



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BEATRIZ LACERDA FERREIRA

**BIODEGRADAÇÃO DE IBUPROFENO MEDIADOS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO PROVENIENTE DE EXTRAÇÃO DE
MINÉRIO DE FERRO**

Macapá-AP

2024

BEATRIZ LACERDA FERREIRA

**BIODEGRADAÇÃO DE IBUPROFENO MEDIADOS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO PROVENIENTE DE EXTRAÇÃO DE
MINÉRIO DE FERRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira

Co-orientadora: Prof.^a Dr^a Lilian Grace da Silva Solon

Macapá-AP

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central/UNIFAP-Macapá-AP
Elaborado por Cristina Fernandes – CRB-2 / 1569

L131b Ferreira, Beatriz Lacerda.

Biodegradação de ibuprofeno mediado por fungos filamentosos isolados do solo proveniente de extração de minério de ferro / Beatriz Lacerda Ferreira. - Macapá, 2024.
1 recurso eletrônico. 100 folhas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Amapá. Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Macapá, 2024.

Orientador: Irlon Maciel Ferreira.

Coorientador: Lilian Grace da Silva Solon.

Modo de acesso: World Wide Web.

Formato de arquivo: Portable Document Format (PDF).

1. Fungos amazônicos. 2. Anti-inflamatórios não esteroides. 3. Degradação microbiana. I. Ferreira, Irlon Maciel, orientador. II. Solon, Lilian Grace da Silva, coorientador. III. Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

CDD 23. ed. – 615.58

FERREIRA, Beatriz Lacerda. Biodegradação de ibuprofeno mediado por fungos filamentosos isolados do solo proveniente de extração de minério de ferro. Orientador: Irlon Maciel Ferreira. 2024. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amapá. Macapá, 2024.

BEATRIZ LACERDA FERREIRA

**BIODEGRADAÇÃO DE IBUPROFENO MEDIADOS POR FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DO SOLO PROVENIENTE DE EXTRAÇÃO DE
MINÉRIO DE FERRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data de Aprovação: 05/03/2024

Orientador - Prof. Dr. Irlon Maciel Ferreira

Co-orientadora: Prof.^a Dr^a Lilian Grace da Silva Solon

Avaliador 1 – Melissa Fontes Landell

Avaliador 2 – Iracirema da Silva Sena

Dedico este trabalho a Deus, meu orientador,
meus pais e a minha querida avó Antônia, pelo
incentivo, confiança e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela dádiva da vida, pela sabedoria, pela saúde e força, que sempre me guiou em todos os momentos da minha vida, e que colocou em meu caminho pessoas especiais, que fazem parte de tudo que conquistei.

Esse trabalho, contou com o apoio de pessoas importantes, dentre as quais agradeço.

Ao meu orientador Prof. Dr Irlon Maciel Ferreira, por abrir as portas do seu conhecimento, por acreditar em minha capacidade, por toda dedicação, paciência e confiança empenhada na elaboração deste trabalho.

A minha co-orientadora Prof. Dr. Lilian Grace da Silva Solon, pela oportunidade de partilhar novos conhecimentos.

A minha amada mãe Maria Antônia e meu pai Geldinei que sempre me incentivaram, não permitiram que eu desistisse nos momentos de desânimo, e sempre acreditaram no meu sucesso, tudo que sou é graças ao apoio que sempre me concederam.

A minha querida avó Antônia, que me deu forças para sempre seguir em frente e superar todas as adversidades, meu exemplo de força e esperança.

As minhas amadas irmãs, Ana, Mel e Priscilla, pelo amor fraterno, por sempre partilharem comigo dos momentos bons e ruins.

Ao meu companheiro de vida, meu querido Daniel, por seu amor, sua amizade, por me motivar nos momentos de dúvida e incentivar a lutar sempre por meus objetivos.

A minha querida amiga Dionisia, por todos esses anos de amizade, pelo afeto, pelo companheirismo nos estudos, por sonharmos juntas por um futuro melhor.

Aos laboratórios por conceder seus espaços para execução da parte prática deste trabalho, agradeço ao Laboratório de Controle de Qualidade e Bromatologia (UNIFAP), ao Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise (USP-IQSC), Laboratório de Analítica e Química ambiental (UNIFAP), e ao Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada (UNIFAP) por conceder o ambiente de trabalho, reagentes e materiais necessários para a execução da pesquisa.

Ao Prof. Dr André Luiz Meleiro Porto e Dr. Willian Birolli, por todo suporte e acolhimento durante minha passagem pela Universidade de São Paulo - Instituto de Química de São Carlos (USP-IQSC).

A Todas as pessoas do Grupo de Pesquisa em Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada (BIORG), em especial a Patrícia Nóbrega, Iracirema Sena, Adriana Maciel, Victor Marinho, David Quintero, Fabricio Holanda e Swanny Borges pela colaboração no desenvolvimento do trabalho, pelo companheirismo, amizade e ajuda.

Agradeço a Universidade Federal do Amapá e ao Programa de Pós Graduação em ciências Farmacêuticas -UNIFAP, a seu corpo docente, administrativo e a todos que direta e indiretamente contribuíram nesse processo de formação, obrigada pela oportunidade a mim concedida.

A FAPEAP e CAPES pelo apoio financeiro recebido através da bolsa de mestrado.

*“O segredo é não correr atrás das
borboletas... é cuidar do jardim
para que elas venham até você.”*

(Mario Quintana)

Introdução: A epidemia da COVID-19 proporcionou um aumento significativo no consumo de anti-inflamatório não esteroidais AINES. O ibuprofeno (IBU), está entre os AINES mais consumidos pela sociedade mundial, isso faz que frequentemente essa substância seja detectado em ambientes aquáticos, geralmente em limites acima dos permitidos pelas agências reguladoras. Os AINES, como IBU, ao entrarem em contato com o meio ambiente (água e solo), tornam-se micropoluentes. Esse estudo aborda a biodegradação de ibuprofeno empregando fungos filamentosos de solo da floresta Amazônica, como proposta viável ecologicamente e de baixo custo. **Objetivo:** Diante disso, o objetivo deste estudo foi realizar a biodegradação do fármaco anti-inflamatório não esteroideal (Ibuprofeno). **Metodologia:** Para isso foi realizado uma análise bibliométrica incluindo a base de dados do *Google Scholar*, *Web of Science*, *Dimension e Scopus* na busca de artigos entre 2012 e 2023 para coletar informações relevantes referentes a biodegradação de AINES. Neste estudo foi isolado, identificado e avaliado a aplicabilidade dos fungos de solos amazônicos [*Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752, *Penicillium rolfsii* CBMAI 2753, *Talaromyces verruculosus* CBMAI 2754, *Asrpegillus* sp. cf. *pseudoviridinutans* CBMAI 2755, *Purpureocillium lilacinum* CBMAI 2757 e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758] na degradação do AINES ibuprofeno. Um delineamento experimental foi realizado com a cultura dos fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense*, onde foi otimizado as condições reacionais, variando tempo, pH e concentração de ibuprofeno. Foi realizado a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV) para quantificar o conteúdo de biodegradação e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) para detectar e identificar metabólitos. Ademais, uma avaliação toxicológica foi realizada utilizando o modelo animal zebrafish (*Danio rerio*). **Resultados e Discussões:** As cepas fúngicas do *Trichoderma pseudoasperelloides* e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* foram selecionadas por meio da triagem em meio sólido para os ensaios reacionais de biodegradação em meio de cultura líquido. Os resultados obtidos através do delineamento experimental (*Box-behnken*) composto por 15 experimentos para cada cepa, tendo como variáveis: pH (5, 7 e 9), período (3, 6 e 9 dias) e concentração de IBU (20, 60 e 100 mg.L⁻¹) mostraram que esses fungos filamentosos de solo são capazes de alcançar percentual de degradação acima de 99%. Foi reputado, a identificação de três possíveis estruturas químicas associadas a biodegradação de IBU, pelos fungos de solo em estudo. O ensaio de toxicidade mostrou que os metabólitos obtidos através desse processo de biodegradação não são nocivos na concentração testada. **Conclusões:** Os fungos filamentosos do solo são capazes de acelerar a biodegradação do IBU e poderiam ser melhor estudados em estações de tratamento de resíduos. Além disso, este é o primeiro estudo de biodegradação de IBU utilizando fungos filamentosos de solo de mina de ferro isolados da região amazônica.

Palavras-chave: Fungos amazônicos; anti-inflamatórios não esteroides; biotransformação; micropoluente; degradação microbiana.

Agradecimentos: CAPES, FAPEAP e PROPESPG/UNIFAP.

Introduction: The COVID-19 epidemic has led to a significant increase in the consumption of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Ibuprofen (IBU) is among the NSAIDs most consumed by society worldwide, which means that this substance is often detected in aquatic environments, usually at limits above those allowed by regulatory agencies. When NSAIDs such as IBU come into contact with the environment (water and soil), they become micropollutants. This study looks at the biodegradation of ibuprofen using filamentous fungi from the soil of the Amazon rainforest, as an ecologically viable and low-cost proposal. **Objective:** The aim of this study was to biodegrade the non-steroidal anti-inflammatory drug Ibuprofen. **Methodology:** For this purpose, a bibliometric analysis was carried out using the Google Scholar, Web of Science, Dimension and Scopus databases to search for articles between 2012 and 2023 in order to gather relevant information regarding the biodegradation of NSAIDs. This study isolated, identified and evaluated the applicability of fungi from Amazonian soils [*Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752, *Penicillium rolfsii* CBMAI 2753, *Talaromyces verruculosus* CBMAI 2754, *Asrpegillus* sp. cf. *pseudoviridinutans* CBMAI 2755, *Purpureocillium lilacinum* CBMAI 2757 and *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758] in the degradation of the NSAID ibuprofen. An experimental design was carried out with the culture of the fungi *Trichoderma pseudoasperelloides* and *Penicillium* sp. cf. *guaibinense*, where the reaction conditions were optimized, varying time, pH and ibuprofen concentration. Analysis was carried out using high-performance liquid chromatography (HPLC-UV) to quantify the biodegradation content and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) to detect and identify metabolites. In addition, a toxicological evaluation was carried out using the zebrafish animal model (*Danio rerio*). **Results and Discussions:** The fungal strains of *Trichoderma pseudoasperelloides* and *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* were selected through screening in solid media for the biodegradation reaction trials in liquid culture media. The results obtained through the experimental design (*Box-behnken*) consisting of 15 experiments for each strain, with the following variables: pH (5, 7 and 9), period (3, 6 and 9 days) and IBU concentration (20, 60 and 100 mg.L⁻¹) showed that these filamentous soil fungi are capable of achieving a degradation percentage of over 99%. Three possible chemical structures associated with the biodegradation of IBU by the soil fungi under study were identified. The toxicity test showed that the metabolites obtained through this biodegradation process were not harmful at the concentration tested. **Conclusions:** Filamentous soil fungi are capable of accelerating the biodegradation of IBU and could be better studied in waste treatment plants. Furthermore, this is the first study of IBU biodegradation using filamentous fungi from iron mine soil isolated from the Amazon region.

Keywords: Amazonian fungi; non-steroidal anti-inflammatory drugs; biotransformation; micropollutant; microbial degradation.

Acknowledgements: CAPES, FAPEAP e PROPESPG/UNIFAP.

Figure 1. (A) Illustration of the simplified mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the inhibition of cyclooxygenase II. (B) Biotransformation route of NSAIDs in the liver	25
Figure 2. Number of publications by year (2013 - 2023), and most frequent words related to COVID-19 with NSAIDs	30
Figure 3. Some metabolites of IBU degradation from fungi or bacteria are described in the literature (Salgado et al., 2020; Li et al., 2022)	33
Figure 4. Some PAR metabolites from fungi or bacteria are described in the literature (Žur et al., 2018b; Rios-Miguel et al., 2022b)	38
Figure 5. (A) Schematic representation of DCF degradation by fungi or bacteria described in the literature (Bessa et al., 2017b; Ivshina et al., 2019b; Wojcieszńska et al., 2023)	39
Figura 1: Fluxograma de reações utilizadas na validação do método (pH 7, 30°, 96 h, 150 rpm)	67
Figura 2: Espécies de fungos isolados do solo de mina de ferro	71
Figura 3: Estudo crescimento radial das cepas de fungos isolados do solo de mina de ferro em meio de cultura sólido com IBU. (Malte e Ágar 2%, pH 5, 30°, 7 dias)	73
Figura 4: Curva de Calibração do método obtida a partir da análise de regressão linear (n=3)	76
Figura 5: Cromatograma da Curva de Calibração do padrão de IBU por HPLC-UV	77
Figura 6: Cromatograma HPLC-UV para amostras de IBU, Controle Células Fúngicas e Controle Malte 2%.	78
Figura 7: Gráfico de Pareto de efeitos de teor de biodegradação IBU (%) por cepas dos fungos <i>Trichoderma pseudoasperelloides</i> CBMAI 2752 (A) e <i>Penicillium</i> sp. cf. <i>guaibinense</i> CBMAI 2758 (B)	79
Figura 8: Gráfico de Superfície de resposta e conteúdo de biodegradação de IBU mediado pelo fungo <i>Trichoderma pseudoasperelloides</i> CBMAI 2752, em função de (A) tempo de reação (x1)	

e pH do meio de cultivo (x2); (B) tempo de reação (x1) e concentração de IBU (x3); (C) pH
meio de cultivo (x2) e concentração de IBU (x3) 80

Figura 9: Gráfico de Superfície de resposta e conteúdo de biodegradação de IBU mediado pelo
fungo *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758, em função de (A) tempo de reação (x1) e
pH do meio de cultivo (x2); (B) tempo de reação (x1) e concentração de IBU (x3) 81

Figura 10: Rota de Biodegradação de IBU por fungos de solos amazônicos 83

Figura 11: Morfologia dos embriões de zebrafish na concentração de 8,06mg/L das soluções
em estudo pós 24 hpf em comparação com os grupos controles, água e DMSO 3%
..... 85

Figura 12: Morfologia dos embriões de zebrafish na concentração de 8,06mg/L das soluções
em estudo pós 96 hpf em comparação com os grupos controles, água e DMSO 3% 86

Table 1. Physicochemical properties of DCF, IBU, and PAR 25

Table 2. Summary of DCF, IBU, and PAR biodegradation 40

Tabela 1. Variáveis independentes usadas no planejamento fatorial de *Box-Behnken* empregado 66

Tabela 2: Grupos utilizados no ensaio de toxicidade em embriões de zebrafish 69

Tabela 3: Crescimento micelial de cepas dos fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758 74

Tabela 4: Comparação de Parâmetros analíticos para análise de precisão/exatidão e concentrações de IBU76

Tabela 5: Matrix design experimental e respostas das variáveis fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758 81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AHRQ	Agência de Pesquisa e Qualidade em Saúde
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectroscopia de Massas
CL-AE	Cromatografia Líquida Alta Eficiência
COX	Cliclooxigenase
CV	Coefficiente de variação
DCF	Diclofenaco
DPR	Desvio padrão relativo
EP	Extrato fúngico <i>Penicillium sp. cf. guaibinense</i>
ET	Extrato fúngico <i>Trichoderma pseudoasperelloides</i>
EUA	Estados Unidos da América
IBU	Ibuprofeno
MEOs	Micropoluentes orgânicos
MEPS	Painel de Despesas Médicas
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs
PAR	Paracetamol
PBP	Produto biodegradação ibuprofeno <i>Penicillium sp. cf. guaibinense</i>
PBT	Produto biodegradação ibuprofeno <i>Trichoderma pseudoasperelloides</i>
pH	Potencial hidrogeniônico

R²

coeficiente de regressão

RDC

Resolução da Diretoria Colegiada

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO: ARTIGO 1	20
Diclofenac, ibuprofen and paracetamol biodegradation: overconsumed non-steroidal anti-inflammatory drugs at COVID-19 pandemic	21
1 Introduction	22
2 Pharmacology of the inflammatory process and possible COVID-19 impacts	23
3 Ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)	25
4 Scope of research and bibliometric analysis	27
5 Biodegradation of Diclofenac	30
6 Biodegradation of Ibuprofen	33
7 Biodegradation of Paracetamol	37
8 Conclusions and future directions	48
9 Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.	50
10 Author Contributions	50
11 Funding	50
References	50
4 ARTIGO 2	60
Uso de fungos filamentosos, isolados do solo proveniente de extração de minério de ferro, na biodegradação de ibuprofeno.	60
Introdução	61
Material e Métodos	63
Reagentes e Solventes	63
Coleta de amostras de solo	63
Isolamento dos fungos filamentosos	63
Identificação molecular dos fungos filamentosos	64
Estudo do crescimento radial na presença de ibuprofeno	64
Reação de Biodegradação de Ibuprofeno mediadas por Fungos em meio líquido.	65
Extração dos produtos de biodegradação	65
Análise estatística (Desenho Experimental)	66

Validação Método.....	66
Quantificação de Ibuprofeno por análise HPLC-UV.....	68
Detecção de IBU e Metabólitos por análise de Cromatografia gasosa e espectroscopia de massa s (GC-MS).....	68
Estudo de toxicidade em embriões do modelo animal zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	69
Resultados e Discussão	71
Identificação fungos filamentosos	71
Crescimento radial de fungos em meio sólido com ibuprofeno	72
Método de Validação.....	76
Avaliação da biodegradação do ibuprofeno através do planejamento experimental	78
Identificação de IBU e seus metabólitos.....	82
Análise toxicológica em embriões zebrafish	84
Conclusão.....	87
Referências.....	88
Informações Suplementares	93
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	95
ANEXOS E APÊNDICES.....	96
ANEXO 1 – Parecer do comitê de Ética	96
ANEXO 2 – Normas de publicação dos respectivos periódicos	97

1 INTRODUÇÃO

A humanidade está sempre em busca da aquisição de medicamentos, para aliviar incômodos correlacionados a saúde. O alto consumo, em alguns casos provocado pela

facilidade no acesso à alguns medicamentos, tornaram-se descontrolado em alguns aspectos, principalmente na geração de rejeitos indesejáveis advindo de medicamentos, que ao serem expostos ao descarte incorreto são nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Atualmente os problemas ambientais e suas consequências quanto a qualidade de vida propiciou diversas discussões no qual buscam alternativas para o descarte correto de medicamentos, visando garantir a efetividade e segurança no tratamento efluentes que contenham este resíduo.

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), estão entre os medicamentos mais utilizados no mundo. São prescritos como uma categoria de medicamentos utilizados para tratamento de processos reumáticos (osteoartrite, artrite reumatoide, reumatismo articular), distúrbios musculoesqueléticos e também utilizado para alívio de sintomas com dor e febre recorrente de processos inflamatórios. Esses fármacos incluem o ibuprofeno e outros agentes tais como, paracetamol e diclofenaco, inibidores de enzimas ciclooxigenase (COX).

A epidemia da COVID-19 proporcionou um aumento significativo no consumo das AINES. Entre esses, o ibuprofeno, está entre os AINES mais consumidos pela sociedade mundial, isso faz que frequentemente essa substância seja detectado em ambientes aquáticos, principalmente em águas residuais (conhecida como esgoto bruto), e em águas superficiais (rios, riachos, córregos, lagos e etc.), geralmente em limites acima dos permitidos pelas agências reguladoras.

Os AINEs, como ibuprofeno, ao entrarem em contato com o meio ambiente (água e solo), tornam-se micropoluentes. Os micropoluentes são considerados substâncias altamente tóxicas que desperta preocupação as entidades de proteção ambiental, porém seus efeitos ao meio ambiente isolado ou combinados com outros (micro)poluentes ainda são poucos estudada.

A biodegradação é considerada o processo mais importante para a eliminação da maioria das substâncias xenobióticos orgânicas, incluindo as drogas, portanto são importantes degradadores de substâncias orgânicas, incluindo produtos farmacêuticos. Por existir uma alta demanda na elucidação da rota metabólica dos fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, especialmente o ibuprofeno, inclusive combinado com outros xenobióticos sintéticos ou naturais, a biodegradação de medicamentos, é uma alternativa frente a outros métodos (químicos e físicos) por fazer uso de meios economicamente viáveis e ambientalmente aceito, já que envolve processo biodegradável de fácil manipulação.

A utilização de microrganismos para biodegradação de fármacos como micropoluentes orgânicos (MEOs) é uma alternativa sustentável, que apresenta algumas vantagens, por ser biodegradáveis, de fácil manipulação e baixo custo operacional, quando comparado aos

métodos físico-químicos tradicionais, que geralmente utilizam metais, ou co-ativos, ou fotodegradação, que exige um gasto energético alto e a inclusão de etapas adicionais.

O bioma amazônico abriga extensa diversidade ecológica, que abrange os ecossistemas aquáticos e terrestres. A amazônica possui aspectos favoráveis para a obtenção de diferentes espécies de microrganismos, como os fungos e as bactérias. Os fungos filamentosos estão presentes em diversos ambientes, como em espécies vegetais, água e solo. Diversos estudos vêm abordando o potencial biotecnológico desses microrganismos, como agente de biodegradação natural de MEOs, dentre esses os fármacos.

O zebrafish é útil para avaliar a toxicidade de substâncias orgânicas, uma vez que possuem alta similaridade com o genoma humano, no qual o torna um modelo animal com potencial para estabelecer estudos de avaliação toxicológica ambiental de fármacos e produtos de biodegradação. Pode-se relacionar toxicidade com os danos que substâncias orgânicas podem causar ao organismo o qual entra em contato. Portanto neste estudo a presença de substâncias químicas nos ecossistemas aquáticos é levantada como preocupantes, capazes de interferir na função dos organismos dos animais, causando impacto negativo no processo.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi realizar a biodegradação do fármaco anti-inflamatório não esteroidal (Ibuprofeno), mediado por células totais de fungos isolados do solo de mina de ferro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos de biodegradação do ibuprofeno, fármaco anti-inflamatório não esteroide, mediado por células totais de fungos de ambiente amazônico, isolados do solo de mina de ferro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o processo de triagem em meio sólido com diferentes espécies de fungos filamentosos;
- Avaliar o comportamento do crescimento micelial dos fungos em meio sólido, em diferentes concentrações de IBU;
- Otimizar o processo de biodegradação com diferentes condições reacionais (pH, dias de reação e concentração do substrato);
- Quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência (CL-AE) a taxa de biodegradação de Ibuprofeno por fungos do solo;
- Propor uma rota de biodegradação plausível através dos possíveis metabólitos identificados no processo de biodegradação;
- Avaliar a taxa de toxicidade embrionária em zebrafish (*Danio rerio*), a partir do conjunto de substâncias obtidas pelo processo de biodegradação do IBU.

3 REFERENCIAL TEÓRICO: ARTIGO 1

Artigo publicado na revista Frontiers in Microbiology (Qualis A2)

Diclofenac, ibuprofen and paracetamol biodegradation: overconsumed non-steroidal anti-inflammatory drugs at COVID-19 pandemic

Beatriz L. Ferreira¹, Dionisia P. Ferreira¹, Swanny F. Borges¹, Adriana M. Ferreira¹, Fabricio H. Holanda¹, João G. M. Ucella-Filho², Rodrigo Alves S. Cruza¹, Willian G. Birolli³, Rafael Luque^{4,5}, Irlon M. Ferreira^{1,*}

¹Biocatalysis and Applied Organic Synthesis Laboratory, Federal University of Amapá, University Campus Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira Km 02, 68902-280, Bairro Zerão, Macapá, AP, Brazil.

²Department of Forestry and Wood Sciences, Federal University of Espírito Santo, Jerônimo Monteiro 29550-000, Espírito Santo, Brazil.

³Molecular Oncology Research Center, Institute of Learning and Research, Barretos Cancer Hospital, Av. Ébano 165-1, 14784-384, Dr. Paulo Prata, Barretos, SP, Brazil.

⁴Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Marie Curie (C-3), Ctra Nnal IV-A, Km 396, Cordoba, Spain.

⁵Universidad ECOTEC, Km. 13.5 Samborondon, Samborondon, EC092302, Ecuador.

* Correspondence:

irlon.ferreira@gmail.com orcid.org/0000-0002-4517-0105

Keywords: COVID-19, Mycodegradation, Bioremediation, SARS-CoV-2, NSAID.

Abstract

The consumption of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have increased significantly last year, especially for patients in COVID-19 treatment. NSAIDs such as diclofenac, ibuprofen, and paracetamol are often available without restrictions, being employed without medical supervision for basic symptoms of inflammatory processes. Furthermore, these compounds are increasingly present in nature constituting complex mixtures discarded at domestic and hospital sewage/wastewater. Therefore, this review emphasizes the environmental fate of NSAIDs (diclofenac, ibuprofen, and paracetamol) due to biodegradation by pure cultures or consortia of fungi and biodegradation at in situ and ex situ processes. Considering the influence of different factors (inoculum dose, pH, temperature, co-factors, reaction time, and microbial isolation medium) relevant for the identification of highly efficient alternatives for pharmaceuticals biodegradation, since biologically active micropollutants became a worldwide issue that should be carefully addressed. In addition, we present a quantitative bibliometric survey, which reinforces that the consumption of these drugs and consequently their impact on the environment goes beyond the epidemiological control of COVID-19.

1 Introduction

In a turnaround moment for humanity, 27 cases of pneumonia of unknown etiology were reported on 31 December 2019 in the city of Wuhan, Hubei Province, China. Later, the fast-spreading agent was identified and named Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), and the new disease was known as Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) by the World Health Organization (WHO) (Hu et al., 2021; Oscanca et al., 2020).

In March 2020, WHO warned governments to constitute response and containment initiatives to an epidemic, later classified as a pandemic scenario. A series of measures were proposed and used in an attempt to contain the virus spreading, including home quarantine of infected persons and those who entered into contact with them (Zhang et al., 2020). However, the available tools and resources were not enough to prevent this threat to mankind.

Mild symptoms of SARS-CoV-2 can be misunderstood with different viruses, as fever, shortness of breath, and diarrhea. Whereas severe cases can lead to pneumonia, severe acute respiratory syndrome, renal failure, multiple organ failure, and death (Sighal et al., 2020). Although the pathogenesis of this disease is still not completely understood, growing evidence indicate that a dysregulated (Zoulikha et al., 2022) inflammatory syndrome is narrowly associated with COVID-19 severity and poor prognosis, which results from the high levels of inflammatory cytokines like IL2, IL7, IL10, GCSF, IP10, MCP1, MIP1A, and TNF α (Chen et al., 2020).

During the initial pandemic period, different known anti-viral, anti-malarial, and anti-inflammatory drugs were explored and introduced into the treatment. In this context, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) were widely employed for COVID-19, especially in patients at home. With over-the-counter availability, they have often been used without medical supervision to treat the basic symptoms of COVID-19, promoting excessive NSAIDs detection in wastewater treatment plants at both domestic and hospital sewage (Barcelo et al., 2020). Also, it is important to note that the consumption of these drugs increased significantly during the COVID-19 pandemic, even in comparison to other types of medication (Luis et al., 2022).

Before this period, NSAIDs were already among the most consumed drugs considering both with and without a prescription (Osafo et al., 2017). Therefore, it is important to note that the continuous use of these drugs, even at sub-therapeutic concentrations, represents a potential

risk to public health, although it is not possible to evaluate the effects of exposure at present (Santos et al., 2010; Stackelberg et al., 2004).

It is known that many non-target organisms (which possess human- and animal-alike metabolic pathways, similar receptors, or biomolecules) are inadvertently exposed to these active pharmaceuticals released into the environment (Santos et al., 2010; Fent et al., 2006). A problem that can be aggravated by the constitution of complex mixtures of biological products that, in some cases, originate from unknown super contaminants (Fent et al., 2005).

The removal of different NSAIDs through treatment stations has been reported as inefficient (Khasawneh et al., 2021; Tiwari et al., 2017). Therefore, several strategies, including mycoremediation (Aracagök et al., 2018), bacterial remediation (Wojcieszynska et al., 2002), membranes, and hybrid materials have been investigated for these purposes (Gu et al., 2018).

2 Pharmacology of the inflammatory process and possible COVID-19 impacts

The inflammatory process is considered a natural reaction of the organism in a protective response against harmful endogenous (immunological, neurological, damaged cells) and exogenous effects (physical, chemical, and infectious), which involves different types of immune cells, blood vessels, chemical and molecular mediators. The purpose of this process is aimed to block, inactivate, or eliminate harmful agents (Borges et al., 2018; Feehan et al., 2019). In most cases, after elimination, the inflammation resolution occurs and the body returns to homeostasis. However, cause resistance and inefficient resolution can culminate in an exacerbated and prolonged inflammatory response that plays a key role in the development of multiple diseases (Feehan et al., 2019; Badri et al., 2016; Holanda et al., 2023).

The conventional pharmacologic intervention for the resolution of these inflammatory processes contemplated the use of anti-inflammatory drugs, which include the NSAIDs approached in this discussion, steroidal anti-inflammatory drugs (AIES) or glyocorticoids (Peesa et al., 2016; Zadori et al., 2023).

NSAIDs present different chemical structures with similarities in the action mechanism, resulting in anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic properties. These compounds are mainly indicated to treat symptoms of acute disorders (fever, edema, and pain), as well as in the treatment of chronic diseases. The main representatives of these drugs are salicylic acid, diclofenac (DCF), nimesulide, ibuprofen (IBU), piroxicam, meloxicam, naproxen, ketoprofen, mefenamic acid, celecoxib (Chen et al., 2019; Wojcieszynska et al., 2022).

Another active ingredient with increased consumption due to COVID-19 pandemic was paracetamol (PAR), also known as acetaminophen, which does not belong to the NSAIDs group because this compound does not present anti-inflammatory activity, but promotes analgesic and antipyretic properties similar to NSAIDs. Regarding this, some studies have reported that PAR activity is also related to the inhibition of the cyclooxygenase (COX) enzymes, demonstrating a preferential inhibition of COX-2 (Wojcieszynska et al., 2022; Huntjens et al., 2005; Ward et al., 1999) (Figure 1A).

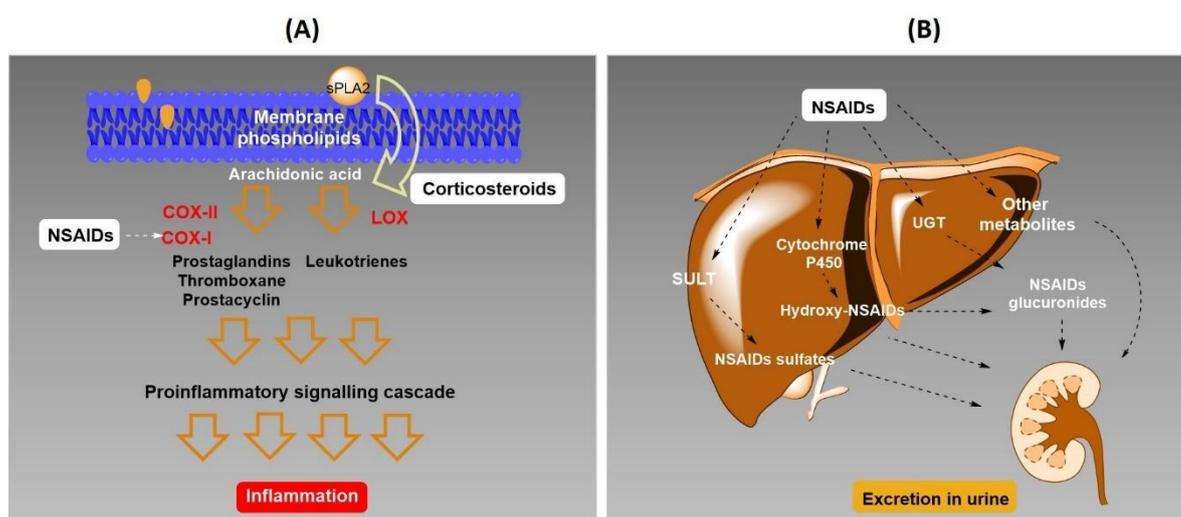


Figure 1. (A) Illustration of the simplified mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the inhibition of cyclooxygenase II. (B) Biotransformation route of NSAIDs in the liver.

The inflammatory process is considered an important part of the pathogenesis of various diseases (e.g., rheumatoid arthritis, diabetes, and cancer), and most of the time, it is a determinant factor regarding severity and complexity (Feehan et al., 2019). In this sense, several studies have already shown that, in the severe cases of COVID-19, the Sars-Cov-2 virus infection promotes multisystem inflammation, generating intense tissue and cellular damage with respiratory, cardiovascular, liver, and renal complications concomitant with coagulation. Thus, demonstrating a strong relationship between disease aggravation and hyperinflammatory response (Micallef et al., 2020; Perico et al., 2023; de Almeida et al., 2020). Therefore, the clinical manifestations of COVID-19 can be a result from exacerbated inflammatory conditions

for a considerable number of cases, leading to the use of anti-inflammatory drugs as therapeutic strategy.

3 Ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)

Pharmaceutical products are released into the environment in different manners during their life cycle that includes production, distribution, acquisition and home use. The three main routes to transform drugs into micropollutants are excretion after ingestion, medicine or chemical removal during bathing, and direct disposal of unwanted products due to leftovers or expired validity (Ruhoy et al., 2007). In addition, topical formats can contribute significantly with the mass used for ibuprofen and diclofenac disproportionately to the mass released when compared with orally taken products (AUSTIN et al., 2021). For instance, DCF and IBU were determined in wastewater from treatment plants (WWTPs) and effluent receiving water in Nigeria. Maximum concentrations of DCF and IBU in wastewater were $166.1 \mu\text{g L}^{-1}$ and $62.0 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectively (Ajibola et al., 2021). In addition, these authors demonstrated a high environmental risk of IBU to fish and DCF to bacteria. DCF and PAR were also determined in rivers in South Africa in the range of 40 ng L^{-1} to $51.94 \mu\text{g L}^{-1}$ for DCF and from 96.70 to almost $152 \mu\text{g L}^{-1}$ for PAR (Omotola et al., 2020).

Furthermore, ketoprofen ($42\text{--}133 \text{ ng L}^{-1}$), IBU ($73\text{--}126 \text{ ng L}^{-1}$), DCF ($199\text{--}469 \text{ ng L}^{-1}$), mefenamic acid ($8\text{--}13 \text{ ng L}^{-1}$), salicylic acid ($54\text{--}109 \text{ ng L}^{-1}$) were detected in the Besós river at urbanized areas of Barcelona (Spain). In addition, the approached drugs were also observed in the aquifer (Jurado et al., 2021).

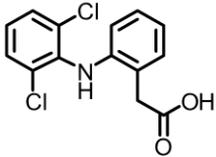
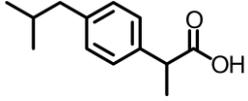
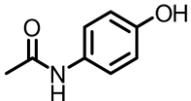
Besides the individual risk of pharmaceuticals, the mixture of contaminants might also pose an unacceptable risk to aquatic habitats (Kumari et al., 2022), however, the effects of toxicity of NSAIDs' are few studies in the aqueous environment (Maculewicz et al., 2022; Scheurell et al., 2009).

In this sense, the toxicity of IBU after photodegradation was investigated using the algae *Chlorella* sp. The toxicity of the obtained byproducts mixture was studied, as well as the toxicity of the main photodegradation product 4-acetylbenzoic acid alone. No effect of the mixture on algae viability was observed in comparison to IBU, whereas 4-acetylbenzoic acid significantly affected *Chlorella* sp. viability, starting from 0.25 mM to concentrations above 0.5 mM which caused death of all cells (Xin et al., 2020).

Moreover, chronic toxicity trials performed on *Oncorhynchus mykiss* evidenced cytological changes in the liver, kidney and gills after 28 days of exposure to just 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of DCF. When exposure reached concentration of 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, renal lesions were evident as well as drug accumulation in liver, kidneys, gills and muscle. DCF also inhibited the growth of marine phytoplankton *Dunaliella tertiolecta* at 25 mg L^{-1} and above (DeLorenzo et al., 2008). IBU ecotoxicity was reported at 5-day exposure to concentrations in the range of 1–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ generating growth stimulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp., but inhibition of the duckweed plant *Lemna minor* after 7 days (Pomati et al., 2004).

Despite the NSAIDs are characterized by relatively low environmental stability especially through biotransformation in aerobic conditions and photolysis occurring in surface waters, today NSAIDs or residues metabolic are frequently detected in surface water, marine water, freshwater reservoirs, rivers and lakes, with range of concentration even several ng L^{-1} up $\mu\text{g L}^{-1}$ (Swiacka et al., 2021). Although physicochemical processes are commonly used in the remediation of NSAIDs, these processes need stringent conditions for the reaction, expensive operational costs, and may cause the formation of more toxic intermediate compounds (Sharma et al., 2019). Therefore, methods of green bioremediation process are an attractive alternative to facilitate the mineralization of NSAIDs into low toxicity product.

Table 1. Physicochemical properties of DCF, IBU, and PAR.

Parameter	DCF	IBU	PAR
Chemical structure			
Chemical formula	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NO ₂	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	C ₈ H ₉ NO ₂
CAS no	15307-86-5	15687-27-1	103-90-2
Water solubility	2.37 mg L ⁻¹	21 mg L ⁻¹	14 g L ⁻¹
PKa	4.15 ^a	4.5 ^b	9.38 ^c
LogKow	4.51 ^a	2.48 ^b	0.46 ^c

^a (Zhang et al., 2008); ^b (Scheytt et al. 2005); ^c (Ward and Alexander-Williams, 1999)

4 Scope of research and bibliometric analysis

Search engines including Google Scholar, Web of Science, and Dimension were used to retrieve literature. Almost 32 research articles published between 2012 to 2023 (February) were used to gather relevant information. The primary search terms were ‘biodegradation and (diclofenac, ibuprofen or paracetamol)’, ‘bacteria removal and (diclofenac, ibuprofen or paracetamol)’, ‘fungi removal and (diclofenac, ibuprofen or paracetamol)’. In addition, a comprehensive bibliometric analysis was carried out using the international scientific database Scopus, with the aim of mapping and understanding the interest and evolution of studies related to NSAIDs during the COVID-19 pandemic. To carry out this study, we followed the methodology proposed by the authors (LUCAS et al., 2023; UCELLA-FILHO et al., 2022), with adaptations. In order to collect data relevant to the topic of study, a search command was drawn up which included keywords pertinent to the focus of the review and which were present in the titles or abstracts of the articles. The following search formula was therefore used: “TITLE (covid-19 OR sars-cov-2 OR coronavirus OR covid19) AND ABS (diclofenac OR "diclofenac potassium" OR "paracetamol" OR "acetaminophen" OR "n-acetyl-p-aminophenol" OR "ibuprofen" OR "2-[4-(2-methylpropil)phenyl]propanoic acid)") OR TITLE (diclofenac OR "diclofenac potassium" OR "paracetamol" OR "acetaminophen" OR "n-acetyl-p-aminophenol" OR "ibuprofen" OR "2-[4-(2-methylpropil)phenyl]propanoic acid)") AND PUBYEAR > 2012 AND PUBYEAR < 2024”. The data collected was processed using the "biblioshiny" function in the "bibliometrix" package (ARIA; CUCCURULLO, 2017) of

software (R CORE TEAM, 2021), allowing us to obtain a structured and quantitative analysis of emerging trends in the field of NSAID research over the last 10 years (2013 to 2023).

Beyond the biodegradation process, several studies relating COVID-19 to drugs categorized as NSAIDs have gained significant adherence in the scientific community, intensifying the number of articles published to better understand the effects of these drugs on the development of COVID-19. To contextualize the fact that the process of environmental contamination by NSAIDs is also present in pre-clinical and clinical testing laboratories, as well as in universities and research institutes, we carried out a comprehensive bibliometric analysis of articles that mention some relationship between NSAIDs and COVID-19, validating this information as mentioned in the Materials and Methods section.

A total of 344 articles addressing the topic under analysis were identified, of which 76 were classified as review articles, book chapters, letters, and communications, while 268 were categorized as research articles, which served as the basis for the data in this study. As expected, there were no studies relating COVID-19 to NSAIDs in the period from 2013 to 2018. However, in 2019, with clinical urgency in the search for information and treatments for the symptoms of this new disease, the first studies are already appearing (CHENG et al., 2020). However, the year with the highest number of publications was 2022, with 89 documents addressing this connection, and from 2023 onwards there was a sharp decline (>50 articles) in the number of publications with this relationship (Figure 5 A). In addition, the continuous increase in publications over these years on the use of NSAIDs related to the treatment of COVID-19 symptoms has become important, given the mutations and adaptations of the viruses and their variants (MARKOV et al., 2023), as well as the need for effective strategies for symptoms and prevent complications.

This research also plays a key role in adapting clinical protocols, discovering innovative therapies, and advancing scientific knowledge to understand future pandemics. Among the highlighted words recorded in these papers collected and processed by the bibliometric method, IBU and PAR appear among the five most cited words in the papers, indicating their relevance in the context of COVID-19 (Figure 2 B). Therefore, without going into the merits of whether concomitant treatment with NSAIDs can be harmful or safe in COVID-19 patients, the production and consumption of NSAIDs, such as IBU, PAR and DCF, as well as involvement in clinical and pre-clinical trials, are still considered high and necessary, especially in developed countries such as the US, Spain, the UK, Italy, and other European countries (Austin et al., 2022). contributing to these substances (IBU, PAR and DIC) being detected in some cases

above the legislative limit. Therefore, it is also necessary to reflect on the methods, which in some cases overlap with the use of NSAIDs, in the study of the pharmacological and epidemiological profile of COVID-19.

Therefore, means of removal and methods of (bio)remediation such as those presented here by fungi or bacteria must be continued for the development of applied bioremediation alternatives, in synergy with the production and evaluation studies (*in vitro* or *in vivo*) of these drugs. Aiming at limiting the impacts possibly generated by the release of the drugs into the environment.

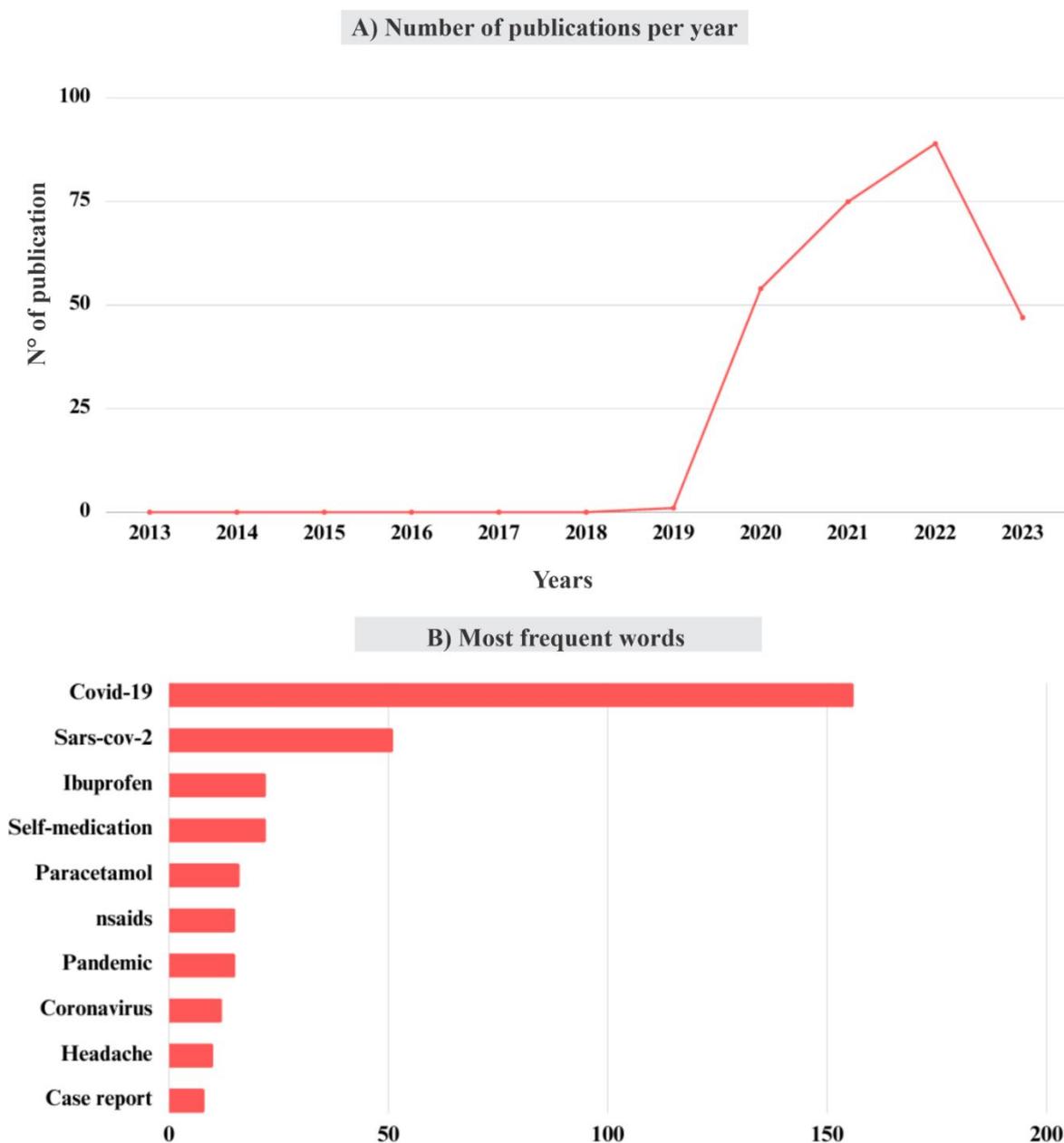


Figure 2. (A) Number of publications by year (2013 - 2023), and most frequent words related to COVID-19 with NSAIDs.

As showed in Figure 2A and 2B, Covid-19 has dominated the global scientific focus since the beginning of 2020, and as such, researchers are apprehensive to add their contributions to what is known and what can be done to combat Covid-19, in addition, studies involving NSAIDs are accelerated to support some approaches. Furthermore, the exhibited ability of the virus to mutate rapidly and access to public or private funding for Covid-19 research is still attractive (Brandt, et al., 2022), consequently, the use of related substances, such as NSAIDs, added to the usual worldwide consumption of these substance will keep the consumption high for several years. Therefore, efficient methods for bioremediation process for DCF, IBU, and PAR will be important for understanding the impact of these drugs on the environment and environmentally exposed population.

5 Biodegradation of Diclofenac

DCF, (2-(2-(2,6-dichlorophenylamino)phenyl)acetic acid, is a common non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) used as oral tablets or topical gel with an estimated global consumption of up to 940 t per year (Zhang et al., 2008), its physicochemical properties are presented in Table 1. After oral administration, 65 and 70% of DCF is excreted in urine and 20–30% in feces as parent drug or metabolites, thus this pharmaceutical undergoes almost complete biotransformation in the human body (Vieno and Sillanpää, 2014; Davis et al., 2020).

For example, bacterial strains isolated from a municipal wastewater treatment plant (WWTP) located in Northern Portugal (Ponte de Moreira, Portugal) were used for DCF biodegradation. *Brevibacterium* sp. D4 biodegraded 35% of 10 mg L⁻¹ DCF as the sole carbon source, however the yield raised to 90% when periodic acetate addition as supplementary carbon source was employed, (Table 2, entry 1) (Bessa et al., 2017a).

In another study, biodegradation of >99% DCF was reported by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11 (Table 2, entry 2) isolated from sediment of a polluted site in Portugal. Complete degradation was reached by co-metabolism with acetate after 6 days for 1.7 µM DCF, and 25 days for 34 µM DCF at 25 °C, both at 130 rpm (Moreira et al., 2018). Furthermore, 12 metabolites were identified using UPLC-QTOF analyses. Including mono- and di-hydroxylated compounds resulting from hydroxylation at a chlorine-substituted site, decarboxylation, methylation of a hydroxyl group, and formation of benzoquinone imine species (Figure 3).

In addition, mono-hydroxylated DCF products were reported at biodegradation by *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus laterosporus* strains provided by the Prodibio Company (Marseille,

France). Complete removal was observed in biodegradation with 1 mg mL⁻¹ DCF after 17 h of an experiment at 20°C, pH 7, and 100 rpm (Table 2, entry 3) (Grandclément et al., 2020).

Recently, Ivshina et al. (2019a) reported the ability of 104 *Rhodococcal* strains isolated from municipal wastewater and deposited at the Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms (IEGM, WDCM 768, <http://www.iegmcollection.ru>) to biodegrade DCF. The selected strain *Rhodococcus ruber* IEGM 346 (Table 2, entry 4) completely biodegraded 50 mg mL DCF after 6 days at 28 °C in pH 7 with glucose (0.5%). Analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) confirmed the C-N bond cleavage and aromatic ring opening of DCF structure, generating benzoquinone imine and mono- and di-hydroxylated derivatives, which were the main biodegradation metabolites (Ivshina et al., 2019a).

Some of these metabolites were also identified in the DCF biodegradation by *Klebsiella* sp. KSC isolated from livestock soil (Gen Bank, accession number KX500307). The best biodegradation results, 90%, were obtained at 70 mg L⁻¹ DCF after 72h at 30 °C, pH 7, and 100 rpm (Table 2, entry 5). Furthermore, acute ecotoxicity assays with *Vibrio fischeri* were performed for the obtained biotransformation products, which were less toxic than the parent compound (Stylianou et al., 2018). In another study, up to 1.0 g L⁻¹ DCF was fully biodegraded by a native microbial soil consortium obtained from 11 forest soil samples within 10 days at 25 °C by 120 rpm (Table 2, entry 6) (Facey et al., 2018).

Different bacterial strains previously isolated from a pharmaceutical manufacturing unit were also employed for DCF biodegradation. The consortium of bacteria composed of *Alcaligenes faecalis* [MG995024], *Staphylococcus aureus* [MG576208], *Staphylococcus haemolyticus* [MG995021], and *Proteus mirabilis* [MH021605] at pH 7 and temperature range of 25 °C-30 °C removed 45% DCF (Table 2, entry 7). Subsequently, at pH between 6-8 and 25 °C-35 °C, the consortium showed an efficiency increase for 55%. These results showed that consortia can be an interesting approach for the biodegradation of these micropollutants (Murshid and Dhakshinamoorthy, 2019).

Fungi species were also employed in the biodegradation process of DCF. *Ganoderma applanatum* and *Laetiporus sulphureus* deposited in the Microbial Collection of the Department of Pure and Applied Botany located at the Federal University of Agriculture Abeokuta (Nigeria) were explored. The removal of DCF reached 96% of 15 mg L⁻¹ by the co-culture of both strains after 72 h at pH 4.5 and 30° (150 rpm). It is important to note that the same strains, *G. applanatum* and *Laetiporus sulphureus*, exhibited reduced efficiencies of 61% (Table 2, entry

8) and 73% (Table 1, entry 9), respectively, when employed individually. Showing that the co-culture of fungi for biodegradation promoted synergistic effects (Bankole et al., 2020).

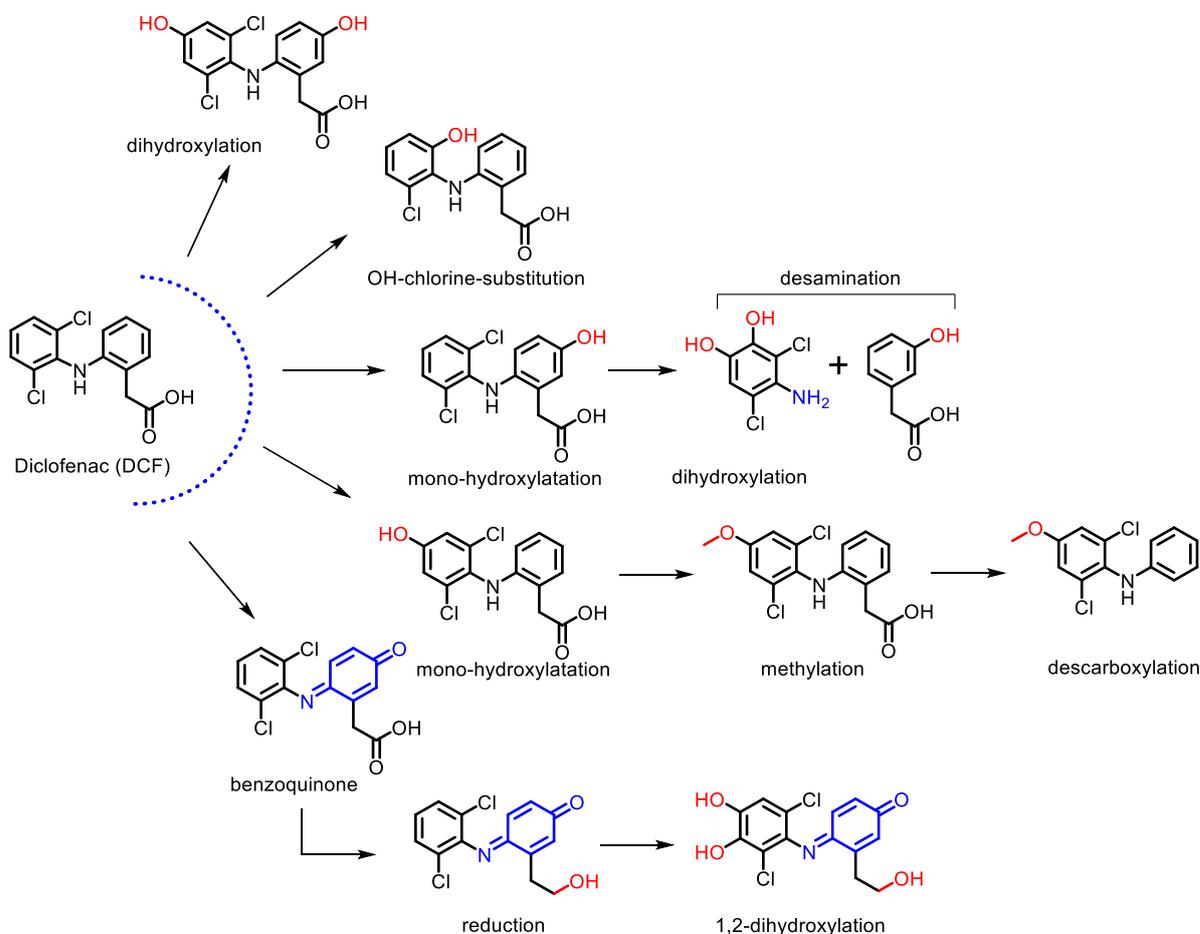


Figure 3. Schematic representation of DCF degradation by fungi or bacteria described in the literature (Bessa et al., 2017b; Ivshina et al., 2019b; Wojcieszynska et al., 2023).

Fungal species isolated from sewage treatment plants at Granada (Spain) were also tested for DCF biodegradation. The consumption after 72h at 28°C was assessed for 6 isolated strains (Table 2, entry 10-15). *Talaromyces gossypii* showed the maximum DCF removal of 85% (Table 1, entry 10), whereas *Syncephalastrum monosporum* presented 82% (Table 2, entry 11) and 76% removal was observed for *A. tabacinus* (Table 2, entry 12). In addition, *Aspergillus terreus*, *Talaromyces verruculosus*, and *Aspergillus cejpai* promoted lower biodegradation percentages of 50%, 37%, and 15% of DCF (Table 2, entries 13, 14, 15), respectively (Conejo-Saucedo et al., 2021).

The fungus *Penicillium oxalicum* previously isolated from a lake polluted by hydrocarbons in Motril (Spain) was also used for DCF biodegradation. Removal of 99% was observed after

24 hours at 28 °C, showing the interesting efficiency of this strain (Table 2, entry 16) (Olicón-Hernández et al., 2019).

So, the literature shows that several microorganisms (fungi and bacterium) have been reported to biodegrade diclofenac with high rates of biodegradation through different metabolic pathways, including hydroxylation, dihydroxylation, decarboxylation, deschlorination, C-N bond cleavage, and aromatic ring opening. However, advances in the ecotoxicological study of metabolites of DCF are needed.

6 Biodegradation of Ibuprofen

Although different biocatalysts have been presented for IBU biodegradation, the search for new strains with unique properties continues by the use of different perspectives aiming at new information and insights for applied bioremediation.

IBU, (2*rs*)-2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid), is a NSAID used in the form of a tablet, capsule, oral suspension, granule, suppository, cream or gel, drop, and injection. Its physicochemical properties are described in Table 1. Approximately 80% of the IBU dose is absorbed in the gastrointestinal tract when administered orally. Then, its biotransformation occurs in the liver generating glucuronide metabolites that are excreted in the urine, in which less than 1% of the dose is excreted in untransformed form (Davies, 1998).

Microbial degradation of IBU has received attention from the worldwide scientific community due to its extensive consumption (Rastogi et al., 2021). The development of IBU was a result from the search for safe drugs in the middle of the 21st century, entering the English market in 1967 and in America in 1974, thus this was the first propionic acid to be used in the United States with non-steroidal anti-inflammatory therapeutic properties. In a comparison with other treatment options, IBU has weak anti-inflammatory activity, but the adverse effects are low, resulting in frequent use for pain and fever relief (Kantor, 1984; Ren et al., 2021).

Recent studies using fungal strains in the biodegradation process of IBU are poorly reported, but some studies were described. In this regard, IBU-mineralizing bacteria were also isolated from sediments of the Elbe River taken downstream of the Hamburg harbor (Germany). The obtained strains were characterized and tested for IBU remediation in different media. *Sphingopyxis granuli* (RW412) biodegraded 80% of 0.08 mg g⁻¹ IBU in 3 days at 30°C and 200 rpm (Table 2, entry 17). These results indicated that RW412 bioaugmentation in a biopurification system can improve the dissipation rates of IBU (Aguilar-Romero et al., 2021).

Wastewater was explored for strains isolation in different studies. Such as in the biodegradation of IBU by *Patulibacter* sp. L11 was isolated from Activated sludge collected

from Beirolas WWTPs (Lisbon, Portugal), and was performed at different concentrations (1000, 250, and 50 $\mu\text{g L}^{-1}$). Experiments at 28°C and 110 rpm resulted in 62% biodegradation of 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ initial concentration using M9 medium with yeast extract and tryptone (Table 2, entry 18). Moreover, 92% biodegradation was observed using OD2-medium (Almeida et al., 2013c).

Other strains obtained from activated sludge of Beirolas WWTPs were also explored for IBU biodegradation. The biodegradation reactions were performed at 27°C and 110 rpm for 100 h with an initial IBU concentration of 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. The species with the highest percentage of biodegradation was *Patulibacter americanus* NR_042369 with 35%, followed by *Gordonia amicalis* EU266486.1 at 26%, *Paracoccus aminophilus* NR_042715.1 with 16%, and *Acinetobacter bouveti* (JF681285) at 13% biodegradation (Table 2, entry 19-20) (Almeida et al., 2013b).

Also, from the WWTP located in Beirola, *Patulibacter medicamentivorans* I11^T was explored at IBU biodegradation (7 days, 28 °C, pH 7.0, 110 rpm) with focus on metabolite identification in mineral medium supplemented with tryptone and yeast extract (Table 2, entry 21) (Almeida et al., 2013a). GC-MS and LC-MS/MS analyses revealed 22 byproducts and biodegradation pathways were proposed based on hydroxylation reactions followed by the production of carboxylic acids and ring cleavage. Toxicity to different species and biodegradability prediction were performed using EPI Suite software, and it was concluded that compounds with increased hydrophilic character and reduced toxic effects were obtained (Almeida et al., 2013a; Salgado et al., 2020).

The biodegradation of IBU in wastewater has been described in the literature, and an active microbial culture was collected from treatment plants in India for isolation of bacterial IBU-degraders by enrichment culture technique. The identified strain *Bacillus siamensis* DSI-1 was assessed in an effluent sample supplemented with IBU. After 18 h, 50% biodegradation was determined and total removal was achieved in 15 days. The kinetic analysis was performed in batch experiments and optimum conditions were 30°C, pH 7, 165 rpm, and 3.5 mg L^{-1} of IBU initial concentration, reaching 86% of biodegradation and showing that optimization strategies should be employed for the obtention of high process yield (Table 2, entry 22) (Chopra and Kumar, 2022).

Microbacterium paraoxydans Genbank OL614700 and OL614701 (Table 2, entry 23) from an industrial wastewater facility at Durgapur, also in India, were screened in mineral salt medium and employed for biodegradation of IBU. An interesting process optimization by

central composite design was performed and a maximum biodegradation of 92% was obtained at pH 7, inoculum of 0.1 OD₆₀₀, 150 rpm, 30 °C, and 0.3% yeast extract. It is important to note that the most significant factor for biodegradation were yeast extract content, showing the importance of co-metabolism for enhanced efficiency (Show et al., 2023).

In an omics approach, the use of metagenomic, metatranscriptomic, and metabolic analyses indicated that *Nocardioides carbamazepini* sp. nov. CBZ_1T was a new strain with an interesting ability to biodegrade pharmaceuticals, emphasizing carbamazepine and IBU. This biocatalyst presented 70% biodegradation of 1.5 mg.L⁻¹ IBU after 7 days in a medium supplemented with glucose (Table 2, entry 24). Therefore, a new strategy was employed with metagenome binning that resulted in a specific biocatalyst of interest, showing a new perspective for biodegradation studies (Benedek et al., 2022).

The enzymatic and genetic aspect of IBU biodegradation was also approached in the biodegradation of IBU by *Sphingomonas* sp. Ibu-2, which was isolated from a sewage treatment plant at Ithaca, USA (Table 2, entry 25). This strain received attention due to its ability to break IBU acid chain to the corresponding catechol. Seven genes (ipfABDEFHI) were identified in the fosmid pFOS3G7 obtained from the chromosomal library of *Sphingomonas* sp. Ibu-2, which encoded the IBU and phenylacetate deacylation activity subsequently expressed in *E. coli*. These results expanded the knowledge about the genetic and enzymatic aspects of IBU biodegradation, enabling further process efficiency increase (Murdoch and Hay, 2013).

Recently in another study, *Sphingomonas wittichii* MPO218 biodegraded IBU as the sole carbon source. Further exploration showed that this strain genome consisted of a circular chromosome and two circular plasmids. The plasmid pIBU218 presented a region with 100% identity with an IBU catabolic gene cluster previously described (Table 2, entry 26). Moreover, this plasmid was conjugative, enabling the horizontal transfer of the IBU consumption ability to *Sphingopyxis granuli* TFA, showing that gene transfer plays an important role in bacterial communities at biodegradation (Aulestia et al., 2021).

Industrial environments were also explored for the obtention of the interesting biocatalysts. For instance, the Gram-positive *Bacillus thuringiensis* B1 isolated from the soil of a chemical factory in Jaworzno (Poland). This strain biodegraded 20 mg L⁻¹ of IBU in 6 days at 30°C using glucose as carbon source (Table 2, entry 27), showing its potential for biodegradation (Marchlewicz et al., 2016).

Recently, marine aphotic environment was explored for IBU biodegradation in the search for new biocatalysts, including *Pseudoalteromonas* sp. GCY isolated from sediment.

Experiments with 1 mg.L⁻¹ IBU at 20 °C and 150 rpm for 72 hours reached about 94% efficiency and five biodegradation products were suggested (Table 2, entry 28). Furthermore, an extensive approach showed that both abiotic and biotic degradation mechanisms occurred by the conversion of IBU by extracellular Reactive Oxygen Species to 4-ethylresorcinol, which was later converted by different intracellular enzymes. These results showed the importance of unifying different experimental data to reach an expanded overview of a biodegradation process (Li et al., 2022).

Extensive screenings of specific groups of strains were employed by some groups for xenobiotics biodegradation. In this regard, 100 actinobacteria strains were assessed, and *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 was selected by the total consumption of 100 mg.L⁻¹ IBU after 144 h. IBU promoted the transition from the single to the multicellular form of *R. cerastii* IEGM 1278, which was accompanied by pronounced morphological changes in cell shape, size, and surface roughness. Moreover, the 6 obtained byproducts resulted from hydroxylation and decarboxylation reactions, presenting higher phytotoxicity than IBU. Thus, indicating a relevant environmental issue during this biodegradation process. The most promising biodegraders in medium supplemented after 7 days with 100 mg L⁻¹ IBU and 0.1% glycerol were *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278, *R. cercidiphylli* IEGM 1184, and *R. erythropolis* IEGM 501 with 14, 22, and 19% biodegradation, respectively (Table 2, entry 29-31) (Ivshina et al., 2021).

In an applied bioremediation approach, the effects of colonization of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Rhizophagus irregularis* BEG140 on the growth and treatment of wetland plants (*Glyceria maxima*) under pressure by the presence of IBU were investigated in constructed wetlands. Two treatments were adopted, sterilized inoculum and fungal inoculum, in which the removal efficiencies of 0.5 mg L⁻¹ IBU were 74-87% and 88-93% (Table 2, entry 32), respectively, in 52 days of reaction. Therefore, bioaugmentation promoted a slight increase in IBU biodegradation rates (Hu et al., 2021).

Some studies reported the isolation and identification of IBU-biodegrading strains of bacteria, also approaching biodegradation pathways. However, few research groups have been performing integrative omics approaches, including genomic and metabolomics assessments aiming at deeper knowledge about the biodegradation of IBU, which is an extensively employed pharmaceutical and micropollutant. Furthermore, the potential of fungi for biodegradation of this compound is unknown, since adequate number of studies are required for the obtention of wide conclusions.

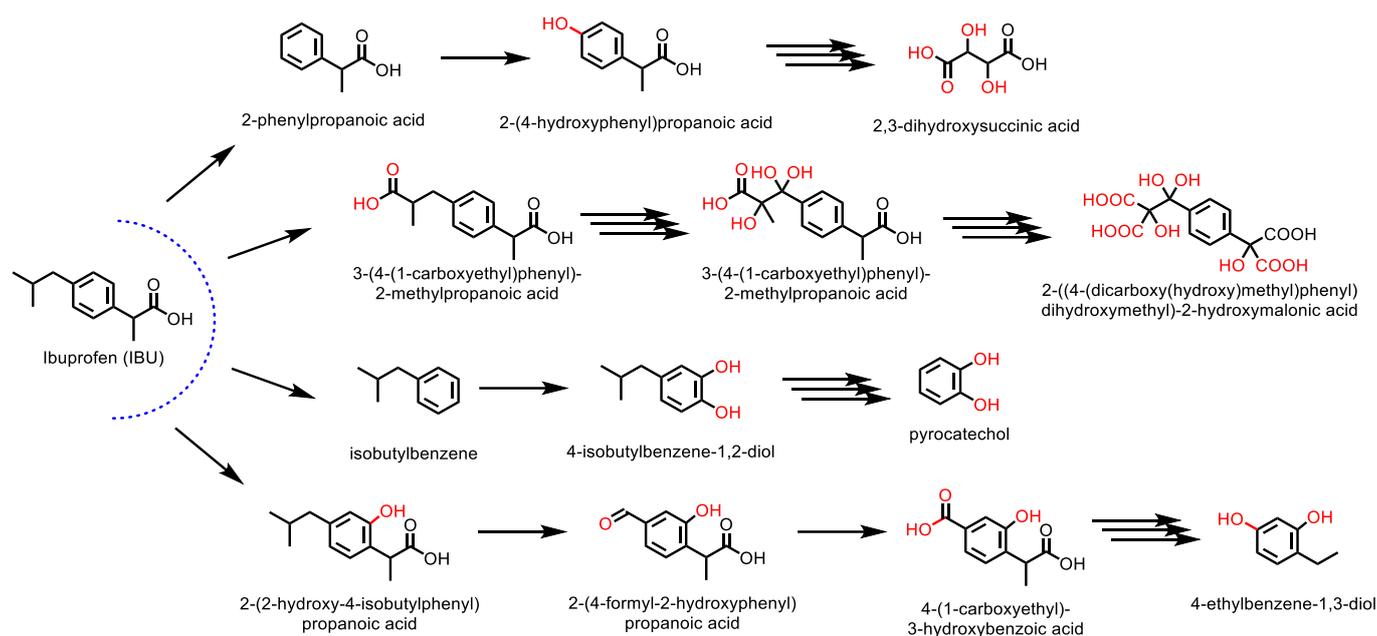


Figure 4. Some metabolites of IBU degradation from fungi or bacteria are described in the literature (Salgado et al., 2020; Li et al., 2022).

7 Biodegradation of Paracetamol

PAR or acetaminophen (*N*-acetyl-*para*-aminophenol, PAR) is an analgesic and antipyretic drug available in the form of tablet and oral suspension, its physicochemical properties are presented in Table 1. This pharmaceutical is administered orally and 90% of the dose is metabolized in the liver with emphasis on the production of 5-15% of the hydroxylated product *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine by cytochrome P-450, and the elimination of 5% through the kidneys in unchanged form (Wojcieszynska et al., 2022).

Due to its large-scale use, this drug can be found in different environments, especially in water bodies. Regarding this, it is noteworthy that PAR is bioaccumulative in aquatic organisms and may induce reproductive and neurotoxic disorders (Vargas-Ordóñez et al., 2023). Therefore, this compound was considered an emerging pollutant and environmentally safe strategies for its removal must be studied.

Microorganisms, mainly bacteria, have been reported as efficient biocatalysts for PAR biodegradation in different environmental matrices, in which the most frequently detected products are 4-aminophenol, hydroquinone, 2-hexenoic acid, succinic acid, malonic acid, oxalic acid, formic acid, nitrate, and nitrite. However, the first step in PAR biodegradation is the cleavage of the amide bond by an amidase to produce 4-aminophenol and acetate (Figure 5) (Hu et al., 2013a, 2013b).

The screening of bacterial strains has been an important tool for PAR biodegradation. For instance, 17 bacterial strains were isolated from the sewage of a Wastewater Treatment Plant (WWTP) in Seville (Spain), but only two of them (*Pseudomonas stutzeri* CSW02 and *Pseudomonas extremoustralis* CSW01) biodegraded high concentrations of PAR as sole carbon and energy source. The process reached 100% degradation at 500 mg L⁻¹ PAR, 150 rpm, and 30 °C for 6 h, showing the high efficiency of these strains (Table 2, entry 33 and 34, respectively) (Vargas-Ordóñez et al., 2023).

In another study, several bacterial strains were isolated from wastewater at a pharmaceutical company in Gujarat (India). Tests with the *Pseudomonas* sp. PrS10 showed, recently, the highest biodegradation efficiency with the removal of 96% of 3 g L⁻¹ PAR at 30 °C and 140 rpm for 7 days of reaction (Table 2, entry 35). Furthermore, experiments showed that both cell surface absorption and internalization of PAR were relevant processes (Poddar et al., 2022).

Wastewater treatment plants were the most explored source of biodegrade agents for PAR biodegradation. Thus, six new bacterial strains isolated from activated sludge from the Klimzowiec wastewater treatment plant (Chorzów, Poland) removed PAR. *Pseudomonas moorei* KB4 was the most efficient strain in the initial concentration of 50 mg L⁻¹ PAR at 30 °C and pH 7.0 for 1.5 hours (Table 2, entry 36). In addition, the biodegradation products *p*-aminophenol and hydroquinone were identified (Żur et al., 2018a), then, the hydroquinone aromatic ring might have been cleaved to 4-hydroxymuconic semialdehyde (Figure 4). Furthermore, this study showed that the concentrations of aromatic metabolites (phenol, 4-hydroxybenzoate, 4-chlorophenol and 2-chlorophenol) were observed for a longer period than PAR, whereas aminophenol fast disappearing was determined. Indicating that these substrates may compete with the same enzymes, a phenomenon frequently observed during the degradation of aromatic compounds (Guzik et al., 2014).

Bacterial communities isolated from sludge of two Portuguese WWTPs were explored for PAR biodegradation under different media and oxygen conditions. Aerobic bacteria completely removed PAR in wastewater at a concentration of 50 mg L⁻¹ after 2 days of incubation with aeration, and the metabolites 4-aminophenol and hydroquinone were identified as PAR degradation products. These results revealed that *Pseudomonas*, initially in 0.1%, reached the final relative abundance of 21.2% during the biodegradation process, confirming previous works reporting strains of this genus as paracetamol decomposers. Besides, the genera *Flavobacterium*, *Dokdonella*, and *Methylophilus* also deserve to be highlighted, since the initial relative abundances of 1.7%, 1.5 and 0.0% (not detected) in the inoculum reached 6.9%, 3.8%

and 3.8% after incubation, respectively. Indicating the putative role of these genera in paracetamol biodegradation (Table 2, entry 37) (Palma et al., 2018).

Still approaching the pseudomonas genus, in another study three bacterial strains, *Pseudomonas* sp. f2, *Pseudomonas* sp. fg-2, and *Stenotrophomonas* sp. f1 were isolated from a PAR degrading aerobic aggregate using this drug as a unique source of energy. Complete biodegradation was observed for initial concentrations of 2.000 mg L⁻¹ PAR after 70 hours, 2.500 mg L⁻¹ after 45 hours, and 2.000 mg L⁻¹ after 16 hours at 30 °C, showing the high efficiency and potential of these strains (Table 2, entry 38-40). Furthermore, the metabolites 4-aminophenol and hydroquinone were detected (Zhang et al., 2013).

The species *Pseudomonas aeruginosa* HJ1012 isolated from a stable microbial aggregate in a sequential batch reactor was also employed for PAR removal. Complete biodegradation of this active ingredient was obtained after 18 hours at pH 7.0 and 30 °C with an initial concentration of 2.200 mg L⁻¹ PAR (Table 2, entry 41). The consumption of PAR by *Pseudomonas aeruginosa* HJ1012 generated 71.4% of CO₂, showing that PAR consumption occurred via mineralization (Hu et al., 2013b).

Recently bacterial strains obtained from an oxidation ditch of a WWTP in Faro Norwest (Portugal) consumed PAR as carbon source. Strains were selected and *Bacillus cereus*, *Corynebacterium nuruki* and *Enterococcus faecium* removed 97±4%, 97±6%, and 87% PAR respectively at an initial concentration of 200 mg L⁻¹ after 48 hours at 28 °C (Table 2, entry 42). Furthermore, the metabolites 4-aminophenol, hydroquinone and 2-hexenoic acid were identified in the process, bringing new insights into the environmental fate of this drug. (Palma et al., 2021).

In another study, *Bacillus drentensis* S1 obtained from sewage of a wastewater drainage in Sonipat (India) was employed in an experimental design in a 20 L batch reactor resulting in an increase from 28 to 93% of PAR removal in the optimized experimental conditions of pH 7.0, 40 °C, 165 rpm and PAR initial concentration of 300 mg L⁻¹, showing that different factors can affect this biodegradation process (Table 2, entry 43) (Chopra and Kumar, 2020).

Pharmaceutical industrial wastewater was also explored for PAR biodegradation. *Micrococcus yunnanensis* KGPO4 was isolated for PAR biodegradation processes from sludge collected at the Vishwakarma industrial area (India). Removal of 43% was achieved in the initial screening and, after applying a Taguchi L8 experimental design for optimization, a biodegradation of 83% was obtained in optimized conditions (dextrose- 0.15%, peptone 0.1%, inoculum size 4% (wv⁻¹), rpm 200, pH 8 at 25°C) after 6 hours (Table 2, entry 44). Moreover,

the biodegradation products were explored using nuclear magnetic resonance and Q-Tof-MS aiming at expanding the knowledge about the fate of this drug in the environment (Sharma et al., 2020).

Another strain from the same species was employed in another PAR biodegradation study. *Micrococcus yunnanensis* strain TJPT4 was isolated from consortia of marine organisms collected at Cathedral and Queijo Suijo marine caves (Sagres, Portugal). This strain showed high PAR biodegradation capacity with 93% removal of 15 mg L⁻¹ PAR after 360 h (Table 2, entry 45), also consuming the obtained metabolites. Therefore, promoting a cleaner residual medium (Palma et al., 2022).

A diverse microbial community obtained from a hospital WWTP enriched under low PAR concentrations in a membrane bioreactor was also approached, and two bacterial strains were isolated. A fast-growing *Pseudomonas* sp. that biodegraded 200 mg L⁻¹ PAR in approximately 10 h producing 4-aminophenol, and a slow-growing *Pseudomonas* sp. that degraded PAR without obvious intermediates in more than 90 days were obtained. In addition, the metabolites 4-aminophenol, hydroquinone, hydroxyquinol, 4-hydroxymuconic semialdehyde, 2,5-dihydroxy-6-oxo-2,4-hexadienoic acid and 3-hydroxy-2,4-hexadienedioic acid were identified as biodegradation products of the PAR, expanding the available information about the biodegradation pathways of these compounds (Figure 5) (Rios-Miguel et al., 2022a).

Fungi strains were also employed for PAR biodegradation. *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporium* isolated from wastewater of a pharmaceutical industry located in Sana'a (Yemen) were assessed. The optimized conditions were 25 °C and pH 6.0 for both species with 37% biodegradation for *A. niger* with an initial concentration of 2000 mg L⁻¹ and 26% for *F. oxysporium* with an initial concentration of 1000 mg L⁻¹ during 60 days of reaction, indicating that fungi strains can also be employed as biodegradation agents at PAR biodegradation processes (Table 2, entry 46 and 47) (Sana, 2018).

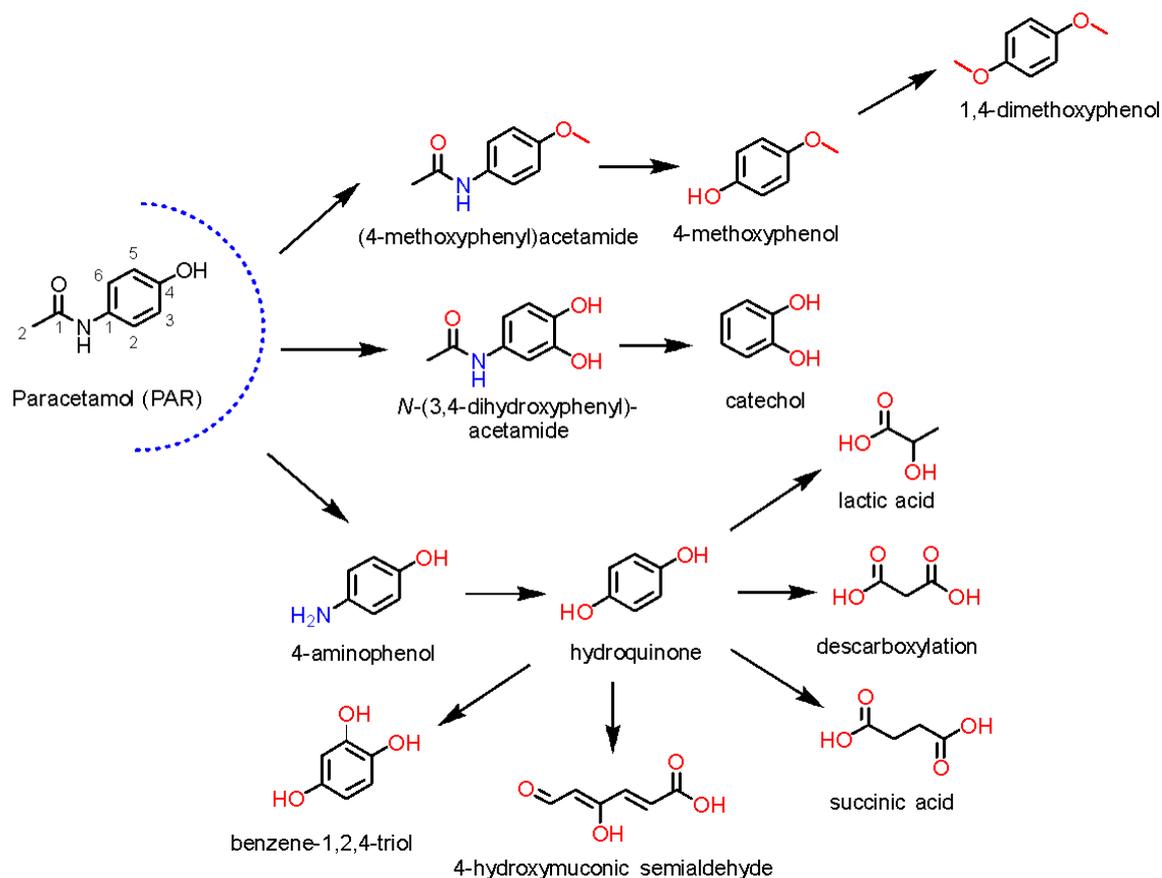


Figure 5. Some PAR metabolites from fungi or bacteria are described in the literature (Žur et al., 2018b; Rios-Miguel et al., 2022b).

Therefore, PAR can be degraded by different microorganisms, although bacteria were better explored than fungi for this purpose. Furthermore, the biodegradation of the obtained aromatic products includes hydroxylation reactions and cleavage of the aromatic ring, in general catalyzed by the dioxygenases and monooxygenases. The main intermediates such as catechol, hydroquinone, 4-methoxyphenol, succinic and lactic acid are formed as a result of these enzymatic hydroxylations.

Many research groups focused their studies on optimizing the biodegradation process by parameters such as pH, temperature, oxygen availability, and nutrient supply. Thus, omics approaches are necessary for a better comprehension of the genetic and metabolic aspects involved in these reactions, since a comprehensive approach to the different aspects are necessary for the obtention of a process overview.

Table 2. Summary of DCF, IBU, and PAR biodegradation.

Ent.	Microorganism	Isolation place	Drug	Biodegradation rate (conditions)	Ref
1.	<i>Brevibacterium sp. D4</i>	From wastewater treatment plant (Ponte de Moreira, Maia – Portugal)	DCF	90% (10 mg L ⁻¹ , at 25 °C, 150 rpm by 30 days)	(Bessa et al., 2017)
2.	<i>Labrys portucalensis</i> F11	From sediment of a polluted site in the northern Portugal	DCF	>99% (7,01 mg L ⁻¹ at 25 °C, 130 rpm by 25 days).	(Moreira et al., 2018)
3.	<i>Bacillus subtilis</i>	Provided by the ProdiBio Company - Marseille, France	DCF	>99% (1000 mg L ⁻¹ , at 20 °C, 100 rpm by 17h).	(Grandclément et al., 2020).
4.	<i>Rhodococcus ruber</i> IEGM 346	From Regional Specialised Collection of Alkanotrophic Microorganisms	DCF	>99% (1000 mg L ⁻¹ , at 28 °C, 100 rpm by 6 days and 0.5% glucose).	(Ivshina et al., 2019).
5.	<i>Klebsiella sp.</i> KSC	From livestock soil	DCF	90% (70000 mg L ⁻¹ , at 30 °C, pH 7, 100 rpm by 72h).	(Stylianou et al., 2018)
6.	<i>Microbial consortia</i>	Native microbial soil	DCF	90% (1000 mg L ⁻¹ , at 25 °C, 120 rpm by 10 days).	(Facey et al., 2018)
7.	<i>Ganoderma applanatum</i>	Collection in the Department of Pure and Applied Botany - Nigeria.	DCF	61% (15 mg L ⁻¹ , at 30 °C, pH 4,5 and 150 rpm by 72h)	(Bankole et al., 2020)
8.	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Collection in the Department of Pure and Applied Botany, Federal University of Agriculture Abeokuta - Nigeria.	DCF	73% (15 mg L ⁻¹ , at 30 °C, pH 4,5 and 150 rpm by 72h)	(Bankole et al., 2020)
9.	<i>Talaromyces gossypii</i>	Sewage sludge composite samples were collected from the WWTPs - Granada - Spain	DCF	84,6% (20,62 mg L ⁻¹ at 28 °C by 72h)	(Conejo-Saucedo et al., 2021)

10.	<i>Syncephalastrum monosporum</i>	Sewage sludge composite samples were collected from the WWTPs - Granada – Spain	DCF	82% (20,62 mg L ⁻¹ at 28 °C by 72h)	(Conejo-Saucedo et al., 2021)
11.	<i>Aspergillus tabacinus</i>	Sewage sludge composite samples were collected from the WWTPs - Granada - Spain	DCF	76% (20,62 mg L ⁻¹ at 28 °C by 72h)	(Conejo-Saucedo et al., 2021)
12.	<i>Talaromyces verruculosus</i>	Sewage sludge composite samples were collected from the WWTPs - Granada - Spain	DCF	37% (20,62 mg L ⁻¹ at 28 °C by 72h)	(Conejo-Saucedo et al., 2021)
13.	<i>Aspergillus terreus</i>	Sewage sludge composite samples were collected from the WWTPs - Granada - Spain	DCF	49,7% (20,62 mg L ⁻¹ at 28 °C by 72h)	(Conejo-Saucedo et al., 2021)
14.	<i>Aspergillus cejpaii</i>	Sewage sludge composite samples were collected from the WWTPs - Granada - Spain	DCF	14.6% (20,62 mg L ⁻¹ at 28 °C by 72h)	(Conejo-Saucedo et al., 2021)
15.	Microbial consortium (<i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Proteus mirabilis</i>)	Isolated from the vicinity of a pharmaceutical manufacturing unit - India	DCF	45% (150 mg.L ⁻¹ , at 25-30 °C, pH 7 by 120 h)	(Murshid & Dhakshinamoorthy, 2019)
16.	<i>Penicillium oxalicum</i>	Isolated from a hydrocarbonpolluted pond in Motril -Granada	DCF sodium	99% (20,62 mg L ⁻¹ , 24 h, 28 °C)	(Murshid & Dhakshinamoorthy, 2019)
17.	<i>Rhizophagus irregularis</i>	Institute of Botany, Czech Academy of Science - Czechia	IBU	80% (0.5 mg L ⁻¹ , 5- 30 °C, by 150 days,)	(B. Hu et al., 2021)

18.	<i>Sphingopyxis granuli</i> RW412	River Elbe taken downstream of the Hamburg harbor - Germany	IBU	80% (800 mg L ⁻¹ , 30 °C, 200 rpm, 3 days)	(Aguilar-Romero et al., 2021)
19.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Soil of the Chemical factory "Organika-Azot" in Jaworzno, Poland	IBU	46.56% (25 mg L ⁻¹ , at 30 °C, 130 rpm by 20 days)	(Marchlewicz et al., 2017)
20.	<i>Patulibacter sp.</i> Strain L11	Activated sludge collected from Beirolas WWTP - Lisbon, Portugal)	IBU	92% (0,05 mg L ⁻¹ , at 28 °C, 110 rpm by 90h)	(Almeida, Kjeldal, et al., 2013)
21.	<i>Gordonia amicalis</i> EU266486.1	Activated sludge Beirolas WWTP (Lisbon, Portugal)	IBU	26% (0,1 mg L ⁻¹ , at 27°C, 110 rpm by 100 h)	(Almeida, Oehmen, et al., 2013)
22.	<i>Acinetobacter bouveti</i> JF681285	Activated sludge Beirolas WWTP (Lisbon, Portugal)	IBU	12.8% (0,1 mg L ⁻¹ , at 27°C, 110 rpm by 100 h)	(Almeida, Oehmen, et al., 2013)
23.	<i>Bacillus siamensis</i> DSI-1	Isolated from wastewater - GenBank MT 039503	IBU	50% (3.5 mg L ⁻¹ at 30 °C, pH 7, 165 rpm, by 18 h)	(Chopra & Kumar, 2022)
24.	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Isolated from pharmaceutical wastewater of East India Pharmaceutical Private Limited, Durgapur, West Bengal, India	IBU	92,01% (15 mg L ⁻¹ at 30 °C, pH 7, 150 rpm, 0.3% yeast extract)	(Show et al., 2023)
25.	<i>Patulibacter medicamentivorans</i>	Isolated from activated sludge collected from Beirolas WWTP (Lisbon, Portugal)	IBU	>99% (0,25 mg L ⁻¹ , at 28 °C, pH 7, 110 rpm by 7 days)	(Salgado et al., 2020)
26.	<i>Nocardioides carbamazepini sp. nov.</i> CBZ_1T	Biofilm sample collected from a Pump & Treat system treating BTEX (benzene,	IBU	70% (1.5 mg.L ⁻¹ , at 27 °C, 145 rpm by 7 days)	(Benedek et al., 2022)

				toluene, ethylbenzene, xylenes) contaminated groundwater.	
27.	<i>Sphingomonas wottichii</i> MPO218	Sewage sludge of Copero (EMASESA, dos Hermanas, Seville, Spain), Company Almirall (Barcelona Spain)	IBU	>75% (4.4 mM at 4.5 h, 30 °C and pH 7)	(Aulestia et al., 2021)
28.	<i>Sphingomonas</i> sp		IBU	>99% (500 mg L ⁻¹ , 80h, 37±2 °C)	(Murdoch & Hay, 2013)
29.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp	GenBank accession number: KY583737	IBU	80%, (1,0 mg L ⁻¹ , 20 ±1 °C, 150 rpm by 72 h)	(Li et al., 2022)
30.	<i>Rhodococcus cerastii</i> IEGM 1278	Regional specialised Collection of Alkano-trophic Microorganisms (acronym IEGM, the wprdl Federation for Culture)	IBU	14.1% (100 mg L ⁻¹ , at 28 °C, 160 rpm by 7 days)	(Ivshina et al., 2021)
31.	<i>R. cercidiphylli</i> IEGM 1184	Regional specialised Collection of Alkano-trophic Microorganisms (acronym IEGM, the wprdl Federation for Culture)	IBU	21.6% (100 mg L ⁻¹ , at 28 °C, 160 rpm by 7 days)	(Ivshina et al., 2021)
32.	<i>R. erythropolis</i> IEGM 501	Regional specialised Collection of Alkano-trophic Microorganisms (acronym IEGM, the wprdl Federation for Culture)	IBU	18.6% (100 mg L ⁻¹ , at 28°C, 160 rpm by 7 days)	(Ivshina et al., 2021)

33.	<i>Paracoccus aminophilus</i> NR_042715.1	Activated sludge Beirolas WWTP (Lisbon, Portugal)	IBU	16.2% (0,1 mg L ⁻¹ , at 27°C, 110 rpm by 100 h)	(Almeida, Oehmen, et al., 2013)
34.	<i>Patulibacter americanus</i> NR_042369	Activated sludge Beirolas WWTP (Lisbon, Portugal)	IBU	35% (0,1 mg L ⁻¹ , at 27°C, 110 rpm by 100 h)	(Almeida, Oehmen, et al., 2013)
35.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> CSW02	Sewage sludge was obtained from a Wastewater Treatment Plant (WWTP) in the city of Seville	PAR	100% (500 mg L ⁻¹ , at 30 ± 1 °C , 150 rpm by 4h	(Vargas-Ordóñez et al., 2023)
36.	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> CSW 01	Sewage sludge was obtained from a Wastewater Treatment Plant (WWTP) in the city of Seville	PAR	100% (500 mg L ⁻¹ , at 30 ± 1°C, 150 rpm, by 6h	(Vargas-Ordóñez et al., 2023)
37.	<i>Pseudomonas</i> sp. PrS10	Sample wastewater collected from Cadila Pharmaceutical Limited, Gujarat, India	PAR	96.37% (3000 mg L ⁻¹ , at 30 °C, 140 rpm by 7 days)	(Poddar et al., 2022)
38.	<i>Pseudomonas moorei</i> KB4	From the activated sludge from the wastewater treatment plant Klimzowiec (Chorzów, Poland)	PAR	99% (50 mg L ⁻¹ , at 30 °C, pH 7 by 1.5h)	(Żur et al., 2018)
39.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sludges from two Portuguese WWTPs	PAR	90% (50 mg L ⁻¹ , at r.t, by 2 days)	(T. L. Palma et al., 2018)
40.	<i>Pseudomonas</i> sp. f2	PAR-degrading aerobic aggregate	PAR	100% (2.000 mg L ⁻¹ , at 30 °C, 200 rpm by 70h)	(Zhang et al., 2013)

41.	<i>Pseudomonas</i> sp. fg-2	PAR-degrading aerobic aggregate	PAR	100% (2500 mg L ⁻¹ , 30 °C, 200 rpm by 45h)	(Zhang et al., 2013)
42.	<i>Stenotrophomonas</i> sp. f1	PAR-degrading aerobic aggregate	PAR	100% (2000 mg L ⁻¹ , at 30 °C, 200 rpm, by 16h)	(Zhang et al., 2013)
43.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain HJ1012	Isolated from stable microbial aggregate in a sequencing batch reactor	PAR	71.4% (2200 mg L ⁻¹ , at 30°C, pH 7 by 18h)	(J. Hu et al., 2013)
44.	<i>Aspergillus niger</i>	Wastewater samples were collected from the effluent generated by YEDCO factory situated in Sana'a City, Yemen.	PAR	37% (2000 mg L ⁻¹ , at 25°C, pH 6.0 by 60 days)	(Sana, 2018)
45.	<i>Fusarium oxysporium</i>	Wastewater samples were collected from the effluent generated by YEDCO factory situated in Sana'a City, Yemen.	PAR	26.1% (1000 mg L ⁻¹ , at 25°C, pH 6.0 by 60 days)	(Sana, 2018)
46.	Microbial consortium (<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Corynebacterium nuruki</i> ; <i>Enterococcus faecium</i>)	A sample of aerobic activated sludge was collected from the oxidation ditch of Faro Northwest WWTP's, Portugal.	PAR	> 90% (200 mg L ⁻¹ , at 28°C, by 48h)	(T. L. Palma et al., 2021)
47.	<i>Bacillus drentensis</i> stirpe S1	The sewage samples used in this study were collected from waste water drain in Sonipat, Haryana, India	PAR	93% (300 mg L ⁻¹ , at 40°C, pH 7, 165 rpm by 48 h)	(Chopra & Kumar, 2020)
48.	<i>M. yunnanensis</i> KGP04	Pharmaceutical industry wastewater and sludge samples	PAR	80% (1% w/v, at 25 °C, pH 8, 200 rpm, by 6h)	(Sharma et al., 2020)

		were collected from VKIA (Vishwakarma Industrial Area), Jaipur.			
49.	<i>M. yunnanensis</i> TJPT4	Bacteria recovered from marine organisms, which were collected from the Catedral and Queijo Suiço marine caves, located in Sagres, Algarve, Portugal	PAR	>60% (15 mg L ⁻¹ , at 28°C, 150 rpm, by 360 h)	(T. Palma et al., 2022)
50.	<i>Pseudomonas</i> spp	Sludge of a hospital WWTP (Pharmafilter, Delft, NL)	PAR	>99% [250 mgL ⁻¹ (reactor conditions 500 rpm, pH 7, airflow 30 mL/min, and 20 ± 1 °C) at 10 days]	(Rios-Miguel et al., 2022)

8 Conclusions and future directions

Microbial degradation processes are a great alternative for the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), especially by the use of selected strains isolated from contaminated environments. Moreover, extensive studies about biodegradation pathways are required for the determination of the fate of these compounds, including the knowledge about enzymes and genes involved in these processes.

An increase in the amount of non-steroidal anti-inflammatory drugs, especially DCF, IBU, and PAR, present in domestic and hospital sewers was expected from the consumption of the population in the treatment of COVID-19-driven infections, resulting in aggravated environmental impact. Moreover, the consequences of NSAIDs should not be considered individually for each active ingredient, since complex mixtures and combinations with other xenobiotics can greatly enhance their impacts on nature and human health.

The growth of microbial degradation studies applied to NSAID mostly conducted with bacteria is remarkable, but the ecotoxicological consequences of biodegradation products are still unknown. Therefore, some topics require extensive advances, such as systematic monitoring of NSAID and its biodegradation products at *in vivo* models. Furthermore, studies addressing the effect of biodegradation products with mixtures of these drugs and other active

ingredients related to the treatment of different diseases, including COVID-19, are essential. Studies on cost-performance and energetic efficiency of different degradation methods should also be addressed.

Therefore, the development of alternatives to minimize the increasing pollution promoted by the incorrect disposal, human excretion or production activity of NSAIDs and related compounds will be essential for maintaining a healthy ecosystem and life.

9 Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

10 Author Contributions

Beatriz L. Ferreira, Dionisia P. Ferreira, Swanny F. Borges, Adriana M. Ferreira, Fabricio H. Holanda, and João G. M. Ucella-Filho: Methodology, Validation, Investigation, Data curation, Writing - Original Draft. Willian G. Birolli, Rafael Luque and Irlon M. Ferreira: Conceptualization, Supervision, Writing - Review & Editing and Methodology.

11 Funding

The authors would like to acknowledge the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amapá* (FAPEAP); grant no. 88887.568501/2020-00, the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) grant no. 88881.716142/2022-01 for financial support. Beatriz L. Ferreira and Irlon M. Ferreira thanks for the scholarships financed *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) Grant no. 88887.637671/2021-00 (PDPG) and 88881.716142/2022-01 (PROCAD-AMAZONIA-DRI), respectively.

References

- Aguilar-Romero, I., De la Torre-Zúñiga, J., Quesada, J. M., Haïdour, A., O'Connell, G., McAmmond, B. M., et al. (2021). Effluent decontamination by the ibuprofen-mineralizing strain, *Sphingopyxis granuli* RW412: metabolic processes. *Environ. Pollut.* 274:116536. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2021.116536
- Ajibola, A. S., Adebisi, A. O., Nwaeke, D. O., Ajibola, F. O., and Adewuyi, G. O. (2021). Analysis, occurrence and ecological risk assessment of diclofenac and ibuprofen residues in wastewater from three wastewater treatment plants in South-Western Nigeria. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 25, 330–340. doi: 10.4314/jasem.v25i3.5
- Almeida, B., Kjeldal, H., Lolas, I., Knudsen, A. D., Carvalho, G., Nielsen, K. L., et al. (2013a). Quantitative proteomic analysis of ibuprofen-degrading *Patulibacter* sp. strain I11. *Biodegradation* 24, 615–630. doi: 10.1007/s10532-012-9610-5
- Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito, D., Carvalho, G., and Barreto Crespo, M. T. (2013b). Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (497s) by activated sludge and a pure culture. *Bioresour. Technol.* 133, 31–37. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2013.01.035
- Almeida, B., Vaz-Moreira, I., Schumann, P., Nunes, O. C., Carvalho, G., and Crespo, M. T. B. (2013c). *Patulibacter medicamentivorans* sp. nov., isolated from activated sludge of a

wastewater treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 2588–2593. doi: 10.1099/ijs.0.047522-0

Aracagök, Y. D., Göker, H., and Cihangir, N. (2018). Biodegradation of diclofenac with fungal strains. *Archiv. Environ. Protect.* 1, 55–62. doi: 10.24425/118181

Aria, M., and Cuccurullo, C. (2017). Bibliometrix: an R-tool for comprehensive science mapping analysis. *J. Inf. Secur.* 11, 959–975. doi: 10.1016/j.joi.2017.08.007

Aulestia, M., Flores, A., Mangas, E. L., Pérez-Pulido, A. J., Santero, E., and Camacho, E. M. (2021). Isolation and genomic characterization of the ibuprofen-degrading bacterium *Sphingomonas* strain MPO218. *Environ. Microbiol.* 23, 267–280. doi: 10.1111/1462-2920.15309

Austin, T. J., Comber, S., Forrester, E., Gardner, M., Price, O. R., Oldenkamp, R., et al. (2021). The importance of over-the-counter-sales and product format in the environmental exposure assessment of active pharmaceutical ingredients. *Sci. Total Environ.* 752:141624. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.141624

Austin, T., Bregoli, F., Höhne, D., Hendriks, A. J., and Ragas, A. M. J. (2022). Ibuprofen exposure in Europe; ePiE as an alternative to costly environmental monitoring. *Environ. Res.* 209:112777. doi: 10.1016/j.envres.2022.112777

Badri, W., Miladi, K., Nazari, Q. A., Greige-Gerges, H., Fessi, H., and Elaissari, A. (2016). Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: overview, progress, challenges and prospects. *Int. J. Pharm.* 515, 757–773. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.002

Banerjee, S., and Maric, F. (2023). Mitigating the environmental impact of NSAIDs—physiotherapy as a contribution to one health and the SDGs. *Eur. J. Phys.* 25, 51–55. doi: 10.1080/21679169.2021.1976272

Bankole, P. O., Adekunle, A. A., Jeon, B.-H., and Govindwar, S. P. (2020). Novel cobiomass degradation of NSAIDs by two wood rot fungi, *Ganoderma applanatum* and *Laetiporus sulphureus*: ligninolytic enzymes induction, isotherm and kinetic studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 203:110997. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110997

Barcelo, D. (2020). An environmental and health perspective for COVID-19 outbreak: meteorology and air quality influence, sewage epidemiology indicator, hospitals disinfection, drug therapies and recommendations. *J. Environ. Chem. Eng.* 8:104006. doi: 10.1016/j.jece.2020.104006

Benedek, T., Pápai, M., Gharieb, K., Bedics, A., Tánicsics, A., Tóth, E., et al. (2022). *Nocardioides carbamazepini* sp. nov., an ibuprofen degrader isolated from a biofilm bacterial community enriched on carbamazepine. *Syst. Appl. Microbiol.* 45:126339. doi: 10.1016/J.SYAPM.2022.126339

- Bessa, V. S., Moreira, I. S., Tiritan, M. E., and Castro, P. M. L. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 120, 135–142. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.02.008
- Borges, R. S., Lima, E. S., Keita, H., Ferreira, I. M., Fernandes, C. P., Cruz, R. A. S., et al. (2018). Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents. *Inflammopharmacology* 26, 183–195. doi: 10.1007/s10787-017-0374-8
- Brandt, M. D., Ghazy, S. A., Kallmes, D. F., McDonald, R. J., and Kadirvel, R. D. (2022). Comparison of citation rates between COVID-19 and non-COVID-19 articles across 24 major scientific journals. *PLoS One* 17, 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0271071
- Chen, M., Yu, L., Gu, C., Zhong, D., Wu, S., and Liu, S. (2013). Celecoxib antagonizes the cytotoxic effect of cisplatin in human gastric cancer cells by decreasing intracellular cisplatin accumulation. *Cancer Lett.* 329, 189–196. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.030
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., et al. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 395, 507–513. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7
- Cheng, S.-C., Chang, Y.-C., Fan Chiang, Y.-L., Chien, Y.-C., Cheng, M., Yang, C.-H., et al. (2020). First case of coronavirus disease 2019 (COVID-19) pneumonia in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc.* 119, 747–751. doi: 10.1016/j.jfma.2020.02.007
- Chopra, S., and Kumar, D. (2020). Characterization, optimization and kinetics study of acetaminophen degradation by *Bacillus drentensis* strain S1 and waste water degradation analysis. *Bioresour. Bioprocess* 7:9. doi: 10.1186/s40643-020-0297-x
- Chopra, S., and Kumar, D. (2022). Characterization and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus siamensis* strain DSI-1 isolated from wastewater. *Rendiconti Lincei* 33, 643–652. doi: 10.1007/s12210-022-01085-6
- Conejo-Saucedo, U., Ledezma-Villanueva, A., Ángeles de Paz, G., Herrero-Cervera, M., Calvo, C., and Aranda, E. (2021). Evaluation of the potential of sewage sludge mycobiome to degrade high diclofenac and bisphenol-a concentrations. *Toxics* 9:115. doi: 10.3390/toxics9060115
- Davies, N. M. (1998). Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. *Clin. Pharmacokinet.* 34, 101–154. doi: 10.2165/00003088-199834020-00002
- Davis, S. N., Wu, P., Camci, E. D., Simon, J. A., Rubel, E. W., and Raible, D. W. (2020). Chloroquine kills hair cells in zebrafish lateral line and murine cochlear cultures: implications for ototoxicity. *Hear. Res.* 395:108019. doi: 10.1016/j.heares.2020.108019

de Almeida, J. O., de Oliveira, V. R. T., dos Lucas, S. A. J., Simões Moita, B., Moreira Lima, L., Moita, B. S., et al. (2020). COVID-19: physiopathology and targets for therapeutic intervention. *Rev. Virtual Quim.* 12, 1464–1497. doi: 10.21577/1984-6835.20200115

DeLorenzo, M. E., and Fleming, J. (2008). Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 203–210. doi: 10.1007/s00244-007-9032-2

Facey, S. J., Nebel, B. A., Kontny, L., Allgaier, M., and Hauer, B. (2018). Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms. *Environ. Technol. Innov.* 10, 55–61. doi: 10.1016/J.ETI.2017.12.009

Feehan, K. T., and Gilroy, D. W. (2019). Is resolution the end of inflammation? *Trends Mol. Med.* 25, 198–214. doi: 10.1016/j.molmed.2019.01.006

Fent, K., Weston, A. A., and Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009

Gong, H., Chu, W., Huang, Y., Xu, L., Chen, M., and Yan, M. (2021). Solar photocatalytic degradation of ibuprofen with a magnetic catalyst: effects of parameters, efficiency in effluent, mechanism and toxicity evolution. *Environ. Pollut.* 276:16691. doi: 10.1016/j.envpol.2021.116691

Grandclément, C., Piram, A., Petit, M.-E., Seyssiecq, I., Laffont-Schwob, I., Vanot, G., et al. (2020). Biological removal and fate assessment of diclofenac using *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus laterosporus* strains and ecotoxicological effects of diclofenac and 4'-hydroxy-diclofenac. *J. Chemother.* 2020, 1–12. doi: 10.1155/2020/9789420

Gu, Y., Huang, J., Zeng, G., Shi, L., Shi, Y., and Yi, K. (2018). Fate of pharmaceuticals during membrane bioreactor treatment: status and perspectives. *Bioresour. Technol.* 268, 733–748. doi: 10.1016/j.biortech.2018.08.029

Guzik, U., Hupert-Kocurek, K., Krysiak, M., and Wojcieszynska, D. (2014). Degradation potential of protocatechuate 3,4-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels and on Glyoxyl agarose. *Biomed. Res. Int.* 2014:138768. doi: 10.1155/2014/138768

Holanda, F. H., Ribeiro, A. N., Sánchez-Ortiz, B. L., de Souza, G. C., Borges, S. F., Ferreira, A. M., et al. (2023). Anti-inflammatory potential of baicalein combined with silk fibroin protein in a zebrafish model (*Danio rerio*). *Biotechnol. Lett.* 45, 235–253. doi: 10.1007/s10529-022-03334-y

Hu, B., Hu, S., Chen, Z., and Vymazal, J. (2021). Employ of arbuscular mycorrhizal fungi for pharmaceuticals ibuprofen and diclofenac removal in mesocosm-scale constructed wetlands. *J. Hazard. Mater.* 409:124524. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2020.124524

- Hu, J., Zhang, L. L., Chen, J. M., and Liu, Y. (2013). Degradation of paracetamol by *Pseudomonas aeruginosa* strain HJ1012. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 48, 791–799. doi: 10.1080/10934529.2013.744650
- Huntjens, D. R. H., Danhof, M., and Della Pasqua, O. E. (2005). Pharmacokinetic–pharmacodynamic correlations and biomarkers in the development of COX-2 inhibitors. *Rheumatology* 44, 846–859. doi: 10.1093/rheumatology/keh627
- Ivshina, I. B., Tyumina, E. A., Bazhutin, G. A., and Vikhareva, E. V. (2021). Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effects of ibuprofen. *PLoS One* 16:e0260032. doi: 10.1371/journal.pone.0260032
- Ivshina, I. B., Tyumina, E. A., Kuzmina, M. V., and Vikhareva, E. V. (2019). Features of diclofenac biodegradation by *Rhodococcus ruber* IEGM 346. *Sci. Rep.* 9:9159. doi: 10.1038/s41598-019-45732-9
- Jurado, A., Vázquez-Suñé, E., and Pujades, E. (2021). Urban groundwater contamination by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Water* 13:720. doi: 10.3390/w13050720
- Kantor, T. G. (1984). Summary: ibuprofen—past, present, and future. *Am. J. Med.* 77, 121–125. doi: 10.1016/S0002-9343(84)80030-3
- Khasawneh, O. F. S., and Palaniandy, P. (2021). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants. *Process. Saf. Environ. Prot.* 150, 532–556. doi: 10.1016/j.psep.2021.04.045
- Kumari, M., and Kumar, A. (2022). Environmental and human health risk assessment of mixture of Covid-19 treating pharmaceutical drugs in environmental waters. *Sci. Total Environ.* 812, 1–10. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152485
- Li, Z., Wang, J., Gu, C., Guo, Y., and Wu, S. (2022). Marine bacteria-mediated abiotic-biotic coupling degradation mechanism of ibuprofen. *J. Hazard. Mater.* 435:128960. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2022.128960
- Lucas, F. M. F., Araujo, E. C. G., Fiedler, N. C., da Silva Santana, J. A., and Tetto, A. F. (2023). Perspective: scientific gaps on forest fires in Brazilian protected areas. *For. Ecol. Manag.* 529:120739. doi: 10.1016/j.foreco.2022.120739
- Luis López-Miranda, J., Molina, G. A., Esparza, R., Alexis González-Reyna, M., Silva, R., and Estévez, M. (2022). Ecofriendly and sustainable *Sargassum* spp.-based system for the removal of highly used drugs during the COVID-19 pandemic. *Arab. J. Chem.* 15, 1–15. doi: 10.1016/j.arabjc.2022.104169
- Maculewicz, J., Kowalska, D., Świacka, K., Toński, M., Stepnowski, P., Białk-Bielińska, A., et al. (2022). Transformation products of pharmaceuticals in the environment: their fate,

(eco)toxicity and bioaccumulation potential. *Sci. Total Environ.* 802, 1–31. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.149916

Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., and Wojcieszynska, D. (2016). *Bacillus thuringiensis* B1(2015) is a gram-positive Bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen. *Water Air Soil Pollut.* 227:197. doi: 10.1007/s11270-016-2893-0

Markov, P. V., Ghafari, M., Beer, M., Lythgoe, K., Simmonds, P., Stilianakis, N. I., et al. (2023). The evolution of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 21, 361–379. doi: 10.1038/s41579-023-00878-2

Micallef, J., Soeiro, T., and Jonville-Béra, A. P. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs, pharmacology, and COVID-19 infection. *Therapies* 75, 355–362. doi: 10.1016/j.therap.2020.05.003

Moreira, I. S., Bessa, V. S., Murgolo, S., Piccirillo, C., Mascolo, G., and Castro, P. M. L. (2018). Biodegradation of diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 152, 104–113. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.040

Murdoch, R. W., and Hay, A. G. (2013). Genetic and chemical characterization of ibuprofen degradation by *Sphingomonas Ibu-2*. *Microbiology* 159, 621–632. doi: 10.1099/mic.0.062273-0

Murshid, S., and Dhakshinamoorthy, G. P. (2019). Biodegradation of sodium diclofenac and mefenamic acid: kinetic studies, identification of metabolites and analysis of enzyme activity. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 144:104756. doi: 10.1016/J.IBIOD.2019.104756

Olicón-Hernández, D. R., Camacho-Morales, R. L., Pozo, C., González-López, J., and Aranda, E. (2019). Evaluation of diclofenac biodegradation by the ascomycete fungus *penicillium oxalicum* at flask and bench bioreactor scales. *Sci. Total Environ.* 662, 607–614. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2019.01.248

Omotola, E. O., and Olatunji, O. S. (2020). Quantification of selected pharmaceutical compounds in water using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Heliyon* 6:e05787. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05787

Osafo, N., Agyare, C., Obiri, D. D., and Antwi, A. O. (2017). “Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs” in *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. ed. A. G. A. Al-kaf (Rijeka: Intech Open)

Oscanoa, T. J., Romero-Ortuno, R., Carvajal, A., and Savarino, A. (2020). A pharmacological perspective of chloroquine in SARS-CoV-2 infection: an old drug for the fight against a new coronavirus? *Int. J. Antimicrob. Agents* 56, 1–16. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106078

- Palma, T. L., Donaldben, M. N., Costa, M. C., and Carlier, J. D. (2018). Putative role of Flavobacterium, Dokdonella and Methylophilus strains in paracetamol biodegradation. *Water Air Soil Pollut.* 229:200. doi: 10.1007/s11270-018-3858-2
- Palma, T. L., Magno, G., and Costa, M. C. (2021). Biodegradation of paracetamol by some gram-positive bacterial isolates. *Curr. Microbiol.* 78, 2774–2786. doi: 10.1007/s00284-021-02543-4
- Palma, T., Valentine, J., Gomes, V., Faleiro, M., and Costa, M. (2022). Batch studies on the biodegradation potential of paracetamol, fluoxetine and 17 α -Ethinylestradiol by the *Micrococcus yunnanensis* strain TJPT4 recovered from marine organisms. *WaterSA* 14:3365. doi: 10.3390/w14213365
- Peesa, J. P., Yalavarthi, P. R., Rasheed, A., and Mandava, V. B. R. (2016). A perspective review on role of novel NSAID prodrugs in the management of acute inflammation. *J. Acute Dis.* 5, 364–381. doi: 10.1016/j.joad.2016.08.002
- Perico, N., Cortinovis, M., Suter, F., and Remuzzi, G. (2023). Home as the new frontier for the treatment of COVID-19: the case for anti-inflammatory agents. *Lancet Infect. Dis.* 23, 22–33. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00433-9
- Poddar, K., Sarkar, D., Chakraborty, D., Patil, P. B., Maity, S., and Sarkar, A. (2022). Paracetamol biodegradation by Pseudomonas strain PrS10 isolated from pharmaceutical effluents. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 175:105490. doi: 10.1016/J.IBIBOD.2022.105490
- Pomati, F., Netting, A. G., Calamari, D., and Neilan, B. A. (2004). Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of Synechocystis sp. and Lemna minor. *Aquat. Toxicol.* 67, 387–396. doi: 10.1016/j.aquat.2004.02.001
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. Available at: <https://www.r-project.org/>
- Rastogi, A., Tiwari, M. K., and Ghangrekar, M. M. (2021). A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *J. Environ. Manag.* 300:113694. doi: 10.1016/J.JENVMAN.2021.113694
- Ren, Z., Romar, H., Varila, T., Xu, X., Wang, Z., Sillanpää, M., et al. (2021). Ibuprofen degradation using a co-doped carbon matrix derived from peat as a peroxymonosulphate activator. *Environ. Res.* 193:110564. doi: 10.1016/J.ENVRES.2020.110564
- Rios-Miguel, A. B., Smith, G. J., Cremers, G., van Alen, T., Jetten, M. S. M., Op den Camp, H. J. M., et al. (2022). Microbial paracetamol degradation involves a high diversity of novel amidase enzyme candidates. *Water Res X* 16:100152. doi: 10.1016/J.WROA.2022.100152

Ruhoy, I. S., and Daughton, C. G. (2007). Types and quantities of leftover drugs entering the environment via disposal to sewage — revealed by coroner records. *Sci. Total Environ.* 388, 137–148. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.08.013

Salgado, R., Brito, D., Noronha, J. P., Almeida, B., Bronze, M. R., Oehmen, A., et al. (2020). Metabolite identification of ibuprofen biodegradation by *Patulibacter medicamentivorans* under aerobic conditions. *Environ. Technol.* 41, 450–465. doi: 10.1080/09593330.2018.1502362

Sana, A. (2018). Biodegradation of paracetamol by native fungal species inhabiting wastewater of a pharmaceutical factory in sana'a, Yemen. *Univ. J. Pharm. Res.* 2, 35–41. doi: 10.22270/ujpr.v2i6.r7

Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., and Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175, 45–95. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.100

Scheurell, M., Franke, S., Shah, R. M., and Hühnerfuss, H. (2009). Occurrence of diclofenac and its metabolites in surface water and effluent samples from Karachi, Pakistan. *Chemosphere* 77, 870–876. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.07.066

Scheytt, T., and Mersmann, P., Lindst^{adt} Lindst^{adt}, R., and Heberer, T. (2005). 1-octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone. *Water Air Soil Pollut.* 165, 3–11. doi: 10.1007/s11270-005-3539-9

Sharma, K., Kaushik, G., Thotakura, N., Raza, K., Sharma, N., and Nimesh, S. (2020). Enhancement effects of process optimization technique while elucidating the degradation pathways of drugs present in pharmaceutical industry wastewater using *Micrococcus yunnanensis*. *Chemosphere* 238:124689. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124689

Show, S., Sarkar, P., Barman, S., and Halder, G. (2023). Microbial remediation of ibuprofen contaminated water using novel isolate *Microbacterium paraoxydans*. *Chem. Pap.* 77, 517–531. doi: 10.1007/s11696-022-02499-0

Singhal, T. (2020). A review of coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Ind. J. Pediatr.* 87, 281–286. doi: 10.1007/s12098-020-03263-6

Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., and Reissman, D. B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci. Total Environ.* 329, 99–113. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.03.015

Stylianou, K., Hapeshi, E., Vasquez, M. I., Fatta-Kassinos, D., and Vyrides, I. (2018). Diclofenac biodegradation by newly isolated *Klebsiella* sp. KSC: microbial intermediates and

ecotoxicological assessment. *J. Environ. Chem. Eng.* 6, 3242–3248. doi: 10.1016/j.jece.2018.04.052

Świacka, K., Michnowska, A., Maculewicz, J., Caban, M., and Smolarz, K. (2020). Toxic effects of NSAIDs in non-target species: a review from the perspective of the aquatic environment. *Environ. Pollut.* 273:115891. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115891

Tiwari, B., Sellamuthu, B., Ouarda, Y., Drogui, P., Tyagi, R. D., and Buelna, G. (2017). Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach. *Bioresour. Technol.* 224, 1–12. doi: 10.1016/j.biortech.2016.11.042

Ucella-Filho, J. G. M., Freire, A. S. M., Carréra, J. C., Lucas, F. M. F., Zucolotto, S. M., Dias Júnior, A. F., et al. (2022). Tannin-rich bark extract of plants as a source of antimicrobial bioactive compounds: a bibliometric analysis. *S. Afr. J. Bot.* 150, 1038–1050. doi: 10.1016/j.sajb.2022.09.018

Vargas-Ordóñez, A., Aguilar-Romero, I., Villaverde, J., Madrid, F., and Morillo, E. (2023). Isolation of novel bacterial strains *Pseudomonas extremaustralis* CSW01 and *Stutzerimonas stutzeri* CSW02 from sewage sludge for paracetamol biodegradation. *Microorganisms* 11:196. doi: 10.3390/microorganisms11010196

Vieno, N., and Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant—a review. *Environ. Int.* 69, 28–39. doi: 10.1016/j.envint.2014.03.021

Ward, B., and Alexander-Williams, J. M. (1999). Paracetamol revisited: a review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Acute Pain* 2, 139–149. doi: 10.1016/S1366-0071(99)80006-0

Wojcieszynska, D., Guzik, H., and Guzik, U. (2022). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the era of the COVID-19 pandemic in the context of the human and the environment. *Sci. Total Environ.* 834:155317. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2022.155317

Wojcieszynska, D., Łagoda, K., and Guzik, U. (2023). Diclofenac biodegradation by microorganisms and with immobilised systems—a review. *Catalysts* 13, 1–18. doi: 10.3390/catal13020412

Zhang, L., Hu, J., Zhu, R., Zhou, Q., and Chen, J. (2013). Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 3687–3698. doi: 10.1007/s00253-012-4170-5

Zhang, X., Wang, Y., Lyu, H., Zhang, Y., Liu, Y., and Luo, J. (2021). The influence of COVID-19 on the well-being of people: big data methods for capturing the well-being of working adults and protective factors nationwide. *Front. Psychol.* 12:681091. doi: 10.3389/fpsyg.2021.681091

Zhang, Y., Geißen, S.-U., and Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 73, 1151–1161. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.07.086

Zoulikha, M., Huang, F., Wu, Z., and He, W. (2022). COVID-19 inflammation and implications in drug delivery. *J. Control. Release*. 346, 260–274. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.04.027

Żur, J., Piński, A., Marchlewicz, A., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszynska, D., and Guzik, U. (2018b). Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 21498–21524. doi: 10.1007/s11356-018-2517-x

Żur, J., Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Marchlewicz, A., and Guzik, U. (2018a). Paracetamol—toxicity and microbial utilization. *Pseudomonas moorei* KB4 as a case study for exploring degradation pathway. *Chemosphere* 206, 192–202. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.04.179

Uso de fungos filamentosos, isolados do solo proveniente de extração de minério de ferro, na biodegradação de ibuprofeno.

Beatriz L. Ferreira¹, Adriana M. Ferreira¹, Fabricio H. Holanda¹, Patrícia de A. Nóbrega¹, Willian G. Birolli², André Luiz M. Porto³, Lilian Grace da S. Solon¹, Irlon M. Ferreira^{1*}

¹Laboratório de Biotransformação e Síntese Orgânica Aplicada, Universidade Federal do Amapá, Universidade Campus Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek de Oliveira Km 02, 68902-280, Bairro Zerão, Macapá, AP, Brazil.

²Molecular Oncology Research Center, Institute of Learning and Research, Barretos Cancer Hospital, Av. Ébano 165-1, 14784-384, Dr. Paulo Prata, Barretos, SP, Brazil.

³ Laboratório de Química Orgânica e Biotransformação, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. João Dagnone, 1100, Ed. Prof. Dr. Wagner Douglas, J. Santa Angelina, 13563-120, São Carlo, São Paulo, Brazil

* Correspondência:

irlon.ferreira@gmail.com orcid.org/0000-0002-4517-0105

Palavras-chave: Degradação microbiana; Anti-inflamatório; Fungo de ambiente amazônico NSAID; Micropoluentes.

Resumo

O ibuprofeno (IBU) é um dos medicamento anti-inflamatório não esteroideais mais utilizados mundialmente, e seu descarte incorreto vem causando preocupação a organização mundial de saúde. Atualmente, várias tecnologias foram desenvolvidas como alternativas na gestão de resíduos de micropoluentes orgânicos (MEOs) a partir de fármacos. O objetivo desse trabalho foi realizar estudos de biodegradação do IBU mediado por células totais de fungos de ambiente amazônico, isolados do solo rico em concentrações de metais. Cinco cepas de fungos foram isoladas de solo de mina de ferro, por método de diluição seriada. Após a triagem em meio sólido, os fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* (CBMAI 2752) e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* (CBMAI 2758) foram selecionados para o experimento de biodegradação de IBU em meio de cultura líquido, conforme planejamento fatorial *Box-Behnken* de três variáveis, composto por 15 experimentos, sendo as variáveis: pH (5, 7 e 9), tempo (3, 6, 9 dias) e concentração (20, 60 e 100 mg.L⁻¹). As amostras foram quantificadas por HPLC-UV e o IBU e seus metabólitos foram identificados por CG-MS. Foi realizado um estudo de toxicidade aguda em embriões do modelo animal zebrafish (*Danio rerio*), para avaliar a toxicidade do extrato degradado comparado ao IBU. Ambos os fungos *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* e *Trichoderma pseudoasperelloides* apresentaram biodegradação superior a 99% em diversas condições reacionais. Foram identificados por CG-MS três metabólitos, dentre eles 2-(*R*-hidróxi-4-isobutilfenil) propanoico acid. O estudo de toxicidade evidencia que os extratos obtidos após a biodegradação de ibuprofeno não são nocivos aos embriões de zebrafish na concentração estudada, quando comparado ao ibuprofeno comercial que foi considerado tóxico. A pesquisa revela o potencial biotecnológico dos fungos de solo amazônico, elucidando a importância no emprego destas cepas em metodologias verdes capazes de aperfeiçoar a biodegradação de outros MEOs.

Introdução

Os medicamentos desempenham um papel marcante em benefício da qualidade de vida, da população mundial. O ibuprofeno (IBU) é um medicamento anti-inflamatório não esteroideal (AINEs) que atua como inibidor seletivo da ciclooxigenase, e sintetizam prostaglandinas responsáveis de reduzir dor e inflamações (ZHANG et al., 2020). O IBU é utilizado para tratar uma variedade de doenças, como dores acompanhadas de inflamações significativas, tais como artrite reumatoide e distúrbios musculoesqueléticos, dores moderadas no pós-operatório, cefaleia, dismenorreia primária, etc. Encontra-se entre um dos AINEs mais prescritos mundialmente (GUTIÉRREZ-NOYA et al., 2020; MOTOV et al., 2019).

Segundo a Pesquisa do Painel de Despesas Médicas (MEPS), realizada pela Agência de Pesquisa e Qualidade em Saúde (AHRQ), o IBU foi encontrado entre os 40 principais medicamentos mais prescritos nos Estados Unidos da América (EUA), no período de 2013-2020. A prescrição e o consumo global deste medicamento são eminentes, e a sua produção anual varia na casa dos milhões de toneladas, o que significa que o IBU foi detectado em corpos de água, e sua presença aumenta à medida que é descartada (MARCHLEWICZ; GUZIK; WOJCIESZYŃSKA, 2015) por diferentes formas, seja por excreção de medicamentos não absorvidos na urina e nas fezes, no descarte incorretos de medicamentos e em resíduos industriais (CHABCHOUBI et al., 2023), tornando-se um potencial micro-contaminante ambiental. Diversos estudos apontam a presença de IBU em meio aquático, em concentrações que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, representando um risco ambiental para os organismos aquáticos e terrestres, por seus danos prejudiciais citotóxicos, genotóxicos e alto estresse oxidativo celular (AJIBOLA et al., 2021; JAN-ROBLERO; CRUZ-MAYA, 2023; SILVA; BORGES; FONSECA, 2020). Além disso, com o surgimento da pandemia causada pela Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), o consumo de AINEs, entre eles o IBU, tornou-se ainda mais recorrentes.

Atualmente, várias tecnologias foram desenvolvidas como alternativas na gestão de resíduos de micropoluentes orgânicos (MEOs) a partir de fármacos. Como o uso de membrana (WILLIAMS; RAY; GOMAA, 2012), processo de oxirredução (SAEID et al., 2018), fotodegradação (MAGAELA et al., 2022), ozonização catalítica e ozonização fotocatalítica (FIDELIS et al., 2023), adsorção (STACHOWIAK; CEGŁOWSKI; KURCZEWSKA, 2023) e biodegradação (HASAN et al., 2021; HOLANDA et al., 2019). A biodegradação, em alguns casos é uma proposta eficaz e ecologicamente viável para a remoção de ME, especialmente

quando estão presentes em baixas concentrações (AGUILAR-ROMERO et al., 2021). Os fungos filamentosos possuem alto potencial de biodegradação, por possuir enzimas extracelulares, especialmente as oxidases, que degradam diversos compostos orgânicos (OMOKHAGBOR ADAMS et al., 2020), incluindo drogas anti-inflamatórias não esteroidais (CONEJO-SAUCEDO et al., 2021)

Vários estudos já relataram o uso de diferentes microrganismos, para a biodegradação de IBU (LI et al., 2022; MURSHID; DHAKSHINAMOORTHY, 2019; SHOW et al., 2023). Por exemplo, a bactéria *Rhizophagus irregularis*, isolado pelo instituto de botânica da academia Theca de Ciências (Tchéquia), utilizada na remoção de IBU e seus metabólitos, com taxa de biodegradação de até 80%, em condições brandas de pH e temperatura Hu (et al., 2021), porém a literatura ainda é carente de pesquisas que envolvem a biodegradação de ibuprofeno por fungos filamentosos.

A floresta amazônica possui a mais rica biodiversidade dentre os biomas tropicais, com espécies de animais, plantas e microrganismos ainda pouco conhecidas (DE et al., 2009). As inúmeras diversidades microbianas presentes no solo garantem a manutenção desta rica floresta, permitindo a reutilização dos seus componentes de flora e fauna através da reciclagem de matéria orgânica (CELESTINO et al., 2014; MELO et al., 2012).

Partindo deste contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar estudos de biodegradação do IBU mediado por células totais de fungos de ambiente amazônico, isolados do solo rico em concentrações de metais.

Material e Métodos

Reagentes e Solventes

O (+/-)ibuprofeno (98%) foi adquirido pela empresa Sigma-AldrichIGMA (São Paulo, Brasil); ibuprofeno comercial foi adquirido pela Prati-Donaduzzi, L21L70J, os solventes orgânicos: acetato de etila (99,5%), álcool etílico (70%), álcool metílico (99,8%) e dimetilsufóxido (97%) foram adquiridos pela Synth® (São Paulo, Brasil). Os meios de cultura (Extrato Malte Ágar sabouraud) foram obtidos pela fabricante Himedia® (Mumbai, Índia), e o Agar-Agar, obtidas pela empresa Dinâmica (São Paulo, Brasil), Ácido clorídrico (37%) e cloreto de sódio foi obtido pela Qhemis® (São Paulo, Brasil). O azul de lactofenol P.A foi adquirido pela fabricante Newprov (Pinhais, Paraná, Brasil), a acetronitrila grau HPLC adquirida pela Dinâmica (São Paulo, Brasil), o clorafenicol (99%), fosfato de potássio KH_2PO_4 (99%) e fosfato de sódio Na_2HPO_4 (99%) foram obtidos pela indústria química Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil), e o sulfato de sódio Na_2SO_4 pela Reagen (São Paulo, Brasil).

Coleta de amostras de solo

Para o isolamento dos fungos filamentosos realizou-se uma coleta do solo da área explorada pela mina de ferro da empresa UNAMGEN MINERACAO E METALURGIA SA, localizada no município de Mazagão (Estado do Amapá, Brasil). A coleta foi realizada em 4 pontos aleatórios no interior da mina, com as seguintes coordenadas geográficas: **Amostra (A):** 0.398175°, -51.755533°, **Amostra (B):** 0.399548°, -51.755179°, **Amostra (C):** 0.398958, -51.754728°, **Amostra (D):** 0.398143°, -51.755168°, a 20 cm de profundidade, com auxílio de um cano inoxidável e espátula esterilizados. As amostras foram transferidas para embalagens de polietileno, pré-esterilizados e etiquetadas. Para cada local foram coletados 100g do solo em triplicata. Posteriormente as amostras foram secas em estufa (50°C, 24 horas), depois homogeneizadas e peneiradas (2,0 mm de abertura)(RAJA; PRAVEENA; WILLIAM, 2017). Para a determinação do pH do solo coletado utilizou-se pHmetro (pH Pro LineLab).

Isolamento dos fungos filamentosos

O isolamento dos fungos ocorreu por meio da técnica de suspensão seriada. De início foi preparada a solução mãe das amostras de solo coletadas do solo, através da homogeneização de 10g de cada amostra de solo em 100 mL de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada, e posteriormente colocada em agitação por 60 minutos à 150 rpm. A partir da solução mãe foi realizada diluições seriadas em triplicata, 0,3 mL de solução mãe concentrada foi misturada

com 9 mL (1;10 p/v) de solução salina, em sequência as diluições 1:100; 1:1000, 1:10000. Posteriormente introduziu-se 300 µL de cada diluição para semeadura em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud, previamente esterilizados em autoclave (Phoenix, modelo AV-75) por 15 minutos à 121°C, 1 atm, e adição da solução de clorafenicol (100 mg.L⁻¹). As placas foram mantidas em incubação em Estufa (B.O.D. LUCADEMA®, modelo LUCA-161/03) a (28°C), durante 5 dias para desenvolvimento dos microrganismos (DESHMUKH; VEREKAR, 2014; FERREIRA et al., 2023a).

Identificação molecular dos fungos filamentosos

As identificações iniciais foram baseadas nas observações características macromorfológica como cor, textura e bordas da colônia, e posteriormente as características micromorfológicas, utilizando a técnica do microcultivo para análise das hifas fúngicas da colônia do microrganismo, utilizando azul de lactofenol (0,5%), seguindo os métodos e critérios conforme (SENA et al., 2022a). Os fungos de solo utilizados nesta pesquisa foram identificados por métodos moleculares através do Centro de Pesquisa Pluridisciplinar Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) da Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil (FERREIRA et al., 2015). As culturas *Trichoderma pseudoasperelloides* (CBMAI 2752), *Penicillium rolsii* (CBMAI 2753), *Talaromyces verruculosus* (CBMAI 2754), *Asrpegillus* sp. cf *pseudoviridnutans* (CBMAI 2755), *Purpureocillium lilacinum* (CBMAI 2757) e *Penicillium* sp. cf *guaibinense* (CBMAI 2758) estão depositadas na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – (CBMAI- <https://cbmai.cpqba.unicamp.br/>).

Estudo do crescimento radial na presença de ibuprofeno

O estudo do crescimento da cultura micelial radial foi conduzido conforme estudo de BIROLLI et al., (2014), com algumas adaptações, utilizando os fungos: CBMAI 2752, CBMAI 2753, CBMAI 2754), CBMAI 2755, CBMAI 2757 e CBMAI 2758. Para preparação do meio de cultura sólido adicionou-se 20 g de Extrato Malte e 20g de ágar em 1000 mL de água destilada, o meio foi ajustado para pH 5 com auxílio da solução de HCl ou NaOH (10%). Posteriormente o meio de cultura foi esterilizado por autoclave p (15 min à 121°C, 1 atm). Para cada microrganismo inoculado, realizou-se o estudo com placas de meio de cultura controle (sem a presença do fármaco) e placas contendo os fármacos em solução IBU (20, 60 e 100 mg.L⁻¹), solubilizadas em DMSO. Inserindo-se um disco de 5 cm de micélio no centro de cada placa previamente vertida com meio de cultura, em pH 5. Após a inoculação as placas foram mantidas por 6 dias incubadas em B.O.D. à 30°C. O monitoramento do crescimento radial dos

microrganismos foi realizado utilizando paquímetro para medir o diâmetro em posições perpendiculares a cada 24 horas por 7 dias. Foi realizada a análise de variância (ANOVA), para análise estatística da velocidade de crescimento, sendo valores de $P \leq 0,05$ considerados significativos. Os gráficos foram realizados pelo software Graph Pad Prisma® (Versão 8.0.2).

Reação de Biodegradação de Ibuprofeno mediadas por Fungos em meio líquido.

Cultivo microbiano em meio líquido (malte 2%)

Após a triagem em meio sólido, os fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* (CBMAI 2752) e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* (CBMAI 2758) foram selecionados para o experimento de biodegradação em meio líquido. 50 mL do meio de cultura, preparado a partir de 20 g de Extrato Malte diluído em 1000 mL de água destilada em pH 5 (ajustado em solução de HCl ou NaOH 10%) foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL e autoclavados (15 min, à 121°C, 1 atm). Em seguida foram transferidos 6 fragmentos circulares (1cm diâmetro) do meio do sólido contendo os fungos de interesse (CBMAI 2752 e CBMAI 2758). As reações foram mantidas em incubadora orbital (SHAKER, LUCADEMA®, modelo LUCA -222), à 150 rpm por 4 dias a 30°C.

Reação Biodegradação

Após o tempo de cultivo em meio líquido, os micélios foram filtrados em funil de Buchner e ressuspensos em solução tampão fosfato (pH 5, 7 e 9). O processo foi concluído com adição da solução de IBU em diferentes concentrações (20, 60 e 100 mg.L⁻¹). As reações foram mantidas agitação orbital (150 rpm) por 3, 6 e 9 dias a 30°C, conforme o desenho experimental (HOLANDA et al., 2019a).

Extração dos produtos de biodegradação

Após o tempo de agitação, conforme o planejamento experimental, foi realizada a extração das reações com adição de 30 mL de acetato de etila, em agitação magnética por 30 minutos. Em seguida as células foram filtradas em funil de Buchner. A mistura reacional foi extraída por partição líquido-líquido novamente com acetato de etila (3x 30mL). Na fase orgânica adicionou-se Na₂SO₄ anidro e a reação foi novamente filtrada. O excesso de solvente foi rotaevaporado a pressão reduzida, e as amostras foram liofilizadas.

Análise estatística (Desenho Experimental)

Para este estudo, foi aplicado planejamento fatorial *Box-Behnken* de três variáveis, e determinado a combinação adequada das variáveis para estudo da biodegradação do ibuprofeno, utilizando os fungos do solo. Valores de pH do meio, tempo (dias) e concentração de IBU, identificados fatores influentes sobre a resposta em testes preliminares, foram variáveis testadas em um experimento de 15 execuções para determinar o nível ideal. As variáveis foram especificadas como x_1 , x_2 e x_3 , e seus níveis. Os valores são mostrados conforme Tabela 3. As três variáveis são dadas de acordo com a equação polinomial a seguir:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11} \times x_1^2 + \beta_{22} \times x_2^2 + \beta_{33} \times x_3^2 + \beta_{12} \times x_1 \times x_2 + \beta_{13} \times x_1 \times x_3 + \beta_{23} \times x_2 \times x_3$$

Em que Y é a resposta prevista; β_0 equivale a constante modelo, β_1 , β_2 e β_3 são coeficientes lineares, β_{11} , β_{22} e β_{33} correspondem aos coeficientes quadráticos; β_{12} , β_{13} e β_{23} são coeficientes de interação; e x_1 , x_2 e x_3 são variáveis independentes.

Tabela 1. Variáveis independentes usadas no planejamento fatorial de *Box-Behnken* empregado

FATOR	VARIÁVEIS	NÍVEIS		
		-1	0	1
x_1	Tempo	3	6	9
x_2	pH	5	7	9
x_3	Concentração	20	60	100

Considerou-se o teor de biodegradação (BD%) como resposta para determinar as condições ideais. O software STATISTICA® (versão 10, Statesoft—Inc., Tulsa, OK, EUA, versão de teste, 2011) foi usado para planejamento experimental, análise de dados e determinação de condições ideais. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para os efeitos das variáveis independentes e a significância das interações. Os gráficos de Pareto foram aplicados para obter a significância dos efeitos das variáveis testadas nas respostas mencionadas (SENA et al., 2022a).

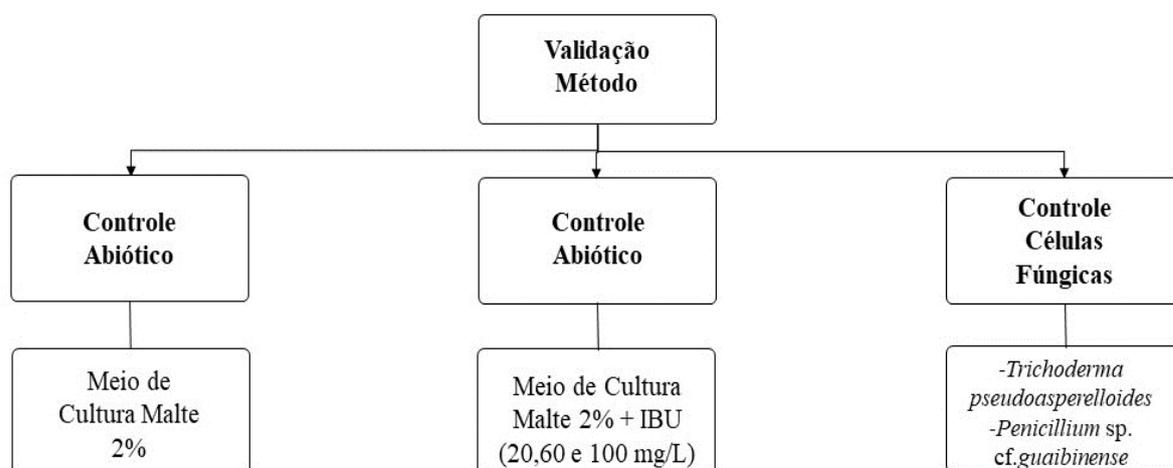
Validação Método

O método foi validado de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC, 2017)Nº 166, da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre a validação de

métodos analíticos. Na validação do método cromatográfico considerou a seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

A seletividade do método de validação foi analisada determinando que as substâncias ou metabolitos presentes nas amostras não co-eluem com IBU na análise CG-MS e HPLC-UV. Para validação do método foram realizadas reação de controle abiótico com e sem a presença do medicamento em meio de cultura malte 2%, e também reações de controle de células em meio de cultura, sem a presença do medicamento em estudo, para avaliar a seletividade do método bioanalítico (Figura 1).

Figura 1: Fluxograma de reações utilizadas na validação do método (pH 7, 30°, 96 h, 150 rpm)



As reações foram preparadas em ambiente esterilizado conforme descrito anteriormente. As extrações foram realizadas conforme a secção que disserta sobre as extrações dos produtos de biodegradação. Por fim, ambas foram preparadas para análise cromatográfica em metanol (HPLC-UV e CG-MS) (HOLANDA et al., 2019).

A linearidade foi verificada através da curva de calibração, foram utilizados seis padrões de calibração de IBU padrão, sendo em concentrações de 10, 70, 130, 190, 250 e 310 ppm, diluídas em metanol. A determinação da concentração de IBU, foi realizada um método de padrão externo, dada na seguinte equação: $c = Ax + B$, onde c corresponde a concentração do analito em mg L^{-1} , x é referente a área do analito, A trata-se do coeficiente angular, e B o coeficiente linear. A curva de calibração do padrão de IBU foi construída, produzindo a equação linear: $c = 10016.x + 22988$. A sensibilidade foi expressa através da inclinação da curva analítica.

A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, precisão e reprodutividade, e a exatidão refere-se, no método analítico, ao grau de concordância entre os resultados do método em estudo e o valor aceito como verdadeiro (RDC-2017). A precisão é expressa pela dispersão dos resultados, calculando o desvio padrão relativo (DPR) também denominado de coeficiente de variação (CV), conforme a equação abaixo:

$$CV = \left[\frac{DP}{CMD} \right] \times 100$$

Onde DP é referente ao desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

A precisão relativa foi calculada através da equação da percentagem de exatidão, conforme a seguir:

$$\text{Precisão \%} = \left[\frac{\text{Concentração média detectada}}{\text{Concentração nominal}} \right]$$

O Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do equipamento, foi calculado baseado em parâmetros de curvas analíticas, que consideram os intervalos de confiança da regressão linear.

Quantificação de Ibuprofeno por análise HPLC-UV

O IBU foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando um sistema cromatográfico Shimadzu, constituído pelos módulos: sistema de bombeamento LC-20 AT, degaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, detector UV-VIS SPD M20A, CTO- Forno de coluna 20A e controlador de sistema CBM-20A. A coluna utilizada para separação foi a Phenomenex C18 Column (5 µm de tamanho de partícula, 25 cm x 4,6 mm) com pré-coluna. A fase móvel por gradiente foi composta de acetonitrila (solvente A) e água (solvente B), como segue: modo isocrático (solvente A), 0-15 min, (60:40), acidificada em ácido fórmico 0,1% respectivamente. A temperatura do forno foi de 40°C, com fluxo de 1 mL/min e volume de injeção 10 µL. A detecção ultravioleta foi estudada em 230 nm (BIROLI et al., 2016). A quantificação foi realizada através do método analítico validado conforme o item acima.

Detecção de IBU e Metabólitos por análise de Cromatografia gasosa e espectroscopia de massa s (GC-MS)

A análise de IBU, e seus produtos de biodegradação foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectroscopia de massas em aparelho (GC-MS) Shimadzu /

GC-2010 equipado com auto-injetor Shimadzu/GC-2010 aparelho equipado com um autoinjetor Shimadzu/AOC-5000 e um detector de feixe de elétrons Shimadzu MS-2010 plus no modo SCAN 70 eV. O forno foi equipado com coluna de sílica fundida DB-5 (J & W, Scientific, 30mm x 0,25 mm x 0,25µm). O gás de arraste utilizado foi o He a 65 kPa. As análises foram realizadas com injetor em temperatura de 250 °C, e temperatura do detector de 280 °C. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C por 5 min e elevada para 280 °C com taxa de aquecimento de 20 °C / min, mantendo esta temperatura por 10 min, em estimativa de tempo total de análise de 45 min. A relação de divisão foi de 1:1. O analito foi analisado primeiramente em modo SCAN para selecionar os íons e o tempo de retenção do composto (SOARES et al., 2021).

Estudo de toxicidade em embriões do modelo animal zebrafish (*Danio rerio*)

Animais

Os animais são provenientes da Piscicultura Power Fish, located in Itaguaí-RJ, Brazil. Utilizou os peixes de ambos os sexos, com idade entre 8 meses e 2 anos, de linhagem AB selvagem, os animais foram mantidos em água, sob controle de temperatura ($23 \pm$ dois °C), alimentação e ciclo claro/escuro (10/14) (Borges et al., 2018; Souza G et al., 2016, FERREIRA et al 2023), acondicionados em aquários na Laboratório de Ictio e Genotoxicidade da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAP (Brasil) sob o número de 019/2022.

Estudo sobre a toxicidade em embriões de zebrafish

O teste seguiu as recomendações com base na *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) 236 com algumas adaptações. Foi realizado o acondicionamento (pelo menos 12 horas) de dez grupos de animais, cada grupo era composto por dois machos e uma fêmea, mantidos separados por uma divisória de vidro transparente em aquário de reprodução, onde os ovos são capturados para o fundo para que não haja canibalismo. Após pernoite, foram acesas luminárias, simulando o amanhecer (estímulo luminoso) de forma a incitar a postura (OECD, 2013). Segundo metodologia descrita por Yang e colaboradores (2018), para evitar variantes do tipo genético optou-se por coletar ovos de no mínimo três grupos diferentes. Após coleta, os ovos foram lavados com água de aquário, randomizados, para cada concentração avaliou-se grupos de 15 embriões (em triplicata), totalizando 45

embriões por concentração transferidos para placas de 96 poços em contato com as concentrações a serem estudadas (Tabela 4), seguindo a metodologia descrita por Ferreira (et al., 2023b) e Marinho (et al., 2023). O estudo da toxicidade foi realizado 24, 48, 72 e 96 h.

Tabela 2: Grupos utilizados no ensaio de toxicidade em embriões de zebrafish.

GRUPO	DESCRIÇÃO
1	Água destilada (H ₂ O)
2	Dimetilsulfóxido 2% (DMSO)
3	Ibuprofeno Comercial (IBU)*
4	Produto biodegradação ibuprofeno <i>Penicillium</i> sp. cf. <i>guaibinense</i> (PBP)*
5	Produto biodegradação ibuprofeno <i>Trichoderma pseudoasperelloides</i> (PBT)*
6	Extrato fúngico <i>Penicillium</i> sp. cf. <i>guaibinense</i> (EP)*
7	Extrato fúngico <i>Trichoderma pseudoasperelloides</i> (ET)*

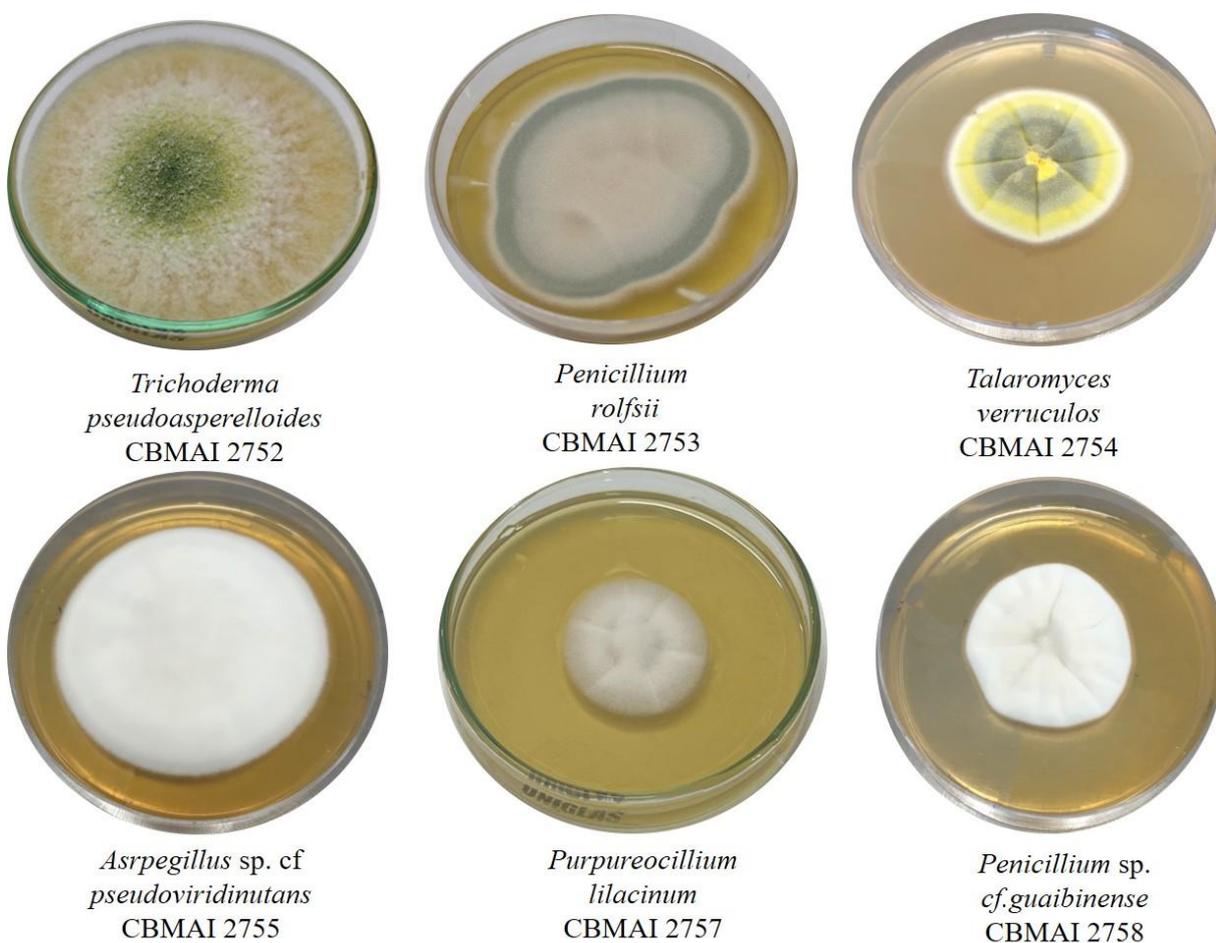
*Concentração 8,06 mg.L⁻¹

Resultados e Discussão

Identificação fungos filamentosos

As análises macromorfológicas e micromorfológicas identificaram as seguintes espécies de fungos: *Trichoderma pseudoasperelloides*, *Penicillium rolfsii*, *Talaromyces verruculosus*, *Asrpegillus* sp. cf *pseudoviridinutans*, *Purpureocillium lilacinum*, *Penicillium* sp. cf. *guaibinense*, com os seguintes códigos: CBMAI 2752, CBMAI 2753, CBMAI 2754, CBMAI 2755, CBMAI 2757, CBMAI 2758, respectivamente. A figura 2 mostra os fungos isolados de solo, cultivados em placas de Petri após o procedimento de purificação de suas linhagens.

Figura 2: Espécies de fungos isolados do solo de mina de ferro



A morfologia macroscópica, características mais robustas podem ser descritas, como cor, textura, relevo granular ou micelial, que podem se agregar ou se dispersar livremente.

Através da morfologia microscópica, propriedades mais específicas, como frequência de ramificação, tamanho das hifas e segregação, podem ser verificadas (MCINTYRE et al., 2001).

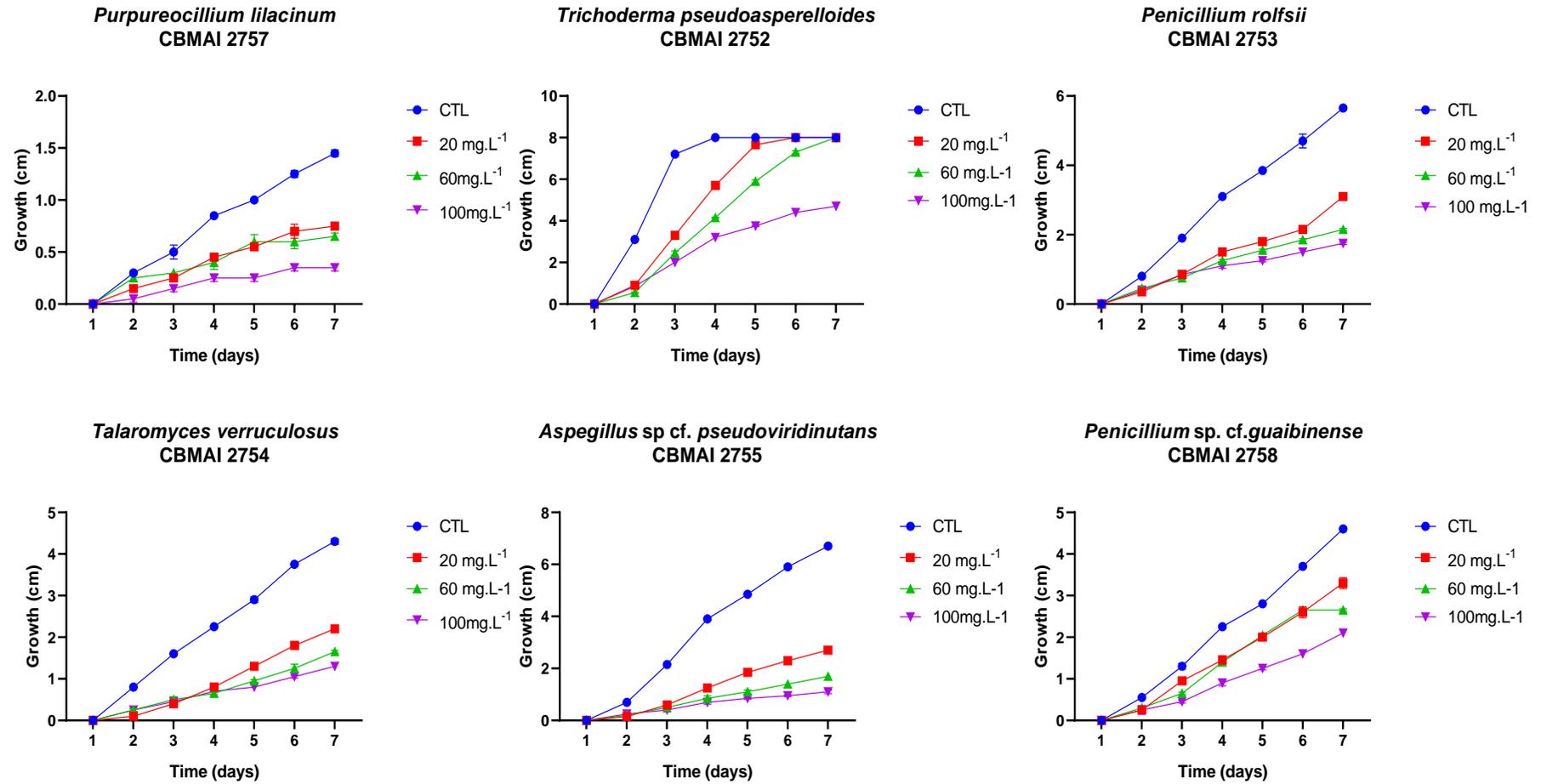
O solo amazônico, por ser rico na biodiversidade microbiológica, vem sendo amplamente estudado com diferentes finalidades, como o isolamento e identificação de espécies de microrganismos tais como os fungos filamentosos.

Cinquenta cepas foram isoladas de solo amazônico, por CELESTINO (et al., 2014), incluindo fungos do gênero *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces* sp., *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp., e *Penicillium* sp. Estudos semelhantes concentraram-se na bioprospecção em solos amazônicos para encontrar fungos capazes de degradar herbicidas presentes na agricultura e no meio ambiente, sendo que do total de cepas isoladas, 60% são do gênero *Penicillium*, 26 % de *Aspergillus* e 8% *Trichoderma* (CORREA et al., 2023). Esses resultados sugerem que a bioprospecção de fungos na Amazônia é uma abordagem viável para encontrar novas fontes de degradação microbiana.

Crescimento radial de fungos em meio sólido com ibuprofeno

Foi realizado a avaliação de crescimento micelial de fungos filamentosos isolados, na presença de IBU. Os experimentos foram conduzidos por 7 dias, e o crescimento da colônia foi avaliado a cada 24 h. Os resultados para o crescimento micelial a partir das médias do diâmetro (cm) da placa de Petri se encontram na Tabela 1, apresentada pelas espécies fúngicas, meio de cultura testados (Controle Malte 2%, IBU 20, 60, 100 mg.L⁻¹). Foi realizado análise de variância (ANOVA) para todas as espécies testadas, sendo observado diferenças significativas entre os resultados obtidos ($p < 0,05$).

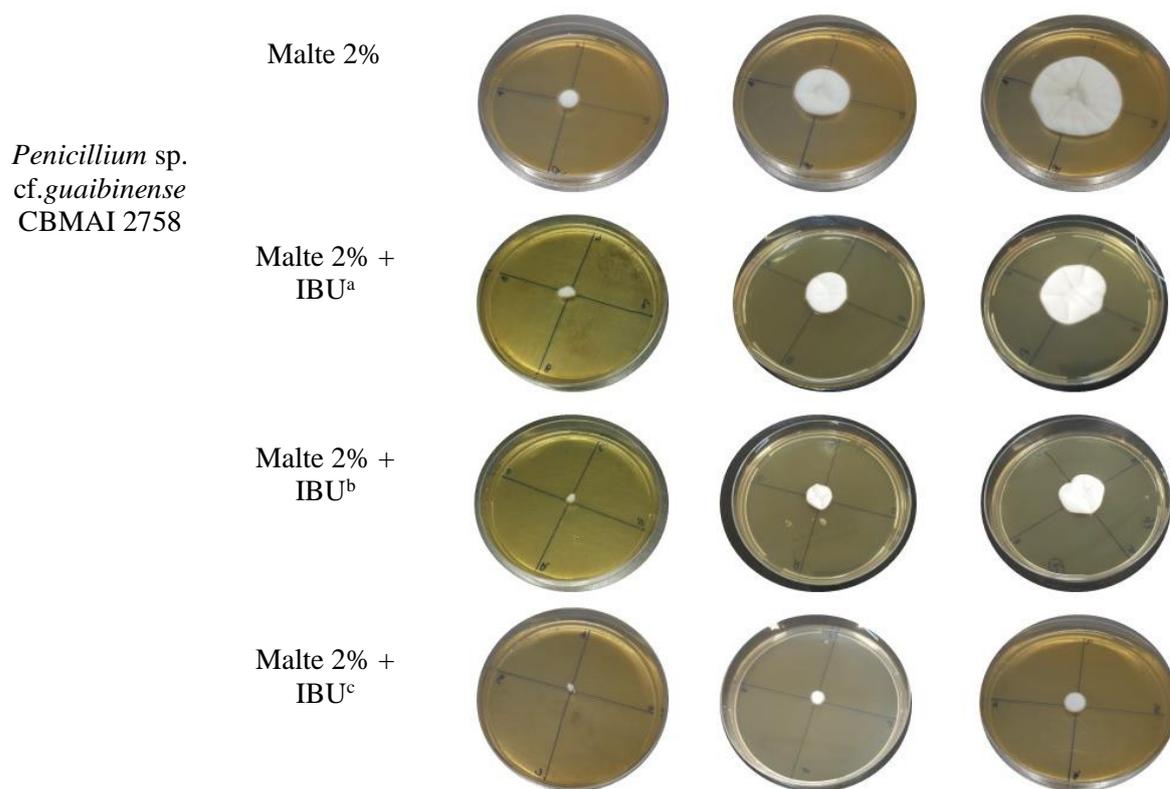
Figura 3: Estudo crescimento radial das cepas de fungos isolados do solo de mina de ferro em meio de cultura sólido com IBU. (Malte e Ágar 2%, pH 5, 30°, 7 dias)



Nos experimentos (Figura 3), a cepa *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 demonstrou crescimento semelhante ao grupo controle malte a 2%, ao atingir $7,65 \pm 0,03$ cm de diâmetro no quinto dia com a menor concentração de IBU, e atingiu 8,0 cm de diâmetro no sétimo dia, em todas as concentrações. O fungo *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758 foi o segundo que apresentou velocidade de crescimento semelhante em todas concentrações de IBU quando comparado ao controle, chegando o grupo controle a 4,6 cm de diâmetro e o grupo IBU com $3,3 \pm 0,1$ cm, no sétimo dia de avaliação.

Tabela 3: Crescimento micelial de cepas dos fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758

Cepa	Meio de Crescimento	Tempo (dias)		
		3	5	7
<i>Trichoderma</i> CBMAI 2752	Malte 2%			
	Malte 2% + IBU ^a			
	Malte 2% + IBU ^b			
	Malte 2% + IBU ^c			



^a Concentração 20 mg.L⁻¹; ^b Concentração 60 mg.L⁻¹; ^c Concentração 100 mg.L⁻¹

Os resultados obtidos propõem que os fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758 (Tabela 5), podem utilizar o próprio anti-inflamatório como fonte de carbono para a indução do seu crescimento micelial, sugerindo que esses microrganismos são fortes agentes em processos biotecnológicos de biorremediações.

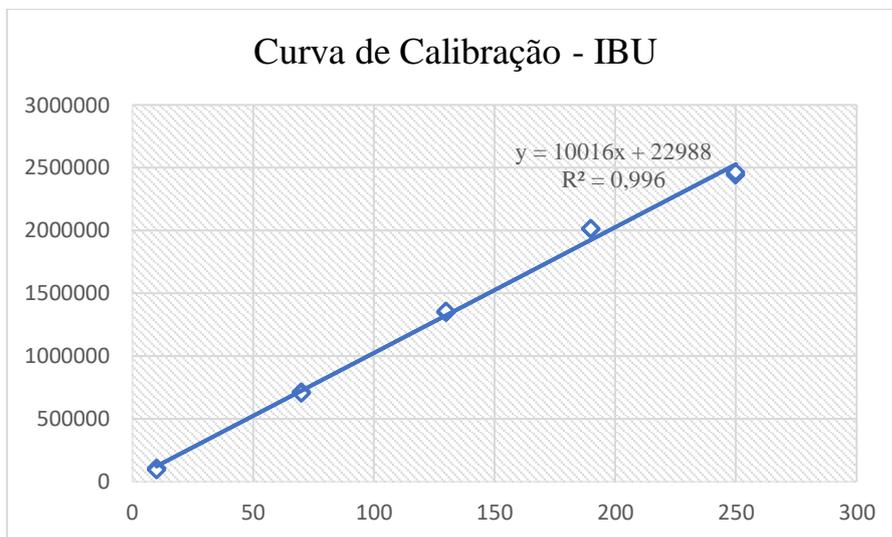
As cepas *Penicillium rolfsii* CBMAI 2753, *Talaromyces verruculosus* CBMAI 2754, *Aspegillus* sp. cf. *pseudoviridinutans* CBMAI 2755, *Purpureocillium lilacinum* CBMAI 2757, apresentaram diferenças significativas no diâmetro micelial na presença de IBU, quando comparado ao grupo controle Malte 2%, sugerindo que o anti-inflamatório interfere no crescimento desses microrganismos.

Para todos os fungos submetidos ao crescimento radial em meio sólido na presença do medicamento, foi observado o processo de conidiogênese, a diminuição da produção e retardo na produção dos esporos, porém todos os microrganismos apresentaram crescimento, pois as condições para esporulação são geralmente mais específicas do que aquelas para crescimento vegetativo (SEKIGUCHI & GAUCHER, 1977).

Método de Validação

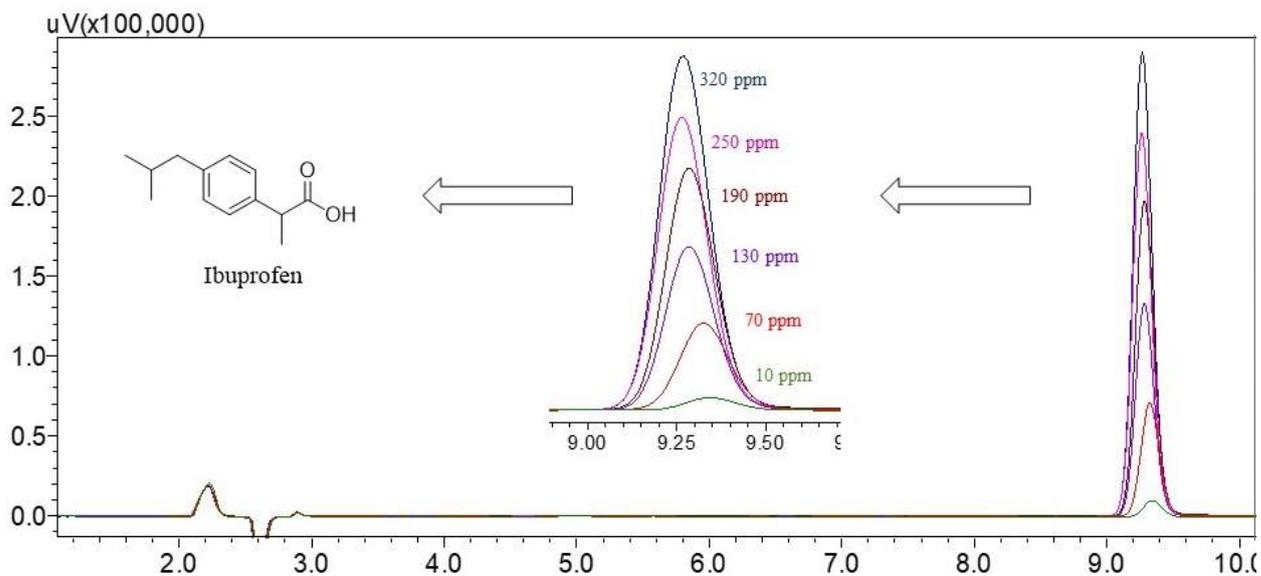
A relação das concentrações nominais e a área do pico de IBU no intervalo de de 10 a 320 ppm foi linear (Figura 4), sendo o coeficiente de regressão (R^2) de 0,996. A equação de regressão linear ponderada foi: $y = 10016x + 22988$, sendo todos os parâmetros de regressão, estatisticamente significativos (FILIST et al., 2016) .

Figura 4: Curva de Calibração do método obtida a partir da análise de regressão linear (n=3).



A figura 5 mostra os cromatogramas de HPLC-UV, identificando o IBU em seis diferentes pontos de concentrações, onde mostra uma linha de base estável, com picos simétricos com tempo de retenção em 9.3 min. O limite de quantificação foi de 10 ppm, referente a 1 ppm no meio de cultivo, e o limite de detecção foi de 3 ppm correspondendo a 0.3 ppm no meio de cultivo. Conforme as recomendações da ICH, os limites de detecção e quantificação foram calculados com base na relação sinal-ruído de 10:1 e 3:1, respectivamente (ICH, 2014).

Figura 5: Cromatograma da Curva de Calibração do padrão de IBU por HPLC-UV



Os resultados da exatidão e precisão são apresentados na tabela 6, no qual observa-se que a variabilidade de precisão foi mínima, variando entre 0,052% a 4,82%, apontando uma notável precisão, e a exatidão variou de 77% a 104,52% (Tabela 4), estando também dentro dos limites aceitáveis Solon (et al., 2010)

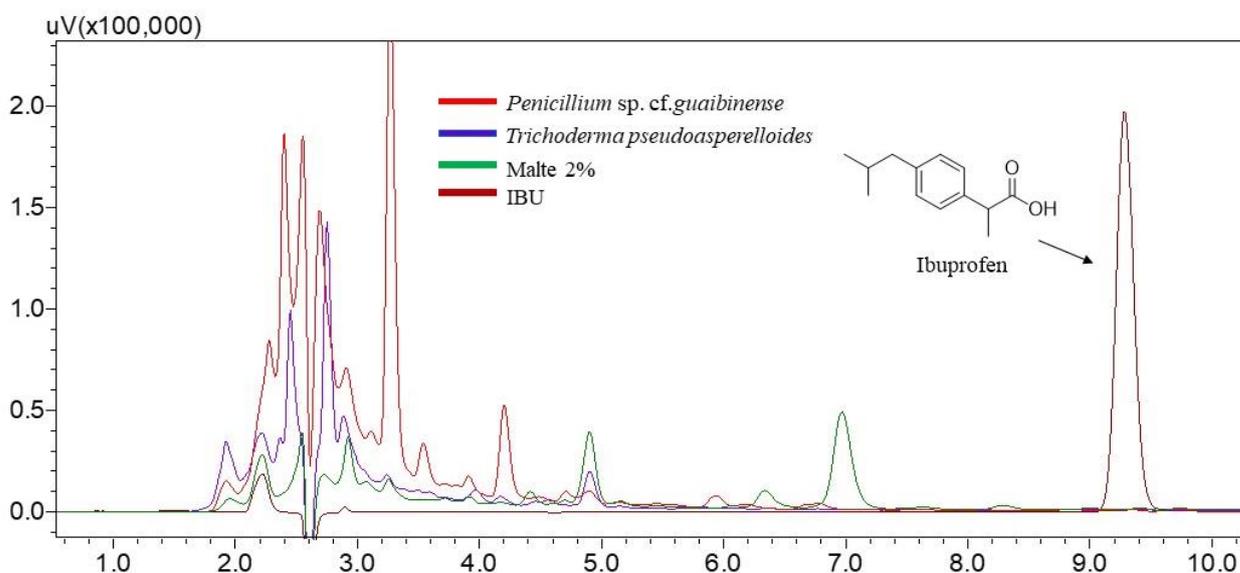
Tabela 4: Comparação de Parâmetros analíticos para análise de precisão/exatidão e concentrações de IBU.

Concentração nominal (ppm)	Concentração Detectada (ppm)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
10	7,7	4,82	77
70	68,4	0,39	97,7
130	132,5	0,32	101,9
190	198,6	0,052	104,52
250	242,6	0,43	97,04
310	294,6	0,35	95,03

ppm: mg.L⁻¹

O estudo da seletividade envolveu a comparação entre quatro cromatogramas referentes a amostras utilizadas para validação do método, no qual observa-se que não houve picos interferentes de co-eluição quando comparados com as amostras controle abiótico e células fúngicas (Figura 6). Portanto o método cromatográfico revelou ser seletivo para avaliar o composto de interesse (KOÇAK; ATÍLA, 2022).

Figura 6: Cromatograma HPLC-UV para amostras de IBU, Controle Células Fúngicas e Controle Malte 2%.



Por conseguinte, a fase móvel constituída de acetonitrila e ácido fórmico 0,1 % utilizada neste estudo oferece uma vantagem para a análise de um grande número de amostras. Além disso, os valores do desvio padrão das amostras demonstram a precisão do método desenvolvido. Portanto, o método proposto tem grande aplicabilidade na biodegradação de outros substratos de interesse.

Avaliação da biodegradação do ibuprofeno através do planejamento experimental

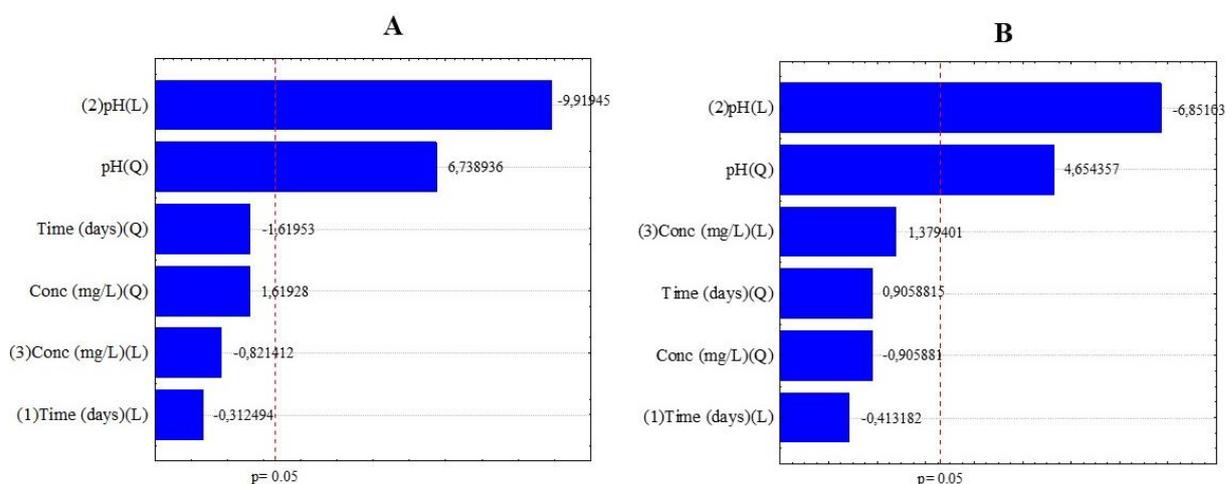
A avaliação da biodegradação do anti-inflamatório foi realizada com base no teor de IBU (BD%) que foi obtido a partir do ensaio de desenho experimental com os fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 (T1 à T15) e *Penicillium sp. cf. guaibinense* CBMAI 2758 (P1 à P15). Os valores das variáveis estão conforme a tabela 6. Foi realizado um gráfico de pareto de efeitos padronizados, conforme a figura 7 para os ensaios com o microrganismo *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 e *Penicillium sp. cf. guaibinense* CBMAI 2758, no qual expõe o efeito significativo da concentração de IBU (mg.L^{-1}), tempo das reações (dias) e pH das variáveis do meio de cultivo.

O comprimento da barra para cada parâmetro caracteriza a importância absoluta do efeito estimado. A linha vertical representa o limite entre efeitos significativos e insignificantes com risco de erro de 5%. No domínio experimental estudado, os efeitos foram significativos ($p < 0,05$) ao nível de confiança de 95%, conforme mostra a Figura 7 (HOLANDA et al., 2019).

De acordo com a figura 7, dois efeitos foram significativos estatisticamente com $p < 0,05$ para a biodegradação de IBU mediada pela espécie *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 e *Penicillium sp. cf.guaibinense* CBMAI 2758. Claramente a variável pH, representa um fator importante para melhorar a biodegradação de IBU, sendo os valores positivos gerados pelo gráfico de pareto (6,738936) e (4,654357) evidenciam que quanto menor o pH, maior será a porcentagem de biodegradação. Esses resultados podem ser observados no experimento T3, T4, T10, T12, P3, P4, P10 e P12, da matriz do planejamento experimental (Tabela 5), onde as reações com meio de cultivo pH 9, foram as que não alcançaram biodegradação total.

A composição do meio onde os microrganismos são cultivados, pH, temperatura, tempo e concentrações é essencial no acréscimo de processos biotecnológicos, ou seja, a produtividade da reação está diretamente relacionada a otimização do meio de cultura (RIGO et al., 2021). Estudos revelam condições ótimas de pH ácido para enzimas utilizadas na indústria alimentícia, cervejeira e de panificação, tais como a amiloglucosidases, lactase, sacarase, etc. isoladas de fungos filamentosos (RAVINDRAN et al., 2018).

Figura 7: Gráfico de Pareto de efeitos de teor de biodegradação IBU (%) por cepas dos fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 (A) e *Penicillium sp. cf.guaibinense* CBMAI 2758 (B).



A projeção de três gráficos de superfície de resposta na otimização dos resultados está na figura 8, onde pode-se observar o modelo quadrático correlacionado com os fatores tempo,

pH e concentração. Os gráficos de superfície de resposta determinam o cruzamento entre duas condições para analisar os impactos sobre a resposta do teor de biodegradação (SENA et al., 2022).

A biodegradação de IBU mediada pelo fungo *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752, observa-se em resposta a relação de tempo e pH do meio reacional (figura 8A), e tempo com concentração (figura 8B), que o fator tempo (3, 6 e 9 dias) não influencia significativamente na resposta, portanto para responder a essa hipótese seria necessário otimizar as reações, em um período inferior a 3 dias. Ao cruzar o pH do meio com a concentração é possível observar que a redução do pH (de 9 para 5), condiz as maiores porcentagens de biodegradação, e que houve total consumo de IBU em todas as concentrações (20, 60 e 100 mg.L⁻¹) (Figura 8C).

Figura 8: Gráfico de Superfície de resposta e conteúdo de biodegradação de IBU mediado pelo fungo *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752, em função de (A) tempo de reação (x1) e pH do meio de cultivo (x2); (B) tempo de reação (x1) e concentração de IBU (x3); (C) pH meio de cultivo (x2) e concentração de IBU (x3).

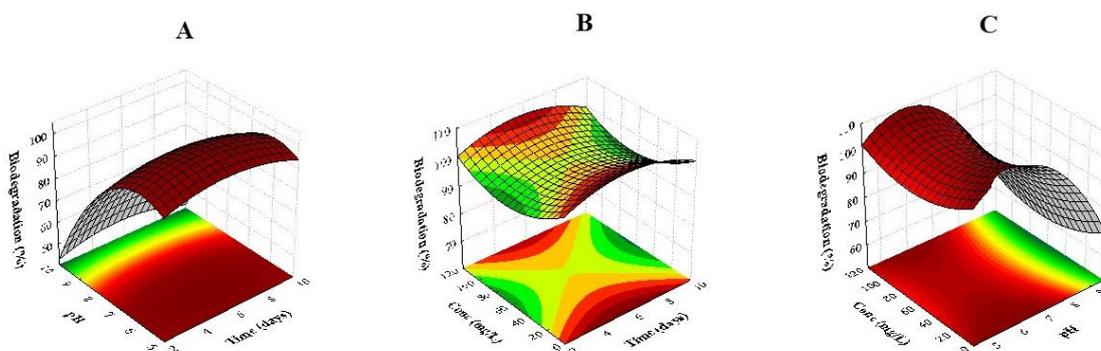
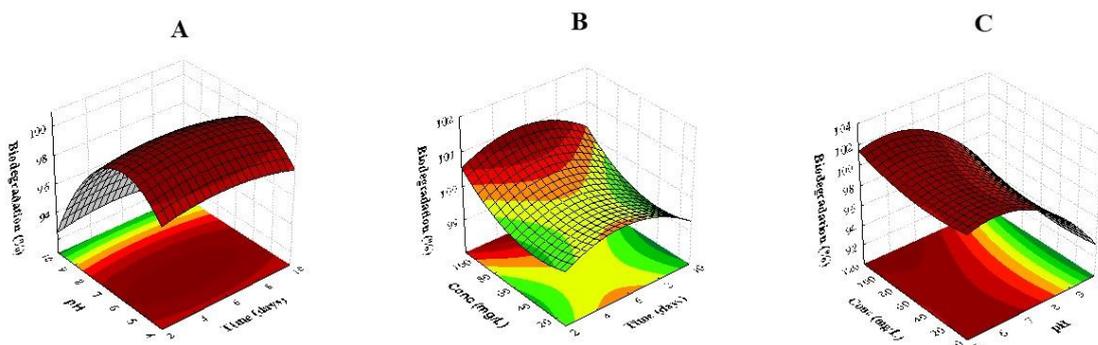


Figura 9: Gráfico de Superfície de resposta e conteúdo de biodegradação de IBU mediado pelo fungo *Penicillium sp. cf. guaibinense* CBMAI 2758, em função de (A) tempo de reação (x1) e

pH do meio de cultivo (x2); (B) tempo de reação (x1) e concentração de IBU (x3); (C) pH meio de cultivo (x2) e concentração de IBU (x3).



O gráfico de superfície, de resposta para biodegradação de IBU mediada pela cepa do fungo *Penicillium sp. cf. guaibinense* CBMAI 2758 é exposta na figura 9. Bem como no gráfico anterior o pH representa um fator importante na resposta do cruzamento de variáveis (Figura 9A e 9C). Na figura 9B, mostra que a concentração também é um fator decisivo para essa espécie, sendo que quanto maior a quantidade de IBU no meio reacional, melhor o percentual de biodegradação, entretanto essa variável não foi significativa (Figura 7).

Tabela 5: Matrix design experimental e respostas das variáveis fungos *Trichoderma pseudoasperelloides* CBMAI 2752 e *Penicillium sp. cf. guaibinense* CBMAI 2758.

Run	Uncoded and coded variables levels						Response (BD%)
	x1		x2		x3		
T1	3	-1	5	-1	60	0	>99%
T2	9	1	5	-1	60	0	>99%
T3	3	-1	9	1	60	0	67,3
T4	9	1	9	1	60	0	63,8
T5	3	-1	7	0	20	-1	>99%
T6	9	1	7	0	20	-1	>99%
T7	3	-1	7	0	100	1	>99%
T8	9	1	7	0	100	1	>99%
T9	6	0	5	-1	20	-1	>99%
T10	6	0	9	1	20	-1	83,5
T11	6	0	5	-1	100	1	>99%
T12	6	0	9	1	100	1	74,3
T13	6	0	7	0	60	0	>99%
T14	6	0	7	0	60	0	>99%
T15	6	0	7	0	60	0	>99%
P1	3	-1	5	-1	60	0	>99%

P2	9	1	5	-1	60	0	>99%
P3	3	-1	9	1	60	0	96
P4	9	1	9	1	60	0	95,1
P5	3	-1	7	0	20	-1	>99%
P6	9	1	7	0	20	-1	>99%
P7	3	-1	7	0	100	1	>99%
P8	9	1	7	0	100	1	>99%
P9	6	0	5	-1	20	-1	>99%
P10	6	0	9	1	20	-1	95,5
P11	6	0	5	-1	100	1	>99%
P12	6	0	9	1	100	1	98,5
P13	6	0	7	0	60	0	>99%
P14	6	0	7	0	60	0	>99%
P15	6	0	7	0	60	0	>99%

A biodegradação total de IBU foi obtida na maioria dos experimentos. Diversos estudos relataram a biodegradação eficiente de AINEs, tais como o IBU por microrganismos, sendo a maioria mediadas por bactérias (FERREIRA et al., 2023). Ivshina (et al., 2021) evidencia a degradação deste AINEs mediada pelas bactérias *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278, *R. cercidiphylli* IEGM 1184 e *R. erythropolis* IEGM 501, em 7 dias, com percentuais de 14,1%, 21,6% e 18,6% de remoção o IBU, respectivamente. Outras pesquisas relatam a remoção de 80% de IBU em 3 dias pela cepa de *Pseudoalteromonas* sp. (LI et al., 2022) e *Sphingopyxis granuli* RW412 (AGUILAR-ROMERO et al., 2021b). Estudos mais recentes elaborados por (CHOPRA; KUMAR, 2022) evidenciam a degradação de 50% de IBU pela bactéria *Bacillus siamensis* em apenas 18 horas.

A maioria das rotas metabólicas de degradação conhecidas fundamentam-se em bactérias, porém estudos vem descrevendo os fungos filamentosos como agentes decompositores de compostos aromáticos e fenólicos (SOARES et al., 2011).

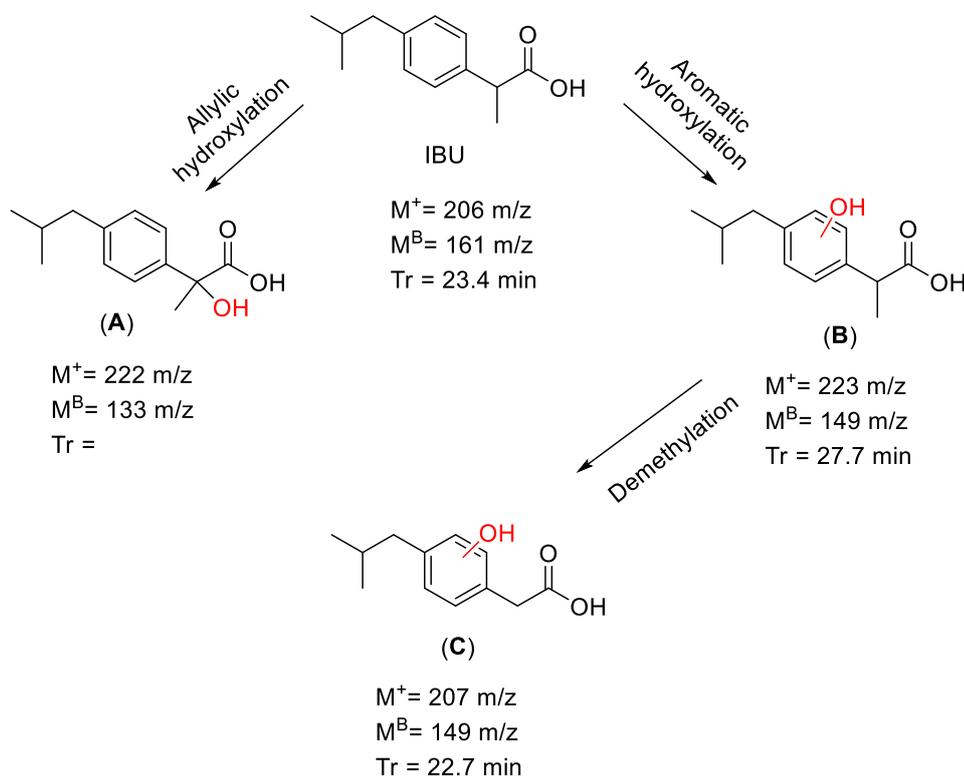
Identificação de IBU e seus metabólitos

Foi identificado o IBU e seus metabólitos, produzidos a partir da biodegradação mediada por fungos filamentosos de solo amazônico, para isso as amostras foram recolhidas para serem analisadas por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG-MS). O IBU foi detectado em 23.4 min, com íon molecular em 206 m/z, e pico base em 161 m/z, com 91%

de semelhança com a biblioteca de espectros NIST11 (Os espectros podem ser observados em informações suplementares).

O metabolito 2-hydroxy-2-(4-isobutylphenyl)propanoic acid (**A**) foi identificado com íon molecular em 222 m/z, e pico base de 133 m/z. O metabolito 2-(*R*-hydroxy-4-isobutylphenyl)propanoic acid (**B**) foi identificado na análise CG-MS, tanto nas amostras de biodegradação, mediadas por *Trichoderma pseudoasperelloides* quanto para *Penicillium sp. cf. guaibinense*, avaliado em um tempo de retenção de 27.7 min, com pico base em 149 m/z e íon molecular 223 m/z. O metabolito 2-(*R*-hydroxy-4-isobutylphenyl)acetic acid (**C**) foi determinada na amostra degradada por *Trichoderma pseudoasperelloides*, em 22.7 min, íon molecular 207 m/z e pico base 146 m/z (Figura 11).

Figura 10: Rota de Biodegradação de IBU por fungos de solos amazônicos



Foram propostas estruturas para cada metabolito com base nos valores m/z dos espectros e nos padrões de fragmentação. Foi reputado, a identificação de três possíveis estruturas químicas associadas a biodegradação de IBU, pelos fungos de solo em estudo (Figura 11), propondo uma metabolização pelos fungos por hidroxilação alílica para a estrutura (**A**), hidroxilação aromática para a estrutura (**B**), e desmetilação do metabolito (**C**) a partir do (**B**). Estudos anteriores identificaram 2-(2-hydroxy-4-isobutylphenyl) propanoic acid, e outras estruturas por estas vias de biodegradação propostas (LI et al., 2022; SALGADO et al., 2020).

A estruturas (C), até então não foi comunicada pela literatura, relacionada a processos de degradação de IBU.

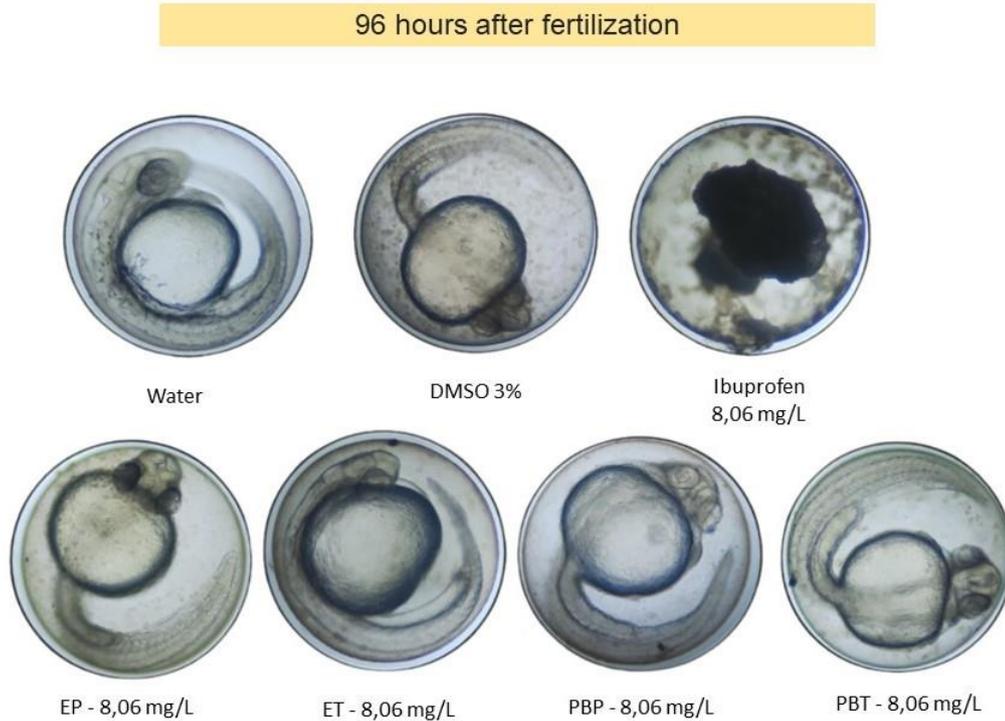
Análise toxicológica em embriões zebrafish

Foi utilizada uma única concentração de 8,06mg/L para todas as amostras diluídas em DMSO a 3%, ibuprofeno comercial, extrato fúngico *Penicillium sp. cf.guaibinense* (EP), extrato fúngico *Trichoderma pseudoasperelloides* (ET), produto da biodegradação do ibuprofeno utilizando o fungo *penicillium sp.* (PBP), produto da biodegradação do ibuprofeno utilizando o fungo *trichoderma sp.* (PBT) e para os grupos controles, os embriões foram incubados em água e DMSO (3%).

Para determinar a toxicidade foram levadas em consideração condições letais quanto às alterações teratogênicas, mortalidade, presença de coagulação, eclosão e ausência de separação da cauda e desenvolvimento de somitos. As quais foram realizadas através da análise em microscópio óptico nas seguintes horas: 24, 48, 72 e 96 horas pós fertilização (hpf) (OECD, 2013).

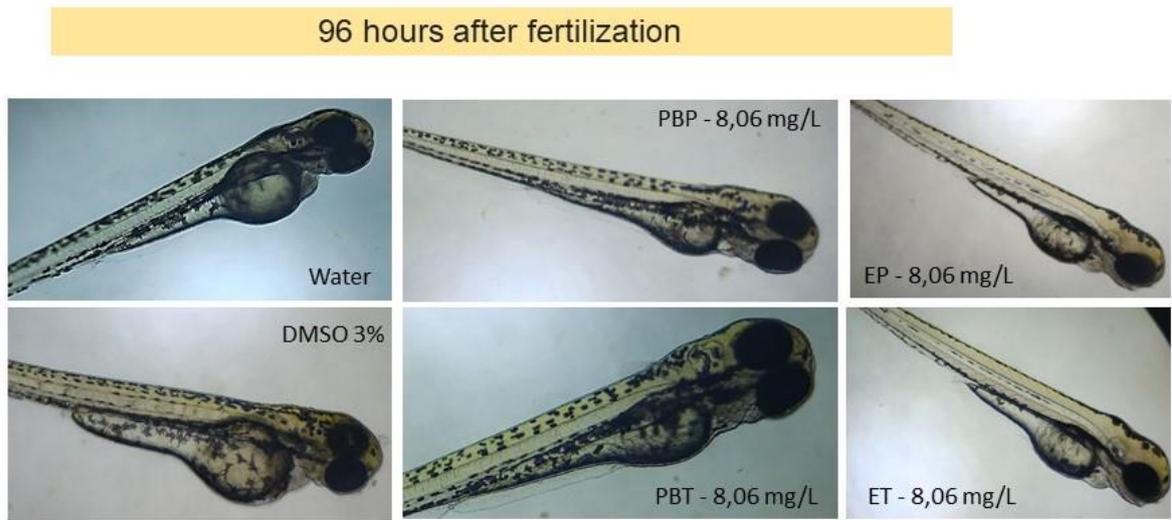
Evidência que no grupo tratado com o ibuprofeno comercial (Figura 11), não foi possível observar a formação do embrião considerando assim o composto tóxica concentração estudada (CHABCHOUBI et al., 2023b).

Figura 11: Morfologia dos embriões de zebrafish na concentração de 8,06mg/L das soluções em estudo pós 24 hpf em comparação com os grupos controles, água e DMSO 3%.



A maior anomalia deformativa encontrada ao examinar a morfologia dos embriões após exposição nas substâncias estudadas foi o edema pericárdico encontrado no grupo do extrato fúngico *Trichoderma pseudoasperelloides* (SCOPEL et al., 2021) (Figura 11).

Figura 12: Morfologia dos embriões de zebrafish na concentração de 8,06mg/L das soluções em estudo pós 96 hpf em comparação com os grupos controles, água e DMSO 3%.



Conclusão

Este foi o primeiro estudo que mostra a degradação do AINEs IBU por cepas fúngicas isoladas de solo amazônico enriquecido com metais pesados. Ambos os fungos *Penicillium sp. cf.guaibinense* e *Trichoderma pseudoasperelloides* apresentaram biodegradação superior a 99% em diversas condições reacionais. O planejamento experimental foi importante para a otimização das condições experimentais, reduzindo custos e tempo de reação. Por meio da análise estatística é possível concluir que o pH, foi um fator importante a ser discutido, sendo que as reações com pH ácido e neutro as que alcançaram os melhores percentuais de biodegradação.

O estudo de toxicidade evidência que os extratos obtidos após a biodegradação de ibuprofeno não são nocivos aos embriões de zebrafish na concentração estudada, quando comparado ao ibuprofeno comercial que foi considerado tóxico. Portanto a pesquisa revela o potencial biotecnológico dos fungos de solo amazônico, elucidando a importância no emprego destas cepas na biocatálise, fomentando o uso de metodologias verdes capazes de aperfeiçoar a biodegradação de outros MEOs.

Referências

- AGUILAR-ROMERO, I. et al. Effluent decontamination by the ibuprofen-mineralizing strain, *Sphingopyxis granuli* RW412: Metabolic processes. **Environmental Pollution**, v. 274, 1 abr. 2021.
- AJIBOLA, A. S. et al. Analysis, Occurrence and Ecological Risk Assessment of Diclofenac and Ibuprofen Residues in Wastewater from Three Wastewater Treatment Plants in South-Western Nigeria. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 25, n. 3, p. 330–340, 27 abr. 2021.
- ARIA, M.; CUCCURULLO, C. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. **Journal of Informetrics**, v. 11, n. 4, p. 959–975, nov. 2017.
- AUSTIN, T. et al. Ibuprofen exposure in Europe; ePiE as an alternative to costly environmental monitoring. **Environmental Research**, v. 209, 1 jun. 2022.
- AUSTIN, T. J. et al. The importance of over-the-counter-sales and product format in the environmental exposure assessment of active pharmaceutical ingredients. **Science of the Total Environment**, v. 752, 15 jan. 2021.
- BIROLLI, W. G. et al. Growth assessment of Marine-Derived fungi in the presence of esfenvalerate and its main metabolites. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 6, n. 5, p. 260–267, 2014.
- BIROLLI, W. G. et al. Biodegradation of the Pyrethroid Pesticide Esfenvalerate by Marine-Derived Fungi. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 511–520, 2016.
- CELESTINO, J. D. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.
- CHABCHOUBI, I. BEN et al. Short-term effects of various non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on *Danio rerio* embryos. **MethodsX**, v. 10, 1 jan. 2023.
- CHENG, S.-C. et al. First case of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) pneumonia in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 119, n. 3, p. 747–751, mar. 2020.
- CHOPRA, S.; KUMAR, D. Characterization and biodegradation of ibuprofen by *Bacillus siamensis* strain DSI-1 isolated from wastewater. **Rendiconti Lincei**, v. 33, n. 3, p. 643–652, 1 set. 2022.
- CONEJO-SAUCEDO, U. et al. toxics Evaluation of the Potential of Sewage Sludge Mycobiome to Degrade High Diclofenac and Bisphenol-A Concentrations. 2021.
- CORREA, L. O. et al. Amazonian soil fungi are efficient degraders of glyphosate herbicide; novel isolates of *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Trichoderma*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 2023.
- DE, L. et al. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 2009.

- DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A. Isolation of keratinophilic fungi from selected soils of Sanjay Gandhi National Park, Mumbai (India). **Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 4, p. 319–327, 2014.
- FERREIRA, A. M. et al. Anti-Melanogenic Potential of Natural and Synthetic Substances: Application in Zebrafish Model. **Molecules**. 2023.
- FERREIRA, A. M. et al. *Trichoderma asperellum* Extract Isolated from Brazil Nuts (*Bertholletia excelsa* BONPL): In Vivo and In Silico Studies on Melanogenesis in Zebrafish. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2023b.
- FERREIRA, I. M. et al. Chemoselective biohydrogenation of α,β - and $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated ketones by the marine-derived fungus *Penicillium citrinum* CBMAI 1186 in a biphasic system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 59–65, 2015.
- FIDELIS, M. Z. et al. Enhancing Ibuprofen and 4-Isobutylacetophenone degradation: Exploiting the potential of Nb₂O₅ sol-gel catalysts in photocatalysis, catalytic ozonation, and photocatalytic ozonation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 5, 1 out. 2023.
- FILIST, M. et al. Validated HPLC-UV method for determination of naproxen in human plasma with proven selectivity against ibuprofen and paracetamol. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 6, p. 953–961, 1 jun. 2016.
- GUTIÉRREZ-NOYA, V. M. et al. Ibuprofen at environmentally relevant concentrations alters embryonic development, induces teratogenesis and oxidative stress in *Cyprinus carpio*. **Science of the Total Environment**, v. 710, 25 mar. 2020.
- HASAN, M. et al. Biodegradation of salicylic acid, acetaminophen and ibuprofen by bacteria collected from a full-scale drinking water biofilter. **Journal of Environmental Management**, v. 295, 1 out. 2021.
- HOLANDA, F. H. E. et al. Study of biodegradation of chloramphenicol by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nuts). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, n. June, p. 101200, 2019.
- HU, B. et al. Employ of arbuscular mycorrhizal fungi for pharmaceuticals ibuprofen and diclofenac removal in mesocosm-scale constructed wetlands. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, 5 maio 2021.
- ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1) Retrieved from the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Disponível em: <www.somatek.com>.
- IVSHINA, I. B. et al. Response of *Rhodococcus cerastii* IEGM 1278 to toxic effects of ibuprofen. **PLoS ONE**, v. 16, n. 11 November, 1 nov. 2021.
- JAN-ROBLERO, J.; CRUZ-MAYA, J. A. Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. **Molecules**. 1 mar. 2023.

KOÇAK, Ö. F.; ATİLA, A. Determination of Ibuprofen in Pharmaceutical Preparations by UPLC-MS/MS Method. **Türk Doğa ve Fen Dergisi**, v. 11, n. 2, p. 58–63, 29 jun. 2022.

LI, Z. et al. Marine bacteria-mediated abiotic-biotic coupling degradation mechanism of ibuprofen. **Journal of Hazardous Materials**, v. 435, 5 ago. 2022.

LUCAS, F. M. F. et al. Perspective: Scientific gaps on forest fires in Brazilian protected areas. **Forest Ecology and Management**, v. 529, p. 120739, fev. 2023.

MAGAELA, B. N. et al. Photodegradation of ibuprofen using 5-10-15-20-tetrakis(4-bromophenyl) porphyrin conjugated to graphene quantum dots. **Optical Materials**, v. 134, 1 dez. 2022.

MARCHLEWICZ, A.; GUZIK, U.; WOJCIESZYŃSKA, D. Over-the-Counter Monocyclic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environment - Sources, Risks, Biodegradation. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 10, 1 out. 2015.

MARINHO, V. H. S. et al. Nanoparticles from silk fibroin and Amazon oils: Potential larvicidal activity and oviposition deterrence against *Aedes aegypti*. **Industrial Crops and Products**, v. 203, 1 nov. 2023.

MARKOV, P. V. et al. The evolution of SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 361–379, 5 jun. 2023.

MCINTYRE, M. et al. Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*. Advances in biochemical engineering. **Biotechnology**, 2001.

MELO, V. S. et al. Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon. **Soil Use and Management**, v. 28, n. 4, p. 530–535, dez. 2012.

Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.

MOTOV, S. et al. Comparison of Oral Ibuprofen at Three Single-Dose Regimens for Treating Acute Pain in the Emergency Department: A Randomized Controlled Trial. **Annals of Emergency Medicine**, v. 74, n. 4, p. 530–537, 1 out. 2019.

MURSHID, S.; DHAKSHINAMOORTHY, G. P. Biodegradation of Sodium Diclofenac and Mefenamic Acid: Kinetic studies, identification of metabolites and analysis of enzyme activity. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 144, 1 out. 2019.

OMOKHAGBOR ADAMS, G. et al. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28–39, 29 out. 2020.

R CORE TEAM, K. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, 2021.

RAJA, M.; PRAVEENA, G.; WILLIAM, S. J. Isolation and Identification of Fungi from Soil in Loyola College Campus, Chennai, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1789–1795, 2017.

- RAVINDRAN, R. et al. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, 1 dez. 2018.
- RIGO, D. et al. PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ENZIMAS: UMA REVISÃO/MICROBIOLOGICAL PRODUCTION OF ENZYMES: A REVIEW. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232–9254, 2021.
- SAEID, S. et al. Advanced oxidation process for the removal of ibuprofen from aqueous solution: A non-catalytic and catalytic ozonation study in a semi-batch reactor. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 230, p. 77–90, 15 ago. 2018.
- SALGADO, R. et al. Metabolite identification of ibuprofen biodegradation by *Patulibacter medicamentivorans* under aerobic conditions. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 41, n. 4, p. 450–465, 10 fev. 2020.
- SCOPEL, C. F. V. et al. Bpa toxicity during development of zebrafish embryo. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, p. 437–447, 1 jan. 2021.
- SENA, I. S. et al. *Euterpe oleracea* Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2022.
- SHOW, S. et al. Microbial remediation of ibuprofen contaminated water using novel isolate Microbacterium paraoxydans. **Chemical Papers**, v. 77, n. 1, p. 517–531, 1 jan. 2023.
- SILVA, J. R. P. DA; BORGES, C. P.; FONSECA, F. V. DA. A Critical Review of Criteria Used For the Selection of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Different Environmental Matrices. **Environmental Pollution and Protection**, v. 5, n. 1, 10 mar. 2020.
- SOARES, I. A. et al. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 341–350, jun. 2011.
- SOARES, P. R. S. et al. Biodegradation pathway of the organophosphate pesticides chlorpyrifos, methyl parathion and profenofos by the marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 and its potential for methylation reactions of phenolic compounds. **Marine Pollution Bulletin**, v. 166, n. July 2020, 2021.
- SOLON, L. G. DA S. et al. Comparative bioavailability of a generic and two compounded naproxen sodium suspensions administered to rats. **Journal of Bioanalysis and Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 48–54, mar. 2010.
- STACHOWIAK, M.; CEGŁOWSKI, M.; KURCZEWSKA, J. Hybrid chitosan/molecularly imprinted polymer hydrogel beads doped with iron for selective ibuprofen adsorption. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 251, 1 nov. 2023.
- UCELLA-FILHO, J. G. M. et al. Tannin-rich bark extract of plants as a source of antimicrobial bioactive compounds: A bibliometric analysis. **South African Journal of Botany**, v. 150, p. 1038–1050, nov. 2022.
- WILLIAMS, N. S.; RAY, M. B.; GOMAA, H. G. Removal of ibuprofen and 4-isobutylacetophenone by non-dispersive solvent extraction using a hollow fibre membrane contactor. **Separation and Purification Technology**, v. 88, p. 61–69, 22 mar. 2012.

ZHANG, K. et al. Ibuprofen and diclofenac impair the cardiovascular development of zebrafish (*Danio rerio*) at low concentrations. **Environmental Pollution**, v. 258, 1 mar. 2020.

Informações Suplementares

Figura S1: 2-(4-isobutylphenyl)propanoic acid

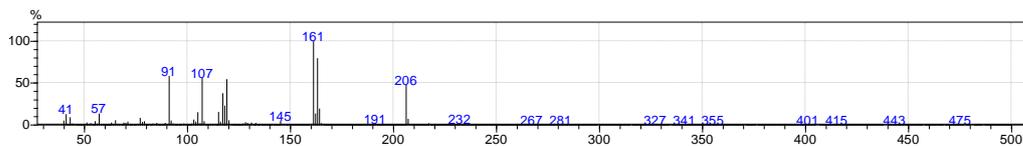


Figura S2: 2-(*R*-hydroxy-4-isobutylphenyl)propanoic acid

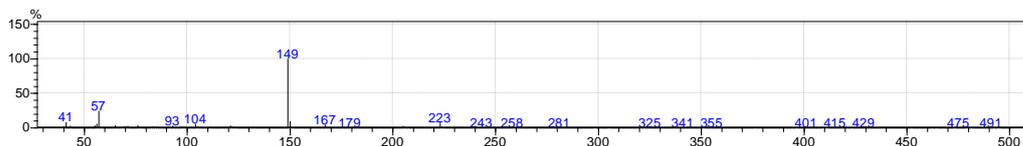


Figura S3: 2-(*R*-hydroxy-4-isobutylphenyl)acetic acid

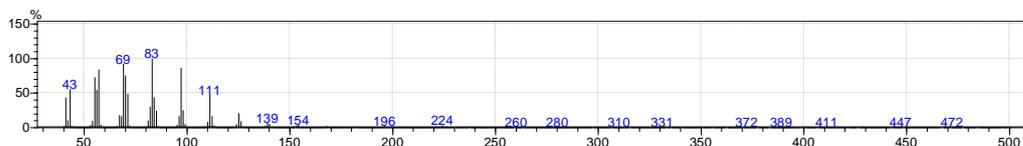


Tabela S1: Análise de Variância (ANOVA) do modelo *Trichoderma*

ANOVA; Var.: BD%; Adj:0,91182 (Spreadshhet1)

3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Run; MS Residual= 15,68062, DV:BD%

FATOR	SS	Df	MS	<i>F</i> -valor	<i>F</i> 0.05
X1 (L)	1,531	1	1,531	0,09765	0,762656
X2 (L)	1542,901	1	1542,901	98,39539	0,0000009
X3 (L)	10,580	1	10,580	0,67472	0,435205
X1 (Q)	41,128	1	41,128	2,62287	0,143993
X2 (Q)	712,108	1	712,108	45,41326	0,000147
X3 (Q)	41,128	1	41,128	2,62287	0,143993
Erro	125,445	8	15,681		
Total	2489,589	14			

R2 - 0,94961

SS: soma dos quadrados, Df: graus de liberdade, MS: média quadrada, R2: Coeficiente de determinação.

ANOVA; Var.: BD%; Adj.: 8265 (Spreadshhet1)

3 3-level factors, 1 Blocks, 15 Run; MS Residual= 0,59125, DV:BD%

Tabela S2: Análise de Variância (ANOVA) do modelo *Penicillium*

FATOR	SS	Df	MS	F-valor	F 0.05
X1 (L)	0,10125	1	0,10125	0,17125	0,689877
X2 (L)	27,75125	1	27,75125	46,93658	0,000131
X3 (L)	1,12500	1	1,12500	1,90275	0,205100
X1 (Q)	0,48519	1	0,48519	0,82062	0,391465
X2 (Q)	12,80827	1	12,80827	21,66303	0,001635
X3 (Q)	0,48519	1	0,48519	0,82062	0,391465
Erro	4,73000	8	0,59125		
Total	47,70933	14			

R2 - 0,90086

SS: soma dos quadrados, Df: graus de liberdade, MS: média quadrada, R2: Coeficiente de determinação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No presente estudo encontramos uma metodologia utilizando células inteiras dos fungos amazônicos *Penicillium sp. cf.guaibinense* e *Trichoderma pseudoasperelloides*, capazes de degradar o AINEs ibuprofeno em bons rendimentos (63,8 - >99%). Nos últimos anos as pesquisas relacionadas a degradação de AINEs têm crescido nas ciências farmacêuticas, visando a prospecção de fungos isolados de solo da floresta amazônica. Na referida pesquisa a biodegradação torna-se viável para a remoção de MEOs do meio ambiente, no caso, o IBU.

As perspectivas futuras centram-se primeiramente na adoção de um planejamento experimental com variáveis em menor tempo de reação e aumento de concentração do IBU, afim de achar a condição ótima de reação. Outra perspectiva centra-se na investigação da concentração letal (LC) de IBU e dos extratos biodegradados pelos fungos *Penicillium sp. cf.guaibinense* e *Trichoderma pseudoasperelloides*, para os ensaios de toxicidade em zebrafish. Dado o grande potencial de biodiversidade da região Norte, a promoção de pesquisas nesta escala deve ser incentivada para abordar micropoluentes emergentes, assim, estudar metabólitos de interesse e melhorar as tecnologias biocatalíticas no Brasil.

ANEXO 1 – Parecer do comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 03 de novembro de 2022, o parecer referente ao protocolo no. **019/2022** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**BIODEGRADAÇÃO DE PARACETAMOL E IBUPROFENO MEDIADOS POR FUNGOS DO SOLO ISOLADOS DO SOLO DE MINA DE FERRO**" coordenado por **Beatriz Lacerda Ferreira**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting on 03 November 2022, the final decision about the Protocol **019/2022** and certify that the research project entitled "**BIODEGRADAÇÃO DE PARACETAMOL E IBUPROFENO MEDIADOS POR FUNGOS DO SOLO ISOLADOS DO SOLO DE MINA DE FERRO**" coordinated by **Beatriz Lacerda Ferreira**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 03 de novembro de 2022

Documento assinado digitalmente
 JOSE CARLOS TAVARES CARVALHO
Data: 03/11/2022 14:53:00-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juscelino Juscelino Kubitscheck, km 02 – Campus Marco Zero,
Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (96)4009-2907

ANEXO 2 – Normas de publicação dos respectivos periódicos

Normas da revista Frontiers (Artigo 1)



Article Title

First Author¹, Second Author^{2*}, Third Author^{1,2}

¹Laboratory X, Institute X, Department X, Organization X, City X, State XX (only USA, Canada and Australia), Country

²Laboratory X, Institute X, Department X, Organization X, City X, State XX (only USA, Canada and Australia), Country

*** Correspondence:**

Corresponding Author
email@uni.edu

Keywords: keyword₁, keyword₂, keyword₃, keyword₄, keyword₅. (Min.5-Max. 8)

Abstract

For full guidelines please refer to [Author Guidelines](#)

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. References should not be cited in the abstract. Leave the Abstract empty if your article does not require one – please see the “Article types” on every Frontiers journal page for full details.

1 Introduction

For **Original Research Articles**, **Clinical Trial Articles**, and **Technology Reports** the introduction should be succinct, with no subheadings. For **Case Reports** the Introduction should include symptoms at presentation, physical exams and lab results.

2 Article types

For requirements for a specific article type please refer to the Article Types on any Frontiers journal page. Please also refer to [Author Guidelines for further information on how to organize your manuscript in the required sections or their equivalents for your field¹](#).

¹ For Original Research articles, please note that the Material and Methods section can be placed in any of the following ways: before Results, before Discussion or after Discussion.

3 Manuscript Formatting

4 Headings

You may insert up to 5 heading levels into your manuscript as can be seen in “Styles” tab of this template. These formatting styles are meant as a guide, as long as the heading levels are clear, Frontiers style will be applied during typesetting.

5 Equations

The equations should be inserted in editable format from the equation editor.

$$f(x) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{n\pi x}{L} + b_n \sin \frac{n\pi x}{L} \right)$$

6 Figures

Frontiers requires figures to be submitted individually, in the same order as they are referred to in the manuscript. Figures will then be automatically embedded at the bottom of the submitted manuscript. Kindly ensure that each table and figure is mentioned in the text and in numerical order. Figures must be of sufficient resolution for publication. Figures which are not according to the guidelines will cause substantial delay during the production process. Figure legends should be placed at the end of the manuscript. Please see [here](#) for full Figure guidelines

7 Permission to reuse and Copyright

Permission must be obtained for use of copyrighted material from other sources (including the web). Please note that it is compulsory to follow figure instructions.

8 Tables

Tables should be inserted at the end of the manuscript. Tables must be provided in an editable format e.g., Word, Excel. Tables provided as jpeg/tiff files will **not be accepted**. Please note that very large tables (covering several pages) cannot be included in the final PDF for reasons of space. **These tables will be published as Supplementary Material on the online article page at the time of acceptance. The author will be notified during the typesetting of the final article if this is the case.**

9 Nomenclature

10 Resource Identification Initiative

To take part in the Resource Identification Initiative, please use the corresponding catalog number and RRID in your current manuscript. For more information about the project and for steps on how to search for an RRID, please click [here](#).

11 Life Science Identifiers

Life Science Identifiers (LSIDs) for ZOOBANK registered names or nomenclatural acts should be listed in the manuscript before the keywords with the following format:

urn:lsid:<Authority>:<Namespace>:<ObjectID>[:<Version>]

12 Additional Requirements

For additional requirements for specific article types and further information please refer to “Article types” on every Frontiers journal page.

14 Conflict of Interest

All financial, commercial or other relationships that might be perceived by the academic community as representing a potential conflict of interest must be disclosed. If no such relationship exists, authors will be asked to confirm the following statement:

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

15 Author Contributions

The Author Contributions section is mandatory for all articles, including articles by sole authors. If an appropriate statement is not provided on submission, a standard one will be inserted during the production process. The Author Contributions statement must describe the contributions of individual authors referred to by their initials and, in doing so, all authors agree to be accountable for the content of the work. Please see [here](#) for full authorship criteria.

16 Funding

Details of all funding sources should be provided, including grant numbers if applicable. Please ensure to add all necessary funding information, as after publication this is no longer possible.

17 Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors.

18 Reference styles

The following formatting styles are meant as a guide, as long as the full citation is complete and clear, Frontiers referencing style will be applied during typesetting.

19 Science, Engineering and Humanities and Social Sciences references

For articles submitted in the domains of Science, Engineering or Humanities and Social Sciences please apply Author-Year system for in-text citations. For Humanities and Social Sciences articles please include page numbers in the in-text citations

For some examples please click [here](#).

For more examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to the [Chicago Manual of Style](#).

20 Health, Physics and Mathematics references

For articles submitted in the domain of Health or the journals *Frontiers in Physics* and *Frontiers in Applied Mathematics and Statistics* please apply the Vancouver system for in-text citations.

In-text citations should be numbered consecutively in order of appearance in the text – identified by Arabic numerals in the parenthesis [square parenthesis for Physics and Mathematics].

For some examples please click [here](#).

For more examples of citing other documents and general questions regarding reference style, please refer to [Citing Medicine](#).

21 Supplementary Material

Supplementary Material should be uploaded separately on submission, if there are Supplementary Figures, please include the caption in the same file as the figure. Supplementary Material templates can be found in the Frontiers Word Templates file.

Please see the [Supplementary Material section of the Author guidelines](#) for details on the different file types accepted.

22 Data Availability Statement

The datasets [GENERATED/ANALYZED] for this study can be found in the [NAME OF REPOSITORY] [LINK]. Please see the “Availability of data” section of [Materials and data policies in the Author guidelines](#) for more details.