

II-450 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE CARBAMAZEPINA E 17 α -ETINILESTRADIOL POR FUNGOS LIGNOLÍTICOS

Ivan José Santana Santos⁽¹⁾

Biólogo pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Mestrando em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Alexandre Nunes Ponezi⁽²⁾

Biólogo pelo Centro Universitário Hermínio Ometto. Mestre em Tecnologia de Alimentos pela UNICAMP. Doutor em Engenharia Civil pela UNICAMP. Pesquisador do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

Adilson Sartoratto⁽³⁾

Químico pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Mestre em Química pela UNICAMP. Doutor em Química pela UNICAMP. Pesquisador do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/UNICAMP).

Lucia Regina Durrant⁽⁴⁾

Engenheira de Alimentos pela UNICAMP. Mestre em Engenharia de Alimentos pela UNICAMP. Doutora em Biotecnologia pela Universidade de Surrey (Inglaterra). Professora Associada MS-5 UNICAMP.

Endereço⁽¹⁾: Rua Teresa Bonato Signori, 56 – Jardim Santa Genebra II - Campinas - SP - CEP: 13084-777 - Brasil - Tel: (19) 8844-9919 - e-mail: ivanj_ssantos@yahoo.com.br

RESUMO

17 α -etinilestradiol (EE2, estrogênio sintético), carbamazepina (CBZ, antiepiléptico) são substâncias farmacêuticas muito utilizadas em todo o mundo e vêm sendo frequentemente detectadas em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's) e águas naturais em vários países, inclusive no Brasil. A grande preocupação da presença de resíduos desses fármacos na água potável e nos ambientes aquáticos são os potenciais efeitos adversos para a saúde humana e animal.

O presente trabalho avaliou o potencial de fungos lignolíticos (duas linhagens de *Pleurotus* sp. e uma linhagem ainda não identificada - BNI) para degradar EE2 e CBZ, individualmente. Todas as três linhagens foram capazes de degradar totalmente o EE2, após 7 dias de incubação, tanto na ausência quanto na presença de uma outra fonte de carbono (glicose). Enquanto o EE2 foi extensivamente degradado por todas as linhagens, apenas BNI (basidiomiceto não identificado) foi capaz de degradar a CBZ, na presença de glicose no meio, numa percentagem significativa (28%).

PALAVRAS-CHAVE: Biodegradação, fungos lignolíticos, fármacos, estrógenos.

INTRODUÇÃO

A detecção de fármacos em diversos corpos d'água em todo mundo vem chamando muita atenção nos últimos anos. Esses compostos podem atingir ambientes aquáticos por diferentes rotas; atualmente é aceito que a principal forma de contaminação é representada por efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETE's), seja de 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.

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, inclusive o homem. Pouco se sabe ainda acerca dos efeitos causados por fármacos presentes no meio ambiente. Vários autores sugerem que o principal problema está nas possíveis interações desses fármacos com os micro-organismos presentes nos ambientes aquáticos e terrestres. Além disso, a seleção de bactérias resistentes a antibióticos e a desregulação hormonal são efeitos toxicológicos proporcionados por fármacos que estão diretamente ligados à saúde humana.

Diversas formas de se evitar que fármacos atinjam águas naturais vêm sendo estudadas e desenvolvidas. O emprego de processos de sorção, processos químicos, fotoquímicos e processos de biodegradação são as formas que têm sido mais estudadas.

Fungos lignolíticos, ou de degradação branca, são um grupo de micro-organismos capazes de despolimerizar e mineralizar aerobicamente a lignina. Esses fungos produzem enzimas intracelulares (como o complexo citocromo-P450) e extracelulares (como as lacases), as quais possuem uma baixa especificidade pelo substrato e são capazes de degradar também uma grande variedade de compostos xenobióticos. Essa capacidade de degradar compostos recalcitrantes os torna 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. Dessa forma, a possibilidade de aplicação dessas enzimas no tratamento de efluentes vem despertando interesse de muitos pesquisadores, uma vez que elas podem ser produzidas em grandes quantidades e com baixo custo, devido aos grandes avanços biotecnológicos que vêm ocorrendo nos últimos anos. Além da utilização das enzimas, imobilizadas ou não, a utilização dos fungos imobilizados também é uma alternativa a ser avaliada para o tratamento de efluentes.

O 17 α -etinilestradiol (EE2) é o principal estrogênio sintético, sendo encontrado nas pílulas anticoncepcionais e aplicado nas terapias de reposição hormonal. Esse composto é um dos interferentes endócrinos mais importantes encontrado no ambiente aquático, devido ao fato de ser altamente estrogênico e resistente à biodegradação. A carbamazepina (CBZ) é um antiepiléptico muito utilizado em todo o mundo. Essas drogas foram selecionadas para esse trabalho devido à baixa biodegradabilidade e ao alto consumo e detecção em ETE's.

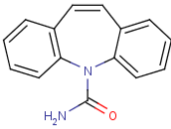
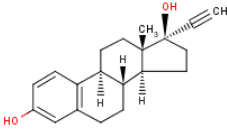
Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de fungos lignolíticos para a degradação do fármaco CBZ e do hormônio EE2.

MATERIAIS E MÉTODOS

FÁRMACOS

CBZ e EE2 foram os compostos estudados nesse trabalho. Esses compostos foram adquiridos na forma pura (grau HPLC) e informações relevantes sobre eles estão presentes na Tabela 1. Uma solução estoque de CBZ 2 g.L⁻¹ foi preparada em etanol enquanto que de EE2 1 g.L⁻¹ foi preparada em acetona.

Tabela 1: Características dos fármacos.

Propriedades Físicas	Carbamazepina	17 α -etinilestradiol
Número CAS	298-46-4	57-63-6
Fórmula molecular	C15-H12-N2-O	C20-H24-O2
Ponto de Fusão (°C)	190,2	183
Solubilidade (mg.L ⁻¹)	17,7	11,3
Estrutura Química		

LINHAGENS E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

Pleurotus sp. P1, *Pleurotus ostreatus* BS e uma linhagem de basidiomiceto ainda não identificada (BNI) foram as linhagens utilizadas nesse trabalho. Esses micro-organismos foram obtidos da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (FEA/UNICAMP).

As cepas fúngicas foram mantidas em placas de Petri contendo meio PDA (extrato de batata 4 g.L⁻¹; dextrose 20 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹). Repiques periódicos foram realizados para a manutenção das culturas em atividade.

SELEÇÃO DOS FUNGOS LIGNOLÍTICOS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os fungos lignolíticos foram avaliados quanto à capacidade de degradar os fármacos em estudo. Nesses experimentos, foi avaliada tanto a capacidade desses micro-organismos em crescer em meio mineral com os fármacos como única fonte de carbono e energia (catabolismo), quanto num meio com uma fonte de carbono mais disponível acrescido dos fármacos em concentrações menores (cometabolismo). Esses experimentos foram realizados para cada fármaco e cada micro-organismo individualmente.

O Meio mineral utilizado nesses experimentos tem a seguinte composição: 0,5g Na_2HPO_4 ; 0,8g KH_2PO_4 ; 0,3g K_2HPO_4 ; 0,3g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1mL da solução de vitaminas e 10mL da solução de metais; em 1000 mL de água destilada estéril. A solução de vitaminas é composta de biotina 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ácido fólico 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; tiamina HCl 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; riboflavina 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; piridoxina HCl 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; cianocobalamina 0,10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ácido nicotínico 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; DL-pantotenato de cálcio 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; ácido tiótico 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A solução de metais é composta de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

A esse meio foram adicionados os fármacos nas concentrações descritas na Tabela 2 e nos ensaios de cometabolismo foi adicionado ainda glicose para uma concentração final de 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, a partir de uma solução estoque 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 visando à obtenção das concentrações desejadas (Tabela 2). Os frascos foram inoculados com 2 fragmentos de 1cm² do ágar-micélio (fungo crescido no meio PDA). Após a inoculação, os frascos foram fechados utilizando-se tampões de algodão. O experimento foi conduzido em duplicata e a incubação ocorreu em agitador orbital, a 90 rpm, a 30°C. Os frascos foram divididos em dois grupos onde a cada 7 dias um dos grupos foi removido para a quantificação da degradação dos compostos. Um controle não-inoculado e um controle onde o micro-organismo foi inativado por autoclavagem após seu crescimento por 7 dias na ausência do fármaco foram realizados. O primeiro controle foi realizado para monitorar a degradação abiótica dos compostos, enquanto o segundo controle foi realizado com o intuito de se avaliar a possível adsorção do fármaco na biomassa celular. Todos os frascos foram pesados antes de serem incubados e após o período de incubação. A diferença de peso entre as duas medidas foi considerada como perda de água por evaporação, sendo esta diferença corrigida com adição de água destilada aos frascos antes da retirada das alíquotas para quantificação da degradação.

As concentrações dos fármacos mencionadas na Tabela 2 apresentam valores muito acima do que é esperado de se encontrar em amostras ambientais, no entanto estas concentrações foram selecionadas para possibilitar o desenvolvimento dos micro-organismos a serem testados, ressaltando-se a baixa solubilidade desses compostos em meios aquosos.

A quantificação da degradação dos fármacos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). 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 Waters 2996 e software Empower, 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 (triethylamina) e 20% de metanol. A eluição das amostras foi realizada com uma vazão de FM de 1 mL/min e detecção a 280 nm. 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 mistura de água e acetonitrila (50:50), sendo a eluição das amostras realizada numa vazão de FM de 0,6 mL/min e a detecção ocorreu a 280 nm.

Tabela 2. Concentrações ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) dos fármacos em estudo.

Fármaco	Catabolismo	Cometabolismo
17 α -etinilestradiol	10	7
Carbamazepina	15	10

RESULTADOS

Os resultados da degradação de carbamazepina estão demonstrados nas Tabelas 3, 4 e 5. A biodegradação da CBZ foi examinada durante um período de 14 dias. Valores significativos de biodegradação da CBZ ocorreram apenas quando se utilizou a cepa BNI com a presença de glicose no meio (cometabolismo). Valores significativos de degradação abiótica e de adsorção na biomassa micelial não foram detectados para esse composto (Tabela 3).

Tabela 3. Degradação de Carbamazepina por P1

Processo	Ensaio	T0 dias	T7 dias	T14 dias	% de degradação
	Controle abiótico	14,7	-	14,57	1
Catabolismo	Controle autoclavado	0	13,49	17,29	0
	Ensaio de degradação	12,27	12,08	11,7	5
	Controle abiótico	9,55	-	9,27	3
Cometabolismo	Controle autoclavado	0	9,37	10,79	0
	Ensaio de degradação	9,18	9,06	8,82	4

Tabela 4. Degradação de Carbamazepina por BNI

Processo	Ensaio	T0 dias	T7 dias	T14 dias	% de degradação
	Controle abiótico	14,7	-	14,57	3
Catabolismo	Controle autoclavado	0	14,95	14,81	1
	Ensaio de degradação	15,19	15,42	14,61	4
	Controle abiótico	9,55	-	9,27	3
Cometabolismo	Controle autoclavado	0	9,66	10,29	0
	Ensaio de degradação	9,77	7,9	7,02	28

Tabela 5. Degradação de Carbamazepina por BS

Processo	Ensaio	T0 dias	T7 dias	T14 dias	% de degradação
	Controle abiótico	14,38	-	16,32	0
Catabolismo	Controle autoclavado	0	16,68	16,35	0
	Ensaio de degradação	15,21	16,42	14,99	1
	Controle abiótico	10,25	-	10,18	1
Cometabolismo	Controle autoclavado	0	11,64	11,41	2
	Ensaio de degradação	9,76	9,86	8,97	8

A CBZ é um fármaco bastante recalcitrante e vem sendo utilizado como fármaco modelo nesses tipos de estudo em vários trabalhos científicos. Além da biodegradação, estudos de processos químicos e fotoquímicos vêm sendo estudados, porém nenhuma destas técnicas ainda possibilita uma degradação significativa dessa droga, principalmente nos processos oxidativos avançados (POA's), onde já se foi detectada, por alguns pesquisadores, a formação de acridina após oxidação conferindo a esta droga uma maior toxicidade ambiental.

Quanto à biodegradação do EE2, foi observado que após o período de incubação de 7 dias, não foi detectada a presença de EE2 nos meios de cultivo com a presença de qualquer uma das três linhagens fúngicas utilizadas nesse trabalho, demonstrando que houve total degradação do composto, tanto na presença (cometabolismo) quanto na ausência (catabolismo) de glicose. Não foram detectados níveis significativos de degradação abiótica ou de adsorção no micélio autoclavado.

CONCLUSÕES

Esse trabalho demonstra que fungos lignolíticos, ou de podridão branca, são capazes de degradar a EE2 e CBZ, tornando-os potencialmente úteis no tratamento de águas residuais após o processo de oxidação da matéria orgânica. No entanto, mais estudos são necessários para a otimização do processo de biodegradação, como também para se avaliar o mecanismo de degradação (enzimas envolvidas no processo) e a toxicidade dos metabólitos gerados.

A presença de micropoluentes bioativos, como fármacos e hormônios, no ambiente aquático tem gerado grande preocupação devido aos potenciais efeitos adversos para a saúde humana e animal principalmente no caso do EE2 sendo este um interferente endócrino. Devido às baixas concentrações (ppb ou ppt) e à alta recalcitrância desses compostos tornam ineficientes as atuais plantas de tratamento de água e esgoto na sua remoção. A obtenção de espécies de micro-organismos capazes de degradar micropoluentes bioativos pode possibilitar o emprego desses organismos, ou suas enzimas imobilizadas, como coadjuvantes nos atuais sistemas de tratamento de água e esgoto.

Estudos de avaliação do mecanismo de degradação (processos enzimáticos) e avaliações ecotoxicológicas estão sendo conduzidos no momento para um melhor entendimento do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BILA, D. M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. 2003. Química Nova 26, Nº 4, 523-530.
2. BLÁNQUEZ, P., GUIEYSSE, B. 2008. Continuous biodegradation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. Journal of Hazardous Materials 150, 459-462.
3. CAJTHAML, T., KRESINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., MÖDER, M. 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. Chemosphere 75, 745-750.
4. COELHO, A. D. 2008. Degradação dos antiinflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno por ozonização. 214p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
5. FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology 76, 122-159.
6. GAUTHIER, H., YARGEAU, V., COOPER, D. G. 2010. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by cometabolism. Sci. Total Environ., doi:10.1016/j.scitotenv.2009.12.012.
7. KARAM, J., NICELL J. A. 1997. Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol. 69, 141-153.
8. MARCO-URREA, E., PÉREZ-TRUJILLO, M., VICENT, T., CAMINAL, G. 2009. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. Chemosphere 74, 765-772.
9. TAMBOSI, J. L. 2008. 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
10. WEN, X., JIA, Y., LI, J. 2009. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* – A white rot fungus. Chemosphere 75, 1003-1007.
11. ZHANG, Y., GEIBEN, S. 2009. In vitro degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase. J.Hazard. Mater., doi:10.1016/j.jhazmat.2009.10.133.