



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Ivan José Santana Santos**

**Estudo do potencial de biodegradação de 17 $\alpha$ -etinilestradiol,  
carbamazepina e ibuprofeno por fungos ligninolíticos e bactérias**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA  
À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE MESTRE EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

Coorientador: Dr. Alexandre Nunes Ponezi

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Ivan José Santana Santos, aprovada pela comissão julgadora em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_ e orientada pela Profa. Dra. Lucia Regina Durrant.

---

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR CLAUDIA AP. ROMANO  
DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Santos, Ivan José Santana, 1986-  
Sa59e Estudo do potencial de biodegradação de 17 $\alpha$ -  
etinilestradiol, carbamazepina e ibuprofeno por fungos  
ligninolíticos e bactérias / Ivan José Santana Santos. --  
Campinas, SP: [s.n], 2012.

Orientador: Lucia Regina Durrant.  
Coorientador: Alexandre Nunes Ponezi.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fármacos. 2. Fungos ligninolíticos. 3. Bactérias.  
4. Biodegradação. 5. Tratamento de efluentes. I.  
Durrant, Lucia Regina. II. Ponezi, Alexandre Nunes. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Assessment of the ligninolytic fungi and bacteria  
potential to degrade 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, carbamazepine and ibuprofen

Palavras-chave em inglês:

Pharmaceuticals drugs

Ligninolytic fungi

Bacteria

Biodegradation

Wastewater treatment

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Alexandre Nunes Ponezi [Coorientador]

Ísis Serrano Silva

Rose Marry Araújo Gondim Tomaz

Data da defesa: 06/06/2012

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Alexandre Nunes Ponezi  
(Presidente)

---

Dra. Ísis Serrano Silva  
(Membro)

---

Dra. Rose Marry Araújo Gondim Tomaz  
(Membro)

---

Dra. Andréia Fonseca de Faria  
(Suplente)

---

Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero  
(Suplente)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, que me deu a vida e me acompanha durante toda essa caminhada.

Aos meus pais, José Maria e Lucília, exemplos de vida, pelo apoio incondicional e pelas orações, que sei que foram muitas; e aos meus irmãos, Rodrigo e Caio. Amo muito vocês!

À Profa. Lucia, pela confiança em mim depositada e por possibilitar a realização deste trabalho. Obrigado por tudo!

Ao Alexandre, coorientador e amigo, pelas diversas ideias que contribuíram enormemente na elaboração deste trabalho, e também pelas conversas “jogadas fora” nas horas do café.

A todos os moradores e ex-moradores da Biocasa (Deborah, Julia, Karine, Diego, Camila, Enzo), minha grande família em Campinas.

A todos os grandes amigos do Colunicamp e ex-alunos da UFV-MG, que fizeram de Campinas um “pedacim” da nossa tão saudosa Viçosa.

Ao Adilson, pelo imenso auxílio na realização das análises cromatográficas, sem as quais esse trabalho não sairia do papel; e a todos os colegas da Divisão de Microbiologia do CPQBA, que de alguma forma contribuíram na construção deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e por terem contribuído significativamente na construção dessa obra.

A toda minha família, avós, tios e primos, que mesmo de longe me apoiou durante toda essa etapa.

Aos grandes colegas de laboratório, Emerson, Fernanda, Lígia, Matthew e Elisangela, presentes no dia-a-dia, dividindo as frustrações e conquistas alcançadas na pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Saneamento (FEAGRI/UNICAMP), Giovani e Noely, pelos conhecimentos compartilhados e por se disponibilizarem em me auxiliar nos experimentos de ecotoxicidade.

Aos professores da UFV-MG, principalmente aqueles do Departamento de Microbiologia, pela excelente formação proporcionada, a qual me permitiu chegar até aqui.

Aos professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela contribuição na minha formação acadêmica; e a todos os funcionários dessa Faculdade, que atuam nos bastidores, mas sem os quais esse trabalho também não seria possível.

Ao Prof. Anthony Hay (Universidade de Cornell, EUA), por ter proporcionado a oportunidade única de estagiar em seu laboratório, o qual contribuiu imensamente em minha formação acadêmica e em meu crescimento pessoal.

Aos meus *roomates* Paul e Armanda e à Ash, pela imensa receptividade e por tornarem possível minha “american experience”.

Às agências de fomento Fapesp e Capes, pelo auxílio financeiro, propiciando a realização deste trabalho.

E a todos os quais eu não citei o nome, mas que foram muito importantes para a conclusão dessa etapa, meus sinceros agradecimentos.

A todos, o meu muito obrigado!

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1	FÁRMACOS .....	3
2.1.1	<i>17<math>\alpha</math>-etinilestradiol</i> .....	4
2.1.2	<i>Carbamazepina</i> .....	5
2.1.3	<i>Ibuprofeno</i> .....	5
2.2	ROTAS DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL.....	6
2.3	DISPOSIÇÃO AMBIENTAL .....	8
2.4	EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS E HUMANOS .....	9
2.5	TESTES DE ECOTOXICIDADE.....	11
2.6	MÉTODOS DE REMOÇÃO E DEGRADAÇÃO DE FÁRMACOS .....	14
2.6.1	<i>Adsorção em matriz sólida</i> .....	14
2.6.2	<i>Degradação abiótica</i> .....	14
2.6.3	<i>Biodegradação</i> .....	15
2.7	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS .....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	FÁRMACOS .....	24
4.2	FUNGOS LIGNINOLÍTICOS .....	25
4.2.1	<i>Linhagens e manutenção dos micro-organismos</i> .....	25
4.2.2	<i>Preparo do inóculo</i> .....	25
4.2.3	<i>Seleção dos fungos ligninolíticos com potencial de degradação dos fármacos</i> .....	26
4.2.4	<i>Avaliação do crescimento fúngico</i> .....	29
4.2.5	<i>Ensaio de biodegradação dos fármacos</i> .....	29
4.2.6	<i>Atividades enzimáticas</i> .....	30
4.2.7	<i>Degradação dos fármacos utilizando o caldo enzimático</i> .....	33
4.2.8	<i>Ensaio de inibição do Citocromo P450</i> .....	33

4.3	BACTÉRIAS .....	35
4.3.1	<i>Micro-organismos e manutenção das linhagens</i> .....	35
4.3.2	<i>Preparo do inóculo</i> .....	35
4.3.3	<i>Seleção das bactérias com potencial de degradação dos fármacos</i> .....	36
4.3.4	<i>Ensaio de biodegradação dos fármacos</i> .....	37
4.4	ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>VIBRIO FISCHERI</i> .....	38
4.5	CORREÇÃO DE PERDA DE ÁGUA POR EVAPORAÇÃO .....	39
4.6	ANÁLISES CROMATOGRAFICAS .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
5.1	BIODEGRADAÇÃO DE 17A-ETINILESTRADIOL .....	41
5.2	BIODEGRADAÇÃO DE CARBAMAZEPINA .....	49
5.3	BIODEGRADAÇÃO DE IBUPROFENO .....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de alguns fármacos e DE's detectados em amostras ambientais.....	9
Tabela 2: Características dos fármacos (TOXNET, 2010). .....	24
Tabela 3: Composição do meio mineral (CLEMENTE, 2002).....	27
Tabela 4: Composição da solução de vitaminas (WOLIN <i>et al.</i> , 1963).....	27
Tabela 5: Composição da solução de microelementos (CLEMENTE, 2002 – modificado). .....	28
Tabela 6: Concentração dos fármacos nos meios de cultivo.....	28
Tabela 7: Composição do Meio Mineral (PELLIZARI, 1995). .....	36
Tabela 8: Concentração dos fármacos no meio de cultivo de adaptação.....	36
Tabela 9: Limites de detecção e quantificação dos fármacos em estudo. ....	40
Tabela 10: Crescimento micelial das linhagens fúngicas na presença de EE2. ....	41
Tabela 11: Porcentagem de degradação (%) de EE2 por P1.....	43
Tabela 12: Atividade das enzimas MnP e lacase produzidas por P1. ....	44
Tabela 13: Valores de CE <sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de EE2 por P1. ....	47
Tabela 14: Porcentagem de degradação (%) de CBZ por P1. ....	49
Tabela 15: Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI.....	50
Tabela 16: Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BS.....	50
Tabela 17: Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI.....	51
Tabela 18: Atividade das enzimas lacase e LiP produzidas por BNI.....	52
Tabela 19: Valores de CE <sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de CBZ por BNI. ....	55
Tabela 20: Crescimento micelial das linhagens fúngicas na presença de EE2. ....	56
Tabela 21: Porcentagem de degradação (%) de IBU por BNI.....	57
Tabela 22: Atividade da enzima lacase produzida por BNI. ....	57
Tabela 23: Valores de CE <sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de IBU por BNI. ....	59
Tabela 24: Porcentagem de degradação (%) de IBU por <i>S. arlettae</i> .....	60
Tabela 25: Porcentagem de degradação (%) de IBU por <i>B. megaterium</i> . ....	60
Tabela 26: Porcentagem de degradação de IBU por <i>B. megaterium</i> . ....	61
Tabela 27: Valores de CE <sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de IBU por <i>B. megaterium</i> .....	62



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis rotas de fármacos no ambiente (Adaptado de BILA & DEZOTTI, 2003). .....	7
Figura 2: Fungo ligninolítico crescido em meio PDA e fragmentos utilizados como inóculo. ....	26
Figura 3: Meio de cultivo inoculado com fungo e incubado em agitador orbital. ....	29
Figura 4: Fotômetro - Microtox <sup>®</sup> . ....	39
Figura 5: Porcentagem de degradação (%) de EE2 por P1.....	43
Figura 6: Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI.....	51
Figura 7: Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI na presença de PB.....	54
Figura 8: Estrutura química da acridina (metabólito da degradação de CBZ). ....	55

## LISTA DE ABREVIações

AINE – Anti-inflamatório não esteroidal

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBZ – Carbamazepina

CE – Contaminante emergente

CE<sub>50</sub> – Concentração Efetiva Média

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CG – Cromatografia gasosa

CL<sub>50</sub> – Concentração Letal Média

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CP450 – Citocromo P450

DE – Desregulador endócrino

EE2 – 17 $\alpha$ -etinilestradiol

ETA – Estação de tratamento de água

ETE – Estação de tratamento de esgoto

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBU – Ibuprofeno

ISO - *International Organization for Standardization* (Organização Internacional para Padronização)

LiP – Lignina peroxidase

MDEP - *Massachusetts Department of Environmental Protection* (Departamento de Proteção Ambiental de Massachusetts)

MnP – Manganês peroxidase

OECD - *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

POA – Processo oxidativo avançado

USEPA - United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

## RESUMO

17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), carbamazepina (CBZ) e ibuprofeno (IBU) são substâncias farmacêuticas muito utilizadas em todo o mundo e vêm sendo frequentemente detectadas em estações de tratamento de efluentes e em águas naturais em vários países, inclusive no Brasil. A grande preocupação da presença destes fármacos em quantidades residuais na água potável e nos ambientes aquáticos são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana e animal. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos ligninolíticos e bactérias para degradar esses três compostos, individualmente. Linhagens de bactérias e fungos ligninolíticos foram crescidas em meio mineral com os fármacos, na presença ou ausência de glicose. Primeiramente, foi realizada uma seleção com o objetivo de escolher linhagens bacterianas e fúngicas com maior capacidade de degradação dessas drogas, avaliando a necessidade da presença de glicose para que a degradação ocorresse. As linhagens que apresentaram maior capacidade de degradar tais compostos foram selecionadas e, em seguida, foram realizados ensaios com o intuito de se otimizar o período de incubação, visando-se uma maior porcentagem de degradação no menor período de incubação possível. Posteriormente, foram realizadas análises de atividade das enzimas lacase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) produzidas pelos fungos selecionados e foi avaliada a participação dessas na degradação dos fármacos. A atuação das enzimas do Citocromo P450 na degradação dos fármacos foi avaliada por meio da adição de piperonil butóxido (PB), o qual inibe esse complexo enzimático. A toxicidade dos fármacos e seus metabólitos para a bactéria *Vibrio fischeri* também foram avaliadas. A quantificação dos fármacos em todas as amostras foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. EE2 foi totalmente degradado por todos os fungos avaliados, sem a necessidade de glicose no meio de cultivo; no entanto, nenhuma das bactérias estudadas foi capaz de degradá-lo significativamente. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm linhagem P1 foi selecionado para os ensaios subsequentes. Após 6 dias, foi encontrada atividade de MnP igual a 5122,11 U.L<sup>-1</sup>. A lacase teve como atividade 307,69 U.L<sup>-1</sup>, valor encontrado após 4 dias de incubação. Não foi detectada atividade da enzima LiP em nenhum dos tempos analisados. Apesar da detecção de atividade dessas enzimas, elas não foram capazes de degradar o EE2 na ausência do micélio fúngico. Nos ensaios de toxicidade foi encontrada uma CE<sub>50</sub> igual a 76% para o EE2 e os metabólitos não apresentaram toxicidade. *Trametes* sp. linhagem BNI foi a selecionado para degradar CBZ, sendo a glicose necessária para o processo de biodegradação. Após 28 dias de incubação, houve 42% de degradação de CBZ. A atividade máxima de lacase foi de 1740,17 U.L<sup>-1</sup>, sendo encontrada após 21 dias de incubação. LiP teve como atividade máxima 663,08 U.L<sup>-1</sup>, valor encontrado após 14 dias de incubação. Não foi detectada atividade da

enzima MnP em nenhum dos tempos analisados. Não houve a degradação de CBZ utilizando apenas o caldo enzimático. A presença de PB inibiu totalmente a degradação de CBZ. CBZ e seus metabólitos não apresentaram toxicidade. Nenhuma das bactérias foi capaz de degradar CBZ. IBU foi totalmente degradado por todos os fungos avaliados sem a necessidade de glicose no meio de cultivo, sendo *Trametes* sp. linhagem BNI selecionado para os ensaios posteriores. Após 2 dias de incubação, BNI foi capaz de degradar totalmente IBU. Lacase foi a única enzima que teve atividade detectada nesse ensaio, sendo a atividade máxima detectada igual a 478,18 U.L<sup>-1</sup>, no sexto dia de incubação. Não foi detectada degradação de IBU utilizando apenas o caldo enzimático e a presença de PB no meio não inibiu a degradação deste fármaco. Nos ensaios de toxicidade foi encontrada uma CE<sub>50</sub> igual a 86% para o IBU e os metabólitos não apresentaram toxicidade. *Staphylococcus arlettae* e *Bacillus megaterium* foram capazes de degradar significativamente IBU na presença de glicose. *B. megaterium* foi selecionado para os ensaios subsequentes. Após 3 dias, essa linhagem foi capaz de degradar todo IBU disponível no meio. Nos ensaios de toxicidade para os metabólitos do processo de biodegradação por *B. megaterium*, o IBU apresentou uma CE<sub>50</sub> inicial igual a 47% e os metabólitos não apresentaram toxicidade. Esses resultados comprovam que fungos ligninolíticos e bactérias são capazes de degradar fármacos encontrados em matrizes ambientais, sendo plausível a utilização destes micro-organismos, ou suas enzimas, em sistemas de tratamento de água e esgoto.

**Palavras-chave:** Fármacos, fungos ligninolíticos, bactérias, biodegradação.

## ABSTRACT

17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), carbamazepine (CBZ) and ibuprofen (IBU) are pharmaceutical drugs used worldwide and have been frequently detected in wastewater treatment plants and in natural waters in several countries, including Brazil. The major concern about the occurrence of these drugs in trace amounts in drinking water and aquatic environments are the potential adverse effects on human and animal health. The main objective of this study was to assess the potential of ligninolytic fungi and bacteria to degrade these 3 compounds individually. Bacteria and ligninolytic fungi strains were grown on mineral medium with these drugs and with or without glucose. A selection was carried out to choose bacterial and fungal strains with capacity to degrade these drugs and if an addition of a carbon source (glucose) was needed for degradation. Strains with greater capacity to degrade these compounds were selected and assays were performed in order to optimize the incubation time to obtain the highest degradation rate in the shortest incubation time. Subsequently, the enzymatic activities of laccase, lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) produced by the selected fungi was assessed. Also, the action of these enzymes in the degradation of the drugs was evaluated. The involvement of cytochrome P450 enzymes in degradation of the pharmaceutical drugs was evaluated by the addition of piperonyl butoxide (PB), which inhibits this enzyme complex. The toxicity of the drugs and metabolites to *Vibrio fischeri* were also evaluated. The quantification of the drugs was performed by high performance liquid chromatography. EE2 was completely degraded by all fungi without glucose in the medium, however none of the studied bacteria was capable to degrade it significantly. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm strain P1 was selected for subsequent tests. The maximum enzyme activity produced by P1 was 5122.11 UL<sup>-1</sup> for MnP after 6 days and 307.69 UL<sup>-1</sup> for laccase after 4 days, while LiP activity was not detected. Although the detection of the enzymes activity, they were not able to degrade EE2 without the fungal mycelia. Toxicity studies showed the half maximal effective concentration (EC<sub>50</sub>) value equal to 76% to EE2 prior to fungal treatment, after this no toxicity was observed. *Trametes* sp. strain BNI was selected to degrade CBZ, and glucose was shown to be necessary for the biodegradation process. After 28 days of incubation, 42% of CBZ was degraded. The maximum laccase activity was 1740.17 UL<sup>-1</sup>, after 21 days of incubation. LiP maximum activity was 663.08 UL<sup>-1</sup>, found after 14 days of incubation, while MnP activity was not detected. There was no CBZ degradation using only the enzymatic supernatant. The addition of PB completely inhibited the degradation of CBZ. CBZ and its metabolites did not show toxicity. IBU was completely degraded by all fungi without glucose in the medium, and *Trametes* sp. strain BNI was selected for further analyses.

After 2 days, BNI was able to degrade IBU completely. Laccase was the only enzyme activity detected in this assay, the maximum activity was found to be  $478.18 \text{ UL}^{-1}$ , on the sixth day of incubation. IBU degradation was not detected using the enzymatic supernatant and the addition of PB did not inhibit drug degradation. An  $\text{EC}_{50}$  value equal to 86% was determined to IBU, while the metabolites did not show any toxicity. After 3 days, this strain has degraded all IBU available in the medium. In the toxicity assays for this degradation process, IBU has showed an  $\text{EC}_{50}$  equal to 47% while the metabolites have not showed toxicity. These results indicate that ligninolytic fungi and bacteria are able to degrade pharmaceuticals found in the environment, making possible the use of these microorganisms, or their enzymes, in water and wastewater treatment plants.

**Key words:** Pharmaceutical drugs, bacteria, ligninolytic fungi, biodegradation.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um novo grupo de substâncias químicas, conhecido como Contaminantes Emergentes (CE's), vem atraindo muita atenção da comunidade científica. Fármacos, hormônios, produtos de higiene pessoal, poluentes orgânicos persistentes e nano-materiais são compostos que fazem parte deste grupo.

O uso de fármacos, como a carbamazepina e o ibuprofeno, e hormônios sexuais sintéticos, como o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, vem aumentando a cada ano e se tornando um grande problema ambiental. Essas substâncias podem atingir o meio ambiente por diferentes rotas, sendo os efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE's) a principal delas. O avanço das técnicas analíticas, como a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia gasosa e os detectores de massas nas últimas décadas, contribuiu muito com os trabalhos de detecção destes compostos, uma vez que eles são encontrados em concentrações relativamente baixas no meio ambiente. Desde então, diversos trabalhos científicos vêm relatando a presença CE's em diferentes matrizes ambientais em todo o mundo.

A presença dos CE's nas matrizes ambientais vem gerando preocupação na comunidade científica, uma vez que muitos destes compostos apresentam baixa degradabilidade e podem se bioacumular nos seres vivos. Testes ecotoxicológicos vêm demonstrando que esses compostos podem causar efeitos tóxicos em diversos seres vivos nos mais diferentes níveis tróficos.

Diversas formas de minimizar a entrada de fármacos nas águas naturais vêm sendo estudadas e desenvolvidas. O emprego de processos de adsorção em matriz sólida, como a utilização de carvão ativado e membranas, processos de degradação abióticos, como a fotodegradação e a aplicação de substâncias oxidativas, e processos de biodegradação são as formas mais estudadas atualmente. A biodegradação envolve a utilização de micro-organismos capazes de transformar esses compostos tóxicos por meio de reações biológicas. Fungos

ligninolíticos produzem uma grande variedade de enzimas que são empregadas na degradação de lignina e na detoxificação de compostos nocivos à célula. Essas enzimas possuem baixa especificidade pelo substrato e são utilizadas em diversos estudos de degradação de compostos xenobióticos com estruturas complexas e aromáticas. Algumas linhagens bacterianas, isoladas principalmente de ambientes contaminados com essas drogas, vêm apresentando o mesmo potencial dos fungos ligninolíticos.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar micro-organismos, fungos ligninolíticos e/ou bactérias, com grande capacidade de degradação de  $17\alpha$ -etinilestradiol, carbamazepina, ibuprofeno, investigando as possíveis enzimas responsáveis por esses processos e a toxicidade dessas drogas e seus possíveis metabólitos por meio de ensaio ecotoxicológico. A utilização de micro-organismo pode ser considerada um potencial mecanismo para a descontaminação de águas ou efluentes contaminados com esses fármacos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fármacos

Fármacos, ou drogas médicas, são substâncias químicas de estrutura molecular conhecida, que não seja um nutriente ou um ingrediente essencial da dieta, e que, quando administrado a um organismo vivo, produz um efeito biológico. Fármacos podem ser substâncias químicas sintéticas, de origem animal, vegetal ou produto de engenharia genética (RANG *et al.*, 2007). Esses compostos químicos são moderadamente solúveis em água ou lipofílicos e biologicamente ativos (IKEHATA *et al.*, 2006). Fármacos, tais como os anti-inflamatórios, analgésicos, antiepilépticos, antibióticos, hormônios contraceptivos, dentre outros, são aplicados principalmente na medicina humana e veterinária, podendo ser utilizados também na agricultura e aquicultura.

Desde as civilizações mais antigas, substâncias de origem vegetal, animal ou mineral são empregadas no tratamento de diversas enfermidades que acometem o homem. No entanto, a farmacologia só nasceu como ciência em meados do século XIX, aliada aos avanços das ciências médicas e biológicas. Nessa época, os farmacologistas estudavam exclusivamente os efeitos de substâncias naturais, principalmente extratos vegetais, e métodos de purificação dos compostos ativos. No início do século XX, a química sintética começou a revolucionar a indústria farmacêutica e os primeiros fármacos sintéticos, como barbitúricos, anestésicos e quimioterápicos, surgiram no mercado, proporcionando uma melhor qualidade e maior expectativa de vida ao homem (RANG *et al.*, 2007). A partir dessa época, milhares de substâncias químicas sintéticas foram criadas com fins farmacêuticos. Atualmente, mais de 4.000 substâncias químicas são utilizadas como fármacos de uso humano ou veterinário em todo o mundo (BEAUSSE, 2004). Além disso, diversas outras substâncias farmacêuticas vêm sendo disponibilizadas no mercado anualmente em decorrência do constante avanço da ciência e da necessidade de medicamentos mais eficientes. Estima-se que o consumo mundial de medicamentos por seres humanos é superior a 100.000 toneladas por ano, o

que corresponde a uma média mundial per capita de consumo na faixa de 15 gramas por ano (TERNES & JOSS, 2006). Brasil, Estados Unidos, França e Alemanha são os maiores consumidores mundiais de fármacos, porém não há dados a respeito da quantidade de fármacos produzida e consumida anualmente no Brasil (STUMPF *et al.*, 1999).

Os fármacos pertencem a um grupo de substâncias químicas conhecido atualmente como Contaminantes Emergentes (CE's), junto com produtos de higiene pessoal, desreguladores endócrinos, poluentes orgânicos persistentes e nano materiais. A ameaça à saúde humana, à segurança pública ou ao meio ambiente, e as escassas ou inexistentes informações acerca da toxicidade, bem como a falta de legislações ambientais específicas, são as principais características dos CE's (MDEP, 2006).

### **2.1.1 17 $\alpha$ -etinilestradiol**

O 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) é um dos principais representantes de um grupo de substâncias químicas conhecidas atualmente como desreguladores endócrinos (DE's). Os DE's têm a capacidade de simular ou alterar as ações regulares dos hormônios naturais dos seres humanos e de outros animais (BILA, 2005). A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) define um DE como “agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (USEPA, 1997).

Sintetizado pela primeira vez em 1938, o EE2 é encontrado em medicamentos anticoncepcionais, onde atua inibindo a ovulação, e utilizado em terapias de reposição hormonal. O consumo de EE2 vem aumentando a cada dia e sua presença em diversas ETE's e águas naturais em todo o mundo vem sendo detectada (BILA & DEZOTTI, 2007; SODRÉ, *et al.*, 2007; KOLPIN *et al.*, 2002; TERNES *et al.*, 1999). Esse composto é um dos DE's mais importantes

encontrados no ambiente aquático, devido ao fato de ser altamente estrogênico, resistente à biodegradação e por ser introduzido constantemente no meio ambiente (FERREIRA, 2008). A presença do grupo etinil na estrutura molecular do EE2 confere a esse composto uma maior resistência à biodegradação em ETE's quando comparados aos estrogênios naturais (SERVOS *et al.*, 2005; JÜRGENS *et al.*, 2002).

### **2.1.2 Carbamazepina**

A carbamazepina [CBZ; 5H-Dibenzo(b,f)azepina-5-carboxamida], composto químico pertencente ao grupo dos iminostilbenos, é um fármaco empregado no tratamento de doenças neurológicas, como distúrbios bipolares e principalmente epilepsia (MARTINS, 2009).

Desenvolvida na década de 60, a carbamazepina (CBZ) é comercializada atualmente por diversas empresas, tendo como nome comercial mais conhecido o Tegreto<sup>®</sup> (Novartis). A CBZ atua no organismo estabilizando a membrana de nervos hiperexcitados, inibindo a descarga neuronal repetitiva e reduzindo a propagação sináptica dos impulsos excitatórios. A prevenção de estímulos repetitivos dos potenciais de ação sódio-dependentes na despolarização dos neurônios por meio do bloqueio do canal de sódio voltagem-dependente é considerada o principal mecanismo de ação (NOVARTIS, 2007). A CBZ é utilizada mundialmente e já foi detectada em diversas ETE's e águas superficiais (ZHOU *et al.*, 2009; ZUCCATO *et al.*, 2005). Esse composto apresenta uma lenta fotodegradação, alta persistência e baixa adsorção no lodo. Em 2003, foram produzidas 35 toneladas deste composto nos Estados Unidos e, em 2001, 87 toneladas na Alemanha (FENT *et al.*, 2006).

### **2.1.3 Ibuprofeno**

O ibuprofeno [IBU; ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propanoico] é um analgésico e anti-inflamatório não-esteroidal (AINE), cujos nomes comerciais no

Brasil são Alivium<sup>®</sup> e Advil<sup>®</sup>. Da mesma forma que todos os AINE's, o IBU atua inibindo as enzimas cicloxigenases (COX-1 e COX-2), e conseqüentemente, a síntese de prostaglandinas, as quais causam inflamação e febre, além de contribuir para a percepção de dor pelo cérebro (PFIZER, 2009). Sintetizado pela primeira vez em 1961, o IBU é uma das drogas mais consumidas no mundo atualmente, fazendo parte da lista de fármacos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS). Em 2001, foram produzidas 345 toneladas deste composto só na Alemanha (FENT *et al.*, 2006).

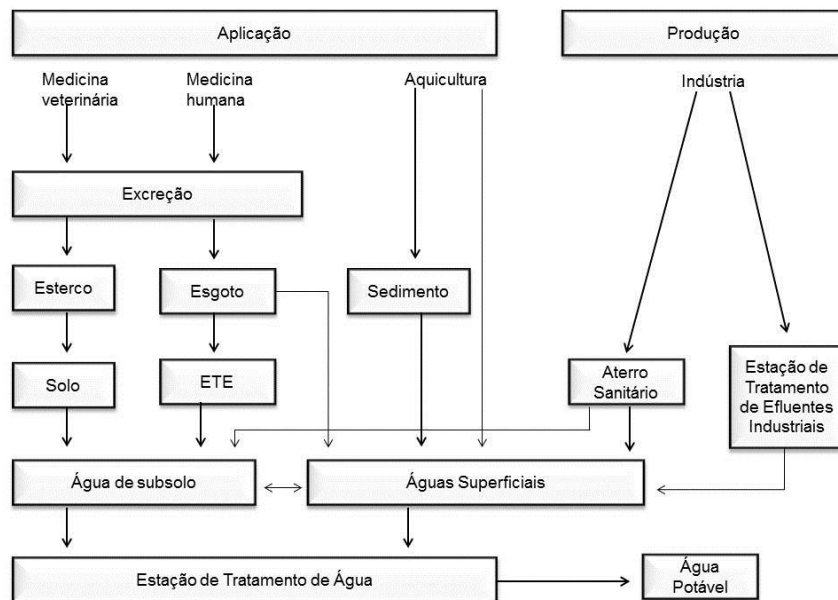
Esse composto apresenta uma baixa adsorção no lodo, sendo a biodegradação a principal forma de eliminação e, na maioria das vezes, ele é removido significativamente nas ETE's, sendo os metabólitos hidroxí-IBU e carboxi-IBU os mais detectados. Apesar disso, a presença do IBU em ETE's e águas naturais já foram detectadas em alguns países (Brasil, Suécia, Inglaterra, Estados Unidos, Itália, Suíça, dentre outros) (ZORITA *et al.*, 2009; FENT *et al.*, 2006; ZUCCATO *et al.*, 2005; BUSER *et al.*, 1999).

## **2.2 Rotas de exposição ambiental**

Os fármacos podem atingir ambientes aquáticos por diferentes rotas (Figura 1). Atualmente é aceito que a principal rota de contaminação é representada por efluentes de ETE's (esgotos domésticos, hospitalares ou industriais). A disposição em aterros, as excreções de animais e a destinação não adequada de fármacos não utilizados são outras formas de entrada dessas substâncias no meio ambiente (FENT *et al.*, 2006; BILA & DEZOTTI, 2003). Como a utilização de fármacos ocorre diariamente em todo o mundo e também os efluentes das ETE's são lançados nos corpos d'água continuamente, é importante ressaltar que a entrada destes compostos no meio ambiente ocorre de modo contínuo.

Uma vez que os fármacos não são totalmente degradados nas ETE's, os efluentes lançados nos corpos d'água promovem a contaminação de rios, lagos, estuários e, em alguns casos, águas subterrâneas. Muitas vezes, o lodo gerado no

processo de tratamento é lançado em campos agrícolas, podendo esse causar também contaminação do solo, águas superficiais e percolação para águas subterrâneas.



**Figura 1:** Possíveis rotas de fármacos no ambiente (Adaptado de BILA & DEZOTTI, 2003).

Após a administração dos medicamentos, as moléculas são absorvidas, distribuídas, parcialmente metabolizadas, e finalmente excretadas do corpo. O metabolismo elimina moléculas da droga em excesso, assim como outros compostos tóxicos xenobióticos, via uma série de biotransformações enzimáticas, convertendo-os em compostos mais polares hidrofílicos. Certas drogas, agentes médicos não terapêuticos e xenobióticos não são metabolizados no organismo, devido à ausência de enzimas específicas para esse processo, e podem ser eliminados lentamente do corpo sem que ocorra alguma biotransformação (IKEHATA *et al.*, 2006).

### 2.3 Disposição ambiental

A ocorrência de fármacos em águas residuárias tratadas foi primeiramente relatada nos EUA, onde ácido clofíbrico foi detectado na concentração de 0,8-2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (GARRISON *et al.*, 1976 *apud* FENT *et al.*, 2006). Em 1981, compostos farmacêuticos foram detectados em rios no Reino Unido em concentrações de até 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (RICHARDSON & BOWRON, 1985 *apud* FENT *et al.*, 2006); e ibuprofeno e naproxeno foram identificados em amostras da rede de esgoto no Canadá (ROGERS *et al.*, 1986 *apud* FENT *et al.*, 2006). Nos últimos anos, o conhecimento sobre a ocorrência ambiental de fármacos tem aumentado, em grande medida devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de determinar compostos farmacêuticos em baixas concentrações. No Brasil, os primeiros relatos de presença de fármacos em esgotos, efluentes tratados e em águas superficiais foram feitos por STUMPF e colaboradores (1999) e TERNES e colaboradores (1999).

Atualmente, diversos estudos revelaram a presença de CE's, principalmente fármacos e DE's, em diversas localidades como afluentes e efluentes de ETE's e ETA's, águas superficiais e, menos frequentemente, em águas subterrâneas ou potáveis no Brasil e em vários outros países. A Tabela 1 ilustra alguns fármacos e DE's detectados em diferentes países nos últimos anos.

O comportamento e destino de fármacos e seus metabólitos no ambiente aquático ainda não são bem conhecidos. A baixa volatilidade destes compostos indica que sua distribuição no meio ambiente ocorre principalmente por meio de transporte aquoso, podendo ser transportado também por meio da cadeia alimentar, uma vez que são capazes de bioacumularem nos seres vivos, e por dispersão (TAMBOSI, 2008).

Não há relatos na literatura acerca de alimentos contaminados com fármacos residuais; no entanto WINKER e colaboradores (2010) detectaram carbamazepina tanto nas raízes quanto na parte aérea da gramínea azévem (*Lolium perene*)

crescida em solo tratado com urina humana contendo tal fármaco. Esses resultados demonstram que é plausível a presença CE's em vegetais, principalmente em culturas que recebem urina de animais como fertilizante.

**Tabela 1:** Concentrações de alguns fármacos e DE's detectados em amostras ambientais.

Composto	Concentração (ng.L <sup>-1</sup> )	Localidade	Referência
17 $\alpha$ -etinilestradiol	340	ETA / BRA	SODRÉ <i>et al.</i> , 2007
Carbamazepina	1060	Efluente / ING	ZHOU <i>et al.</i> , 2009
Ibuprofeno	250	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006
17 $\beta$ -estradiol	2510	ETA / BRA	SODRÉ <i>et al.</i> , 2007
Ácido clofíbrico	20	Efluente / SUE	ZORITA <i>et al.</i> , 2009
Bifenilol	100	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006
Bisfenol A	1760	ETA / BRA	SODRÉ <i>et al.</i> , 2007
Cetoprofeno	280	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006
Ciprofloxacina	65000	Efluente / BRA	MARTINS <i>et al.</i> , 2008
Clorofeno	200	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006
Diclofenaco	490	Efluente / SUE	ZORITA <i>et al.</i> , 2009
Di-n-butilftalato	9860	ETA / BRA	SODRÉ <i>et al.</i> , 2007
Estigmasterol	340	Água de torneira / BRA	SODRÉ <i>et al.</i> , 2010
Fenitoína	250	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006
Gemfibrozil	130	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006
Indometacina	30	Efluente / ING	ZHOU <i>et al.</i> , 2009
Naproxeno	380	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006
Ofloxacina	10	Efluente / SUE	ZORITA <i>et al.</i> , 2009
Propranolol	135	Efluente / ING	ZHOU <i>et al.</i> , 2009
Sulfametoxazol	30	Efluente / ING	ZHOU <i>et al.</i> , 2009
Triclosan	250	Efluente / EUA	YU <i>et al.</i> , 2006

## 2.4 Efeitos ecotoxicológicos e humanos

A grande preocupação ambiental não é necessariamente o volume de produção de um fármaco, mas sua persistência no ambiente e as possíveis

interações dessas substâncias químicas com os diversos organismos do ecossistema (espécies não-alvo), inclusive o homem, a longo prazo. Muitas das drogas comercializadas atualmente não possuem o efeito específico ou o modo de ação muito bem conhecido, além de poderem causar efeitos colaterais no próprio homem. A presença destes compostos no meio ambiente torna-se potencialmente perigoso aos organismos que entrarão em contato com eles.

Alguns autores sugerem que o principal problema está nas possíveis interações destes fármacos com os micro-organismos presentes nos ambientes aquáticos e terrestres. Estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de vários agentes antibióticos em esgotos (ZORITA *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2008; KOLPIN *et al.*, 2002) e, embora geralmente sejam encontrados em concentrações pelo menos 1.000 vezes menores que as necessárias para inibir o crescimento de bactérias, eles podem afetar bactérias susceptíveis, selecionando as resistentes (COELHO, 2008).

Diversos efeitos do DE's na vida animal já foram relatados por pesquisadores, uma vez que eles são capazes de imitar ou interferir na ação de hormônios endógenos. JÜRGENS e colaboradores (2002) mostraram que o EE2 é o mais potente desregulador endócrino para peixes: a indução da produção de vitelogenina (proteína presente em ovos de animais ovíparos) e feminização de órgãos reprodutivos em peixes machos estão diretamente relacionada ao contato com os DE's. JOBLING e colaboradores (1998) observaram também a geração de peixes hermafroditas em experimentos utilizando efluentes de ETE's. O surgimento de células mamárias cancerígenas em alguns mamíferos também já foi relatado como efeito dos DE's (COLEMAN *et al.*, 2005). Nos seres humanos, algumas enfermidades podem ser induzidas pela ação dos DE's, como cânceres de mama, de útero e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina, aumento de incidência de ovários policísticos, distúrbios nas funções do ovário (crescimento folicular e a ovulação) e alteração de glândulas tireoides. Os DE's podem atuar tanto no sistema endócrino como também nos



sistemas imunológico e nervoso. A seleção de bactérias resistentes a antibióticos e a desregulação hormonal são dois efeitos toxicológicos ocasionados pela presença de fármacos residuais que estão diretamente relacionados à saúde humana.

Efeitos ecotoxicológicos de outras drogas em concentrações residuais também vêm sendo relatados. Efeitos subletais e comportamentais de CBZ em concentrações de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ou  $\text{ng.L}^{-1}$  são encontrados em diversos organismos, como *Lemna minor* (planta aquática), *Oryzias latipes* (peixe), *Hydra attenuata* (cnidário) (SANTOS *et al.*, 2010).

Os AINE's residuais presentes nas águas naturais também podem afetar diversos seres vivos. Peixes possuem uma cicloxigenase similar à COX-2 humana, que os tornam um alvo potencial de AINE's residuais (ZOU *et al.*, 1999). Foi observado que prostaglandinas participam da síntese da casca de ovos de pássaros, dessa forma a ausência dessa substância torna as cascas mais finas e frágeis (LUNDHOLM, 1997). Concentrações inferiores a  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  estimularam o crescimento da cianobactéria *Synechocystis* sp. e inibiram o crescimento de *Lemna minor* (POMATI *et al.*, 2004). FLIPPIN e colaboradores (2007) relataram a atuação de IBU como DE em peixes, aumentando a produção de óvulos e reduzindo o número de desovas ao mesmo tempo.

## **2.5 Testes de ecotoxicidade**

O termo Ecotoxicologia foi definido pela primeira vez na década de 70 pelo toxicologista francês René Truhaut. Segundo ele, “a ecotoxicologia é a ciência que estuda o efeito de substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, aquáticos ou terrestres que constituem a biosfera”. A ecotoxicologia é surgiu com a finalidade de dar suporte à questão da contaminação de ambientes, como por exemplo, corpos d'água por compostos tóxicos.

Atualmente, existem diversos testes ecotoxicológicos (bioensaios) padronizados por instituições internacionais (USEPA, ISO, OECD, dentre outras) e nacionais (IBAMA, CETESB) que são realizados em laboratórios e utilizados no monitoramento ambiental, visando principalmente avaliar a qualidade de águas e efluentes. A utilização de ensaios ecotoxicológicos como ferramenta de avaliação ambiental é de extrema importância, uma vez que algumas características de poluentes não são avaliadas por ensaios abióticos, como por exemplo, a biodisponibilidade e a interação entre os efeitos de poluentes (MAGALHÃES & FILHO, 2008; CARLSSON *et al.*, 2006; CRANE *et al.*, 2006).

A escolha do organismo-teste ideal depende das características da substância tóxica e do ambiente onde essa se encontra (marinho, dulcícola, terrestre, etc.). Peixes (*Danio rerio*), oligoquetas (*Eisenia andrei*), poliquetas (*Laeonereis acuta*), equinóides (*Paracentrotus lividus*), microcrustáceos (*Daphnia similis*) e bactérias (*Vibrio fischeri*) são alguns exemplos de organismos utilizados nesses ensaios. (MAGALHÃES & FILHO, 2008; CARLSSON *et al.*, 2006; CRANE *et al.*, 2006).

Os testes de toxicidade aguda avaliam o efeito de uma substância tóxica num curto intervalo de tempo, o qual varia de acordo com o organismo-teste utilizado. Normalmente, a resposta observada é a letalidade ou outra manifestação do organismo que a anteceda, como o estado de imobilidade em invertebrados. Estes testes têm como objetivo determinar a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) ou a Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>), isto é, a concentração da substância tóxica que causa mortalidade ou outro efeito em estudo, respectivamente, a 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo de exposição (MAGALHÃES & FILHO, 2008).

Os testes de toxicidade crônica têm como objetivo avaliar os efeitos subletais (efeitos que permitem a sobrevivência do organismo, no entanto afetam uma ou várias funções biológicas, como o desenvolvimento e a reprodução) que determinada substância tóxica pode causar nos organismos-teste. Estes são

expostos à amostra durante um longo período, que pode chegar à totalidade da vida do organismo. As concentrações da amostra utilizadas nesses testes são calculadas a partir da CL<sub>50</sub>, sendo os testes de toxicidade crônica dependentes dos testes de toxicidade aguda. Devido à necessidade de longos períodos de avaliação, dados de toxicidade crônica são muito mais raros que de toxicidade aguda na literatura (MAGALHÃES & FILHO, 2008).

Os testes de ecotoxicidade são a forma mais utilizada atualmente para se avaliar os possíveis efeitos da presença de fármacos em ambientes aquáticos. Entretanto, esses testes deveriam ser realizados objetivando o efeito do fármaco em organismos vertebrados e invertebrados baseados na hipótese de semelhança no modo de ação (FENT *et al.*, 2006). Devido à atual legislação em relação ao bem-estar animal, vários testes de toxicidade têm sido realizados *in vitro*, mas esses não são suficientes para avaliar o perfil toxicológico de um composto ou de uma combinação de compostos, e são pouco confiáveis para gerar uma base para análise de risco (FENT, 2001).

Além dos testes laboratoriais, alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos para calcular ou prever os efeitos ecotoxicológicos destes compostos, sendo o software ECOSAR (USEPA) o mais utilizado. Na literatura aberta ou nas bases de dados atuais, dados ecotoxicológicos estão disponíveis para menos de 1% dos fármacos, e apenas um pequeno número de novos compostos são submetidos à avaliação de riscos, utilizando testes ecotoxicológicos (FENT *et al.*, 2006). A ecotoxicologia de fármacos deve ser aliada às atividades de farmacodinâmica para que resultados mais conclusivos acerca dos riscos dos fármacos e suas formulações no ambiente possam ser apresentados (SANDERSON *et al.*, 2004).

*Vibrio fischeri* é uma bactéria originária de ambientes marinhos e possui a capacidade de emitir luminescência quando em ambiente saudável. A presença de substâncias tóxicas no meio inibe a emissão de luminescência numa escala quantitativa (CETESB, 2012). Os testes de toxicidade aguda consistem na análise

da bioluminescência emitida pela bactéria em amostras com diferentes diluições, sendo um teste relativamente simples e rápido. A partir da diferença entre as intensidades de luminescência em cada diluição é atribuída a toxicidade da amostra, por meio de análises estatísticas (MARTINS, 2009). Dessa forma, *V. fischeri* vem sendo utilizada como organismo modelo em análises de qualidade de água (ERBE *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2007; JOS *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2002).

## **2.6 Métodos de remoção e degradação de fármacos**

Diversas formas de se evitar que fármacos atinjam águas naturais vêm sendo estudadas e desenvolvidas. O emprego de processos de adsorção em matriz sólida (GROVER, 2011), processos de degradação abióticos (COELHO, 2008; TAMBOSI, 2008; BILA, 2005) e processos de biodegradação (MARCO-URREA *et al.*, 2009; GAUTHIER *et al.*, 2010) são as formas que têm sido mais estudadas.

### **2.6.1 Adsorção em matriz sólida**

As técnicas de adsorção em matriz sólida têm como principal característica a remoção significativa de contaminantes do meio, sem que haja degradação real do mesmo. Abrange tanto processos clássicos como precipitação, coagulação, flotação, sedimentação, quanto processos modernos como filtração com membranas, osmose reversa e carvão ativado (GROVER *et al.*, 2011). Como não há a degradação dos contaminantes presentes no efluente a ser tratado, esses processos acabam gerando resíduos sólidos perigosos, os quais necessitam de uma nova forma de disposição ou tratamento (TEIXEIRA & JARDIM, 2004).

### **2.6.2 Degradação abiótica**

Os processos oxidativos abióticos promovem a destruição (mineralização) dos poluentes, física ou quimicamente. A incineração é a técnica mais clássica de degradação abiótica, no entanto pode apresentar alto custo, destruir todo o material e não apenas os poluentes e ainda gerar subprodutos de alta toxicidade.

Além disso, a incineração só pode ser empregada na degradação de resíduos sólidos (TEIXEIRA & JARDIM, 2004).

Os processos oxidativos avançados (POA's) é um grupo de metodologias que têm em comum a geração de radicais hidroxilas ( $\bullet\text{OH}$ ), os quais são altamente oxidantes e capazes de mineralizar a matéria orgânica a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), água e íons inorgânicos. Esses radicais são gerados por meio de reações envolvendo oxidantes como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), irradiação ultravioleta, ozônio ( $\text{O}_3$ ), dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ), podendo ser utilizado também a combinação de mais de um oxidante. Além de serem fortemente oxidantes, os radicais hidroxilas apresentam uma baixa seletividade, sendo capazes de oxidar a maioria das classes de contaminantes (MELO 2009 *et al.*, 2009; IKEHATA *et al.*, 2006).

A fotodegradação por meio de irradiação solar é um processo que também já foi relatado por alguns autores. Diversos tipos de poluentes podem absorver a energia da irradiação solar, sendo essa capaz de excitar elétrons e causar modificações na estrutura da molécula, como rupturas de ligações por exemplo. DOLL & FRIMMEL (2003) mostraram que fármacos como a carbamazepina e ácido clofíbrico podem sofrer degradação quando expostos à luz solar.

### **2.6.3 Biodegradação**

A transformação biológica de um composto químico a outra forma mais simples é denominada biodegradação. Muitas vezes, os micro-organismos presentes no meio ambiente são capazes de utilizar poluentes orgânicos como fonte de nutrientes e energia, processo denominado catabolismo. A oxidação de determinado composto ocorre por meio de uma rota metabólica, onde há a atuação de uma ou mais enzimas. Quando há a oxidação completa de um composto até suas formas inorgânicas mais simples, como dióxido de carbono e água, o processo é denominado mineralização (MELO & AZEVEDO, 2008). No entanto, na maioria das vezes, os poluentes orgânicos são degradados apenas

parcialmente, gerando os metabólitos. Isto pode ocorrer quando o micro-organismo não é capaz de sintetizar todas as enzimas necessárias para a mineralização do poluente ou ainda por um processo conhecido como cometabolismo. Neste último caso, o micro-organismo é capaz de sintetizar enzimas inespecíficas capazes de degradar, por coincidência, o poluente, sendo a energia e metabólitos produzidos não utilizados para o crescimento do micro-organismo (MAIER *et al.*, 2009).

A formação de metabólitos durante o processo de biodegradação é uma questão que merece atenção, pois diversos trabalhos demonstram que esses metabólitos podem ser tão ou mais tóxicos a outros seres vivos que o próprio poluente em sua forma original. Isso pode ocorrer uma vez que a atuação de enzimas na estrutura molecular do poluente pode gerar radicais altamente reativos, os quais podem penetrar mais facilmente nas células e interagir com componentes celulares (MAIER *et al.*, 2009).

Em geral, a decomposição biológica de micropoluentes, como os fármacos, aumenta com o aumento do tempo de retenção hidráulica e com a idade do lodo, durante o tratamento pelo processo de lodos ativados (TAMBOSI, 2008). Entretanto, METCALFE e colaboradores (2003) reportaram que independente do tempo de retenção hidráulica, compostos com baixos índices de biodegradabilidade como a CBZ, só são removidos em quantidades muito baixas (normalmente inferiores a 10%).

### **2.6.3.1 Fungos**

Fungos ligninolíticos, principalmente os de degradação branca, constituem um grupo de micro-organismos capazes de despolimerizar e mineralizar aerobiamente a lignina. Os fungos de degradação branca recebem esse nome pois quando degradam a lignina deixam a madeira com uma coloração esbranquiçada. A maioria dos fungos ligninolíticos pertence ao filo Basidiomycota,

porém algumas espécies do filo Ascomycota também são capazes de degradar lignina (CABANA *et al.*, 2007; POINTING, 2001).

Os fungos basidiomicetos são capazes de sintetizar uma grande variedade de enzimas, que vêm sendo muito estudadas nos últimos anos. Dentre essas enzimas está o Citocromo P450 (CP450), que é uma superfamília de enzimas intracelulares encontradas em todos os seres vivos, sendo as monoxigenases as principais enzimas dessa família. Uma das funções dessas enzimas é metabolizar compostos tóxicos à célula e dessa forma, muitos pesquisadores vêm estudando a aplicabilidade destes organismos em processos de biodegradação e biorremediação (MARCO-URREA *et al.*, 2009; SUBRAMANIAN & YADAV, 2009). Esses fungos também produzem enzimas extracelulares, as quais são essenciais para a degradação da lignina e são conhecidas como enzimas ligninolíticas. Essas enzimas são produzidas principalmente durante o metabolismo secundário e quando há limitação de nutrientes no meio (CABANA *et al.*, 2007; POINTING, 2001). Lacase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) são as principais enzimas ligninolíticas secretadas pelos basidiomicetos.

A lacase (E.C. 1.10.3.2) contém íons cobre em sua estrutura e pertence à família das oxidases, sendo dependente de oxigênio para catalisar reações. Além de polímeros, a lacase é capaz de oxidar também pequenos compostos orgânicos, compostos aromáticos, como fenóis, e metais. Em escala laboratorial, uma maior produção de lacase é observada quando há agitação do meio de cultivo (CABANA *et al.*, 2007; POINTING, 2001). A lacase vem sendo utilizada em diversos ramos industriais, como na produção de rolhas para vinhos, no acabamento de coloração de tecidos, no clareamento de dentes e na degradação de polifenóis em alimentos (FARACO *et al.*, 2009; ASGHER *et al.*, 2008; WESENBERG *et al.*, 2003).

A LiP (E.C. 1.11.1.14) é uma enzima pertencente ao grupo das oxidases que necessitam de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como cofator e possuem um grupo heme em sua estrutura. O álcool veratrílico é o redutor preferido da enzima, podendo ser produzido pelo fungo como forma de proteção contra o excesso de

peróxido de hidrogênio, que pode inativar a LiP. A utilização de meio de cultivo estático proporciona uma maior produção de LiP em escala laboratorial (MELO & AZEVEDO, 2008; CABANA *et al.*, 2007; POINTING, 2001). Os principais estudos de aplicabilidade dessa enzima ocorrem nos segmentos de tratamento de efluentes e biorremediação (FARACO *et al.*, 2009; ASGHER *et al.*, 2008; WESENBERG *et al.*, 2003). Da mesma forma que a LiP, a MnP (E.C. 1.11.1.13) pertence ao grupo das oxidases que necessitam de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como cofator e possuem um grupo heme em sua estrutura, no entanto a MnP necessita de íons Mn<sup>+2</sup> como um segundo cofator (CABANA *et al.*, 2007; POINTING, 2001). O emprego de MnP na descoloração e detoxificação de efluentes industriais também vem sendo estudado (FARACO *et al.*, 2009; ASGHER *et al.*, 2008; WESENBERG *et al.*, 2003).

Além das características reportadas acima, as enzimas ligninolíticas possuem uma baixa especificidade pelo substrato e são capazes de degradar também uma grande variedade de compostos xenobióticos. Devido a essa capacidade de degradar compostos recalcitrantes, os fungos ligninolíticos tornaram-se organismos potencialmente úteis em processos de biorremediação e biodegradação. Estudos recentes vêm demonstrando que algumas enzimas fúngicas são capazes de degradar fármacos e hormônios sintéticos considerados muito recalcitrantes (ZHANG & GEIBEN, 2009; MARCO-URREA *et al.*, 2009; WEN *et al.*, 2009; BLÁNQUEZ & GUIEYSSE, 2008).

A grande maioria dos fungos potencialmente produtores de enzimas degradadoras de compostos xenobióticos são terrestres, o que dificulta a utilização destes organismos em ETE's. Além da dificuldade de crescimento, a utilização de fungos em ETE's é muito limitada, uma vez que o processo de incubação e adsorção dos poluentes no micélio fúngico é muito lento. A principal maneira de se combater esses fatores é o isolamento das enzimas de interesse, e a aplicação apenas das enzimas no processo de tratamento, o que torna também o processo mais simples e efetivo (WEN *et al.*, 2009). Dessa forma, a



possibilidade de aplicação de enzimas no tratamento de efluentes vem despertando interesse de muitos pesquisadores, uma vez que elas apresentam uma grande capacidade de degradação de compostos recalcitrantes, como alguns fármacos, e podem ser produzidas em grandes quantidades e com baixo custo, devido aos grandes avanços biotecnológicos que vêm ocorrendo nos últimos anos (KARAM & NICELE, 1997). Apesar da vantagem de se utilizar enzimas imobilizadas ou não, a utilização de fungos imobilizados pode ser também uma alternativa a ser melhor estudada para as situações em que toda a maquinaria celular, e não só as enzimas isoladas, for necessária para a degradação do composto alvo.

### **2.6.3.2 Bactérias**

Bactérias são os principais micro-organismos utilizados nos processos de tratamento biológico de efluentes convencionais. No entanto, as bactérias normalmente presentes nas ETE's não são capazes de remover totalmente os diversos fármacos durante o processo, uma vez que vários destes compostos vêm sendo encontrados em águas naturais, como já dito anteriormente. Isso pode ocorrer devido a diversos fatores como a concentração relativamente baixa dos fármacos que pode ser incapaz de induzir a expressão das enzimas aptas a degradá-los; a bioatividade dessas moléculas (capazes de inibir o crescimento e metabolismo de diversas bactérias) e a falta de condições propícias nas ETE's para que o processo de biodegradação ocorra (MAIER *et al.*, 2009). Diferentes linhagens bacterianas vêm sendo isoladas ao longo dos anos de diferentes ambientes contaminados por compostos xenobióticos. Estudos recentes (GAUTHIER *et al.*, 2010; MUSSON *et al.*, 2010; O'GRADY *et al.*, 2009; ROH *et al.*, 2009) demonstram que algumas linhagens bacterianas são capazes de degradar fármacos de alta persistência embora este processo ocorra de forma lenta. No entanto, ainda não há trabalhos que demonstrem a utilização dessas bactérias em ETE's ou em plantas piloto.

A principal forma de remoção de alguns fármacos nas ETE's ocorre por meio de processos de adsorção, no qual as moléculas se aderem fisicamente ao lodo ativado ou até mesmo na membrana das células microbianas por meio de interações iônicas, dependendo das características do fármaco (como a hidrofobicidade e as interações eletrostáticas, por exemplo) (MAIER *et al.*, 2009), sendo um exemplo de processo de adsorção em matriz sólida.

## **2.7 Métodos de quantificação de fármacos**

O conhecimento sobre a ocorrência ambiental dos CE's foi proporcionado principalmente pelo desenvolvimento de técnicas analíticas capazes de detectar e quantificar a presença destes poluentes mesmo em baixíssimas concentrações, contribuindo, assim, para o melhor entendimento do problema de contaminação ambiental. Os CE's têm sido determinados nas mais variadas matrizes ambientais como águas, efluentes industriais, solos, sedimentos, emissões gasosas, amostras biológicas, alimentos e até ovos de pássaros, sendo que as matrizes aquosas são as mais analisadas (DA SILVA & COLLINS, 2011).

Dentre essas técnicas analíticas, merece destaque a cromatografia, a qual é um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada por meio da migração diferencial destes componentes entre duas fases, a móvel e a estacionária, as quais estão em contato. As principais técnicas cromatográficas utilizadas para a detecção e quantificação de fármacos são a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A utilização de detecção por espectrometria de massas (EM) é recomendada para assegurar a identificação das substâncias analisadas (COLLINS *et al.*, 2006; BILA & DEZOTTI, 2003).

A CLAE é uma técnica cromatográfica que emprega pequenas colunas, as quais são preenchidas com materiais especialmente preparados (fase estacionária), e uma fase móvel, que é eluída sobre alta pressão por meio de uma bomba. As diferentes substâncias presentes numa amostra atravessam a coluna

em velocidades distintas, de acordo com as características físico-químicas de cada uma, o que leva à separação de todas as substâncias presentes na amostra. Após atravessarem a coluna, as substâncias são reconhecidas por um detector permitindo analisar a natureza da separação obtida. Os detectores são instrumentos que medem de forma contínua alguma propriedade intrínseca física ou físico-química da amostra e em resposta envia um sinal proporcional à concentração do componente. Os detectores podem ser óticos, de massa, eletroquímicos e radioquímicos, sendo a escolha dependente também das características das substâncias a serem quantificadas (DA SILVA & COLLINS, 2011; COLLINS *et al.*, 2006; BILA & DEZOTTI, 2003).

Existem diversos tipos de fases estacionárias e móveis, as quais devem ser escolhidas de acordo com as características da amostra e do analito a ser identificado e/ou quantificado, principalmente a polaridade e a volatilidade do analito. A CLAE é adequada para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam alta polaridade e baixa volatilidade ou ainda elevada instabilidade térmica, as quais são características de muitos CE's. A fase móvel deve apresentar uma série de atributos, que tornam a técnica mais precisa e segura, evitando danos ao equipamento. Água deionizada, metanol e acetonitrila são as principais substâncias utilizadas como fase móvel. A adição de modificadores (ácido fórmico, acetato de amônio, amônia, dentre outros) ou a utilização de fases móveis tamponadas têm como objetivo favorecer a ionização dos analitos por meio do ajuste de pH, melhorando suas interações com a fase móvel e a fase estacionária. Já a coluna contendo a fase estacionária deve ser capaz de suportar a pressão exercida pela fase móvel. Sólidos rígidos à base de sílica, principalmente com grupo C18, são as principais fases estacionárias utilizadas atualmente (DA SILVA & COLLINS, 2011; COLLINS *et al.*, 2006; BILA & DEZOTTI, 2003).

A CLAE, como todas as técnicas analíticas, possui limitações quanto à concentração do analito em estudo. O limite de detecção (LD), ou sensibilidade, é

a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Este valor é determinado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ é determinado por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). É importante ressaltar esses valores, pois não se deve afirmar que o analito está ausente quando este não for detectado por meio da CLAE, apenas que sua concentração é inferior ao LD. Da mesma forma, não se deve assegurar a concentração do analito quando essa for inferior ao LQ, apenas que sua concentração é inferior ao LQ.

Dessa forma, por meio da CLAE pode-se de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com uma alta resolução, eficiência e sensibilidade.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Esse estudo se propôs a avaliar o potencial de bactérias e fungos ligninolíticos na degradação de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, carbamazepina e ibuprofeno.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Selecionar linhagens de micro-organismos capazes de degradar 17 $\alpha$ -etinilestradiol, carbamazepina e ibuprofeno em meio de cultivo;
- Comparar a degradação dos fármacos na presença ou ausência de glicose no meio de cultivo;
- Acompanhar o processo de degradação dos fármacos por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a produção de algumas enzimas (lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase) pelos fungos;
- Avaliar a capacidade do caldo enzimático em degradar os fármacos, na ausência de biomassa microbiana;
- Avaliar a atuação das enzimas do Citocromo P450 na degradação dos fármacos;
- Avaliar a toxicidade destes fármacos e dos produtos da biodegradação por meio de teste ecotoxicológico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

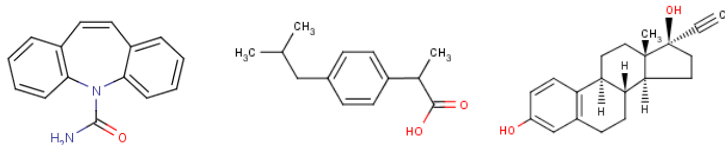
### 4.1 Fármacos

Carbamazepina, 17 $\alpha$ -etinilestradiol e ibuprofeno foram os compostos estudados nesse trabalho. CBZ (TCI America<sup>®</sup>) e EE2 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) foram adquiridos na forma pura (grau analítico), enquanto que o IBU (Genix Indústria Farmacêutica Ltda.) foi adquirido na sua forma pura comercial (utilizado por farmácias de manipulação). Informações relevantes sobre esses compostos encontram-se na Tabela 2. Soluções estoque de CBZ e IBU foram preparadas em etanol (grau analítico – 99,5%) numa concentração de 2 g.L<sup>-1</sup>, sendo apenas o EE2 preparado em acetona numa concentração de 1 g.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 2:** Características dos fármacos (TOXNET, 2010).

Propriedades Físicas	Carbamazepina	Ibuprofeno	17 $\alpha$ -etinilestradiol
Número CAS	298-46-4	15687-27-1	57-63-6
Fórmula molecular	C15-H12-N2-O	C13-H18-O2	C20-H24-O2
Massa Molecular (g/mol)	236,27	206,29	296,4
Ponto de Fusão (°C)	190.2	76	183
log P (octanol-água)	2,45	3,97	3,67
Solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> )	17,7	21	11,3

Estrutura Química



## **4.2 Fungos ligninolíticos**

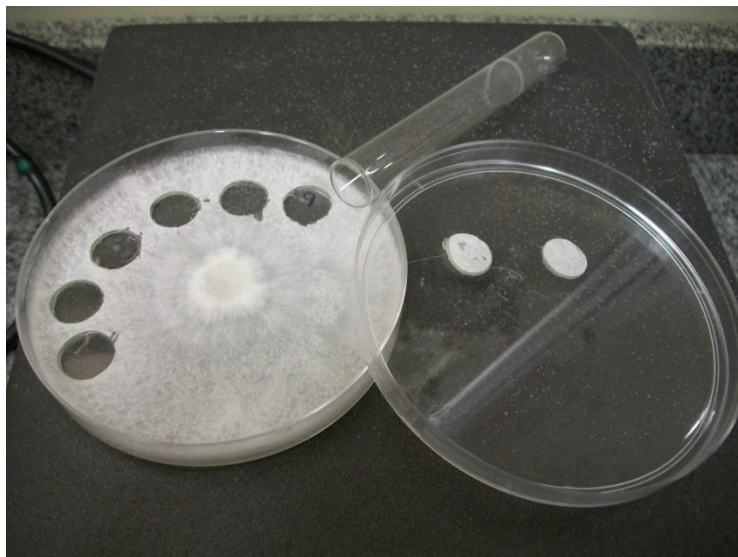
### **4.2.1 Linhagens e manutenção dos micro-organismos**

*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm linhagem P1, *Pleurotus* sp. linhagem BS e *Trametes* sp. linhagem BNI foram as linhagens utilizadas nesse trabalho. Os micro-organismos foram obtidos da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (FEA/UNICAMP), os quais foram utilizados também em outros estudos de biodegradação de compostos xenobióticos.

As linhagens fúngicas foram mantidas em placas de Petri contendo meio PDA (*Potato-Dextrose-Agar* - Oxoid®) e armazenadas em câmara fria (4°C). Repiques periódicos foram realizados para a manutenção das culturas em atividade.

### **4.2.2 Preparo do inóculo**

As linhagens foram crescidas em placa de Petri contendo meio PDA, durante 8 dias, em estufa à 30°C. Após esse período, círculos de 1 cm<sup>2</sup> foram feitos no ágar-micélio, com o auxílio de um tubo de ensaio estéril (CLEMENTE, 2002 - modificado). Esses fragmentos foram utilizados como inóculo nos posteriores ensaios (Figura 2).



**Figura 2:** Fungo ligninolítico crescido em meio PDA e fragmentos utilizados como inóculo.

#### **4.2.3 Seleção dos fungos ligninolíticos com potencial de degradação dos fármacos**

Os fungos ligninolíticos foram avaliados quanto à capacidade de degradar os fármacos em estudo. Nesses experimentos foi analisada a capacidade destes micro-organismos em degradarem os fármacos, tanto na presença quanto na ausência de glicose no meio de cultivo. Na presença de glicose, fonte de carbono e energia mais acessível, foram utilizadas concentrações menores dos fármacos em relação aos experimentos na ausência de glicose.

As concentrações dos fármacos usadas nesse trabalho foram escolhidas com o intuito de se aproximar ao máximo da realidade observada nos efluentes de ETE's e nas águas naturais. As concentrações utilizadas ainda são muito superiores ao esperado nessas amostras ambientais, no entanto, elas foram escolhidas para possibilitar a atuação das enzimas fúngicas e a quantificação da degradação dos fármacos por cromatografia, ressaltando-se os limites de detecção e quantificação dessa técnica.



Os experimentos de degradação foram realizados para cada fármaco e para cada micro-organismo individualmente.

O meio mineral (Tabela 3), suplementado com 1 mL da solução de vitaminas (Tabela 4) e 10mL da solução de microelementos (Tabela 5), foi utilizado em todos os ensaios que envolveram o crescimento dos fungos. Os fármacos foram adicionados nas concentrações descritas na Tabela 6, sendo que nos ensaios com a presença de glicose no meio, essa foi adicionada numa concentração final de 5 g.L<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque a 30% (p/v).

**Tabela 3:** Composição do meio mineral (CLEMENTE, 2002).

Componente	Concentração
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g.L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8 g.L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3 g.L <sup>-1</sup>
Solução de vitaminas	1 mL.L <sup>-1</sup>
Solução de microelementos	10 mL.L <sup>-1</sup>

**Tabela 4:** Composição da solução de vitaminas (WOLIN *et al.*, 1963).

Componente	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )
Biotina	2
Ácido fólico	2
Piridoxina	10
Riboflavina	5
Tiamina	10
Ácido nicotínico	5
Ácido pantotênico	5
Ácido para-aminobenzóico	5
Ácido Tióctico	5

**Tabela 5:** Composição da solução de microelementos (CLEMENTE, 2002 – modificado).

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,5
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,5

**Tabela 6:** Concentração dos fármacos nos meios de cultivo.

Fármaco	Meio sem glicose (mg.L <sup>-1</sup> )	Meio com glicose (mg.L <sup>-1</sup> )
CBZ	15	10
EE2	10	7
IBU	20	15

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 35 mL de meio de cultivo. Alíquotas das soluções estoque dos fármacos foram adicionadas aos frascos visando à obtenção das concentrações desejadas (Tabela 6). Uma alíquota de 5 mL de meio de cultura foi retirada de cada frasco para confirmação da concentração inicial do fármaco, por CLAE. Os frascos foram inoculados com três fragmentos do ágar-micélio (item 4.2.2), e fechados utilizando-se tampões de algodão (Figura 3). O experimento foi conduzido em duplicata e a incubação ocorreu em agitador orbital (New Brunswick Scientific Innova 4900), a 90 rpm e a 30°C (Figura 3). Os frascos foram divididos em dois grupos, onde a cada 7 dias um dos grupos foi removido para a quantificação da degradação do fármaco.

Um controle não inoculado (controle abiótico) e um controle onde o micro-organismo foi inativado por autoclavagem (controle autoclavado) após seu

crescimento por 7 dias na ausência do fármaco foram realizados. O controle abiótico foi realizado para monitorar a degradação dos compostos livre do metabolismo microbiano, enquanto o controle abiótico foi realizado com o intuito de se avaliar a possível adsorção do fármaco na biomassa celular.

Após o período de incubação, o meio de cultivo foi filtrado com lã de vidro para a remoção do micélio fúngico. O caldo enzimático obtido foi utilizado para a quantificação dos fármacos por CLAE.



**Figura 3:** Meio de cultivo inoculado com fungo e incubado em agitador orbital.

#### **4.2.4 Avaliação do crescimento fúngico**

O crescimento dos fungos em todos os ensaios foi acompanhado por meio da estimativa visual do desenvolvimento micelial, sendo a seguinte escala utilizada para demonstrar tal crescimento: bom crescimento (+++); crescimento moderado (++); baixo crescimento (+); ausência de crescimento (-) (DURRANT *et al.*, 1995).

#### **4.2.5 Ensaios de biodegradação dos fármacos**

Os ensaios de biodegradação foram realizados para cada fármaco e cada fungo selecionado individualmente, de acordo com os resultados obtidos na etapa

de seleção (item 4.2.3). Esses ensaios tiveram como objetivo otimizar o tempo de incubação e possibilitar uma maior porcentagem de degradação dos fármacos. A condição experimental relativa à presença ou ausência de glicose, que forneceu melhores resultados na etapa anterior, para cada combinação fármaco-fungo, foi utilizado nessa etapa.

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 35 mL de meio mineral. Alíquotas das soluções estoque dos fármacos foram adicionadas aos frascos visando à obtenção das concentrações desejadas. Uma alíquota de 5 mL de meio de cultura foi retirada de cada frasco para confirmação da concentração inicial do fármaco. Os frascos foram inoculados com três fragmentos do ágar-micélio (item 4.2.2) e após a inoculação, foram fechados utilizando-se tampões de algodão. O experimento foi conduzido em triplicata e a incubação ocorreu em agitador orbital, a 90 rpm, a 30°C. Controles abióticos e controles autoclavados foram realizados.

Os tempos de incubação e as concentrações de fármacos utilizadas foram definidos de acordo com os resultados obtidos no item 4.2.3 e serão demonstrados no item 5. Após o período de incubação, os meios de cultura foram filtrados utilizando-se lã de vidro e o caldo enzimático (sobrenadante das culturas, sem a biomassa) congelado (-20°C) em frascos de vidro âmbar para serem utilizados nos ensaios posteriores.

#### **4.2.6 Atividades enzimáticas**

Os caldos enzimáticos, obtidos no item 4.2.5, foram utilizados para a realização dos ensaios enzimáticos descritos a seguir. Esses ensaios foram conduzidos para verificar a possível presença das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, por meio da quantificação de suas atividades. Essa quantificação foi realizada por meio de espectrofotometria UV/VIS (Shimadzu UV-1240, Kyoto, Japão).

Os ensaios foram realizados em triplicata com os caldos enzimáticos previamente descongelados à temperatura ambiente. O espectrofotômetro foi calibrado (zerado) utilizando-se água destilada como branco. Para todas as enzimas foi utilizado como controle negativo o caldo enzimático fervido por 30 minutos, para inativar as prováveis enzimas presentes. Esse controle teve como objetivo eliminar possíveis interferências de outros compostos presentes no caldo, que não as enzimas, nos valores de absorvância.

Dessa forma, a variação de absorvância do controle negativo ( $\Delta\text{Abs}_{\text{CN}}$ ) foi subtraída da variação de absorvância das enzimas ativas ( $\Delta\text{Abs}_{\text{EA}}$ ) e o valor final ( $\Delta\text{Abs}$ ) utilizado para calcular a atividade enzimática. Resumindo:

$$\Delta\text{Abs}_{\text{CN}} = \text{Abs final do caldo fervido} - \text{Abs inicial do caldo fervido}$$

$$\Delta\text{Abs}_{\text{EA}} = \text{Abs final das enzimas ativas} - \text{Abs inicial das enzimas ativas}$$

$$\Delta\text{Abs} = \Delta\text{Abs}_{\text{EA}} - \Delta\text{Abs}_{\text{CN}}$$

\* Absorvância inicial: absorvância detectada antes da incubação da mistura de reação;  
absorvância final: absorvância detectada após a incubação da mistura de reação.

A atividade enzimática foi expressa em  $\text{UL}^{-1}$  (unidades de enzima/Litro) obtidas através da equação:

$$\text{U/L} = \frac{\Delta\text{Abs} \times 10^6}{\epsilon \times R \times T}$$

Onde:

$\Delta\text{Abs}$  = variação da absorvância

$\epsilon$  = Coeficiente de extinção molar ( $\text{L} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

R = Volume de caldo enzimático (L)

T = Tempo de reação (min)

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto e por litro da solução de enzima ( $\mu\text{mol}$  produto/min. x Litro).

### **Lacase**

A atividade da lacase (E.C. 1.10.3.2) foi determinada conforme SZKLARZ e colaboradores, 1989 (modificado), utilizando-se a siringaldazina como substrato. A mistura de reação foi constituída por 0,6 mL do sobrenadante das amostras; 0,2 mL de tampão citrato-fosfato (0,05 M - pH 5,0); 0,1 mL de água destilada e 0,1 mL de siringaldazina 0,1% em etanol. A mistura de reação foi incubada por 10 minutos e a oxidação da siringaldazina até a sua forma quinona foi determinada por meio da leitura da absorbância a 525 nm.

### **Lignina Peroxidase (LiP)**

A atividade da LiP (E.C. 1.11.1.14) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico (TIEN & KIRK, 1984). A mistura de reação foi constituída por 0,6 mL do sobrenadante das amostras; 0,2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2,0 mM) e 0,2 mL de álcool veratrílico (2,0 mM) em tampão tartarato de sódio (0,4 M - pH 3). A mistura de reação foi incubada por 10 minutos e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 310 nm.

### **Manganês Peroxidase (MnP)**

A atividade de MnP (E.C. 1.11.1.13) foi determinada pela oxidação do vermelho de fenol em presença de manganês e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (KUWAHARA *et al.*, 1984). A mistura de reação foi constituída por 0,5 mL do sobrenadante das amostras; 0,1 mL de lactato de sódio 0,25 M; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,05 mL de  $\text{MnSO}_4$  2,0 mM; 0,05 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,0 mM preparado em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura de reação foi incubada por 5 minutos, sendo interrompida por meio da adição de 0,04 mL de

NaOH 2N. A oxidação do vermelho de fenol foi determinada por meio da leitura da absorvância a 610 nm.

#### **4.2.7 Degradação dos fármacos utilizando o caldo enzimático**

Esses ensaios foram realizados com os caldos enzimáticos (item 4.2.5) visando avaliar se as enzimas presentes nesses caldos são capazes de degradar os fármacos em estudo por si só, ou seja, na ausência do micélio fúngico.

Uma nova alíquota da solução estoque dos fármacos foi adicionada a 15 mL dos caldos enzimáticos, previamente descongelados em temperatura ambiente, visando à obtenção das concentrações iniciais utilizadas nos ensaios de biodegradação anteriores. Foram utilizados os caldos enzimáticos do menor tempo de incubação onde houve maior percentual de degradação do fármaco. Nenhum cofator enzimático ou solução tamponante foi adicionado aos caldos enzimáticos. Uma alíquota inicial da mistura de reação (caldo enzimático mais fármaco) foi então retirada para a quantificação da concentração inicial dos fármacos, seguido de incubação em agitação (120 rpm) e à 30°C. Alíquotas da mistura foram retiradas após 24 horas para a quantificação dos fármacos. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.2.8 Ensaio de inibição do Citocromo P450**

O envolvimento do Citocromo P450 na biodegradação dos fármacos em estudo foi avaliado por meio da adição de piperonil butóxido (PB), substância inibidora deste complexo enzimático, ao meio de cultura. Uma solução de PB 1,5 M foi preparada em etanol e uma alíquota foi adicionada ao meio de cultura para a obtenção de uma concentração final de 5 mM (MARCO-URREA *et al.*, 2009).

Os frascos Erlenmeyer contendo 35 mL de meio mineral, com cada fármaco e uma alíquota da solução de PB foram inoculados com 3 fragmentos do ágar-micélio (item 4.2.2) e incubados em agitador orbital, a 90 rpm e a 30°C. Controles

autoclavados e controles livres do inibidor foram realizados. O experimento foi conduzido em triplicata para cada grupo.

A concentração de cada fármaco, a linhagem fúngica utilizada e o tempo de incubação foram determinados de acordo com o resultado do item 4.2.3 e serão apresentados no item 5.



## 4.3 Bactérias

### 4.3.1 Micro-organismos e manutenção das linhagens

*Bacillus megaterium*, *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp. e *Staphylococcus arlettae*, espécies já utilizadas em outros estudos de biodegradação de compostos xenobióticos, foram utilizadas nesse trabalho. Esses micro-organismos foram obtidos da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (FEA/UNICAMP).

As culturas bacterianas foram mantidas em tubos de ensaio inclinado contendo meio Ágar Nutriente (Oxoid®). Repiques periódicos foram realizados para a manutenção das células em atividade.

### 4.3.2 Preparo do inóculo

Alçadas das linhagens bacterianas crescidas em placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente foram transferidas para frasco Erlenmeyer contendo meio mineral (Tabela 7) suplementado com extrato de levedura 1% (p/v). Após 24 horas de incubação, a 130 rpm e 30°C, as células foram lavadas (centrifugação do meio de cultivo, sendo o sobrenadante descartado e as células decantadas ressuspensas em solução salina 0,85%). Um novo meio mineral, contendo glicose 5 g.L<sup>-1</sup> e uma baixa concentração dos fármacos (Tabela 8), foi inoculado com uma alíquota das células lavadas visando a obtenção de uma densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) igual a 0,1. A adição de uma pequena alíquota dos fármacos no meio de preparo dos inóculos foi feita com o intuito de adaptar as células a essas drogas. Após 24 horas de incubação, as células foram lavadas 3 vezes e então utilizadas como inóculo, sendo adicionadas aos frascos em DO<sub>600</sub> igual a 0,1.

**Tabela 7:** Composição do Meio Mineral (PELLIZARI, 1995).

Componente	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2
NaCl	0,1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02

**Tabela 8:** Concentração dos fármacos no meio de cultivo de adaptação.

Fármaco	CBZ	EE2	IBU
Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	1,5	1	2

#### 4.3.3 Seleção das bactérias com potencial de degradação dos fármacos

As linhagens bacterianas foram avaliadas quanto à capacidade de degradar os fármacos em estudo. Nesses experimentos foi avaliada a capacidade destes micro-organismos em degradar os fármacos, tanto na presença quanto na ausência de glicose no meio de cultivo. Esses experimentos foram realizados para cada fármaco e cada micro-organismo, individualmente.

Os fármacos foram adicionados ao meio de cultivo, nas concentrações descritas na Tabela 6, sendo que nos ensaios com a presença de glicose no meio de cultivo, essa foi adicionada numa concentração final de 5 g.L<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque a 30% (p/v).

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 35 mL de meio de cultura. Alíquotas das soluções estoque dos fármacos foram adicionadas aos frascos nas concentrações de acordo com a Tabela 6. Os frascos foram inoculados como descrito no item 4.3.2 e, posteriormente, fechados

utilizando-se tampões de algodão. O experimento foi conduzido em duplicata e a incubação ocorreu em agitador orbital, a 130 rpm e a 30°C. Após 7 dias, os frascos foram removidos para a quantificação da degradação dos compostos. Controles abióticos e controles autoclavados foram realizados.

#### **4.3.4 Ensaios de biodegradação dos fármacos**

Os ensaios de biodegradação foram realizados para cada fármaco e para cada bactéria selecionados, individualmente, de acordo com os resultados obtidos na etapa de seleção anterior (item 4.3.3). Esses ensaios tiveram como objetivo otimizar o tempo de incubação e possibilitar uma maior porcentagem de degradação dos fármacos. O processo, catabolismo ou cometabolismo, que forneceu melhores resultados na etapa anterior, para cada combinação fármaco-bactéria, e foi utilizado nessa etapa.

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo 35 mL de meio mineral (Tabela 7). Alíquotas das soluções estoque dos fármacos foram adicionadas aos frascos visando à obtenção das concentrações desejadas. Uma alíquota de 5 mL de meio de cultura foi retirada de cada frasco para confirmação da concentração inicial do fármaco, por CLAE. Os frascos foram inoculados (item 4.3.2) e após a inoculação, foram fechados utilizando-se tampões de algodão. O experimento foi conduzido em triplicata e a incubação ocorreu em agitador orbital, a 90 rpm, a 30°C. Controles abióticos e controles autoclavados foram realizados.

Os tempos de incubação e as concentrações de fármacos utilizadas foram definidos de acordo com os resultados obtidos no item anterior e serão demonstrados no item 5. Após o período de incubação, o meio de cultura foi filtrado utilizando-se lã de vidro e o caldo enzimático congelado em frascos de vidro âmbar até o momento de ser utilizado nos ensaios posteriores.

#### 4.4 Ensaio de Toxicidade aguda com *Vibrio fischeri*

O bioensaio de toxicidade aguda com *V. fischeri* foi utilizado nesse trabalho. Esta metodologia baseia-se na inibição da bioluminescência da bactéria causada pela exposição a um composto tóxico. A luminescência é mensurada por meio do equipamento Microtox M500 Analyzer<sup>®</sup> (Figura 4), o qual possui um fotômetro capaz de medir a quantidade de luz emitida pela bactéria.

Os bioensaios consistiram na exposição de uma alíquota da bactéria em suspensão às amostras, em diferentes diluições durante 15 minutos, nas condições pré-estabelecidas pela Norma Técnica L5.227 (CETESB, 2001). As amostras foram previamente descongeladas e tiveram o pH ajustado para 7,0, como estabelecido pelo método. A luminescência foi mensurada antes e depois da exposição da bactéria a cada diluição das amostras e, a partir da diferença entre as intensidades de luminescência em cada diluição, foi calculada a toxicidade da amostra, por meio de análises estatísticas realizadas com o auxílio do software MicrotoxOmni<sup>®</sup>, versão 4.0. A toxicidade das amostras foi expressa por meio da CE<sub>50</sub> (concentração da amostra que provoca redução de 50% da emissão de luz pela bactéria).

A toxicidade dos meios de cultivo, com e sem os fármacos, e antes e depois dos processos de biodegradação pelos micro-organismos, foram avaliadas.

A concentração de cada fármaco, o micro-organismo utilizado e o tempo de incubação foram determinados de acordo com os resultados dos itens 4.2.3 e 4.3.3 e serão apresentados no item 5.

Os testes de toxicidade para *V. fischeri* foram realizados no Laboratório de Saneamento, FEAGRI/UNICAMP.



**Figura 4:** Fotômetro - Microtox®.

#### **4.5 Correção de perda de água por evaporação**

Ensaio preliminares demonstraram a ocorrência de alteração dos pesos dos Erlenmeyers durante o período de incubação dos mesmos. Essa alteração de peso foi considerada como perda de água por evaporação, como sugerido por GAUTHIER e colaboradores (2010). O não controle da evaporação, que foi de aproximadamente 1% ao dia, poderia gerar valores superestimados de concentração dos fármacos, uma vez que houve redução no volume de meio de cultivo.

Dessa forma, em todos os ensaios, os frascos foram pesados antes de serem incubados e após o período de incubação, em todos os ensaios. A diferença de valor entre as duas pesagens foi corrigida com adição de água destilada aos frascos antes da retirada das alíquotas para quantificação da degradação.

#### **4.6 Análises cromatográficas**

A quantificação da degradação dos fármacos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para cada fármaco, curvas padrões foram feitas utilizando-se a forma pura do composto. A quantificação da CBZ foi realizada em sistema cromatográfico LC-DAD Alliance Waters, composto por bomba Waters 2695, detector de arranjo de diodos (Waters 2996) e coluna L-10 Phenomenex Luna CN (250 x 4,6 mm x 5µm). Como fase móvel foi utilizada

uma mistura de 80% de solução Água/Metanol/Tetrahidrofurano (85:12:3), contendo 0,22 ml de ácido fórmico e 0,5 ml de TEA (trietilamina) e 20% de metanol. A eluição das amostras foi realizada com uma vazão de FM de 1 mL.min<sup>-1</sup> e detecção a 280 nm (USP, 2006).

O EE2 foi quantificado utilizando o mesmo sistema cromatográfico, porém com uma coluna C-18 (150 mm x 3,9 mm x 5 µm). Como fase móvel foi utilizada uma solução de água e acetonitrila (50:50), sendo a eluição das amostras realizada numa vazão da fase móvel de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e a detecção ocorreu a 280 nm (USP, 2006).

O IBU foi quantificado também com o mesmo sistema cromatográfico, sendo utilizada uma coluna C-18 (150 x 3,9 mm x 5 µm), a fase móvel uma solução de ácido cloroacético 0,11M e acetonitrila (40:60) e a vazão da fase móvel igual a 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. A detecção foi realizada a 254 nm. Todas as análises foram realizadas a 30°C (USP, 2006).

Análises preliminares foram realizadas para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos fármacos em estudo. A Tabela 9 exibe os valores determinados.

Todas as análises cromatográficas foram realizadas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

**Tabela 9:** Limites de detecção e quantificação dos fármacos em estudo.

	LD (mg.L <sup>-1</sup> )	LQ (mg.L <sup>-1</sup> )
EE2	0,39	1,31
CBZ	0,15	0,50
IBU	0,15	0,50

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Biodegradação de 17 $\alpha$ -etinilestradiol

A degradação de EE2 em meio de cultivo, por fungos ligninolíticos e bactérias, foi avaliada nesse trabalho. Após 7 dias de incubação, todas as linhagens de fungos ligninolíticos avaliadas foram capazes de degradar EE2 até níveis inferiores ao LD da CLAE, tanto na presença quanto na ausência de glicose.

Dessa forma, o processo de biodegradação na ausência de glicose foi escolhido para os ensaios subsequentes, uma vez que essa não foi necessária para a ocorrência da biodegradação e devido à carência de estudos enfocando a degradação de EE2 na ausência de fontes de carbono de fácil acesso. Devido à presença de resquícios de meio PDA no inóculo e à possível armazenagem de outras fontes de carbono no interior das células fúngicas, não é possível afirmar que os fármacos foram utilizados como única fonte de carbono nos experimentos realizados sem a adição de glicose ao meio.

*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm linhagem P1 foi selecionado para esses ensaios envolvendo EE2 por apresentar um melhor crescimento, observado visualmente, na presença deste fármaco (Tabela 10).

**Tabela 10:** Crescimento micelial das linhagens fúngicas na presença de EE2.

	Meio sem glicose	Meio com glicose
P1	++	++
BS	+	+
BNI	+	+

\*Bom crescimento (+++); crescimento moderado (++); baixo crescimento (+); ausência de crescimento (-).

O ensaio de biodegradação, utilizando P1, foi realizado empregando as mesmas condições utilizadas na etapa de seleção na ausência de glicose, porém a incubação ocorreu durante 6 dias com o intuito de se otimizar o tempo necessário para degradação completa do EE2. A avaliação da degradação ocorreu a cada 2 dias durante um período de 6 dias. Nesses ensaios, observou-se certa adsorção do fármaco no micélio e degradação abiótica, de acordo com os resultados dos controles. As porcentagens de degradação observadas nos controles foram descontadas dos valores obtidos nos ensaios inoculados, para a obtenção dos valores reais de biodegradação do fármaco. A Tabela 11 e a Figura 5 apresentam as porcentagens de degradação de EE2 por P1 em meio mineral, sendo os valores demonstrados a média de triplicatas. P1 foi capaz de degradar 94% do EE2 presente no meio de cultivo, após 6 dias de incubação. Além disso, esses resultados indicam que P1 é capaz de degradar todo EE2 biodisponível no meio de cultivo.

CAJTHAML e colaboradores (2009) relataram que os fungos *Pleurotus ostreatus*, *Irpex lacteus* e *Pycnoporus cinnabarinus* foram capazes de degradar 10 mg.L<sup>-1</sup> de EE2 a níveis inferiores ao LD da CLAE, após 3 dias de incubação em meio de cultivo estático. BLÁNQUEZ & GUIEYSSE (2008) relataram valores superiores a 97% de degradação de EE2 10 mg.L<sup>-1</sup> por *Trametes versicolor*, tanto em cultivo contínuo quanto em batelada, após 24 horas de incubação. No entanto, ambos os estudos foram realizados fornecendo uma fonte de carbono de fácil acesso aos fungos, como glicose e maltose. Não há relatos de trabalhos utilizando EE2 sem fontes auxiliares de carbono.

A biodegradação de diversos outros desreguladores endócrinos (DE's) como bisfenol A, nonilfenol, octilfenol, di-n-butilftalato e estrógenos naturais, estão sendo intensamente estudada em todo mundo (SUBRAMANIAN & YADAV, 2009; PAUWELS *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005; YOSHIMOTO *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2000). Diversas espécies de bactérias e fungos ligninolíticos vêm demonstrando capacidade de degradar e eliminar a ação

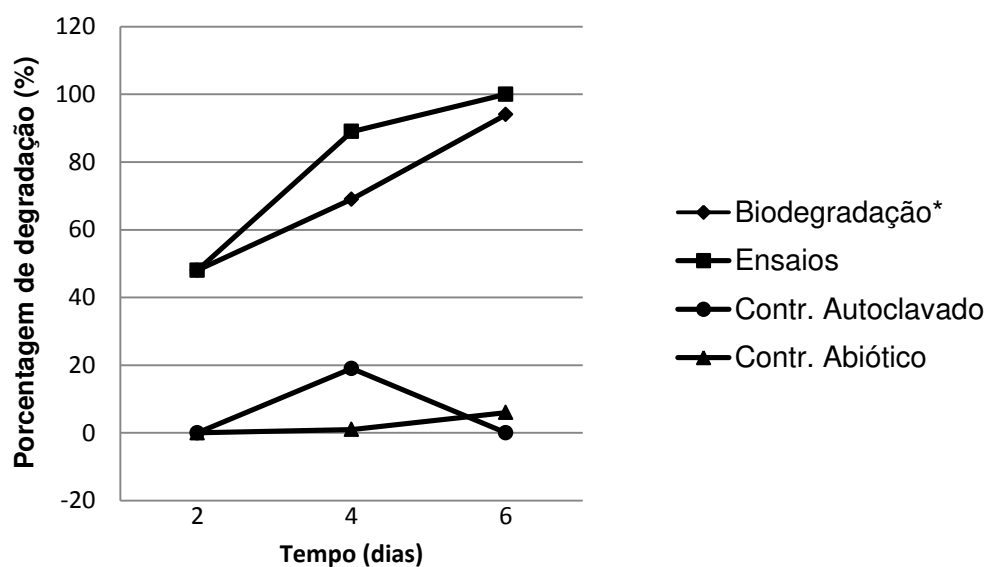


endócrina de tais compostos, sugerindo a possibilidade de tratamentos biológicos de efluentes contaminados com esses compostos.

**Tabela 11:** Porcentagem de degradação (%) de EE2 por P1.

Tempo (dias)	Controle abiótico	Controle autoclavado	Ensaio	Biodegradação*
2	0	0	48	48
4	1	19	89	70
6	6	0	100	94

\*Foi considerada como porcentagem de biodegradação do composto a diferença entre os valores obtidos nos ensaios e os controles abióticos e/ou autoclavados.



**Figura 5:** Porcentagem de degradação (%) de EE2 por P1.

A atividade das enzimas lacase, LiP e MnP produzidas por P1 foi avaliada a cada 2 dias durante um período de 6 dias (Tabela 12). A atividade máxima de MnP foi de 5122,11 U.L<sup>-1</sup>, sendo encontrada após 6 dias de incubação. Lacase teve como atividade máxima 307,69 U.L<sup>-1</sup>, valor encontrado após 4 dias de incubação. Não houve detecção de atividade da enzima LiP em nenhum dos

tempos analisados. Trabalhos recentes demonstram que essas enzimas podem ser produzidas em altas concentrações. FARACO e colaboradores (2009) obtiveram valores superiores a  $1,3 \times 10^5$  U.L<sup>-1</sup> de lacase, utilizando *P. ostreatus*, após um período de 8-11 dias. LEE e colaboradores (2005) relataram que os basidiomicetos *Stereum hirsutum* e *Heterobasidium insulare* produziram lacase em níveis próximos a 1000 U.L<sup>-1</sup> e MnP próximo a 500 U.L<sup>-1</sup>, após 7 dias de incubação. ROMERO e colaboradores (2006) relataram que *Trametes versicolor* é capaz de produzir lacase até níveis superiores de  $2,5 \times 10^3$  U.L<sup>-1</sup> de atividade enzimática. BONUGLI-SANTOS e colaboradores (2011), utilizando linhagens de basidiomicetos marinhos, reportaram atividade enzimática de lacase próximo a  $5 \times 10^5$  U.L<sup>-1</sup>; MnP  $1,7 \times 10^4$  U.L<sup>-1</sup> e LiP  $7,9 \times 10^3$  U.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 12:** Atividade das enzimas MnP e lacase produzidas por P1.

Tempo (dias)	MnP (U.L <sup>-1</sup> )	Lacase (U.L <sup>-1</sup> )
2	0	97,44
4	3363,23	307,69
6	5112,11	0

\*Valores exibidos como média de triplicatas

Apesar da produção dessas enzimas, não foi detectada degradação de EE2 nos ensaios utilizando apenas o caldo enzimático. O objetivo deste experimento foi avaliar a atuação das enzimas em conjunto e nas condições em que elas se encontravam previamente no meio de cultivo, na ausência do micélio fúngico. A não adição de cofatores enzimáticos e soluções tamponantes, a possibilidade dessas enzimas estarem ligadas à parede celular das células fúngicas e a possível formação de algum metabólito durante o processo fermentativo capaz de inibir a atividade dessas enzimas são hipóteses que podem explicar esse resultado.

Autores reportam que a lacase é a principal enzima ligninolítica responsável pela degradação de DE's, além de ter produção aumentada quando o fungo é

crescido em agitação. No entanto, nesse trabalho observou-se também elevada produção de MnP por P1 crescido em agitação. SUZUKI e colaboradores (2003) demonstraram que extratos enzimáticos semi-purificados de lacase e MnP produzidas por *Phanerochaete chrysosporium* e *Trametes versicolor* são capazes de degradar totalmente o EE2. BLÁNQUEZ & GUIEYSSE (2008) reportaram que a lacase produzida por *Trametes versicolor* provavelmente foi a responsável pela degradação de EE2 em seus ensaios. CAJTHAML e colaboradores (2009) observaram que a lacase foi a enzima mais produzida por *Pleurotus ostreatus*, dentre avaliadas, na presença de EE2. Em sua revisão, CABANA e colaboradores (2007) citam diversos trabalhos que demonstram a capacidade das enzimas ligninolíticas em degradar diversos DE's, evidenciando que a utilização dessas enzimas pode ser uma promissora forma de tratamentos de diferentes matrizes contaminadas com tais compostos.

Diversos grupos de pesquisa vêm estudando a possibilidade da purificação e posterior imobilização dessas enzimas em diferentes matrizes inertes, visando o tratamento de efluentes (ASGHER, *et al.*, 2008; CABANA *et al.*, 2007). A utilização das enzimas imobilizadas possui vantagens como uma maior estabilidade e vida útil da enzima, além da não necessidade da manutenção de condições ótimas para a sobrevivência dos fungos. Alguns estudos vêm propondo ainda a imobilização do próprio micélio fúngico para com o mesmo objetivo de tratamento de efluentes (COUTO, 2009; MOHAMMADI & NASERNEJAD, 2009).

O Citocromo P450 é uma superfamília de enzimas intracelulares encontrado em todos os seres vivos. Uma das funções dessas enzimas é metabolizar compostos tóxicos à célula, dessa forma elas podem estar relacionadas com a degradação de xenobióticos, tais como os fármacos. Nesse trabalho, tentou-se avaliar se essas enzimas atuam no processo de degradação de EE2 por P1, por meio da adição de piperonil butóxido (PB), composto que inibe a síntese deste complexo enzimático sem causar quaisquer outros danos à célula. No entanto, não foi possível avaliar a participação do Citocromo P450 no processo de

degradação de EE2. Após o período de incubação não foi detectada a presença de EE2 no controle abiótico, o que sugere a existência de algum tipo de interação entre o PB e o EE2. Não há relatos na literatura de algum ensaio semelhante a esse proposto. A utilização de outras substâncias inibidoras, como o 1-aminobenzotriazol, ou outras metodologias para a quantificação dessas enzimas podem ser formas alternativas de se avaliar essa hipótese. SUBRAMANIAN & YADAV (2009) relataram que PB inibiu 75% da degradação de nonilfenol, um desregulador endócrino, em ensaios utilizando *Phanerochaete chrysosporium* em meio de cultivo com limitação de fonte de nitrogênio.

A toxicidade de EE2 e seus possíveis metabólitos após o processo de biodegradação para *Vibrio fischeri* foi avaliada nesse trabalho. Esses ensaios tiveram como principal objetivo comparar a toxicidade das amostras antes e depois do processo de biodegradação, uma vez que diversos trabalhos vêm relatando que os metabólitos de diversos compostos podem ser mais tóxicos que o próprio composto em sua estrutura química original. O meio mineral foi utilizado como controle e as condições do processo de biodegradação foram as mesmas dos ensaios de biodegradação.

Como demonstrado na Tabela 13, o meio de cultivo mais EE2, não inoculado, apresentou uma  $CE_{50}$  igual a 76%, o que significa que seriam necessários 76% da amostra (os outros 24% seriam a solução diluente, inerte) para causar a redução de 50% da emissão de luz pela suspensão bacteriana. Já os metabólitos (meio de cultivo mais EE2, após 6 dias de incubação) não apresentaram toxicidade alguma, uma vez que a  $CE_{50}$  foi superior a 100%, significando que para que esta amostra causasse alguma toxicidade ela deveria ser concentrada, e não diluída. Dessa forma, o processo de biodegradação por P1 foi capaz de eliminar a toxicidade de EE2 para o organismo-teste em questão.

**Tabela 13:** Valores de CE<sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de EE2 por P1.

Meio de cultivo sem fármaco	Meio de cultivo mais EE2 (não inoculado)	Meio de cultivo mais EE2 (inoculado após 6 dias de incubação)
>100%	76%	>100%

Como o EE2 atua principalmente sobre o sistema endócrino, testes ecotoxicológicos em organismos que possuem tal sistema seria o mais indicado. No entanto, como já discutido nesse trabalho, ensaios toxicológicos em organismos superiores são de difícil execução, devido principalmente às questões legislatórias e do tempo necessário para a realização destes ensaios. Além disso, diversos órgãos brasileiros como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA), a Companhia Estadual de Tecnologia Ambiental (CETESB-SP) e outros órgãos estaduais de proteção ambiental recomendam a utilização da avaliação de toxicidade por meio de testes com organismos-padronizados internacionalmente, dentre eles *V. fischeri*, como um forte instrumento para a avaliação do potencial de impacto de substâncias químicas ou efluentes lançados no ambiente (MAGALHÃES & FILHO, 2008). Portanto, apesar dos testes em organismos que não apresentam sistema endócrino avaliarem apenas o efeito agudo da amostra em análise, esses testes são considerados como indicadores de toxicidade.

O desenvolvimento de organismos unicelulares geneticamente modificados pode ser uma solução para tal problema. ROUTLEDGE & SUMPTER (1996) e NISHIKAWA e colaboradores (1999) desenvolveram em seus trabalhos leveduras geneticamente modificadas que possuem plasmídeos contendo genes que respondem à presença de estrógenos no meio. CAJTHAML e colaboradores (2009) utilizando uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada sensível ao EE2 relataram redução superior a 85% da atividade estrogênica deste hormônio, após processo de degradação utilizando fungos ligninolíticos. SUZUKI e colaboradores (2003), também utilizando leveduras geneticamente modificadas, reportaram a remoção total da atividade estrogênica

de EE2 após tratamento com extratos semi-purificados das enzimas MnP e lacase associada ao mediador 1-hidroxibenzotriazol. ZAVA e colaboradores (1997) utilizaram culturas de células mamárias cancerígenas para avaliar a atividade estrogênica de diversos compostos. Dessa forma, esses ensaios podem ser considerados alternativos aos testes ecotoxicológicos quando se trata de DE's.

Nenhuma das quatro linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho foi capaz de degradar significativamente EE2 nas condições avaliadas. No entanto, pesquisadores vêm relatando que algumas bactérias podem degradar tal hormônio. O'GRADY e colaboradores (2009) relataram que *Rhodococcus erythropolis* foi capaz de degradar 47% de EE2 1,4 mg.L<sup>-1</sup>, após 13 horas de incubação em meio de cultivo contendo ácido adípico como fonte principal de carbono. Já *Rhodococcus equi* foi capaz de degradar 39% de EE2 1,4 mg.L<sup>-1</sup>, na presença de glicose como principal fonte de carbono, após 65 horas de incubação. YOSHIMOTO e colaboradores (2004), trabalhando com uma linhagem de *Rhodococcus zopfii* isolada de amostra de lodo ativado de ETE do Japão, relataram que esse micro-organismo foi capaz de degradar EE2 100 mg.L<sup>-1</sup> a níveis não detectáveis, após um período de incubação de 24 horas, sendo o hormônio a única fonte de carbono. PAUWELS e colaboradores (2008) relataram que seis linhagens de *Proteobacteria*, isoladas de amostras de compostagem, foram capazes de degradar EE2, tanto na concentração inicial de 4 mg.L<sup>-1</sup> quanto 600 ng.L<sup>-1</sup>, com 17β-estradiol (estrógeno natural) como principal fonte de carbono em ambos os casos.

Esses trabalhos demonstram que a biodegradação de hormônios por fungos ligninolíticos e bactérias é possível, tanto como única fonte de carbono como na presença de outras fontes mais acessíveis.

## 5.2 Biodegradação de Carbamazepina

A degradação de CBZ por fungos ligninolíticos e bactérias foi avaliada nesse trabalho. A CBZ é um fármaco bastante recalcitrante e vem sendo encontrada frequentemente em matrizes ambientais, tornando-se um fármaco modelo em estudos de biodegradação (GAUTHIER *et al.*, 2010; HATA *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; MARCO-URREA *et al.*, 2009; ZHANG & GEIBEN, 2009).

Os fungos ligninolíticos foram capazes de degradar CBZ e as Tabelas 14, 15 e 16 apresentam os resultados da degradação pelas três linhagens fúngicas avaliadas nesse trabalho (média de duplicatas). *Trametes* sp. linhagem BNI apresentou maior capacidade de degradação de CBZ (25%) (Tabela 15). Tal degradação ocorreu nos ensaios em presença de glicose e após 14 dias de incubação. A degradação abiótica e a adsorção da CBZ no micélio foram detectadas, porém em quantidade relativamente baixa. De acordo com esses resultados, o experimento com BNI na presença de glicose foi selecionado para os subsequentes ensaios de degradação de CBZ. A necessidade de uma fonte de carbono mais disponível e um longo período de incubação foram requeridos para que a oxidação do composto ocorresse, comprovando assim sua elevada recalcitrância.

**Tabela 14:** Porcentagem de degradação (%) de CBZ por P1.

Glicose (5 g.L <sup>-1</sup> )	Ensaio	7 dias	14 dias
Ausente	Controle abiótico	-	1
	Controle autoclavado	-	0
	Ensaio de degradação	2	5
Presente	Controle abiótico	-	3
	Controle autoclavado	-	0
	Ensaio de degradação	1	4

**Tabela 15:** Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI.

Glicose (5 g.L <sup>-1</sup> )	Ensaio	7 dias	14 dias
Ausente	Controle abiótico	-	3
	Controle autoclavado	-	1
	Ensaio de degradação	0	4
Presente	Controle abiótico	-	3
	Controle autoclavado	-	0
	Ensaio de degradação	19	28

**Tabela 16:** Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BS.

Glicose (5 g.L <sup>-1</sup> )	Ensaio	7 dias	14 dias
Ausente	Controle abiótico	-	0
	Controle autoclavado	-	0
	Ensaio de degradação	0	1
Presente	Controle abiótico	-	1
	Controle autoclavado	-	2
	Ensaio de degradação	0	8

O ensaio de biodegradação foi realizado utilizando BNI, empregando-se as mesmas condições da etapa de seleção em presença de glicose; porém, a incubação ocorreu durante 28 dias com o intuito de se conseguir maiores porcentagens de biodegradação. Nesses ensaios, observou-se certa adsorção do fármaco no micélio, de acordo com os resultados dos controles autoclavados. Tal porcentagem de adsorção foi descontada dos valores encontrados nos processos de degradação para a obtenção dos valores reais de biodegradação do fármaco. Após os 28 dias de incubação, houve 42% de biodegradação do fármaco (Tabela 17). É importante ressaltar que nesse projeto não houve ensaios visando a otimização do processo de biodegradação, como a escolha de uma melhor fonte



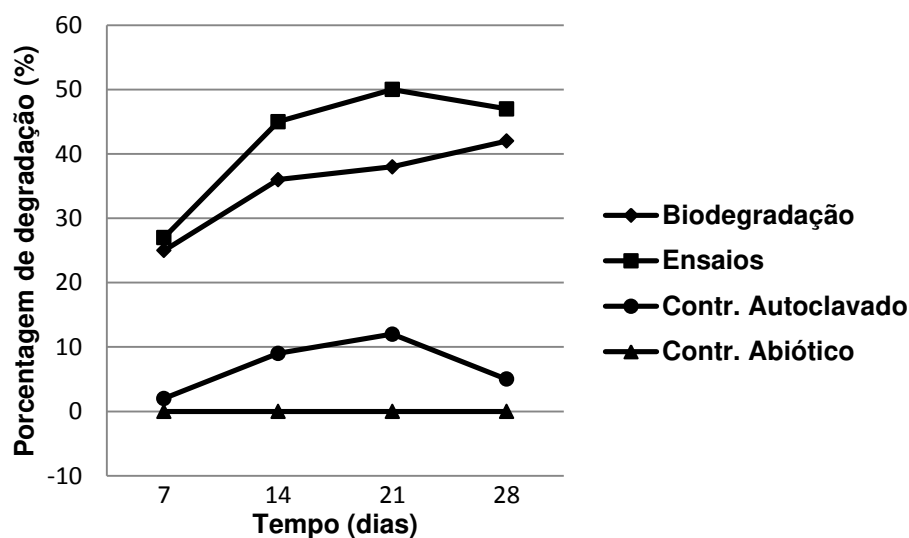
de carbono, temperatura, pH, agitação, dentre outros parâmetros que possam influenciar nesse processo; sendo essa otimização um objetivo futuro.

A Tabela 17 e a Figura 6 apresentam as porcentagens de degradação de CBZ pela linhagem BNI em meio mineral com glicose, sendo os valores apresentados a média de triplicatas. A avaliação da degradação ocorreu a cada 7 dias durante um período de 28 dias.

**Tabela 17:** Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI.

Tempo (dias)	Controle abiótico	Controle autoclavado	Ensaio	Biodegradação*
7	0	2	27	25
14	0	9	45	36
21	0	12	50	38
28	0	5	47	42

\*Foi considerada como porcentagem de biodegradação do composto a diferença entre os valores obtidos nos ensaios e os controles autoclavados.



**Figura 6:** Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI.

MARCO-URREA e colaboradores (2009), utilizando *Trametes versicolor*, obtiveram 58% de degradação de CBZ 10 mg.L<sup>-1</sup> após 7 dias de incubação em meio de cultivo; *Ganoderma lucidum* foi capaz de degradar 46% sob as mesmas condições. Já GAUTHIER e colaboradores (2010), utilizando *Aspergillus niger*, obtiveram 9% de degradação CBZ 11,4 mg.L<sup>-1</sup> após 10 dias de incubação. Em ambos os trabalhos, os autores detectaram certa porcentagem de adsorção dos fármacos no micélio fúngico, por meio do controle autoclavado, corroborando com os resultados obtidos nesse projeto. Nesses trabalhos também foi utilizado glicose como principal fonte de carbono no meio de cultivo. Não há relatos na literatura de qualquer micro-organismo que consiga crescer em meio de cultivo contendo CBZ na ausência de uma fonte auxiliar de carbono.

A atividade das enzimas lacase, LiP e MnP foi avaliada para a linhagem BNI a cada 7 dias durante um período de 28 dias (Tabela 18). A atividade máxima de lacase foi de 1740,17 U.L<sup>-1</sup>, sendo encontrada após 21 dias de incubação. LiP teve como atividade máxima 663,08 U.L<sup>-1</sup>, valor encontrado após 14 dias de incubação. Não houve detecção de atividade da enzima MnP em nenhum dos tempos analisados.

**Tabela 18:** Atividade das enzimas lacase e LiP produzidas por BNI.

Tempo (dias)	Lacase (U.L <sup>-1</sup> )	LiP (U.L <sup>-1</sup> )
7	0	0
14	132,05	663,08
21	1740,17	295,70
28	1511,97	0

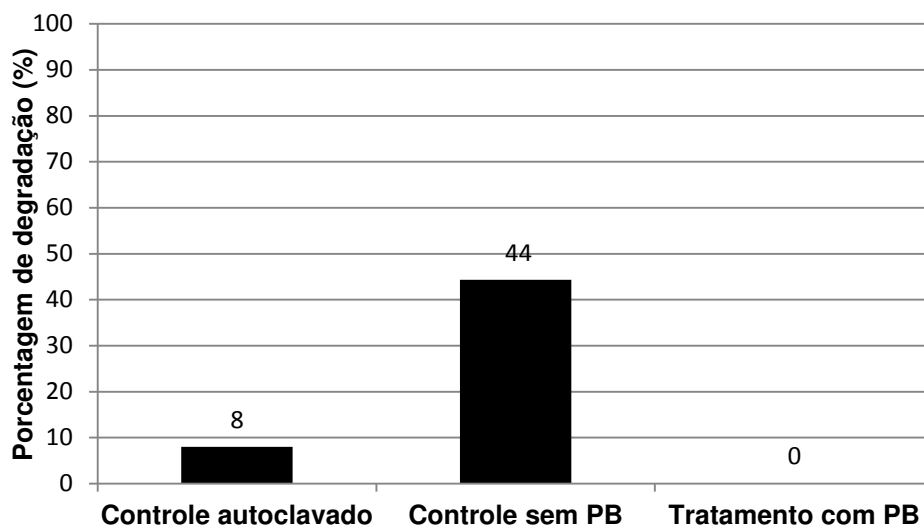
\*Valores exibidos como média de triplicatas

A capacidade das enzimas extracelulares produzidas por BNI em degradar CBZ foi avaliada nesse trabalho. Os sobrenadantes produzidos no item 4.2.5, após 21 dias de incubação, foram expostos a uma nova dose do fármaco e

incubados durante 24 horas, sem a adição de nenhum cofator enzimático ou soluções tamponantes. Apesar da constatação da presença de enzimas ligninolíticas nos sobrenadantes de acordo com os resultados apresentado no item anterior, não houve degradação de CBZ nesse experimento. A grande maioria dos pesquisadores vem estudando a atuação das enzimas ligninolíticas individualmente na degradação de fármacos (HATA *et al.*, 2010; MARCO-URREA *et al.*, 2009; ZHANG & GEIBEN; 2009), sem dar devida atenção a uma possível ação conjunta das enzimas. No entanto, os resultados deste experimento reforçam a importância do ajuste de condições ótimas para que as enzimas possam agir sobre os fármacos. HATA e colaboradores (2010), utilizando extratos semi-purificados de lacase produzida por *Trametes versicolor*, obtiveram 60% de degradação de CBZ após 48 horas de reação. Esse ensaio foi realizado com uma concentração inicial de CBZ igual a 4,7 mg.L<sup>-1</sup> e na presença do mediador 1-hidroxibenzotriazol. Não foi detectada a degradação na ausência de tal mediador. O extrato semi-purificado de MnP, produzido pelo mesmo fungo, foi capaz de degradar 14% da CBZ na mesma concentração inicial e após 24 horas de reação, sem a presença de qualquer mediador. ZHANG & GEIBEN (2009), utilizando extratos semi-purificados de LiP produzida por *Phanerochaete chrysosporium*, obtiveram valores de degradação de CBZ inferiores a 10% após 2 horas de reação, a partir de uma concentração inicial do fármaco igual 5 mg.L<sup>-1</sup>. MARCO-URREA e colaboradores (2009) não detectaram a degradação de CBZ utilizando extratos semi-purificados de lacase e MnP.

A atuação do Citocromo P450 no processo de degradação de CBZ pelo fungo BNI foi investigada. Nesses ensaios, PB foi adicionado ao meio de cultivo, numa concentração de 5 mM, com o intuito de inibir a síntese das enzimas do Citocromo P450. Esse experimento foi realizado em triplicata nas mesmas condições dos experimentos de biodegradação, durante 14 dias. Controles autoclavados e sem PB foram realizados. Como demonstrado na Figura 7, nos tratamentos contendo PB não houve degradação de CBZ, ao contrário do que ocorreu nos controles livres de PB, o que indica a participação deste complexo

enzimático na oxidação da CBZ. MARCO-URREA e colaboradores (2009), utilizando *Trametes versicolor*, observaram uma inibição de aproximadamente 50% da degradação de CBZ quando PB foi adicionado ao meio de cultivo.



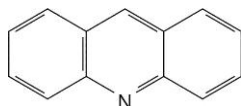
**Figura 7:** Porcentagem de degradação (%) de CBZ por BNI na presença de PB.

Da mesma forma que para EE2, a toxicidade da CBZ e seus possíveis metabólitos após o processo de biodegradação para *V. fischeri* foi avaliada nesse trabalho. As condições do processo de biodegradação foram as mesmas utilizadas nos ensaios de cinética de biodegradação. Nesse ensaio, não foi detectada toxicidade em nenhuma amostra (Tabela 19). Esses resultados indicam que os metabólitos gerados na degradação não apresentam toxicidade para esse organismo, o que é uma informação muito relevante, pois alguns trabalhos vêm demonstrando que os metabólitos da CBZ, principalmente a acridina (Figura 8), apresentam elevada toxicidade (LI *et al.*, 2011; VOGNA *et al.*, 2004).

**Tabela 19:** Valores de CE<sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de CBZ por BNI.

MM sem fármaco	MM com CBZ não inoculado	MM com CBZ inoculado (após 14 dias de incubação)
>100%	>100%	>100%

A utilização de micro-organismos como indicador de ecotoxicidade também não é o ideal para CBZ. Como foi dito anteriormente, a CBZ atua no sistema nervoso e assim não teria efeito sobre bactérias, sendo testes em organismos superiores o mais indicado. No entanto, diversos trabalhos vêm detectando toxicidade da CBZ a organismos que não possuem sistema nervoso (SANTOS *et al.*, 2010; FENT, 2006; FERRARI *et al.*, 2003), o que corrobora com a questão da ecotoxicidade deste composto e a necessidade de mais estudos sobre essa droga.



**Figura 8:** Estrutura química da acridina (metabólito da degradação de CBZ).

Nenhuma das quatro linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho foi capaz de degradar significativamente CBZ nas condições avaliadas. Há poucos estudos relatando a degradação de CBZ por bactérias. GAUTHIER e colaboradores (2010) relataram que *Rhodococcus rhodochrous* foi capaz de degradar 15% de CBZ 9,5 mg.L<sup>-1</sup>, após 28 dias de incubação em meio de cultivo contendo glicose como fonte principal de carbono, mostrando também a recalcitrância deste fármaco.

### 5.3 Biodegradação de Ibuprofeno

A degradação de IBU em meio de cultivo, por fungos ligninolíticos e bactérias, foi avaliada nesse trabalho. Após 7 dias de incubação, todas as linhagens de fungos ligninolíticos avaliadas foram capazes de degradar IBU até níveis inferiores ao LD da CLAE, tanto na presença quanto na ausência de glicose.

Dessa forma, o processo de biodegradação na ausência de glicose foi escolhido para os ensaios subsequentes, uma vez que essa não foi necessária para a ocorrência da biodegradação e devido aos poucos trabalhos enfocando a degradação de IBU na ausência de fontes de carbono mais acessíveis. *Trametes* sp. linhagem BNI foi selecionado para esses ensaios envolvendo IBU por apresentar um melhor crescimento, observado visualmente, na presença deste fármaco (Tabela 20).

**Tabela 20:** Crescimento micelial das linhagens fúngicas na presença de IBU.

	Meio sem glicose	Meio com glicose
P1	+	+
BS	+	+
BNI	++	++

\*Bom crescimento (+++); crescimento moderado (++); baixo crescimento (+); ausência de crescimento (-).

Para o ensaio de biodegradação utilizando BNI foram empregadas as mesmas condições da etapa de seleção na ausência de glicose (item 4.2.3), porém a incubação ocorreu durante 6 dias com o intuito de se otimizar o tempo necessário para degradação completa do IBU. A avaliação da degradação ocorreu a cada 2 dias durante um período de 6 dias. No entanto, já no segundo dia de incubação não foi detectado níveis de IBU superiores ao LD nas amostras (Tabela

21). Descontando-se os valores de degradação abiótica, observou-se 91% de biodegradação de IBU, indicando que todo IBU biodisponível pode ser degradado.

**Tabela 21:** Porcentagem de degradação (%) de IBU por BNI.

Tempo (dias)	Controle abiótico	Controle autoclavado	Ensaio	Biodegradação*
2	9	0	100	91

\*Foi considerada como porcentagem de biodegradação do composto a diferença entre os valores obtidos nos ensaios e os controles autoclavados.

MARCO-URREA e colaboradores (2009) relataram que os fungos ligninolíticos *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus* e *Trametes versicolor* degradaram IBU 10 mg.L<sup>-1</sup> em meio de cultivo contendo glicose, após 7 dias de incubação.

A atividade das enzimas lacase, LiP e MnP produzidas por BNI foi avaliada a cada 2 dias durante um período de 6 dias (Tabela 22). Lacase foi a única enzima que teve atividade detectada, sendo a atividade máxima detectada igual a 478,18 U.L<sup>-1</sup>, no sexto dia de incubação.

**Tabela 22:** Atividade da enzima lacase produzida por BNI.

Tempo (dias)	Lacase (U.L <sup>-1</sup> )
2	235,90
4	131,62
6	487,18

\*Valores exibidos como média de triplicatas

A capacidade das enzimas extracelulares produzidas por BNI em degradar IBU foi avaliada nesse trabalho. Os caldos enzimáticos produzidos no item 4.2.5, após 6 dias de incubação, foram expostos a uma nova dose do fármaco e incubados durante 24 horas, sem a adição de nenhum cofator enzimático ou soluções tamponantes. Apesar da constatação da presença de enzimas

ligninolíticas nos sobrenadantes, de acordo com os resultados apresentados no item anterior, não houve degradação de IBU nesse experimento. MARCO-URREA e colaboradores (2009), utilizando extratos enzimáticos semi-purificados de lacase e MnP também não detectaram degradação de IBU.

A atuação do Citocromo P450 no processo de degradação de IBU pelo fungo BNI foi investigada. Nesses ensaios, PB foi adicionado ao meio de cultivo, numa concentração de 5 mM, com o intuito de inibir a síntese das enzimas do Citocromo P450. Esse experimento foi realizado nas mesmas condições dos ensaios de biodegradação, com período de incubação de 2 dias. Controles autoclavados e sem PB foram realizados. Tanto na presença quanto na ausência de PB, houve total degradação de IBU, o que sugere que o Citocromo P450 não está envolvido na degradação deste fármaco por BNI. Não houve degradação no controle autoclavado e como já mostrado nos ensaios anteriores, IBU não é degradado abioticamente. MARCO-URREA e colaboradores (2009), trabalhando com *Trametes versicolor* e IBU numa concentração inicial 10 mg.L<sup>-1</sup>, obtiveram o mesmo resultado: total degradação do fármaco na presença de PB, corroborando com a hipótese de que as enzimas do Citocromo P450 de fungos ligninolíticos não estão envolvidas na degradação de IBU.

Da mesma forma que para EE2, a toxicidade de IBU e seus possíveis metabólitos após o processo de biodegradação para *Vibrio fischeri* foi avaliada nesse trabalho. As condições do processo de biodegradação foram as mesmas dos ensaios de biodegradação. Como demonstrado na Tabela 23, o IBU apresentou certa toxicidade à bactéria enquanto que os metabólitos não apresentaram toxicidade alguma, uma vez que a CE<sub>50</sub> foi superior a 100%. Dessa forma, o processo de degradação por BNI foi capaz de eliminar a toxicidade de IBU para o organismo-teste em questão.



**Tabela 23:** Valores de CE<sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de IBU por BNI.

Meio Mineral sem fármaco	Meio Mineral mais IBU (não inoculado)	Meio Mineral mais IBU (inoculado após 6 dias de incubação)
>100%	86%	>100%

Em sua revisão, CRANE e colaboradores (2006) citam alguns organismos sensíveis a IBU, como algas, cnidários e moluscos. MARCO-URREA e colaboradores (2009) reportaram maior toxicidade dos metabólitos gerados na degradação de IBU por *Trametes versicolor* que o próprio fármaco em si, utilizando a bactéria *Photobacterium phosphoreum* como organismo-teste.

Os fármacos, de uma maneira geral, são desenvolvidos para atuar especificamente sobre algum sistema do ser humano. No entanto, raros são os estudos que avaliam os efeitos que essas drogas podem gerar nos seres vivos expostos a elas a longo prazo, mesmo sobre aqueles que não possuem tal sistema-alvo da droga.

Dentre as quatro linhagens bacterianas avaliadas, *Staphylococcus arlettae* e *Bacillus megaterium* foram capazes de degradar significativamente IBU na presença de glicose (Tabelas 24 e 25). Nos ensaios de seleção, ambas as linhagens conseguiram degradar aproximadamente 80% do IBU presente no meio de cultivo, após 7 dias de incubação.

Apesar dos valores de degradação utilizando *S. arlettae* terem sido maiores, essa linhagem apresentou difícil cultivo e crescimento em meio sólido. Dessa forma, *B. megaterium* foi selecionado para os ensaios subsequentes envolvendo IBU, por apresentar um melhor crescimento, além de ter proporcionado altas taxas de degradação.

**Tabela 24:** Porcentagem de degradação (%) de IBU por *S. arlettae*.

Processo	Ensaio	7 dias
Catabolismo	Controle abiótico	1
	Controle autoclavado	4
	Ensaio de degradação	19
Cometabolismo	Controle abiótico	1
	Controle autoclavado	13
	Ensaio de degradação	96

**Tabela 25:** Porcentagem de degradação (%) de IBU por *B. megaterium*.

Processo	Ensaio	7 dias
Catabolismo	Controle abiótico	1
	Controle autoclavado	0
	Ensaio de degradação	1
Cometabolismo	Controle abiótico	1
	Controle autoclavado	9
	Ensaio de degradação	90

O ensaio de biodegradação foi realizado utilizando *B. megaterium*. Nesse ensaio foram empregadas as mesmas condições utilizadas na etapa de seleção na presença de glicose (item 4.3.3), utilizando-se uma concentração inicial do fármaco igual a 15 mg.L<sup>-1</sup> e a incubação ocorreu durante 9 dias com o intuito de se otimizar o tempo necessário para degradação completa do IBU. A avaliação da degradação ocorreu a cada 3 dias durante um período de 6 dias. No entanto, já no terceiro dia de incubação não foi detectado níveis de IBU superiores ao LD nas amostras (Tabela 26). Descontando-se os valores de degradação abiótica e adsorção, observou-se 87% de biodegradação de IBU, sendo que esse

experimento indica que todo IBU biodisponível pode ser degradado. Esses resultados, próximos aos obtidos na etapa de seleção, indica que o processo de degradação ocorre já nos primeiros dias de incubação.

**Tabela 26:** Porcentagem de degradação de IBU por *B. megaterium*.

Tempo (dias)	Controle abiótico	Controle autoclavado	Ensaio	Biodegradação*
3	1	12	100	87

\*Foi considerada como porcentagem de biodegradação do composto a diferença entre os valores obtidos nos ensaios e os controles autoclavados.

ROH e colaboradores (2009) relataram que *Nitrosomonas europaea*, bactéria oxidante de amônia, não foi capaz de degradar IBU 0,4 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, quando utilizaram amostras de lodo ativado contendo diversas bactérias heterotróficas, eles observaram a degradação total de IBU 0,5 mg.L<sup>-1</sup> após 2 dias de incubação. MURDOCH & HAY (2005) relataram que uma linhagem de *Sphingomonas* isolada de lodo ativado é capaz de crescer com IBU como única fonte de carbono e energia, numa concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup>. O IBU não é um fármaco muito recalcitrante, porém seu alto consumo vem alertando pesquisadores de todo o mundo.

Da mesma forma que para o fungo BNI, a toxicidade de IBU e seus possíveis metabólitos após o processo de biodegradação para *V. fischeri* foi avaliada. As condições para a obtenção das amostras para esse ensaio foram as mesmas dos ensaios de biodegradação. Como demonstrado na Tabela 27, nesse experimento o IBU apresentou uma CE<sub>50</sub> de 47% ao *V. fischeri*, enquanto que os metabólitos não apresentaram toxicidade alguma. Dessa forma, o processo de degradação por BNI foi capaz de eliminar a toxicidade de IBU para o organismo-teste em questão.

**Tabela 27:** Valores de CE<sub>50</sub> para o ensaio de biodegradação de IBU por *B. megaterium*.

Mio Mineral sem fármaco	Mio Mineral mais IBU (não inoculado)	Mio Mineral mais IBU (inoculado após 3 dias de incubação)
>100%	47%	>100%

## 6 CONCLUSÕES

- As linhagens de fungos ligninolíticos avaliadas nesse trabalho foram capazes de degradar 17 $\alpha$ -etinilestradiol e ibuprofeno na ausência de uma fonte auxiliar de carbono, sendo o processo relativamente rápido e eficiente;
- Essas linhagens foram capazes de degradar carbamazepina, no entanto necessitaram de uma fonte de carbono auxiliar para que a degradação ocorra. Além disso, o processo de biodegradação foi lento e não possibilitou a oxidação completa da quantidade do fármaco utilizada, nas condições avaliadas;
- *Trametes* sp. linhagem BNI apresentou maior potencial de biodegradação de carbamazepina, dentre as avaliadas;
- As enzimas ligninolíticas foram produzidas em quantidades diferentes, variando de acordo com o fármaco utilizado e o tempo de incubação;
- O processo de oxidação da carbamazepina por fungos ligninolíticos ocorreu, provavelmente, por meio de enzimas intracelulares (Citocromo P450);
- O Citocromo P450 provavelmente não está envolvido no processo de biodegradação de ibuprofeno por fungos ligninolíticos;
- Nenhuma das linhagens de bactérias avaliadas foi capaz de degradar 17 $\alpha$ -etinilestradiol e carbamazepina, nas condições avaliadas;
- *Staphylococcus arlettae* e *Bacillus megaterium* foram capazes de degradar de ibuprofeno na presença de glicose no meio de cultivo;
- Os metabólitos dos fármacos não apresentaram toxicidade a *Vibrio fischeri*;
- Os micro-organismos avaliados foram capazes de degradar fármacos encontrados em matrizes ambientais. A utilização destes em sistemas de tratamento (água e esgoto) é plausível, no entanto muitos estudos ainda são necessários.

## 7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimização das condições de biodegradação para carbamazepina, como pH, temperatura, agitação, fonte auxiliar de carbono e concentração dessa, dentre outros parâmetros, utilizando fungos ligninolíticos;
- Identificação dos metabólitos gerados no processo de biodegradação dos fármacos;
- Avaliação da biodegradação dos fármacos utilizando os fungos ou apenas suas enzimas imobilizadas;
- Avaliação da atividade estrogênica dos metabólitos gerados por meio dos processos de biodegradação de desreguladores endócrinos, utilizando ensaios apropriados;
- Realização de testes ecotoxicológicos utilizando-se outros organismos-teste, enfocando principalmente na toxicidade dos metabólitos dos processos de biodegradação;
- Realização ensaios de toxicidade crônica em organismos de maior porte;
- Avaliação da capacidade dos fungos ligninolíticos para degradar outras classes de fármacos e combinações de fármacos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução N°899. 2003.

ASGHER, M., BHATTI, H. N., ASHRAF, M., LEGGE, R. L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771–783, 2008.

BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. **Trends in Analytical Chemistry** 23, n° 10–11, p. 753-761, 2004.

BILA, D. M. Degradação e remoção da atividade estrogênica do Desregulador endócrino 17 $\beta$ -estradiol pelo processo de ozonização. 281p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2005.

BILA, D. M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n° 3, p. 651-666, 2007.

BILA, D. M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n° 4, p. 523-530, 2003.

BLÁNQUEZ, P., GUIEYSSE, B. Continuous biodegradation of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, p. 459–462, 2008.

BONUGLI-SANTOS, R. C., DURRANT, L. R., SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water, Air & Soil Pollution**, 2011. Disponível *online*.

BUSER, H., POIGER, T., MÜLLER, M. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. **Environ. Sci. Technol.**, v. 33, p. 2529-2535, 1999.

CABANA, H., JONES, J. P., AGATHOS, S. N. Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. **Eng. Life Sci.**, v. 7, n° 5, p. 429–456, 2007.

CAJTHAML, T., KRESINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., MÖDER, M. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. **Chemosphere**, v. 75, p. 745–750, 2009.

CARLSSON, C., JOHANSSON, A., ALVAN, G., BERGMAN, K., KÜHLER, T. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk

assessments of selected active pharmaceutical ingredients. **Science of the Total Environment**, v. 364, p. 67–87, 2006.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Ensaio Ecotoxicológico. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/aguas-interiores/variaveis/aguas/variaveis\\_toxicologicas\\_e\\_ecotoxicologicas/ensaios\\_ecotoxicologicos.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/aguas-interiores/variaveis/aguas/variaveis_toxicologicas_e_ecotoxicologicas/ensaios_ecotoxicologicos.pdf)>. Acesso em 20 de janeiro de 2012.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio. 13p. Norma Técnica L5.227, 2001.

CLEMENTE, A. R. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos ligninolíticos e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados. 159p. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2002.

COELHO, A. D. Degradação dos anti-inflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno por ozonização. 214p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

COLEMAN, H. M., ABDULLAH, M. I., EGGINS, B. R., PALMER, F. L. Photocatalytic Degradation of 17 $\beta$ -Oestradiol, Oestriol and 17 $\alpha$ -Ethinylloestradiol in Water Monitored Using Fluorescence Spectroscopy. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 55, pp. 23-30, 2005.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, 1ª ed. 453 p. Campinas: Editora UNICAMP. 2006.

COUTO, S. R. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 227–235, 2009.

CRANE, M., WATTS, C., BOUCARD, T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 23–41, 2006.

DA SILVA, C. G., COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, nº 4, p. 665-676, 2011.

DOLL, T. E., FRIMMEL, F. H. Fate of pharmaceuticals – photodegradation by simulated solar UV-light. **Chemosphere**, v. 52, p. 1757–1769, 2003.

DURRANT, L. R., CANALE-PAROLA, E., LESCHINE, S. B. Facultatively anaerobic cellulolytic fungi from soil. In: COLLINS, H. P., ROBERTSON, G. P., KLUG, M., J. **The Significance and Regulation of Soil Biodiversity**. Kluwer Academic Publishers, p. 161-167, 1995.



ERBE, M. C. L., RAMSDORF, W. A., VICARI, T., CESTARI, M. M. Toxicity evaluation of water samples collected near a hospital waste landfill through bioassays of genotoxicity piscine micronucleus test and comet assay in fish *Astyanax* and ecotoxicity *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 320–328, 2011.

FARACO, V., PEZZELLA, C., MIELE, A., GIARDINA, P., SANNIA, G. Bioremediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. **Biodegradation**, v. 20, p. 209–220, 2009.

FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122-159, 2006.

FENT, K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 477–488, 2001.

FERRARI, B., PAXÉUS, N., LO GIUDICE, R., POLLIO, A., GARRIC, J. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, p. 359–370, 2003.

FERREIRA, M. G. M. Remoção da atividade estrogênica de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 173p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.

FLIPPIN, J. L., HUGGETT, D., FORAN, C. M. Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **Aquatic Toxicology**, v. 81, p. 73–78, 2007.

GARRISON, A. W., POPE, J.D., ALLEN, F.R. Analysis of organic compounds in domestic wastewater, 1976. In: Keith, C.H. (Ed.), Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water. Ann Arbor Science, Michigan, USA, p. 517–566. In: FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122-159, 2006.

GAUTHIER, H., YARGEAU, V., COOPER, D. G. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by cometabolism. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1701-1706, 2010.

GROVER, D. P., ZHOU, J. L., FRICKERS, P. E., READMAN, J. W. Improved removal of estrogenic and pharmaceutical compounds in sewage effluent by full scale granular activated carbon: Impact on receiving river water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, p. 1005–1011, 2011.

HATA, T., SHINTATE, H., KAWAI, S., OKAMURA, H., AND NISHIDA, T. Elimination of carbamazepine by repeated treatment with laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 1175-1178, 2010.

IKEHATA, K., NAGHASHKAR, N. J., EL-DIN, M. G. Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. **Ozone: Science and Engineering**, v. 28, p. 353–414, 2006.

JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHT, G., SUMPTER, J. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. **Environ. Sci. Technol.**, v. 32, p. 2498-2506, 1998.

JOS, A., REPETTO, G., RIOS, J. C., HAZEN, M.J., MOLERO, M. L., DEL PESO, A., SALGUERO, M., FERNÁNDEZ-FREIRE, P., PÉREZ-MARTÍN, J. M., CAMEÁN, A. Ecotoxicological evaluation of carbamazepine using six different model systems with eighteen endpoints. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 525–532, 2003.

JÜRGENS, M. D., HOLTHAUS, K. I. E., JOHNSON, A. C., SMITH, J. J. L., HETHERIDGE, M., WILLIAMS, R. J. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, nº 3, p. 480–488, 2002.

KARAM, J., NICELL J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **J.Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 69, p. 141-153, 1997.

KIM, Y., CHOI, K., JUNG, J., PARK, S., KIM, P., PARK, J. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. **Environment International**, v. 33, p. 370–375, 2007.

KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. T., BARBER, L. B., BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 1202-1211, 2002.

KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A., GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.**, v. 169, p. 247-250, 1984.

LEE, S., KOO, B., CHOI, J., CHOI, D., AN, B., JEUNG, E., CHOI, I. Degradation of bisphenol a by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, nº2, p. 201—207, 2005.

LI, Z., FENET, H., GOMEZ, E., CHIRON, S. Transformation of the antiepileptic drug oxcarbazepine upon different water disinfection processes. **Water Research**, v. 45, p. 1587-1596, 2011.

LIU, M. C., CHEN, C.-M., CHENG, H. Y., CHEN, H. Y., SU, Y. C., HUNG, T. Y. Toxicity of Different Industrial Effluents in Taiwan: A Comparison of the Sensitivity of *Daphnia similis* and Microtox. **Environmental Toxicology**, v. 17, n<sup>o</sup>2, p. 93–97, 2002.

LUNDHOLM, C. E. DDE-induced eggshell thinning in birds: Effects of p,p'-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 118, n<sup>o</sup>2, p. 113–128, 1997.

MAGALHÃES, D. P., FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p. 355-381, 2008.

MAIER, R. M., PEPPER, I. L., CHERBA, C. P. Environmental Microbiology, 2<sup>a</sup> ed. 624p. Elsevier. 2009.

MARCO-URREA, E., PÉREZ-TRUJILLO, M., VICENT, T., CAMINAL, G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 74, p. 765–772, 2009.

MARTINS, A. C. O. Processo oxidativo avançado UV/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na oxidação da carbamazepina: avaliação por ensaios respirométricos e ecotoxicológicos. 101p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2009.

MARTINS, A. F., VASCONCELOS, T. G., HENRIQUES, D. M., FRANK, C. DA S., KÖNIG, A., KÜMMERER, K. Concentration of ciprofloxacin in brazilian hospital effluent and preliminary risk assessment: A case study. **Clean**, v. 36 n<sup>o</sup> 3, p. 264–269, 2008.

MDPE - MASSACHUSETTS DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL PROTECTION. Emerging Contaminants Fact Sheet & Overview. Disponível em: <<http://www.mass.gov/dep/toxics/stypes/emercfs.htm#screen> >. Acesso em 25 de janeiro de 2012.

MELO, I. S., DE AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. 2<sup>a</sup> ed. 647 p. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2008.

MELO, S. A. S., TROVÓ, A. G., BAUTITZ, I. R., NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n<sup>o</sup> 1, p. 188-197, 2009.

METCALFE, C. D., KOENIG, B. G., BENNIE, D. T., SERVOS M., TERNES T. A., HIRSCH, R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 2872-2880, 2003.

MOHAMMADI, A., NASERNEJAD, B. Enzymatic degradation of anthracene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on sugarcane bagasse. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 534–537, 2009.

MURDOCH, R. W., HAY, A. G. Formation of catechols via removal of acid side chains from ibuprofen and related aromatic acids. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n° 10, p. 6121–6125, 2005.

MUSSON, E. S., CAMPO, P., TOLAYMAT, T., SUIDAN, M., TOWNSEND, T. G. Assessment of the anaerobic degradation of six active pharmaceutical ingredients. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2068–2074, 2010.

NISHIKAWA, J., SAITO, K., GOTO, J., DAKEYAMA, F., MATSUO, M., NISHIHARA, T. New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 154, n° 1, p. 76–83, 1999.

NOVARTIS Indústria Farmacêutica Ltda. Tegretol: carbamazepina. Bula de remédio. 2007.

O'GRADY, D., EVANGELISTA, S., YARGEAU, V. Removal of Aqueous 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol by *Rhodococcus* Species. **Environmental Engineering Science**, v. 26, n° 9, p. 1393-1400, 2009.

PAUWELS, B., WILLE, K., NOPPE, H., DE BRABANDER, H., VAN DE WIELE, T., VERSTRAETE, W., BOON, N. 17 $\alpha$ -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 $\beta$ -estradiol and estriol. **Biodegradation**, v. 19, p. 683–693, 2008.

PELLIZARI, V. H. Aspectos moleculares e fenotípicos de bactérias isoladas do ambiente e envolvidas na biodegradação de bifenilos policlorinados-PCBs. 67 p. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 1995.

PFIZER Indústria Farmacêutica Ltda. Advil: ibuprofeno. Bula de remédio. 2009.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20–33, 2001.

POMATI, F., NETTING, A. G., CALAMARI, D., NEILAN, B. A. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. **Aquatic Toxicology**, v. 67, p. 387–396, 2004.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R. J. Rang & Dale Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007.

RICHARDSON, M. L., BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 37, nº1, p. 1–12. 1985. In: FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122-159, 2006.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., MARCO-URREA, E., CAMINAL, G. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2259-2266, 2010.

ROGERS, I. H., BIRTWELL, I. K., KRUZNYSKI, G. M. Organic extractables in municipal wastewater of Vancouver, British Columbia. *Water Pollut. Res. J. Can.*, v. 21, p. 187–204, 1986. In: FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 122-159, 2006.

ROH, H., SUBRAMANYA, N., ZHAO, F. YU, C., SANDT, J., CHU, K. Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria. **Chemosphere**, v. 77, p. 1084–1089, 2009.

ROMERO, S., BLÁNQUEZ, P., CAMINAL, G., FONT, X., SARRÀ, M., GABARRELL, X., VICENT, T. Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, p. 42–47, 2006.

ROUTLEDGE, E. J., SUMPTER, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, nº 3, p. 241–248, 1996.

SANDERSON, H., BRAIN, R. A., JOHNSON, D. J., WILSON, C. J., SOLOMON, K. R. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones. **Toxicology**, v. 203, p. 27–40, 2004.

SANTOS, L. H. M. L. M., ARAÚJO, A. N., FACHINI, A., PENA, A., DELERUEMATOS, C., MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 45–95, 2010.

SERVOS, M. R., BENNIE, D. T., BURNISON, B. K., JURKOVIC, A., MCINNIS, R., NEHELI, T., SCHNELL, A., SETO, P., SMYTH, S. A., TERNES, T. A. Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 336, p. 155– 170, 2005.

SOARES, A., JONASSON, K., TERRAZAS, E., GUIEYSSE, B., MATTIASSON, B. The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 719–725, 2005.

SODRÉ, F. F., LOCATELLI, M. A. F., JARDIM, W. F. Occurrence of emerging contaminants in brazilian drinking waters: A sewage-to-tap issue. **Water Air Soil Pollut.**, v. 206, p. 57–67, 2010.

SODRÉ, F. F., MONTAGNER, C. C., LOCATELLI, M. A. F., JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n° 2, p. 187-196, 2007.

STUMPF, M., U, TERNES, T. A., WILKEN, R.-D., RODRIGUES, S. V., BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.

SUBRAMANIAN, V., YADAV, J. S. Role of P450 Monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n° 17, p. 5570–5580, 2009.

SUZUKI, K., HIRAI, H., MURATA, H., NISHIDA, T. Removal of estrogenic activities of 17 $\beta$ -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. **Water Research**, v. 37, p. 1972–1975, 2003.

SZLARZ, G. D., ANTIBUS, R. K., SINSABAUGH, R. L., LINKINS, A. E. Production of phenol-oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycol.**, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAMBOSI, J. L. Remoção de fármacos e avaliação de seus produtos de degradação através de tecnologias avançadas de tratamento. 141p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2008.

TANAKA, T., YAMADA, K., TONOSAKI, T., KONISHI, T., GOTO, H., TANIGUCHI, M. Enzymatic degradation of alkylphenols, bisphenol A, synthetic estrogen and phthalic ester. **Water Science and Technology**, v. 42, n° 7–8, p. 89–95, 2000.

TEIXEIRA, C. P. A. B., JARDIM, W. F. 2004. Processos oxidativos avançados – Conceitos teóricos. Disponível em: <<http://lqa.iqm.unicamp.br/>>. Acesso em: 24 de janeiro de 2012.

TERNES, T. A., JOSS, A. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: the challenge of micropollutants in urban water management. 453p. IWA Publishing. 2006.

TERNES, T. A., STUMPF, U. 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. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TIEN, M., KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 2280-2284, 1984.

TOXNET. Toxicology data network. Disponível em: < <http://toxnet.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 5 de setembro de 2010.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Report EPA/630/R-96/012, Washington D. C. 1997.

USP - THE UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. The United States Pharmacopeia: The National Formulary. 29<sup>a</sup> ed. 2006.

VOGNA, D., MAROTTA, R., ANDREOZZI, R., NAPOLITANO, A., D'ISCHIA, M. Kinetic and chemical assessment of the UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of antiepileptic drug carbamazepine. **Chemosphere**, v. 54, p. 497–505, 2004.

WEN, X., JIA, Y., LI, J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* – A white rot fungus. **Chemosphere**, v. 75, p. 1003–1007, 2009.

WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161–187, 2003.

WINKER, M., CLEMENS, J., REICH, M., GULYAS, H., OTTERPOHL, R. Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1902–1908, 2010.

WOLIN, E. A., WOLIN, M. J., WOLFE R. S. Formation of methane by bacterial extracts. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, n<sup>o</sup> 8, p. 2882-2886.

YOSHIMOTO, T., NAGAI, F., FUJIMOTO, J., WATANABE, K., MIZUKOSHI, H., MAKINO, T., KIMURA, K., SAINO, H., SAWADA, H., OMURA, H. Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n<sup>o</sup> 9, p. 5283–5289, 2004.

YU, J. T., BOUWER, E. J., COELHAN, M. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. **Agricultural Water Management**, v. 86, p. 72-80, 2006.

ZAVA, D. T., BLEN, M., DUWEL, G. Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 637-645, 1997.

ZHANG, Y., GEIBEN, S. *In vitro* degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase. **J. Hazard. Mater.**, v. 176, p. 1089-1092, 2009.

ZHOU, J. L., ZHANG, Z. L., BANKS, E., GROVER, D., JIANG, J. Q. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 655–661, 2009.

ZORITA, S., MÅRTENSSON, L., MATHIASSEN, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 2760-2770, 2009.

ZOU, J., NEUMANN, N. F., HOLLAND, J. W., BELOSEVIC, M., CUNNINGHAM, C., SECOMBES, C. J., ROWLEY, A. F. Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. **Biochem. J.**, v. 340, p. 153–159, 1999.

ZUCCATO, E., CASTIGLIONI, S., FANELLI, R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 122, p. 205–209, 2005.