

# BIODEGRADAÇÃO DO DICLOFENACO: UMA REVISÃO

ARTHUR PÉREZ AGUIAR\*

KÁTIA MARIA GOMES MACHADO\*\*

\* Bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Católica de Santos, apaguair97@gmail.com

\*\* Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Católica de Santo

## RESUMO

A contínua inserção dos fármacos no ambiente exige novas estratégias tecnológicas para removê-los das águas residuárias domésticas e industriais. Com o objetivo de conhecer o estado da arte recente sobre a biodegradação do diclofenaco, o presente trabalho permitiu identificar o estágio atual das pesquisas sobre a biodegradação desse fármaco por microrganismos, confirmando a necessidade de aumentar os esforços de investigação para a prospecção de microrganismos mineralizadores. Contribuiu, ainda, para alertar sobre a importância de os estudos optarem por um planejamento experimental robusto, visando comprovar a atuação do microrganismo no fármaco, pela inclusão de controles abióticos adequados, e a segurança do processo, pela avaliação da toxicidade aguda e crônica, em vários níveis tróficos.

## PALAVRAS-CHAVE

Biodegradação de fármaco. Contaminantes emergentes. Biorremediação.

## 1 INTRODUÇÃO

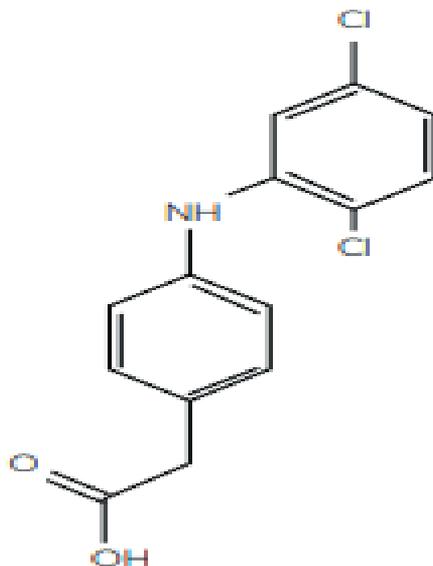
A partir da década de 1980, um novo grupo de substâncias químicas se destacou como poluente ambiental. Denominado de contaminantes emergentes, esse grupo compreende compostos químicos naturais ou sintéticos, que não são ainda objetos de monitoramento ambiental por muitos países. Neste grupo, estão incluídas várias classes de fármacos, como antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, hormônios sintéticos, além de produtos de limpeza e higiene pessoal, hormônios naturais e compostos usados na produção de resinas e plástico. A ocorrência dos contaminantes emergentes em cursos d'água constitui ameaça à saúde pública e aos ecossistemas. Os impactos dessas substâncias incluem toxicidade aquática, carcinogenicidade, genotoxicidade, interferência no sistema endócrino e reprodutivo e seleção

de bactérias multirresistentes (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; FONTES *et al.*, 2018; REIS FILHO *et al.*, 2007; SILVA; COLLINS, 2011).

Do ponto de vista da saúde ambiental, os dois subgrupos mais importantes dos poluentes emergentes são os interferentes endócrinos e os fármacos, os quais estão presentes no ambiente em concentrações na ordem de  $\text{ng.L}^{-1}$  a  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (LIU *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2016; SILVA; COLLINS, 2011). Os fármacos são substâncias químicas com atividade biológica, ou seja, capazes de interagir com os sistemas bioquímicos dos seres vivos. São introduzidos no ambiente principalmente em decorrência da sua presença na rede coletora de esgoto, lançamento de efluentes industriais e pelo descarte inadequado de medicamentos. Os sistemas convencionais empregados para o tratamento de águas residuárias e industriais não foram concebidos para tratar os contaminantes emergentes. Assim, os fármacos não são removidos completamente nas estações de tratamento de esgoto (ETEs), sendo a sua taxa de remoção bastante variável e, geralmente, incompleta. Diversos fármacos permanecem no efluente de ETEs e podem atingir os corpos de água e estações de tratamento de água e se constituírem em ameaça à saúde humana e ambiental devido aos seus efeitos tóxicos crônicos (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; CORCORAN; WINTER; TYLER, 2010; DESBIOLLES *et al.*, 2018; DESCHAMPS *et al.*, 2012; FERRARI *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2019; PATEL *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2020a; MELO *et al.*, 2009; REIS FILHO *et al.*, 2007; STUMPF *et al.*, 1999; THOMAIDI *et al.*, 2015).

O diclofenaco (DCF) (Figura 1) é um dos fármacos mais encontrados no ambiente, devido ao seu amplo consumo mundial pela sua função analgésica e anti-inflamatória. Esse medicamento consiste em um anti-inflamatório não estereoidal, formado por um diclorofenil ligado a um ácido fenilacético por meio de um grupo amina (BORGES *et al.*, 2016; LANGE-NHOFF *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2020a).

Figura 1 - Forma estrutural da molécula de DCF.



Fonte: adaptado de Borges et al. (2016).

Assim como outros fármacos, o DCF não é facilmente removido pelos sistemas convencionais de tratamento empregados nas ETEs. Segundo Aquino, Brandt e Chernicharo

(2013), o DCF passa praticamente incólume pelo sistema de lodo ativado, devido à baixa remoção por sorção e biodegradação. No pós-tratamento, é detectada a presença de cerca de 30 a 70% da concentração inicial de DCF (AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; LONAPPAN *et al.*, 2016; RODARTE-MORALES *et al.*, 2012). Em recente revisão, Pereira *et al.* (2020a) registraram que a eficiência média da remoção do DCF por ETEs é de 34%, sendo a mínima de 0% e a máxima de 80%.

A exposição ao DCF, assim como aos seus metabólitos, propicia efeitos prejudiciais a diversos organismos não alvos (algas, moluscos, peixes, dentre outros), como amplamente documentado na literatura (TROMBINI.; HAMPEL; BLASCO, 2019; FEITO; VALCÁRCEL; CATALÀ, 2012; CUKLEV *et al.*, 2011; FACEY *et al.*, 2018; RIBAS; ZAMPRONIO, ASSIS, 2016, 2017; FONTES *et al.*, 2018; HOEGER *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2018; NIETO *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2020b; TRIEBSKORN *et al.*, 2004). Em 2013, o DCF foi incluído pela União Europeia na lista de substâncias prioritárias que devem ser objetos de monitoramento ambiental (PARLAMENTO EUROPEU, 2013). No Brasil, ainda não existe legislação dispendo de valores limites de lançamento de fármacos no ambiente (ESCHER *et al.* 2019).

A contínua inserção dos fármacos no ambiente exige novas estratégias tecnológicas para auxiliar na remoção desses contaminantes das águas residuárias domésticas e industriais. Nesse sentido, é grande o interesse pela biorremediação, ou seja, o uso da capacidade dos seres vivos (bactérias, arqueas, fungos e plantas) ou de seus componentes (como as enzimas), de degradar, reduzir ou eliminar contaminantes orgânicos (MACHADO; NASCIMENTO; ARAUJO, 2016; KRZMARZICK *et al.*, 2018).

A biorremediação apresenta várias vantagens em relação a outras técnicas de remoção de poluentes do ambiente, podendo-se destacar o baixo custo e a possibilidade de obter-se a completa degradação do poluente, ou seja, sua mineralização, com sua transformação em produtos finais menos tóxicos ou inócuos aos seres vivos (AZUBUIKE; CHIKERE; OK-POKWASIL, 2016; MACHADO *et al.*, 2016; MATHEUS; MACHADO, 2002). Processos biológicos, como a biorremediação, combinados a processos físico-químicos podem constituir potenciais estratégias para o tratamento secundário ou terciário em ETEs, assegurando a qualidade da água de abastecimento e reduzindo a contaminação ambiental por esses poluentes (MEEBURG *et al.* 2012).

De forma a subsidiar o desenvolvimento de processos de biorremediação, esforços têm sido conduzidos para avaliar o potencial de microrganismos para a biodegradação de fármacos. Nos ecossistemas naturais, bactérias e fungos são os principais agentes atuantes na degradação de moléculas orgânicas. A ação desses microrganismos em um composto orgânico pode se dar por diferentes vias metabólicas, resultando na sua degradação em moléculas mais simples, na sua mineralização (degradação completa) ou na sua transformação, processo no qual a complexidade química do composto orgânico não é alterada de forma significativa. Com exceção da mineralização, os demais processos podem resultar na formação de metabólitos, os quais podem ser até mais tóxicos que o composto original (MARCO-URREA *et al.*, 2010; TIBURTIUS; SCHEFFER, 2014).

A mineralização de um composto orgânico poluente é o destino final de preferência para a sua remoção do ambiente. A mineralização de um composto orgânico poder ser obtida a partir do uso de microrganismos que o utilizam como fonte de carbono e energia ou então por co-metabolismo, processo no qual o microrganismo atua em um composto orgânico, sem que o produto resultante contribua para a sobrevivência do microrganismo. A degradação por co-metabolismo ocorre na presença de um outro composto orgânico, o qual é empregado

pelo microrganismo como fonte de carbono e energia (GAYLARDE; BELLINASSO; MANSFIO, 2005; MATHEUS; MACHADO, 2002).

Assim, a capacidade do microrganismo de mineralizar o poluente constitui uma importante característica a ser observada nos estudos que visam subsidiar a aplicação posterior do microrganismo para o desenvolvimento de estratégias de biorremediação. Para que o estudo evidencie a capacidade de um microrganismo de mineralizar um composto orgânico, faz-se necessário identificar a ocorrência da redução da sua concentração por meio de mecanismos não relacionados à ação microbiana. Além da ação biológica do microrganismo, os possíveis mecanismos atuantes para a remoção de um composto orgânico de uma matriz ambiental podem incluir: sorção (adsorção e absorção), volatilização e reações químicas abióticas (DENG *et al.*, 2016; PALLI *et al.*, 2017; NGUYEN *et al.* 2013, 2019; WU *et al.*, 2019).

Os estudos que pretendem avaliar o potencial uso de microrganismos para a remoção de contaminantes emergentes, como o DCF, precisam abordar com clareza o destino final do poluente a partir do estudo do metabolismo microbiano envolvido na sua remoção. Outro aspecto importante é assegurar que os metabólitos formados durante a aplicação de métodos biológicos não sejam mais tóxicos que o composto original. Isso tem sido feito pela inclusão de ensaios de toxicidade, uma vez que eles complementam as análises químicas. Não menos importante é a concentração inicial do fármaco, uma vez que esse parâmetro influencia a sua biodegradação, por exemplo, pela toxicidade ou pela incapacidade de induzir a síntese das enzimas envolvidas na sua degradação. Por fim, a escala na qual a biodegradação é avaliada (laboratorial, piloto ou industrial) fornece informações relevantes sobre o potencial de aplicabilidade do processo de biodegradação.

Com o objetivo de conhecer o estado da arte recente sobre a biodegradação do DCF por cultura pura de microrganismos, o presente estudo realizou uma pesquisa sistemática da literatura, procurando identificar: os microrganismos capazes de atuar nesse fármaco, o destino do fármaco após atuação do microrganismo, considerando o processo metabólico envolvido na sua remoção e a toxicidade dos produtos finais, as concentrações do fármaco empregadas nos estudos de biodegradação e a escala na qual a biodegradação foi avaliada.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo trata de revisão sistemática da literatura, tendo como base artigos científicos experimentais, de modo a realizar um recorte da bibliografia especializada do campo de degradação de diclofenaco por microrganismos. Para a coleta de dados foram utilizadas as bibliotecas virtuais *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Scientific Electronic Library Online* (SciELO) (<https://www.scielo.org/>) e as seguintes palavras-chave: remoção diclofenaco microrganismos, biodegradação diclofenaco e *diclofenac biodegradation*. Os grupos microbianos pesquisados incluíram bactérias, fungos e arqueas.

A identificação inicial das possíveis fontes de informação consistiu na seleção das publicações considerando-se seus títulos e resumos. Posteriormente, as publicações a serem utilizadas na revisão foram selecionadas a partir da leitura detalhada do artigo, com fichamento das informações significativas para atingir os objetivos propostos. Foram incluídas publicações do período de 2009 a 2019 que avaliaram a degradação do DCF por cultura pura de microrganismos cultivados em matrizes líquidas, como meio de cultura e efluentes sintéticos e reais. Foram excluídos os artigos de revisão, aqueles que examinaram a degradação do DCF por

comunidades microbianas mistas, aqueles que usaram o DCF em mistura com outros fármacos ou então aqueles que usaram apenas as enzimas microbianas e não a biomassa fúngica.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 2009 a 2019, foram recuperados um total de 79 artigos científicos que possuíam títulos e resumos que remetiam à temática da degradação de DCF pelo emprego das palavras-chave. Desses, apenas oito artigos científicos (Quadro 1) atenderam aos critérios de inclusão e exclusão pré-determinados, permitindo evidenciar a escassez de estudos sobre a atuação de microrganismos no DCF no período de 2009 a 2019.

Quadro 1 – Artigos científicos publicados no período de 2009 a 2019 que avaliaram a degradação do diclofenaco por ação de microrganismos.

Autores	Título
Marco-Urrea <i>et al.</i> (2010)	Degradation of the drug sodium diclofenac by <i>Trametes versicolor</i> pellets and identification of some intermediates by NMR
Hata <i>et al.</i> (2010)	Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus <i>Phanerochaete sordida</i> YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation
Aissaoui <i>et al.</i> (2017)	Metabolic and Co-Metabolic Transformation of Diclofenac by <i>Enterobacter hormaechei</i> D15 Isolated from Activated Sludge
Palyzová <i>et al.</i> (2018)	Potential of the strain <i>Raoutella</i> sp. KDF8 for removal of analgesics
Moreira <i>et al.</i> (2018)	Biodegradation of Diclofenac by the bacterial strain <i>Labrys portucalensis</i> F11
Olicón-Hernández <i>et al.</i> (2019)	Evaluation of diclofenac biodegradation by the ascomycete fungus <i>Penicillium oxalicum</i> at flask and bench bioreactor scales
Ivshina <i>et al.</i> (2019)	Features of diclofenac biodegradation by <i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 346
Cruz-Ornelas <i>et al.</i> (2019)	Biodegradation of NSAIDs and their effect on the activity of ligninolytic enzymes from <i>Pleurotus djamor</i>

Nota-se uma ausência de artigos científicos sobre a temática estudada no período de 2010 a 2017 e uma maior produção científica a partir de 2018. Isso pode evidenciar o crescente interesse científico pela degradação de DCF nos últimos anos, provavelmente impulsionado pela inclusão desse fármaco, em 2013, na lista de substâncias prioritárias que devem ser objetos de monitoramento ambiental pela União Europeia.

#### 3.1 Microrganismos capazes de atuar no DCF e mecanismo envolvido na sua remoção

A Tabela 1 sistematiza as informações resultantes da pesquisa referente aos microrganismos capazes de atuar no DCF e o mecanismo envolvido na remoção desse fármaco. As bactérias estudadas quanto à capacidade de degradar o DCF foram *Enterobacter hormaechei* (AISSAOUI *et al.*, 2017), *Labrys portucalensis* (MOREIRA *et al.*, 2018) e *Raoutella* sp. (PALYZOVÁ *et al.*, 2018) pertencentes ao filo Proteobacteria, e *Rhodococcus ruber* (IVSHINA *et al.*, 2019) pertencente ao filo Actinobacteria. Em relação aos fungos estudados quanto à capacidade de degradar o DCF, os estudos empregaram espécies do filo Basidiomycota (*Phanerochaete sordida*, *Pleurotus djamor* e *Trametes versicolor*) e do filo Ascomycota (*Penicillium oxalicum*) (CRUZ-ORNELAS *et al.*, 2019; HATA *et al.*, 2010; MARCO-URREA *et al.*, 2010; OLICÓN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Não foram encontrados estudos que avaliaram o potencial de arqueas para a degradação de DCF.

Tabela 1 – Microrganismos capazes de atuar no diclofenaco (DCF) e o mecanismo envolvido na remoção desse fármaco, de acordo com os estudos científicos publicados no período de 2009 a 2019.

Grupo microbiano	Organismo	Mecanismo	Co-metabolismo	Referência
Bactéria	<i>Enterobacter hormaechei</i>	TR	sim	Aissaoui <i>et al.</i> (2017)
	<i>Raoutella</i> sp.	NE	sim	Palyzová <i>et al.</i> (2018)
	<i>Labrys portucalensis</i>	MI	sim	Moreira <i>et al.</i> (2018)
	<i>Rhodococcus ruber</i>	DE	sim	Ivshina <i>et al.</i> (2019)
Fungo	<i>Trametes versicolor</i>	MI	-	Marco-Urrea <i>et al.</i> (2010)
	<i>Phanerochaete sordida</i>	TR	-	Hata <i>et al.</i> (2010)
	<i>Penicillium oxalicum</i>	TR	sim	Olicón-Hernández <i>et al.</i> (2019)
	<i>Pleurotus djamor</i>	NE	-	Cruz-Ornelas <i>et al.</i> (2019)

NOTA: DE: degradação; MI: mineralização; NE: não evidenciado; TR: transformação; -: não explorado.

A leitura dos oito artigos selecionados propiciou identificar três outros estudos (BESSA *et al.*, 2017; DOMARADZKA *et al.*, 2016; STENHOLM *et al.*, 2018), no âmbito da temática da degradação do DCF por microrganismos, que não foram recuperados pela pesquisa das palavras-chaves nos bancos de dados das bibliotecas virtuais empregadas. Além disso, foi feita uma pesquisa na literatura para identificar os artigos sobre essa temática publicados antes de 2009, sendo detectados apenas dois estudos (OSORIO-LOZADA *et al.*, 2008; WEBSTER *et al.*, 1998) que avaliaram a capacidade de microrganismos de degradar DCF nas mesmas condições que foram selecionadas para a realização do presente estudo, ou seja, por cultura pura do microrganismo, em matrizes líquidas, sem uso de mistura de fármacos. Os microrganismos avaliados nesses estudos foram bactérias dos gêneros *Actinoplanes* (OSORIO-LOZADA *et al.*, 2008), *Raoutella* (DOMARADZKA *et al.*, 2016) e *Brevibacterium* (BESSA *et al.*, 2017) e os fungos *Epicoccum nigrum* IMI354292 (WEBSTER *et al.*, 1998) e *Trametes versicolor* (DOMARADZKA *et al.*, 2016).

Assim, foi possível evidenciar que poucos microrganismos foram objeto de investigação até o momento, reforçando a necessidade de serem investidos maiores esforços na bioprospecção de microrganismos com capacidade de atuar no DCF. Ressalta-se a importância do recorte do objeto selecionado para o presente trabalho de forma a assegurar o nível de conhecimento necessário sobre o processo de biodegradação do DCF por culturas puras de microrganismos como subsídio para o desenvolvimento de novas tecnologias de remediação que possam contribuir para o enfrentamento da poluição causada pelos contaminantes emergentes.

A capacidade do fungo *T. versicolor* de mineralizar o DCF foi evidenciada pelo desaparecimento total do DCF e dos seus metabólitos após o tratamento com o fungo, em comparação aos controles abióticos (MARCO-URREA *et al.*, 2010). Durante o processo de remoção do fármaco pelo fungo, foram detectados e identificados dois metabólitos (4'-hidroxidiclofenaco e 5-hidroxidiclofenaco). Esses metabólitos são conhecidos intermediários da degradação do DCF pelo ser humano, animais e microrganismos (GRÖNING *et al.* 2007; STIERLIN; FAIGLE, 1979; WEBSTER *et al.* 1998). Apesar do crescimento do fungo ser feito na presença de glicose, não foi explorada a possibilidade de a degradação ser resultante de co-metabolismo.

DCF foi removido totalmente do meio de cultura durante o crescimento do fungo *P. sordida* (HATA *et al.*, 2010). Durante o crescimento do fungo na presença de DCF foram identificados três metabólitos (4'-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco e 4',5-diidroxiclofenaco), evidenciando a capacidade do fungo de transformar o fármaco. No entanto, os metabólitos não foram objeto de identificação no tempo final do tratamento não sendo possível confirmar a ocorrência de mineralização do fármaco pelo fungo. O estudo não descreveu os controles abióticos, dificultando evidenciar qual foi a real ação do fungo na remoção do fármaco. Apesar do crescimento do fungo ser feito na presença de glicose, também não foi explorada a possibilidade de ter ocorrido co-metabolismo.

Aissaoui *et al.* (2017) avaliaram a remoção de DCF pela bactéria *E. hormaechei* isolada de lodo ativado. Transformação do DCF por *E. hormaechei* foi detectada tanto quando DCF foi a única fonte de carbono, quanto em co-metabolismo, com glicose como fonte suplementar de carbono e energia. A transformação do DCF por *E. hormaechei* foi evidenciada pela identificação de apenas um metabólito (1-(2,6-diclorofenil)-2-indolinona), o qual não foi detectado nos controles abióticos. Nenhuma remoção do DCF foi observada nos controles abióticos e nos controles usados para determinar a adsorção do fármaco na biomassa, permitindo aos autores evidenciarem a ação da bactéria na remoção do fármaco.

Palyzová *et al.* (2018) avaliaram a remoção de DCF pela bactéria *Raoutella* sp. modificada por mutagênese química. Os autores concluíram que o DCF foi transformado pela bactéria, em co-metabolismo, com apenas um metabólito sendo identificado (4'-hidroxiclofenaco). A concentração desse metabólito reduziu para níveis inferiores ao limite de detecção após 72 horas do cultivo da bactéria. No entanto, a ausência de controles abióticos dificultou evidenciar a capacidade da bactéria de mineralizar o DCF.

*L. portucalensis* foi capaz de mineralizar o DCF em co-metabolismo, com suplementação periódica de acetato (MOREIRA *et al.*, 2018). Foram detectados e identificados 12 metabólitos, alguns já descritos anteriormente (4'-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco, ácido 2-(2,6-dicloro-4-metoxianilina) fenilacético e 5-hidroxiclofenaco quinona-imina), permitindo que os autores propusessem a via metabólica de degradação do DCF pela bactéria. Nenhum metabólito foi detectado no tempo final do tratamento com a bactéria e foram observadas quantidades estequiométricas de cloretos. Os controles empregados indicaram a não ocorrência de degradação da molécula de DCF por meio de reações abióticas.

Total remoção do DCF por co-metabolismo foi observada para o fungo *P. oxalicum* (OLLICÓN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Foram detectados sete metabólitos e quatro deles foram identificados (4'-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco, 4',5-diidroxiclofenaco e diclofenaco acilglucoronido). A maioria dos metabólitos foi proveniente de hidroxilação do DCF, permitindo evidenciar a capacidade do fungo de transformar o fármaco. Dois metabólitos não identificados foram provenientes de reações de fotodegradação. Os autores propuseram uma via metabólica para a remoção e destoxificação do DCF envolvendo tanto processos biológicos (ação do fungo) quanto físicos (fotodegradação).

A capacidade de *R. ruber* degradar o DCF foi observada por Ivshina *et al.* (2019). A remoção do DCF pela bactéria foi acelerada na presença de glicose, evidenciando a ocorrência de co-metabolismo. Atuação da bactéria no DCF foi confirmada pelo aumento do consumo de oxigênio durante o processo metabólico, evidenciando atividade catalítica e o envolvimento de oxigenases. Foram detectados e identificados um total de 16 metabólitos, sendo alguns já descritos em outros estudos (4'-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco quinona-imina). Ficaram evidenciadas a clivagem da ligação covalente C-N, a abertura do anel aromático não clorado, a formação de ácido fenilacético, como um

dos metabólitos intermediários, e de ácido fumárico, como metabólito final. DCF não foi detectado no tempo final do crescimento da bactéria e nenhum metabólito foi detectado nos controles abióticos, evidenciando a degradação do DCF pela bactéria.

*P. dijamor* foi capaz de remover DCF (CRUZ-ORNELAS *et al.*, 2019), mas como os metabólitos não foram objeto de análise, não foi possível evidenciar qual tipo de metabolismo estaria envolvido na remoção do fármaco pelo fungo. Apesar do crescimento do fungo ter sido feito na presença de fontes complexas de carbono, também não foi explorada a possibilidade da ocorrência de co-metabolismo.

### 3.2 Concentração inicial de DCF e sua remoção por microrganismos

Os fármacos estão presentes no ambiente em concentrações na ordem de  $\text{ng.L}^{-1}$  a  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (HEBERER; SCHMIDT-BÄUMLER; STAN, 1998; LIU *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2016; RADJENOVIC; PETROVIC; BARCELÒ, 2009; SILVA; COLLINS, 2011). Melo *et al.* (2009) reportaram concentrações de DCF variando entre 0,02 a  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  em diferentes matrizes ambientais de diversos países. Para o Brasil, os autores registraram valores de DCF de 0,02 e  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  na água superficial, de 0,04 a  $2,9 \mu\text{g.L}^{-1}$  em esgoto bruto e de  $1,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  em efluentes de ETE.

A concentração inicial do DCF empregada nos oito estudos avaliados compreendeu valores entre  $45 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $5.000.000 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Tabela 2). Apenas dois estudos avaliaram concentrações próximas àquelas detectadas no ambiente (IVSHINA *et al.*, 2019; MARCO-URREA *et al.*, 2010). A porcentagem de remoção do DCF variou de acordo com o microrganismo, com a concentração inicial de DCF empregada no estudo e com o tempo de cultivo.

Marco-Urrea *et al.* (2010) usaram duas concentrações de DCF com o objetivo de avaliar a capacidade de *T. versicolor* de remover o fármaco em uma concentração inicial alta ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e em outra próxima da concentração encontrada na natureza ( $45 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Remoção de 100% do DCF foi observada após 0,5 e 4 horas nas concentrações de  $45 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Com o mesmo objetivo, Ivshina *et al.* (2019) avaliaram também a capacidade de *R. ruber* de remover o fármaco em duas concentrações ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Remoção de 100 e 50% do DCF foi observada após 6 e 60 dias nas concentrações de  $50 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente.

Tabela 2 – Concentração do diclofenaco (DCF) empregada nos estudos científicos publicados no período de 2009 a 2019, sua porcentagem de remoção, tempo no qual foi observada a remoção e capacidade do sistema de cultivo do microrganismo.

Organismo	Concentração do DCF ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Remoção do DCF (%)	Tempo no qual foi observada a remoção (h)	Capacidade do sistema de cultivo (mL)	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	45	100	0,5	250	Marco-Urrea <i>et al.</i> (2010)
	10.000	100	4		
<i>Phanerochaete sordida</i>	29.614	100	144	100	Hata <i>et al.</i> (2010)
<i>Enterobacter hormaechei</i>	10.000	53	48	250	Aissaoui <i>et al.</i> (2017)
	50.000	82			
<i>Raoutella sp.</i>	1.000.000	96	96	< 20*	Palyzová <i>et al.</i> (2018)
	2.000.000	88			
	3.000.000	71			
	4.000.000	64			
	5.000.000	63			

Organismo	Concentração do DCF ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )	Remoção do DCF (%)	Tempo no qual foi observada a remoção (h)	Capacidade do sistema de cultivo (mL)	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	45	100	0,5	250	Marco-Urrea et al. (2010)
	10.000	100	4		
<i>Phanerochaete sordida</i>	29.614	100	144	100	Hata et al. (2010)
<i>Enterobacter hormaechei</i>	10.000	53	48	250	Aissaoui et al. (2017)
	50.000	82			
<i>Raoutella</i> sp.	1.000.000	96	96	< 20*	Palyzová et al. (2018)
	2.000.000	88			
	3.000.000	71			
	4.000.000	64			
	5.000.000	63			

NOTA: \*placa para cultivo de células 6 poços; \*\*microplaca 96 poços.

Os demais estudos empregaram concentrações iniciais de DCF muito superiores às detectadas no ambiente. Hata et al. (2010) empregaram DCF na concentração de 29.615  $\mu\text{g.L}^{-1}$  com 100% de remoção do fármaco por *P. sordida* após 6 dias. Aissaoui et al. (2017) observaram remoção de 53% e de 82% do DCF por *E. hormaechei*, após 48 horas, quando o fármaco foi empregado nas concentrações de 10  $\text{mg.L}^{-1}$  e de 50  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Palyzová et al. (2018) avaliaram a remoção de DCF, nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5  $\text{g.L}^{-1}$ , por *Raoutella* sp. A porcentagem de remoção diminuiu com o aumento da concentração de DCF, com máximo valor de 96% e mínimo de 63% para as concentrações de 1 e 5  $\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, após 96 horas do tratamento com a bactéria. Moreira et al. (2018) também avaliaram diferentes concentrações de DCF (1,7; 3,3; 8,4; 17,5 e 34  $\mu\text{M}$ ) para averiguar a capacidade de remoção do fármaco por *L. portucalesis*. Foi observada a remoção total de DCF em todas as concentrações avaliadas, no intervalo de 6 a 25 dias para as concentrações de 1,7 e 34  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Olicón-Hernández et al. (2019) empregaram DCF na concentração de 29.614  $\mu\text{g. L}^{-1}$ , de maneira a avaliar a capacidade de *P. oxalicum* de remover o fármaco, sendo observada remoção de 100% do fármaco em 24 horas. Cruz-Ornelas et al. (2019) observaram remoção de 93% do DCF na concentração de 10  $\text{mg.L}^{-1}$  por *P. djamor* após 6 horas.

### 3.3 Escala empregada nos estudos de degradação de DCF por microrganismos

A maioria dos estudos avaliados empregou a escala laboratorial para o estudo da degradação do diclofenaco, com o uso de sistemas de cultivo com capacidades que variaram de 0,4 a 250 mL (Tabela 2). Apenas Olicón-Hernández et al. (2019) desenvolveram seus estudos em duas escalas: em frascos com capacidade de 125 mL e em biorreatores com capacidade de 3 L.

A menor escala é usada no início do desenvolvimento de uma determinada área de pesquisa, uma vez que atende de forma satisfatória aos estudos que visam, por exemplo, na área da degradação de poluentes orgânicos, a seleção de linhagens microbianas, a definição das melhores condições de cultivo e as informações básicas sobre os mecanismos envolvidos na degradação. Ficou evidenciado que o período selecionado para esse estudo, 2009 a 2019, concentrou a fase inicial dos estudos sobre a degradação de DCF por microrganismos em cultura pura.

### 3.4 Toxicidade dos metabólitos formados pela ação dos microrganismos no DCF

A inclusão de ensaios de ecotoxicidade nos estudos de biodegradação visa acompanhar a possível formação de metabólitos tóxicos durante a ação dos microrganismos no fármaco. Dos artigos analisados, apenas três determinaram a toxicidade e usaram bioensaios para avaliar apenas o efeito agudo. Os demais estudos não determinaram a toxicidade dos metabólitos produzidos durante a remoção do fármaco, dificultando avaliar a segurança da aplicação dos microrganismos estudados em novas tecnologias visando o tratamento de resíduos contendo DCF.

Marco-Urrea *et al.* (2010) confirmaram a não toxicidade aguda dos produtos finais de atuação de *T. versicolor* durante mineralização do DCF usando o bioensaio padrão com a bactéria marinha *Vibrio fischeri* (Microtox). Os resultados desse estudo reforçam a importância do monitoramento do processo com a ecotoxicidade. Os autores constataram remoção de 100% do DCF nos frascos inoculados com o fungo, mas o controle abiótico empregado (biomassa morta pelo calor) permitiu evidenciar remoções de 47% e 80% do DCF por adsorção nas concentrações de 45  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 10  $\text{mg.L}^{-1}$ , respectivamente. Assim, o resultado da toxicidade atestou que o processo de degradação do DCF pelo fungo não produziu metabólitos tóxicos. Além disso, os autores detectaram toxicidade apenas para o controle não inoculado preparado com 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de DCF, muito superior às concentrações normalmente encontradas no ambiente. A ausência de toxicidade do controle feito com a concentração de 45  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de DCF evidencia que o monitoramento deve incluir também bioensaios que identifiquem o efeito crônico desse fármaco, uma vez que os organismos aquáticos são expostos a baixas concentrações de forma contínua. Segundo Melo *et al.* (2009), os bioensaios que avaliam efeitos crônicos não são muito empregados uma vez que exigem um longo prazo para que seja constatada a toxicidade.

Hata *et al.* (2010) confirmaram a capacidade de *P. sordida* de reduzir a toxicidade aguda do DCF, após 6 dias de tratamento, usando ensaio com o crustáceo de água doce *Thamnocephalus platyurus*. Como o estudo não evidenciou a capacidade do fungo de mineralizar o DCF, os resultados da toxicidade foram importantes para evidenciar a segurança do tratamento com o fungo. Olicón-Hernández *et al.* (2019) utilizaram o bioensaio padrão com *V. fischeri* (Microtox) e verificaram correlação entre a redução significativa da toxicidade aguda e a remoção do DCF.

Como pode ser verificado, foram empregados apenas dois organismos para o bioensaio de ecotoxicidade: a bactéria marinha *Vibrio fischeri* e o crustáceo de água doce *Thamnocephalus platyurus*. Outro aspecto a ser considerado é a necessidade de os estudos incluírem bioensaios frente aos vários níveis tróficos de forma a verificar o real impacto dos metabólitos no ambiente aquático.

## 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho permitiu identificar o estágio atual das pesquisas sobre a biodegradação do DCF por microrganismos em cultura pura, sendo possível evidenciar que um número pequeno de bactérias e fungos foram, até o momento, avaliados quanto à capacidade de atuar no DCF. Os estudos revelaram a importância do co-metabolismo para a remoção do fármaco e que os hidroxidiclofenacos foram os principais metabólitos resultantes da atuação dos microrganismos no DCF. Ficou demonstrado que a maioria dos estudos empregaram

concentrações do DCF muito superiores às detectadas no ambiente e que a maioria das pesquisas sobre a biodegradação do DCF por microrganismos ainda é feita em escala laboratorial empregando volumes muito reduzidos de matrizes líquidas. Espera-se que nos próximos anos seja possível acompanhar o interesse pelo aumento da escala do processo.

Considerando os resultados obtidos com os oito microrganismos avaliados, destaca-se a performance do fungo basidiomiceto *T. versicolor*. Ele foi capaz de remover completamente o DCF por meio de sua mineralização e em concentração próxima àquela encontrada na natureza em um curto intervalo de tempo (0,5 horas), com a formação de metabólitos finais não tóxicos.

Ressalta-se a ausência de controles abióticos adequados, o que dificultou evidenciar a real capacidade de alguns microrganismos de atuar sobre a molécula do DCF. Além disso, a ausência de ensaios de ecotoxicidade na maioria dos estudos impediu confirmar a segurança ambiental do processo de remoção do fármaco pelo microrganismo. Esses dois aspectos reforçam a premissa de que os estudos precisam optar por planejamento experimental robusto, para comprovar a atuação dos microrganismos no fármaco, em relação não apenas aos controles abióticos, mas também no sentido de avaliar a ecotoxicidade aguda e crônica, por meio da utilização de vários níveis tróficos.

Assim, o presente estudo confirmou a necessidade de aumentar os esforços de investigação no sentido de prospectar possíveis microrganismos mineralizadores e otimizar as condições de cultivo para assegurar que se estabeleça o processo de mineralização do fármaco. Um arcabouço teórico robusto na área da degradação do DCF por microrganismos permitirá inferir o potencial real dos processos biológicos utilizando microrganismos para degradação de fármacos nas estações de tratamento de esgoto, os quais poderiam ser aplicados posteriormente aos processos físico-químicos.

## REFERÊNCIAS

- AISSAOUI, S.; OULED-HADDAR, H.; SIFOUR, M.; HARROUCHE, K.; SGHAIER, H. Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 isolated from activated sludge. *Current Microbiology*, v. 75, n. 3, p. 381-388, mar. 2017.
- AQUINO, S.F.; BRANDT, E.M.F.; CHERNICHARO, C.A.L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão de literatura. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, [online], v. 18, n.3, p. 187-204, jul./set. 2013.
- AZUBUIKE, C.C.; CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 180, p. 1-18, 2016.
- BESSA, V.S.; MOREIRA, I.S.; TIRITAN, M.E.; CASTRO, P.M.L. Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 120, p. 135-142, mai. 2017.
- BORGES, R.M.; MINILLO, A.; LEMOS, D.G.M.; PRADO, H.F.A.; TANGERINO, E.P. Uso de filtros de carvão ativado granular associado a microrganismos para remoção de fármacos no tratamento de água de abastecimento. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, [online], v. 21, n. 4, p. 709-720, out./dez. 2016.
- CORCORAN, J., WINTER, M.J.; TYLER, C.R. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 40, n. 4, p. 287-304, abr. 2010.
- CUKLEV, F.; KRISTIANSSON, E.; FICK, J.; ASKER, N.; FÖRLIN, L.; LARSSON, D.G.J. Diclofenac

in fish: blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, n. 9, p. 2136-2134, set. 2011.

CRUZ-ORNELAS, R.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, J.E.; AMAYA-DEGADO, L.; GUILLÉN-NAVARRO, K.; CALIXTO-ROMO, A. Biodegradation of NSAIDs and their effect on the activity of ligninolytic enzymes from *Pleurotus djamor*. *3 Biotech*, v. 9, n. 373, p. 1-8, out. 2019.

DENG, Y.; LI, B.; YU, KE.; ZHANG, T. Biotransformation and adsorption of pharmaceutical and personal care products by activated sludge after correcting matrix effects. *Science of The Total Environment*, v. 544, p. 980-986, fev. 2016.

DESBIOLLES, F.; MALLERT, L.; TILIACOS, C.; WONG-WAH-CHUNG, P.; LAFFONT-SCHWOB, I. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Science of The Total Environment*, v. 639, p. 1334-1348, out. 2018.

DESCHAMPS, E.; VASCONCELOS, O.; LANGE, L.; DONNICI, C.L.; SILVA, M.C.; SALES, J.A. Management of effluents and waste from pharmaceutical industry in Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 48, n. 4, out./dez. 2012.

DOMARADZKA, D.; GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYNSKA, D. Toxicity of diclofenac and its biotransformation by *Raoultella* sp. DD4. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 25, n. 5, p. 2211-2216, 2016.

ESCHER, M.A.S.; AMÉRICO-PINHEIRO, J.H.P.; TORRES, N.H.; FERREIRA, L.F.R. A problemática ambiental da contaminação dos recursos hídricos por fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, Rio de Janeiro, n. 51, p. 141-148, mar. 2019

FACEY, S.J.; NEBEL, B.A.; KONITNY, L.; ALLGAIER, M.; HAUER, B. Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms. *Environmental Technology & Innovation*, v. 10, p. 55-61, mai. 2018.

FEITO, R.; VALCÁRCCEL, Y.; CATALÀ, M. Biomarker assessment of toxicity with miniaturised bioassays: diclofenac as a case study. *Ecotoxicology*, v. 12, n. 1, p. 289-296, jan. 2012.

FERRARI, B.; PAXÉUS, N.; GIUDICE, R.L.; POLLIO, A.; GARRIC, J. Ecotoxicological impact of pharmaceutical found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55, n. 3, p. 359-370, jul. 2003.

FONTES, M.K.; GUSSO-CHOUERI, P.K.; MARANHÃO, L.A.; ABESSA, D.M.S.; MAZUR, W.A.; CAMPOS, B.G.; GUIMARÃES, L.L.; TOLEDO, M.S.; LEBRE, D.; MARQUES, J.R.; FELICIO, A.A.; CESAR, A.; ALMEIDA, E.A.; PEREIRA, C.D.S. A tired approach to assess effects of diclofenac on the brown mussel *Perna perna*: a contribution to characterize the hazard. *Water Research*, v. 132, p. 361-370, abr. 2018.

GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biocologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, n. 34, p. 36-43, jan./jun. 2005.

GRÖNING, J.; HELD, C.; GARTEN, C.; CLAUBNITZER, U.; KASCHABEK, S.R.; SCHLÖMANN, M. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*, v. 69, n. 4, p. 509-516, set. 2007.

HATA, T.; KAWAI, S.; OKAMURA, H.; NISHIDA, T. Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation*, v. 21, n. 5, p. 681-689, set. 2010.

HEBERER, T.; SCHMIDT-BÄUMLER, K.; STAN, H.J. Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I: drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, v. 26, n. 5, p. 272-278, dez. 1998.

HOEGER, B.; KÖLLNER, B.; DIETRICH, D.R.; HITZFELD, B. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*, v. 75, n. 1, p. 53-64, out. 2005.

- IVSHINA, I.B.; TYUMINA, E.A.; KUZMINA, M.V.; VIKHAREVA, E.V. Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1-13, jun. 2019.
- KRZMARZICK, M.J.; TAYLOR, D.K.; FU, X.; MCCUTCHAN, A.L. Diversity and niche of archaea in bioremediation. *Archaea*, p. 1-17, set. 2018.
- LANGENHOFF, A.; INDERFURTH, N.; VEUSKENS, T.; SCHRAA, G.; BLOKLAND, M.; KUJAWA-ROELEVELD, K.; RIJNAARTS, H. Microbial removal of the pharmaceutical compound's ibuprofen and diclofenac from wastewater. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-9, nov. 2013.
- LI, Y.; DING, J.; ZHANG, L.; LIU, X.; WANG, G. Occurrence and ranking of pharmaceuticals in the major rivers of China. *Science of The Total Environment*, v. 696, p. 1-12, dez. 2019.
- LIU, H.; LAM, J.C.W.; LI, W.; YU, H.; LAM, P.K.S. Spatial distribution and removal performance of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment plants in China. *Science of The Total Environment*, v. 586, p. 1162-1169, mai. 2017.
- LONAPPAN, L.; BRAR, S.K.; DAS, R.K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R.Y. Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity – a review. *Environment International*, v. 96, p. 127-138, nov. 2016.
- MACHADO, K.M.G.; NASCIMENTO, E.A.; ARAUJO, J.C.S.B. Aplicação da biorremediação no Estado de São Paulo. *Revista Leopoldianum*, Santos, v. 42, n. 166-118, 2016.
- MARCO-URREA, E.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; CRUZ-MORATÓ, C.; CAMINAL, G.; VICENT, T. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, v. 176, n. 1-3, p. 836-842, abr. 2010.
- MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Biorremediação: potencial de aplicação para POPs. In: FERNICOLA, N. A. G.; Oliveira, S. S. (Org.). Poluentes orgânicos persistentes: POPs. CRA (Intertox): *Cadernos de referência ambiental*, v. 13. Salvador: CRA, 2002. 500p.
- MELO, S.A.S.; TROVÓ, A.G.; BAUTITZ, I.R.; NOGUEIRA, R.F.P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.
- MEEBURG, F.; HENNEBEL, T.; VANHAECKE, L.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. Diclofenac and 2-anilinophenylacetate degradation by combined activity of biogenic manganese oxides and silver. *Microbial Biotechnology*, v. 5, n. 3, p. 388-395, mai. 2012.
- MOREIRA, I.S.; BESSA, V.S.; MURGOLO, S.; PICCIRILLO, C.; MASCOLO, G.; CASTRO, P.M.L. Biodegradation of diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 152, p. 104-113, mai. 2018.
- NIETO, E.; CORADA-FERNÁNDEZ, C.; HAMPEL, M.; LARA-MARTÍN, P.A.; SÁNCHEZ-AGÜELLO, P.; BLASCO, J. Effects of exposure to pharmaceuticals (diclofenac and carbamazepine) spiked sediments in the midge, *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Science of The Total Environment*, v. 609, p. 715-723, dez. 2017.
- NGUYEN, L.N.; HAI, F.I.; YANG, S.; KANG, J.; LEUSCH, F.D.L.; RODDICK, F.; PRICE, W.E.; NGHIEM, L.D. Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresource Technology*, v. 148, p. 234-241, 2013.
- OLICÓN-HERNÁNDEZ, D.R.; CAMACHO-MORALES, R.L.; POZO, C.; GPMZÁLEZ-LÓPEZ, J.; ARANDA, E. Evaluation of diclofenac biodegradation by the ascomycete fungus *Penicillium oxalicum* at flask and bench bioreactor scales. *Science of The Total Environment*, v. 662, p. 605-614, abr. 2019.
- OSORIO-LOZADA, A.; SURAPANENI, S.; SKILES, G.L.; SUBRAMANIAN, R. Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: case study of diclofenac metabolism by Actinoplanes species. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 36, n. 2, p. 234-240, fev. 2008.
- PALLI, L.; CASTELLET-ROVIRA, F.; PÉREZ-TRUJILLO, M.; CANIANI, D.; SARRÀ-ADROGUER, M.; GORI, R. Preliminary evaluation of *Pleurotus ostreatus* for the removal of selected pharmaceuticals from hospital wastewater. *Biotechnology Progress*, v. 33, n. 6, p. 1529-1537, nov. 2017.
- PALYZOVÁ, A.; ZAHRADNÍK, J.; MARESOVÁ, H.; SOKOLOVÁ, L.; KYSLÍKOVÁ, E.; GRULICH,

M.; STEPÁNEK, V.; REZANKA, T.; KYSLÍK, P. Potential of the strain *Raoultella* sp. KDF8 for removal of analgesics. *Folia Microbiologica*, v. 63, n. 3, p. 273-282, 2018.

PARLAMENTO EUROPEU e Conselho da União Europeia. Diretiva 2013/39/UE, 12 de agosto de 2013. Alteração das Diretivas 2000/60/CE no que diz respeito às substâncias prioritárias no domínio da política da água. *Jornal Oficial da União Europeia*, Bruxelas, 24 ago. 2013.

PATEL, N.; KHAN, M.D.Z.A.; SHAHANE, S.; RAI, D.; CHAUHAN, D.; KANT, C.; CHAUDHARY, V.K. Emerging pollutants in aquatic environment: source, effect, and challenges in biomonitoring and bioremediation – a review. *Pollution*, v. 6, n. 1, p. 99-113, 2020.

PEREIRA, C.D.S.; MARANHO, L.A.; CORTEZ, F.S.; PUSCEDDU, F.H.; SANTOS, A.R.; RIBEIRO, D.A.; CESAR, A.; GUIMARÃES, L.L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of The Total Environment*, v. 548-549, p. 148-154, abr. 2016.

PEREIRA, A.; SILVA, L.; LARANJEIRO, C.; LINI, C.; PENA, A. Selected pharmaceuticals in different aquatic compartments: part I – source, fate and occurrence. *Molecules*, v. 25, n. 5, p. 1-33, fev. 2020a.

\_\_\_\_\_. Selected pharmaceuticals in different aquatic compartments: part II – toxicity and environmental risk assessment. *Molecules*, v. 25, n. 8, p. 1-31, abr. 2020b.

RADJENOVIC, J.; PETROVIC, M.; BARCELÒ, D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, v. 43, n. 3, p. 831-841, fev. 2009.

REIS FILHO, R.W.; BAREIRO, J.C.; VIEIRE, E.M.; CASS, Q.B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. *Revista Ambiente & Água*, Taubaté, v. 2, n. 3, p. 54-61, 2007.

RIBAS, J.L.C.; ZAMPRONIO, A.R.; ASSIS, H.C.S. Effects of trophic exposure to diclofenac and dexamethasone on hematological parameters and immune response in freshwater fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 4, p. 975-982, abr. 2016.

\_\_\_\_\_. Inhibition of immune responses and related proteins in *Rhamdia quelen* exposed to diclofenac. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, n. 8, p. 2092-2107, ago. 2017.

RODARTE-MORALES, A.I.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M.T.; LEMA, J.M. Biotransformation of three pharmaceutical active compounds by the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in a fed batch stirred reactor under air and oxygen supply. *Biodegradation*, v. 23, n. 1, p. 145-156, fev. 2012.

SCHWAIGER, J.; FERLING, H.; MALLOW, U.; WINTERMAYR, H.; NEGELE, R.D. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, v. 68, n. 2, p. 141-150, jun. 2004.

SILVA, C.G.A.; COLLINS, C.H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

STENHOLM, A.; HEDELAND, M.; ARVIDSSON, T.; PETTERSSON, C.R. Removal of diclofenac from a non-sterile aqueous system using *Trametes versicolor* with an emphasis on adsorption and biodegradation mechanisms. *Environmental Technology*, v. 40, n. 19, p. 2460-2472, 2019.

STIERLIN, H.; FAIGLE, J.W. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile. *Xenobiotica*, v. 9, n. 10, p. 611-621, out. 1979.

STUMPF, M.; TERNES, T.A.; WILKEN, R.D.; RODRIGUES, S.V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural water in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of The Total Environment*, v. 225, n. 1-2, p. 135-141, jan. 1999.

THOMAIDI, V.S.; STASINAKIS, A.S.; BOROVA, V.L.; THOMAIDIS, N.S. Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, p. 740-747, fev. 2015.

TIBURTIUS, E.R.L.; SCHEFFER, E.W.O. Triclosan: destino no meio ambiente e perspectivas no tratamento de águas de abastecimento público. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 5, p. 1144-1159, set./out. 2014.

TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; HEYD, A.; EIKEMPER, R.; KÖHLER, H.R.; SCHWAIGER, J. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, v. 68, n. 2, p. 151-166, jun. 2004.

TROMBINI, C.; HAMPEL, M.; BLASCO, J. Assessing the effect of human pharmaceuticals (carbamazepine, diclofenac and ibuprofen) on the marine clam *Ruditapes philippinarum*: an integrative and multibiomarker approach. *Aquatic Toxicology*, v. 208, p. 146-156, mar. 2019.

WEBSTER, R.; PACEY, M.; WINCHESTER, T.; JOHSON, P.; JEZEQUEL, S. Microbial oxidative metabolism of diclofenac: production of 4-hydroxydiclofenac using *Epiccocum nigrum* IMI354292. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 49, p. 371-376, abr. 1998.

WU, G.; GENG, J.; LI, S.; LI, J.; FU, Y.; XU, K.; REN, H.; ZHANG, X. Abiotic and biotic processes of diclofenac in enriched nitrifying sludge: kinetics, transformation products and reactions. *Science of The Total Environment*, v. 683, p. 80-88, 2019.

### **ABSTRACT**

The continuous insertion of pharmaceuticals into the environment requires new technological strategies to remove them from domestic and industrial wastewater. With the objective of knowing the recent state of the art on the biodegradation of diclofenac, the present work allowed us to identify the current stage of research on the biodegradation of this drug by microorganisms, confirming the need to increase research efforts for the prospection of mineralizing microorganisms. It also contributed to alerting about the importance of studies opting for a robust experimental design, aiming to prove the action of the microorganism in the drug, through the inclusion of adequate abiotic controls, and the safety of the process, through the evaluation of acute and chronic toxicity, in several trophic levels.

### **KEYWORDS**

Biodegradation of pharmaceutical drugs. Emerging contaminants. Bioremediation.

