

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - *CAMPUS* ARARAS/SP
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO

PALOMA BARROS DIAS

**MICROORGANISMOS DO SOLO AGRÍCOLA E SUA CAPACIDADE DE ATUAR NA
BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM FÁRMACOS
DERIVADOS DE ACETAMINOFENO**

ARARAS - SP

2022

PALOMA BARROS DIAS

**MICROORGANISMOS DO SOLO AGRÍCOLA E SUA CAPACIDADE DE ATUAR NA
BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM FÁRMACOS
DERIVADOS DE ACETAMINOFENO**

Monografia apresentada ao curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de São
Carlos - *campus* de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli.

Araras - SP

2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

PALOMA BARROS DIAS

MICROORGANISMOS DO SOLO AGRÍCOLA E SUA CAPACIDADE DE ATUAR NA
BIORREMEDIAÇÃO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM FÁRMACOS
DERIVADOS DE ACETAMINOFENO

Assinatura dos membros integrantes à banca examinadora para aprovação da monografia de Paloma Barros Dias na finalidade da obtenção do grau de licenciada em Ciências Biológicas na Universidade de São Carlos *campus* Centro de Ciências Agrárias Araras - SP.

Profº Dr. Renato Nallin Montagnolli
Universidade Federal de São Carlos - *campus* Araras

Profª Drª. Ane Hackbart de Medeiros
Universidade Federal de São Carlos - *campus* Araras

Dr. Profº Guilherme Dilarri
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *campus* Rio Claro

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Deonete, meus irmãos Rafaela e Davi que considero meus três pilares. Aos meus avós Alaide e José por me apoiarem e acreditarem em meus sonhos. Aos meus familiares em especial minhas tias Delvânia, Dione e Leina por todo apoio prestado. E por fim a todos os meus amigos pelo companheirismo e suporte ao longo dos anos de graduação.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente ao universo e a todos os seres de luz que me proporcionaram as mais belas oportunidades e força para enfrentar os desafios da vida, sem essa fé não seria possível chegar até aqui. Agradeço imensamente minha mãe Deonete por me aconselhar nos melhores e piores momentos, meus irmãos Rafaela e Davi por entenderem a minha ausência física e me lembrar constantemente os motivos para eu não desistir. Gostaria de agradecer em especial os meus avós Alaide e José que com toda simplicidade e pouco estudo me apoiam e se orgulham da minha trajetória. Minhas tias Delvânia, Dione e Leina por me tratarem como filha e serem o suporte extra nestes anos de faculdade assim como em toda minha vida. Aos meus tios e meu padrasto pelo apoio e aos meus primos João Victor, Jerre Vinícius, Pedro Lucas e Luiz Miguel por serem crianças e adolescentes que me fazem acreditar na nova juventude e em tempos melhores. Agradeço também ao meu pai José pelo apoio financeiro.

Agradeço aos meus amigos de faculdade Isabelle, Aryadne, Edson, Victória, Matheus, Kaminski, Marcos e Letícia por estarem comigo em todos os momentos nesses últimos anos, por cada conselho, abraço, troca e experiência vivida. Vocês foram essenciais durante esse tempo. Aos meus amigos de longas datas Aprígio e Matheus por estarem presentes na minha vida mesmo a distância.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade, assim como a todos integrantes do *campus* de Ciências Agrárias, em especial ao professor Renato por me acolher, me entender, me ensinar e aumentar o meu amor pela microbiologia.

RESUMO

Um novo ramo de pesquisa vem ganhando destaque na comunidade científica; investigar e eliminar compostos orgânicos que emergem no ambiente de forma crônica, os chamados contaminantes emergentes. Estes micropoluentes ao longo do tempo e da deposição podem gerar bioacumulação caso não seja degradado. Um dos principais contaminantes listados são os fármacos como é o caso do acetaminofeno também conhecido como paracetamol, sendo este o fármaco mais encontrado nas residências brasileiras. A literatura traz dados que relatam a presença significativa de acetaminofeno em efluentes e com isso a busca por soluções de degradação desses compostos aumentaram. A biorremediação surge como opção e consiste em uma técnica que utiliza organismos vivos como microrganismos para descontaminar áreas poluídas. O objetivo deste trabalho foi identificar a capacidade da microbiota do solo agrícola em degradar o acetaminofeno nos efluentes a partir do seu metabolismo e para isso utilizou-se o método de respirometria o qual consistiu em criar um ambiente semi-fechado onde o CO_2 liberado durante o metabolismo microbiano é dissolvido em uma solução de KOH a qual foi titulada contra HCL e a partir da equação de conversão foi obtido o valor de CO_2 produzido durante a biodegradação. Para análise, foram utilizadas amostras do Rio Piracicaba (Piracicaba/SP) onde consta presença de cerca de 300ng/L^{-1} de acetaminofeno segundo a literatura, ademais foi simulado um ambiente aquoso com concentração do fármaco de 10x e 100x maior que este encontrado. Como variáveis analisou-se as diferentes concentrações e a presença e ausência do inóculo do solo contendo os microrganismos. Os resultados apontam uma eficácia significativa na biodegradação do fármaco na concentração de 10x na presença do inóculo do solo, sugerindo que os microrganismos do solo podem atuar na biorremediação desses efluentes contaminados.

Palavras-chave: Biorremediação. Acetaminofeno. Paracetamol. Respirometria.

ABSTRACT

A new branch of research is gaining prominence in the scientific community; investigate and eliminate organic compounds that emerge in the environment in a chronic form, the so-called emerging contaminants. These micropollutants over time and deposition can generate bioaccumulation if not degraded. One of the main contaminants listed are drugs such as acetaminophen, also known as paracetamol, which is the drug most commonly found in Brazilian homes. The literature brings data that report the significant presence of acetaminophen in effluents and with that the search for solutions of degradation of these compounds increased. Bioremediation appears as an option and consists of a technique that uses living organisms such as microorganisms to decontaminate polluted areas. The objective of this work was to identify the ability of the agricultural soil microbiota to degrade acetaminophen in the effluents from its metabolism and for this, the respirometry method was used, which consisted of creating a semi-closed environment where the CO₂ released during microbial metabolism is dissolved in a KOH solution which was titrated against HCL and from the conversion equation the value of CO₂ produced during biodegradation was obtained. For analysis, samples from the Piracicaba River (Piracicaba/SP) were used, where there is the presence of about 300ng/L⁻¹ul of acetaminophen according to the literature. As variables, the different concentrations and the presence and absence of the soil inoculum containing the microorganisms were analyzed. The results point to a significant efficacy in the biodegradation of the drug at a concentration of 10x in the presence of soil inoculum, suggesting that soil microorganisms can act in the bioremediation of these contaminated effluents.

Keywords: Bioremediation. Acetaminophen. Paracetamol. Respirometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição das classes dos compostos estudadas nas matrizes aquáticas brasileiras: esgoto*, água tratada e águas superficiais. -----	16
Figura 2 - Principais possíveis rotas de destino dos fármacos no meio ambiente. ----	18
Figura 3 - Síntese do acetaminofeno a partir da reação entre o p-aminofenol e anidrido acético. Resultando em paracetamol e ácido acético.-----	19
Figura 4 - Biodegradação eficiente do fármaco paracetamol por microrganismos presentes nos filtros de carvão com atividade biológica, onde na presença do inóculo ocorre a diminuição da concentração do paracetamol.-----	20
Figura 5 - Local onde foi realizado a coleta da amostra do solo para preparo do inóculo.-----	24
Figura 6 - Local da coleta de amostra do Rio Piracicaba na cidade de Piracicaba-SP.-----	25
Figura 7 - Respirômetro adaptado.-----	26
Figura 8 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra A1.-----	30
Figura 9 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra A2.-----	30
Figura 10 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra A3.-----	31
Figura 11 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra C1.-----	32
Figura 12 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra C2.-----	32
Figura 13 - Respirômetro C2.2 contendo a presença de microalgas fotossintetizantes.-----	33
Figura 14 - Lâmina simples no aumento de 40x preparada para confirmação da presença de microalgas na amostra do respirômetro C2.2.-----	34
Figura 15 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra B1.-----	34

Figura 16 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra B2.....	35
Figura 17 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra B3.....	36
Figura 18 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias de todas as amostras testadas.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa da abundância de microrganismos do solo no ambiente, demonstrada por seus números e biomassa.-----	21
Tabela 2 - Quadro explicativo referente ao conteúdo dos respirômetros montados.---	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1. CONTAMINANTES EMERGENTES	15
2.1.1. Fármacos e o meio ambiente	16
2.2. ACETAMINOFENO	18
2.2.1. Características físico-químicas do acetaminofeno	19
2.2.2. Biodegradação do acetaminofeno	20
2.3. BIORREMEDIAÇÃO	20
2.4. MICRORGANISMOS DO SOLO	21
2.4.1. Microrganismos do solo agrícola	21
2.5. RESPIROMETRIA DE BARTHA	22
3. OBJETIVO	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. RESPIROMETRIA	23
4.1.1. Preparação dos reagentes e soluções	23
4.1.2. Preparo do inóculo	24
4.1.3. Preparo das amostras	25
4.1.4. Montagem do respirômetro	26
4.1.5. Inoculação do respirômetro e montagem das amostras	27
4.1.6. Monitoramento do respirômetro	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos criaram um desafio para a comunidade científica: investigar e eliminar compostos orgânicos que de certa forma emergem em ambientes causando contaminação dos mesmos. Esses compostos são contaminantes emergentes, micropoluentes que são disseminados nos ambientes de forma crônica causando bioacumulação caso não seja degradado. Diversas classes de compostos existentes já estão classificadas como contaminantes emergentes, são exemplos: hormônios, fármacos, corantes de indústria têxtil, petróleo e defensivos agrícolas. Os fármacos ou drogas farmacêuticas são usados em larga escala por seres humanos, além da aplicação em animais, essa deliberação usual e o descarte incorreto do mesmo é o que torna os fármacos um dos focos do estudo dessa classe de poluentes (NAPOLEÃO et al., 2015).

Os estudos no Brasil sobre contaminantes emergentes deram início em 1995, principalmente relacionados a pesticidas. Em 1996, Stumpf e colaboradores analisaram em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) e águas superficiais a remoção de fármacos e hormônios no sul do Rio de Janeiro. Desde então as matrizes aquáticas são focos de buscas desses contaminantes (MONTAGNER et al., 2017).

O Brasil está entre os maiores consumidores de fármacos do mundo, sendo a indústria farmacêutica uma das mais rentáveis no país, quanto a sua distribuição têm-se a média de 3,3 farmácias para cada 10 mil habitantes. Esse número permite uma maior acessibilidade a população e leva até mesmo ao consumo exagerado de drogas farmacêuticas. A grande preocupação dessa liberação são os Medicamentos Isentos de Prescrição (MIPs), grupo ao qual pertence o paracetamol, também conhecido como acetaminofeno, esse fármaco é o mais encontrado nas residências brasileiras devido principalmente a prática de automedicação (BRAYNER et al., 2018).

O acetaminofeno é um anti-inflamatório não esteróide com baixa capacidade anti-inflamatória, possui função analgésica e antipirética, também se encontra formulado com outros princípios ativos, sua dose diária não pode ultrapassar 4000mg ou 75mg/kg. O consumo em maior dose ou constante do medicamento pode causar danos hepáticos, a Anvisa é responsável por monitorar e fiscalizar a produção, manutenção e distribuição do fármaco no país (ANVISA, 2014).

A presença de fármacos em matrizes aquáticas está cada vez mais fácil de ser detectada devido a criação de equipamentos mais avançados e métodos mais específicos e sensíveis. O fármaco que é vital para a remediação de doenças humanas acaba se tornando um problema ecossistêmico, visto que o próprio corpo humano não é capaz de assimilá-lo completamente, esse fato junto ao descarte incorreto seja de sobras ou fármacos fora da data de validade, expõe a biota aquática e os seres vivos que utilizam desse recurso em risco de contaminação crônica (BISOGNIN et al., 2017).

Na literatura encontram-se dados que comprovam a presença do acetaminofeno em efluentes de todo o mundo. Em um levantamento no Brasil e Estados Unidos foram encontrados cerca de 18.100 - 59.000ng L⁻¹ em seus efluentes. Adentrando as cidades brasileiras, em Curitiba-PR o estudo de Kramer et al., (2015) citado por Bisognin et al., (2017) identifica a presença de acetaminofeno nos rios Iguaçu e Belém, chegando a detectar 6.896ng.g⁻¹ em sedimentos no rio Barigui (BISOGNIN et al., 2017).

O trabalho de Américo et al. (2012) identificou a presença do acetaminofeno em seis pontos de amostragem do Córrego da Onça, na cidade de Três Lagoas-MS. De acordo com os autores, em todos os pontos do Córrego foi possível identificar a presença do fármaco, principalmente no ponto próximo a ETE da cidade, o que é justificado pelo fato de que dejetos domésticos possuem uma maior concentração de fármacos devido ao descarte incorreto pela população.

O artigo de Pasquini (2016) analisou a presença e concentração de diversos fármacos no Ribeirão Quilombo no estado de São Paulo durante os doze meses do ano. O Ribeirão Quilombo abrange os municípios de Campinas, Hortolândia, Sumaré, Nova Odessa e Americana, tendo como ponto de deságue o Rio Piracicaba, todas as cidades citadas são do Estado de São Paulo - BR. Dentre os fármacos encontrados, o acetaminofeno possui concentrações de até 305,1ng/L⁻¹. O autor relata que, ainda que ocorra uma biodegradação dos fármacos ao longo do curso do rio, a contaminação do Ribeirão Quilombo é levada até o Rio Piracicaba.

Garrido (2012) relata em seu trabalho as características do acetaminofeno, que é definido como uma molécula orgânica que possui uma moderada solubilidade em

água e grande estabilidade em solução aquosa em pH 5-7. A hidrólise do composto é a principal rota de degradação porém gera dois subprodutos: p-aminofenol e ácido acético. O tempo de meia vida dentro de organismo biológico varia entre 1,5 a 3 horas, mas no ambiente não se sabe ao certo o tempo de permanência do fármaco.

Quando o acetaminofeno está em efluentes não é esperado a sua adsorção em sedimentos e o seu potencial de bioconcentração é baixo. Pode ser encontrado no ar em forma de vapor e o composto pode reagir com radicais hidroxilas, sua remoção pode se dar por deposição seca ou úmida. No solo apresenta alta mobilidade e baixa volatilização. Além da forma direta de contaminação nos efluentes têm-se a forma indireta advindo do solo ou do ar na forma de vapor. Nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), ocorre um processo rotineiro de cloração da água, nessa fase o acetaminofeno ali presente sofre oxidação, o que define destinos diversos para o mesmo, que por sua vez pode ser em partes eliminado ou permanecer na água tratada. A oxidação parcial gera subprodutos em suma tóxicos como, por exemplo, a 1,4-benzoquinona que tem efeitos genotóxicos e mutagênicos (PAIS, 2013).

A remoção de fármacos dos efluentes é realizada em sua maioria por processos físico-químicos, hoje ocorre uma busca por novos métodos mais baratos e eficazes, seja um método único ou como complementar dos demais processos existentes. A biorremediação é um processo que utiliza organismos vivos para descontaminar ou minimizar os impactos de contaminação nos ambientes através do metabolismo dos mesmos. As bactérias reagem melhor nessa dinâmica de biorremediação, quando a técnica é aplicada em ambientes abertos cria-se uma gama de variedades de microorganismos através da interação no local. Ao longo da evolução as bactérias ficaram cada vez mais adaptadas para consumir os diversos compostos químicos presentes na Terra para obter energia e manter o seu metabolismo ativo, tendo como uma das principais fontes de energia o carbono (MINILLO et al., 2014).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CONTAMINANTES EMERGENTES

O meio ambiente vem sofrendo as consequências do avanço tecnológico e populacional humano principalmente a partir da Revolução Industrial em 1760. Desde a década passada a cada ano é possível detectar novas fontes de contaminações e com isso surgiu a temática dos contaminantes emergentes. Abordado em diferentes aspectos científicos os contaminantes emergentes são centenas de compostos encontrados no ar, água e no solo e não fazem parte da composição natural desses ambientes ou estão presentes em concentrações além do esperado, podendo assim, causar danos ao ecossistema. Estes compostos ainda estão sendo estudados e avaliados para serem incluídos em programas de monitoramentos de rotina assim como precisam de legislação para regulamentar e evitar danos às gerações futuras (MONTAGNER et al., 2017).

A origem desses contaminantes podem ser antrópicas (efluentes e resíduos domésticos, industriais, hospitalares, agrícolas e pecuário) e também por fontes naturais (compostos presentes em espécies específicas de plantas). O mais importante em detectar a fonte é poder impedir que essa eliminação de compostos tóxicos causem danos irreversíveis (MOREIRA et al., 2013).

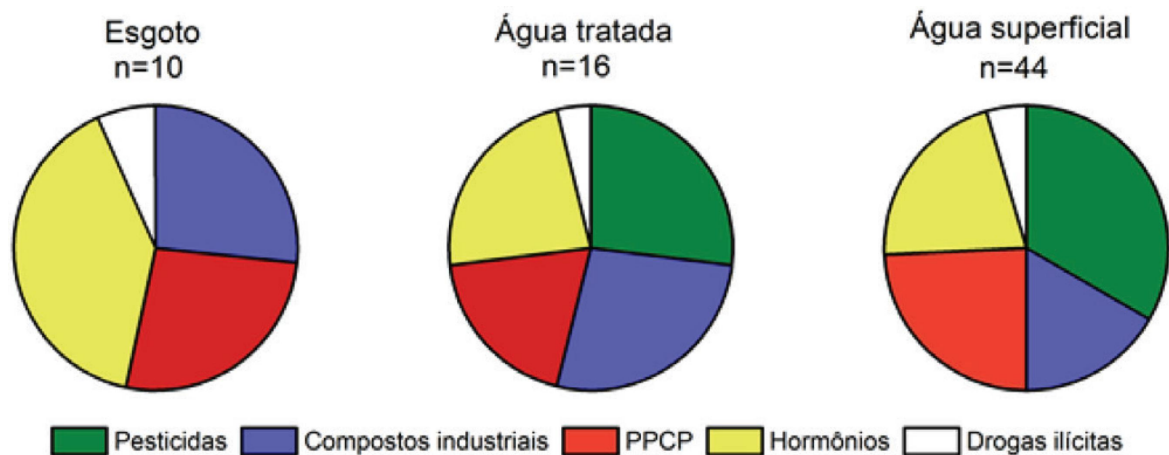
Com avanço de técnicas mais sensíveis capazes de detectar contaminantes emergentes em corpos aquáticos e em águas residuárias, na faixa de ng L^{-1} e ug L^{-1} gerou mais preocupação acerca da exposição crônica a estes compostos que podem afetar a preservação da vida aquática, dessedentação de animais e saúde humana (MIZUKAWA, 2016).

No Brasil os estudos envolvendo os contaminantes emergentes deram início na década de 90, tendo como foco os pesticidas. As matrizes aquáticas (esgoto, águas superficiais e subterrâneas, águas tratada e envasada para consumo humano) são as mais investigadas visto que em suma é destino final de contaminantes seja de forma direta ou indireta. Por sua amplitude territorial, o Brasil apresenta grandes conflitos socioeconômicos e ambientais sendo importante destacar que mesmo estando entre as 20 maiores economias mundiais o país sofre problemas sérios de saneamento

básico e escolaridade que afetam diretamente no aumento da poluição e deliberação de compostos com potencial tóxico para o meio ambiente (MOREIRA et al., 2013).

De acordo com Montagner et al. (2017) Os contaminantes emergentes podem bioacumular e se estabelecerem de forma crônica nos ecossistemas, a lista que compreende esses compostos englobam agrotóxicos, produtos de higiene, corantes da indústria têxtil, petróleo, hormônios e fármacos. Muitos desses compostos possuem em sua fórmula estruturas químicas tóxicas e cancerígenas como os anéis benzênicos. Na figura 1 é possível observar os estudos no Brasil publicados em revistas indexadas que demonstram os contaminantes encontrados em matrizes aquáticas investigadas.

Figura 1 - Distribuição das classes dos compostos estudadas nas matrizes aquáticas brasileiras: esgoto*, água tratada e águas superficiais, em que n representa o total de trabalhos publicados em revistas indexadas por matriz ambiental, dentro dos critérios estabelecidos. *Matriz esgoto: está indicando os trabalhos publicados sobre esgotos bruto e tratado e sobre efluentes hospitalares do Brasil. PPCP** (PPCP, do inglês, *Pharmaceuticals and Personal Care Products*).



Fonte: MONTAGNER et al. (2017).

Dessa forma, têm-se os hormônios, fármacos, produtos de higiene pessoal, compostos industriais e pesticidas como as classes mais investigadas. Os pesticidas são estudados seguindo o padrão de consumo regional no país, enquanto os demais seguem a tendência mundial e a prioridade determinada por agências ambientais norte-americanas e europeias (MONTAGNER et al., 2017).

2.1.1. Fármacos e o meio ambiente

Os fármacos podem ser considerados contaminantes devido a sua relação com metabolismos vivos, uma vez que dentro de organismos os fármacos passam por

processos de biotransformação, podendo em alguns seres bioacumular ou gerar reações que alteram a homeostase, causando danos ou até mesmo a morte. Sendo os fármacos compostos químicos sua interação com o meio se dá por reações químicas, podendo absorver, agregar, incorporar ou até mesmo reduzir outras moléculas as quais estão em contato. Além disso, é necessário levar em conta o tempo de meia vida dos fármacos e a sua biodisponibilidade, o que afeta diretamente sua relação e taxa de contaminação no ambiente (BISOGNIN et al., 2017).

O Brasil está entre os maiores consumidores de fármacos do mundo, dentre as classificações e uso dos fármacos, o grupo dos Medicamentos Isentos de Prescrição (MIPs) são a grande preocupação principalmente devido a automedicação (BRAYNER et al., 2018).

O trabalho de Arrais et al. (2016) traz uma lista das classes de fármacos mais consumidos no Brasil por automedicação sendo os principais: analgésicos, relaxante muscular, anti-inflamatórios e preparos para tosse e resfriado. Para além dos MIPs tem-se a preocupação com os antibióticos e os hormônios, visto que, a interferência metabólica destes são mais intensas com danos mais severos a biota exposta. Ao se tratar de antibióticos em efluentes é necessário compreender a microbiota local, a qual desempenha papel fundamental no ecossistema, a presença desse medicamento pode levar a morte desses microrganismos e conseqüentemente desequilíbrio ecológico.

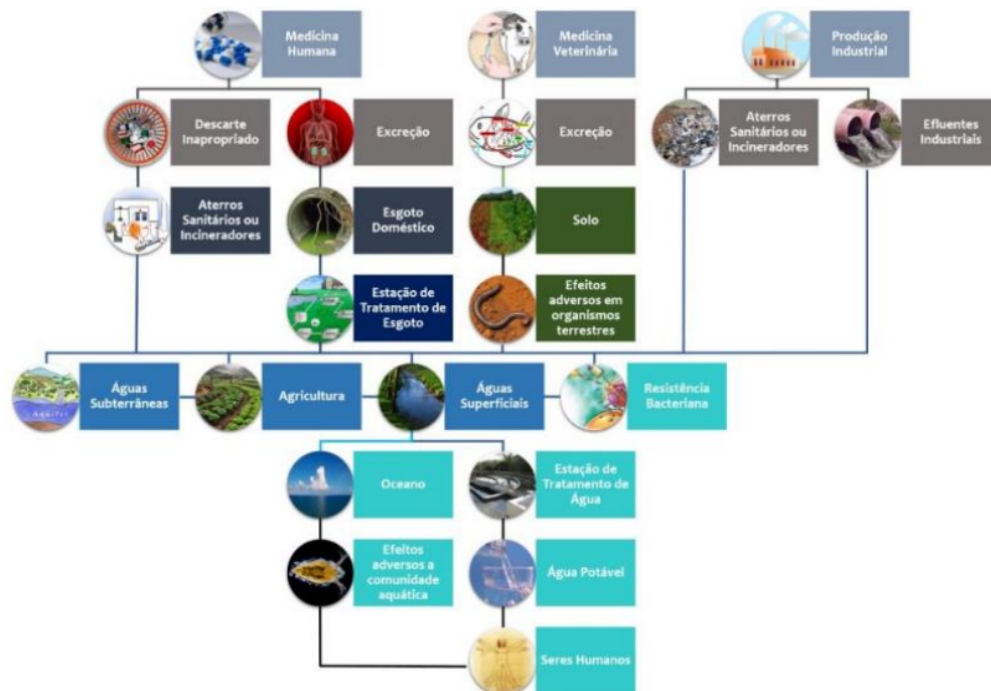
Segundo Ueda et al. (2009) a literatura retrata os fármacos como contaminantes emergentes de alta preocupação, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas para remediar efluentes contaminados e eliminar os impactos ambientais causados. Sendo as redes de tratamento de esgoto não capacitadas para remoção efetiva de fármacos devido a falta de tecnologias capazes de degradar os compostos sem gerar subprodutos tóxicos (principalmente se tratando dos métodos físico-químicos) dessa forma, fica uma certa responsabilidade por parte dos órgãos fiscais de desenvolver coletas e conscientização para população descartar corretamente seus resíduos farmacêuticos evitando assim a contaminação dos efluentes, os quais são os mais afetados.

A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é responsável por

monitorar e fiscalizar a produção, manutenção e distribuição de fármacos no país (ANVISA, 2014). Para o uso terapêutico as pessoas adquirem medicamentos que, em muitos casos, não são consumidos por completo e/ou ao perderem o prazo de validade, tais produtos são descartados no esgoto residencial, lixo comum ou em rede pública de esgoto. Porém, no ano de 2009, foi criado um regulamento da Anvisa que possibilita farmácias e drogarias a participarem voluntariamente de coleta de resíduos de medicamentos para descarte pela população. Existe um desconhecimento por parte da população sobre a composição química dessas substâncias e como elas podem contaminar ambientes, assim como não devem ser descartados no lixo comum também não há orientação e não existem postos de recolhimento (LEMOS, 2019).

Na figura 2 é demonstrado as possíveis rotas de destino de fármacos no meio ambiente, evidenciando as matrizes aquáticas como as mais afetadas pela contaminação, principalmente advindas das redes de tratamento de esgoto que não conseguem eliminar estes compostos por completo (DEMBOGURSKI, 2019).

Figura 2 - Principais possíveis rotas de destino dos fármacos no meio ambiente.



Fonte: DEMBOGURSKI (2019).

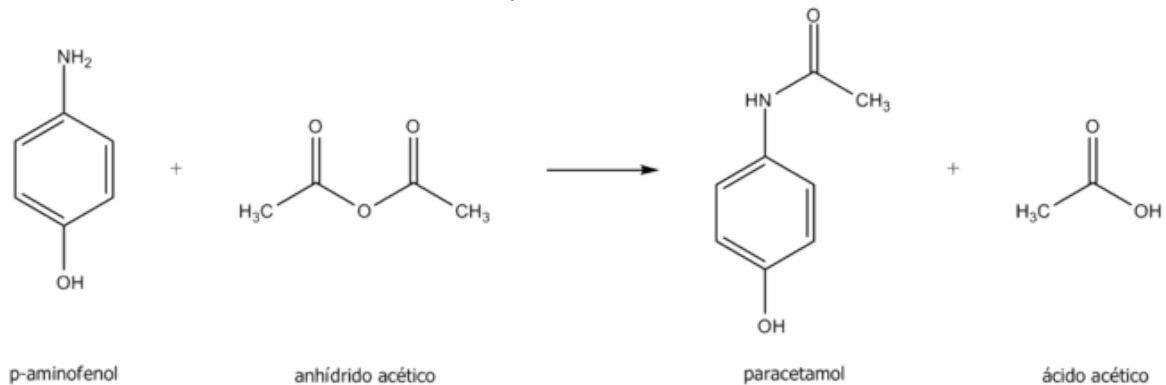
2.2. ACETAMINOFENO

Segundo a Anvisa (2014) o acetaminofeno é um droga farmacêutica com características anti-inflamatórias, entretanto ele se trata de um anti-inflamatório não

esteróide por isso possui baixa capacidade anti-inflamatória. Neste caso ele age melhor como analgésico e inibidor de febre, ou seja, antipirético. Pode ser comercializado adjunto a outros princípios ativos e sua venda não necessita de prescrição médica, sendo este um Medicamento isento de Prescrição. Ainda que sua venda seja liberada, a Anvisa alerta sobre o risco da automedicação e superdosagem, na qual sua dose diária não pode ultrapassar 4000mg ou 75mg/kg pois uma alta dose ou consumo constante pode causar danos no fígado e culminar em doenças hepáticas.

De acordo com Baptistella (2003) o acetaminofeno, foi descoberto em 1877 na Alemanha e pode ser sintetizado a partir da reação entre o p-aminofenol e anidrido acético como demonstrado na figura 3:

Figura 3 - Síntese do acetaminofeno a partir da reação entre o p-aminofenol e anidrido acético. Resultando em paracetamol e ácido acético.



Fonte: (BAPTISTELLA, 2003).

O acetaminofeno é derivado do p-aminofenol, mesmo que seu mecanismos de ação ainda não é completamente determinado, o fármaco pode inibir a via do óxido nítrico (NO) na qual é mediada por diversos receptores de neurotransmissores como o N-metil-D-aspartato (NMDA) resultando assim no alívio da dor. Quanto a capacidade antipirética o mesmo pode inibir a síntese e liberação de prostaglandinas no Sistema Nervoso Central (SNC) assim como os efeitos que as prostaglandinas causam no centro regulador de calor no hipotálamo anterior (DEMBOGURSKI, 2019).

2.2.1. Características físico-químicas do acetaminofeno

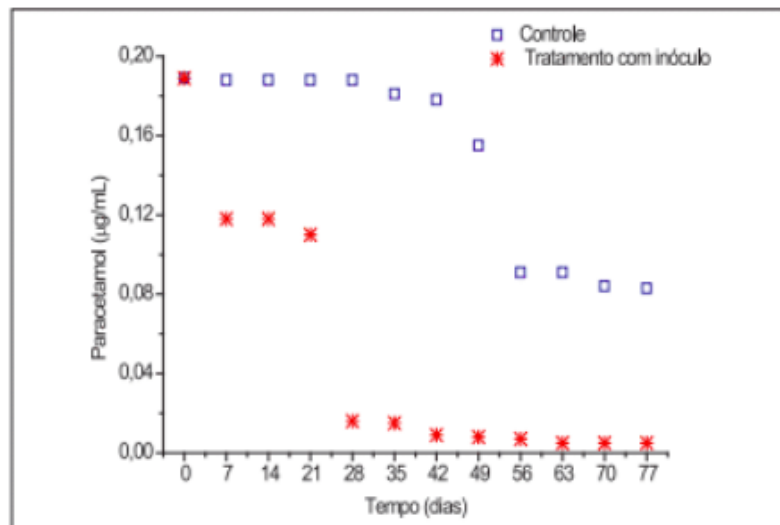
Segundo Sigma-Aldrich (2019) *apud* Dembogurski (2019) a molécula de acetaminofeno é um composto orgânico nitrogenado que possui um anel benzênico, o

mesmo é classificado pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) como N-(4-hidroxifenil)etanamida. Possui as funções orgânicas fenol, amida e metila, sua fórmula molecular é $C_8H_9NO_2$, massa molar de $151,16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, é uma substância sólida na temperatura ambiente, com ponto de fusão em 169°C e solubilidade em água de $12,75 \text{ g/L}$ (20°C).

2.2.2. Biodegradação do acetaminofeno

A biodegradação do fármaco acetaminofeno é relatada em estudos na literatura, seja através do seu metabolismo ou até mesmo da biomassa como adsorvente (MINILLO et al., (2014); ALVES e TAKAHASHI (2016)). A figura 4 mostra a degradação do paracetamol no trabalho de Minillo et al. (2014) a partir de microrganismos encontrados em filtros de carvão.

Figura 4 - Biodegradação eficiente do fármaco paracetamol por microrganismos presentes nos filtros de carvão com atividade biológica, onde na presença do inóculo ocorre a diminuição da concentração do paracetamol.



Fonte: MINILLO et al. (2014).

2.3. BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é uma técnica que utiliza organismos vivos para limpar ambientes contaminados. O metabolismo dos seres vivos são o grande mecanismo que permite a execução da técnica. Dentre os seres utilizados têm-se as plantas, algas e os microrganismos como principais agentes. Para que ocorra uma biorremediação é necessário que o organismo vivo seja capaz de biodegradar o

composto, para isto, o composto deve está biodisponível no ambiente de forma a ser metabolizado pelos seres (ALENCAR, 2020).

Os microrganismos são amplamente estudados e empregados na biorremediação devido a sua capacidade de metabolizar diversos compostos principalmente compostos orgânicos. A evolução rápida dos microrganismos principalmente das bactérias contribui efetivamente para tal. Dessa forma é de suma importância conhecer o composto a ser degradado e os organismos vivos a serem utilizados, pois a técnica de biorremediação necessita de aparatos biotecnológicos e análise íntegra da viabilidade para evitar um desequilíbrio ainda maior no ecossistema (ALENCAR, 2020; MINILLO et al., 2014).

2.4. MICRORGANISMOS DO SOLO

De acordo com Pepper e Josephson (1996), os microrganismos estão presentes em todos os ambientes e relacionados a todos os demais seres vivos, participam de atividade biológica e são fundamentais na ciclagem de nutrientes. No solo é possível encontrar uma gama de microrganismos seja bactérias, fungos ou leveduras desempenhando papéis diversos neste ecossistema como as bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas pela primeira vez por Beijerinck em 1888, dando início a longas pesquisas em bioquímica e composição do solo. A quantidade de microrganismos no solo pode ser evidenciada na tabela (**Tabela 1**):

Tabela 1 - Estimativa da abundância de microrganismos do solo no ambiente, demonstrada por seus números e biomassa.

Microrganismo	Número / g solo ⁻¹	Biomassa dentro da Zona Raízes / kg ha ⁻¹
Bactérias	10 ⁸	500
Actinomicetos	10 ⁷	500
Fungos	10 ⁶	1500

Fonte: PEPPER et al. (1996).

2.4.1. Microrganismos do solo agrícola

Os microrganismos do solo agrícola estão adaptados a presença e concentrações altas de compostos tóxicos como os pesticidas. Estes compostos possuem em sua composição anéis benzênicos e funções nitrogenadas. Isso permite que os microrganismos do solo seja capaz de integrar ao seu metabolismo estes

compostos e eliminar no ambiente compostos menos tóxicos, a exemplo os compostos orgânicos, onde os microrganismos degradam as cadeias carbônicas e liberam gás carbônico removendo dessa forma o poluente do solo (MONTEIRO, 2001).

2.5. RESPIROMETRIA DE BARTHA

A respirometria de Bartha e Pramer (1965) é um modelo de sistema que cria um ambiente fechado, conectando duas câmaras; uma que possui o inóculo a ser degradado e outra que contém a solução alcalina identificadora de CO₂ que será gerada pela respiração microbiana. Deve-se conectar a um erlenmeyer (250 mL) um braço lateral (40mm de diâmetro; 100mm de altura), ambos deverão estar fechados com rolhas de borracha. No caso do braço lateral, a rolha deve ter uma perfuração para acoplar uma cânula (1 a 2mm de diâmetro) com tampa. A rolha do erlenmeyer por sua vez, deverá ter perfuração para acoplar um suporte (lã de vidro ou algodão) com uma válvula intermediária localizada acima da rolha e abaixo do filtro de cal sodada (15mm de diâmetro; 40mm de altura, o filtro deve ser vedado com rolha na região de contato com o externo do respirômetro (Norma técnica L6. 350 da CETESB, 1990).

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a capacidade da microbiota do solo de degradar o acetaminofeno presente em ambientes aquáticos e analisar a viabilidade da biorremediação de efluentes contaminados com fármacos derivados de acetaminofeno a partir desses microrganismos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a biodegradação do acetaminofeno a partir da respirometria;
- Verificar a adaptação dos microrganismos do solo em ambiente aquático;

- Comparar a taxa de biodegradação do acetaminofeno entre os microrganismos do solo, da água e do consórcio entre eles.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos a serem executados para alcançar os objetivos deste trabalho foram realizados a partir do método de respirometria para bioprospecção de microrganismos e biodegradação do acetaminofeno.

4.1. RESPIROMETRIA

Foi utilizada a metodologia de respirometria de Bartha e Pramer (1965) adaptada para meio aquoso. Desta forma cria-se um ambiente fechado onde é possível determinar de forma indireta a ocorrência da biodegradação pela concentração de CO₂.

4.1.1. Preparação dos reagentes e soluções

Como a obtenção de dados se baseia nas concentrações de CO₂, é necessário que a água utilizada no experimento seja isenta do mesmo, desta forma, a água destilada foi fervida por 30 minutos. Posteriormente a mesma foi transferida para um frasco fechado até seu resfriamento.

Segundo a Norma técnica L6. 350 da CETESB (1990) para obter 0,2M de hidróxido de potássio (KOH) foi necessário dissolver 11,2g de KOH em 1000ml de água isenta de CO₂ e manter a solução em um recipiente fechado. Para padronizar a solução utilizou-se 100ml de solução de 0,200N de ftalato ácido de potássio e duas gotas de vermelho-de-metila para calcular a normalidade real do KOH.

A preparação de 0,1M de HCL consistiu em transferir 8,5mL de HCL concentrado p.a. para um balão volumétrico de 1000ml e o volume completado com água destilada. Sua padronização foi contra 100mL de solução de carbonato de sódio 0,1N e duas gotas do indicador vermelho-de-metila para assim, calcular a normalidade real do HCL (Norma técnica L6. 350 da CETESB, 1990).

Para a obtenção de 0,1N de BaCl₂ foi preciso dissolver 12,2g de BaCl₂.2H₂O em um balão volumétrico de 100ml, por conseguinte completou-se o balão com água

destilada. Uma solução indicadora de fenolftaleína foi realizada, para isso, dissolveu-se 0,2g de fenolftaleína em 60ml de etanol p.a. e completou-se para 100ml com água destilada (Norma técnica L6. 350 da CETESB, 1990).

4.1.2. Preparo do inóculo

O solo agrário possui alta concentração de microrganismos de interesse na biorremediação devido seu metabolismo. Pensando em selecionar microrganismos adaptados capazes de degradar o acetaminofeno presente na amostra analisada, o solo pode ser considerado um inóculo (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Com isso, as amostras do solo para uso do inóculo foram coletadas em terreno agrícola na Universidade Federal de São Carlos no Campus de Ciências Agrárias na cidade de Araras-SP (22°31'46.6"S 47°38'18.2"W) próximo ao ambulatório como indica a figura (Figura 5):

Figura 5 - Local onde foi realizado a coleta da amostra do solo para preparo do inóculo.



Fonte: GPS Coordinates (2022).

A coleta foi realizada em uma profundidade de 0 a 5cm, tendo como características macroscópicas do solo a coloração avermelhada, partículas maiores e resíduos sólidos de vegetação, portanto foi necessário peneirar o solo para sua homogeneização. Com o objetivo final de obter 20g de solo agrário peneirado para posterior inserção do mesmo no respirômetro.

4.1.3. Preparo das amostras

Devido a possibilidade de coleta da amostra ser em um efluente já descrito na literatura como contaminado com acetaminofeno, foi coletado no Rio Piracicaba, na cidade de Piracicaba a amostra da água que foi utilizada em alguns respirômetros (PASQUINI, 2016).

A coleta da amostra do Rio Piracicaba foi realizada próximo a ponte Pênsil localizada dentro da cidade (22°71'84.2"S 47°65'43.9"W) como pode ser observada na figura (**Figura 6**):

Figura 6 - Local da coleta de amostra do Rio Piracicaba na cidade de Piracicaba-SP.



Fonte: GPS Coordinates (2022).

A solução de acetaminofeno foi preparada baseada na concentração máxima encontrada no Ribeirão Quilombo que deságua no Rio Piracicaba, relatada por Pasquini (2016), sendo definida assim a concentração mínima para este experimento de 300ng/L^{-1} , para facilitar os cálculos de concentração e transferência de volume a unidade de concentração foi convertida para mg/ml. Dessa forma, o acetaminofeno líquido encontrado na farmácia possui concentração de 200mg/ml, para obter a concentração relatada na literatura por Pasquini (2016) de 300ng/L^{-1} ou seja $0,0000003\text{mg/ml}$ foi necessário em primeiro momento realizar uma solução de 10ug do medicamento TYLENOL® de 200mg/ml em 100ml de água destilada onde a concentração final foi de 0,02mg/ml. Essa concentração base da solução estoque serviu para determinar posteriormente as concentrações diferentes testadas.

Em alguns respirômetros foi utilizado o meio de cultura líquido base Bushnell Haas Broth (BH), assim, o meio BH foi preparado a partir das pesagens dos seguintes reagentes:

- 0,2 g Sulfato de magnésio
- 0,02g Cloreto de cálcio
- 1g Sulfato de monopotássio
- 1g Sulfato de amônio
- 1g Nitrato de potássio
- 0,005 Cloreto de ferro

Os reagentes pesados foram adicionados a 1000ml de água destilada e homogeneizados. O pH foi mensurado a fim de constatar se o mesmo está na faixa 7 em temperatura ambiente de 25°C, com isso o meio foi esterilizado na autoclave sob pressão de 1 atm, 121°C por 15 minutos.

4.1.4. Montagem do respirômetro

Devido a ausência de respirômetros suficientes no laboratório de microbiologia da UFSCar, foi necessário uma adaptação para criar uma ambiente análogo ao respirômetro de Bartha. Desse modo foi utilizado frascos de vidro com volume de 2L possuindo uma tampa com trava que só foi aberta no momento de coleta do KOH constituindo um sistema semi-fechado assim como o respirômetro de Bartha. O KOH foi colocado dentro de copos descartáveis de 200ml inseridos dentro dos frascos de vidro, ficando dessa forma separado da amostra com capacidade de diluir o CO₂ da mesma forma que o respirômetro de Bartha. Essa modificação da técnica possui baixo custo e mesma eficiência que o sistema original. A montagem do respirômetro pode ser observada na figura (**Figura 7**):

Figura 7 - Respirômetro adaptado.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.1.5. Inoculação do respirômetro e montagem das amostras

Após coleta da amostra do efluente, preparo das soluções, meio de cultura BH e da solução estoque de acetaminofeno, foram montados 8 respirômetros, sendo 3 com a amostra coletada do Rio Piracicaba, 2 controles e 3 para análise da biorremediação com meio simulado, como pode ser observado no quadro (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Quadro explicativo referente ao conteúdo dos respirômetros montados.

AMOSTRA	COLETA DO RIO	MEIO BH	INÓCULO	ACETAMINOFENO
A1	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
A2	SIM	NÃO	SIM	NÃO
A3	SIM	NÃO	SIM	SIM
C1	NÃO	SIM	SIM	NÃO
C2	NÃO	SIM	SIM	SIM
B1	NÃO	SIM	SIM	SIM
B2	NÃO	SIM	SIM	SIM
B3	NÃO	SIM	SIM	SIM

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Cada respirômetro foi executado em triplicata e sua montagem ocorreu da seguinte forma: Na amostra intitulada A1 ou amostra do rio 1 foi colocado 100ml da amostra coletada no rio Piracicaba dentro do frasco de vidro de 2L. No copo descartável de 200ml foi colocado com auxílio da seringa 10ml da solução de KOH previamente preparada, posteriormente o respirômetro foi fechado e travado. A amostra intitulada A2 ou amostra do rio 2 por sua vez foi colocado 100ml da amostra coletada no rio Piracicaba e adicionado a mesma 1g do inóculo do solo dentro do frasco de vidro de 2L. No copo descartável de 200ml foi colocado com auxílio da seringa 10ml da solução de KOH previamente preparada, posteriormente o respirômetro foi fechado e travado. Já a amostra intitulada A3 ou amostra do rio 3 foi executada da seguinte forma: Dentro do frasco de vidro de 2L foi colocado 100ml da amostra coletada no rio Piracicaba e adicionado a mesma 1g do inóculo do solo assim como com o auxílio da pipeta foi pipetado 150ul da solução previamente preparada de acetaminofeno, neste caso, a concentração de acetaminofeno foi 100x o valor relatado na literatura por Pasquini (2016). No copo descartável de 200ml foi colocado com auxílio da seringa 10ml da solução de KOH previamente preparada, posteriormente o respirômetro foi fechado e travado.

A montagem dos controles ocorreu desse modo: O controle intitulado C1 foi preparado com o meio BH no volume de 100ml e adicionado 1g do inóculo do solo, No copo descartável de 200ml foi colocado com auxílio da seringa 10ml da solução de KOH previamente preparada, posteriormente o respirômetro foi fechado e travado. O controle intitulado C2 foi preparado com o meio BH no volume de 100ml e adicionado 150ul da solução estoque de acetaminofeno, ficando na concentração máxima testada de 0,00003mg/ml. No copo descartável de 200ml foi colocado com auxílio da seringa 10ml da solução de KOH previamente preparada, posteriormente o respirômetro foi fechado e travado.

Os respirômetros para verificar a atividade microbiológica e degradação do acetaminofeno a partir do inóculo foram preparados com o meio BH no volume de 100ml, 1g do inóculo do solo e as concentrações de acetaminofeno específicas: mínima (0,0000003mg/ml) baseado nos dados encontrado no efluente do Rio Piracicaba em Piracicaba/SP por Pasquini (2016), média (0,000003mg/ml) sendo esta 10x a registrada pro Pasquini (2016) e máxima (0,00003mg/ml) por sua vez 100x a registrada por Pasquini (2016). Todos os respirômetros de biorremediação foram montados da seguinte maneira: No copo descartável de 200ml foi colocado com auxílio da seringa 10ml da solução de KOH previamente preparada, posteriormente os respirômetros foram fechados e travados. A montagem foi realizada em triplicata e os respirômetros foram incubados em temperatura de 22°C por 42 dias. Os mesmos foram intitulados de acordo com a concentração de acetaminofeno adicionada onde o respirômetro de biorremediação B1, B2 e B3 continha a concentração mínima, média e máxima testadas respectivamente.

4.1.6. Monitoramento do respirômetro

A monitoração da saturação de CO₂ foi realizada após a montagem nos períodos de: 10º dia; 17º dia; 28º dia; 35º dia e 42º dia. Para isso, em todos os dias de titulação foi preciso separar dois frascos de erlenmeyer de 100mL para cada ensaio, adicionar duas gotas de fenolftaleína e 1ml da solução de cloreto de bário 1N. A trava dos frascos foram destravadas e os respirômetros abertos para coleta do KOH, com auxílio de uma seringa de 10ml retirou-se a solução saturada de KOH que foi

transferida para os frascos preparados anteriormente. O copo descartável foi lavado com o auxílio da seringa com 10ml de água destilada isenta de CO₂, esse resíduo foi adicionado nos frascos de erlenmeyer junto a primeira remoção de KOH e, por conseguinte, foi titulado.

A reposição do KOH 0,2N foi realizada com outra seringa de 10ml, o sistema foi fechado novamente e levado para a incubação. Para titulação a Norma técnica L6. 350 da CETESB (1990) determina utilizar o HCL 0,1N e a solução indicadora fenolftaleína. Ao fim da titulação, anotou-se a quantidade de ácido clorídrico utilizada até o ponto de viragem.

O branco foi titulado utilizando dois frascos de erlenmeyer de 100ml, adicionando duas gotas de fenolftaleína e 1ml da solução de cloreto de bário 1N, onde apenas a solução de KOH foi titulada com HCL. Para fazer a conversão do volume de HCL gasto na titulação para a quantidade de CO₂ gerado. Utilizou-se uma equação de conversão, descrita na equação 1 (MONTAGNOLLI, 2015).

Equação 1 – Equação utilizada para calcular a emissão de CO₂, na qual GCO₂ é a geração de gás carbônico, A é o volume de HCl gasto (em ml) na titulação do branco; B é o volume de HCl gasto (em ml) na titulação da amostra; 50 é o fator para transformar equivalente em μmol de CO₂ e 0,044 é o fator para transformar μmol em mg de CO₂.

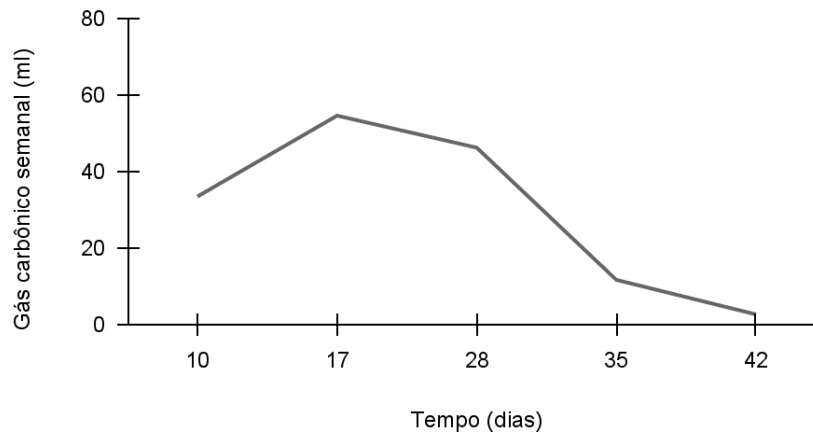
$$GCO_2 = (A - B) * 50 * 0,044$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o período de coleta dos dados e conversão do volume de HCL em CO₂ gerado pode-se observar a geração de CO₂ durante o 10º, 17º, 28º 35º e 42º dia de titulação em cada amostra analisada, a seguir têm-se os gráficos gerados a partir dos dados das amostras do rio e controle testados (**Figuras 8 a 12**).

Figura 8 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra A1.

Respirometria -A1

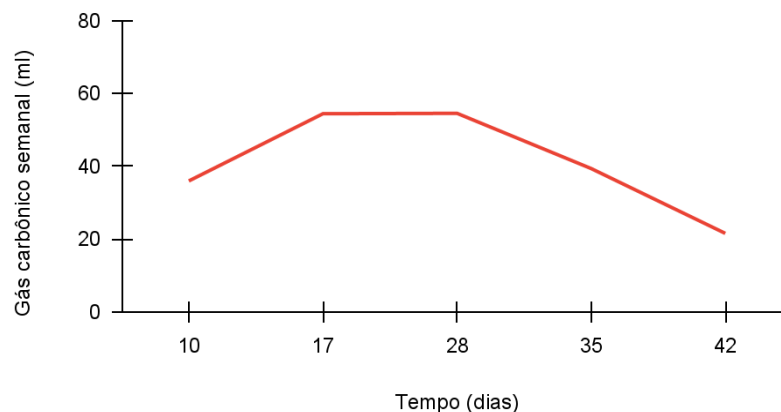


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Na amostra A1 (**Figura 8**), constatou-se a produção acumulada de CO₂ total de 148,5 ml ao longo dos 42 dias. Sendo 33,4 ml, 54,56 ml, 46,2 ml, 11,6 ml e 2,64 no 10º, 17º, 28º, 35º e 42º dias respectivamente. Sua maior taxa de produção foi no 17º dia com posterior decaimento. A1 possuía apenas a amostra coletada do efluente, dessa forma a produção de CO₂ não envolveu o acetaminofeno mas sim a matéria orgânica e os microrganismos já presentes na água do Rio Piracicaba. Por isso, devido à biodegradação pelos microrganismos aquáticos em seu ambiente é esperado a liberação de CO₂ detectado na análise respirométrica (MINILLO et al., 2009).

Figura 9 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra A2.

Respirometria - A2

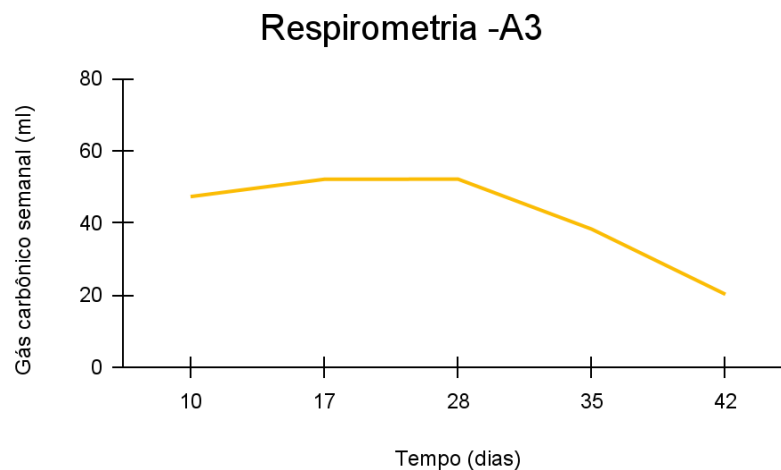


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Na amostra A2 (**Figura 9**), constatou-se a produção acumulada de CO₂ total de 205,92 ml ao longo dos 42 dias. Sendo 35,97 ml, 54,45 ml, 54,56 ml, 39,38 ml e 21,56

no 10º, 17º, 28º, 35º e 42º dias respectivamente. Com maiores taxas no 17º e 28º dias, tendo entre os valores pequenas diferenças, a diminuição se deu a partir do 28º dia. A2 possuía a amostra coletada do efluente e o inóculo do solo, dessa forma a produção de CO₂ e não envolveram o acetaminofeno assim como A1, mas envolve a matéria orgânica e os microrganismos já presentes na água do Rio Piracicaba e no inóculo do solo agrário. Com isso, devido a biodegradação pelos microrganismos em seus ambientes é esperado essa produção de CO₂ no respirômetro. É possível notar que em comparação com A1 que só possuía os microrganismos e matéria orgânica do efluente, A2 teve uma produção maior de CO₂ devido a carga microbiana maior e maior quantidade de matéria orgânica associada advinda do solo (MINILLO et al., 2009).

Figura 10 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra A3.

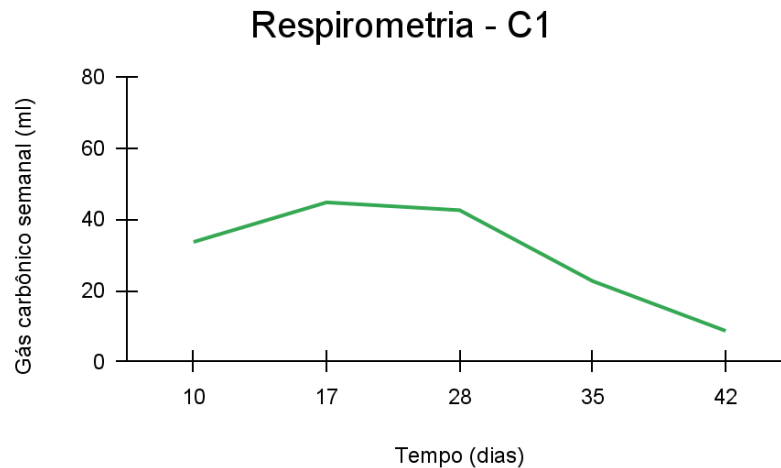


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O gráfico gerado (**Figura 10**) acima é referente a amostra A3, na qual possuía a água coletada do efluente, o inóculo do solo e a concentração máxima de acetaminofeno testada. Sendo assim, A3 teve produção total de CO₂ com volume de 210,06 ml ao longo dos 42 dias, sendo: 47,3 ml, 52,1 ml, 52,14 ml, 38,28 ml e 20,24 nos respectivos: 10º, 17º, 28º, 35º e 42º dias. A3 se assemelha quanto a taxa de produção máxima de CO₂ no 17º e 28º dias e só posterior a isso ocorreu o decaimento da produção. Com produção total um pouco maior que A2, o que pode ser explicado devido a presença do acetaminofeno que serve como fonte de carbono para os microrganismos, portanto além da matéria orgânica advinda do efluente e do solo

pode-se dizer que esse volume maior de CO₂ produzido é referente a possível biodegradação do acetaminofeno (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

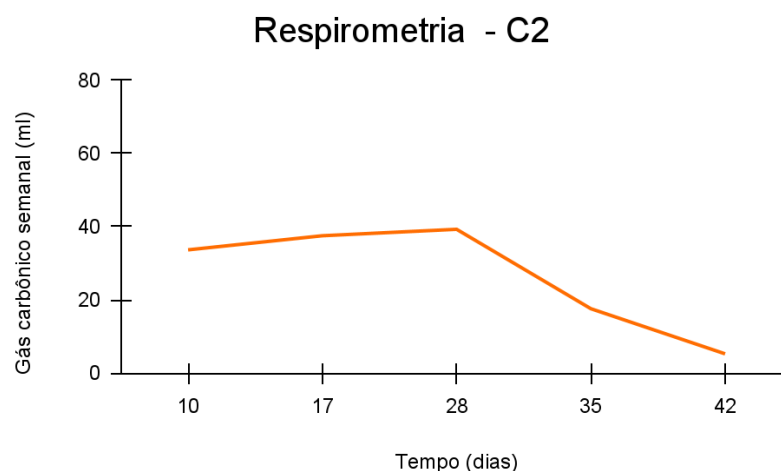
Figura 11 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra C1.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Quanto ao controle C1 (**Figura 11**), o qual só possuía o meio BH e o inóculo do solo, já era esperado um baixo volume de CO₂ produzido. Pois o meio BH não possui fonte de carbono, entretanto o inóculo do solo possui matéria orgânica e microrganismos, os quais metabolizaram o pouco de carbono disponível (MINILLO et al., 2009), caracterizando assim a produção de CO₂ identificada sendo 152,35 ml o volume total de CO₂ produzido, onde: 33,66 ml, 44,77 ml, 42,57 ml, 22,66 ml e 8,69 ml foram produzidos nos respectivos: 10º, 17º, 28º, 35º e 42º dias. C1 só produziu mais CO₂ que C2 como pode ser observado no gráfico a seguir:

Figura 12 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra C2.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Em C2 (**Figura 12**) obteve-se a menor produção de CO_2 o que era esperado, pois possuía apenas o meio BH e o acetaminofeno na concentração máxima testada. Caso o sistema fosse fechado não deveria ter nenhuma taxa de produção de CO_2 , porém o sistema é semi-fechado permitindo assim trocas gasosas que podem ter levado microrganismos capazes de degradar o acetaminofeno que era a única fonte de carbono presente. A produção total de CO_2 foi de 133,32 ml, onde o 33,66 ml, 37,51 ml, 39,27 ml, 17,6 ml e 5,28 ml nos respectivos: 10º, 17º, 28º, 35º e 42º dias.

Todas as amostras foram realizadas em triplicatas, não obtendo diferenças significativas entre elas, entretanto em C2 na réplica intitulada C2.2 (**Figura 13**) ocorreu a presença de microalgas, o que é curioso pois nenhuma outra amostra apresentou crescimento microalgal, nem mesmo a que possuía água coletada do efluente. As microalgas utilizam compostos orgânicos dissolvidos na água em seu metabolismo para realizar fotossíntese. Como a incubadora era compartilhada e outros experimentos dependiam de iluminação, foi utilizado uma incubadora com fotoperíodo, o que pode ter criado um ambiente propício ao crescimento da microalga (NASCIMENTO, 2019). Outro ponto é que a contaminação pode ter surgido no momento da titulação onde ocorre a abertura do respirômetro e trocas gasosas. Mesmo com pouca disponibilidade de matéria orgânica o crescimento de microalgas foi significativo como pode ser observado na figura (**Figura 13**):

Figura 13 - Respirômetro C2.2 contendo a presença de microalgas fotossintetizantes.

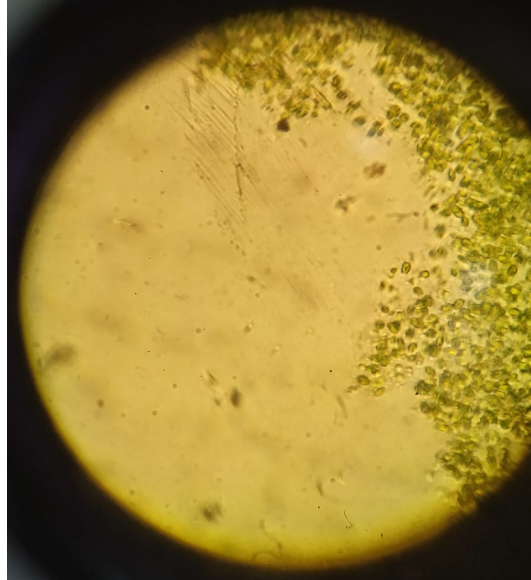


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A fim de averiguar se a coloração verde presente na amostra realmente era microalgas, foi realizada a montagem de uma lâmina simples e posterior visualização

no microscópio óptico, confirmando assim a presença da mesma como pode ser observado (**Figura 14**):

Figura 14 - Lâmina simples no aumento de 40x preparada para confirmação da presença de microalgas na amostra do respirômetro C2.2.

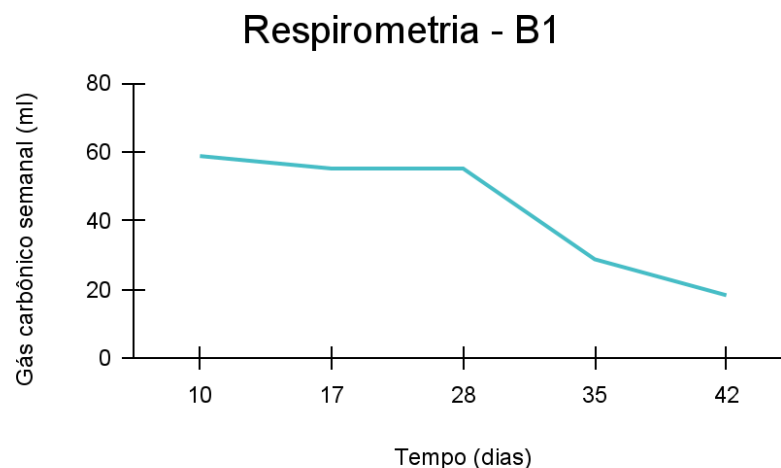


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Durante a visualização no microscópio óptico foi possível observar também que as microalgas estavam em alta concentração e possuía motilidade.

Os respirômetros de biorremediação foram testados em três concentrações diferentes, sendo B1 a concentração mínima a qual foi baseada nos dados de Pasquini (2016), B2 a média e B3 a máxima, as análises dos dados serão relatadas logo abaixo (**Figuras 15, 16 e 17**).

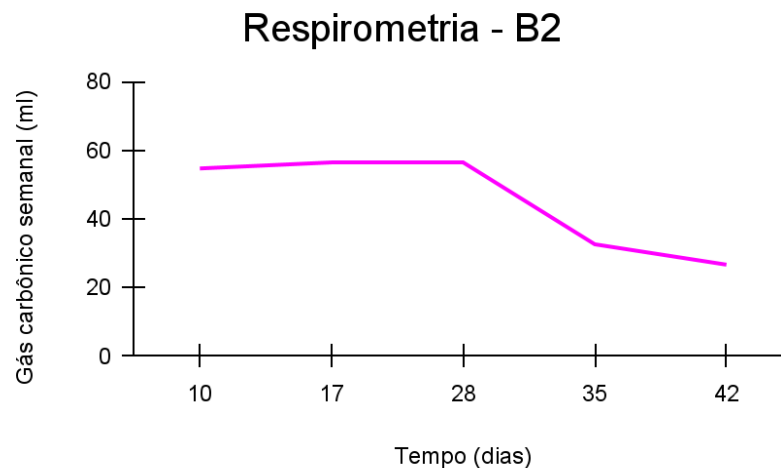
Figura 17 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra B1.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O respirômetro B1 (**Figura 15**) possuía o meio BH, o inóculo do solo e a concentração mínima testada de acetaminofeno. B1 apresentou 216,48 ml de CO₂ ao longo dos 42 dias. Sendo: 58,85 ml, 55,22 ml, 28,82 ml e 18,37 ml no 10º, 17º, 28º, 35º e 42º dias. Esse resultado mostra a segunda maior produção de CO₂. Isso significa que além da matéria orgânica presente no solo agrícola a atividade microbiana detectada pela geração de CO₂ pode ter sido induzida pelo acetaminofeno presente. Sua maior produção foi no 10º dia com queda a partir do 17º dia, esses valores denotam que a microbiota do solo submetida a concentração baseada na literatura, apresentou capacidade de consumo do acetaminofeno, o qual não foi tóxico a ponto de eliminar os microrganismos presentes, sendo estes assim resistentes a essa concentração (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Figura 16 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra B2.

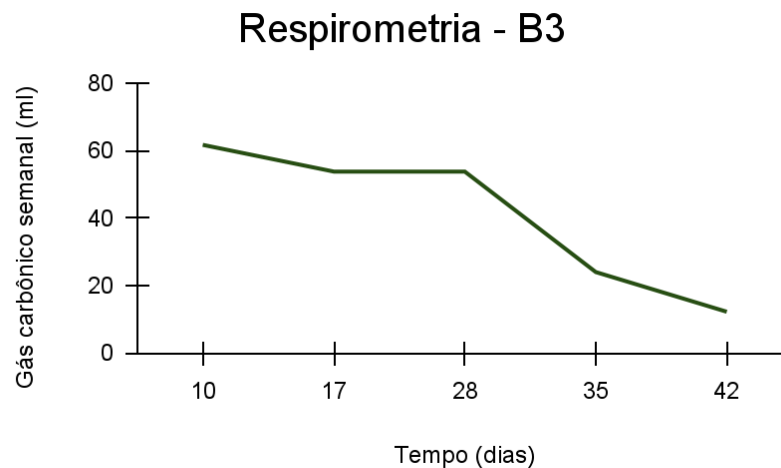


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O Ensaio B2 (**Figura 16**) por sua vez foi o respirômetro que apresentou maior produção de CO₂, assim como B1 possuía o meio BH e o inóculo de solo, porém a concentração de acetaminofeno foi de 10x o valor da literatura (PASQUINI, 2016). Com a taxa de liberação de CO₂ maior que as demais amostras B2 pode ser considerado a concentração ótima dentre as concentrações testadas para as atividades metabólicas dos microrganismos presentes com relação ao acetaminofeno, denotando que a microbiota pode consumir o acetaminofeno com eficácia sem sofrer com grandes efeitos tóxicos. Têm-se para B2 o volume final de CO₂ produzido de 226,71 ml, onde: 54,67 ml, 56,43 ml, 56,43 ml, 32,56 ml e 26,62 ml nos respectivos: 10º, 17º, 28º, 35º e 42º dias. Sua maior produção foi no 17º e 28º dia onde o mesmo

perpetuou o volume produzido decaindo apenas depois do 28º dia. Essa característica de pontos de produção mais altas de CO₂ foi encontrado também em A2 e A3, os quais também obtiveram altas taxas de biodegradação. A semelhança é mais nítida com A3, pois ambos possuíam concentrações de acetaminofeno, entretanto em A3 foi adicionado a amostra do efluente, o inóculo e a concentração máxima do contaminante. Ainda que A3 possuía mais concentração de acetaminofeno o mesmo também possuía mais microrganismos advindos dos efluentes. Portanto em uma concentração menor de 10x a amostra B2 apenas com inóculo do solo denota uma capacidade maior de atividade microbiológica na presença do acetaminofeno. (BORGES et al., 2009).

Figura 17 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias, referente a amostra B3.



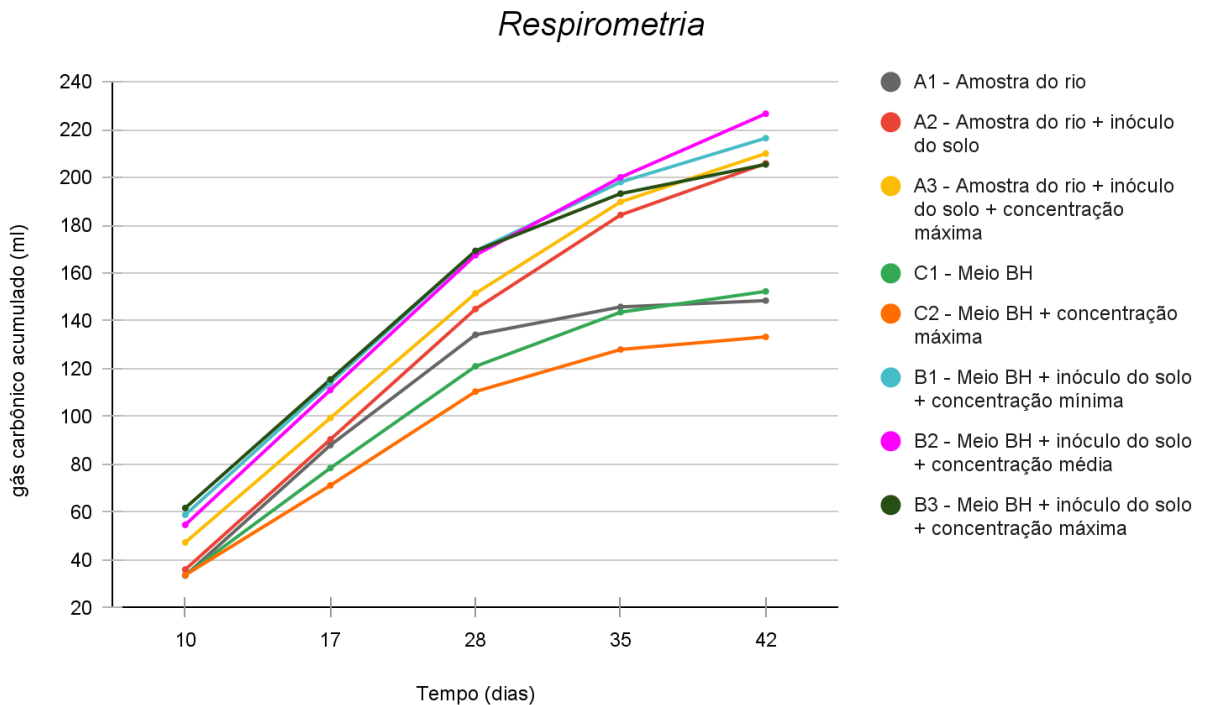
Fonte: Elaborado pela autora (2022)

Por fim B3 (**Figura 17**), que possuía o meio BH, inóculo do solo e maior concentração de acetaminofeno, sendo esta 100x maior que a baseada na literatura (PASQUINI, 2016). Nesse respirômetro a produção de CO₂ ficou em 5º lugar. A explicação pode se dar devido à alta concentração do contaminante que pode ter sido limitador no crescimento microbiano, possuindo efeitos tóxicos para a microbiota do solo impedindo assim a biodegradação. Em comparação com A3 que também possuía a concentração máxima testada B3 obteve menor resultado, isso é explicado devido a presença de microrganismos do efluente em A3 que pode ser mais adaptado a presença do acetaminofeno devido a contaminação do rio já descrita por Pasquini (2016). Em comparação com B2 a menor taxa de B3 reforça que a concentração

ótima nesse estudo foi a utilizada em B2, assim os microrganismos do solo são mais eficazes (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Na figura 18 é possível observar a produção acumulada e total de CO₂ de todas as amostras testadas. Com isso é possível analisar a ordem crescente de produção, sendo: B2, B1, A3, A2, B3, A1, C1 e C2.

Figura 18 - Produção de gás carbônico ao longo dos 42 dias de todas as amostras testadas.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Sendo assim B2 apresentou melhor resultado e maior produção de CO₂ na presença do acetaminofeno. B3 e B2 tiveram uma produção semelhante até o 28º dia, mas posteriormente ocorreu o decaimento em B3 e o aumento da produção em B2. C1 teve a segunda menor taxa com um pequeno aumento nos últimos 7 dias de respirometria. C2 como esperado obteve a menor taxa de todas, ainda que com a presença das microalgas. A2 e A3 tiveram resultados semelhantes, entretanto A3 obteve maior produção de CO₂ dentre as amostras que continham a água do efluente. B1 ficou em segundo lugar, mas compartilhou durante os primeiros dias resultados semelhantes a B2 e B3. Por fim, A1 teve um pico de produção de CO₂ no 28º dia, mas posteriormente ocorreu o declínio, demonstrando que a matéria orgânica encontrada no efluente foi consumida pelos microrganismos aquáticos que já estavam presentes.

6. CONCLUSÃO

Com a produção maior de gás carbônico indicando atividade microbiana nos respirômetros de biorremediação e a baixa produção nos respirômetros que não possuíam o inóculo foi possível estabelecer relações entre as variáveis testadas, de forma a destacar a influência do inóculo no aumento de gás carbônico indicando uma biodegradação. O consórcio entre os microrganismos do solo e da água advindos da amostra do rio na presença do acetaminofeno também apresentou um volume maior de gás carbônico detectado sendo este superior a amostra que continha apenas os microrganismos presentes na água quando submetidos ao acetaminofeno. Foi possível também averiguar que os microrganismos do solo se adaptaram ao ambiente aquático, portanto os objetivos do trabalho foram alcançados. O baixo custo e fácil manipulação da técnica favorecem sua execução, entretanto são necessários mais avanços e pesquisas principalmente quanto a concentração do fármaco e determinação das espécies presentes no solo para assim obter uma confiabilidade e controle maior da biorremediação. Diante os dados apresentados, a partir da respirometria pode-se concluir que a microbiota do solo é capaz de degradar o acetaminofeno, podendo assim, ser uma alternativa futura viável para tratamento de efluentes contaminados com fármacos derivados de acetaminofeno. O trabalho em questão abre portas para futuras investigações na área que vem crescendo de acordo com as demandas mundiais ambientais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. **Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. NRB 14283. 1999. Rio de Janeiro-RJ.
- ALENCAR, F. L. S. **Bioprospecção da *Chromobacterium violaceum* para a biorremediação do chumbo: aplicações em biotecnologia e educação em saúde**. Data do depósito. 2020. 386f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2020.

- ALVES, F.; TAKAHASHI, J. **Avaliação da eficácia do processo de biorremediação do fármaco paracetamol pelo fungo *Penicillium brasilianum* utilizando a técnica de espectroscopia na região do UV-Visível.** 2016.
- AMÉRICO, J. et al. Detecção do analgésico paracetamol no córrego da onça, Três Lagoas-MS. **Revista eletrônica Fórum Ambiental do alto paulista, Saúde Saneamento e Meio Ambiente.** v.8, n. 12, p.38-47. 2012.
- ANVISA. **Paracetamol: riscos hepáticos relacionados ao uso do medicamento em combinação, em doses acima de 325 mg.** 2014.
- BAPTISTELLA et al. Síntese dos analgésicos paracetamol e fenacetina e do adoçante dulcina: um projeto para química orgânica experimental. **Química Nova**, Vol. 26, No. 2, p. 284-286. 2003.
- BISOGNIN, R. et al. Revisão sobre fármacos no ambiente. **Revista DAE**, v.66, n. 210, abril a julho de 2018.
- BORGES, R. et al. **Biodegradação dos fármacos ibuprofeno, naproxeno e diclofenaco de sódio por microrganismos presentes em biofiltros de carvão.** XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos, 2019.
- BRAYNER, N. et al. O risco do uso irracional do paracetamol na população brasileira e seus efeitos na homeostasia. **Revista Científica da FASETE.** 2018. Recife, PE.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo.** 2º ed. 2016. Piracicaba, SP.
- DEMOGURSKI, L. **Remoção dos poluentes emergentes paracetamol e diclofenaco sódico por adsorção em carvão ativado em pó.** Porto Alegre, 2019.
- GARRIDO, RAPHAEL. **Extração e quantificação de paracetamol em fármacos.** 2012, Assis-SP.
- MINILLO et al. Biodegradação de fármacos na água por microrganismos. **Revista DAE**, v.179, p. 42-49. 2009.
- MIZUKAWA, A. **Avaliação de contaminantes emergentes na água e sedimento na Bacia do Alto Iguaçu/PR.** Curitiba, 2016.
- MONTAGNER et al. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Revista Química Nova**, v. 40, n. 9. 2017.

- MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por Bacillus subtilis**. 2011. Rio Claro, SP.
- MONTAGNOLLI, R. N. **Incêndios de petróleo e petroquímicos: biorremediação de áreas afetadas**. 2015. Rio Claro, SP.
- MOREIRA, J. C., GONÇALVES, E. S., BERETA, M. Contaminantes emergentes. **Revista Química Industrial**, v. 81, n. 738, p. 4-13, 2013.
- NAPOLEÃO et al. Degradação do contaminante emergente paracetamol empregando processos oxidativos avançados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental Santa Maria**, v. 19, n. 3, set-dez, 2015 p. 725-734.
- NASCIMENTO, E. C. R. Microalgas - **Agentes naturais no processo de floculação e conhecimento de alunos sobre seu uso**. 2019. Natal, RN.
- PAIS, M. **Avaliação da presença de fármacos, por LC-MS/MS, em águas superficiais pré e pós-tratamento convencional por ensaio jar-test e caracterização do risco humano**. 2013, São Paulo, SP.
- PASQUINI, N. C. Monitoramento de fármacos no Ribeirão Quilombo, estado de São Paulo, BR. **Saúde Meio e Ambiente**. v. 5, n. 1, p. 63-77, jan./jun. 2016.
- PEPPER, I. et al. **Pollution science**. London Academic Press, 1996.