

Biorremediação: usos e aplicações para degradação de diclofenaco

O diclofenaco destaca-se por ser um poluente emergente de preocupação global. O fato de este fármaco ser facilmente adquirido sem receitas e descartado incorretamente somados à ineficiência das estações de tratamento de águas residuais para removê-lo colaboram para que sua presença seja identificada em concentrações crescentes, principalmente nos corpos hídricos. Este fato representa um risco para a biota e consequentemente para os ecossistemas, uma vez que o diclofenaco é comprovadamente tóxico para alguns organismos aquáticos e terrestres. É evidente a necessidade do desenvolvimento de técnicas eficientes para sua remoção. Nesse sentido, surgem as técnicas de biorremediação, que se destacam pela sua eficiência, baixo custo e sustentabilidade. Nossa pesquisa foi motivada pela carência de revisões voltadas para o conhecimento de técnicas recentes voltadas para a biorremediação do diclofenaco. A metodologia desenvolveu-se através da busca de artigos na plataforma "Science Direct" utilizando-se as palavras-chave "bioremediation of diclofenac". Foram discutidas pesquisas que utilizaram biorremediação através de microalgas, bactérias, enzimas, fungos e outras técnicas de biorremediação que não se enquadraram nas anteriores. As espécies de microalgas que se destacaram foram *Scenedesmus obliquus* e *Picocystis* sp., com remoções de 99% e 73% respectivamente. Em relação à biorremediação fúngica, as espécies *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus* e *Penicillium oxalicum* também removeram o composto de forma muito eficiente (acima de 96%). Em biorremediação bacteriana, os melhores percentuais de remoção foram alcançados quando ocorreu a combinação de espécies. Pesquisas que aplicaram a enzima lacase em iniciativas de biorremediação enzimática obtiveram excelentes percentuais de remoção (de 94 a 100%). Todas as pesquisas que testaram a toxicidade antes e após o tratamento com biorremediação, independente da técnica adotada, apresentaram redução da toxicidade do efluente no pós-tratamento. Logo, a aplicação de técnicas de biorremediação mostra-se como promissoras e eficientes também para a redução da toxicidade em relação ao composto original.

Palavras-chave: Resíduos farmacêuticos; Poluente aquático; Remediação.

Bioremediation: uses and applications for diclofenac degradation

Diclofenac stands out for being an emerging pollutant of global concern. The fact that this drug is easily purchased without prescriptions and incorrectly disposed, added to the inefficiency of wastewater treatment plants to remove it, collaborate so that its presence is identified in increasing concentrations, especially in watercourses. This fact represents a risk to the biota and consequently to ecosystems since diclofenac is proven to be toxic to some aquatic and terrestrial organisms. The need to develop efficient techniques for its removal is evident. In this sense, bioremediation techniques emerge, which stand out for their efficiency, low cost, and sustainability. Our research was motivated by the lack of reviews regarding the recent techniques of diclofenac bioremediation. The methodology was performed through the search for articles on the "Science Direct" platform using the keywords "bioremediation of diclofenac". It was discussed research that used bioremediation with microalgae, bacteria, enzymes, fungi and other bioremediation techniques that did not fit the above. The microalgal species that stood out were *Scenedesmus obliquus* and *Picocystis* spp., with removals of 99% and 73% respectively. Regarding fungal bioremediation, the species *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus* and *Penicillium oxalicum* also removed the compound very efficiently (above 96%). In bacterial bioremediation, the best removal percentages were achieved when species combination occurred. Researches that applied the laccase enzyme in enzymatic bioremediation initiatives obtained excellent removal percentages (from 94 to 100%). All studies that tested the toxicity before and after treatment with bioremediation, regardless of the adopted technique, showed a reduction in the toxicity of the effluent after treatment. Therefore, the application of bioremediation techniques is also promising and efficient for reducing toxicity in relation to the original compound.

Keywords: Pharmaceutical waste; Water pollutant; Remediation.

Topic: Engenharia Ambiental

Received: 01/03/2022

Approved: 20/03/2022

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Jéssica Rocha

Universidade Federal de Pelotas, Brasil
jessica.rocha@ifpi.edu.br

Jéssica Santos

Universidade Federal de Pelotas, Brasil
jessica_jesantos@hotmail.com

Carolina Demarco

Universidade Federal de Pelotas, Brasil
carol_demarco@hotmail.com

Luisa Andina Bender

Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9587506623893946>
<https://orcid.org/0000-0002-4009-7711>
luisa_andina@yahoo.com.br

Simone Pieniz

Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2138644604144089>
<https://orcid.org/0000-0002-7403-1577>
nutrisimone@yahoo.com.br

Maurício Silveira Quadro

Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/1749935262841216>
<https://orcid.org/0000-0001-8236-7479>
mausg@hotmail.com

Robson Andreazza

Universidade Federal de Pelotas, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/5706766977817721>
<https://orcid.org/0000-0001-9211-9903>
ROBSONandreazza@yahoo.com.br



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2022.003.0011

Referencing this:

ROCHA, J.; SANTOS, J.; DEMARCO, C.; BENDER, L. A.; PIENIZ, S.; QUADRO, M. S.; ANDREAZZA, R.. Biorremediação: usos e aplicações para degradação de diclofenaco. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, v.13, n.3, p.131-151, 2022. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2022.003.0011>

INTRODUÇÃO

A preservação da natureza reflete diretamente na qualidade de vida, saúde e bem-estar humano (ARES et al., 2019). O aumento da quantidade de medicamentos representou um dos maiores benefícios para a humanidade, entretanto este fato paralelamente conduziu à persistência destes compostos nos ecossistemas (MEZZELANI et al., 2018). Ultimamente, os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais foram inseridos no rol de contaminantes emergentes em virtude de sua presença persistente em ambientes aquáticos (YANG et al., 2017).

Uma vez inseridos no ambiente, os medicamentos passam por transformações e são transferidos entre os diversos compartimentos ambientais. A depender da natureza dos compostos e características do compartimento receptor, estes mecanismos de transformação no ambiente conduzem à exposição da biota, o que se configura em um potencial risco para os ecossistemas¹. O amplo consumo e o descarte inadequado contribuem para que cada vez maiores concentrações de produtos farmacêuticos para uso humano e veterinário sejam liberadas, principalmente nos ambientes aquáticos (MEZZELANI et al., 2018).

Dentre todos os produtos e resíduos farmacêuticos estudados, a classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) foi amplamente considerada na lista de prioridades devido a um caso dramático que ganhou notoriedade global: Nos anos 90, um AINE barato e sem patente – o diclofenaco – foi introduzido no subcontinente indiano como um medicamento para uso veterinário a fim de reduzir a dor e sofrimento de animais como bovinos e equinos (WANG, et al., 2017). Ressalte-se que por questões religiosas, o consumo de carne bovina é muito restrito naquela região, desta forma o gado é utilizado basicamente em atividades que exijam tração, sendo aproveitados apenas seu leite e esterco. Logo, animais velhos eram tratados com diclofenaco e suas carcaças serviam de alimento para os abutres. Mais tarde verificou-se o decréscimo brusco nas populações de abutres no subcontinente indiano e pesquisas apontaram o diclofenaco como a substância responsável por este fato, causando envenenamento e morte dos animais (WANG et al., 2017). Este é um exemplo trivial de que caminhos imprevisíveis de exposição a fármacos podem conduzir a efeitos ecotoxicológicos graves.

Sendo considerados os efeitos potenciais nocivos da sua presença no meio ambiente, o diclofenaco foi proposto como uma das substâncias prioritárias nas políticas de monitoramento da qualidade da água dos países da União Europeia (WANG et al., 2017). O descarte inadequado também tem se destacado para explicar a entrada de medicamentos com ampla utilização, como o diclofenaco. O frequente uso deste medicamento, seja em forma de comprimidos, injeções ou cremes, contribui para a poluição, principalmente das águas residuais (PRIMOŽIČ et al., 2020). Dez comprimidos de diclofenaco podem poluir até 5 milhões de litros de água, isto é, um volume correspondente às águas residuais geradas diariamente por uma cidade de 20 mil habitantes.

Silva et al. (2020) ao realizar um breve estudo sobre a presença do diclofenaco em corpos hídricos brasileiros, mostrou que o referido composto fora detectado em doses que variaram de 0,054 a 10.900 µg L⁻¹

¹ https://health.ec.europa.eu/system/files/2016-11/study_environment_0.pdf

¹, conforme os mesmos autores são doses preocupantes, uma vez que efeitos ecossistêmicos do diclofenaco são reconhecidos e fármacos foram projetados para produzir efeitos biológicos em pequenas doses.

O tratamento dos efluentes com fármacos geralmente é realizado por processos primários, secundários e terciários. O tratamento primário consiste em tratamentos de natureza química ou físico-química, o tratamento secundário consiste na adoção de métodos biológicos como lodo ativado, já o tratamento terciário caracteriza-se pela adoção de métodos de oxidação avançados como oxidação catalítica (SHAH et al., 2020).

Infelizmente, o tratamento convencional é ineficiente para remover o diclofenaco (LI et al., 2019). Logo, a remoção deste produto tem sido amplamente estudada em todo o mundo (PRIMOŽIČ et al., 2020).

Em virtude de sua baixa eficácia e em decorrência da geração de subprodutos deletérios das técnicas convencionais de tratamento de resíduos, surge a biorremediação (TYAGI et al., 2021). Este processo possui uma vantagem sobre todos outros métodos químicos que não obtiveram sucesso na remoção de fármacos e efluentes da indústria farmacêutica, estes tornando a água mais tóxica em decorrência da geração de subprodutos no decorrer do processo de tratamento (SHAH et al., 2020).

Procedimentos de biorremediação são considerados seguros, econômicos, confiáveis, relativamente eficientes e ecologicamente corretos em relação a outras técnicas de remediação convencionais, uma vez que empregam organismos e sua atividade metabólica para degradar os contaminantes (TYAGI et al., 2021). De modo geral, a biorremediação depende da ação de espécies fúngicas, bacterianas ou vegetais (fitorremediação), ou na aplicação destes organismos em biorreatores aeróbios, anaeróbios ou de membrana para tratar e promover a estabilização de produtos químicos nos ecossistemas aquáticos (SHAH et al., 2020).

Conhecendo-se a contaminação dos múltiplos sítios ambientais ocasionados pela substância diclofenaco e considerando os estudos envolvendo o emprego de técnicas de biorremediação para a remoção desta substância, principalmente em ambientes aquáticos, realizou-se o presente trabalho com o objetivo de apresentar e discutir as pesquisas e tecnologias mais recentes aplicadas à biorremediação do referido composto. A principal motivação à concepção deste trabalho foi a carência de revisões voltadas à biorremediação deste composto.

METODOLOGIA

A presente pesquisa é caracterizada como bibliográfica, que, conforme Gil (2002), utiliza-se fundamentalmente das contribuições de vários autores acerca de determinado tema e desenvolve-se com base em materiais já elaborados, constituindo-se principalmente de livros e artigos científicos.

Para realizar a presente pesquisa foi adotada a plataforma Science Direct. No campo “Keywords” foram utilizados os termos “bioremediation of diclofenac”, foram obtidos 322 resultados, sendo 104 artigos de revisão, 112 artigos de pesquisa aplicada, 14 enciclopédias e 47 capítulos de livros. Foram selecionados apenas artigos de pesquisa aplicada, restringindo a busca para 112 artigos. Eles passaram por uma triagem a partir de seus respectivos títulos e foram descartados quando não se relacionavam ao contaminante emergente em questão, não empregavam técnicas de biorremediação para sua remoção, ou eram artigos de

revisão relacionados ao tema. Foram descartados inicialmente 60 artigos. Os trabalhos que se enquadraram aos objetivos da presente pesquisa foram categorizados quanto às técnicas empregadas para a biorremediação do referido contaminante emergente, totalizando em 52 artigos. Após a leitura íntegra de seus resumos foram selecionados 26 artigos, excluindo os outros pelos mesmos critérios já mencionados anteriormente. Os artigos selecionados tiveram seus resultados expostos no presente trabalho de modo a conhecer as tecnologias mais recentes relacionadas à biorremediação do diclofenaco.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a triagem realizada, os trabalhos foram agrupados conforme o tipo de organismo ou técnica adotada para biorremediação do diclofenaco.

Biorremediação com microalgas

Os principais dados referentes à espécie empregada, concentração de diclofenaco, percentual de remoção e técnica de biorremediação associada à remoção de diclofenaco, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Biorremediação do diclofenaco através de microalgas.

Espécies ou cepa utilizada	Concentração de Diclofenaco ($\mu\text{g/L}$)	Percentual de remoção	Técnica de biorremediação associada à remoção de diclofenaco	Referência
<i>Chlorella vulgaris</i>	25.000	21.58%	Os autores não mencionaram.	Escapa et al. (2016)
<i>Chlorella sorokiniana</i>		29.99%		
<i>Scenedes musobliquus</i>		79.09%		
<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Scenedes musobliquus</i>	25.000	71%	Biodegradação.	Escapa et al. (2018)
		67%		
		99%		
<i>Picocysti ssp.</i> <i>Graesiella sp.</i>	25.000 50.000 100.000 25.000 50.000 100.000	73% 43% 25% 52% 28% 24%	Biodegradação/ biotransformação; a porcentagem de diclofenaco adsorvida ou acumulada foi muito baixa e por isso foi desconsiderada.	Ouada et al. (2019)

O trabalho de Escapa et al. (2016) trata da biorremediação do diclofenaco empregando-se três espécies de microalgas, a saber, *C. sorokiniana*, *C. vulgarise* *S. obliquus*, a última mostrou maior capacidade em remover o diclofenaco da solução aquosa, com resultado de remoção maior que 79%. É importante ressaltar que não houve redução do diclofenaco na solução controle negativa, sem a presença das microalgas, o que se pode inferir que a remoção se deu por ação das microalgas. Além de avaliarem a remoção do fármaco pelas microalgas, foi também avaliado se a capacidade de remoção de nutrientes da solução era afetada pela presença do diclofenaco, onde tiveram como resultados que *S. obliquus* removeu mais de 87% dos nitratos e mais de 99% dos fosfatos presentes. Conforme os resultados ainda, as duas espécies de *Chlorella* foram as que mais cresceram durante o experimento, tendo atingido o pico da concentração de biomassa aos nove dias, ambas na presença de diclofenaco. O fármaco foi apontado pelos autores como fonte de carbono para as microalgas.

Escapa et al. (2018) trata da biorremediação pelas mesmas três microalgas do seu trabalho anterior, porém estas previamente isoladas do esgoto e posteriormente cultivadas por nove dias em fotobiorreatores com soluções de mesma concentração contendo o diclofenaco de sódio. Com a finalidade de verificar a possível redução de toxicidade do efluente produzido pós-tratamento com microalgas, os autores realizaram ensaios com embriões de *Daniorerio* (peixe-zebra). Corroborando com Escapa et al. (2016), *Scenedes musobliquus* foi a responsável por biodegradar o composto com maior eficiência (99%). Consequentemente, o efluente gerado no pós-tratamento produziu menor toxicidade em *Daniorerio*. Os autores afirmaram que durante o tempo de duração do experimento não foram gerados subprodutos de transformação do diclofenaco e ressaltaram que a quantificação analítica associada a testes de toxicidade possibilita a avaliação completa da eficiência das microalgas na remoção de produtos farmacêuticos. Os mesmos autores também consideram válido em estudos posteriores avaliar as interações de microalgas e bactérias de águas residuais para a remoção de fármacos da água.

No estudo de Ouada et al. (2019) foram monitorados os efeitos inibitórios sobre o crescimento das microalgas, sua atividade fotossintética e eficiência em remover o fármaco. Os resultados mostraram que o diclofenaco inibiu levemente o crescimento das microalgas, sendo o percentual de inibição em *Picocystis sp.* de 21% e 36% em *Graesiella sp.* depois de 5 dias, indicando a primeira como mais tolerante em relação à segunda, os autores também ressaltaram um leve crescimento de *Picocystis sp.* quando exposta às concentrações de 25 e 50 mg/L. Os autores ao mesmo tempo que justificaram esse fato à origem dos organismos modelos (algas extremófilas), associaram também com a capacidade dos organismos utilizarem o diclofenaco como fonte de carbono orgânico. *Picocystis sp.* apresentou melhor degradação do fármaco, com 73, 43 e 25% nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/L, respectivamente; e *Graesiella sp.* apresentou porcentagens de 52, 28 e 24% nas mesmas concentrações. A quantidade de diclofenaco adsorvida e acumulada não passou 0.5%, o que implica que a biodegradação/biotransformação foram os mecanismos atribuídos para explicar a remoção do fármaco em questão, e ainda para corroborar esse fato foram identificados dois subprodutos na presença dessa alga: hidróxi diclofenaco e um derivado de diclofenaco mono-aromático. Os autores frisaram que a remoção microbiana de poluentes é resultante de uma relação de compensação entre a tolerância dos organismos testados à toxicidade do poluente-alvo e sua eficiência para sequestrá-lo ou degradá-lo, neste sentido, *Picocystis sp.* teve um crescimento satisfatório na presença do fármaco e apresentou melhor eficiência em sua remoção.

Biorremediação com fungos

Os principais dados referentes à espécie empregada, concentração de diclofenaco, percentual de remoção e técnica de biorremediação associada à remoção de diclofenaco, são apresentados na Tabela 2. O estudo de Marco et al. (2010) realizou a degradação do diclofenaco utilizando pellets de *T. versicolor*, alcançando a maior remoção na primeira hora. Tanto o diclofenaco quanto os metabólitos de degradação identificados desapareceram após 24 horas, culminando também com a redução da ecotoxicidade quando avaliados no teste Microtox. Há evidências de que o citocromo P450 desempenhou um papel de destaque

na degradação do diclofenaco, conforme os resultados alcançados com o inibidor do citocromo P450 1-aminobenzotriazol. Os autores finalizaram ressaltando que mais experimentos devem ser realizados ampliando o uso de reatores para confirmar a viabilidade de *T. versicolor* para remover o diclofenaco de ambientes aquáticos.

Tabela 2: Biorremediação do diclofenaco utilizando-se fungos.

Espécies ou cepa utilizada	Conc. de diclofenaco	Percentual de remoção	Técnica de biorremediação associada à remoção de diclofenaco	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	10 µg/L	≥ 94%	Biodegradação	Marco-Urrea et al. (2010)
<i>T. versicolor</i>	1 µg/L 0,4 µg/L	100% 100%	Não especificada pelos autores	Cruz-Morató et al. (2014)
<i>T. versicolor</i> e <i>Ganodermalucidum</i>	100 mg/L	100%	Oxidação.	Vasiliadou et al. (2016)
<i>T. versicolor</i> <i>G. lucidum</i> <i>I. lacteus</i> <i>S. rugosoannulata</i> <i>G. luteofolius</i> <i>A. erebia</i>	55 µg/L 61 µg/L 61 µg/L 113µg/L 106 µg/L 104 µg/L	96% 98% 97% >75% 76% 77%	biodegradação biodegradação biodegradação biossorção biossorção biossorção	Castellet-Rovira et al. (2018)
<i>A. niger</i> <i>M. circinelloides</i> <i>T. longibrachiatum</i> <i>T. polyzona</i> <i>R. microsporus</i>	1 mg/L	99.84 %	biodegradação/ oxidação	Kasonga et al. (2019)
<i>Penicilium oxalicum</i>	100 µM em 24h	>99%	biotransformação	Olincón-Hernández et al. (2019)
<i>P. ostreatus</i>	2 µg/L ^(a) 2 µg/L ^(b) 20 µg/L ^(b)	85% 89-96% 97%	biodegradação	Hultberg et al. (2020)

Já o trabalho realizado por Cruz et al. (2014) partiu do fato de que os efluentes hospitalares contribuem para a entrada de contaminantes emergentes no meio ambiente, como fármacos e desreguladores endócrinos, e apresentaram uma alternativa para o pré-tratamento de efluentes hospitalares com foco na remoção desses produtos, utilizando um biorreator de leiteo fluidizado descontínuo com o fungo *Trametes versicolor* em condições estéreis e não estéreis. Foi observada a remoção de 48 dos 52 compostos estudados após 8 dias. Os autores enfatizaram que se deve dar atenção especial ao diclofenaco, frequentemente recalcitrante em estações de tratamento de águas, cuja remoção completa foi atingida no tratamento proposto, sendo que no primeiro dia, sua remoção foi de 80%, completando sua total remoção ao final do experimento.

Vasiliadou et al. (2016) em sua pesquisa trabalharam com duas espécies de fungo, sendo elas *Trametes versicolor* e *Ganodermalucidum*, de forma isolada e conjuntamente, onde obtiveram resultados bastante satisfatórios com a total remoção do fármaco nos dois tipos de tratamento. Ainda avaliaram a produção e ação enzimática das duas espécies. A concentração de fármaco utilizada foi de 100 mg/L e o período de condução do experimento foi de 7 dias. O mecanismo que os autores consideraram responsável pela remoção do diclofenaco foi o que eles chamaram de “remoção biológica”, atribuída a oxidação intra ou extracelular, por intermédio do sistema citocromo P450 ou de atividade de outras enzimas, respectivamente; o mecanismo de sorção foi descartado, dado os resultados obtidos do experimento controle, e a remoção abiótica também, com base no baixo valor do coeficiente de Henry. Ambas as espécies alcançaram a total remoção do fármaco, tanto nos testes de forma individual como nos testes combinados.

Quanto à atividade enzimática, nos testes individuais, a espécie *T. versicolor* produziu muito mais lacase, enquanto *G. lucidum* produziu muito mais manganase. Já nos testes combinados, a produção de manganase foi superior, o que indica que essa espécie se sobrepõe quando em uma cultura mista, indicando também uma competição entre as espécies, onde a *T. versicolor* foi suprimida.

Para análise do sistema citocromo P450 os autores adicionaram no meio um inibidor desse sistema, o ABT, em todos as modalidades de tratamento (individual e combinada). Como resultados, a remoção biológica foi levemente reduzida na presença desse inibidor na espécie *T. versicolor*, e na espécie *G. lucidum* a capacidade de remoção foi reduzida em mais de 60%. No tratamento combinado não houve efeitos negativos do inibidor, o fármaco foi totalmente removido.

Castellet et al. (2018) em seu trabalho avaliaram a eficiência de diversas espécies de fungos na remoção de uma mistura de fármacos. As espécies avaliadas foram *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus*, *Stropharia rugosoannulata*, *Gymnopilus luteofolius* e *Agrocybe erebia*, embora os autores tenham utilizado vários fármacos, a nossa abordagem será direcionada apenas à remoção do diclofenaco. Os experimentos foram feitos em frascos de capacidade de 250 mL, com 100 mL de meio. Cada frasco foi inoculado com aproximadamente 4.5 g/L de fungos; ainda foram feitos três controles: um abiótico (com fármacos e sem fungos), um biótico ou vivo (com fungos e sem fármacos) e um com biomassa morta pelo calor (com fungos mortos e com fármacos). O controle abiótico foi usado para avaliar o potencial de degradação físico-química. Para avaliar a toxicidade dos fármacos no fungo foi usado o controle vivo, e o controle morto para avaliar o processo de bioissorção. Os experimentos foram feitos em triplicata, e duraram seis dias. Conforme os resultados obtidos pelos autores, o diclofenaco se mostrou altamente estável no controle abiótico, devido a isto puderam afirmar que qualquer remoção do fármaco seria pertencente a ação de bioissorção e biodegradação.

Quanto a concentração inicial de fármacos presentes nas soluções, houve variação de acordo com a espécie de fungo utilizada. Isso foi levado em consideração nas avaliações percentuais de remoção. Ao analisarem a concentração final de fármacos em cada experimento, foram observadas diferenças significativas nos tratamentos experimentais e controle, o que confirma que a biodegradação foi a causa principal da remoção dos fármacos.

Analisando a remoção de cada fármaco separadamente por cada espécie testada, os autores concluíram que *T. versicolor* foi capaz de remover 96% do diclofenaco quando numa concentração inicial de 55 µg/L. *G. lucidum* removeu 98% do fármaco numa concentração inicial de 61 µg/L; A espécie *L. lacteus* também apresentou uma alta remoção, com 97% na concentração inicial de 61 µg/L; com um percentual de remoção um pouco abaixo das demais espécies analisadas, *S. rugosoannulata* alcançou mais de 75% de remoção do fármaco, esse percentual mais baixo pode ter sido causado pela maior concentração inicial de diclofenaco no meio cujo foi de 113 µg/L, ainda os autores apontam que o processo principal de remoção nessa espécie foi a bioissorção. Nos testes com *G. luteofolius*, os resultados demonstraram uma taxa de remoção de 76% na concentração inicial de 106 µg/L, onde novamente os autores apontam a bioissorção como principal processo; e por último, a espécie *A. erebia* removeu 77% do fármaco na concentração inicial

de 104 µg/L.

Os autores ainda ressaltam o trabalho pioneiro, sendo a primeira vez que estudos com as espécies *S. rugosoannulata* e *G. luteofolius* são conduzidos para aferir a capacidade na biorremediação de fármacos em águas contaminadas e também com a espécie *A. erebia* como biodegradadora de fármacos.

Ainda, foram monitoradas a atividade enzimática, onde encontraram nas espécies *T. versicolor*, *S. rugosoannulata* e *A. erebia* lacases e peroxidase de manganês, onde *T. versicolor* apresentou apenas grande quantidade de lacase principalmente no tratamento experimental e *S. rugosoannulata* apresentou maior quantidade de peroxidase de manganês também no tratamento experimental; estes valores mais altos no tratamento experimental indica que o fármaco estimula a atividade do fungo.

Os autores concluem ressaltando os resultados obtidos com as espécies cujas apresentaram potencial para serem usadas na biorremediação de águas contaminadas com fármacos e frisam que mais estudos são necessários para que seja possível levar essa técnica para escalas maiores e com condições mais próximas da realidade das estações de tratamento.

Kasonga et al. (2019) em seu trabalho utilizaram uma associação de cinco fungos nativos e isolados da África do Sul, local onde se deu a pesquisa, sendo eles *Aspergillusniger*, *Mucorcircinelloides*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trametes polyzona* e *Rhizopus microsporus* em um reator de sequência em lote (SBR) na remoção de três fármacos e seus subprodutos, entre eles o diclofenaco. A concentração inicial do fármaco foi de 1 mg/L, cujo só foi adicionado a mistura após três dias para que os fungos pudessem se aclimatar às condições do reator. Além de água da torneira (S1), da solução com os três fármacos (S2) e do consórcio fúngico no meio de cultura (S3), as amostras do reator foram coletadas em diferentes momentos, uma logo após a adição dos fármacos (S4), após 4 horas de tratamento (S5), no sétimo dia (S6), no décimo segundo dia (S7) e ao final no décimo sétimo dia (S8). Quanto a remoção do fármaco, já na amostra S5 houve redução de 29.7% de diclofenaco e nas amostras seguintes de 95.8% (S6), 99.77% (S7) e 99.84% (S8). Também foi avaliada a atividade enzimática de três enzimas, sendo lacase, peroxidase de manganês e lipase peroxidase. Os resultados demonstraram que a enzima mais produzida foi a manganase, principalmente na amostra S3 com 325 U/L aproximadamente e a segunda mais produzida foi a lacasse com 89 U/L aproximadamente. De acordo com os resultados das amostras seguintes, os autores associaram o aumento da produção das enzimas com o aumento da biomassa seca dos fungos, partindo de 84 U/L de manganase e 26 U/L de lipase e com biomassa seca de 122 mg/100 mL em S4 para 207 U/L de manganase e 118 U/L de lipase e biomassa de 238 mg/100 mL em S7. Enquanto a enzima lacase não demonstrou grande variação nas demais amostras. Os autores sugerem que quatro subprodutos do diclofenaco foram produzidos de acordo com testes de avaliação de massa, sendo eles 3'-hidroxiclofenaco, 4'-hidroxiclofenaco, 5-hidroxiclofenaco e 4',5'-diidroxiclofenaco. Os pesquisadores ainda realizaram testes de atividade estrogênica, cujos resultados demonstraram que o diclofenaco não apresenta nenhuma estrogenicidade ou toxicidade, exceto com um longo tempo de exposição e na presença de seus subprodutos. O que vai em desacordo com os estudos de Lloret et al. (2014), Li et al. (2019), Olincón-Hernández et al. (2019) e Spina et al. (2020), que indicam que os subprodutos do diclofenaco são menos tóxicos do que o composto original, e segundo os autores tratados

na introdução deste capítulo que ressaltam a preocupação em monitorar a presença do diclofenaco nos corpos de água visto os efeitos adversos que ele pode causar.

Olincón et al. (2019) estudou a capacidade do fungo *Penicilium oxalicum* na remoção do diclofenaco de sódio testando em dois sistemas de biorreatores com escalas diferentes, onde demonstrou, de forma pioneira os primeiros testes e resultados do uso da referida espécie de fungo na remoção do fármaco. No reator de frasco (escala menor) *P. oxalicum* foi capaz de degradar 100 µM em 24 horas, é ressaltada a importância da atividade enzimática de CYP450 na eliminação da droga. Os testes no segundo biorreator, de maior escala, demonstraram que a biomassa livre foi mais eficiente na remoção do fármaco, cuja total eliminação ocorreu em 36 horas, comparando a biomassa imobilizada. O meio de cultura para o segundo reator foi, ainda, otimizado com redução da disponibilidade nutricional para que fosse alcançada uma remoção de 100%. Ainda houve bio-sorção no tratamento controle biótico durante as primeiras horas, mas após 18 horas, aproximadamente, estabilizou-se. No tratamento com biomassa imobilizada, houve uma significativa bio-sorção do fármaco, com mais de 50% da concentração inicial sendo removida através deste mecanismo. Foram encontrados subprodutos nesse segundo reator com a biomassa livre, cujos eram menos tóxicos do que o produto inicial visto que a toxicidade do meio foi reduzida segundo os testes executados; hidroxilados são geralmente associados a ação de CYP450, enquanto outros subprodutos encontrados são associados a foto-oxidação e fotodegradação.

Como dito anteriormente, a toxicidade foi reduzida de forma significativa no reator com biomassa livre; um resultado curioso que os autores encontraram foi com a biomassa imobilizada com o suporte 2 (chamado de "C2" no artigo) onde não foi observada degradação do fármaco, porém houve redução da toxicidade do meio, sugerindo ação de "bio-sorção superficial" ou mesmo pela falta de acumulação de metabólitos.

Hultberg et al. (2020) utilizaram a espécie de fungo *Pleurotus ostreatus* e sua atividade enzimática para avaliar a eficiência na remoção do diclofenaco de sódio de soluções aquosas. O substrato de cogumelo foi então utilizado para os testes, dois controles foram feitos um sem o substrato de cogumelo e outro com substrato sem os cogumelos; ainda, no primeiro experimento, um controle com o substrato colonizado submetido a um tratamento com calor foi utilizado para aferir a atividade enzimática, cuja ainda estava presente na temperatura de 70 °C, por isso os autores optaram por autoclavar o substrato; também no primeiro experimento, os pesquisadores filtraram um substrato e incluíram nos testes para avaliar se haveriam diferenças entre o substrato filtrado e o normal no que tange a ação das partículas maiores em adsorverem o diclofenaco, os resultados não demonstraram diferenças entre esses dois tratamentos então o estudo principal foi conduzido com o substrato não filtrado. O fármaco foi testado isolado e as concentrações foram de 2 µg/L no primeiro experimento com concentração do substrato de 200 g/L o que corresponde a uma atividade enzimática de 94 ± 4.3 U/L (unidades de enzimas por litro), no segundo experimento as concentrações de diclofenaco foram de 2 µg/L e 20 µg/L e as concentrações de substrato foram de 200, 100 e 50 g/L, correspondendo a uma atividade enzimática de 79 ± 2.9 , 47 ± 2.3 e 29 ± 1.0 U/L, respectivamente. Observaram uma queda na atividade das enzimas quando esta era colocada em

temperaturas mais baixas, no caso foi de 10 °C. Os resultados obtidos, após 5 minutos de tratamento, acerca da remoção do fármaco indicaram uma diminuição significativa na concentração do mesmo no primeiro experimento (indicado na tabela com a letra 'a'), quando a atividade enzimática estava em 94 U/L, no tratamento com o substrato colonizado na concentração de 200 g/L, com remoção de 85% do diclofenaco presente. Não houve registro de atividade enzimática nos tratamentos controles.

No segundo experimento (indicado na tabela com a letra 'b'), como dito anteriormente, foram usadas diferentes concentrações de substrato para ter diferentes concentrações de lacase (enzimas). Na concentração de fármaco de 2 µg/L obtiveram uma redução significativa do fármaco, variando de 89 a 96%. Na maior concentração de diclofenaco, 20 µg/L, houve diferenças entre as concentrações de substrato utilizadas, já que quanto mais concentrado o substrato, mais atividade enzimática ele apresentava; na menor concentração de substrato (50 g/L), por exemplo, houve remoção de 37% do fármaco, enquanto na concentração de 100 g/L houve remoção de 92%, porém aumentando a concentração para 200 g/L não houve grande diferença para a concentração anterior, com remoção de 97%.

Com esses resultados, Hultberg et al. (2020) puderam concluir que a espécie utilizada tem potencial para remover o diclofenaco de sódio de soluções aquosas num período muito curto, os experimentos foram conduzidos em 5 minutos de tratamento. A utilização direta do substrato colonizado com cogumelos para remediar esgoto demandaria menos recursos financeiros do que a produção e purificação das enzimas, e esse substrato é facilmente adquirido visto ser um produto de descarte da produção de cogumelos comerciais; apesar disso, talvez não seja a melhor escolha para o tratamento de esgoto contaminado, já que a atividade enzimática é menor quando comparada ao substrato colonizado antes do desenvolvimento dos corpos de frutificação do fungo. Considerando isso, o substrato colonizado pode ser uma alternativa de uso para tratamento de esgotos contaminados, porém ainda são necessários mais estudos quanto a durabilidade da atividade enzimática para remover os poluentes.

Biorremediação com enzimas

Os principais dados referentes à espécie utilizada para isolamento das enzimas (quando disponível), concentração de diclofenaco, percentual de remoção e técnica de biorremediação associada à remoção de diclofenaco, são apresentados na Tabela 3.

No trabalho realizado por Lloret et al.(2014) foi investigada a biorremediação do diclofenaco e naproxeno por uma enzima lacase de alto potencial redox, a nossa abordagem será concentrada nos resultados obtidos com o diclofenaco. Foram avaliados os efeitos do pH e o uso de mediadores sintéticos e naturais, a saber, 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e siringaldeído (SA), com o objetivo de otimizar a remoção dos referidos fármacos pela lacase. Os resultados obtidos apontaram para a degradação do diclofenaco em pH 4 e em períodos mais curtos de 30 min a 4 h, independente da presença dos mediadores sintéticos testados, os autores também identificaram os principais produtos da biotransformação do diclofenaco e as possíveis vias de reação baseadas na descarboxilação catalisada pela lacase. Os autores finalizaram o estudo ressaltando que o sistema enzimático proposto pode ser considerado com base para o posterior

desenvolvimento de uma tecnologia enzimática voltada para a biorremediação de AINEs e de outros poluentes emergentes.

Tabela 3: Biorremediação do diclofenaco utilizando-se enzimas.

Espécies ou cepa utilizada	Concentração de Diclofenaco	Percentual de remoção	Técnica de biorremediação associada à remoção de diclofenaco	Referência
<i>T. versicolor</i> (lacase)	5 mg/L	100%	Não mencionado pelos autores. Provavelmente biodegradação.	Lloret et al. (2014)
<i>T. versicolor</i> (lacase)	20 µM	94 %	Oxidação	Ji et al. (2016)
<i>T. versicolor</i> (lacase)	100 µg/L	100%	Oxidação	Kumar e Cabana (2016)
peroxidase(raiz-forte)	20 µM	100 %	Oxidação e polimerização	Stadlmair et al. (2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i> (lacase)		40%		
<i>T. versicolor</i> (lacases)	500 µg/L	< 100%	Adsorção e degradação	Lonappan et al. (2018)
Cloroperoxidase	5 nmol	100%	Conversão oxidativa catalisada	Li et al. (2019)
<i>T. versicolor</i>	0.5 g/L	-	Oxidação catalisada e degradação (polimerização)	Pype (2019)
Lacase livre	10µ	11,5 ±0,3 µg DCF/g lacase	Biodegradação	Primožič et al. (2020)
Lacase CLEAs		15,4±0,4 µg DCF/g lacase		
Lacases CLEAs		13,7±0,3µg DCF/g lacase		
<i>T. pubescens</i> (lacase)	0.84 ± 0.16 µg/L ^(a) 0.51 ± 0.10 µg/L ^(b)	-	Provável oxidação.	Spina et al. (2020)

A posterior toxicidade aeróbia foi avaliada mostrando um aumento da biodegradabilidade do meio após tratamento enzimático, segundo os autores, este fato sugere que o tratamento possibilitou a formação de produtos menos tóxicos que o composto diclofenaco, sendo, portanto, o tratamento proposto uma tecnologia ambientalmente correta para a remoção de AINEs de meio aquáticos.

Ji et al. (2016) buscaram em seu trabalho aferir a eficiência de um reator de membrana enzimática, utilizando nanotubos de carvão. As enzimas adquiridas foram lacases do fungo *Trametes versicolor*. As lacases são enzimas oxi-redutoras, tendo um excelente comportamento catalítico para oxidar diversos compostos aromáticos e aqueles altamente recalcitrantes no meio ambiente. O experimento foi conduzido com uma mistura de cinco fármacos, entre eles o diclofenaco. A imobilização das enzimas foi testada de duas formas, via adsorção física e por ligação covalente. De acordo com os resultados obtidos, a adsorção se saiu melhor e foi escolhida para os testes de remoção dos fármacos. A concentração de fármaco utilizada foi de 20 µM, a temperatura foi de 22º C e o pH da solução foi de 5.5. Foram realizados ciclos de degradação de 48 horas cada, ao todo foram quatro ciclos. Quanto à remoção do diclofenaco, após 48 horas verificou-se que 94% haviam sido removidos. Os autores concluíram que o sistema exibiu estabilidade satisfatória e capacidade de reuso e regeneração.

Em condições reais, o esgoto se apresenta com uma mistura enorme de componentes, no trabalho de Kumar et al. (2016) os autores tentaram reproduzir um pouco dessa situação utilizando uma mistura de 13 fármacos, isso é importante para validar a aplicabilidade da técnica. Os autores estudaram um tratamento baseado em enzimas para remoção de fármacos em uma mistura com 13 componentes, incluindo o diclofenaco. Para isso imobilizaram a lacase como agregados enzimáticos reticulados (MAC-CLEAs) em

nanopartículas magnéticas funcionalizadas com amina utilizando cloridrato de quitosano/1-etil -3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida como sistema de reticulação (EDAC), em busca de otimizar a estabilidade e atividade catalítica das enzimas para uso em biorremediação. O catalisador magnético de enzimas apresenta notáveis características que oferecem estabilidade mecânica a longo prazo para o biocatalisador e fácil separação da mistura da reação de forma simples utilizando um campo magnético.

As enzimas compradas foram extraídas do fungo *Trametes versicolor*. Após as MAC-CLEAs serem produzidas, foram colocadas a teste na remoção dos fármacos em mistura, sendo 100 µg/L de cada fármaco, incluindo o diclofenaco, com 1000 U/L de MAC-CLEAs e, ainda, na presença ou ausência de 0.1 mM de ABTS (mediador). As reações foram executadas em temperatura ambiente de 20 °C, com tempos de contato de 6 horas e 12 horas com pH 7 sob agito de 125 rpm. Amostras controle de fármacos e enzimas foram analisadas separadamente. A recuperação da atividade enzimática alcançou 62.2% nas condições ideais de produção de MAC-CLEAs, com 1 g/L de quitosana, 50 mM de EDAC, 100 mg de amina funcionalizada, pH 5 e tempo de ligação cruzada de 62 horas. Essa alta porcentagem pode ser atribuída ao sistema EDAC/quitosana formando ligações cruzadas flexíveis. Comparando, a MAC-CLEA apresenta atividade enzimática mais estável do que as enzimas livres tanto para mudanças no pH como na temperatura. Quanto a remoção do diclofenaco, após 6 horas de tratamento obtiveram remoção de 85%, e após 12 horas 95% do fármaco havia sido removido. Essa alta taxa de remoção pode ser em decorrência da presença da amina aromática na sua estrutura química, cuja possivelmente reduziu seu potencial redox e tornou possível a oxidação enzimática. Já na presença do ABTS na mistura, houve total remoção do diclofenaco com 6 horas de tratamento. Os autores não descartam a produção de subprodutos da degradação e ainda sua reação com outros compostos, tornando-os mais fáceis de serem degradados também, porém não efetuaram a identificação desses possíveis compostos.

Stadlmair et al. (2017) estudaram o potencial de uso de duas enzimas, a peroxidase (HRP) extraída da raiz-forte e a lacase (LccPO) extraída do fungo *Pleurotus ostreatus*, na remoção do diclofenaco de sódio de uma solução aquosa. O estudo buscou aferir a degradação enzimática e a formação de subprodutos. As duas enzimas foram selecionadas por possuírem habilidade de transformar uma variedade de compostos doadores aromáticos, como fenóis aromáticos ou aminas, cujos representam classes de substâncias de micropoluentes importantes presentes nos esgotos. Os experimentos foram conduzidos tanto com o fármaco isolado como em mistura com outros compostos farmacêuticos, ao total foram sete fármacos abordados. Para os testes, foram utilizados 1 µM de HRP (equivalente a 12.8 U/mL, onde 1 U corresponde a conversão de 1.0 mg de pirogalol em 20 segundos, com pH 6 e 20 °C) ou 1.5 µM de LccPO (equivalente a 1.0 U/mL, onde 1 U corresponde a conversão de 1 µmol de pirocatecol por minuto, com pH 4.5 e 25 °C). Já que as definições de unidades são diferentes, os autores optaram por utilizar a medida em µM. A concentração inicial de diclofenaco foi de 20 µM. Foram feitos ainda experimentos controle sem a presença das enzimas para determinar a possível ocorrência de oxidação do fármaco por H₂O₂. O fármaco foi completamente transformado após 4 horas de tratamento com HRP, enquanto que o tratamento com LccPO não foi tão eficiente pois removeu apenas 40% após 24 horas. Também, no tratamento com HRP, foram identificados quatro subprodutos do diclofenaco; o padrão dos subprodutos demonstra que houve polimerização do

diclofenaco pelo tratamento com HRP. No tratamento controle, houve uma redução de aproximadamente 20% indicando uma pequena oxidação do diclofenaco pelo H₂O₂ sozinho.

Lonappan et al. (2018) utilizaram lacases imobilizadas em biochar de três diferentes matérias-primas, sendo elas de esterco de porco (EP), madeira de pinho (MP) e casca de amêndoa (CA). Essa imobilização pode melhorar a estabilidade assim como as propriedades de catálise das enzimas. Ainda foi feito um pré-tratamento com ácido cítrico para melhorar a capacidade de ligação dos biochars. O fungo escolhido para a produção e isolamento das lacases foi o *Trametes versicolor*, cujo tem se mostrado o mais utilizado em trabalhos de fitorremediação e remediação enzimática. Foi adicionado na solução o glutaraldeído, este é usado para de fato imobilizar as enzimas no suporte de biochar. Ele é capaz de reagir com os grupos amins da superfície tanto das enzimas como do suporte. Os autores chegaram na concentração ideal de glutaraldeído de 5%. Foram feitos testes para estabelecer o pH e temperatura para a máxima atividade enzimática, aonde chegaram no pH de 4.5 e temperatura de 40 °C.

Os biochar com os máximos carregamentos de enzimas foram selecionados para então serem submetidos a remoção do diclofenaco. Os experimentos foram feitos em temperatura ambiente (os autores citam temperatura de 25 °C aproximadamente) com efluente real coletado de uma estação de tratamento com pH de 6.35 e concentração inicial do fármaco de 500 µg/L. Os três tipos de biochar foram capazes de remover quase 100% do diclofenaco, variando apenas no tempo necessário para alcançar esse resultado, o biochar de esterco de porco conseguiu remover 98.9% em 2 horas, essa rápida remoção pode ser atribuída a alta capacidade de ligação das lacases nesse biochar, também a grande superfície de contato comparada aos outros dois tipos (CA e MP), também já é demonstrado que o biochar de EP tem excelente capacidade de adsorção de diclofenaco. O biochar de CA foi o segundo mais rápido na remoção total do diclofenaco, e por último o de MP mas que ainda assim removeu completamente o fármaco. Os autores consideram que uma porção do fármaco foi adsorvida na superfície do biochar e pode não ter sofrido degradação apesar de 100% ter sido removida.

Concluiu-se que o biochar de EP mostrou a maior capacidade de ligação enzimática, dada sua superfície de contato ser maior. O pré-tratamento com ácido cítrico melhorou a capacidade de ligação enzimática em todos os tipos de biochar estudados. Porém, o biochar de madeira de pinho e de casca de amêndoa tiveram melhorias no pH, estabilidade térmica, de armazenamento e operacional em relação ao de EP. Ainda pode-se concluir que as enzimas imobilizadas exibiram pH, temperatura e estabilidade aprimoradas.

Embora o estudo conduzido por Li et al. (2019) tenha promovido a conversão oxidativa catalisada de outro anti-inflamatório não esteroide, iremos deter nossa abordagem à degradação do diclofenaco, que alcançou sua conversão completa em 9 minutos de reação. O estudo dos produtos de transformação permitiu aos autores inferirem que inicialmente ocorre a hidroxilação seguida de transformação oxidativa do fármaco. Quando comparado ao diclofenaco original, os produtos obtidos pela conversão catalisada por CPO tem solubilidade melhorada em meio aquoso e por isso são mais vulneráveis à biodegradação. Os autores mencionam que o tratamento da mistura de reação catalisada através da CPO com lodo ativado aumentou

a remoção de COD de 4,9% para 85% e por isso consideram promissor o pré-tratamento enzimático seguido de lodo ativado. É importante também ressaltar que ocorreu a redução da toxicidade em *Chlorella Pyrenoidosa*. Conforme os autores, os ensaios biológicos oferecem uma medida direta para avaliar a magnitude do risco potencial de produtos químicos à saúde.

Pype et al. (2019) avaliaram a capacidade de degradação de enzimas do fungo *Trametes versicolor* cujas foram adquiridas da Sigma-Aldrich. Ainda avaliaram a produção de subprodutos. Os experimentos foram conduzidos em sete condições diferentes, com concentrações de diclofenaco iniciando em 0.5 g/L ou 5.000.000 µg/L (condições 1, 2 e 3) e sendo reduzidas a 0.375 g/L (condição 4), 0.25 g/L (condição 5), 0.15 g/L (condição 6) e 0.005 g/L (condição 7). O volume dos experimentos foi de 200 mL. Ainda foram feitos dois controles, um sem a presença do fármaco e o outro sem a presença das enzimas, para que pudessem ser confirmadas a produção de subprodutos pela atividade enzimática apenas quando esta degradava o diclofenaco. Para estimar o início e o fim da reação pelas enzimas foi utilizado o fator Θ , onde para um alto valor de Θ a produção de subprodutos é retardada em relação ao consumo do fármaco, e, contrariamente, um baixo valor de Θ indica que há formação de subprodutos cuja é limitada ao início da atividade enzimática. O valor mais alto encontrado para esse fator foi no experimento 7, onde apesar de a droga ser consumida, nas 6 horas da reação não foram observados subprodutos.

Os autores citam duas reações ocorridas sendo oxidação catalisada pelas enzimas e a degradação através da polimerização. A remoção do fármaco pelas enzimas depende de diversos fatores como por exemplo de tempo, da atividade enzimática e da concentração inicial do fármaco na solução. Quanto mais enzimas presentes no meio, mais radicais do diclofenaco eram formados, onde posteriormente através da polimerização esses radicais eram combinados com a molécula de diclofenaco para formar outros subprodutos. Essas reações levaram à formação de subprodutos cujos modificaram a coloração do meio para marrom. Este efeito também foi observado no trabalho de Coelho (2008), onde foi atribuído à formação do subproduto carbazol através da perda dos cloretos pela molécula de diclofenaco.

Apesar dos resultados do modelo, os autores colocam como improvável que os únicos produtos formados tenham sido subprodutos insolúveis, ainda destacam que as condições encontradas nas estações de tratamento são diferentes das colocadas aqui visto que o diclofenaco foi posto sozinho na solução para os experimentos. Para aplicação dessa técnica em condições reais deve-se considerar também os possíveis subprodutos de todos os possíveis compostos que estão presentes nos esgotos e águas de tratamento, que envolvem desde diversos outros fármacos como produtos de cuidados pessoais, agrotóxicos, retardantes de chama e tantos outros poluentes. Apesar disso, este trabalho dá uma boa ideia de como o diclofenaco se comporta sozinho em um meio aquoso.

O estudo realizado por Primožič et al. (2020) baseou-se na biodegradação do diclofenaco por três tipos de preparações da enzima lacase: a enzima livre ou natural, a enzima na forma de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) e pós imobilização magnética (mCLEAs). O reconhecido potencial redutor das lacases frente aos compostos aromáticos e não-aromáticos conduziu à esta investigação dos autores, de modo a prever a melhor enzima para possível utilização industrial na remoção do diclofenaco. Observou-se

maior efeito do pH e, portanto, menor estabilidade na enzima livre. Em relação à capacidade de remoção, observa-se que CLEAs alcançaram maior degradação do diclofenaco por grama de enzima, mostrando-se um catalizador muito adequado para a degradação do diclofenaco. Entretanto, embora mCLEAs tenha apresentado menor capacidade de remoção do diclofenaco, quando comparada com CLEAs, sua melhor estabilidade térmica e melhor estabilidade ao longo do tempo mostram que mCLEAs provavelmente teriam um desempenho mais adequado para ser aplicada em estações de tratamento água. Conforme os mesmos autores, a possibilidade de reciclagem da enzima no processo tecnológico representa a redução dos custos da enzima.

Poucos estudos foram executados com esgoto em condições reais, devido a sua complexidade química e biológica, eles geralmente apresentam problemas técnicos, muitas vezes causados pela presença de compostos que interferem na atividade enzimática. Além de Lonappan et al. (2018) citado acima, Spina et al. (2020) foram um dos poucos autores que coletaram o esgoto em si, foram realizadas coletas em dois momentos, o primeiro momento foi o efluente após a sedimentação primária (que a partir de agora identificaremos com a letra "A") e num segundo momento após todo o processo de tratamento (que identificaremos com a letra "B"). Com as análises de identificação de compostos e suas quantidades, chegaram na concentração de diclofenaco, como demonstrada na tabela 3 acima, de $0.84 \pm 0.16 \mu\text{g/L}$ na coleta A e de $0.51 \pm 0.10 \mu\text{g/L}$ em B. Foram utilizadas 100 U/L de enzimas (lacases da espécie de fungo *T. pubescens*) para o tratamento de 300 mL do efluente (A) e afluente (B) por 24 horas, ainda foi feito um controle abiótico sem as enzimas. A atividade enzimática foi contabilizada na unidade U, onde 1 U corresponde a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de substrato por minuto.

A capacidade das lacases em transformar o diclofenaco foi então avaliada. Sua estabilidade foi monitorada durante as 24 horas do tratamento para aferir se a complexa matriz do efluente e afluente causaria alguma inibição. A coleta A mostrou considerável instabilidade, onde 66% da atividade das enzimas foi perdida de forma irreversível. Já na coleta B, houve menos perda de enzimas, apenas 44% foram perdida após as 24 horas. O autor ressalta que há opções para que isso seja evitado ou diminuído como a imobilização em suportes adequados ou em sistemas de membranas. Apesar das lacases estarem bastante ativas na presença da amostra A, são diversos os fatores que governam a resposta delas, sendo difícil pontuar com certeza os parâmetros que devem ser controlados ou colocados sob estresse para melhorar a performance do sistema, porém é sabido que a atividade cinética e estabilidade dependem do pH. Os resultados da remoção podem ser atribuídos a estrutura química dos compostos, ao potencial redox e a concentração do fármaco. A afinidade das lacases com alguns compostos é explicada pela presença de grupos funcionais sendo eles dois, o de doadores de elétrons (DE) e o de receptores de elétrons (RE). No grupo dos doadores de elétrons estão a hidroxila, amina, alcóxi, alquila e acilo, cujos auxiliam na mediação da oxidação enzimática. Já o outro grupo, produz uma deficiência de elétron cuja reduz a afinidade com as enzimas, sendo os grupos carboxila, amida, halogênio e nitro. O diclofenaco tem uma estrutura diferente, onde contém ambos os grupos citados acima.

Os autores ainda fizeram testes de toxicidade, onde constataram que o tratamento com as enzimas

foi capaz de reduzir a toxicidade do efluente. Com estes resultados, puderam demonstrar que as enzimas de *T. pubescens* tem potencial para ser utilizada na remoção de fármacos em tratamentos de esgotos, apesar da remoção do diclofenaco não ter sido tão alta.

Biorremediação Bacteriana

Os principais dados referentes à espécie empregada, concentração de diclofenaco, percentual de remoção e técnica de biorremediação associada à remoção de diclofenaco por ação bacteriana, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Biorremediação do diclofenaco utilizando-se bactérias.

Bactéria empregada	Concentração inicial	Percentual de remoção (%)	Técnica de biorremediação	Referência
AS (diversas espécies) Sd (diversas espécies) SAT (diversas espécies)	50 µg/L	90 % 97 % -	Biotransformação/ biodegradação	Kim et al. (2017)
Biobeds (Múltiplas espécies de microrganismos)	20 µg/g	90%	Biodegradação	Aguilar-Romero et al. (2020)
<i>Bacillus subtilis</i> (168trpc2) <i>B. subtilis</i> (ΔyjiB) <i>B. subtilis</i> (Δyjh)	2.5 mg/L	88.3 % 21 % 10 %	Os autores não citam.	Chen et al. (2020)
Lodo anaeróbio (Múltiplas espécies)	D1 7,11 ± 0,02 D2 13,60 ± 0,03 D3 26,21 ± 0,04 D4 43,10 ± 0,01 DF 44,13 ± 0,02 DE 43,20 ± 0,01 DM 44,41 ± 0,05	11,01 ± 0,50 7,22 ± 0,31 4,11 ± 0,052 17,23 ± 0,31 10,70 ± 1,11 28,24 ± 1,10 26,11 ± 1,40	Biodegradação	Granatto et al. (2020)
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	10 mg/L 70 mg/L	79 % 44 %	Biodegradação	Sharma et al. (2020)

Kim et al. (2017) utilizou três diferentes fontes, sendo esgoto ativado (AS), sedimento (Sd) e tratamento de aquífero do solo (SAT), na elaboração de um meio para inóculo. As bactérias identificadas em cada meio foram as seguintes: No meio AS foram identificadas: *Beijerinckia*, *Globobacter*, *Sphingomonas*, *Planctomycetales*, *Cytophagaceae* e *Myxococcales*; no meio Sd: *Nevskia*, *Sphingomonas*, *Hyphomicrobium*, *Planctomycetales*, *Bradyrhizobiaceae*, *Prostheoco microbium*, *Armatimonadetes* e *Bacteroidetes*; e no meio SAT: *Myxococcales*, *Ideonella*, *Ohtaekwangia*, *Planctomycetales*. O experimento foi feito em mistura de seis fármacos, incluindo o diclofenaco, na concentração de 50 µg/L. No inóculo de AS o diclofenaco foi degradado 90% em quatro dias de tratamento e no inóculo de Sd foi removido 97% em dois dias. O inóculo SAT não apresentou remoção do diclofenaco.

Embora Aguilar et al. (2020) tenham avaliado a remoção de três contaminantes emergentes, nossa abordagem será referente apenas ao diclofenaco. Para realizar a biorremediação dos compostos, os autores utilizaram biobeds (BPSs), que consistem em recipientes ou ainda escavações preenchidas com solo superficial e matéria orgânica que abrigam microrganismos ativos que facilitam a degradação co-metabólica de poluentes. Os resultados mostraram a remoção de 90% do diclofenaco após 84 dias de incubação. Também foi observado pelos autores que o tempo de incubação afetou mais as bactérias do que os

compostos utilizados e que a dissipação dos poluentes estudados foi mais lenta quando os três poluentes foram misturados e introduzidos no sistema. Os autores concluíram o estudo reafirmando a possível aplicação do sistema de biorremediação proposto para a descontaminação de efluentes em fazendas onde o diclofenaco é utilizado para fins veterinários, ou em estações de tratamento de águas residuais e de tratamento de efluentes.

Chen et al. (2020) em seu trabalho testaram a bactéria *Bacillus subtilis* e outras duas cepas modificadas, sendo Δ yrhJ e Δ yjiB, para a degradação do diclofenaco. A concentração de fármaco utilizada para os testes foi de 2.5 mg/L, ainda na solução junto com o fármaco foi colocada glicose. Foi feito um controle sem inóculo de microrganismos para testes de adsorção. A espécie utilizada tem os genes yrhJ (que expressa a proteína CYP102A3) e yjiB (que expressa a proteína CYP109B1) do citocromo P450. A proteína CYP102A3 tem citocromo P450/NADH-citocromo P450 redutase, uma proteína de fusão natural que compreende um domínio heme e um FAD/FMN-redutase que pode hidroxilar ácidos graxos. A proteína CYP109B1 é um citocromo P450 monoxigenase, que pode oxidar ácidos graxos saturados e seus grupos metil e etil éster em posições subterminais na cadeia. O diclofenaco e a glicose foram usados como fonte de carbono para os microrganismos, onde todas as cepas tiveram um bom crescimento. No tratamento controle não houve degradação abiótica nem adsorção, o que demonstra que toda degradação se deve a presença das bactérias. Os resultados mostraram que em 72 horas *B. subtilis* foi capaz de degradar 88.3% do diclofenaco, enquanto as cepas Δ yjiB e Δ yrhJ degradaram 21 e 10%, respectivamente. Isso demonstra que a presença do citocromo P450 é essencial na degradação do fármaco. A diferença das remoções nas cepas B e J podem ser devido a elas terem diferentes vias de transferência de elétrons. Devido à perda da proteína CYP102A3 na cepa *B. subtilis*J, o elétron é primeiro transferido para a proteína CPY109B1 e somente após para o diclofenaco. Além, outras proteínas são requeridas para esse processo como a Fe-S/flavina. Na cepa *B. subtilis*J, com a perda da proteína CYP109B1, o elétron é transferido para a CPY102A3 e depois para o diclofenaco. A proteína CYP102A3 pode completar a transferência de elétrons sozinha já que é uma proteína de fusão natural, como dito anteriormente. Outra razão, pode ser por elas apresentarem atividade enzimática diferente uma da outra.

Da degradação do diclofenaco, os autores identificaram alguns subprodutos. Da cepa *B. subtilis*168trpc2 foram identificados três produtos metabólicos, sendo 4'-hidroxi-acridina (M195), 4-(2,6-diclorofenilamina)1,3-benzendimetanol (M297) e ácido 4'-hidroxidiclofenaco[6-(2,6-dicloro-4-hidroxi-fenilimino)-3-oxo-ciclohexa-1,4-dienil]-acético (M325); das cepas Δ yrhJ e Δ yjiB foram quatro identificados, M195, M297, ácido (7-hidroxi-9,10-diidro-acridin-4-il) acético (M241) e M325, variando no tempo e quantidade de produção. Quanto às vias de degradação, os autores indicam a existência de duas: a degradação direta de M250, e a outra é a hidroxilação do diclofenaco antes da degradação. Os produtos da degradação gerados pela cepa *B. subtilis*168trpc2 são catalisados pelo citocromo P450 e pela lacasecotA. As vias de degradação das cepas mutantes são as mesmas da cepa *B. subtilis*168trpc2, porém o grau de degradação de M250 é muito menor do que da cepa 168trpc2.

Como dito anteriormente, o citocromo P450 é fundamental na degradação do diclofenaco pela

espécie utilizada no estudo. Os autores concluíram que ele afeta a eficiência da degradação e determina a posição da hidroxilação, já que na cepa 168trpc2 apenas gera 5-OH-diclofenaco, que pode ser degradado em M195, e as cepas mutantes geram tanto 5-OH-diclofenaco como 4'-OH-diclofenaco, e este último pode ser degradado em M241. Por fim, os autores ressaltam a importância da declaração na degradação do diclofenaco.

O estudo conduzido por Granatto et al. (2020), teve como ponto de partida a investigação do potencial metanogênico do lodo anaeróbico submetido a diclofenaco e ibuprofeno em reatores em batelada. Foram utilizados três co-substratos separadamente, a saber: etanol, fumarato e metanol. Nossa abordagem irá apresentar apenas os resultados obtidos com o diclofenaco. Os autores observaram a degradação do diclofenaco com e sem os co-substratos em 4 diferentes doses controle (D1, D2, D3 E D4) e verificaram que ocorreu menos remoção sem os co-substratos e na presença de fumarato, também foi verificado que sem co-substratos, ocorreu um aumento na remoção de diclofenaco. O maior potencial metanogênico ($11.530 \pm 368 \mu\text{molCH}_4$) e maior remoção de diclofenaco ($28,24 \pm 1,10\%$) foi observada utilizando-se o co-substrato etanol. Conforme os autores, a estrutura molecular do diclofenaco condicionou a maior diversidade de populações bacterianas, o posterior sequenciamento de RNAr permitiu a identificação de gêneros bacterianos capazes de realizar a clivagem do anel aromático, β -oxidação e oxidação de etanol e ácidos graxos. Em relação ao Domínio Bacteria, a maior abundância relativa foi observada entre os gêneros *Smithella*, *Sulfuricurvum* e *Synthophus*, já em relação ao domínio Archaea, destacou-se o gênero *Methanosaeta*.

Sharma et al. (2020) isolaram a bactéria *Klebsiella pneumoniae* do esgoto e avaliaram a eficiência de remoção do diclofenaco de sódio. Os experimentos foram feitos com diferentes concentrações do fármaco, sendo 10, 30, 50 e 70 mg/L, em temperatura de 30°C e pH 7; além disso, fizeram um experimento controle, sem o inóculo da bactéria, para avaliação de degradação abiótica, onde os resultados não mostraram nenhuma redução na concentração do fármaco. Os resultados demonstraram também que quanto maior a concentração do diclofenaco, menor era o crescimento da colônia devido ao aumento das condições de estresse. Visto que não houve degradação abiótica, as bactérias estudadas são responsáveis pela biodegradação. Após 72 horas de tratamento na concentração de fármaco de 10 mg/L, a remoção foi de 79%, e na concentração de 70 mg/L a remoção foi de 44%.

CONCLUSÃO

É inquestionável que estações de tratamento de águas residuais precisam ser atualizadas para a remoção de fármacos. Sendo assim, surgem iniciativas de biorremediação, que se destacam por exibirem baixo custo, eficiência e sustentabilidade quando comparados a outros métodos. Nossa pesquisa buscou conhecer e discutir as principais novidades relacionadas à biorremediação do diclofenaco realizadas por diversos grupos de organismos, a saber: algas, fungos e bactérias, também tratamos a respeito da biorremediação enzimática e abordamos brevemente outras formas de biorremediação que não se incluem nas anteriores.

Lançando o olhar acerca da biorremediação com a utilização de microalgas, observamos que a espécie *Scenedesmus obliquus* destacou-se por alcançar a remoção de 79.09 e 99 % em dois trabalhos utilizando a dose de 25.000 µg/L, entretanto os autores que utilizaram esta espécie não a testaram sob exposição de outras concentrações do fármaco em estudo, portanto mais estudos devem ser realizados expondo esta espécie a outras concentrações. Foi observado também que *Picocystis* sp. alcançou a máxima remoção de 73%, entretanto, aumentando-se a dose foi verificada a redução do percentual de remoção por biodegradação e biotransformação. Nesse sentido é importante frisar que a biodegradação de um poluente também é regida pelo equilíbrio entre a tolerância do organismo à toxicidade do poluente e sua capacidade de degradá-lo.

Em relação à biorremediação com fungos para o tratamento do diclofenaco mostrou-se muito eficiente (acima de 96%) pelas espécies *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus* e *Penicillium oxalicum* com doses que variaram de 100 mg/L à µg/L. Os principais mecanismos envolvidos foram a biodegradação, seguidos de oxidação e biotransformação.

Em relação à biorremediação bacteriana, o processo de biodegradação foi predominante e os melhores percentuais de remoção ocorreram com a aplicação de diversas espécies combinadas. Entretanto, quando estudadas separadamente, as espécies *Bacillus subtilis* (168 trpc2) e *Klebsiella pneumoniae* alcançaram 88,3% e 79 % respectivamente e em trabalhos diferentes.

Em relação à biorremediação enzimática, a enzima lacase destacou-se por possuir intensa atividade catalítica na oxidação de compostos aromáticos e recalcitrantes. Pesquisas que aplicaram esta enzima obtiveram excelentes percentuais de remoção do diclofenaco que variaram de 94 a 100% em doses de 20 µg/L a 5000 µg/L. Percebeu-se também o aprimoramento das tecnologias referentes à sua aplicação, sendo a pesquisa mais recente voltada para a otimização do tratamento enzimático (preparação enzimática melhorada) de modo a melhorar a estabilidade da enzima para obter mais eficiência e consequentemente redução dos custos do processo de tratamento para remoção do fármaco.

Em todos os trabalhos em que os efluentes com diclofenaco passaram por testes toxicológicos antes e após o tratamento, verificou-se que as técnicas de biorremediação aplicadas promoveram a redução da toxicidade para os organismos testados.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, I. R.; ROMERO, E.; WITTICH, R. M.; DILLEWIIN, P. V.. Bacterial ecotoxicity and shifts in bacterial communities associated with the removal of ibuprofen, diclofenac and triclosan in biopurification systems. *Science of The Total Environment*, v.741, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140461>

ARES, A. M.; MUIÑO, R.; COSTOVA, A.; LORENZO, R. A.; CONCHEIRO, A.; CARRO, A. M.; ALVAREZ, C. L.. Cyclodextrin-functionalized cellulose filter paper for selective capture of diclofenac. *Carbohydrate Polymers*, v.220, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.055>

CASTELLET, F. R.; LUCAS, D.; VILLAGRASA, M.; RODRÍGUEZ, S.

M.; BARCELÓ, D.; SARRÀ, M.. *Stropharia rugosoannulata* and *Gymnopilus luteofolius*: Promising fungal species for pharmaceutical biodegradation in contaminated water. *Journal of Environmental Management*, v.207, p.396-404, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.07.052>

CHEN, L.; LI, Y.; LIN, L.; TIAN, X.; CUI, H.; ZHAO, F.. Degradation of diclofenac by *B. subtilis* through a cytochrome P450-dependent pathway. *Environmental Technology & Innovation*, v.20, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101160>

COELHO, A. D.. **Degradação dos anti-inflamatórios diclofenaco, ibuprofeno e naproxeno por ozonização.** Tese

(doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ESCAPA, C.; COIMBRA, R. N.; PANIAGUA, S.; GARCÍA, A. I.; OTERO, M.. Comparative assessment of diclofenac removal from water by different microalgae strains. **Algal Research**, v.18, p.127-134, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.008>

ESCAPA, C.; TORRES, T.; NEUPARTH, T.; COIMBRA, R. N.; GARCÍA, A. I.; SANTOS, M. M.; OTERO, M.. Zebra fish embryo bioassays for a comprehensive evaluation of microalgae efficiency in the removal of diclofenac from water. **Science of the Total Environment**, v.640-641, p.1024-1033, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.353>

GIL, A. C.. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4 ed. São Paulo: Atlas, 2002.

GRANATTO, F.; GROSSELI, G. M.; SAKAMOTO, I. K.; FADINI, P. S.; VARESCHE, M. B. A.. Methanogenic potential of diclofenac and ibuprofen in sanitary sewage using metabolic cosubstrates. **Science of The Total Environment**, v.742, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140530>

HULTBERG, M.; AHRENS, L.; GOLOVKO, O.. Use of lignocellulosic substrate colonized by oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) for removal of organic micropollutants from water. **Journal of Environmental Management**, v.272, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111087>

JI, C.; HOU, J.; CHEN, V.. Cross-linked carbon nanotubes-based biocatalytic membranes for micro-pollutants degradation: Performance, stability, and regeneration. **Journal of Membrane Science**, v.520, p.869-880, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.08.056>

KASONGA, T. K.; COETZEE, M. A. A.; ZIJL, C. V.; MOMBA, M. N. B.. Removal of pharmaceutical' estrogenic activity of sequencing batch reactor effluents assessed in the T47D-KBluc reporter gene assay. **Journal of Environmental Management**, v.240, p.209-218, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.113>

KIM, S.; ROSSMASSLER, K.; BROECKLING, C. D.; GALLOWAY, S.; PRENNI, J.; LONG, S. K.. Impact of inoculum sources on biotransformation of pharmaceuticals and personal care products. **Water Research**, v.125, p.227-236, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.041>

KUMAR, V. V., CABANA, H.. Towards high potential magnetic biocatalysts for on-demand elimination of pharmaceuticals. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 81-89, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.100>.

LI, X; HE, Q.; LI, H; GAO, X; HU, M; LI, S; ZHAI, Q; JIANG, Y; WANG, X.. Bioconversion of non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and naproxen by chloroperoxidase. **Biochemical Engineering Journal**, v.120, p.7-16, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.12.018>

LONAPPAN, L.; LIU, Y.; ROUISSI, T.; POURCEL, F.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y.. Covalent immobilization of laccase on citric acid functionalized micro-biochars derived from different feedstock and removal of diclofenac. **Chemical Engineering Journal**, v.351, p.985-994, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.06.157>

LLORET, L.; EIBES, G.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.. M. On the use of a high-redox potential laccase as an alternative for the transformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.97, p.233-242, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.08.021>

MARCO, E. U.; TRUJILLO, M. P.; MORATÓ, C. C.; CAMINAL, G.; VICENT, T.. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates. **Journal of Hazardous Materials**, v.176, n.1-3, p.836-842, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.112>

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; REGOLI, F.. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. **Marine Environmental Research**, v.140, p.41-60. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.001>

OLINCÓN, D. R. H.; CAMACHO, R. L. M.; POZO, C.; GONZÁLEZ, J. L.; 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.607-614, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.248>

OUADA, S. B.; ALI, R. B.; CIMETIERE, N.; LÉBOULANGER, C.; OUADA, H. B.; SAYADI, S.. Biodegradation of diclofenac by two green microalgae: *Picocystis* sp. and *Graesiella* sp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.186, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109769>

PRIMOŽIČ, M.; KRAVANJA, G.; KNEZ, Z.; CRNJAC, A.; LEITGEB, M.. Immobilized laccase in the form of (magnetic) cross-linked enzyme aggregates for sustainable diclofenac (bio)degradation. **Journal of Cleaner Production**, v.275, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124121>

PYPE, R.; SEPTAVAU, J.; AMAR, B. O. H.; DEBASTE, F.. Polymerization and formation of insoluble byproducts of diclofenac using *Trametes versicolor* laccases – Experimental study and modelling. **Journal of Water Processes Engineering**, v.32, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100948>

SHAH, A.; SHAH, M.. Characterisation and bioremediation of wastewater: A review exploring bioremediation as a sustainable technique for pharmaceutical wastewater. **Groundwater for Sustainable Development**, v.11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2020.100383>

SHARMA, S.; SETIA, H.; TOOR, A. P.. Understanding the remedial strategy of *Klebsiella pneumoniae* WAH1 against emerging contaminant diclofenac sodium. **Environmental Technology & Innovation**, v.21, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101185>

SILVA, J. K. P., HOLANDA, J. R. A. B., SANTOS, J. T., PINHEIRO, C. M., QUADRO, M. S.. Um estudo sobre a ocorrência do fármaco diclofenaco no meio ambiente. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 29. **Anais**. Pelotas: UFPel, 2020.

SPINA, F.; GEA, M.; BICCHI, C.; CORDERO, C.; SCHILIRÒ, T.; VARESE, G. C.. Ecofriendly laccases treatment to challenge emerging contaminants issue. **Environmental Pollution**,

v.257, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113579>

STADLMAIR, L. F.; LETZEL, T.; DREWES, J. E.; GRAßMANN, J.. Mass spectrometry based in vitro assay investigations on the transformation of pharmaceutical compounds by oxidative enzymes. **Chemosphere**, v.174, p.466-477, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.140>

TYAGI, B.; KUMAR, N.. Bioremediation: principles and applications in environmental management. In: SAXENA, G.; KUMAR, V.; SHAH, M. P. **Bioremediation for Environmental Sustainability**, p.3-28, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00001-8>

VASILIADOU, I. A.; SÁNCHEZ-VÁSQUEZ, R.; MOLINA, R.; MARTÍNEZ, F.; MELERO, J. A.; BAUTISTA, L. F.; IGLESIAS, J.;

MORALES, G.. Biological removal of pharmaceutical compounds using white-rot fungi with concomitant FAME production of the residual biomass. **Journal of Environmental Management**, v.180, p.228-237, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.05.035>

WANG, J.; HE, B.; YAN, D.; HU, X.. Implementing ecopharmacovigilance (EPV) from a pharmacy perspective: A focus on non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Science of The Total Environment**, v.603-604, p.772-784, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.209>

YANG, Y.; SIKOK, Y.; HYUNKIM, K.; KWON, E. E.; TSANG, Y. F.. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. **Science of The Total Environment**, v.596- 597, 2017.

Os autores detêm os direitos autorais de sua obra publicada. A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detêm os direitos materiais dos trabalhos publicados (obras, artigos etc.). Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas ou digitais sob coordenação da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.

Todas as obras (artigos) publicadas serão tokenizadas, ou seja, terão um NFT equivalente armazenado e comercializado livremente na rede OpenSea (https://opensea.io/HUB_CBPC), onde a CBPC irá operacionalizar a transferência dos direitos materiais das publicações para os próprios autores ou quaisquer interessados em adquiri-los e fazer o uso que lhe for de interesse.



Os direitos comerciais deste artigo podem ser adquiridos pelos autores ou quaisquer interessados através da aquisição, para posterior comercialização ou guarda, do NFT (Non-Fungible Token) equivalente através do seguinte link na OpenSea (Ethereum).

The commercial rights of this article can be acquired by the authors or any interested parties through the acquisition, for later commercialization or storage, of the equivalent NFT (Non-Fungible Token) through the following link on OpenSea (Ethereum).



<https://opensea.io/assets/ethereum/0x495f947276749ce646f68ac8c248420045cb7b5e/44951876800440915849902480545070078646674086961356520679561157796706731950081/>