



VI-011 - ESTUDO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE ANTIARRÍTMICOS (ATENOLOL, METROPOLOL E PROPRANOLOL), ANTITÉRMICO (DICLOFENACO DE SÓDIO) E ANTILIPÊMICO (FENOFIBRATO) POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO SOLO

Alexandre Nunes Ponezi⁽¹⁾

Bacharelado em Ciências Biológicas, UNIARARAS. Mestre em Engenharia de Alimentos FEA/UNICAMP; Doutorado em Engenharia Civil – Departamento de Saneamento e Ambiente FEC/UNICAMP.

Marcia Cristina Claudino⁽¹⁾

Graduação em Biologia PUCC-Campinas

Adilson Sartoratto⁽¹⁾

Graduação em Química IQ/UNICAMP; Mestrado em Química Analítica IQ/UNICAMP; Doutorado em Química Analítica IQ/UNICAMP.

Marta Cristina Teixeira Duarte⁽¹⁾

Bacharelado em Ciências Biológicas UNESP/Rio Claro; Mestrado em Biologia Vegetal – Bioquímica de organismos UNESP/Rio Claro; Doutorado em Biologia Vegetal – Bioquímica de organismos UNESP/Rio Claro.

Endereço⁽¹⁾: Rua Alexandre Caselatto, 999- Vila Betel – Paulínia - SP - CEP: 13140-000 - Brasil - Tel: (1) 2139 – 2872 e-mail: ponezi@cpqba.unicamp.br

RESUMO

Vários trabalhos publicados na literatura especializada mencionam a presença de fármacos em matrizes ambientais tais como água, solo e sedimentos, os quais são potencialmente prejudiciais à saúde humana e de animais de vida terrestre e aquática. Algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicadas na medicina humana e veterinária. Geralmente, a produção exata não é publicada na literatura. Vários pesquisadores vêm demonstrando a presença destes fármacos e seus metabólitos no ambiente aquático em várias partes do mundo, como Alemanha, Brasil, Canadá, Holanda, Inglaterra, Itália, Suécia, Estados Unidos e Reino Unido. Neste trabalho foram estudados o potencial de biodegradação de antiarrítmicos (Atenolol, Metoprolol e Propranolol), antitérmico (diclofenaco de sódio) e antilipêmico (fenofibrato), por grupos bacterianos isolados do solo. As análises dos compostos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os resultados mostram que para o grupo dos antiarrítmicos a biodegradação se deu em valores menores que 10%. No caso do diclofenaco de sódio, cerca de 50% foi biodegradado, enquanto o antilipêmico foi reduzido apenas quando utilizada concentração de 250µg. Acima ou abaixo desta concentração não houve degradação. Dentro das condições experimentais os fármacos estudados apresentaram baixa remoção ambiental, com grande potencial de acumulação no ambiente aquático.

PALAVRAS-CHAVE: Fármacos, Biodegradação, Bactérias do solo, CLAE.

INTRODUÇÃO

Os fármacos são desenvolvidos para ser persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. Porém, segundo MULROY 2001, 50% a 90% de uma dosagem do fármaco são excretados inalterados e persistem no ambiente. De acordo com KUMMERER 2001, alguns grupos de fármacos residuais merecem uma atenção especial, dentre eles estão os antibióticos pelo seu potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes e os estrogênios pelo seu potencial de afetar adversamente o sistema reprodutivo de organismos aquáticos e terrestres. O efeito pode ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula – órgãos – organismo – população – ecossistema. De acordo com JORGENSEN *et al.* 1998, alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na ordem de µg/L ou ng/L.

Geralmente, os fármacos são absorvidos pelo organismo e estão sujeitos a reações metabólicas. Entretanto, uma quantidade significativa dessas substâncias originais e seus metabólitos são excretados na urina, fezes ou esterco animal, sendo frequentemente encontrados no esgoto doméstico. De acordo com RICHARDSON *et al.* 1985, nas ETEs há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual: 1) pode ser biodegradável; 2) pode passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente; 3) pode persistir. Pouco se conhece sobre a exatidão das rotas dos fármacos no ambiente, mas duas destas rotas são ponderadas, a



contaminação ambiental por meio de esgoto doméstico e atividades agrícolas. Para a determinação de fármacos, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura sendo estes baseados na extração em fase sólida, em alguns casos derivatização da substância ácida e subsequente determinação do derivado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) ou cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM).

No momento, um ponto crítico neste tema é saber se existe um nível elevado dessas substâncias no ambiente, que sejam suficientes para exercer efeitos adversos em seres vivos. Esta questão estimula o desenvolvimento de estudos de impacto ambiental causado por diferentes fármacos. Dados eco toxicológicos têm sido levantados por pesquisadores, para se identificar fármacos que são potencialmente perigosos, porém, os dados disponíveis na literatura são insuficientes. A ocorrência desses fármacos residuais em águas superficiais e de subsolo demonstra a necessidade de estudos que determinem os efeitos tóxicos desses fármacos ao ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de biodegradação de antiarrítmicos (Atenolol, Metoprolol e Propranolol), antitérmico (diclofenaco de sódio) e antilipêmico (fenofibrato), por bactérias isoladas do solo e quantificar o processo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de fármacos para estudo de biodegradabilidade.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionados fármacos comumente adquiridos pela população, baseado em informações colhidas em grandes drogarias da região e segundo relatos científicos de sua persistência no ambiente. Os fármacos selecionados para este estudo foram: Diclofenaco (anti-inflamatório); Fenofibrato (anti-lipêmico); Atenolol, Metoprolol e Propranolol (controle de pressão arterial). Todos os compostos químicos foram adquiridos tanto na forma comercial como seus princípios ativos com pureza >90% da Sigma.

Coleta das amostras de solo.

As amostras de solo foram coletadas nas proximidades do CPQBA/UNICAMP localizado no município de Paulínia/SP (latitude sul 20° 48'; longitude oeste 47° 07'; altitude 669m), classificado como "latossolo vermelho eutroférrico típico" com presença de vegetais sendo feita a coleta das amostras próximas à rizosfera, na camada superficial do solo (10 cm) objetivando maior possibilidade de se encontrar bactérias viáveis capazes de promover a biodegradação dos fármacos. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e levadas para o laboratório. Cerca de 100 g desse solo foi umedecido com água destilada e disposto em estufa bacteriológica a 28°C, com ausência de luz, por um período de 24 h. Após este período o solo foi submetido a enriquecimento através da adição por aspersão de meio de cultura líquido (MS) e caldo nutritivo Tabela 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1. Meio de cultivo MS.

Composto	Concentração (g/L)
Nitrato de sódio (NaNO_3)	3,0
Mono Fosfato de Potássio (KH_2PO_4)	1,0
Sulfato de magnésio (MgSO_4)	0,5
Sulfato de ferro (FeSO_4)	0,01
Cloreto de potássio (KCl)	0,5

Tabela 2. Caldo Nutritivo.

Composto	Concentração (g/L)
Peptona	3,0
Extrato de Malte	5,0

Isolamento e identificação das colônias metabolicamente ativas.

Amostras de solo de 10g foram diluídas em 100 mL de solução salina (0,85%), homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 RPM por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi diluído em série e utilizado para plaqueamento (pour plate) em meio sólido (Agar nutritivo), seguido de incubação a 37°C por 24 h. Após crescimento, as colônias morfológicamente diferentes foram isoladas e plaqueadas em meio sólido (Agar) contendo os fármacos, adicionado de 25 mg/L de TTC (Cloreto de Trifenil Tetrazolium).



Processo de biodegradação acelerada.

A metodologia utilizada para a biodegradação acelerada dos fármacos foi baseada no trabalho de SILVA et al. (2000) modificado, onde amostras de 10g de solos enriquecidos foram colocados em recipiente plástico com capacidade de 50 mL sendo, a cada dois dias, umedecido com 3 mL de solução salina (0,85%) com diferentes concentrações de fármacos (Tabela 3). Este procedimento foi conduzido por um período de 30 dias com isolamento sucessivo de cepas microbianas a cada 7 dias.

Tabela 3. Concentração de fármacos aplicados no solo para o processo de biodegradação acelerada.

Composto	Concentrações (mg/mL)
Diclofenaco	1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,062 – 0,0031 – 0,0015
Fenofibrato	5 – 2,5 – 1,23 – 0,0625 – 0,312 – 0,152 – 0,0781
Atenolol	1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,0312 – 0,0156
Metoprolol	2 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,0625 – 0,0312
Propranolol	1,6 – 0,8 – 0,4 – 0,2 – 0,1 – 0,05 – 0,025

Ensaio de biodegradação dos fármacos.

Os ensaios foram conduzidos utilizando um pré-inóculo que foi submetido ao crescimento em meio mínimo contendo fármaco durante 48 h a 28°C sob agitação de 130 RPM. Após esta etapa, 15 mL do pré-inóculo foram transferidos para um frasco de Erlenmeyer com 100 mL do referido meio e submetido às mesmas condições de desenvolvimento da etapa anterior por um período de 27 dias, com amostragem a cada 3 dias. As amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM 4°C por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22 µm e estocado em freezer para a realização das análises cromatográficas.

Análise da biodegradação dos fármacos.

As análises foram realizadas através de cromatografia líquida (CLAE). Os métodos empregados para a realização dos ensaios foram selecionados na literatura científica e/ou métodos padronizados para cada composto químico submetido à degradação. A Tabela 4 apresenta os métodos utilizados nas análises cromatográficas. Os ensaios para a quantificação do consumo dos fármacos pelos organismos isolados foram realizados no Laboratório de Instrumentação (Linst) do CPQBA/UNICAMP.

Tabela 4 – Métodos analíticos utilizados para a quantificação dos fármacos durante o processo de biodegradação.

Fármaco	Método	Condições cromatográficas
Atenolol	Método USP 29 (2006)	Fase móvel: 1,1g 1-heptasulfonato de sódio, 0,71g de fosfato de sódio dibásico em 700 mL de água Milli-Q, 2 mL de dibutilamina, ácido fosfórico pH 3,0 e 300mL de metanol; Coluna C-18 Nova Pak (150 x 3,9 mm, 4 µm); Fluxo 0,6 mL/min; Detector arranjo diodos (200 – 400 nm) leitura em 226 nm.
Metropolol	LISA et al, 2006	FM: 1 mL de hidroxitetrautilamônia, ácido acético pH 4 e água Milli-Q, para 1L; Coluna C-18 Nova Pak (150 x 3,9 mm, 4 µm) Fluxo 0,7 mL/min; Temperatura coluna 40°C; Detector arranjo diodo (200 – 400 nm) leitura em 226 nm.
Fenofibrato	HERNANDO et al, 2004	FM: Água Milli-Q e Acetonitrila, com gradiente. Coluna C-18 (150 mm x 3-9 mm); Temperatura coluna 30°C; Fluxo 0,5 mL/min; Detector arranjo diodo (200 – 400) leitura em 254 nm
Diclofenaco de sódio	HILTON & THOMAS, 2003	FM: Metanol:Tampão fosfato 0,01M pH 2,5 (70:30); Coluna C-18 (150 mm x 3-9 mm); Temperatura coluna 30°C; Fluxo 0,5 mL/min; Detector arranjo diodo (200 – 400) leitura em 254 nm.

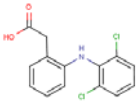
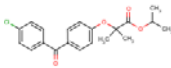
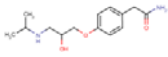
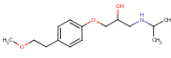
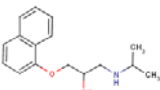
Resultados e Discussão

Fármacos utilizados nos estudos de biodegradação.

Algumas características sobre os fármacos utilizados no desenvolvimento deste trabalho podem ser visualizadas na Tabela 5.



Tabela 5 – Características dos fármacos utilizados no processo de biodegradação.

Composto	CAS	Utilização	Estrutura química	Fator de bioacumulação
Diclofenaco de sódio	15307-86-5	Antiinflamatório não esteróide com ação analgésica e antipirética.		-
Fenofibrato	49562-28-9	Antilipêmico com ação na remoção de triglicérides e colesterol do sangue		2,46
Atenolol	29122-68-7	Bloqueador seletivo β -adrenérgico, anti-arritmico e agente simpatolítico		0,5
Metropolol	37350-58-6	bloqueador não seletivo adrenergico, anti-arritmico e agente simpatolítico		-
Propanolol	525-66-6	adrenergico β -antagonista, agente ansiolítico agente antiarritmico, agente anti-hipertensivo e vasodilatador		1,33

FBC>3,0 indica bioacumulação.

Isolamento e identificação das colônias metabolicamente ativas.

O isolamento dos microrganismos do solo apresentou resultados satisfatórios, sendo obtido um número de colônias a partir do mesmo. No decorrer do processo de enriquecimento foi observado um aumento significativo no número de colônias presentes. A detecção de colônias metabolicamente ativas foi feita através do uso do TTC. Os resultados mostraram adaptação de alguns microrganismos isolados para os fármacos estudados, embora o melhor desenvolvimento microbiológico tenha ocorrido sobre diferentes concentrações.

As colônias metabolicamente ativas foram purificadas e estão sendo mantidas adequadamente para estudos subsequentes e identificação.

Processo de biodegradação acelerada

Após a adaptação dos microrganismos frente ao fármaco em estudo foi isolado um total de 27 colônias bacterianas metabolicamente ativas, indicando a capacidade destes microrganismos em se desenvolver na presença dos fármacos como única fonte de carbono. A Tabela 2 apresenta os resultados deste processo para as concentrações estudadas.



Tabela 2. Crescimento dos microrganismos isolados frente a várias concentrações de fármacos. O sinal + representa tolerância e o – sensibilidade à droga.

Composto	Concentração (mg/mL)							
Metoprolol	2,0	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,3125	0,0156
Isolado 1	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolado 2	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolado 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Diclofenaco	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0031	0,0015	0,0008
Isolado 2	+	+	+	+	+	-	-	-
Isolado 3	+	+	+	+	+	+	+	+
Atenolol	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,008
Isolado 1	+	+	+	+	+	+	+	+
Isolado 2	+	+	+	+	+	+	+	+
Isolado 3	+	+	+	+	+	+	+	+
Isolado 4	+	+	+	+	+	+	+	+

Durante este processo não foi observado crescimento satisfatório dos isolados na presença dos fármacos metoprolol, fenofibrato e propranolol, nas concentrações estudadas. Foi realizado um novo ensaio com o aumento das concentrações destes fármacos e avaliado o desenvolvimento dos isolados. A Tabela 3 apresenta estes resultados.

Tabela 3. Crescimento dos microrganismos isolados frente às várias concentrações dos fármacos. O sinal + representa tolerância e o – sensibilidade à droga.

Composto	Concentração (mg/mL)							
Metoprolol	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Isolado 1	-	+	+	+	-	-	-	-
Isolado 2	-	+	+	+	-	-	-	-
Isolado 3	-	+	+	-	-	-	-	-
Isolado 4	-	+	+	+	-	-	-	-
Isolado 5	-	+	+	+	-	-	-	-
Isolado 6	+	+	-	-	-	-	-	-
Isolado 7	-	+	+	+	+	+	+	+
Fenofibrato	10	5	2,5	1,25				
Isolado 1	-	+	-	-				
Propranolol	6,4	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	
Isolado 1	-	+	+	+	-	-	-	
Isolado 2	+	-	-	-	-	-	-	
Isolado 3	-	-	-	-	-	-	-	

Como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, as colônias bacterianas apresentam respostas diferentes de desenvolvimento conforme a concentração utilizada e tipo de composto químico. Isto indica que dentre os grupos bacterianos estudados existe um estímulo enzimático diferenciado para as concentrações estudadas.

Ensaio de biodegradação dos fármacos.

Com base nos resultados observados na fase anterior foram realizados experimentos com duração de 10 dias, nas condições experimentais anteriores.

Foram selecionadas para estes novos ensaios, cepas isoladas na presença de cada grupo de fármaco testado. As análises de biodegradação foram realizadas através de CLAE dentro do limite de detecção do equipamento.

Diclofenaco de sódio

A curva de crescimento microbiano e biodegradação do diclofenaco pelas cepas 2 e 3, selecionadas na etapa anterior, podem ser visualizadas nas Figuras 1 e 2.

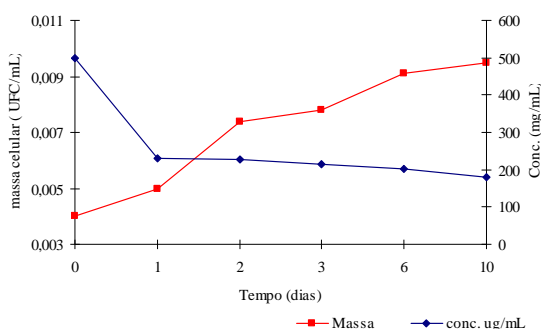


Figura 1 – Crescimento microbiano da cepa 2 (1 µg/mL).

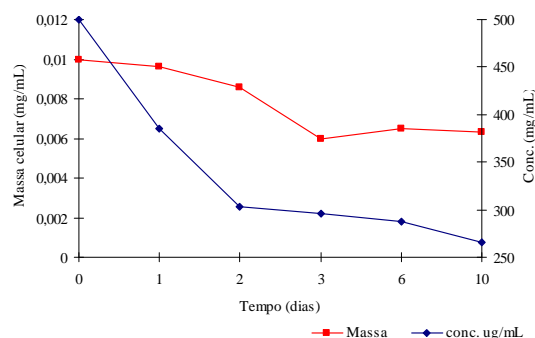


Figura 2 – Crescimento microbiano da cepa 3 (1 µg/mL).

As Figuras 1 e 2 mostram uma curva de crescimento bastante distinta para cada uma das cepas utilizadas. No primeiro caso, podemos observar que durante a fase experimental os microrganismos apresentaram um rápido crescimento durante todo o período testado, indicando uma boa adaptação desta cepa (2) na utilização do fármaco como fonte de carbono e energia com uma redução da concentração inicial do fármaco de 63,8 %. A curva de crescimento observada na Figura 2 (cepa 3) apresenta um processo inverso, onde esta apresenta um lento decaimento durante o período testado com uma redução do fármaco de 46,74%. Os resultados indicam que este composto apresenta um processo de biodegradação lento, podendo estar sendo acumulado no ambiente aquático.

Atenolol.

Nos testes realizados na etapa anterior o comportamento dos microrganismos 1 a 4 foram similares quanto à utilização do Atenolol como fonte de carbono. Neste ensaio foi selecionada apenas a cepa 1 para uma melhor avaliação do processo. Os resultados podem ser observados na Figura 3.

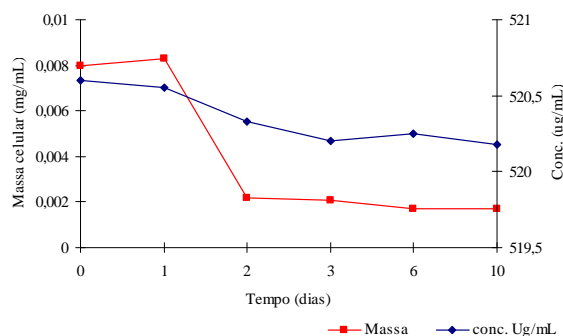


Figura 3 – Crescimento microbiano da cepa 1 na presença de Atenolol (1 µg/mL).

O atenolol quando submetido ao processo de biodegradação a uma concentração de 1 µg/mL utilizando a cepa 1 apresentou uma degradação de apenas 1%. Este resultado está de acordo com o proposto através do modelo de fugacidade desta molécula, onde segundo este modelo, o atenolol apresenta um processo de biodegradação em plantas de tratamento de efluentes < 1%.

Os resultados indicam um grande potencial de acumulação desta substância na matriz aquática ambiental.

Fenofibrato

A curva de crescimento microbiano e biodegradação do Fenofibrato pela cepa 1, pode ser visualizada na Figura 4.

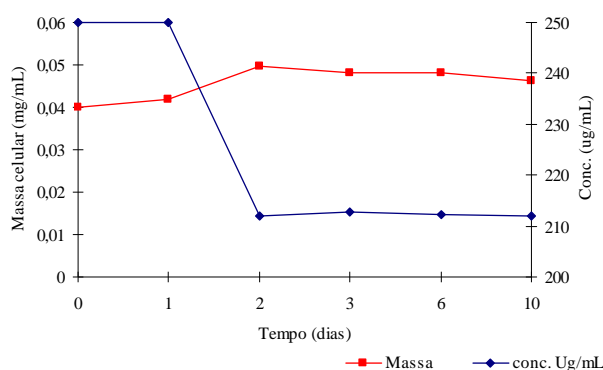


Figura 4. Crescimento microbiano da cepa 1 na presença de fenofibrato (250µg/mL).

O fenofibrato apresentou um comportamento característico, onde foi degradado apenas quando utilizada concentração próximas a 250µg/mL. Os ensaios mostraram que o fenofibrato é rapidamente reduzido a uma concentração próxima de 200µg/mL num período de 48 h, e abaixo desta concentração permanece constante durante o período do ensaio (27 dias). Isso indica que este fármaco possivelmente apresente baixa remoção ambiental com grande potencial de acumulação no ambiente aquático.

Os resultados estão de acordo com o modelo de fugacidade desta molécula onde segundo as informações preditas o fenofibrato apresenta uma parcela de biodegradação em plantas de tratamento de efluentes < 1%. Segundo este mesmo modelo, mais de 90% deste composto pode ser encontrado no sedimento devido a sua baixa solubilidade.

Metropolol

A curva de crescimento microbiano e biodegradação do Metropolol pelas cepas 1 e 2, podem ser visualizadas nas Figuras 5 e 6.

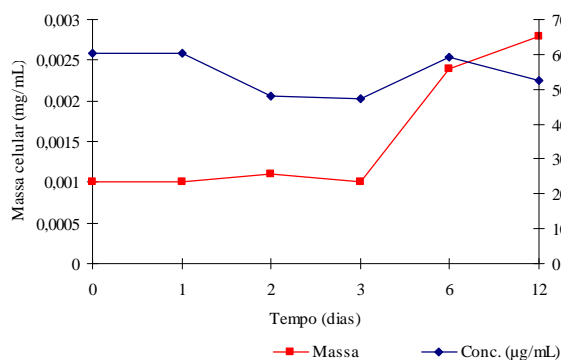


Figura 5 Crescimento microbiano da cepa 1 (60µg/mL)

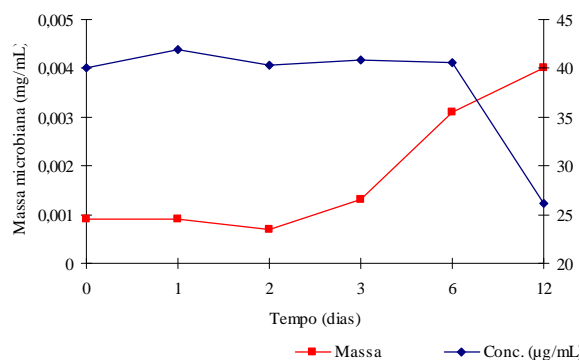


Figura 6. Crescimento microbiano da cepa 2 (40 µg/mL).

A Figura 5 apresenta os resultados do crescimento da cepa 2 e biodegradação do metropolol durante o período do ensaio. Podemos observar que a cepa (2) teve um crescimento lento frente a este fármaco num período de 2 dias e após este período apresentou um crescimento logarítmico. A biodegradação do metropolol neste caso foi melhor do que a observada para a cepa 1. A biodegradação observada foi de 34,6%. Neste caso, as mesmas observações referentes a cepa 1 são válidas.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliado o fator de biodegradação de alguns fármacos por grupos bacterianos isolados do solo. Os resultados indicam que todos os fármacos estudados mostraram ser parcialmente biodegradáveis, uma vez que nenhum destes compostos foi totalmente reduzido durante o período experimental.



Os medicamentos utilizados como antiarrítmicos como Atenolol, Metropolol e Propanolol apresentaram baixos níveis de degradação biológica, ficando este abaixo de 10%. O Diclofenaco de sódio utilizado como antitérmico e antiinflamatório apresentou uma degradação de 50% e o Fenofibrato, um medicamento utilizado para o controle de obesidade foi reduzido apenas quando utilizada concentração de 250µg, acima ou abaixo desta concentração não houve degradação.

Dentro das condições experimentais os fármacos estudados apresentaram baixa remoção ambiental, com grande potencial de acumulação no ambiente aquático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silva, C.M.M.S.; Roque, M.R.A.; Melo, I.S., Ed. Microbiologia ambiental: manual de laboratório. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2000. 98p. (embrapa meio ambiente. Documentos, 19).
2. Mulroy, A.; Water Environ. Technol. **2001**, 13, 32.
3. Kümmerer, K.; Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Springer-Verlag, Berlin.
4. Richardson, M. L.; Bowron, J. M.; The fate of Pharmaceutical chemicals in the aquatic environment - A review. J. Pharm.Pharmacol. Vol. 37 p. I - **1985**.
5. Jorgensen, S. E.; Lutzhoft, H. C.; Halling-Sorensen, B.; Development of a model for environmental risk assessment of growth promoters. Ecological Modelling, 63 Ecolog. Model **1998**, 10.
6. Lisa N.Nikolai, Evelyn L.McClure, Sherri L.MacLeod, Charles S.Wong. Journal of Chromatography A, 1131 (2006) 103–109.
7. M.D. Hernandoa., M. Petrovica, A.R. Fernández-Albab, D. Barcel'ao. Journal of Chromatography A, 1046 (2004) 133–140
8. Tixier C et al; Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. Environmental Science and Technology 37, 1061-1068.
9. Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. Environmental Health Perspectives 107, 907–942.
10. Ternes, T.A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H.-J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N., 2002. Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. Environmental Science and Technology 36, 3855–3863.