

3.07.04 – Engenharias / Saneamento Ambiental.

## **SURFACTANTE IMOBILIZADO NA CELULOSE BACTERIANA COMO BIOSORVENTE ECOLÓGICAMENTE FAVORÁVEL PARA MEDICAMENTO**

Nathália R.C.M. Castanho<sup>1\*</sup>, Nathane De Marco<sup>1</sup>; Gabriela R. dos Santos<sup>1</sup>; Fernanda G. Leite<sup>2</sup>; Victória S. Soeiro<sup>2</sup>; Angela F. Jozala<sup>3</sup>; Denise Grotto<sup>4</sup>

1. Estudante de graduação da Universidade de Sorocaba (UNISO)
2. Estudante de pós-graduação da Universidade de Sorocaba (UNISO)
3. Professora da Pós-Graduação na Universidade de Sorocaba (UNISO)
4. Professora da Pós-Graduação na Universidade de Sorocaba (UNISO) / Orientadora

### **Resumo**

A contaminação por produtos farmacêuticos no ambiente aquático tem despertado a atenção pela toxicidade dos compostos, mesmo em baixas concentrações, por sua persistência no ambiente, e ineficiência do sistema convencional de tratamento de água e esgoto. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um bioproduto ecologicamente favorável, produzido por microrganismos, e aplicar como biosorvente para medicamento em água. A celulose bacteriana foi produzida através do cultivo da *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582, e o biosurfactante (BS) pelo cultivo de *Bacillus subtilis*. Os ensaios de adsorção foram feitos por cinética, a análise do paracetamol foi feita por espectrofotometria e a do 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Performance. Os resultados com paracetamol foram melhores com a celulose liofilizada tirturada, seguido pela celulose com BS. Com relação ao EE2, os melhores resultados foram com celulose sem BS, seguida por celulose liofilizada inteira.

**Palavras-chave:** Biorremediação; Bioprodutos; Fármacos.

**Apoio financeiro:** Pibic; CNPq; FAPESP (2016/22873-4); Uniso.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UNISO.

### **Introdução**

A atividade humana e o desenvolvimento industrial acelerado têm aumentado a contaminação em recursos hídricos por agrotóxicos, metais tóxicos e produtos farmacêuticos, além de derrames ou descartes de óleos, combustíveis, solventes, materiais eletrônicos e eletrodomésticos, corantes (RICHARDSON, 2008; CALIMAN, GAVRILESCU, 2009; PETERS et al., 2013).

O 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) é um hormônio sintético com propriedades estrogênicas, capaz de causar efeitos tóxicos (desregulação endócrina) mesmo em concentrações muito baixas (DZIEWECZYNSKI, BUCKMAN, 2013). A desregulação ou alteração das funções endócrinas pode estar associada a interferências na síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação dos hormônios naturais do organismo, desencadeando, assim, uma nova resposta hormonal. Outro composto farmacêutico que merece atenção é o paracetamol ou acetaminofeno, um potente analgésico e antipirético (BRUNTON, KNOLLMAN, CHABNER, 2012), de venda livre e conseqüentemente de fácil acesso por parte da população. Estudos ecotoxicológicos tem demonstrado que os resíduos de acetaminofeno são detectados no ambiente aquático (KOLPIN, et al., 2002) e são capazes de induzir efeitos tóxicos em organismos como *Vibrio fischeri* e *Daphnia magna*.

A sorção é um fenômeno que consiste na infiltração de uma substância dissolvida em um fluido na parte sólida de um meio poroso. A sorção pode se dar por absorção ou adsorção (PIGNATELLO, 1989). A sorção é um método muito eficaz para a recuperação de compostos tóxicos de soluções aquosas, e muitos biomateriais, como bactérias, leveduras, fungos e algas vêm sendo utilizados com sucesso como biossorventes. A biossorção é uma técnica amigavelmente ecológica (*eco-friendly alternative*) que vem sendo utilizada para a remoção de metais (KIM et al., 2005; ALLURI et al., 2007).

Sabe-se que a adsorção feita por misturas de surfactantes recebeu atenção nos últimos anos, por criar um sistema com interações entre as misturas e produzir efeitos interfaciais marcados por mudança de adsorção, bem como na densidade de carga de superfície (SOMASUNDARAN et al., 1992). Assim, o objetivo é desenvolver um bioproduto produzido por microrganismo, e aplicar a celulose bacteriana com ou sem biosurfactante na biossorção de medicamento em água.

## Metodologia

A metodologia pode ser dividida em três partes: Produção de bioprodutos, ensaios de adsorção em cinética e análises. A produção do biossurfactante foi feita realizando o pré-inóculo de 1ml do microrganismo *Bacillus subtilis* em meio sintético, contendo 50mL do meio de cultivo Tryptone Soy Broth (TSB). Este pré-cultivo submerso foi conduzido em agitador a 150 rpm/ 35°C/ 24 horas e constituiu o inóculo. Ao finalizar o tempo de pré-cultivo, um volume de 5 mL foi inoculado a 45 mL de meio TSB. Os experimentos foram conduzidos durante 96 horas a 35°C, com agitação de 150rpm. O cultivo retirado foi centrifugado para a retirada de precipitado celular. Passou por acidificação até pH2, para a extração e pré-purificação, mantendo apenas o precipitado. Foi realizada a suspensão do precipitado em clorofórmio e metanol, passando pro uma nova centrifugação, obtendo então, o biossurfactante. A amostra foi liofilizada e analisada em FTIR (Espectro de infravermelho com transformadora de Fourier).

As membranas de celulose bacteriana foram produzidas através do cultivo da *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53582, em meio Hestrin & Schramm (20 g/L glicose, 5 g/L peptona bacteriológica, 5 g/L extrato de levedura, 2,7 g/L Fosfato de sódio anidro; 1,5 g/L ácido cítrico monohidratado). O cultivo foi realizado em placas de cultura celular, com 24 poços. O volume inoculado foi de 1 mL por poço, contendo aproximadamente 10<sup>6</sup>UFC (Unidades Formadoras de Colônia). As placas foram mantidas por 4 dias em cultura estática a 30°C. Após o crescimento, as membranas foram lavadas e passaram por um processo de purificação em NaOH, e novamente lavadas para obter pH neutro. As membranas foram autoclavadas e armazenadas a 4°C (JOZALA et al., 2015). A amostra foi analisada em FTIR.

O ensaio de imobilização foi efetuado com a celulose bacteriana sendo imersa em solução de BS, 0,1g da surfactina liofilizada para 10ml de metanol, 1 mL das soluções de BS por celulose. Passando por agitação a 25°C a 100 rpm por 24 horas. A amostra foi analisada em FTIR.

Para avaliação da celulose bacteriana como biosorventes, amostras de 0,5 g da membrana de celulose bacteriana inteira sem água superficial com e sem BS, e celulose bacteriana liofilizada inteira e triturada, foram adicionadas em 60 mL de soluções de paracetamol de 2 g/L e EE2 de 2 mg/L. Os sistemas foram mantidos em agitação, e amostras foram retiradas entre os tempos de 10, 20, 30, 45, 60, 120, 240,360, 720 e 1440 minutos, dependendo da quantidade disponível de biomaterial.

As amostras foram filtradas e analisadas. A análise do paracetamol foi feita por espectrofotometria, segundo metodologia adaptada de Shihana et al., 2010. Enquanto a análise do EE2 foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Em ambos os casos, foi necessário a padronização para dosagem dos medicamentos por meio de uma curva de calibração.

## Resultados e Discussão

A produção do biossurfactante em escala laboratorial, com pré-cultivo e cultivo em erlenmeyers, é um procedimento dificultoso, e corrobora Vedaraman e Venkatesh (2011) Foram realizadas três centrifugações, a primeira apenas para retirada de células, a segunda centrifugação pode ser igualada também a Das, et al. (2008), que também fez extração ácida, assim retirando o biossurfactante pré-purificado. Por fim, a partir da centrifugação de extração líquido-líquido, foi mantido o pallet em ambiente até evaporação de qualquer solvente e posteriormente liofilizado. A análise em FTIR mostra que o biossurfactante produzido tem picos em 3340 - 3365 cm<sup>-1</sup>, que são referentes a possíveis deformações axiais de O-H (SÁNCHEZ, 2007). Outras bandas encontradas tanto no BS produzido, quanto no padrão de surfactina são as bandas 2973 cm<sup>-1</sup> e 1045 cm<sup>-1</sup> referentes a alongamentos de metil C-H, banda 2883 cm<sup>-1</sup> referente a CH<sub>2</sub> e banda 1092 cm<sup>-1</sup> referente à O-C da molécula (SCHARTNER et al., 2013).

A celulose obtida para esse trabalho foi a partir da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 53582), assim como no trabalho realizado por Jozala (2015). A celulose bacteriana pode ser considerada um polímero muito eficiente por ser inerte, ter elevada cristalinidade, ser hidrofílico, permeável e ter grande resistência mecânica, assim como cita Pinto (2013). A análise em FTIR comparada com Pinto, descreve picos característicos da celulose bacteriana, na banda 3300 cm<sup>-1</sup> referente a OH, banda 1600 cm<sup>-1</sup> deformação CH<sub>2</sub> e banda 1000 cm<sup>-1</sup> C-O/C-C. Após a incorporação do BS, os testes de cinética comumente feitos em biosorção de metais, foram realizados (KIM et al., 2005; ALLURI et al., 2007) mas no caso do nosso estudo para o analgésico acetaminofeno (paracetamol) e com o hormônio 17α-etinilestradiol.

Podemos verificar a proporção de adsorção pelo bioproduto com relação aos medicamentos com a interação de misturas e produção de efeitos interfaciais, como por exemplo na densidade de carga superficial e porosidade (SOMASUNDARAN et al., 1992). Singh et al. (2007) mencionaram que tanto surfactantes químicos quanto biológicos podem acelerar ou inibir a biorremediação de poluentes, não podendo prever os acontecimentos, buscando sempre evidências empíricas. Guo et al. (2019) mostraram que a concentração de biossurfactante ramnolípideos pode afetar a mobilização de sorção e dessociação do contaminante. Podemos assim, comparar com a rápida dessorção das análises de celulose bacteriana contendo biossurfactante, a onde o ponto de maior adsorção com paracetamol foi em 60 minutos, com 19,1% de adsorção. Enquanto para o EE2, o maior

ponto de adsorção foi em 20 minutos, com 42%.

Para Żółtowska-Aksamitowska et al. (2018) quanto maior a quantidade do solvente (paracetamol), maior seria a capacidade de sorção pela quitina/lignina. Com celulose bacteriana os resultados foram diferentes, adsorvendo uma quantidade mínima por pequenos períodos. Honorio et al. (2018) que trabalharam com adsorção de 17 $\beta$ -estradiol em casca de arroz, notaram que o melhor tempo para adsorção seria em 120 minutos. Com 17 $\alpha$ -etinilestradiol, o tempo de melhor adsorção com celulose bacteriana foi em 20 minutos.

Silva et al. (2018) relacionaram a celulose modificada com anidrido ftálico (matriz de adsorção) por favorecer ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas com corantes, podendo comparar então as interações feitas da celulose bacteriana com o EE2. Com a celulose triturada e inteira liofilizada, notamos o favorecimento de adsorção, por sua modificação relacionada a superfície de contato. Mostrando adsorção de 31,8% de paracetamol em 30 minutos, e para EE2 88% de adsorção em 20 minutos.

## Conclusões

A produção de biossurfactante, apesar de dificultosa, foi bastante satisfatória e eficiente, assim como, a incorporação do biossurfactante liofilizado na celulose bacteriana. Mesmo lavando a membrana após a incorporação, ainda foi possível manter as bandas que indicam a presença do BS.

O teste de adsorção da água contaminada com paracetamol mostrou pouca adsorção do medicamento quando utilizada a celulose bacteriana sem água superficial (7,4% de adsorção em 45 min), pouca adsorção quando utilizada a celulose bacteriana sem água superficial + BS (19,1% em 60 min) e média adsorção quando a celulose bacteriana triturada liofilizada foi utilizada (31,8% de adsorção em 30 min).

Já a adsorção para EE2 foi média quando celulose bacteriana sem água superficial + BS foi utilizada (42% de adsorção em 20 min), média-alta em celulose bacteriana sem água superficial (52,5% em 20 min), alta na celulose bacteriana sem água superficial (74% de 10 a 60 min) e alta na celulose bacteriana liofilizada (84% em 20 min), sendo esta última com a melhor taxa de adsorção do contaminante.

Assim, a celulose bactéria tem melhor adsorção para EE2 do que para paracetamol e sua forma liofilizada tem melhor adsorção por modificação das suas características físicas. O biossurfactante piora a adsorção para o hormônio, mas melhora para o analgésico. Com isso, é possível produzir um biossorvente ecologicamente favorável, auxiliando na retirada de alguns medicamentos em águas contaminadas.

## Referências bibliográficas

- ALLURI, Iluri, H.K., et al. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. **African Journal of Biotechnology**. v.6, n.25, p. 2924-2931, 2007.
- BRUNTON, L.L., KNALLMAN, B.C., CHABNER, B.A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica – Goodman & Gilman. 12ª Edição, **Editores ARTMED**, 2012.
- CALIMAN, F.A., GAVRILESCU, M. Pharmaceuticals, Personal Care Products and Endocrine Disrupting Agents in the Environment – **A Review. Clean – Soil, Air, Water**. v.37, n. 4-5, p. 277–303, 2009.
- DAS, P., MUKHERJEE, S., SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, n.6, p. 1675-1684, 2008.
- DZIEWECZYNSKI, T.L., BUCKMAN, C.M. Acute exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol disrupts audience effects on male-male interactions in Siamese fighting fish, *Betta splendens*. **Horm. Behav.** v. 63, p. 497-502, 2013.
- GUO, Y. P. et al. Sorption and desorption of 17-ethinylestradiol onto sediments affected by rhamnolipidic biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 707-715, 2019.
- HONORIO, J. F. et al. Adsorption of natural hormones estrone, 17 $\beta$ -estradiol and estriol by rice husk: monocomponent and multicomponent kinetics and equilibrium. **Environmental Technology**, v. 10, p. 1-18, 2018.
- JOZALA, A. F, et al. Bacterial Cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* employing waste as culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 99, n. 3, p. 1181-1189, 2015.
- KIM, T-Y. et al. Adsorption of Heavy Metals by Brewery Biomass. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 91-98, 2005.
- KOLPIN, D.W., et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams,

1999-2000: a national reconnaissance. **Environ Sci Technol.** v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

N. Vedaraman; N.Venkatesh. Production of surfactin by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering.** v. 28, n. 2, p. 175-180, 2011.

PETERS, K., BUNDSCHUH, M., SCHÄFER, R.B. Review on the effects of toxicants on freshwater ecosystem functions. **Environmental Pollution**, v. 180, p. 324–329, 2013.

PIGNATELLO, J.J. Sorption dynamics of organic compounds in soils and sediments; **SSSA Special Publication** nº 22, New Haven, Connecticut, 45-80, 1989.

PINTO, A. M. C. **Modificação in situ e ex situ da celulose bacteriana: efeito da composição do meio de cultura no seu rendimento e propriedades.** Dissertação de Mestrado - UMinho, 2013.

RICHARDSON, S.D. Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. **Anal. Chem.**, v. 80, n. 12, p. 4373–4402, 2008.

SÁNCHEZ-SOTO, M., et al. Curing FTIR study and mechanical characterization of glass bead filled trifunctional epoxycomposites. **Composites Science and Technology**, v. 67, p. 1974-1985, 2007.

SCHARTNER, J., et al. Universal method for protein immobilization on chemically functionalized germanium investigated by ATR-FTIR difference spectroscopy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 10, p. 4079-4087, 2013.

SILVA, L. S., et al. Potential of Cellulose Functionalized with Carboxylic Acid as Biosorbent for the Removal of Cationic Dyes in Aqueous Solution. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. E743, 2018.

SINGH, A. P. et al. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology advances**, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SHIHANA, F., et al. A modified low-cost colorimetric method for paracetamol (acetaminophen) measurement in plasma. **Clinical Toxicology**, v. 48, p. 42–46, 2010.

SOMASUNDARAN, P.; FU, E.; XU, Q. Coadsorption of anionic and nonionic surfactant mixtures at the alumina-water interface. **Langmuir** v. 8, p. 1065-78, 1992.

Żółtowska-Aksamitowska, S. et. Al. Removal of hazardous non-steroidal anti-inflammatory drugs from aqueous solutions by biosorbent based on chitin and lignin. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1223-1233, 2018.