

# Ação de fungos na biorremediação de diclofenaco

DOI: 10.5281/zenodo.11089834

Luiza P. F. de Souza <sup>a\*</sup>

This article is a review of the study by M. F. Blanco-Orta and co-workers,<sup>4</sup> aiming to compare the results of the experiments conducted with other literature, as well as addressing the issue of diclofenac found in our waters and the possibility of bioremediation using easily obtainable fungi.

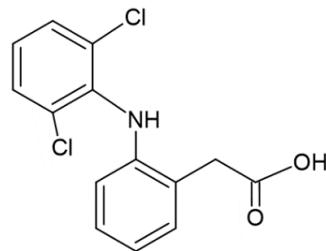
Este artigo é uma revisão do estudo de M. F. Blanco-Orta e colaboradores,<sup>4</sup> buscando comparar o resultado dos experimentos realizados com outras literaturas, além de abordar a problemática do diclofenaco encontrado em nossas águas e a possibilidade da biorremediação utilizando fungos de fácil obtenção.

## Introdução

A biorremediação é um processo que visa degradar, remover ou reduzir produtos tóxicos, transformando-os em substâncias não prejudiciais. No Brasil, a poluição de rios, lagos e represas é frequentemente causada por metais pesados, que são substâncias difíceis de serem removidas. Dessa forma, surgem cada vez mais estudos que buscam caracterizar fungos que possam degradar ou remover esses poluentes. Entretanto, os metais pesados não são os únicos poluentes que podem ser retirados da água utilizando biorremediação, surgem cada vez mais estudos que buscam utilizar microrganismos para esse fim, uma vez que esse é um processo que apresenta menor agressão ao ecossistema.<sup>1</sup>

Além dos metais pesados, outros poluentes geram preocupações. O amplo consumo de produtos farmacêuticos seguidos de seu descarte inadequado tem causado aumento nas concentrações dessas substâncias em ambientes aquáticos.<sup>2</sup> A principal fonte de produtos farmacêuticos no ambiente é a excreção de formas não metabolizadas ou metabólitos ativos por humanos e animais de criação através de urina e fezes, seguida pelo descarte de resíduos da indústria farmacêutica e hospitalares, bem como pela liberação doméstica de medicamentos residuais. Essas substâncias podem permanecer por muito tempo no ambiente e, dentre elas, uma que está chamando atenção dos pesquisadores por sua concentração nas águas é o diclofenaco (DCF), (2-[2-[(2,6-diclorofenil) amino]fenil).<sup>3,4</sup>

**Figura 1.** Estrutura molecular do diclofenaco.



O DCF faz parte do grupo dos Hormônios e anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), ele representa um risco potencial comprovado para organismos, ambientes e humanos e tem sido frequentemente detectado em águas residuais, lodo de esgoto e solos.<sup>5</sup> Devido aos potenciais efeitos nocivos, o diclofenaco foi priorizado nas políticas de monitoramento da água na União Europeia.<sup>6</sup>

Espécies marinhas que foram expostas ao DCF apresentaram efeitos negativos em seus organismos como estresse oxidativo, ativação de respostas imunes, decréscimo na energia disponível para crescer, entre outros.<sup>7</sup> O tratamento convencional de efluentes geralmente não é eficaz na remoção do DCF, levando ao interesse crescente na biorremediação. Estudos têm sido feitos explorando a utilização de fungos, bactérias ou microalgas para degradar contaminantes, uma vez que esse processo é considerado seguro, econômico e ecologicamente correto.<sup>4,8,9</sup> Os fungos, em particular, têm mostrado eficácia na remoção do diclofenaco, com taxas de remoção acima de 96%, pelas espécies *Trametes versicolor*,

*Ganoderma lucidum*, *Irpeflacteus* e *Penicilliumoxalicum*, usando mecanismos como biodegradação, oxidação e biotransformação.<sup>2</sup>

No entanto, muitas outras espécies de fungos também têm sido exploradas para fazer a biorremediação do DCF. O artigo em referência que será analisado traz o estudo da eficácia de três fungos produzidos industrialmente e usados na biorremediação desse fármaco. Iremos então comparar a eficácia com a de outros fungos estudados por outros autores com esse mesmo objetivo.

## Metodologia

M. F. Blanco-Orta e colaboradores fizeram este estudo analisando as espécies *Pleurotus ostreatus* 32783, que foi doada, *Aspergillus niger* 9142 e *Penicillium roqueforti*, que foram isoladas do queijo azul.<sup>4</sup>

Os experimentos de remoção de diclofenaco foram realizados em meio mínimo de sais de Vogel (MMV), em 1 litro de água destilada com 5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 g de citrato de sódio penta-hidratado, 2 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g de ácido cítrico, 0,005 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,00025 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,00005 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,00005 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,00005 g de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,005 mg de biotina e 20 g de glicose.<sup>4</sup>

O extrato fúngico resultou de um período de crescimento fúngico de 96 horas em meio MMV. Os fungos *A. niger* e *P. roqueforti* cresceram em pratos de Agar Batata Dextrose (ABD), que é composto de infusão de batata desidratada e dextrose que estimulam o crescimento de fungos, depois foram incubados, sendo agitados a 200 rpm por dois dias e o *P. ostreatus* cresceu em um prato de ABD com extrato de trigo e foi incubado, sendo agitado a 200 rpm por 15 dias.<sup>4</sup>

Um conjunto de diferentes MMV foi preparado variando o pH do meio basal para 2.0, 3.0 e 4.0. Em outro conjunto de meios, ajustados para os mesmos valores de pH, foi adicionado com NaCl (100 mM). Tanto os fungos quanto o diclofenaco foram analisados individualmente nas condições do MMV em diferentes pH para identificar possíveis efeitos adversos.<sup>4</sup>

Depois de 5 dias de incubação em temperatura ambiente com agitação de 200 rpm, o estudo investigou a biossorção do diclofenaco na parede celular fúngica por meio

de interações eletrostáticas. A biomassa de cada fungo foi recuperada ao final do período de incubação, lavadas e agitadas com solução de NaCl (2 M) para recuperar todo o diclofenaco adsorvido eletrostaticamente dos componentes da parede celular. Em seguida, os autores determinaram as atividades enzimáticas degradantes de diclofenaco extracelular. Eles calcularam a concentração usando dados de absorbância e interpolaram na curva padrão de albumina sérica bovina (0 a 0,8 mg/ml), depois usaram as concentrações para analisar a degradação do diclofenaco como descrito no artigo.<sup>4</sup>

Posteriormente, foi determinada a concentração de diclofenaco por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Por fim, foi feita a análise estatística e os experimentos foram feitos em triplicatas para as melhores condições determinadas de pH de cada espécie. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA) de uma via com correção de Tukey para determinar a significância estatística desses resultados, ao verificar se há diferenças significativas entre três ou mais médias entre grupos independentes e onde está a diferença.<sup>4</sup>

## Resultados e discussão

Os fungos *P. roqueforti* e *P. ostreatus* foram escolhidos por serem de fácil obtenção como subprodutos da indústria alimentícia ou produtos fora da validade. Por serem espécies comestíveis, são não patogênicas e são adequadas para uma estratégia segura de biorremediação. Esses fungos, juntamente com o *A. niger*, que é amplamente utilizado em muitos objetivos biotecnológicos, são uma fonte sustentável de biomassa residual ativa. O *P. ostreatus* além de ser de fácil obtenção também não tem formação de esporos quando cresce em culturas submersas, não forma esporos, limitando sua dispersão, o seu lado negativo é seu lento crescimento.<sup>4</sup>

No artigo em referência,<sup>4</sup> o *P. roqueforti* mostrou a menor capacidade de remover diclofenaco do meio de cultura, além de ter sido um processo lento em todas as condições estudadas, o melhor desempenho de *P. roqueforti* foi observado em cultura com pH 4.0, com uma remoção de 32,5%. A capacidade de remoção diminui sob condições mais ácidas tanto para *P. roqueforti* quanto para *P. ostreatus*, enquanto o contrário foi observado para *A. niger* que removeu mais diclofenaco no pH mais ácido. Ademais, a adição de NaCl ao meio de cultura afeta o desempenho fúngico em todos os três valores de pH testados para *P. roqueforti*, possivelmente afetando a fisiologia fúngica devido a um efeito negativo nas funções proteicas.

A espécie *A. niger* removeu 61,99% do diclofenaco em solução em pH 2.0, o que representa quase 2 vezes do que foi retirado pela *P. roqueforti*, este resultado foi inesperado, já que o pH 2.0 é uma condição de ácido forte e pouca biomassa se desenvolve sob ela. Em contraste, a pH 4.0, *A. niger* removeu apenas 30,9% de diclofenaco. Para esse fungo, a adição de NaCl aumentou a capacidade de remover DCF para os pH 3.0 e 4.0, sendo que no pH 3.0 com adição de NaCl foi observado a remoção de 74,54%.<sup>4</sup> Um valor relativamente alto, mas ainda longe dos valores encontrados em outras literaturas para diferentes fungos.<sup>2</sup>

No estudo feito, das três espécies fúngicas estudadas a espécie *P. ostreatus*, mostrou a melhor capacidade de remoção. No pH 4.0, a *P. ostreatus* alcançou remoção de diclofenaco de 95,6% na ausência de NaCl e 100% na presença de NaCl. No pH 2.0 e 3.0 foi observado uma grande capacidade de remoção também, 69,97% e 95,61%, respectivamente, porcentagens que diminuíram com a adição de NaCl, porém ainda apresentaram um bom resultado, 67,67% para o pH 2.0 e 73,89% para o pH 3.0. Os resultados da pesquisa feita podem ser observados na Tabela 1.<sup>4</sup>

**Tabela 1.** Porcentagem de DCF removido pelas três espécies testadas em diferentes meios.

Meio	<i>P. roqueforti</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. ostreatus</i>
pH 2.0	24,48%	61,99%	69,97%
pH 3.0	28,50%	38,75%	95,61%
pH 4.0	32,54%	30,87%	97,84%
pH 2.0, com NaCl	13,59%	57,11%	67,67%
pH 3.0, com NaCl	23,86%	74,54%	73,89%
pH 4.0, com NaCl	16,55%	46,95%	100%

A análise cromatográfica revelou uma pequena fração de diclofenaco absorvida nos micélios dos fungos *P. roqueforti* e *A. niger* (<0,5%). Também, revelou que o valor de pH é um determinante para a biossorção de DCF, independentemente da presença de NaCl para o *P. roqueforti*, e dependente da quantidade de NaCl no meio de cultura para o *A. niger*.<sup>4</sup>

Já a espécie *P. ostreatus* mostrou uma maior quantidade de diclofenaco ligado à parede celular em um pH de 2.0, 9,4% do diclofenaco total foi recuperado da biomassa desenvolvida na presença de NaCl, o que sugere a existência de diferenças relevantes na composição da parede celular da *P.*

*ostreatus* quando comparada a *P. roqueforti* e a *A. niger*, uma vez que a biomassa tratada com sal de *P. ostreatus* liberou mais de 40 vezes a quantidade de DCF em comparação com as outras espécies na mesma quantidade de sal e no mesmo pH.<sup>4</sup>

Para entender o que faz com que a *P. ostreatus* tenha essa maior capacidade de remover o DCF o estudo abordou a importância das proteínas extracelulares dessa espécie e determinou que elas são essenciais na remoção do diclofenaco do meio de cultura.<sup>4</sup>

Comparando com outros artigos da literatura podemos observar que apesar de sua fácil obtenção, nem o *A. niger*, nem o *P. roqueforti* obtiveram resultados tão positivos em comparação com outros fungos.<sup>2,10,11</sup> Estudos mostram outras opções de fungos para a degradação de DCF, como o *Phanerochaete chrysosporium* que consegue degradar até 97% de DCF em 6 dias na concentração de 1 mg de DCF por litro e 93% na concentração de 10 mg de DCF por litro.<sup>9</sup> Os fungos da podridão branca, *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium* e um anamorfo de *Bjerkandera* sp. R1 também foram estudados para a degradação do DCF. Até 99% foi degradado pelo anamorfo de *Bjerkandera* sp. R1 em 4 dias, mas o DCF ainda estava presente nos frascos com *B. adusta* e *P. chrysosporium* depois de 7 dias, embora em níveis muito baixos (9 e 12%, respectivamente).<sup>12</sup> Outro estudo mostra que a biorremediação de compostos farmacêuticos contidos em águas residuais, também é possível por meio da ação oxidativa de enzimas (lacases) fúngicas.<sup>13</sup> Uma revisão também mostra que um dos fungos com valores mais altos de degradação na literatura são encontrados para o *Trametes versicolor* com alguns estudos que chegaram a encontrar 100% de degradação de DCF.<sup>2</sup>

Apesar dos resultados baixos encontrados por M. F. Blanco-Orta e colaboradores<sup>4</sup>, o *A. niger* em consórcio com outros fungos indígenas da África do sul, *M. circinelloides*, *T. polyzona*, *T. longibrachiatum* e *R. microsporus*, apresentou excelentes resultados de remoção de 99,84% de DCF na concentração de 1mg/L usando a biodegradação e oxidação.<sup>14</sup> O que mostra que, apesar do baixo valor de degradação encontrado pelo artigo de referência, esse fungo ainda é promissor em diferentes condições e deve ser levados em consideração para a biorremediação de DCF principalmente por ter relativamente uma fácil obtenção. O *P. ostreatus* também mostrou resultados positivos na remoção de 97% de DCF na concentração de 20 µg/L em outro estudo usando a biodegradação, o que corrobora com os achados do artigo de referência.<sup>15</sup> Já o *P. roqueforti* não foi encontrado em outras literaturas sobre o assunto, o que abre espaço para que mais

estudos sejam feitos sobre seu uso na biorremediação, já que esse fungo de fácil obtenção poderia possivelmente ter resultados melhores em outras condições. No entanto, a literatura traz fungos que tem capacidades muito mais altas de degradação que já estão sendo estudados.

## Conclusões

A presença de diclofenaco nas águas de rios e mares, tem se mostrado um problema para o meio ambiente, de forma que levantou preocupações fazendo com que pesquisadores buscassem maneiras de remover esse fármaco. A biorremediação se mostra uma forma promissora de alcançar este objetivo, uma das formas sendo a utilização de fungos.

Muitos fungos têm sido estudados para este efeito, dentre eles M. F. Blanco-Orta e colaboradores testaram o uso de *Pleurotus ostreatus* 32783, *Aspergillus niger* 9142 e *Penicillium roquefortii*, que são espécies de fácil obtenção.<sup>4</sup>

O *P. roqueforti* apresentou o pior resultado removendo somente 32,5% de diclofenaco na sua melhor atuação. O *A. niger* demonstrou resultados melhores, 74,54% de remoção na sua melhor atuação, que se mostrou um bom resultado, mas abaixo da capacidade de outros fungos. Por fim, o melhor resultado foi do *P. ostreatus* que alcançou uma remoção de 100% de diclofenaco no pH 4.0 na presença de NaCl. A análise cromatográfica também revelou a capacidade de biossorção do *P. ostreatus* muito superior à dos outros dois fungos, principalmente por causa das proteínas extracelulares dessa espécie.

Muitas pesquisas foram feitas com diferentes fungos e apresentaram resultados promissores com valores mais altos de degradação de diclofenaco. Outros estudos mostram a possibilidade de se obter resultados melhores para *A. niger* em diferentes condições<sup>14</sup> e mais estudos podem ser conduzidos para determinar a capacidade de remoção do diclofenaco com o *P. roqueforti*. Dessa forma, podemos entender que esse assunto tem tido grande atenção de pesquisadores que estão trazendo diversas soluções de maneira ecológica utilizando fungos na biorremediação para a retirada de fármacos da água, dentre eles o diclofenaco. Ademais, os fungos também podem ser utilizados para degradar outros fármacos<sup>12</sup>, além de metais pesados<sup>1</sup>, e outros poluentes. Estudos para a degradação do diclofenaco já estão sendo conduzidos e espera-se que este problema possa ser solucionado com a biorremediação usando fungos.

## Contribuições por Autor

A resenha sobre o artigo em referência e a inclusão de algumas observações são de Luiza P. F. de Souza.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesses.

## Agradecimentos

Ao grupo PET-Química/IQ/UnB, à Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SESu/MEC) e ao Decanato de Ensino de Graduação (DEG/UnB) pelo apoio ao Programa de Educação Tutorial pela bolsa concedida. Ao Instituto de Química (IQ/UnB) e à Universidade de Brasília pelo suporte e espaço fornecidos.

## Notas e referências

- 1 L. de C. Fontes, Biorremediação, <https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/microbiologia-ambiental/biorremediacao/>, (acessado 22 de março, 2024)
- 2 J. Rocha, J. Santos, C. Demarco, L. A. Bender, S. Pieniz, M. S. Quadro and R. Andreazza, Biorremediação: usos e aplicações para degradação de diclofenaco, *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, 2022, **13**, 131–151.
- 3 M. Klavarioti, D. Mantzavinos and D. Kassinos, Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes, *Environment International*, 2009, **35**, 402–417.
- 4 M. F. Blanco-Orta, R. F. García-de La Cruz, L. M. T. Paz-Maldonado, D. A. Pedraza-González, M. M. Morales-Avila, V. E. Balderas-Hernández, O. González-Ortega and A. S. Pérez-Martínez, Assessing three industrially produced fungi for the bioremediation of diclofenac, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2023, **58**, 661–670.
- 5 H. Ericson, G. Thorsén and L. Kumblad, Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels, *Aquatic Toxicology*, 2010, **99**, 223–231.
- 6 J. Wang, B. He, D. Yan and X. Hu, Implementing ecopharmacovigilance (EPV) from a pharmacy perspective:

A focus on non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Science of The Total Environment*, 2017, **603–604**, 772–784.

- 7 M. Mezzelani, S. Gorbi and F. Regoli, Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms, *Marine Environmental Research*, 2018, **140**, 41–60.
- 8 A. Singh, A. Shourie and S. Mazahar, Integration of Microalgae-Based Wastewater Bioremediation–Biorefinery Process to Promote Circular Bioeconomy and Sustainability: A Review, *CLEAN Soil Air Water*, 2023, **51**, 2100407.
- 9 L. Ercoli, R. Rossetto, S. Di Giorgi, A. Raffaelli, M. Nuti and E. Pellegrino, Effective bioremediation of clarithromycin and diclofenac in wastewater by microbes and Arundo donax L, *Environ Sci Pollut Res*, 2023, **30**, 77193–77209.
- 10 T. Hata, S. Kawai, H. Okamura and T. Nishida, Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus Phanerochaete sordida YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation, *Biodegradation*, 2010, **21**, 681–689.
- 11 R. Cruz-Ornelas, J. E. Sánchez-Vázquez, L. Amaya-Delgado, K. Guillén-Navarro and A. Calixto-Romo, Biodegradation of NSAIDs and their effect on the activity of ligninolytic enzymes from Pleurotus djamor, *3 Biotech*, 2019, **9**, 373.
- 12 A. I. Rodarte-Morales, G. Feijoo, M. T. Moreira and J. M. Lema, Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi, *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, **27**, 1839–1846.
- 13 Y. El Yagoubi , B. Lemieux , P. A. Segura and H. Cabana, Characterization of laccases from Trametes hirsuta in the context of bioremediation of wastewater treatment plant effluent, *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, **171**, 1–12.
- 14 T. K. Kasonga, M. A. A. Coetzee, C. Van Zijl and M. N. B. Momba, Removal of pharmaceutical estrogenic activity of sequencing batch reactor effluents assessed in the T47D-KBluc reporter gene assay, *Journal of Environmental Management*, 2019, **240**, 209–218.
- 15 M. Hultberg, L. Ahrens and O. Golovko, Use of lignocellulosic substrate colonized by oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) for removal of organic micropollutants from water, *Journal of Environmental Management*, 2020, **272**, 111087.