

I-184 - BIODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS UTILIZANDO BACTÉRIAS PRESENTES EM BIOFILTROS DE CARVÃO EM ESCALA DE LABORATÓRIO

Rívea Medri Borges⁽¹⁾

Bióloga, Mestre em Recurso Hídricos e Tecnologias Ambientais pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP.

William Deodato Isique

Biólogo pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP de São Jose do Rio Preto. Mestre em Ciência dos Alimentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP de Araraquara. Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química de São Carlos – USP de São Carlos.

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Bióloga pela Universidade de São Paulo. Mestrado em Bioquímica pela Universidade de São Paulo. Doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo. Professora Titular do Departamento de Tecnologia da UNESP – Campus de Jaboticabal.

Edson Pereira Tangerino

Engenheiro Civil pela Escola de Engenharia de Lins (EEL), SP - Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS – Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) – Professor do Departamento de Engenharia Civil da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) – UNESP

Alessandro Minillo

Oceanólogo e Mestre em Oceanografia Física, Química e Geológica pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP) – Pesquisador Visitante pela Faculdade de Engenharia (FAEN) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

Endereço⁽¹⁾: Rua Um, 36 – Vila Maria – Santa Fé do Sul – SP – CEP: 15775-000 – Brasil - Tel: +55 (17) 8153 5874 – email: rivea_borges@hotmail.com

RESUMO

A contaminação dos ambientes aquáticos por compostos farmacêuticos e sua difícil remoção no tratamento convencional de água representam, atualmente, um desafio a muitas companhias de saneamento. Na busca por soluções tecnológicas, o uso da filtração com carvão ativado granular (CAG) em conjunto ao tratamento de água nas Estações de Tratamento de Água (ETA) tem demonstrado resultados satisfatórios; porém, para garantir a eficiência do tratamento, devido a propriedades intrínsecas do carvão, se faz necessário maior manutenção durante o funcionamento do sistema, bem como regeneração periódica dos leitos dos filtros. Entretanto, pesquisas relatam que quando operado em filtração lenta, os filtros CAG são naturalmente colonizados por microorganismos que degradam uma diversidade de compostos retidos nos filtros, contribuindo com a remoção destes, demonstrando ser uma alternativa promissora aos problemas operacionais da filtração. Os fármacos são compostos suscetíveis a degradação por microorganismos presentes na água, nos sedimentos e nos efluentes de esgoto orgânicos. Diante deste aspecto, o presente estudo avaliou a remoção dos fármacos: diclofenaco de sódio, ibuprofeno, naproxeno e amoxicilina por meio de filtros de carvão com atividade biológica (CAB) em condições de laboratório durante 24 semanas, bem como a biodegradação desses compostos por microorganismos aderidos nesses biofiltros, e a identificação filogenética dos microorganismos participantes no processo de degradação dos fármacos testados. Os resultados obtidos demonstram a remoção expressiva dos fármacos acima de 80% e a presença de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Shinella*, e *Sphingomonas* presentes no biofilme, inferindo a participação destes microorganismos durante o processo de biofiltração. A presença de microorganismos com potencial de metabolização pode ser uma alternativa para aumentar o tempo de uso dos filtros de carvão nas ETAs. A possibilidade de isolar, a partir de águas naturais, microorganismos específicos ou consórcios microbianos capazes de remover os compostos farmacêuticos pode representar uma medida considerável para o controle e remoção destas substâncias, possibilitando aumento na qualidade do tratamento da água, principalmente quando as condições adequadas para a biodegradação puderem ser identificadas e impostas aos sistemas de tratamento.

PALAVRAS-CHAVE: Tratamento de água, Filtros de carvão granular biologicamente ativado, Biofilme, Compostos farmacológicos.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a crescente expansão dos centros urbanos, da indústria, da agricultura, e da pecuária, tem contribuído com o aumento na contaminação de rios, lagos e reservatórios. A inexistência de um crescimento populacional planejado, fundamentado em critérios ambientais, deu origem a um cenário crítico, onde se observa que resíduos gerados por centros urbanos e industriais, somados as descargas difusas (de origem urbana e agrícola) despejam diariamente diversas substâncias químicas estranhas aos seres vivos, que deterioram os corpos hídricos.

Dentre as substâncias sintéticas cada vez mais presentes nos ambientes aquáticos, estão os compostos farmacêuticos, que se encontram na formulação de uma série de medicamentos, tais como antimicrobianos, analgésicos, antiinflamatórios, e contraceptivos orais (FENT et al., 2006). O surgimento no ambiente natural desses compostos advém principalmente pelo uso intenso e extensivo no tratamento de doenças; sendo esses excretados pelo organismo na forma não metabolizada ou como metabólitos ativos, introduzidos no meio ambiente, principalmente, a partir do lançamento via efluentes municipais nos corpos receptores de águas servidas, ou pelos efluentes de indústrias que os utilizam em suas atividades (CALAMARI et al., 2003 *apud* REIS FILHO et al., 2007; CHAPMAN, 2006; PETROVIĆ et al., 2005).

Apesar das modernas tecnologias de tratamento adotadas nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), os fármacos não são eliminados completamente durante o tratamento (GHISELLE, 2006). Nas águas naturais, dependendo da capacidade de autodepuração do corpo receptor, e da estabilidade das moléculas, os fármacos podem chegar às águas das populações assentadas à jusante dos lançamentos e até serem transferidas para Estações de Tratamento de Água (ETA), onde não são removidos pelos sistemas de tratamento convencionais (JONES et al., 2005), estendendo-se à água de abastecimento humano, configurando um risco potencial de exposição à saúde humana (WEBB et al., 2003).

A presença de fármacos em águas aduzidas para ETA representa atualmente um desafio para remoção destas substâncias durante o seu tratamento, o que é de extrema importância na manutenção do padrão de qualidade da água de consumo. O desenvolvimento de métodos alternativos no tratamento das águas, como o uso de filtros com carvão ativado biologicamente (CAB), em complemento aos métodos convencionais de tratamento de água pode representar uma proposta promissora para remoção de resíduos de fármacos, entre outras substâncias presentes na água durante seu tratamento em uma ETA (BUNDY et al., 2007). A utilização deste sistema de biofiltração pode ainda representar uma otimização operacional e redução dos custos do tratamento da água em ETA, pela possibilidade de prolongar o tempo de vida útil destes filtros. Outro aspecto a ser considerado, está na possibilidade de reduzir as chances de transpasse de contaminantes do filtro para a água efluente, mantendo assim a produção de água potável com uma mesma eficiência (SIMPSON, 2008).

A principal característica deste sistema de tratamento de água está na capacidade destes biofiltros em remover compostos biodegradáveis através da ação dos microrganismos (SERVAIS et al., 1992). Porém, há a necessidade de um maior conhecimento e compreensão da diversidade de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para a biodegradação de substâncias nocivas, bem como, dos benefícios econômicos e estratégicos, relacionados à utilização desse processo de tratamento. Em todo o mundo, avaliações criteriosas vêm sendo realizadas sobre os efeitos desses no meio aquático e os limites seguros de concentrações de fármacos na água potável, a fim de estabelecer diretrizes e regulamentações objetivando proteger a saúde humana e os ecossistemas naturais dos indesejáveis efeitos destas substâncias. Igualmente, vem sendo realizadas investigações de processos de tratamento que promovam a remoção adequada desses compostos da água potável.

OBJETIVO

Avaliar a capacidade de remoção dos fármacos ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco de sódio e amoxicilina na água em filtros de carvão granular com atividade biológica (CAB) em condições de laboratório. Estimar a biodegradação destes compostos farmacológicos por microrganismos presentes nos filtros CAB, e identificar filogeneticamente estes microorganismos aderidos nestes biofiltros de carvão.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado em três etapas distintas: 1) inicialmente foi realizado, o experimento de remoção dos compostos farmacológicos em filtros de carvão ativados, em bancada de laboratório; 2) na segunda fase foi avaliado a biodegradação de fármacos por microorganismos em condições controladas em laboratório; 3) e finalmente a etapa de identificação filogenética dos microrganismos associados aos filtros biológicos de carvão.

Para o experimento, foi utilizada água natural coletada no reservatório localizado no Bairro Ipê, no município de Ilha Solteira – SP. A área de captação da microbacia da Lagoa do Ipê apresenta aproximadamente 286 ha, de uso urbano-rural, com grande presença de pastagem e cultivos agrícolas anuais e perenes. Segundo Basso & Carvalho (2007), o Índice de Qualidade de Água – IQA, da Lagoa do Ipê apresenta média igual a 58, que conforme Escala de IQA (CETESB, 2004), indica qualidade boa da água. Estudos de caracterização para abastecimento público, realizados por Tavares (2008) mostraram que a água da Lagoa do Ipê se enquadra aos limites estabelecidos por Di Bernardo; Brandão e Heller (1999) para filtração lenta desde que seja submetida a um pré-tratamento.

ENSAIO DE FILTRAÇÃO BIOLÓGICA DOS FÁRMACOS

Para esse ensaio, água de estudo foi filtrada em filtro de celulose (1,0 μm) e esterilizada (120 °C – 15 min), recebendo posteriormente a adição dos compostos farmacológicos: um grupo de antiinflamatórios, constituído pelo diclofenaco (1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$), ibuprofeno (1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$), naproxeno (1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$), e um antibiótico, este representado pela amoxicilina (1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), cujas características estão apresentadas na tabela 1. As concentrações utilizadas reproduzem valores que podem ser encontrados em águas superficiais segundo alguns autores (GHISELLE, 2006; DOUGHTON et al., 2001; ZWIENER; FRIMMEL, 2000). Para prevenir a colonização dos filtros CAG por microrganismos, foi adicionada à água de estudo uma solução de azida de sódio (4 mg.L^{-1}) durante todo o experimento.

O carvão ativado granular utilizado nos filtros foi escolhido com base em ensaios prévios realizados em projetos de pesquisa do Laboratório de Saneamento da FEIS - UNESP. O carvão selecionado foi de casca de coco, com grânulos de 0,35 a 0,50 mm. Este carvão, após ensaios sobre o potencial de adsorção realizados em estudos anteriores no Laboratório de Saneamento, apresentou isoterma do tipo II, segundo a classificação BET (Brunauer-Emmer-Teller) descrita por Brunauer et al. (1938). A isoterma do tipo II, segundo proposto por Gilles et al. (1960) se assemelha a isoterma H4, se caracteriza pela alta afinidade com o soluto adsorvido e onde a adsorção aumenta com o aumento da concentração do soluto na fase líquida até atingir um platô, em que o soluto não mais responde ao aumento da concentração e a adsorção é interrompida.

Para os ensaios de bancada foram utilizados quatro filtros de carvão ativados (CAB) confeccionados em colunas de vidro (borosilicato) de 10 cm, com diâmetro interno de 1,2 cm, preenchidos por 3 cm de uma camada do carvão ativado, aproximadamente 3,5 gramas (peso úmido), conforme observa-se na Figura 1. O carvão utilizado proveio do leito filtrante de uma coluna de polimento contendo carvão ativado da FIME. Em laboratório este carvão recebeu, continuamente, água natural provida do reservatório Ipê por um período de 2 meses. Para o controle foram utilizados quatro filtros semelhantes (CAG) sem a inoculação de biofilme, e de modo a inibir qualquer atividade metabólica de microrganismos foi previamente adicionado ázida de sódio (4 mg.L^{-1}) à água de exposição. A atividade biológica dos filtros CAB foi determinada pela taxa de consumo do oxigênio, em comparação com o controle.

Tabela 1. Características dos compostos farmacológicos em estudo.

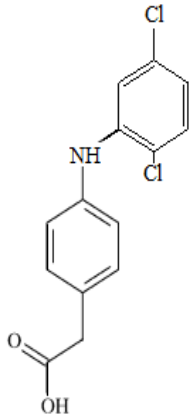
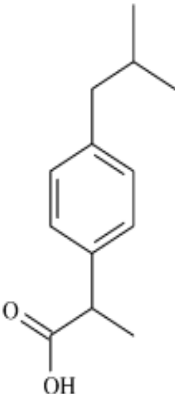
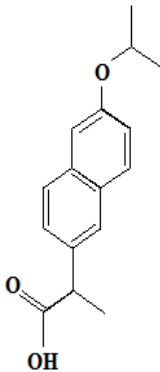
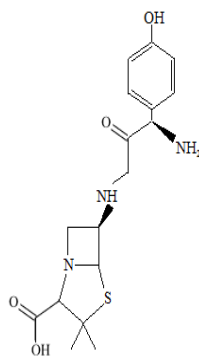
Composto	Diclofenaco	Ibuprofeno	Naproxeno	Amoxicilina
Fórmula	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$	$C_{13}H_{18}O_2$	$C_{14}H_{14}O_3$	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
Peso Mol.	296.14 g.mol ⁻¹	206,3 g.mol ⁻¹	230.24 g.mol ⁻¹	365.38 g.mol ⁻¹
Estrutura Química				
Uso terapêutico	Antiinflamatório	Antiinflamatório	Antiinflamatório	Antibiótico



Figura 1. Filtros de carvão confeccionados para os ensaios de remoção de fármacos (a), com detalhamento de sua estrutura (b).

Após esse período de maturação, as duas configurações de filtros (CAB e CAG) foram expostos a água de estudo em fluxo contínuo por uma bomba peristáltica multicanais (Ismatec RS 232 IN), conforme representado na figura 2. Os filtros foram operados sob fluxo ascendente com taxa de filtração constante e igual a 0,003 m³/m².d, vazão ascensional de 0,3 mL.min⁻¹ e tempo de contato de 12 min. O experimento foi realizado durante 180 dias, sendo recolhidas amostras (200 mL) afluente e efluente dos filtros semanalmente, para leituras do pH (DIGIMED DM 20); determinação das concentrações dos fármacos (HPLC - Prominence, Shimadzu); e níveis de carbono orgânico dissolvido (TOC 5000-A, Shimadzu).

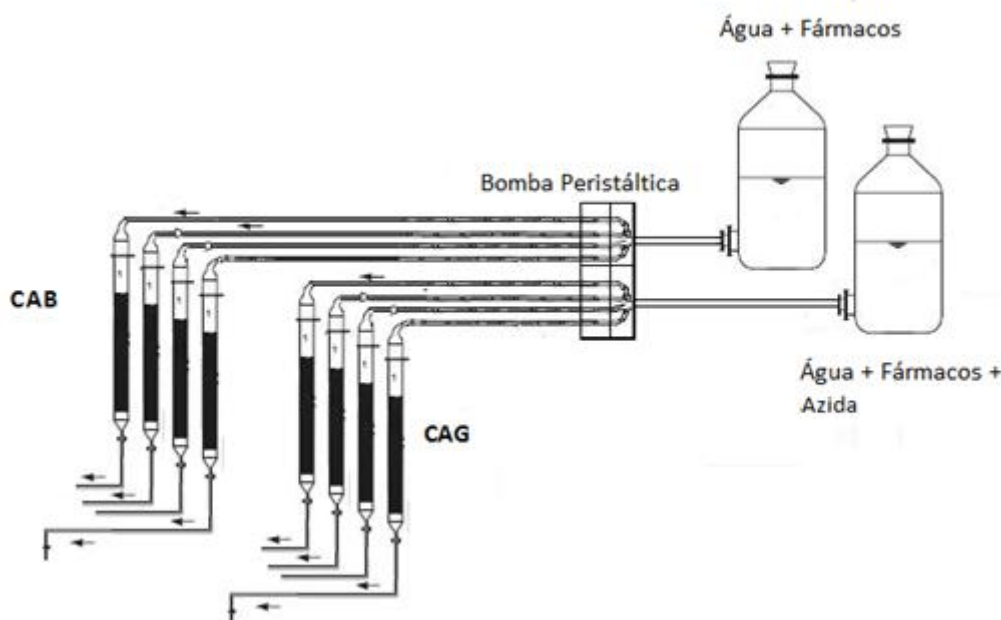


Figura 2. Configuração do sistema experimental com filtros de carvão colonizados e não colonizados por microrganismos.

ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS

Para o experimento, a água coletada no reservatório Ipê foi filtrada em filtro de celulose ($1,0\ \mu\text{m}$), esterilizada ($120\ ^\circ\text{C} - 15\ \text{min}$), recebendo posteriormente a adição do grupo de antiinflamatórios compostos por ibuprofeno ($20\ \mu\text{g.L}^{-1}$), naproxeno ($20\ \mu\text{g.L}^{-1}$) e diclofenaco de sódio ($20\ \mu\text{g.L}^{-1}$) cujas características estão apresentadas na Tabela 5. Os fármacos utilizados nos ensaios foram obtidos pela Sigma-Aldrich, os quais demonstraram ter 97-98% de grau de pureza. As concentrações utilizadas reproduzem valores que podem ser encontrados em águas superficiais segundo alguns autores (GHISELLE, 2006; DOUGHTON *et al.*, 2001; ZWIENER; FRIMMEL, 2000).

Neste ensaio, a água de estudo foi acondicionada em galão de vidro âmbar (4L) esterilizado. Ao galão foram inoculados 10% (v/v) de uma solução aquosa, filtrada ($1,0\ \mu\text{m}$) contendo o biofilme presente em um filtro biológico de carvão da Instalação Piloto de Filtração em Múltiplas Etapas do Departamento de Engenharia Civil (DEC) da FEIS-UNESP. Para o controle foi usado um galão sob as mesmas condições descritas anteriormente, sem o acréscimo do inóculo com microrganismos, e ainda recebendo ázida de sódio ($4\ \text{mg.L}^{-1}$) à água de estudo, a fim de inibir qualquer atividade metabólica de microrganismos. O ensaio foi realizado durante 180 dias, no escuro, mantido em agitação orbital (100 rpm) e temperatura aproximada de $23 \pm 2\ ^\circ\text{C}$. Foram recolhidas amostras (100 mL) semanalmente para leituras do pH (Digimed DM 20) e a quantificação das concentrações dos fármacos (HPLC - Prominence, Shimadzu).

ANÁLISE DOS COMPOSTOS FARMACOLÓGICOS EM CROMATRÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a extração dos fármacos foi empregada a técnica de extração em fase sólida (SPE) com cartuchos do tipo C18, conforme metodologia adaptada de Nebot *et al.* (2007). A determinação dos fármacos utilizados no estudo foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu), equipado com detector "Photodiode Array" (SPD-M20A), duas bombas de alta pressão (LC-20AT e LC 20AD), em coluna de fase reversa C-18 (modelo Shim-pack), com $4,6 \times 250\ \text{mm}$ e diâmetro de partícula de $5\ \mu\text{m}$, segundo Nebot *et al.* (2007), com adaptações. A fase móvel foi constituída por metanol e água acidificada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA), sendo utilizado um fluxo de $1\ \text{mL/min}$ e um tempo de corrida de 18 minutos para cada amostra analisada, em triplicata.

A identificação de cada fármaco foi efetuada de acordo com os seus respectivos tempos de retenção e também através de cada perfil espectrofotométrico, nos comprimentos de onda específicos de detecção para cada composto. As curvas analíticas foram efetuadas através do método do padrão interno, concomitantemente os limites de detecção (LD) e os limites de quantificação (LQ) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) também foram obtidos por meio de planilha de validação proposta por Ribeiro e Ferreira (2008). A seguir está apresentado o perfil cromatográfico (Figura 3) dos padrões utilizados como base de reconhecimento para os fármacos estudados nas amostras recolhidas afluente e efluentes dos filtros de carvão colonizados (CAB) e não colonizados por microrganismos (CAG).

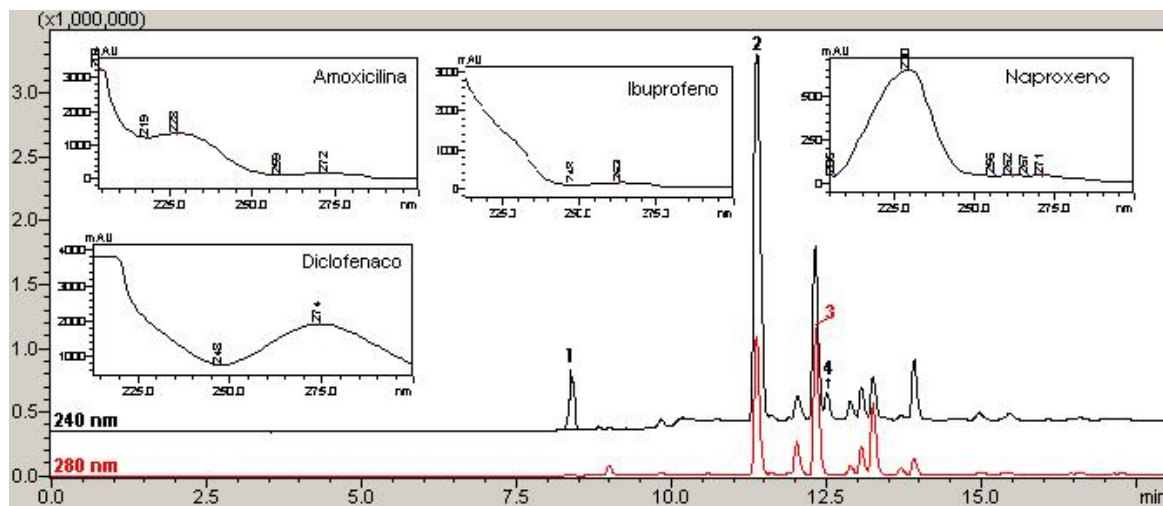


Figura 3 - Perfil cromatográfico de padrões de fármacos: 1- Amoxicilina (T.R: 8.36); 2- Naproxeno (T.R: 11.38), 3- Diclofenaco (T.R: 12.33) e 4- Ibuprofeno (T.R: 12.50). Coluna: LC Column Shim-pack C₁₈ (250 mm x 4.6 mm ID, partículas de 5,0 μm), comprimentos de onda (240 e 280 nm).

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS MICRORGANISMOS NOS FILTROS CAB

Os microrganismos presentes nos filtros CAB foram submetidos ao processo de isolamento e caracterização filogenética, por meio da retirada de um volume (1 mL) de amostra na superfície e interior dos filtros CAB. O material recolhido foi homogeneizado, sendo realizadas diluições decimais de uma alíquota (1 mL) em solução de Ringer para o posterior plaqueamento em meios sólidos contendo meio de cultura PCA. As placas (Figura 4ab) foram incubadas a 25 °C, no escuro, por uma semana.

Após incubação, foram observadas as principais características das colônias obtidas. O isolado de cada colônia foi obtido por meio de sucessivos plaqueamentos por esgotamento em estrias (figura 4c), e então transferidas para tubos de ensaio contendo o meio de cultivo inclinado (figura 4d), e mantidas em refrigeração a 25°C. Para cada colônia isolada foram observadas características morfológicas (coloração, tamanho e tipo de borda das colônias), coloração diferencial de Gram, e verificação da formação de esporos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003), de modo a obter informações dos possíveis grupos microbianos presentes nos filtros, em seguida, foi realizado a produção massiva de cada isolado para extração do DNA e identificação filogenética.

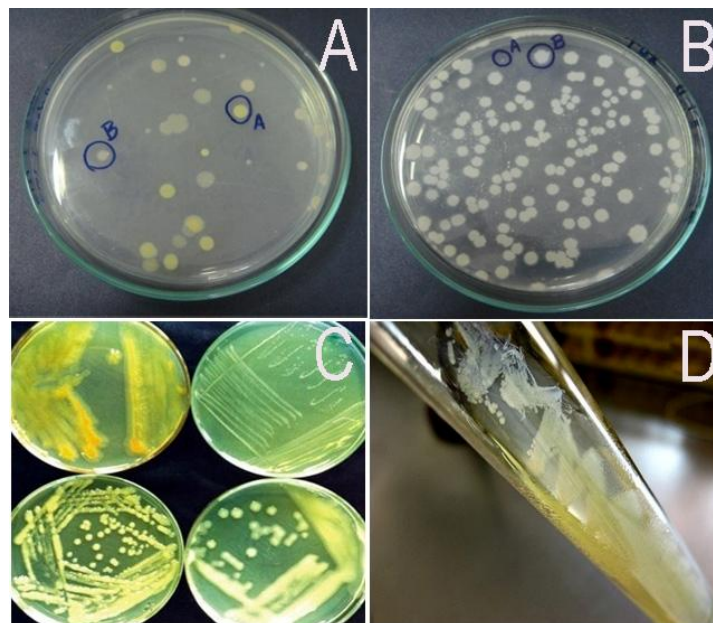


Figura 4 Crescimento das colônias de bactérias após o plaqueamento (A e B). Plaqueamento por esgotamento em estrias (C). Tubos de ensaio contendo o meio de cultivo inclinado (D).

Os microorganismos isolados foram cultivados em tubos Falcon com o meio de cultura durante 24 horas. Os cultivados foram centrifugados a 5000 rpm durante 9 minutos, sendo os precipitados (5 mL) encaminhados para a extração do DNA ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas da UNESP de Jaboticabal. A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando o *Kit FastDNA® SPIN Kit for Soil* (BIO 101-Quantum Biotechnologies), seguindo as instruções do fabricante. O gene 16S rRNA do material genético extraído de cada amostra foi amplificado pela técnica de PCR. Os *amplicons* gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose e visualizado em um fotodocumentador (Gel Doc 1000).

Os produtos de PCR do gene 16S rRNA foram seqüenciados em um seqüenciador de capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As seqüências foram analisadas com o auxílio do programa *Sequencing Analysis 3.4* e pelo programa Phred/Phrap (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998) e comparadas com os bancos de dados de genes ribossomais: *Ribosomal Database Project II* (RDP II), através do programa *Classifier* e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), por meio do programa *Blast*. Todas as seqüências do gene 16S rRNA obtidas neste estudo foram cadastradas no Banco Internacional de Genes (*GenBank*).

ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados obtidos durante o estudo foram armazenados em planilhas eletrônicas Excel e submetidos a análises estatísticas com o teste de Tukey ($p < 0,05$) através do Software Estatístico *SPSS 11.5 for Windows*, de modo a avaliar o desempenho dos filtros, bem como o comportamento destes frente a outros parâmetros físicos e químicos da água de estudo.

RESULTADOS

REMOÇÃO DOS FÁRMACOS EM FILTROS CAB E CAG

Os resultados exibiram a remoção dos quatro fármacos no filtro CAB durante o período avaliado, sendo os valores ligeiramente maiores registrados próximos aos encontrados no efluente dos filtros CAG. Embora os filtros colonizados com microrganismos tenham apresentado um maior percentual de remoção ($>80\%$) para todos os fármacos em relação aos filtros não colonizados ($<80\%$), não foi verificada uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na remoção dos fármacos entre os filtros testados. Os filtros CAG apresentaram eficiência média acima de 80% apenas para naproxeno e ibuprofeno, sendo que neste tratamento, essas substâncias apresentaram maiores níveis de remoção. Os resultados estão apresentados na figura 5 a seguir

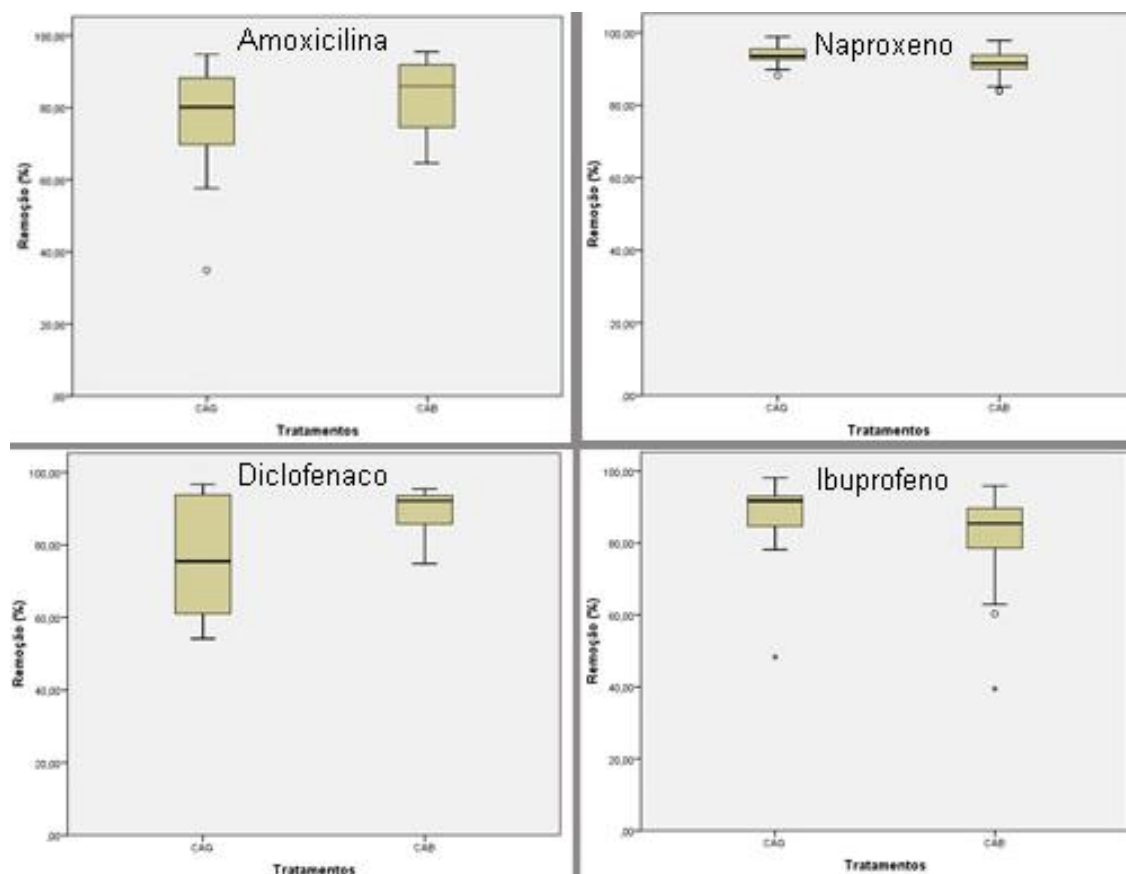


Figura 5. Distribuição dos valores de remoção nos filtros CAG e CAB.

Pode-se constatar que os filtros apresentaram um padrão semelhante de elevada remoção dos compostos farmacológicos, demonstrando que o carvão ativado granular utilizado, assim como as condições experimentais, foram favoráveis para a elevada capacidade de adsorção das substâncias farmacêuticas durante o experimento. A baixa dispersão relativa nos percentuais de remoção dos quatro compostos testados durante o ensaio nos filtros CAB ($CV \leq 15$), com residuais no efluente dos filtros em média menores que $0,5\mu\text{g.L}^{-1}$ comprovam que a combinação dos processos de adsorção e biodegradação minimizam a flutuação da concentração dos contaminantes na água afluyente (AKTAS; ÇEÇEN, 2007).

Nos filtros CAG, a maior dispersão temporal na eficiência de remoção dos fármacos deve-se principalmente pela oscilação da concentração afluyente dos contaminantes. A diminuição na concentração do adsorvato no afluyente altera o equilíbrio da reação de adsorção em CAG. Na reação reversível de adsorção, as moléculas do adsorvato acumulando-se do meio de maior concentração (água) para a superfície de menor concentração (carvão), com a queda na concentração do adsorvato no afluyente, a taxa da reação de adsorção diminui, gerando menor adsorção dos fármacos (BRADY, 1997). Caso a concentração dos fármacos no afluyente seja menor que a concentração do carvão poderá ocorrer a reação reversa (dessorção), porém este efeito não foi observado no presente estudo.

A literatura tem demonstrado que a vida útil do CAG em ETA, dependendo das características da água bruta e do adsorvato, está em torno de 6 a 12 meses (DUSSERT; VAN STONE, 1994 apud SIMPSON, 2008). A redução da vida útil do carvão no leito filtrante pode ser observada pela perda significativa na eficiência de adsorção e pelo transpasse de concentrações consideráveis das moléculas adsorvidas para a água (HO, 2004; WANG et al., 2007). No presente estudo não foi observado saturação dos sítios de ligação do carvão durante os 6 meses de ensaios realizados.

ENSAIO DE BIODEGRADAÇÃO DOS FÁRMACOS

A biodegradação dos fármacos durante o experimento foi observada, pode-se verificar que o composto ibuprofeno foi o que apresentou os maiores níveis de biodegradação (Figura 6A), seguidos pelo diclofenaco de sódio (Figura 6B), enquanto que o naproxeno (Figura 6C) apresentou valores ligeiramente reduzidos. O ibuprofeno apresentou rápida biodegradação entre a segunda e terceira semana de ensaio, enquanto que o diclofenaco e o naproxeno obtiveram uma degradação significativa, somente após a sexta semana de experimento, comprovando a estabilidade dessas moléculas e sua difícil degradabilidade no meio natural. De modo geral, cada composto farmacológico apresentou um padrão distinto de biodegradação e degradação natural.

Foi verificada expressiva degradação natural apenas do composto ibuprofeno, já com naproxeno e diclofenaco observou-se uma degradação natural reduzida, comprovando a estabilidade dessas moléculas no meio aquático. O pH entre os tratamentos testados revelaram um comportamento de semelhança entre estes, com valores próximos à neutralidade.

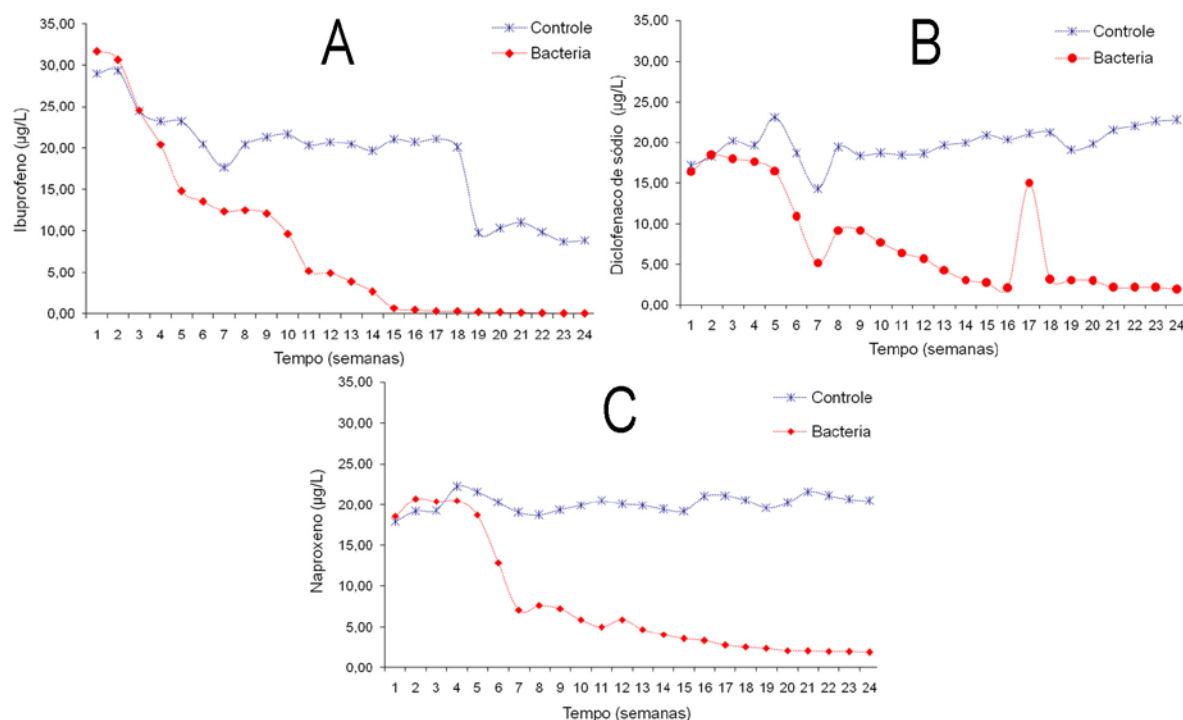


Figura 6. Concentrações dos compostos farmacológicos quantificados entre os tratamentos testados durante o ensaio.

As substâncias avaliadas nesse estudo representam importantes grupos de drogas com diferentes estruturas químicas e modos de ação. Nenhum dos compostos avaliados foi sintetizado rapidamente, visto que no ensaio de biodegradação foram necessárias 5 semanas para se observar níveis da degradação biológica. Contudo, os resultados indicaram capacidade de metabolização dos fármacos pelos microrganismos presentes no meio inoculante.

De modo geral verificou-se que a degradação dos fármacos testados durante todo o experimento atingiu valores próximos a 90% para diclofenaco e naproxeno e 99% para o ibuprofeno. Em concordância com outros trabalhos envolvendo o uso de bactérias como uma via de degradação de fármacos em ensaios de laboratório (CHUA et al., 1996), o presente estudo evidencia a capacidade de metabolização desses compostos por microrganismos (bactérias) presentes nos filtros biológicos de carvão.

Com base nos resultados estima-se que o declínio dos elementos nutricionais ao longo do tempo induz os microrganismos a utilizar os fármacos como fonte de carbono e energia, proporcionou a degradação. Uma situação semelhante foi observada por Park et al. (2001) no trabalho de degradação de microcistina, que

verificaram tempo de degradação do contaminante quatro vezes superior em água com ausência de nutrientes orgânicos.

CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NOS FILTROS CAB

A partir do material isolado e cultivado dos filtros CAB segundo os métodos microbiológicos tradicionais, foram obtidas 31 amostras de microrganismos, sendo estas representadas em sua totalidade por colônias bacterianas integrantes dos filos Firmicutes (19), Proteobacteria (12). Conforme descrito na tabela 2, através das seqüências do gene 16S rRNA amplificadas a partir do DNA das amostras isoladas foram identificados um total de 6 gêneros distintos (*Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Shinella*, e *Sphingomonas*), com destaque ao gênero *Bacillus*, o qual apresentou predomínio nas amostras. Em uma destas amostras foi possível a classificação somente a nível de família (Pseudomonadaceae).

A análise realizada sobre a diversidade biológica de microrganismos associados ao biofilme dos filtros CAB constatou a dominância de bactérias do gênero *Bacillus*. Este gênero é composto por microorganismos considerados ubíquos podendo ser isolados do solo, da água doce e salgada e em gêneros alimentícios. Algumas espécies do gênero *Bacillus* aderem fortemente a diversas superfícies sólidas, as estruturas responsáveis na adesão não são totalmente conhecidas, porém no caso do *Bacillus cereus* sabe-se que a presença de filamentos semelhantes ao pili (apêndice filiforme encontrado na superfície de algumas bactérias) facilita sua fixação. A elevada capacidade de fixação promove a adesão das bactérias à camada filtrante beneficiando a formação do biofilme (HUSMARK; RÖNNER, 1990).

A prevalência do gênero *Bacillus* provavelmente foi favorecida pela introdução de amoxicilina na água de estudo, o que promoveu a colonização dos filtros por bactérias resistentes a presença desse antibiótico. A amoxicilina é um antibiótico beta-lactâmico, que atua destruindo a parede das células bacterianas, pois se une a uma grande variedade de proteínas responsáveis pela produção de enzimas que sintetizam os alimentos, deixando-as sem ação.

O gênero *Bacillus*, o qual se demonstrou dominante nos cultivos desse experimento, possui várias espécies produtoras da enzima β -lactamase, responsáveis pela resistência a antibióticos β -lactâmicos. Esta enzima quebra o anel de quatro átomos conhecido como β -lactama (Figura 7), desativando as propriedades antibacterianas da molécula. Presume-se que a dominância desse gênero de bactérias corresponde à resistência à amoxicilina e sua elevada capacidade de sintetizá-la e utilizá-la como fonte de carbono e nitrogênio (BLAU et al., 2006). Deve-se considerar que além da ação de enzimas específicas no efeito de quebra da molécula do fármaco, há combinação com outros fatores que podem atuar conjuntamente, influenciando o processo de degradação dos antibióticos β -lactâmicos, dentre esses se destacam a temperatura, o pH e a tensão de oxigênio dissolvido (SANYAL et al., 1992).

Com base nos resultados, pode-se verificar a presença do gênero *Pseudomonas*. Segundo Smith et al. (1990) este gênero sob condições aeróbicas, também apresenta a habilidade de utilizar uma diversidade de compostos recalcitrantes como fontes de energia e de carbono. A versatilidade do gênero *Pseudomonas* em crescer e metabolizar diferentes compostos orgânicos o torna amplamente descrito na literatura, especialmente quanto ao seu uso no tratamento de esgoto (KHAN et al., 2006). Este mesmo gênero de bactéria é descrito em razão de sua ampla capacidade em utilizar uma variedade de substratos orgânicos, como fonte de carbono, além da excepcional habilidade de colonizar nichos ecológicos diversos, nas quais a oferta de nutrientes é limitada. A capacidade das *Pseudomonas* em sobreviver por longos períodos em ambientes úmidos variados contribuem para as suas características ubiquitárias (KHAN et al., 2006). Estudo realizados por Minillo et al. (2009) apontaram a capacidade de microrganismos formadores do biofilme em filtros biológicos de carvão em biodegradar compostos farmacológicos. Segundo estes autores bactérias gram-negativas, estas representadas, principalmente pelo gênero *Pseudomonas* promoveram a depleção de três compostos farmacológicos (cefalexina, diclofenaco de sódio e paracetamol).

Tabela 2. Caracterização dos isolados obtidos dos filtros biológicos de carvão e disponibilizados no GeneBank.

Isolados	Acesso GenBank	Organismo	% similar
R1	GU826150.1	<i>Bacillus anthracis</i>	97%
R2	FJ390475.1	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	93%
R3	FJ957720.1	<i>Bacillus pumilus</i>	91%
R4	HM441232.1	<i>Bacillus sp.</i>	94%
R5	GU122951.1	<i>Bacillus sp.</i>	89%
R6	GU374115.1	<i>Bacillus sp.</i>	94%
R7	EF428970.1	<i>Bacillus sp.</i>	97%
R8	HM152752.1	<i>Bacillus sp.</i>	93%
R9	EU333143.1	<i>Bacillus sp.</i>	93%
R10	HM836048.1	<i>Bacillus sp.</i>	92%
R11	HM836926.1	<i>Bacillus sp.</i>	88%
R12	HM775374.1	<i>Bacillus sp.</i>	93%
R13	EU333117.1	<i>Bacillus sp.</i>	92%
R14	FJ950671.1	<i>Bacillus sp.</i>	93%
R15	FJ686822.1	<i>Bacillus sp.</i>	93%
R16	GU566355.1	<i>Bacillus sp.</i>	98%
R17	HM776394.1	<i>Bacillus sp.</i>	88%
R18	FJ959367.1	<i>Bacillus subtilis</i>	93%
R19	CP001903.1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99%
R20	AB091183.1	<i>Burkholderia fungorum</i>	90%
R21	AJ884809.1	<i>Burkholderia sp.</i>	90%
R22	AB545639.1	<i>Burkholderia sp.</i>	86%
R23	GU969241.1	<i>Cupriavidus sp.</i>	86%
R24	EF511678.1	<i>Pseudomonadaceae</i>	89%
R25	GU969239.1	<i>Pseudomonas panipatensis</i>	89%
R26	AM083997.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	92%
R27	GQ332344.2	<i>Pseudomonas sp.</i>	89%
R28	FR682932.1	<i>Pseudomonas sp.</i>	92%
R29	AB285481.1	<i>Shinella yambaruensis</i>	83%
R30	FJ382941.1	<i>Sphingomonas sp.</i>	84%
R31	DQ337548.1	<i>Sphingomonas sp.</i>	86%

Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Ribosomal Database Project (RDP).

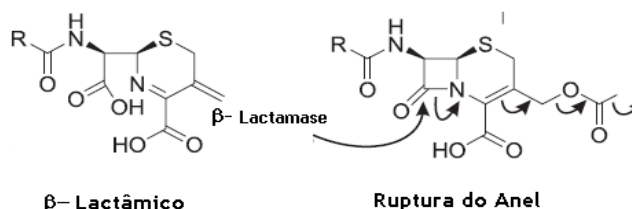


Figura 7 - Atuação da enzima β -Lactamase no anel β -lactâmico.

A ocorrência de representantes dos gêneros *Burkholderia*, *Shinella* e *Sphingomonas* nas amostras analisadas demonstram a participação diretamente destes grupos no consumo de fármacos. Estudos realizados por Murdoch e Hay (2005) revelaram diversas estratégias metabólicas realizadas pelas *Sphingomonas* na degradação de ibuprofeno, propondo que a sequência de reações ocorre conforme figura 8. O gênero *Sphingomonas* também vem sendo descrito em trabalhos de filtração biológica em carvão e areia, onde isolados específicos de *Sphingomonas* foram inoculados no sistema filtrante com objetivo de remover microcistinas da água potável (BOURNE et al., 2006; WANG et al., 2007).

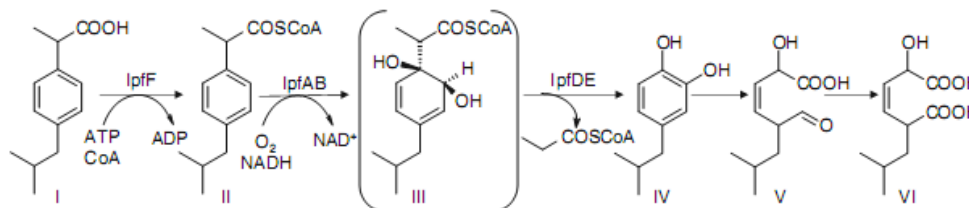


Figura 8 – Possível rota de degradação de ibuprofeno por *Sphingomonas* sp. Fonte: Murdoch e Hay (2005, 2006).

A presença de bactérias do gênero *Burkholderia* nos isolados cultivados dos filtros CAB evidencia o potencial desses microrganismos em biodegradarem compostos farmacêuticos, visto que, trabalhos realizados sobre a degradação de antibióticos destacam o gênero *Burkholderia* como um dos microrganismos do ambiente natural capazes de consumir esses compostos (DANTAS et al., 2008). Estudos realizados por Lemes et al. (2008) com outros compostos recalcitrantes ao tratamento de água, reportam sobre a ampla capacidade do gênero *Burkholderia* em degradar eficientemente cianotoxinas, demonstrando seu potencial de utilização em processos de filtração biológica. O gênero *Cupriavidus* classificado na família Burkholderiaceae, apesar de nenhum relato sobre degradação de fármacos, possivelmente contém as mesmas características genéticas das espécies *Burkholderia* sp., que os proporciona a habilidade em consumir os compostos analisados. Estudos relatam a capacidade dos gêneros *Cupriavidus* e *Shinella* em degradar outros micropoluentes (IWAKI; HASEGAWA, 2007; BAI et al., 2009). Todavia, demonstrou-se o potencial de grande variedade de gêneros de bactérias que podem degradar estes compostos, conforme outros relatos (KAGLE et al., 2009).

O presente estudo demonstra que alguns as bactérias participam na degradação dos compostos farmacêuticos. Na ordem de elucidar a degradação microbiológica dos fármacos nos tratamento avaliados, devemos focar a importância da atividade sinérgica dos microrganismos formadores da microflora no biofilme dos filtros de carvão como agentes da metabolização deste composto. Deve ser destacada a possível presença de linhagens de bactérias que eventualmente não se desenvolveram nas placas de cultivo, mas que poderiam atuar no consumo dos fármacos de forma direta ou, contribuindo com a formação dos consórcios microbianos. O isolamento e o cultivo de microrganismo é o método tradicional para caracterização microbiana, mas somente uma pequena parcela variando de 0,1% a 1,0% de bactérias são cultiváveis utilizando os métodos padrões de cultivo (TORSVIK, et al. 2002 apud PAIXÃO, 2009). Desta forma, torna-se imprescindível a realização de uma varredura da diversidade microbiana presente no biofilme dos filtros biológicos de carvão, o que auxiliaria na verificação da presença de grupos bacterianos que estariam atuando conjuntamente na metabolização dos fármacos utilizadas no estudo.

Através desse estudo, podemos inferir que esses microrganismos de forma direta ou indireta participam nas reações de degradação dos compostos em estudo, e foi possível comprovar a importância de microrganismos como agentes degradadores de compostos farmacêuticos, demonstrando que o uso das técnicas de biorremediação pode ser um método explorado no controle e remoção de fármacos em ambientes contaminados. As bactérias estão entre os organismos que melhor interagem na dinâmica de biorremediação, muitas vezes, assumindo o papel central na biorremediação, em razão da sua capacidade de degradar uma série de poluentes, enquanto que outros organismos (e.g., fungos e protozoários) podem favorecer ou mesmo afetar esta dinâmica (WATANABE, 2001).

Segundo López et al. (2005) a remoção de um determinado composto xenobiótico (e.g., fármacos) deve oferecer uma boa alternativa na relação custo-eficácia entre os métodos não biológicos utilizados para o tratamento de águas e solos contaminados. Os resultados encontrados nesse estudo evidenciaram uma eficácia da atividade microbiana promovida por bactérias como agentes de degradação de fármacos na água. Este padrão corrobora a tendência reportada na literatura sobre a importância das vias metabólicas dos microrganismos como uma forma de quebra das moléculas de alguns compostos xenobióticos (SCHRAP et al., 2000; JOHNSEN et al., 2001).

A possibilidade de isolar microrganismos específicos ou consórcios microbianos adaptados em remover poluentes a partir de águas residuais ou água potável, pode representar uma medida considerável para o controle e remoção destas substâncias, possibilitando aumento na qualidade do tratamento da água. Desta forma, são necessários novos estudos envolvendo processos não convencionais para o tratamento de água contendo pesticidas (filtros biológicos de carvão) combinados aos processos convencionais em operação nas Estações de Tratamento de Água (ETA) para aumentar a eficiência na remoção dos mesmos.

CONCLUSÕES

Sobre as condições empregadas no presente estudo, foi constatada a remoção dos compostos farmacológicos em ambos os filtros testados; sendo que os filtros de carvão colonizados por microrganismos apresentaram capacidade de retenção dos fármacos próxima aos filtros de carvão não colonizados por microrganismos;

Os filtros de carvão ativado, nas condições empregadas nesse estudo, demonstraram-se favoráveis como suporte para o desenvolvimento de microrganismos (biofilme) capazes de metabolizar os compostos farmacológicos testados;

Foi constatado o predomínio de bactérias como microrganismos associados aos filtros de carvão, sendo estas capazes de degradar os compostos, utilizando-os como fonte de carbono no seu metabolismo;

Foram registrados seis gêneros distintos de bactérias formadoras do biofilme (*Bacillus*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Shinella*, e *Sphingomonas*) com destaque ao gênero *Bacillus* que apresentou domínio;

O sucesso da capacidade destes microrganismos (bactérias) em degradarem os compostos farmacológicos testados neste estudo sugere sua potencial utilização em processos de biofiltração em ETAs;

O uso de linhagens específicas de microrganismos capazes de metabolizarem eficientemente estes fármacos pode vir a representar uma proposta para a ativação biológica no leito de filtros de carvão, o que poderia contribuir no aumento da eficiência na remoção destes compostos durante o tratamento de água;

O uso de filtros biológicos de carvão pode representar uma medida alternativa no tratamento de água para remoção de fármacos e outros compostos orgânicos que contaminem os mananciais de abastecimento público.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKTAS, O.; ÇEÇEN, F. Bioregeneration of activated carbon: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Barking, v. 59, p. 257-272, 2007.
2. BAI, Y. H. et al. Aerobic degradation of pyridine by a new bacterial strain, *Shinella zoogloeoides* BC026. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 36, p. 1391-1400, 2009.

3. BASSO, E. R.; CARVALHO, S. L. Avaliação da qualidade da água em duas represas e uma lagoa no município de Ilha Solteira (SP). *Holos Environment*, Rio Claro, v. 7, n. 1, p. 16, 2007.
4. BLAU, L.; MENEGON, R. F.; CHIN-CHUNG, M. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. *Química Nova*, São Carlos, v. 29, n. 6, p. 1307-1317, 2006.
5. BOURNE, D. G. et al. Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Research*, New York, v. 40, p. 1294-1302, 2006.
6. BRADY, R. D. Activated carbon processes. In: AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION – AWWA; AMERICAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS – ASCE. *Water treatment plant design*. New York: McGraw-Hill, 1997. p. 377-416.
7. BRUNAUER, S.; EMMETT, P.; TELLER, J. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, Easton, v. 60, p. 309-319, 1938.
8. BUNDY, M. M. et al. Removal of pharmaceuticals and related compounds by a bench-scale drinking water treatment system. *Journal of Water Supply: Research and Technology -AQUA*, London, v. 56, n. 2, p. 105-115, 2007.
9. CALAMARI, D. et al. Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environmental Science and Technology*, Easton, v. 37, n. 7, p. 1241-1248, 2003.
10. COMPANHIA ESTADUAL DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO BÁSICO – CETESB. Relatório da qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, 2004.
11. CHAPMAN, P. M. Emergin substances: emerging problems? *Environmental Toxicology and Chemistry*, New York, v. 25, n. 6, p. 1445-1447, 2006.
12. CHUA, H. I.; YAW, M. G. S.; NG, W. J. Bacterial populations and their roles in a pharmaceutical-waste anaerobic filter. *Water Research*, New York, v. 30, n. 12, p. 3007-3016, 1996.
13. DANTAS, G. et al. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, Washington, DC, v. 320, p. 100-103, 2008.
14. DI BERNARDO, L.; BRANDÃO, C. C. S.; HELLER, L. Tratamento de água de abastecimento por filtração em múltiplas etapas. Rio de Janeiro: ABES, 1999, 114 p.
15. DOUGHTON, C. G.; JONES-LEPP, T. L. (Eds.). *Pharmaceuticals in the enviroment: overarching issues and overview*, in *pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues*. Washington, DC: American Chemical Society, 2001. P. 2-38. (Symposium Series, 791).
16. DUSSERT, B.; VAN STONE, G. The biological active carbon process for water purification. *Water Engineering and Management*, Des Plaines, v. 141, n. 12, p. 22–24, 1994.
17. FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, v. 76, n. 2, p. 122-159, 2006.
18. GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
19. GILLES, C. H. et al. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society*, Cambridge, v. 2, p. 3973-3993, 1960.
20. HO, L. The removal of cyanobacterial metabolites from drinking water using ozone and granular activated carbon. 2004. Thesis (Ph.D.) - University of South Australia, Adelaide, Australia, 2004.
21. HUSMARK, U.; RÖNNER, U. Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v. 69, p. 557-562, 1990.
22. IWAKI, H.; HASEGAWA, Y. Degradation of 2-nitrobenzoate by *Burkholderia terrae* strain KU-15. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Tokyo, v. 71, n. 1, p. 145-151, 2007.
23. JONES, O. A.; LESTER J. N.; VOULVOULIS N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? *Trends in Biotechnology*, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 163-168, 2005.
24. JOHNSEN, K. et al. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils: a review. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v. 33, p. 443–453, 2001.
25. KAGLE, J. et al. Biodegradation of Pharmaceutical and Personal Care Products. *Advances in Applied Microbiology*, San Diego, v. 67, p. 65-108, 2009.
26. KHAN, S.A.; HAMAYUN, M.; AHMED, S. Degradation of 4-aminophenol by newly isolated *Pseudomonas sp.* strain ST-4. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v. 38, p. 10-13, 2006.
27. LEMES, G. A. F. et al. Biodegradation of Microcystin by Aquatic *Burkholderia sp.* from a South Brazilian Coastal Lagoon. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 69, p. 358-365, 2008.
28. LÓPEZ, L. et al. Identification of Bacteria Isolated from an Oligotrophic Lake. *Ecotoxicology*, [S.l.], v. 14, p. 299-312, 2005.

29. MINILLO, A. et al. Biodegradação de fármacos na água por microrganismos associados em filtros biológicos de carvão. *Revista DAE, São Paulo*, v. 179, p. 42-49, 2009.
30. MURDOCH, R. W.; HAY, A. G. Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 71, p. 6121-6125, 2005.
31. NEBOT, C; GIBB, S. W.; BOYD, K. G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 598, p. 87-94, 2007.
32. PAIXÃO, D. A. A. Prospecção gênica e diversidade bacteriana de um consórcio degradador de óleo diesel. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.
33. PARK, H. D. et al. Degradation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin by a new bacterium isolated from a hypertrophic lake. *Environmental Toxicology*, New York, v. 16, p. 337-343, 2001.
34. REIS FILHO, R. W. et al. Fármacos, ETE's e corpos hídricos. *Revista Ambi-Água*, Taubaté, v. 2, n. 3, p. 54-61, 2007.
35. SANYAL, A. K.; CHOWDHUR, Y; BANERJEE, A. B. Generation of high antimycotic activity during degradation of p-lactam antibiotic. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 14, p. 221-223, 1992.
36. SCHRAP, S. M.; HEUVEL, H.; MEULEN, J.; RUITER, H.; PARSONS, J.R. A chemostat system for investigating pesticide biodegradation in continuous mixed bacteria cultures originating from surface water. *Chemosphere*, Oxford, v. 40, p. 1389- 1397, 2000.
37. SERVAIS, P. et al. A pilot study of biological GAC filtration in drinking water treatment. *Journal of Water Supply: Research and Technology -AQUA*, London, v. 41, n. 3, p.163-168, 1992.
38. SIMPSON, D. R. Biofilm processes in biologically active carbon water purification. *Water Research*, New York, v. 42, p. 2839-2848, 2008.
39. SMITH, G.B.; DEZENY, C.; DOUGLAS, W. Stability and kinetics of degradation of imipenem in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Washington, DC, v. 79, p. 732-740, 1990.
40. TAVARES, B. M. Utilização de colunas verticais de filtração em manta e areia como pré-tratamento de filtro lento. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2008.
41. TORSVIK, V. et al. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, Oxford, v. 5, p. 240-245, 2002.
42. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. São Paulo: Artmed, 2003.
43. WANG, H. et al. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. *Water Research*, New York, v. 41, p. 4262–4270, 2007.
44. WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Environmental Biotechnology*, Oxford, v. 12, p. 237–241, 2001.
45. WEBB, S. et al. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 142, p. 157-167, 2003.
46. ZWIENER, C.; FRIMMEL, F. H. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Research*, New York, v. 34, n. 6, p. 1881-1885, 2000.