

II-442 - BIORREMEDIAÇÃO DO PROPOFOL CATALISADA POR *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 PARA TRATAMENTO DE EFLUENTES

Pedro Henrique de Oliveira Carvalho⁽¹⁾

Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás e Farmacêutico Generalista também pela UFG. Técnico em Sistema de Saneamento na SANEAGO (Saneamento de Goiás).

Evilanna Lima Arruda⁽²⁾

Doutora em Inovação Farmacêutica pela UFG

Kamila Bohne Japiassul⁽³⁾

Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás

Paula Letícia de Melo Souza⁽⁴⁾

Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás

Endereço: Av. Ver. José Monteiro, 1953 - Setor Negrão de Lima, Goiânia - GO, 74650-300, Brasil. Tel: +55 (62) 98511-8725 e-mail: pedrofarmaciauc@gmail.com

RESUMO

A liberação indiscriminada de efluentes não tratados no solo e nas águas é uma das principais preocupações de saúde em todo o mundo, com efeitos duradouros no ecossistema. Os fármacos lançados no meio ambiente por meio das excretas ou do descarte indevido são classificados como poluentes emergentes. Esses xenobióticos, como não são completamente metabolizados pelo organismo, são excretados nas águas residuais, chegando às estações de tratamento, e por não serem totalmente degradados, são liberados no meio ambiente. Os métodos de remoção físicos convencionais ou tratamento biológico geralmente atingem apenas uma degradação parcial. Fungos filamentosos têm sido utilizados na remoção sustentável de poluentes em áreas contaminadas. *Cunninghamella* é um fungo filamentoso capaz de transformar xenobióticos em compostos menos tóxicos. O propofol é um fármaco anestésico amplamente utilizado e com biotransformação hepática reduzida, sendo grande parte excretada de maneira inalterada, tornando uma preocupação de contaminação dos corpos hídricos. O objetivo do presente trabalho foi realizar a biorremediação do propofol catalisada por *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 para tratamento de efluentes. A cepa foi cultivada em meio líquido com posterior adição de propofol. Ao final de 24 horas, análise de espectrometria de massa em alta resolução confirmou a ausência de propofol no meio reacional com a presença de um derivado inativo de íon molecular $[M + Na]^+$ m/z de valor 363,17813 (1-hidroxipropofol-glicosídeo). Foi possível biorremediar o propofol utilizando o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 como catalizador em condições brandas de reação.

PALAVRAS-CHAVE: Biorremediação, *Cunninghamella*, tratamento de efluentes.

INTRODUÇÃO

O crescimento dos números de indústrias tem aumentado consideravelmente a descarga de resíduos para o meio ambiente, principalmente solo e água. A liberação indiscriminada de efluentes não tratados no solo e nas águas é uma das principais preocupações de saúde em todo o mundo, com efeitos duradouros no ecossistema (SALEM; EWEIDA; FARAQ, 2000). Muitos dos compostos encontrados próximos a essas indústrias são tóxicos mesmo em concentrações muito baixas além de apresentarem propriedades carcinogênicas e mutagênicas na natureza (AHLUWALIA; GOYAL, 2007).

Um poluente emergente é um produto químico ou material caracterizado por uma potencial ameaça real ou percebida, para a saúde humana ou para o ambiente ou por uma falta de padrões de saúde publicados. Um poluente também pode ser "emergente", devido à descoberta de uma nova fonte ou de uma nova via de contato para os seres humanos (EPA, 2013).

Existem vários tipos de compostos ditos poluentes emergentes, como um dos mais preocupantes se destacam os fármacos e os resíduos de produtos de higiene pessoal. Os fármacos são lançados no meio ambiente por

meio das excretas ou do descarte indevido e agem de formas específicas nos organismos podendo afetar até a reprodução. Da mesma forma, os resíduos de produtos de higiene pessoal muitas vezes têm ação bactericida, que pode ser altamente tóxica aos organismos vivos. (SCHWARZENBACH *et al.*, 2016; SODRÉ *et al.*, 2010) Fármacos, tais como os da classe dos hormônios, antibióticos, anestésicos e antineoplásicos, são os principais contaminantes em efluentes de esgoto e sua presença na água pode interferir com hormônios endógenos (LLORET *et al.*, 2010). Esses xenobióticos, como não são completamente metabolizados pelo organismo, são excretados nas águas residuais, chegando às estações de tratamento, e por não serem totalmente degradados, são liberados no meio ambiente (ESPLUGAS *et al.*, 2007).

A degradação deste tipo de compostos implica um importante desafio ecológico devido às suas estruturas complexas e de baixa biodisponibilidade (LLORET *et al.*, 2010). Os métodos de remoção físicos convencionais ou tratamento biológico geralmente atingem apenas uma degradação parcial (GUEDES MANIERO; MAIA BILA; DEZOTTI, 2008). Alguns processos de tratamento avançados (por exemplo: ozonização, processos oxidativos e osmose reversa) removem os contaminantes de águas residuais de forma eficaz; no entanto, essas tecnologias apresentam diversas desvantagens importantes, tais como os custos elevados, metodologias demoradas e formação de resíduos tóxicos (CÉDAT *et al.*, 2016) Assim, novos processos são necessários para tratar esses efluentes de uma maneira custo-benefício efetiva.

Fungos filamentosos têm sido utilizados para a produção de medicamentos, processos fermentativos e degradação natural de resíduos ambientais. Os fungos podem ajudar a resolver problemas difíceis para a química, como a funcionalização de carbonos não ativados, a produção de novos protótipos a fármacos e na remoção sustentável de poluentes em áreas contaminadas (MAIA *et al.*, 2015; TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Cunninghamella é um fungo filamentoso encontrado no solo e material vegetal, particularmente em zonas mediterrânicas e subtropicais, não patogênico ao ser humano (ASHA; VIDYAVATHI, 2009). Estudos tem provado que *Cunninghamella* tem enzimas sinônimas daqueles envolvidos na desintoxicação xenobiótica em mamíferos (SUN *et al.*, 2004) tornando este micro-organismo muito útil em estudos de biorremediação (PANNOCCHIA *et al.*, 2010) por transformar xenobióticos em compostos menos tóxicos (PINEDO-RIVILLA; ALEU; COLLADO, 2009).

O propofol (2,6 diisopropilfenol) (figura 1) é um fármaco pertencente a classe dos agentes anestésicos injetáveis sendo um dos mais amplamente utilizados em pacientes humanos e veterinários (VISHNE *et al.*, 2005). Por possuir características farmacocinéticas de rápido início de ação, biotransformação hepática reduzida e reduzidos efeitos cumulativos, se tornou o agente de escolha para indução e manutenção anestésica em humanos e nos animais domésticos, como uma alternativa à anestesia inalatória (DOGAN *et al.*, 2011). Existem evidências de que seus metabólitos conhecidos sejam desprovidos de atividade clinicamente significativa (BRAY, 2002), porém a grande preocupação está nas altas concentrações desse fármaco excretadas de maneira inalterada, contaminando os corpos hídricos.

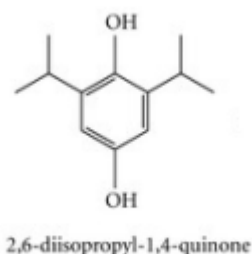


Figura 1: Estrutura química do Propofol

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi realizar a biorremediação do propofol catalisada por *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 para tratamento de efluentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 oriunda da coleção American Type Culture Collection (ATCC) foi conservada em ágar batata inclinado e armazenada em refrigerador a entre 2 e 4 °C. Antes do uso, a cepa foi repicada com solução de glicerol estéril 25% v/v em ágar batata e incubado a 27°C por 7 dias em câmara germinativa para crescimento da cultura. Após este período, verificou-se o aspecto macroscópico da colônia para confirmar o crescimento adequado sem possíveis contaminações.

Erlenmeyers de boca larga com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido de cultura *Potato dextrose soy medium* - PDSM, foram semeados com uma gota de esporos ressuspensos do ágar batata inclinado e mantidos em incubadora rotativa, a 27 °C, 200 rpm, por 65 horas. Durante esse período, foram observadas as características morfológicas das cepas, bem como temperatura e agitação.

Após o crescimento fúngico, foi adicionado o Propofol ao meio reacional. Ao final de 24 horas, a amostras com meio de cultivo foi filtrada com membrana de 0,45µm, 13mm para análise de espectrometria de massa em alta resolução

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o repique da cepa, foi verificada a viabilidade do crescimento fúngico. A colônia se apresentou em aspecto algodinoso como confirmado pela característica morfológica da espécie em questão.



Figura 2: *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 após o repique e crescimento por sete dias.

Foi então inoculada uma gota contendo esporos no meio de cultura líquido. Após 65 horas, o halo de crescimento presente no *erlenmeyer* (figura 3) confirmou o crescimento do micro-organismo no meio reacional líquido. O aspecto macromorfológico foi de *pellets* aglomerados.



Figura 3: Meio reacional líquido

No espectro obtido por Espectrometria de massas em alta resolução foi possível verificar a ausência de propofol ao fim das 24 horas e identificar um íon molecular $[M + Na]^+$ m/z de valor 363,17813 (Figura 4). A partir de um programa para análise qualitativa dos dados foi possível propor estruturas dos derivados com erros menores que 1ppm. Caracterizou-se a presença de um grupamento hidroxil e uma molécula de glicose no

produto de partida. O produto majoritário de degradação formado foi o 1-hidroxipropofol-glicosídeo, como ilustrado na figura 5.

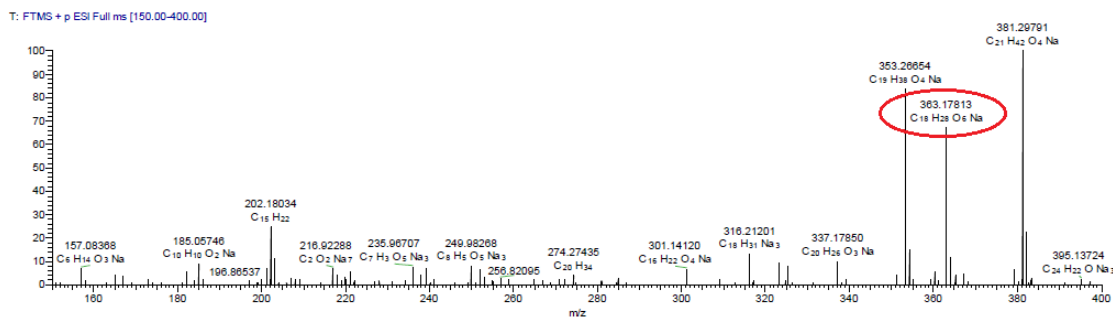


Figura 4: Presença do íon m/z 363.17813 com fórmula molecular $C_{18}H_{28}O_6Na$ identificado como 1-hidroxipropofol-glicosídeo e a ausência do íon m/z 178.13576 referente ao composto de partida, propofol - $C_{12}H_{18}O$.

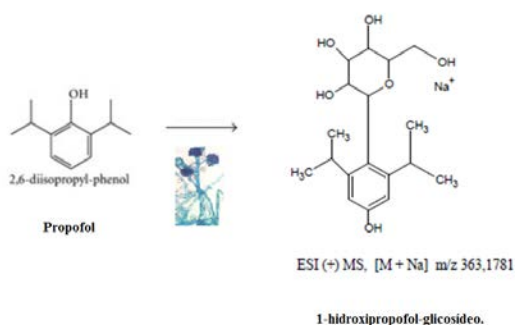


Figura 5: Produto formado pelo consumo do propofol por *Cunninghamella elegans* ATCC 26169

CONCLUSÃO

Foi possível biorremediar o propofol utilizando o fungo filamentoso *Cunninghamella elegans* ATCC 26169 como catalizador. Ao final do tempo de 24 horas não foi confirmado por espectrometria de massas de alta resolução a ausência de propofol no meio reacional. Diante das condições brandas de reação, baixo custo e realização em uma única etapa, essa metodologia apresenta vantagens para ser utilizada como uma excelente alternativa para biorremediar xenobióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p. 2243–2257, 2007.
2. ASHA, S.; VIDYAVATHI, M. *Cunninghamella* - A microbial model for drug metabolism studies - A review. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 1, p. 16–29, 2009..
3. BRAY, R. J. The propofol infusion syndrome in infants and children: Can we predict the risk? *Current Opinion in Anaesthesiology*, v. 15, n. 3, p. 339–342, 2002.
4. CÉDAT, B. *et al.* Are UV photolysis and UV/H₂O₂ process efficient to treat estrogens in waters? Chemical and biological assessment at pilot scale. *Water Research*, v. 100, p. 357–366, 2016.
5. DOGAN, Z. *et al.* Comparação entre o Enflurano e o Propofol na Eletroconvulsoterapia: um Estudo Preliminar, Aleatório, Aberto e Cruzado sobre a Duração de Convulsões e a Recuperação Anestésica. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, n. 5, p. 582–590, 2011.
6. EPA- US Environmental Protection Agency. Emerging Contaminants and Federal Facility Contaminants of Concern. Federal Facilities Restoration and Reuse Office (FFRRO) 2013. <http://www.epa.gov/fedfac/documents/emerging_contaminants.htm>

7. ESPLUGAS, S. *et al.* Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *Journal of Hazardous Materials*, v. 149, n. 3, p. 631–642, 2007.
8. GUEDES MANIERO, M.; MAIA BILA, D.; DEZOTTI, M. Degradation and estrogenic activity removal of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. *Science of the Total Environment*, v. 407, n. 1, p. 105–115, 2008..
9. LLORET, L. *et al.* Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51, n. 3, p. 124–131, 2010.
10. MAIA, L. C. *et al.* Diversity of brazilian fungi. *Rodriguesia*, v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.
11. PANNOCCHIA, A. *et al.* Fungal Biosorption, An Innovative Treatment for the Decolourisation and Detoxification of Textile Effluents. *Water*, n. 2, p. 550–565, 2010.
12. PINEDO-RIVILLA, C.; ALEU, J.; COLLADO, I. Pollutants Biodegradation by Fungi. *Current Organic Chemistry*, v. 13, n. 12, p. 1194–1214, 2009.
13. SALEM, H. M.; EWEIDA, E. A.; FARAQ, A. Heavy Metals in Drinking Water and Their Environmental Impact on Human Health. *Icehm*, p. 542–556, 2000.
14. SCHWARZENBACH, R. P. *et al.* The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems Published by: American Association for the Advancement of Science Linked references are available on JSTOR for this article: The Challenge of Micropollutants ally used in industrial and consumer produc. v. 313, n. 5790, p. 1072–1077, 2016.
15. SODRÉ, F. F. *et al.* Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 96, n. 1, p. 92–98, 2010.
16. SUN, L. *et al.* Transformation of verapamil by *Cunninghamella blakesleeana*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 5, p. 2722–2727, 2004.
17. TAKAHASHI, J. A. *et al.* Fungos filamentosos e química: Velhos conhecidos, novos aliados. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 6, p. 2351–2382, 2017.
18. VISHNE, T. *et al.* Remifentanil supplementation of propofol during electroconvulsive therapy: Effect on seizure duration and cardiovascular stability. *Journal of ECT*, v. 21, n. 4, p. 235–238, 2005.