

VI-190 – AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS PELO MICRO-ORGANISMO *Bacillus subtilis*

Alessandra Cazelatto de Medeiros⁽¹⁾

Tecnóloga em Saneamento Ambiental pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Luana Carvalho Jayme Espíndola⁽²⁾

Tecnóloga em Saneamento Ambiental pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Alexandre Nunes Ponezi⁽³⁾

Bacharelado em Ciências Biológicas, UNIARARAS. Mestre em Engenharia de Alimentos FEA/UNICAMP; Doutorado em Engenharia Civil – Departamento de Saneamento e Ambiente FEC/UNICAMP, Professor credenciado no programa de pós-graduação FEC/UNICAMP, Membro do Grupo de Gestão Ambiental da UNICAMP, Gestor Ambiental CPQBA/UNICAMP

Adilson Sartoratto⁽⁴⁾

Bacharelado em química, IQ/UNICAMP; Mestre em Química analítica IQ/UNICAMP.

Cassiana Maria Reganhan Coneglian⁽⁵⁾

Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina – PR; Mestre em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada Unesp/Rio Claro; Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada, Unesp/Rio Claro; Professora Pleno da Faculdade de Tecnologia a UNICAMP.

Endereço⁽¹⁾: Rua Culto à Ciência, 309 , Ap. 41 - Botafogo - Campinas - SP - CEP: 13020-060 - Brasil - Tel: (19) 9136-8532 - e-mail: acm@fea.unicamp.br

RESUMO

Em paralelo a importância dos medicamentos para a saúde humana está à dificuldade do tratamento dos resíduos e a falta de conhecimentos sobre os efeitos causados ao meio ambiente. As pesquisas atuais indicam que os fármacos residuais são difundidos nas matrizes ambientais tais com água, solo e sedimentos em quantidades vestigiais, os quais seus efeitos na saúde humana sejam sutis e mais pronunciados em animais de vida terrestre e aquática. Neste trabalho foi avaliado o potencial de biodegradação pelo micro-organismo *Bacillus subtilis*, de fármacos pertencentes a três diferentes classes, sendo anti-inflamatório (Diclofenaco de sódio), anti-arrítmicos (Atenolol, metoprolol e propanolol) e antilipêmico (Fenofibrato). A quantificação da biodegradação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados mostraram que na presença de propanolol e fenofibrato, o micro-organismo não apresentou desenvolvimento satisfatório em nenhuma das faixas de concentração estudadas nos ensaios de biodegradação, enquanto na presença do atenolol ($1,25\text{mg/L}^{-1}$), os resultados demonstram que houve pequena biodegradação deste composto químico, nos primeiros 10 dias de incubação, com sucinta utilização do composto $\approx 10\mu\text{g/ml}$. Para o diclofenaco, não foi possível avaliar a biodegradação, pois os resultados demonstram que houve grande variação entre os valores das concentrações obtidas em cada período coletado, resultando-se de erros analíticos e da falta de ajuste da metodologia utilizada. Para o metoprolol os resultados demonstraram que houve biodegradação pelo *B. subtilis*, nas concentrações 1,25 mg e 2,5 mg/mL, indicando a utilização do fármaco $\approx 150\mu\text{g/mL}$ e $\approx 32\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Fármacos, *Bacillus subtilis*, Biodegradação, CLAE.

INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural imprescindível para as atividades humanas, como abastecimento público, irrigação, produção de energia elétrica, lazer e recreação e a preservação da vida aquática. Diante disso, questões relacionadas à qualidade da água vêm ganhando cada vez mais importância, valorizando o seu reuso, minimização de consumo e tratamento.

A poluição da água pode ser de fácil avaliação macroscópica em relação ao odor, aparência e cor. Porém a poluição microscópica é de difícil avaliação, como no caso dos fármacos, onde a maioria não é legislado no Brasil e possui efeitos desconhecidos, incluindo toxicidade aquática, desenvolvimento de resistência em bactérias patogênicas, genotoxicidade e distúrbios endócrinos.

Anualmente são consumidos uma enorme quantidade de diferentes classes de fármacos, entre eles, antibióticos, antipiréticos, analgésicos, antidepressivos, agentes quimioterápicos e outros mais. Geralmente, os fármacos são absorvidos pelo organismo, parcialmente metabolizados e excretados na urina e fezes, sendo frequentemente encontrados em estações de tratamento de esgotos.

Entretanto, estudos mostram que o tratamento convencional nas estações de tratamento de esgotos, não tem sido eficaz, na remoção completa dos fármacos. Isso pode ser explicado pelo fato de que os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas para servir a um propósito terapêutico. Segundo Mulroy (2001) de 50 a 90% de uma dosagem do fármaco são excretado inalterado e persistem no meio ambiente.

Nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) existem 3 destinos possíveis para os fármacos individuais: eles podem ser biodegradáveis, podem passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente e podem ser persistentes. Porém a principal rota de aporte de fármacos em águas superficiais é o lançamento de esgoto *in natura*, visto que em muitas localidades há um grande déficit de infra-estrutura em saneamento.

A presença de fármacos residuais e outros compostos xenobióticos na água potável é outra questão de saúde pública, uma vez que pouco se sabe sobre o potencial efeito na saúde associado com o consumo a longo prazo da mistura destes compostos na água potável. Dentro deste contexto, a preocupação com a preservação dos ecossistemas aquáticos tem incentivado estudos com o objetivo de identificar e quantificar estes resíduos e desenvolver processos que promovam sua remoção efetiva, junto com outros poluentes prioritários, antes do seu descarte nos corpos hídricos.

MATERIAIS E MÉTODOS

SELEÇÃO DE FÁRMACOS PARA ESTUDO

Para o desenvolvimento deste trabalho os fármacos estudados foram selecionados de acordo com a sua persistência no meio ambiente, segundo relatos científicos e ao seu grande consumo pela população, baseado em informações obtidas em grandes drogarias regionais. Os fármacos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram adquiridos em sua formulação comercial para os bioensaios e na sua forma pura para a quantificação.

Na Tabela 1 estão representados os fármacos estudados, suas aplicações e informações relevantes.

Tabela 1. Fármacos selecionados para estudos de biodegradação

Composto	Aplicação	Número do CAS	Fórmula Molecular
Diclofenaco	Anti-inflamatório	15307-86-5	C14-H11-Cl2-N-O2
Fenofibrato	Antilipêmico	49562-28-9	C20-H21-Cl-O4
Atenolol	Antiarrítmicos	29122-68-7	C14-H22-N2-O3
Metoprolol	Antiarrítmicos	37350-58-6	C15-H25-N-O3
Propranolol	Antiarrítmicos	525-66-6	C16-H21-N-O2

SELEÇÃO E MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo *Bacillus subtilis* é uma bactéria gram positiva de solo, não patogênica, não colonizadora de tecidos, naturalmente transformável e formadora de esporos. Essas características acarretam vantagens de interesse industrial com características biológica pouco explorada. Esta cepa foi selecionado devido ao seu potencial de biodegradação de compostos diversos incluindo os xenobióticos.

Utilizou-se para os ensaios, a cepa de *B. subtilis* obtida da coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP. As cepas de *B. subtilis* foram mantidas em placas de Petri contendo meio Nutriente Agar, sendo realizados repiques periódicos para a sua manutenção.

A ativação da cultura de referência *Bacillus subtilis* foi realizada por meio da transferência de biomassa a placa de Petri contendo Nutriente Agar por técnica de estriamento, com o auxílio da alça de platina, obtendo assim a cultura Master. A nova cultura foi incubada em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas.

ADAPTAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

A adaptação do micro-organismo aos fármacos foi realizada inoculando estes em 20 mL de meio Mineral, contendo 1 mg/mL dos fármacos selecionados em Erlenmeyers de 50 mL. Inicialmente foi adicionado ao meio glicose na concentração de 200 mg/L⁻¹, como fonte alternativa de carbono (cometabolismo) para a adaptação ao fármaco. A fase de adaptação foi realizada em um período de 24 horas a 37°C sob agitação em shaker de 140 rpm.

Após este período o inóculo foi centrifugado 4°C, 9500 rpm durante 15 minutos, por duas vezes com solução salina (0,9%) e transferido para um novo frasco contendo apenas o meio Mineral com os fármacos como única fonte de carbono, na mesma concentração (1mg/mL).

A adaptação do *B. subtilis* foi avaliada pela adição de Cloreto de Trifenil tetrazolium 25 mg/L (TCC) ao meio. Adicionou-se 10% do volume total de solução reveladora em cada frasco e o resultado foi avaliado após 3 horas de incubação. A utilização do TCC é importante para a avaliação do desenvolvimento do micro-organismo, na qual a coloração rosada é resultante da reação da solução reveladora com o oxigênio proveniente da respiração do micro-organismo, indicando o crescimento microbiano.

SELEÇÃO DAS MELHORES CONCENTRAÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO DO *B. subtilis*

Após a adaptação do micro-organismo aos fármacos, foram definidas as melhores concentrações (formulação comercial) para o seu desenvolvimento. Estas concentrações foram definidas pela técnica desenvolvida no laboratório de microbiologia do CPQBA/UNICAMP, que consiste na diluição seriada do fármaco em micro placas (Elisa), conforme esquema ilustrado na Figura 1. As concentrações testadas estão descritas na Tabela 2.

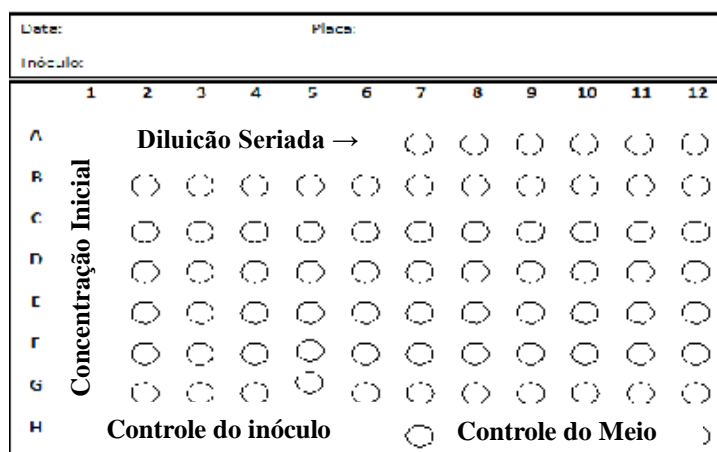


Figura 1. Esquema da micro placa (Elisa) utilizada na diluição seriada das concentrações.

Tabela 2. Concentrações de fármacos testadas para o ensaio de biodegradação

Composto	Concentrações (mg/mL)
Diclofenaco	250 – 125 – 62,5 – 31,25 – 15,625 – 7,81 – 3,9 – 1,95 – 0,97 – 0,48 – 0,24
Fenofibrato	300 – 150 – 75 – 37,7 – 18,75 – 9,37 – 4,69 – 2,34 – 1,17 – 0,59 – 0,29
Atenolol	10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,31 – 0,15 – 0,125 – 0,0625 – 0,03125 – 0,078
Metoprolol	10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,31 – 0,15 – 0,125 – 0,0625 – 0,03125 – 0,078
Propranolol	10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,31 – 0,15 – 0,125 – 0,0625 – 0,03125 – 0,078

Para avaliar a biodegradação dos fármacos adicionou-se 100 µL de meio Mineral em cada poço da micro placa esterilizada, onde foi realizada a diluição seriada, com exceção da linha H, que foi utilizada para os controles de meio e inóculo e da coluna 1, utilizada para controle da amostra, onde foi depositados 150 µL. Na coluna 1 foram acrescentados em cada poço 50 µL das soluções nas concentrações iniciais de cada fármaco (uma substância diferente para linha). Em seguida, na coluna 2, foram adicionados 100 µL das amostras de fármacos,

totalizando 200 µL com o meio no orifício. Esses 200 µL foram homogeneizados e transferido 100µL para o orifício da coluna seguinte (3), repetindo-se este procedimento até a coluna 12, de modo a obter concentração decrescente das amostras. Os 100 µL finais foram desprezados. Em seguida, 100 µL de uma suspensão dos micro-organismos adaptados, de crescimento recente (24 horas), foram adicionados. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após este período foram acrescentados 50 µL de uma solução reveladora de TTC (cloreto de trifênil tetrazolium) a 1%, e a placa re-incubada por 3 horas na referida temperatura. As melhores concentrações foram definidas como a concentração que apresentou melhor desenvolvimento do micro-organismo, representado através da coloração rosa-avermelhada, conferida às células quando estas apresentam atividade respiratória. Foram também incluídos nos testes controles para confirmação da esterilidade do meio de cultura e controle para confirmação do crescimento dos micro-organismos na linha H. O controle do meio foi feito adicionado apenas 200 µL de meio em 4 poços e para o controle do micro-organismo adicionou-se 100 µL de meio e 100 µL da suspensão de micro-organismos. Os testes foram realizados em duplicata.

ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO MICROBIANO

Durante a realização dos testes de biodegradação foi avaliado o desenvolvimento microbiano pelo plaqueamento por diluição seriada do micro-organismo. A cada 3 dias foram retiradas alíquotas de 1 mL de cada fármaco e transferidas para tubos contendo 9 mL de solução salina. Em seguida foi realizada a diluição seriada até 10^{-14} , como ilustra a Figura 2.

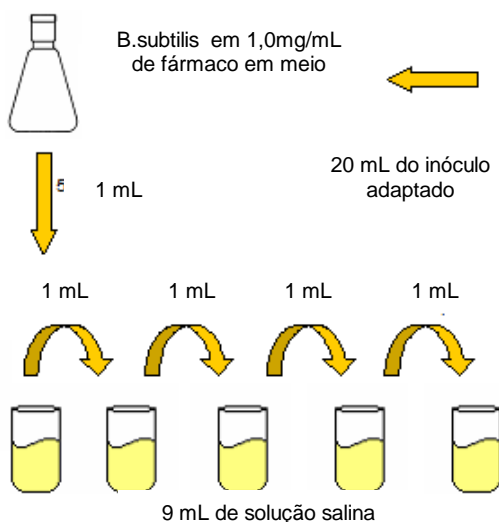


Figura 2. Diluição seriada do micro-organismo.

Após a diluição foram retiradas alíquotas de 100 µL de cada diluição e feito o plaqueamento (pour plate) em placas de Petri contendo Nutriente Agar. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, após este período realizou-se a contagem das colônias.

TESTE DE BIODEGRADAÇÃO

Os testes de biodegradação foram realizados em 9 frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio Mineral para cada fármaco, com as melhores concentrações dos fármacos definidas anteriormente, juntamente com o micro-organismo já adaptado. O inóculo foi centrifugado, a 4°C; 9500 rpm; 15 minutos, e a massa celular foi dividida entre os 9 Erlenmeyers. Esses foram incubados à temperatura de 37°C, 140 rpm, 27 dias. Alíquotas foram retiradas a cada 3 dias, filtradas em membrana 0,45 µm e conservadas em geladeira ($\pm 4^\circ\text{C}$) para as análises cromatográficas.

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA 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 para cada composto químico submetido à degradação.

Os ensaios para a quantificação do consumo dos fármacos pelos *B.subtilis* foram realizados no Laboratório de Instrumentação (Linst) do CPQBA/UNICAMP sobre orientação do Dr. Adilson Sartoratto.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

FÁRMACOS ESTUDADOS

Para o desenvolvimento deste estudo foram citados 6 fármacos no projeto inicial (atenolol, ibuprofeno, fenofibrato, propranolol, metoprolol e diclofenaco), porém o estudo foi realizado apenas com 5 destes fármacos em função da dificuldade de obtenção do fármaco ibuprofeno, o qual é vetada a comercialização no Brasil (dados do fornecedor).

Em relação aos demais fármacos, apenas o atenolol, metoprolol e o diclofenaco demonstraram resultados satisfatórios para o desenvolvimento do *B.subtilis*, dando continuidade aos testes de biodegradação.

ADAPTAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

A detecção de colônias metabolicamente ativas foi feita pelo uso do TTC (cloreto de trifetil tetrazolium), onde a coloração rosa-avermelhada representa a presença de atividade microbiana. Os resultados mostraram desenvolvimento satisfatório do *B. subtilis* em presença do atenolol, metoprolol e diclofenaco, para as substâncias propranolol e fenofibrato não foram observados desenvolvimento do micro-organismo. Uma explicação para o fato é que talvez o período de tempo utilizado para a adaptação dos micro-organismos a tais compostos tenha sido demasiadamente curto ou ocorreu a inibição do micro-organismo em presença destes fármacos. Mesmo com resultados negativos foi dada continuidade aos testes de seleção das melhores concentrações para os dois fármacos com o objetivo de se obter a confirmação dos resultados.

SELEÇÃO DAS MELHORES CONCENTRAÇÕES PARA DESENVOLVIMENTO DO MICRO-ORGANISMO

As análises foram realizadas no laboratório de microbiologia do CPQBA/UNICAMP. A seleção das melhores concentrações foi realizada por meio da observação visual das colônias metabolicamente ativas, utilizando TCC como solução reveladora. Na presença do metoprolol o micro-organismo *B. subtilis* demonstrou adaptabilidade em três diferentes concentrações, 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL, selecionadas para a continuação dos estudos. Na presença do atenolol o melhor desenvolvimento ocorreu na concentração de 1,25 mg/mL e diclofenaco à 30 mg/mL. Na presença de Propranolol e Fenofibrato, o micro-organismo não apresentou desenvolvimento satisfatório em nenhuma das faixas de concentração estudadas para a realização dos ensaios de biodegradação, sendo então encerrados os testes com os dois fármacos. Os valores reais do princípio ativo são 190 µg/mL 390 µg/mL e 780 µg/mL para o metoprolol (0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL respectivamente), 200 µg/mL para o atenolol (1,25mg/mL) e 5,6 µg/mL para o diclofenaco (30mg/mL). Os resultados podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

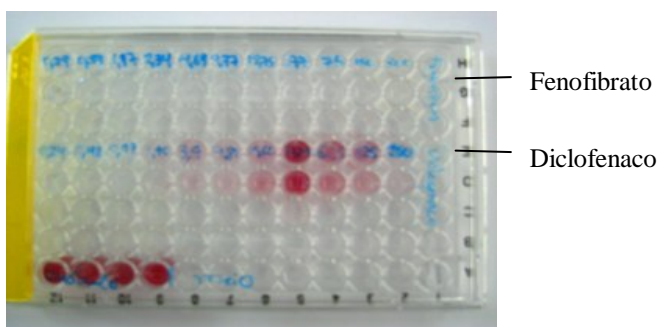


Figura 3. Desenvolvimento do *Bacillus subtilis* nas concentrações de fenofibrato e diclofenaco (30 mg/mL).

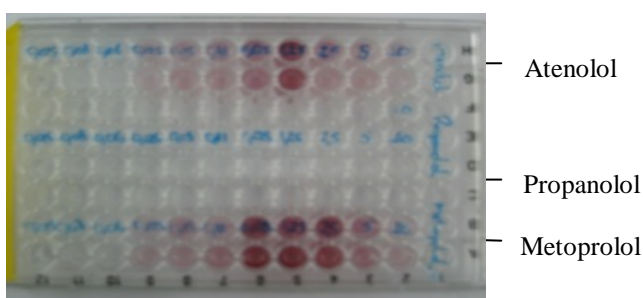


Figura 4. Desenvolvimento do *Bacillus subtilis* nas concentrações atenolol (1,25 mg/mL), propranolol e metoprolol (0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL)

QUANTIFICAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO

A quantificação da biodegradação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As curvas de calibração referentes às análises realizadas.

Durante o experimento foi observado evaporação (perda no volume) do meio de cultivo a uma taxa de aproximadamente 1 mL a cada 3 dias por conta da temperatura e agitação do shaker e vedação dos erlenmeyers, implicando no aumento das concentrações do fármaco quanto maior a exposição à estes fatores. Sendo assim, os cálculos apresentados na quantificação dos fármacos foram corrigidos com base nesta taxa.

ATENOLOL

Os resultados demonstraram que houve pequena biodegradação deste composto químico nos primeiros 10 dias de incubação, sendo que, até o sexto dia foi observado adaptação da cepa ao fármaco e entre o sexto ao nono dia foi notada uma sucinta utilização do composto $\approx 10 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 3). Após este período o aumento da concentração do fármaco observado nos ensaios subsequentes pode estar correlacionado com o decaimento celular (Figura 6) e a não utilização deste composto. As pequenas oscilações nas concentrações são derivadas de erros experimentais, considerados na margem de erro ocorrida durante o período de incubação (37°C, 140rpm).

Os resultados das análises cromatográficas indicam que o *B. subtilis* não possuiu enzimas capazes de utilizar este composto como fonte de carbono e energia.

Tabela 3. Quantificação da biodegradação do atenolol no período de 27 dias

Amostra (Tempo em dias)	Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração final corrigida ($\mu\text{g/ml}$)
0	224,90	225
3	224,81	220
6	236,90	227
9	234,47	220
12	261,00	240
15	260,48	235
18	284,33	250
21	332,37	219
24	310,57	261
27	318,93	262

DICLOFENACO

A quantificação do diclofenaco não foi possível, pois os resultados demonstraram que houve grande variação entre os valores obtidos das concentrações em cada período coletado (Tabela 4), resultando-se de erros analíticos e da falta de ajuste do método utilizado. Esses resultados indicam a necessidade de repetição dos ensaios para confirmação dos resultados e melhor avaliação do processo.

Tabela 4. Quantificação da biodegradação do diclofenaco no período de 27 dias

Amostra (Tempo em dias)	Concentração final (µg/ml)	Concentração Final corrigida (µg/ml)
0	188,90	189
3	414,34	406
6	344,37	330
9	360,63	338
12	621,87	572
15	436,77	393
18	534,53	470
21	4245,59	3651
24	1338,29	1124

METOPROLOL

Na Tabela 5 estão descritos os resultados obtidos nas análises cromatográficas para o metoprolol nas três concentrações estudadas (A = 0, 625 mg/mL, B= 1,25 mg/mL, C= 2,5 mg/mL). As concentrações foram calculadas até o terceiro dia para o metoprolol 0,625mg/mL e até o nono dia para o metoprolol em 1,25 e 2,5 mg/mL. As demais concentrações não foram calculadas devido a sobreposição dos picos nos cromatogramas por conta de um componente desconhecido e a falta do método analítico exato para a eluição do composto.

Os resultados demonstraram diminuição na concentração inicial para o metoprolol a 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL, indicando ocorrência da biodegradação do fármaco pelo *B.subtilis*.

Tabela 5. Quantificação da biodegradação do metoprolol no período de 27 dias.

Amostra (tempo em dias)	Concentração final (µg/ml)	Concentração Final corrigida (µg/ml)
A-0	176,51	177
A-3	264,74	259
B-0	367,94	353
B-3	222,99	210
B-6	348,46	320
B-9	383,63	345
C-0	670,37	590
C-3	655,97	564
C-6	665,17	559

Para o metoprolol a 1,25 mg/mL foi observado decaimento da concentração entre os nove dias de incubação quantificados, indicando pequena biodegradação do composto químico, sendo que nos três primeiros dias foi notada a utilização do composto $\approx 150 \mu\text{g/mL}$. Esta biodegradação possui correspondência com os resultados obtidos no desenvolvimento microbiano, no qual foi observado pequeno crescimento do micro-organismo no mesmo período da biodegradação ocorrida (Figura 8).

Os resultados obtidos com o metoprolol a 2,5 mg/mL indicam que houve pequena biodegradação entre os seis primeiros dias de ensaio quantificados, onde notou-se sucinta utilização do composto $\approx 32 \mu\text{g/ml}$.

Esses resultados indicam a necessidade de repetição dos ensaios para confirmação dos resultados e estudos específicos para selecionar o método analítico exato para a perfeita eluição do composto a fim de se obter a separação dos picos.

DESENVOLVIMENTO MICROBIANO

A avaliação do desenvolvimento do micro-organismo foi por meio da contagem das unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) de *Bacillus subtilis* em crescimento pelo método de plaqueamento.

Com base nos resultados observados na contagem das UFC foi possível realizar o acompanhamento do desenvolvimento do micro-organismo durante o período de 27 dias da fase de biodegradação. Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 5 a 7.

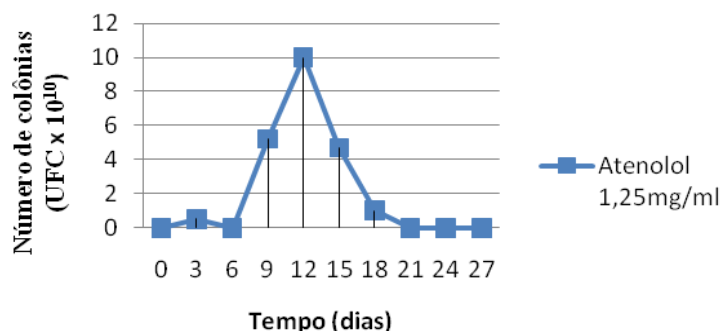


Figura 5. Crescimento microbiano do *B.subtilis* na presença de atenolol (1,25 mg/mL), durante um período de 27 dias.

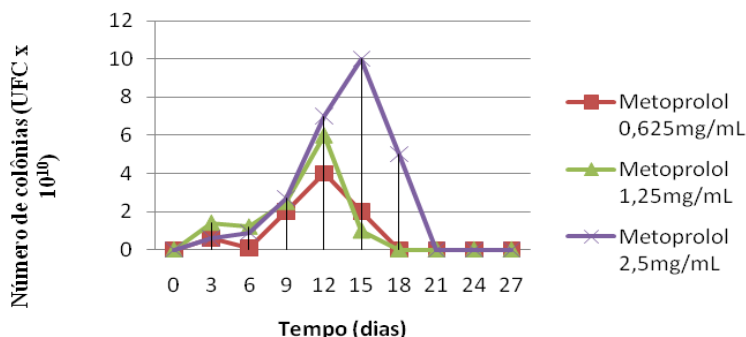


Figura 6. Crescimento microbiano do *B.subtilis* na presença de metoprolol (0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL), durante um período de 27 dias.

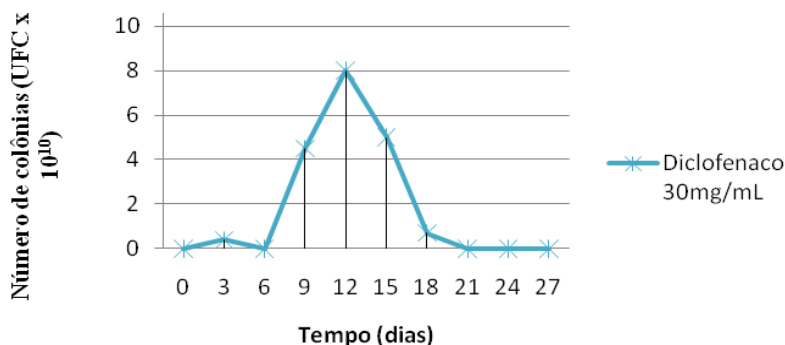


Figura 7. Crescimento microbiano do *B. subtilis* na presença de diclofenaco (30mg/mL), durante um período de 27 dias.

As Figuras 5, 6 e 7 mostram uma curva de crescimento do *B. subtilis* no período de ensaio, onde pode-se observar rápido crescimento à partir do sexto dia de incubação, praticamente igual à todos os compostos utilizados neste trabalho, indicando boa adaptação na utilização do fármaco como fonte de carbono e energia e posterior declínio entre o décimo segundo e décimo oitavo dia, que pode ser explicado pela “disputa” dos dois micro-organismos em relação ao alimento. Em paralelo ao crescimento do micro-organismo junto ao atenolol e metoprolol (1,25 e 2,5 mg/mL) foi observado que houve biodegradação do composto nos 10 primeiros dias. O lento decaimento do número de colônias do *B. subtilis* junto ao fármaco, após o décimo segundo dia, pode ser explicada pelo fato do crescimento do *B. subtilis* ser promovido por meio de células mortas, sem a utilização do fármaco para seu desenvolvimento, mantendo-se as concentrações.

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi avaliado o fator de biodegradação de alguns fármacos pelo micro-organismo *B. subtilis*. Durante a realização do trabalho foi encontrado dificuldade em trabalhar com sistemas biológicos, no qual as respostas nem sempre são imediatas e de forma esperada.

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que os fármacos propanolol e fenofibrato não apresentaram desenvolvimento bacteriano, sendo necessários novos estudos a fim de encontrar outra alternativa para sua degradação.

Os resultados obtidos para nas análises cromatográficas do atenolol indicam que o micro-organismo *B. subtilis* não apresenta enzimas capazes de promover sua degradação completa, uma vez que se observou pequena variação no período analisado.

A quantificação do metoprolol não foi concluído até o presente momento, porém foi possível observar visualmente nos cromatogramas e por meio das concentrações calculadas, uma queda na taxa da concentração inicial de duas faixas estudadas (1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL), demonstrando ser parcialmente biodegradáveis, porém ainda não foi encontrado o método analítico exato para a perfeita eluição do composto.

No caso do diclofenaco, os resultados obtidos apontam a necessidade da continuidade dos estudos a fim de identificar o erro analítico ocorrido e repetição das análises para a confirmação dos resultados.

De modo geral conclui-se que dentro das condições experimentais, os fármacos estudados apresentaram nenhuma ou baixa remoção de degradação pelo *B. subtilis*, serão necessários novos ensaios a fim de confirmar e certificar os resultados obtidos neste primeiro estudo. Após a validação, o micro-organismo *B. subtilis* poderá ser utilizado em sistemas de tratamento de águas e efluentes com o intuito de auxiliar no processo de tratamento.

A partir do trabalho realizado fica a sugestão de realização de novos testes para a confirmação dos resultados e a realização dos estudos de toxicidade do produto resultante da biodegradação dos fármacos, assim como a busca de novas metodologias analíticas para quantificação dos fármacos metoprolol e diclofenaco pois estes compostos apresentaram falta de ajuste na metodologia escolhida para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GEBHARDT, W., SCHRÖDER H.Fr. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *J. Chromatogr. A*, v.1160, p.34-43, 2007.
2. KÜMMERER, K. Resistance in the Environment. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 54, n.2, p.311–320, 2004.
3. MULROY, A. “When the Cure Is the Problem”. *Water Environment Technology*, v. 13, pp. 32-36, 2001.
4. RICHARDSON, M.L., BOWRON J.M. The Fate of Pharmaceutical Chemicals in the Aquatic Environment. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.37, n.1, p.1-12, 1985.
5. SACHER, F., LANGE F.T, BRAUCH H.J., BLANKENHORN E.I. Pharmaceuticals in Groundwaters- Analytical Methods and Results of a Monitoring Program in Baden-Württemberg, Germany. *J. Chromatogr. A*, v.938, p. 199-210, 2001.

6. STACKELBERG, P.E., FURLONG E.T., MEYER M.T., ZAUGG S.D, HENDERSON A.K., REISSMAN D.B. Persistence of Pharmaceutical Compounds and Other Organic Wastewater Contaminants in a Conventional Drinking-Water Treatment Plant. *Sci. Total Environ.*, v.329, p.99-113, 2004.
7. TERNES, T.A. Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Res.*, v.32, n.11, p.3245-3260, 1998.