

## **AValiação DA BIODEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS (ETINILESTRADIOL, DICLOFENACO DE SÓDIO E TRICLOSAN) UTILIZANDO ENZIMAS DE FUNGOS DE PODRIDÃO BRANCA (*Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus*)**

Paulo M. Bosco Mofatto<sup>1</sup>, Alexandre N. Ponezi<sup>2</sup>

1. Mestrando da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas (FEC-UNICAMP)
2. Professor da FEC-UNICAMP - Departamento de Saneamento e Ambiente/Orientador

### **Resumo**

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a biodegradação de fármacos (Ethinilestradiol, Diclofenaco de sódio e Triclosan) utilizando enzimas dos fungos *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus* (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase), numa possível última etapa do processo de tratamento de águas de abastecimento e/ou águas residuárias. Os resultados mostraram que dentre as duas espécies de fungos, a que apresentou melhor produção enzimática frente ao conjunto dos fármacos foi o *Pleurotus ostreatus* (Lacase 1,061 U. mL<sup>-1</sup> e Lignina peroxidase 6,929 U. mL<sup>-1</sup>), frente as concentrações EE<sub>2</sub> (0,20 µg/mL), Diclofenaco (0,025 mg/mL) e Triclosan (12,5 ηg/mL). Posteriormente, foi avaliada a degradação dos fármacos por cromatografia (CLAE). Foi observada uma degradação de 87% após um período de 4 horas no sistema em operação. Desta maneira podemos concluir a viabilidade da aplicação desta tecnologia no tratamento de água e/ou residuária.

**Autorização legal:** A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos. Cadastro nº ADB3A3E

**Palavras-chave:** micropoluentes ambientais; enzimas fúngicas; tratamento de águas.

**Apoio financeiro:** CPQBA/UNICAMP - Divisão de Microbiologia

### **Introdução**

Os micropoluentes ambientais, dos quais se encontram os fármacos, produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, dentre outros são um tema muito estudado hoje em dia por serem passíveis de produzir diversos efeitos adversos aos seres vivos com os quais entram em contato após serem lançados nos corpos d'água (BILA & DEZOTTI, 2007; BERGMAN et al., 2012). Deste grupo, podemos citar os antibióticos, responsáveis pela ocorrência de bactérias resistentes (LINDSEY et al., 2001), os anti-inflamatórios que estimulam ou inibem importantes respostas fisiológicas dos seres vivos (BELISÁRIO et al., 2015) e alguns hormônios como o 17 α – etinilestradiol (EE<sub>2</sub>) responsável por provocar alterações endócrinas nos organismos aquáticos e humanos como determinação do sexo, atraso da maturidade sexual, dentre outros (LIMA & BERGAMASCO, 2017; BERGMAN et al., 2012). Uma das alternativas mais promissoras para o tratamento destes micropoluentes, é o uso de microrganismos que produzem um grupo de enzimas não específicas como a lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, as quais são grandes transformadoras de uma imensa quantidade de poluentes como produtos farmacêuticos, pesticidas e outros produtos químicos, apresentando uma eficiência acima de 55% na remoção ou transformação dos compostos estudados como por exemplo o etinilestradiol (DAVILA-VAZQUEZ et al., 2005; TABOADA-PUIG et al., 2011). Dentre os seres vivos que produzem estas enzimas, podemos citar os fungos de podridão branca como as espécies *Lentinus edodes* (D'ANNIBALE et al., 2000) e *Pleurotus ostreatus* (HOLTZ et al., 2009). Este trabalho está de acordo com o proposto pela UNESCO/WHO (2012) sobre a garantia da qualidade da água e tem como objetivo uma possível estratégia na biodegradação de produtos farmacêuticos (Ethinilestradiol, Diclofenaco de sódio e Triclosan) utilizando células e enzimas fúngicas dos fungos *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus* (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase) antes da etapa de cloração no tratamento de água de abastecimento. O estudo aqui apresentado faz parte de uma comunicação de invenção INOVA/UNICAMP.

### **Metodologia**

#### **Teste de Adaptabilidade**

Os experimentos foram conduzidos por meio de ensaios de adaptabilidade das cepas fúngicas (*Lentinus edodes*, *Pleurotus sp.*), às concentrações dos fármacos em estudo. Inicialmente os fungos foram cultivados em meio de cultura líquido PDB (*Potato Dextrose Broth*) sendo: triplicata, crescimento estático em estufa bacteriológica FANEM 502 a 28°C, e agitado em incubadora shaker *ethik* 430 a 120 rpm a 28°C, com diferentes concentrações de cada fármaco e dois grupos controle (sem adição dos fármacos) durante um período de 10 dias. O objetivo do ensaio foi observar possíveis interferências dos fármacos no crescimento e desenvolvimento das cepas. As concentrações utilizadas: EE<sub>2</sub>: 0,2 µg/mL; Diclofenaco: 0,05 e 0,025 mg/mL; e Triclosan: 1600 a 12,5 ng/ml.

### Determinação da Biomassa

Após os ensaios de adaptabilidade, foi avaliado o desenvolvimento dos fungos por determinação da biomassa onde o micélio foram submetidos a filtração a vácuo em papel de filtro, seguido de lavagem com água destilada e secagem em estufa FANEM 315 SE a 80°C, até obtenção de peso constante. O valor da biomassa foi definido pela diferença entre peso do papel de filtro seco, peso da biomassa seca, subtraído pelo peso dos discos de fungos. O ensaio foi realizado em triplicata e em meio de cultura líquido (PDB) após o período de ensaio 10 dias.

### Determinação da Atividade Enzimática

As enzimas Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase foram determinadas conforme metodologias descritas por Szklarz et al., (1989-modificado), Kuwahara et al. (1984) e Tien e Kirk (1984) respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata nos quatro primeiros dias e no décimo após a inoculação dos microrganismos em amostras contendo as substâncias em estudo. Para determinação do cálculo enzimático foi utilizada a Equação descrita por Leonowicz & Grzywnowicz (1981) apud Menezes, Silva e Durrant (2009).

### Delineamento Experimental

Os ensaios foram conduzidos em triplicata, em meio estático e agitação, utilizando as concentrações dos fármacos onde foram percebidas as maiores produções enzimáticas nos ensaios anteriores, totalizando 16 ensaios. Paralelamente, foram preparados dois meios controle, sendo um com ausência dos fármacos em meio de cultura PDB, e outro com água destilada esterilizada. Amostras foram coletadas a cada 24h, nos quatro primeiros dias, 7º e 10º dia para análise de atividade enzimática, e avaliação de degradação por cromatografia. No final do período, foi determinada a biomassa para avaliar o crescimento dos microrganismos.

### Análise Cromatográfica

As análises foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) composto por: LC-DAD Alliance Waters, bomba Waters 2695, detector de arranjo de diodos (Waters 2996) e coluna C-18 (150 mm x 3,9 mm x 5 µm), e detector UV, com o objetivo de avaliar a degradação dos fármacos. As metodologias utilizadas foram: Cordeiro (2009) para EE<sub>2</sub>, Santos et al. (1992) diclofenaco e Liu & Wu (2012) para triclosan.

## Resultados e Discussão

### Teste de Adaptabilidade

Os ensaios mostraram que os fungos foram capazes de produzir a enzima lacase de maneira satisfatória para as concentrações dos fármacos utilizadas. Os resultados de produção de enzimas pelos fungos mostraram que as melhores concentrações dos fármacos em estudo foram: Etnilestradiol: 0,20 µg mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O; Diclofenaco: 0,025 mg mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O; e Triclosan: 12,5 ng mL<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O. Nesta parte do experimento, foi quantificado que em relação à enzima lacase (Lac), o microrganismo que mais a produziu tanto em condição estática quanto em agitação foi a espécie *P. ostreatus*.

### Determinação da Biomassa

No presente ensaio foi verificado que todas as espécies fúngicas apresentaram diferentes crescimentos de acordo com os tratamentos. Os tratamentos em que foi observado um maior crescimento foram, em ordem decrescente: Controle (PDB), EE<sub>2</sub>, Controle (água), Diclofenaco, Junção dos fármacos e Triclosan. Este ensaio demonstrou que mesmo em contato com os produtos em estudo, as espécies foram capazes de se desenvolver.

### Delineamento Experimental

Os resultados indicam que o fungo *P. ostreatus* apresenta uma melhor habilidade na produção enzimática frente às concentrações de fármacos utilizadas, sobretudo frente aos tratamentos EE<sub>2</sub>, triclosan, junção e controles (H<sub>2</sub>O e PDB), principalmente em condição de agitação. A maior atividade mensurada foi de 1,061 (U.mL<sup>-1</sup>) no tratamento EE<sub>2</sub>. No entanto, o organismo que menos apresentou atividade enzimática na maior parte dos tratamentos foi a espécie *L. edodes*. Tais resultados podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Produção enzimática de lacase dos fungos *P. ostreatus* e *L. edodes* sob diferentes concentrações de fármacos e condições de ensaio.

Fármaco	Organismo	Condição	Atividade (U.mL <sup>-1</sup> )
EE2 0,20 µg/mL	<i>P. ostreatus</i>	Estático	1,061
		Agitação	1,056
	<i>L. edodes</i>	Estático	0,043
		Agitação	0,051

	Junção dos microrganismos	Estático Agitação	0,011 0,074
Diclofenaco 0,025mg/mL	<i>P. ostreatus</i>	Estático Agitação	0,451 0,348
	<i>L. edodes</i>	Estático Agitação	0,374 0,200
	Junção dos microrganismos	Estático Agitação	0,037 0,083
Triclosan 12,5 ng/mL	<i>P. ostreatus</i>	Estático Agitação	0,043 0,080
	<i>L. edodes</i>	Estático Agitação	0,021 0,032
	Junção dos microrganismos	Estático Agitação	0,039 0,059
Junção dos fármacos	<i>P. ostreatus</i>	Estático Agitação	0,011 0,024
	<i>L. edodes</i>	Estático Agitação	0,013 0,024
	Junção dos microrganismos	Estático Agitação	0,012 0,020
Controle (H <sub>2</sub> O)	<i>P. ostreatus</i>	Estático Agitação	0,018 0,060
	<i>L. edodes</i>	Estático Agitação	0,014 0,034
	Junção dos microrganismos	Estático Agitação	0,047 0,055
Controle (PDB)	<i>P. ostreatus</i>	Estático Agitação	0,057 0,060
	<i>L. edodes</i>	Estático Agitação	0,017 0,013
	Junção dos microrganismos	Estático Agitação	0,046 0,045

Quanto à produção da enzima manganês peroxidase (MnP) em condição estática a espécie *P. ostreatus* se sobressaiu em relação às outras, enquanto em agitação a maior produção foi quantificada nas amostras contendo as três espécies juntas. Não foi percebida uma produção desta enzima pela espécie *L. edodes*. Em relação à enzima lignina peroxidase (LiP), a espécie *P. ostreatus* demonstrou uma maior produção desta enzima em todos os tratamentos em ambas as condições.

#### Avaliação da Degradação dos Fármacos em Estudo

As análises cromatográficas (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE) realizadas quantificaram diferentes tempos de degradação para os diferentes fármacos utilizados neste estudo, onde foram percebidos, em amostras contendo os três fármacos em questão junto ao microrganismo selecionado para a produção enzimática. Os resultados foram: Etinilestradiol: degradação de 100% após duas horas de ensaio; Diclofenaco: degradação de 77% após dois dias de ensaio; e Triclosan: degradação de 100% após duas horas de ensaio. Também foi observado que a degradação dos fármacos ocorre em > 98% (<24h) quando estes são adicionados ao fungo já ativo.

Tais resultados se mostram mais eficientes que outros estudos realizados com fármacos utilizando outras formas de tratamento de águas, das quais podem ser citados Lima et al. (2014) que obtiveram uma eficiência de remoção de 40%, 39% e 35% para os hormônios estrona (E<sub>1</sub>), 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) e EE<sub>2</sub> respectivamente utilizando Policloreto de Alumínio (PAC). Ternes et al. (1999) obtiveram uma eficiência de remoção de EE<sub>2</sub> de

64% e 78% utilizando filtro biológico e lodos ativados respectivamente.

O presente trabalho, no entanto, apresentou uma eficiência similar ao estudo de Tambosi (2008), onde foi verificada uma eficiência de remoção maior de 90% para fármacos como cetoprofeno, naproxeno e sulfametoxazol, com a diferença que este autor utilizou carvão ativado granular para este estudo.

Com relação à transformação de compostos farmacêuticos utilizando as mesmas enzimas estudadas neste trabalho, alguns trabalhos como Davila-Vazquez et al. (2005) e Taboada-Puig et al. (2011) obtiveram uma eficiência acima de 55% na remoção ou transformação dos compostos estudados como etinilestradiol.

### Conclusões

A partir dos resultados já obtidos, pôde ser observado que a espécie onde foi constatada uma maior produção enzimática foi *Pleurotus ostreatus*, cujo pico de produção se deu em média no segundo dia após a inoculação deste microrganismo nas amostras contendo as substâncias em estudo, produzindo até 1,061 U. mL<sup>-1</sup> de lacase. Tal microrganismo mostrou-se apto para degradar ou transformar mais de 77% das moléculas em estudo num período de apenas três dias após o contato com estes fármacos. Quando em contato com um meio suporte que auxilia o microrganismo a produzir enzimas anteriormente ao momento em que este entra em contato com as substâncias em estudo, porém, o microrganismo demonstrou uma eficiência de 100% de remoção após um dia de contato com os fármacos etinilestradiol e triclosan.

Seria interessante, futuramente, realizar um experimento onde sejam utilizadas enzimas imobilizadas aplicadas ao pré-tratamento de água e compará-lo com a eficiência deste projeto, visto que enzimas nesta condição apresentam vantagens como estabilidade operacional e possibilidade de reutilização ao fim de um determinado processo.

### Referências bibliográficas:

- BELISÁRIO, M., BORGES, P. S., GALAZZI, R. M., DEL PIERO, P. B., ZORZAL, P. B., RIBEIRO, A. V. F. N., & RIBEIRO, J. N. **O emprego de resíduos naturais no tratamento de efluentes contaminados com fármacos poluentes**, InterSciencePlace, 2015
- BERGMAN, Å., HEINDEL, J. J., JOBLING, S., KIDD, K., ZOELLER, T. R., & World Health Organization. **State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012**. World Health Organization. 2012
- BILA, D. M., & DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**. Química nova, 30(3), 651, 2007.
- CORDEIRO, D. (2009). Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP. 2009. 90 f. Tese (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- D'ANNIBALE, A., STAZI, S. R., VINCIGUERRA, V., & SERMANNI, G. G. **Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater**. Journal of biotechnology, 77(2-3), 265-273, 2000.
- DAVILA-VAZQUEZ, G., TINOCO R., PICKARDMA, V., VAZQUEZ-DUHALT R. **Transformation of halogenated pesticides by versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta***. Enzyme Microb Technol, 2005.
- HOLTZ, M., BORGES, G. M., FURLAN, S. A., & WISBECK, E. **Cultivo De *Pleurotus ostreatus* Utilizando Resíduos De Algodão Da Indústria Têxtil**. Revista de Ciências Ambientais, 3(1), 37-51, 2009.
- LIMA, D. R. S., AFONSO, R. J. D. C. F., LIBÂNIO, M., & AQUINO, S. F. D. **Avaliação da remoção de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada**, Química Nova, v.37, n.5, p.783-
- LIMA, P. R., & BERGAMASCO, R. **Efeitos da contaminação da água pelo fármaco 17 $\alpha$ -etinilestradiol, detecção e tipos de tratamento**. Evidência-Ciência e Biotecnologia, 17(2), 119-134, 2017.
- LIU, T.; WU, D. High-performance liquid chromatographic determination of triclosan and triclocarban in cosmetic products. **International journal of cosmetic science**, v. 34, n. 5, p. 489-494, 2012.
- LINDSEY, et al. Endocrine disruption: Why is it so complicated? Water Qual. Res. J. Can., v.36, p. 175-190, 2001.
- TABOADA-PUIG, R., JUNGHANNS, C., DEMARCHE, P., MOREIRA, M. T., FEIJOO, G., LEMA, J. M., et al. **Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors**. Bioresour Technol;102:6593–9, 2011.
- SANTOS, S. R. C. J., DONZELLA, H., BERTOLINE, M. A., PEREIRA, M. D., OMOSAKO, C. E., PORTA, V. Simplified micromethod for the HPLC measurement of diclofenac in plasma. Braz. J. Med. Res., Ribeirão Preto, v 25. P. 125-128, 1992.
- TABOADA-PUIG, R., JUNGHANNS, C., DEMARCHE, P., MOREIRA, M. T., FEIJOO, G., LEMA, J. M., et al. **Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors**. Bioresour Technol;102:6593–9, 2011
- TAMBOSI, J. L. **Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento**. Thesis of PhD degree. Department of Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- TERNES, T. A., STUMPF, M., MUELLER, J., HABERER, K., WILKEN, R. D., & SERVOS, M. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I**. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, 1999.