

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ALINE CRISTINE HERMANN BONATO

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E
TRIMETOPRIMA POR ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E FOTÓLISE**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2018**

ALINE CRISTINE HERMANN BONATO

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA
POR ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E FOTÓLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Curitiba, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Controle e Monitoramento Ambiental.

Orientadora: Prof. Dr^a Giselle Maria Maciel
Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz

CURITIBA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B699a Bonato, Aline Cristine Hermann
2018 Avaliação da degradação de sulfametoxazol e trimetoprima
por enzimas ligninolíticas e fotólise / Aline Cristine
Hermann Bonato.-- 2018.
93 f.: il.; 30 cm.

Disponível também via World Wide Web
Texto em português com resumo em inglês
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia
Ambiental, Curitiba, 2018
Bibliografia: p. 79-90.

1. Antibióticos. 2. Contaminantes emergentes na água.
3. Lacase. 4. Oxidação. 5. Biorremediação. 6. Lignina. 7.
Monitoramento ambiental. 8. Tecnologia ambiental -
Dissertações. I. Maciel, Giselle Maria, orient. II. Liz, Marcus
Vinícius de, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal
do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecária Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 100

A Dissertação de Mestrado intitulada AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA POR ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS E FOTÓLISE, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Aline Cristine Hermann Bonato**, no dia 28 de março de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias E Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). Giselle Maria Maciel - Presidente - UTFPR

Prof(a). Dr(a). Lutécia Hiera da Cruz – UNESPAR

Prof(a). Dr(a). Marlene Soares – UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 28 de março de 2018.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder graça para cumprir esta etapa, força para superar as dificuldades diárias e por colocar em minha vida pessoas especiais que tornaram esta jornada mais agradável.

Ao Gustavo, pelo exemplo de amor e incentivo na superação dos meus limites. Obrigada pelo companherismo, paciência, auxílio, por providenciar meus inúmeros “cafezinhos” e por compreender minha ausência ao longo desta jornada.

A toda a minha amada família (aos Hermann e aos Bonato), pela apoio e compreensão nos momentos de ausência. Agradeço em especial aos meus pais Elisa e Luiz, pelo amor incondicional e incentivo. Dedico mais esta conquista a vocês.

Aos meus queridos professores Dr^a Giselle Maria Maciel e Dr Marcus Vinicius de Liz, agradeço a disponibilidade, os valiosos ensinamentos transmitidos e pela companhia. Sem vocês este projeto não seria possível.

A banca avaliadora, por dispor de tempo para avaliar o trabalho e pelas valiosas sugestões.

A Aline Bisinella, pela amizade sincera e bom humor. Obrigada pela disposição em me auxiliar nos horários e dias mais absurdos, pelas conversas e por sempre fornecer minha alimentação!

Às colegas Ana Stafussa, Dayane, Jéssica Matei, Maria Paula, Anna Lou e aos demais alunos do laboratório de Biotecnologia, pela troca de conhecimento e momentos de descontração.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), que contribuíram para minha formação.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) por disponibilizar os recursos e permitir o uso das dependências para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma formam contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

RESUMO

BONATO, Aline Cristine Hermann. **Avaliação da degradação de sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas ligninolíticas e fotólise**. 93 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

A frequente detecção do sulfametoxazol (SMX) e da trimetoprima (TMP) no esgoto, rios e águas de abastecimento tem causado preocupação devido aos efeitos ecotoxicológicos e o risco pontencial da indução de genes resistentes a estes antibacterianos. Técnicas envolvendo a degradação por Processos Avançados de Oxidação (AOPs) e biodegradação, utilizando fungos e suas enzimas, têm sido estudadas. Este trabalho avaliou o potencial do tratamento de SMX e TMP utilizando o tratamento enzimático (oxidação biológica) e a fotólise (oxidação química), em processos unitários e combinados. O trabalho foi dividido em três etapas, na primeira foi realizada a produção e otimização das enzimas ligninolíticas, as produções máximas obtidas foram de 0,94 U L⁻¹ de lignina peroxidase pelo fungo *Inonotus splitgerberi*, 4599 U L⁻¹ e 38 U L⁻¹ de lacase e manganês peroxidase, respectivamente, pelo fungo *Trametes* sp. Na segunda etapa, foram realizados os ensaios de degradação, a oxidação biológica dos fármacos foi avaliada utilizando lacase comercial e o extrato bruto contendo lacases (produzido por *Trametes* sp.), as degradações foram testadas na presença dos mediadores 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzothiazoline sulfonato(6)] diammonium (ABTS) e 1-hidróxi-benzotriazole (HBT). Os melhores resultados de degradação biológica foram obtidos após 24 horas de reação, a 37°C, 110 rpm, pela ação da lacase do extrato bruto de *Trametes* sp., atingindo remoção de 27,51% de TMP, na ausência de mediadores, e 96% de SMX na presença de ABTS. Para o tratamento com fotólise, utilizando reator com lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão (28 W), a degradação máxima de SMX foi de 98% em 50 minutos e para TMP de 63% em 60 minutos. Os resultados de degradação obtidos pelos processos combinados, de acordo com testes estatísticos, não apresentaram diferença significativa aos obtidos durante a fotólise. A terceira etapa do projeto avaliou a inibição de *E. coli* nas amostras submetidas a fotólise e ao tratamento combinado, e foi possível identificar que as enzimas atenuaram a toxicidade dos tratados. Em função dos resultados, pode-se considerar viável a aplicação do extrato bruto enzimático contendo lacase, sem etapas de separação ou purificação para a degradação de SMX e TMP, bem como a aplicação da fotólise direta. Em relação a associação dos tratamentos pode-se sugerir que apesar de provocarem incremento nas taxas de remoção foram responsáveis por atenuar a toxicidade.

Palavras-chave: Antibióticos. Contaminantes emergentes. Lacase. Lignina peroxidase. Tratamento Combinado. Processos Avançados de Oxidação

ABSTRACT

BONATO, Aline Cristine Hermann. **Evaluation of the Degradation of Sulfamethoxazole and Trimethoprim by Ligninolytic Enzymes and Photolysis.** 93 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

The frequent detection of sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) in sewage, rivers and water supply has caused concern due to the ecotoxicological effects and the potential risk of induction of genes resistant to these antibacterials. Techniques involving the degradation by Advanced Oxidation Processes (AOPs) and biodegradation, using fungi and their enzymes, have been studied. This work evaluated the potential of SMX and TMP treatment using enzymatic treatment (biological oxidation) and photolysis (chemical oxidation) in single and combined processes. Ligninolytic enzymes were produced and optimized. The maximum yields obtained were 0.94 U L⁻¹ of lignin peroxidase by the fungus *Inonotus splitgerberi*, 4599 U L⁻¹ and 38 U L⁻¹ of laccase and manganese peroxidase, respectively, by the fungus *Trametes* sp. In the second step, the degradation assays were performed, the biological oxidation of the drugs was evaluated using commercial laccase and the crude extract containing laccases (produced by *Trametes* sp.), The degradations were tested in the presence of the 2,2'-azino- di- [3-ethylbenzothiazoline sulfonate (6)] diammonium (ABTS) and 1-hydroxybenzotriazole (HBT). The best biological degradation results were obtained after 24 hours of reaction, at 37°C, 110 rpm, by the action of the laccase of the crude extract of *Trametes* sp., Reaching 27,51% removal of TMP, in the absence of mediators, and 96% of SMX in the presence of ABTS. For photolysis treatment using a low pressure mercury vapor lamp reactor (28 W), the maximum degradation of SMX was 98% in 50 minutes and for TMP of 63% in 60 minutes. The degradation results obtained by the combined processes, according to statistical tests, did not present a significant difference to those obtained during photolysis. The third stage of the project evaluated the inhibition of *E. coli* in the samples submitted to photolysis and the combined treatment, and it was possible to identify that the enzymes attenuated the toxicity of the treated. Due to the results, the application of laccase-containing enzymatic crude extract, without separation or purification stages for the degradation of SMX and TMP, as well as the application of direct photolysis, may be considered viable. Regarding the association of treatments, it can be suggested that, despite increasing the removal rates, they were responsible for attenuating toxicity.

Palavras-chave: Antibiotics. Emerging pollutants. Laccase. Lignin peroxidase. Combined Treatment. Advanced Oxidation Processes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Métodos para tratamento de efluentes.....	24
Figura 2. Fungos da podridão branca classificados quanto à habilidade de produção de enzimas ligninolíticas	30
Figura 3. Mecanismo de catálise da lacase.....	31
Figura 4. Etapas envolvidas para realização da pesquisa	37
Figura 5. Reator UV	48
Figura 6. Diagrama de Pareto. Significância das variáveis do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} para a produção de lacase por <i>Trametes</i> sp.	50
Figura 7. Diagrama de Pareto. Significância das variáveis do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} para a produção de MnP por <i>Trametes</i> sp.	54
Figura 8. Diagrama de Pareto. Significância das variáveis do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} para a produção de LiP por <i>Trametes</i> sp.	54
Figura 9. Cinética de produção de lacase por <i>Trametes</i> sp. nas melhores condições de produção: 10 g L ⁻¹ C ₆ H ₁₂ O ₆ , 3 g L ⁻¹ , KH ₂ PO ₄ , 5 g L ⁻¹ peptona de carne, 1 mM de MnSO ₄ , 1 mM de CuSO ₄ , 5 g L ⁻¹ <i>Vitis labrusca</i> e 10 g L ⁻¹ casca de arroz	55
Figura 10. Cinética de MnP produzida por <i>Trametes</i> sp. nas melhores condições de produção: 10 g L ⁻¹ C ₆ H ₁₂ O ₆ , 3 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 5 g L ⁻¹ peptona de carne, 1 mM de MnSO ₄ , 1 mM de CuSO ₄ , 5 g L ⁻¹ <i>Vitis labrusca</i> e 10 g L ⁻¹ casca de arroz.....	56
Figura 11. Cinética de glicose consumida e produção de proteínas por <i>Trametes</i> sp. nas melhores condições de produção: 10 g L ⁻¹ C ₆ H ₁₂ O ₆ , 3 g L ⁻¹ , KH ₂ PO ₄ , 5 g L ⁻¹ peptona de carne, 1 mM de MnSO ₄ , 1 mM de CuSO ₄ , 5 g L ⁻¹ <i>Vitis labrusca</i> e 10 g L ⁻¹ casca de arroz.....	57
Figura 12. Cinética de compostos fenólicos versus produção de lacase por <i>Trametes</i> sp. nas melhores condições de produção: 10 g L ⁻¹ C ₆ H ₁₂ O ₆ , 3 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 5 g L ⁻¹ peptona de carne, 1 mM de MnSO ₄ , 1 mM de CuSO ₄ , 5 g L ⁻¹ <i>Vitis labrusca</i> e 10 g L ⁻¹ casca de arroz.....	58

Figura 13. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos padronizados. Efeito das variáveis na composição do meio para a produção de LiP por <i>Inonotus splitgerberi</i> . (■) variáveis significativas e (●) variáveis não significativas.	59
Figura 14. Otimização da produção de LiP por <i>Inonotus splitgerberi</i>	62
Figura 15. Evolução da atividade enzimática de LiP, lacase, MnP em relação ao tempo de cultivo de <i>Inonotus splitgerberi</i> . (■) atividade de lacase (U L ⁻¹) (▲) atividade de MnP (U L ⁻¹) e (●) atividade de LiP (U L ⁻¹). Condições otimizadas de produção: 5 g L ⁻¹ C ₆ H ₁₂ O ₆ , 1% peptona de carne, 0,1 mM de álcool veratílico, 0,38 mM de CuSO ₄ , 1% de bagaço de uva <i>Vitis labrusca</i> e 0,18% de casca de arroz	63
Figura 16. Cinética de glicose consumida e produção de proteínas por <i>Inonotus splitgerberi</i> em condições otimizadas para produção de LiP: 5 g L ⁻¹ C ₆ H ₁₂ O ₆ , 1% de peptona de carne, 0,1 mM de álcool veratílico, 0,38 mM de CuSO ₄ , 1% de bagaço de uva <i>Vitis labrusca</i> e 0,18% de casca de arroz.....	64
Figura 17. Cinética de compostos fenólicos versus produção de proteínas por <i>Inonotus splitgerberi</i> . em condições otimizadas para produção de LiP: 5 g L ⁻¹ C ₆ H ₁₂ O ₆ , 1% peptona de carne, 0,1 mM de álcool veratílico, 0,38 mM de CuSO ₄ , 1% de bagaço de uva <i>Vitis labrusca</i> e 0,18% de casca de arroz.....	65
Figura 18. Residual de trimetoprima após 24 horas de degradação enzimática utilizando 50 unidades de lacase (extrato ou comercial), na ausência/presença de mediadores (peróxido de hidrogênio=25 mg L ⁻¹ , HBT=1 mM, ABTS=1 mM). Condições de degradação: 37°C e 110 rpm	66
Figura 19. Residual de sulfametoxazol após 24 horas de degradação enzimática utilizando 50 unidades de lacase (extrato ou comercial), na ausência/presença de mediadores (peróxido de hidrogênio=25 mg L ⁻¹ , HBT=1 mM, ABTS=1 mM). Condições de degradação: 37°C e 110 rpm	69
Figura 20. Cromatograma de degradação de 95,91% de SMX após 24 horas de tratamento do fármaco com 50 unidades de lacase (extrato) e ABTS (1 mM). Condições de degradação: 37°C e 110 rpm.....	70
Figura 21. Oxidação química de SMX e TMP através fotólise direta em reator com lâmpada de vapor de mercúrio debaixo pressão (28 W)	71
Figura 22. Metabólitos gerados durante a fotólise direta de TMP em reator com lâmpada de vapor de mercúrio debaixo pressão (28 W)	72
Figura 23. Compostos majoritários na degradação de TMP por fotólise	72

Figura 24. Via de reação proposta por fotólise para SMX. As setas sólidas representam as rotas principais, e as setas pontilhadas representam as rotas secundárias	74
Figura 25. Comparação entre o residual obtido ao final da fotólise e o tratamento combinado de TMP - tratamento enzimático por 24 h do residual obtidos nos tempos 1-60 minutos de fotólise	75
Figura 26. Comparação entre o residual obtido ao final da fotólise e o tratamento combinado de SMX - tratamento enzimático por 24 h do residual obtidos nos tempos 1-60 minutos de fotólise	75
Figura 27. Comparação entre o residual obtido ao final da fotólise e o tratamento combinado de TMP - tratamento enzimático por 24 h do residual obtidos nos tempos 1-60 minutos de fotólise	76
Figura 28. Curva analítica para determinação de açúcares redutores	91
Figura 29. Curva analítica de compostos fenólicos	91
Figura 30. Curva analítica para proteínas totais	92
Figura 31. Curvas analíticas e perfil cromatográfico para os fármacos SMX (A e B) e TMP (C e D).	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Compostos emergentes nos produtos de uso pessoal e industrial	17
Quadro 2. Características químicas dos compostos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP)	22
Quadro 3. Classificação dos Processos Avançados de Oxidação	26
Quadro 4. Pesquisas envolvendo a biodegradação de substâncias farmacêuticas utilizando fungos da podridão branca.....	30
Quadro 5. Bactérias sensíveis à ação de sulfametoxazol + trimetoprima	36
Quadro 6. Condições cromatográficas para análise de TMP e SMX	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de alguns contaminantes emergentes encontrados no Brasil em ambientes aquáticos	18
Tabela 2. Concentrações de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) encontrados em efluentes e afluentes de estações de tratamento de esgoto, em águas superficiais e subterrâneas	23
Tabela 3. Remoção de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) em estações de tratamento em diversos países	25
Tabela 4. Planejamento fatorial fracionário (2^{7-4}) para selecionar as variáveis significativas para a produção de lacase por <i>Trametes</i> sp.....	39
Tabela 5. Planejamento fatorial para a produção de enzimas ligninolíticas por <i>Inonotus splitgerberi</i>	40
Tabela 6. Níveis das variáveis estudadas para otimização da produção de LiP no delineamento experimental Box-Behnken, com 3^3 , e 3 pontos centrais.....	41
Tabela 7. Degradação de SMX e TMP nas concentrações de 50 e 100 mg L ⁻¹ , na presença/ausência de HBT, ABTS e peróxido de hidrogênio	47
Tabela 8. Produção de lacase, MnP e LiP por <i>Trametes</i> sp. através do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} . Os melhores resultados de produção de Lacase e MnP estão destacados	49
Tabela 9. Análise de variância da atividade de lacase em função das variáveis analisadas	50
Tabela 10. Resultados do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} para a produção para produção de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase por <i>Inonotus splitgerberi</i>	59
Tabela 11. Análise de variância da atividade de LiP por <i>Inonotus splitgerberi</i> em função das variáveis analisadas	60
Tabela 12. Delineamento experimental Box-Behnken para avaliação das variáveis significativas para a produção de lignina peroxidase pelo fungo <i>Inonotus splitgerberi</i>	61
Tabela 13. Análise de variância da atividade enzimática em função das variáveis analisadas	62

Tabela 14. Inibição do crescimento de *E. coli* ATCC 25922 quando exposta ao efluente tratado por fotólise e tratamento combinado77

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AOPs	Processos Avançados de Oxidação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AEM	Ágar extrato de malte
°C	Graus celsius
CIM	Concentração mínima inibitória
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CuSO ₄	Sulfato de cobre
DAD	Detector arranjo de diodo
E.C.	<i>Enzyme Commission</i>
ETE	Estações de tratamento de efluente
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HBT	1-hidróxi-benzotriazole
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
LiP	Lignina peroxidase
MnP	Manganês peroxidase
Mm	Milimolar
PH	Potencial hidrogeniônico
PhACs	<i>Pharmaceutically-active Compounds</i> (Compostos com atividade farmacêutica)
RMP	Rotações por minuto
SMX	Sulfametoxazol
TMP	Trimetoprima
U	Unidade internacional de atividade enzimática
U L ⁻¹	Unidades de atividade enzimática por mililitro
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	CONTAMINANTES EMERGENTES.....	17
3.1.1	Fármacos	19
3.1.1.1	Antimicrobianos SMX e TMP.....	20
3.2	TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM SMX E TMP.....	23
3.2.1	Oxidação química: fotólise direta	25
3.2.2	Oxidação biológica: processo com enzimas ligninolíticas	27
3.2.2.1	Fungos da podridão branca.....	28
3.2.2.2	Enzimas ligninolíticas	29
3.2.2.3	Produção de enzimas ligninolíticas por fungos da podridão branca.....	33
3.3	DETERMINAÇÃO DE SMX E TMP POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	35
3.4	ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	35
4	METODOLOGIA	37
4.1	ETAPA 1 - PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	37
4.1.1	Basidiomicetos	37
4.1.2	Preparo do inóculo para cultivo líquido	38
4.1.3	Produção enzimática em cultivo líquido	38
4.1.4	Delineamentos experimentais	38
4.1.4.1	Produção enzimática por <i>Trametes</i> sp.....	38
4.1.4.2	Produção de LiP por <i>Inonotus splitgerberi</i>	40
4.1.5	Cinética final de produção enzimática por <i>Trametes</i> sp. e <i>Inonotus splitgerberi</i>	42
4.1.6	Obtenção dos extratos enzimáticos	42
4.2	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	42

4.2.1 Determinação da atividade de lacase, MnP e LiP	42
4.2.2 Determinação da concentração de açúcares redutores	43
4.2.3 Determinação da concentração de compostos fenólicos	44
4.2.4 Determinação da concentração de proteínas totais	44
4.2.5 Análise de biodegradação de SMX e TMP por CLAE-DAD	45
4.3 ETAPA 2 - DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>	46
4.3.1 Degradação biológica: ação enzimática.....	46
4.3.2 Degradação química: fotólise direta.....	47
4.3.3 Degradação combinada	48
4.4 ETAPA 3 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO.....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR <i>TRAMETES</i> SP.	49
5.1.2 Cinética de <i>Trametes</i> sp.	54
5.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR <i>INONOTUS SPLITGERBERI</i>	58
5.2.1 Otimização de Lip.....	60
5.2.2 Cinética de <i>Inonotus splitgerberi</i>	63
5.3 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA.....	65
5.4 DEGRADAÇÃO QUÍMICA POR FOTÓLISE DIRETA.....	70
5.5 TRATAMENTO COMBINADO	74
5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO.....	77
6 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE AÇUCARES REDUTORES	91
APÊNDICE B - CURVA PADRÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	91
APÊNDICE C - CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	92
APÊNDICE D - CURVA PADRÃO DE SMX E TMP	92

1 INTRODUÇÃO

Uma série de compostos, não legislados, chegam às Estações de Tratamento de Águas Residuárias e não são removidos eficientemente pelos tratamentos convencionais (LARSEN et al., 2004). Os denominados “contaminantes emergentes”, têm se acumulado em concentrações na ordem de ng L^{-1} nas águas superficiais e subterrâneas (BARCELÓ, 2003; DAUGHTON, TERNES, 1999; PETROVIC et al., 2014), causando preocupação quanto aos efeitos potenciais à saúde humana, animal e à dinâmica dos ecossistemas.

Uma importante classe de contaminantes emergentes é a dos fármacos. Depois de consumidos, eles podem ser absorvidos e metabolizados pelo organismo (ANKLEY et al., 2007), ou excretados na forma inalterada, ou de metabólitos, fazendo com que substâncias com atividade biológica sejam lançadas e acumuladas nos corpos hídricos.

Nesse contexto os antibióticos merecem destaque, pois correspondem ao quinto tipo de fármaco mais vendido no mundo, ficando atrás apenas dos medicamentos utilizados para o combate ao câncer, dores, diabetes e hipertensão (IMS Health *apud* Veja, 2014)¹. O uso intenso de antibióticos aumenta a probabilidade de sua introdução no ambiente (DAUGHTON; TERNES, 1999) e a exposição de diversos organismos a essas substâncias, podendo provocar o aparecimento de bactérias resistentes (BAQUERO et al., 2003).

O sulfametoxazol (SMX) e a trimetoprima (TMP), em 2005, estavam entre os oito antibióticos mais vendidos no Brasil (ANVISA, 2006). Empregados habitualmente de maneira conjunta (ex. Bactrim®), exibem atividade antibacteriana de amplo espectro, sendo encontrados frequentemente em águas residuais, e por serem resistentes aos tratamentos biológicos mais utilizados (VALCÁRCEL et al., 2011), permanecem no efluente tratado. A presença de SMX e TMP foi detectada em águas superficiais e afluentes de Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (KARTHIKEYAN; MEYER, 2006; VALCÁRCEL et al., 2011). Estes antibióticos são considerados compostos de alto risco e de elevada relevância ambiental devido

¹ IMS Health. <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth>

à ocorrência em águas superficiais e à ecotoxicidade (BESSE; GARRIC, 2008). Relatos demonstram um aumento gradual na frequência de bactérias isoladas resistentes ao SMX e ao TMP (HUOVINEN et al., 1995).

Diferentes metodologias para o tratamento de SMX e TMP têm sido propostas, com o objetivo de reduzir a concentração e atividade biológica destes compostos emergentes nos ambientes aquáticos.

Os Processos Avançados de Oxidação (AOPs), atraentes em função de sua rapidez e eficiência na degradação de moléculas recalcitrantes, têm sido estudados para degradação do SMX e TMP. Entre as técnicas testadas destacam-se a fotólise e UV/peróxido, porém, os resultados indicam que os produtos da degradação apresentam toxicidade (ALHARBI, et al., .2017; YANG, et al., 2017).

A aplicação das enzimas ligninolíticas, produzidas por basidiomicetos, como agentes de biodegradação, é uma alternativa promissora. Os fungos da podridão branca, entre eles o *Trametes* sp., são capazes de degradar a complexa molécula da lignina, através da ação das enzimas lacase, manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP), que são secretadas pelos fungos e atuam oxidando substratos fenólicos. Estudos envolvendo a degradação de SMX e TMP com enzimas lignolíticas indicam a formação de produtos da degradação de baixa toxicidade (MARGOT et al., 2015), porém, a remoção não ocorre de forma rápida, García-Galan e colaboradores (2011), obtiveram 100% degradação de SMX após 20 horas de reação.

Diante da ineficiência dos atuais sistemas de tratamento de efluentes para remoção destes compostos, da presença destes nos ambientes aquáticos, e dos potenciais riscos aos ambientes aquáticos e saúde humana, é importante estabelecer metodologias capazes de remover estes compostos, gerando produtos sem toxicidade. Uma alternativa para o tratamento rápido de SMX e TMP, gerando subprodutos com toxicidade inferior, é a combinação dos processos de oxidação química (fotólise) e biológica (tratamento enzimático).

2OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de degradação dos antimicrobianos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP), através de mecanismos de oxidação biológica (tratamento enzimático) e química (fotólise).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção das enzimas ligninolíticas (lacase, MnP e LiP) através de delineamentos estatísticos experimentais, por cultivo estático dos fungos da podridão branca *Trametes sp.* e *Inonotus splitgerberi*;
- Estabelecer a cinética enzimática nas condições de cultivo otimizadas;
- Aplicar tratamento enzimático, utilizando lacase comercial e extratos enzimáticos brutos, contendo lacase, nos experimentos de biodegradação *in vitro* dos antimicrobianos SMX e TMP, determinando a porcentagem de degradação;
- Aplicar processo de fotólise para degradação dos antimicrobianos SMX e TMP, e determinar a degradação.
- Avaliar a combinação dos tratamentos de fotólise (oxidação química) e enzimático (oxidação biológica) na degradação dos antibióticos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos metabólitos produzidos na oxidação de SMX e TMP através da técnica de determinação da concentração mínima inibitória.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

A Agência de Pesquisa Geológica dos Estados Unidos (*United States Geological Survey*, USGS, 2016), que investiga a ocorrência de micropoluentes, define o termo “contaminante emergente” como sendo uma substância química ou microrganismo, de origem natural ou antropogênica, capaz de entrar no ambiente, e provocar efeitos antagônicos à saúde humana e/ou ecossistema, que são conhecidos ou suspeitos.

Os contaminantes emergentes de origem antropogênica estão presentes na composição de várias substâncias utilizadas para manutenção da saúde, limpeza, produção agrícola, pecuária e industrial. O Quadro 1 apresenta uma lista com as principais classes de micropoluentes exógenos encontrados no ambiente.

Quadro 1. Compostos emergentes nos produtos de uso pessoal e industrial

Classe de substância	Exemplos
Fármacos	
Antibióticos	Trimetoprima, eritromicina, lincomicina, sulfametazina.
Analgésicos e drogas anti-inflamatórias	Codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, fenoprofeno.
Drogas psiquiátricas	Diazepam.
Reguladores Lipídicos	Bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico.
b-Bloqueadores	Metoprolol, propanolol, timolol.
Esteróis e hormônios (contraceptivos)	Estradiol, estrona, estriol, dietilestilbestrol.
Produtos de uso pessoal	
Fragrâncias	Nitropolicíclicos e macrocíclicos.
Agentes de protetor solar	Benzofenona, cânfora metilbenzilideno.
Repelentes	N,N-dietiltoluamida.
Antissépticos	Triclosan, clorofeno.
Agentes e aditivos industriais	Agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos.
Aditivos de gasolina	Dialquiléters, metil-t-butil éter (MTBE).
Produtos de desinfecção	Iodo-THMs, bromoácidos, bromoacetoneitrilas, bromoaldeídos, cianoformaldeídos, bromatos, NDMA.

Fonte: BARCELÓ, 2003

Os contaminantes emergentes, após o uso, são descartados, lixiviados ou eliminados biologicamente, em sua forma natural e/ou metabolizada. Estes compostos, não legislados no Brasil, exigem tratamentos específicos para que sejam eliminados dos efluentes, isto devido à sua complexibilidade química. Tratamentos convencionais de esgoto não promovem a remoção dos compostos emergentes (LARSEN et al., 2004); assim, o efluente tratado, não isento destes micropoluentes, pode atingir águas de abastecimento, permitindo sua distribuição pela rede de água potável.

Esses micropoluentes, biologicamente ativos, vêm sendo identificados e quantificados, em função do desenvolvimento da química analítica (SODRÉ et al., 2007). Estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de quantificar e avaliar a ecotoxicidade e toxicidade destes compostos, presentes nos ambientes aquáticos e nas águas de abastecimento (PABLOS et al., 2015; VALCÁRCEL et al., 2011). A Tabela 1 apresenta as concentrações de alguns contaminantes emergentes encontrados em águas superficiais.

Tabela 1. Concentração de alguns contaminantes emergentes encontrados no Brasil em ambientes aquáticos

Contaminante	Uso	Concen- -tração máxima (ng L ⁻¹)	Referência	Tipo de corpo d'água	Estado
Cafeína	Estimulante	2769	Machado et al., 2016	Água potável	Rio Grande do Sul
		511,3	Pereira et al., 2016	Mar	São Paulo
Atrazina	Herbicida	19	Machado et al., 2016	Rio	Minas Gerais
		24	Machado et al., 2016	Água potável	Minas Gerais
Triclosan	Agente Antimicrobiano	281,1	Campanha et al., 2014	Rio	São Paulo
Diclofenaco	Antinflamatório	385,6	Campanha et al., 2014	Rio	São Paulo
17β-estradiol	Hormônio	106	Montagner e Jardim, 2011	Rio	São Paulo
Bisfenol A	Plastificante	204	Montagner e Jardim, 2011	Rio	São Paulo
Acetaminofeno	Analgésico	29,1	Pereira et al., 2016	Mar	São Paulo

Suspeita-se que, mesmo em pequenas concentrações, muitos micropoluentes sejam capazes de provocar danos à saúde humana e alterações no

ecossistema (SANTANA, 2013). Kidd e colaboradores (2007) propõem a ocorrência da feminização de peixes expostos por sete anos ao hormônio sintético 17 α -etinilestradiol, em concentração entre 5 e 6 ng L⁻¹. Oishi (2002) observou que o butilparabeno, substância utilizada como agente antimicrobiano em alimentos, cosméticos, produtos de higiene pessoal e fármacos, causou alterações no sistema reprodutivo de ratos machos, uma vez que o composto danificou etapas da espermatogênese nos testículos destes animais.

3.1.1 Fármacos

Dentre os micropoluentes ambientais os que apresentam atividade farmacológica (PhACs) compõem a classe de poluentes emergentes que recebe destaque (DA CRUZ, 2012). Os fármacos englobam uma variedade de drogas terapêuticas, aplicadas na medicina humana e animal.

Após a administração, parte do fármaco é excretada na forma inalterada e/ou metabolizada, através das fezes e urina, as quais são direcionadas para fossas sépticas ou diretamente para corpos hídricos, por ligação clandestina ou escoamento superficial, permitindo a entrada destes compostos nas águas superficiais e subterrâneas.

Os fármacos podem ainda ser excretados, conduzidos à rede coletora de esgoto e direcionados à uma ETE; porém, o efluente tratado não fica isento de vários fármacos e hormônios (CHANG; HU; SHAO, 2007; LIU et al., 2011; STACKELBERG et al., 2004; ZHOU et al., 2009), disponibilizando-os para ambiente e causando problemas de cunho ambiental e de saúde pública (GHISELLI; JARDIM, 2007). Os fármacos com níveis de hidrosolubilidade inferior a 10% (30% dos comercializados), por serem sedimentáveis, podem ficar retidos no lodo das ETEs (HALLING-SORENSEN et al., 1998). O lodo contaminado, se aplicado como adubo na agricultura, pode causar a contaminação das águas por lixiviação (BILA; DEZOTTI, 2003).

A disposição final de resíduos da indústria farmacêutica em aterros controlados e o uso de fezes animais como adubo na agricultura também causam

contaminação das águas, pois os compostos contidos nestes resíduos são lixiviados atingindo aquíferos (BILA; DEZOTTI, 2003).

Os fármacos são desenvolvidos para alterar funções bioquímicas e fisiológicas nos seres humanos e demais animais, em geral, apresentam características lipofílicas e baixa biodegradabilidade (AMÉRICO et al., 2013) propriedades que contribuem para sua bioacumulação e persistência no meio ambiente (CHRISTENSEN, 1998). Uma vez que estes compostos se tornam disponíveis ao meio ambiente são capazes de manter sua atividade e atuar em organismos não alvos, causando efeitos negativos (JJEMBA, 2006). Além disto, estas substâncias são susceptíveis a transformações no ambiente, através de processos bióticos e abióticos (TIXIER et al., 2003).

Garrison (1976)² *apud* Américo et al. (2013), reportou a primeira ocorrência de fármacos em águas residuárias, a presença de ácido clofibríco foi quantificada na faixa de 0,8 a 2 µg L⁻¹. Esta descoberta estimulou pesquisas sobre a presença de fármacos nas águas, que foram possíveis em virtude do desenvolvimento de técnicas analíticas para quantificação de compostos polares (FENT et al., 2006).

Estudos realizados em vários países detectaram a presença de hormônios estrógenos naturais e de diversos fármacos como antibióticos, anestésicos, antilipêmicos, anti-inflamatórios, glicocorticóides, entre outros, no esgoto doméstico, em água tratada, em águas superficiais e subterrâneas (CHANG; HU; SHAO, 2007; HIRSCH et al., 1999; KARTHIKEYAN; MEYER, 2006; PETROVIC et al., 2014; VALCÁRCEL et al., 2011; VULLIET; CREN-OLIVÉ, 2011; YANG et al., 2011).

3.1.1.1 Antimicrobianos SMX e TMP

Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos, capazes de inibir crescimento ou provocar a morte de bactérias e fungos (WALSH, C., 2003³ *apud*

² GARRISON, A. W.; POPE, J. D.; ALLEN, F. R. Analysis of organic compounds in domestic wastewater. In: KEITH, C.H. (Org.). **Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water**. Michigan, p. 517–566, 1976.

³ WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Constituem um grande grupo da classe de fármacos, sendo aplicados de forma intensa na medicina humana, veterinária e nas atividades de produção animal (HIRSCH et al., 1999; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Segundo dados da consultoria internacional IMS *Health* (IMS *Health* apud Veja, 2014)⁴, os antibióticos correspondem ao quinto remédio mais vendido no mundo, atrás dos medicamentos empregados no combate ao câncer, dores, diabetes e hipertensão. De acordo com a mesma consultoria, a venda de medicamentos da classe terapêutica dos antibióticos movimentou, cerca de R\$ 1,24 bilhão de reais no Brasil, em 2013. O uso intenso destes fármacos aumenta a probabilidade de sua introdução no ambiente (DAUGHTON; TERNES, 1999).

A maioria dos antibióticos administrados em humanos e animais são pouco absorvidos, sendo que aproximadamente 25-75% dessas substâncias deixam os organismos na forma não metabolizada através das fezes ou urina (CHEE-SANFORD et al., 2001).

Alguns antibióticos não são removidos totalmente pelos métodos de tratamento de esgoto convencionais. Na Alemanha, 18 antibióticos foram identificados em efluentes de ETEs e em águas superficiais (HIRSCH et al., 1999). Em Madri, 25 fármacos foram detectados à jusante de ETEs (VALCÁRCEL et al., 2011).

A presença de grandes quantidades de antibióticos no ambiente pode causar o aparecimento de bactérias resistentes, bem como recombinantes com maior patogenicidade (BAQUERO et al., 2003).

O sulfametoxazol (SMX) e a trimetoprima (TMP) são antibióticos empregados geralmente de maneira conjunta (ex. Bactrim®). O sulfametoxazol foi o quarto antibiótico mais vendido no Brasil em 2005, correspondendo a um consumo de 133 toneladas. A trimetoprima foi o oitavo antibiótico mais consumido, o que equivale a 27 toneladas comercializadas em 2005 (ANVISA, 2006).

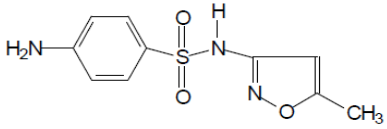
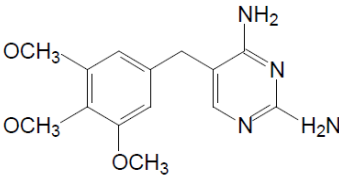
O sulfametoxazol (SMX), cuja nomenclatura oficial segundo a IUPAC é 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenossulfonamida, é uma sulfonamida que atua como agente bacteriostático e bloqueia a enzima di-hidropteroato sintetase (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), afetando a síntese bacteriana do ácido

⁴ IMS Heath. <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth>

fólico (REESE e BETTS, 1995). Após administração, o SMX é eliminado através da urina, apresentando porcentagens que variam entre 10% a 30% do produto em sua forma inalterada (Bula Bactrim®).

A trimetoprima (TMP), nomeada pela IUPAC como 5-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-2,4-pirimidinodiamina, é um derivado da diaminopiridina que apresenta atividade antimicrobiana inibindo a enzima di-hidrofolato redutase (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), afetando também a produção de ácido fólico. A excreção do TMP é renal, cerca de 50% a 70% da dose administrada é eliminada através da urina na forma não metabolizada (Bula Bactrim®). Algumas informações a respeito destes compostos são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Características químicas dos compostos sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP)

Composto	Fórmula	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estrutura
Sulfametoxazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,27	
Trimetoprima	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,32	

Fonte: Adaptado de BRENNER, 2009

A combinação entre o sulfametoxazol (SMX) e a trimetoprima (TMP) é indicada para o tratamento de infecções de origem bacteriana (Bula Bactrim®). Os dois compostos em conjunto atuam de forma sinérgica, bloqueando enzimas que catalisam estágios sucessivos na biossíntese do ácido fólico na bactéria, criando uma inibição competitiva (CORDEIRO, 2006).

A presença de SMX e a TMP foi detectada em efluentes e afluentes de ETEs, águas superficiais e subterrâneas, em concentrações na ordem de µg L⁻¹. Dados quanto à ocorrência de SMX e TMP em diferentes locais e concentrações são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) encontrados em efluentes e afluentes de estações de tratamento de esgoto, em águas superficiais e subterrâneas

Substância	Local	Concentração	Referência
SMX	Afluente e efluente de ETE/EUA	0,37-1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ *	Karthikeyan; Meyer, 2006
	Afluente e efluente de ETE/Japão	6,9-28 ng L^{-1}	Chang et al., 2008
	Águas superficiais /Japão	0,37-0,56 ng L^{-1}	Chang et al., 2008
	Águas superficiais /Espanha	32-952 ng L^{-1}	Valcárcel et al., 2011
	Águas superficiais/Brasil	106 ng L^{-1} *	Locatelli et al., 2010
TMP	Afluente e efluente de ETE/EUA	0,55-1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ *	Karthikeyan; Meyer, 2006
	Afluente e efluente de ETE/Japão	11-42 ng L^{-1}	Chang et al., 2008
	Águas superficiais /Japão	0,09-0,34 ng L^{-1}	Chang et al., 2008
	Águas superficiais /Espanha	38-690 ng L^{-1}	Valcárcel et al., 2011
	Águas superficiais/Brasil	484 ng L^{-1} *	Locatelli et al., 2010

*Concentrações máximas observadas.

Estudos demonstram um aumento gradual na frequência de bactérias isoladas que são resistentes ao SMX e à TMP (HUOVINEN et al., 1995). Além da resistência patogênica, a genotoxicidade pode ser preocupante. Abou-Eisha, Marcos e Creus (2004) relataram que o SMX foi capaz de induzir um efeito citotóxico em linfócitos humanos cultivados. Um aumento significativo na porcentagem de abortos e de natimortos foi reportado entre filhos de homens que trabalhavam em uma indústria farmacêutica e ficaram expostos às sulfonamidas (PRASAD et al., 1996).

3.2 TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS COM SMX E TMP

Os efluentes podem ser tratados através de métodos que são classificados em biológicos, físicos e/ou químicos. A Figura 1 esquematiza os principais processos de tratamento envolvidos em cada um dos métodos.

Figura 1. Métodos para tratamento de efluentes

Fonte: adaptado de FREIRE et al. (2000)

A remoção de fármacos dos efluentes, principal via de contaminação dos corpos hídricos, é um desafio, uma vez que o esgoto possui composição complexa e com concentrações de micropoluentes em frações traço (DA CRUZ, 2012).

Os métodos convencionais utilizados nas ETEs, para tratamento de SMX e TMP têm-se mostrado pouco eficientes na remoção dos fármacos contidos nas águas residuárias (TERNES, 1998; VALCÁRCEL et al., 2011). Segundo Goebel e colaboradores (2007), a TMP, por exemplo, apresenta baixa taxa de remoção em tratamentos convencionais com lodo ativado e reatores de leito fixo.

A Tabela 3 apresenta resultados da eficiência de ETEs no tratamento de sulfametoxazol e trimetoprima.

Tabela 3. Remoção de sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) em estações de tratamento em diversos países

Composto (Classe)	Afluente	Efluente	% Remoção	Referência
SMX	390 ng L ⁻¹	310 ng L ⁻¹	20	Brown et al., 2006
	75 ng L ⁻¹	51 ng L ⁻¹	n.r.	Clara et al., 2005
	0,65 µg L ⁻¹	0,29 µg L ⁻¹	< 60	McClure et al., 2007
	-	0,6 µg L ⁻¹	67	Zhang et al., 2008
	1090 ng L ⁻¹	210 ng L ⁻¹	81	Yang et al., 2005
	580 ng L ⁻¹	250 ng L ⁻¹	57	Carballa et al., 2004
	254 ng L ⁻¹	175 ng L ⁻¹	n.r.	Sim et al., 2011
	157 ng L ⁻¹	70 ng L ⁻¹	< 60	Miège et al., 2009
	29 ng L ⁻¹	10 ng L ⁻¹	< 66	Kasprzyk-Hordern et al., 2009
TMP	-	-	< 30	Jelic et al., 2011
	-	30 ng L ⁻¹	88	Gómez et al., 2007
	230 ng L ⁻¹	209 ng L ⁻¹	n.r.	Sim et al., 2011
	205 ng L ⁻¹	63 ng L ⁻¹	69	Behera et al., 2011
	610 ng L ⁻¹	< 10 ng L ⁻¹	n.r.	Yang et al., 2011
	281 ng L ⁻¹	60 ng L ⁻¹	< 25	Miège et al., 2009
	2192 ng L ⁻¹	1152 ng L ⁻¹	< 50	Kasprzyk-Hordern et al., 2009
	0,27 µg L ⁻¹	0,26 µg L ⁻¹	< 5	McClure et al., 2007
	590 ng L ⁻¹	180 ng L ⁻¹	69	Brown et al., 2006
320 ng L ⁻¹	120 ng L ⁻¹	62	Gulkowska et al., 2008	

Fonte: adaptado DA CRUZ, 2012

A ineficiência dos processos convencionais de tratamento está possibilitando que compostos emergentes como SMX e TMP sejam disponibilizados para o ambiente. Em razão da falta de alternativas eficientes, muitos estudos têm sido dedicados ao desenvolvimento de novas propostas para o tratamento de efluentes contendo estes antimicrobianos.

3.2.1 Oxidação química: fotólise direta

Os Processos Avançados de Oxidação (AOPs), entre eles a fotólise, são uma alternativa para o tratamento de substâncias recalcitrantes (DA CRUZ, 2012; FREIRE et al. 2000). Os AOPs são caracterizados pela geração de radicais hidroxila (HO[•]), espécie muito reativa e pouco seletiva, que atuam como oxidantes e podem promover a degradação de substâncias em um curto espaço de tempo (FREIRE et al., 2000), e algumas vezes a mineralização dos compostos, resultando em dióxido de carbono, água e sais inorgânicos (ANDREOZZI et al., 1999). Os radicais hidroxila são

produzidos no meio reacional pela adição de compostos fortemente oxidantes, como ozônio e peróxido de hidrogênio, ou pela combinação de semicondutores, como TiO₂ e ZnO, e irradiação ultravioleta (MANSILLA et al., 1997).

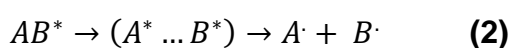
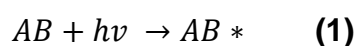
Os AOPs podem ser classificados quanto à presença/ausência de irradiação e quanto à fase do sistema homogêneo/heterogêneo (Quadro 3). São considerados sistemas homogêneos quando as reações ocorrem em sistema de uma única fase e heterogêneos quando se encontram em fases distintas.

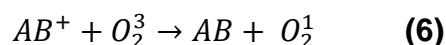
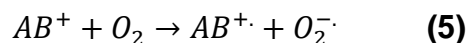
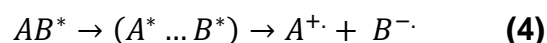
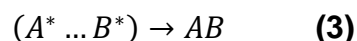
Quadro 3. Classificação dos Processos Avançados de Oxidação

	Sistemas homogêneos	Sistemas heterogêneos
Com irradiação	UV-H ₂ O ₂	Fotocatálise heterogênea Eletrofotocatalítico
	Foto-Fenton (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ /UV) O ₃ /UV	
Sem irradiação	Fenton (Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	Eletro-Fenton
	O ₃ -OH ⁻	Eletroquímico
	O ₃ -H ₂ O ₂	

Fonte: DA CRUZ, 2012

A fotólise direta é um tratamento com radiação ultravioleta (UV), de sistema homogêneo; neste processo a radiação é absorvida pela molécula alvo, deixando-a em um estado eletronicamente excitado (Equação 1), causando a clivagem de ligações e geração de radicais (Equação 2). Conforme a estrutura da molécula e presença de oxigênio os radicais podem ser oxidados ou reduzidos, resultando em diferentes produtos da degradação. Os radicais primários podem ser recombinados, o que ocorre com alta probabilidade (Equação 3). Processos de transferência de energia e elétron podem ocorrer quando os compostos orgânicos estão no estado excitado, gerando espécies reativas como o radical superóxido (Equação 5) e oxigênio singlete (Equação 6), causando recombinação molecular e retorno ao estado fundamental do composto.





As radiações UV possuem comprimento de onda entre 100 e 400 nm, sendo que esta região pode ser dividida em três faixas, conforme a intensidade com que a radiação é absorvida pelo O₂ e O₃: UV-A (320 – 400 nm), UV-B (290 - 320 nm) e UV-C (100 - 280 nm). A degradação de fármacos por radiação UV tem sido avaliada e reportada na literatura, sendo que as faixas UV-A e UV-C são mais usadas em aplicações ambientais (CAVALCANTE, 2005).

3.2.2 Oxidação biológica: processo com enzimas ligninolíticas

Uma alternativa biológica para o tratamento de substâncias recalcitrantes é o uso das enzimas oxidativas produzidas por basidiomicetos. Os basidiomicetos, mais especificamente os fungos da podridão branca da madeira, são capazes de degradar as complexas estruturas de lignina, além da celulose e a hemicelulose. Isto é possível devido à ação de um sistema enzimático ligninolítico extracelular, composto por enzimas lacase (E.C. 1.10.3.2) e peroxidase, representada pela lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14), manganês peroxidase (E.C. 1.11.1.13) e peroxidase versátil (E.C. 1.11.1.16). Estas enzimas atuam de forma inespecífica, o que permite sua ação não só sobre materiais lignocelulolíticos, mas também em compostos com estrutura semelhante à da lignina. Baseado neste princípio, pesquisadores têm cultivado fungos da podridão branca com o objetivo de produzir estas enzimas inespecíficas e aplicá-las no tratamento de poluentes com estruturas tão complexas quanto à lignina (GUO; ZHU; LI, 2014; HOU et al., 2004; INOUE et al., 2010; LIBARDI JUNIOR, 2010; MOREDO et al., 2003; WEN; JIA; LI, 2009; ZHANG; GEISSEN, 2010).

O resultado final pretendido consiste na biodegradação do poluente, com geração de moléculas mais simples e menos tóxicas e/ou atóxicas.

O uso destes fungos e suas enzimas em processos de biorremediação de fármacos têm produzido resultados promissores (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007b; LLORET et al., 2010). No entanto, são necessários mais estudos na área, devido às inúmeras substâncias presentes nas mais diversas matrizes ambientais.

Hermann (2015) testou a aplicação de extrato enzimático contendo lacase em concentrações de 2,5 mg L⁻¹ de SMX e TMP, obtendo taxas de degradação, após 24 horas, de 35,76% e 26,27% respectivamente.

A aplicação direta destas enzimas na degradação *in vitro* de micropoluentes ambientais é uma alternativa aos tratamentos físico-químicos e microbiológicos tradicionais, pois a técnica é ecologicamente correta e, quando utilizado extrato enzimático bruto pode reduzir os custos do tratamento (TAVARES, 2012), viabilizando o método.

3.2.2.1 Fungos da podridão branca

Os fungos são organismos eucarióticos quimiorganotróficos, ou seja, obtém energia de compostos orgânicos. São divididos em quatro filos: quitridiomycetos (Chytridiomycota), zigomicetos (Zygomycota), ascomycetos (Ascomycota), e os basidiomicetos (Basidiomycota) (MCLAUGHLIN et al., 2009). Os basidiomicetos produzem um tipo de esporo de origem sexuada, denominado basídiosporo, sustentado pelo basídio, que é a estrutura reprodutiva do fungo.

Os basidiomicetos são divididos em três subfilos: Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina (RILEY et al., 2014). O subfilo Agaricomycotina engloba muitos fungos destruidores da madeira como os fungos da podridão parda (*brown-rot fungi*) e branca (*white-rot fungi*) (MADIGAN et al., 2016).

Os fungos causadores da podridão parda degradam a celulose e hemicelulose, mas não metabolizam a lignina, já os fungos da podridão branca são capazes de atacar e degradar a lignina, estrutura complexa que protege a celulose e hemicelulose das plantas, desempenhando importante papel na decomposição dos

materiais vegetais (MADIGAN et al., 2016; RILEY et al., 2014). A degradação desta estrutura confere uma aparência esbranquiçada à madeira, o que justifica o nome deste grupo de fungos.

A degradação ocorre pela penetração das suas hifas do fungo sobre o lúmen das plantas, onde secretam metabólitos de baixo peso molecular e enzimas, que catalisam reações bioquímicas. Dentre as enzimas secretadas estão a lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, celulasas, hemicelulasas e xilanases (MISHRA; LEATHAM, 1990; YANG et al., 2013). A ação das enzimas provoca a despolimerização da celulose e da hemicelulose, e a fragmentação da lignina, convertendo estas estruturas em moléculas mais simples e solúveis, disponíveis como fonte de energia para os fungos. A metabolização destas estruturas das plantas gera gás carbônico e água, ou seja, promove a mineralização dos compostos (KIRK; FARREL, 1987), permitindo a ciclagem de materiais lignocelulolíticos, como a madeira e resíduos agroindustriais.

3.2.2.2 Enzimas ligninolíticas

As enzimas envolvidas na degradação dos materiais lenhosos podem ser divididas em dois grupos: a) enzimas hidrolíticas, celulasas e hemicelulasas, envolvidas nas reações de despolimerização da hemicelulose e da celulose; b) enzimas oxidativas MnP, LiP e lacase, que desempenham função na degradação da lignina, denominadas ligninolíticas (KIRK; FARREL, 1987).

As enzimas ligninolíticas apresentam baixa especificidade e são classificadas em fenoloxidasas, grupo que abrange a lacase, e heme peroxidases, classe à que pertencem às enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase (FALADE, et al., 2017).

As enzimas oxidativas são produzidas durante o metabolismo secundário dos fungos da podridão branca, tendo sua síntese influenciada pelos níveis de carbono ou nitrogênio disponíveis no meio. Os fungos podem produzir uma ou mais enzimas lignocelulolíticas, para deslignificar os tecidos vegetais (MACIEL, 2012; WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003), conforme Figura 2.

Figura 2. Fungos da podridão branca classificados quanto à habilidade de produção enzimas ligninolíticas

Fungos produtores de lacase e MnP e LiP • <i>Trametes versicolor</i> , <i>Bjerkandera adusta</i> .
Fungos produtores de lacase e pelo menos uma peroxidase • <i>Lentinus edodes</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> .
Fungos produtores apenas de lacase • <i>Schizophyllum commune</i> .
Fungos produtores apenas de peroxidase • <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .

Fonte: adaptado de MACIEL, 2012

As enzimas ligninolíticas têm sido alvo de vários estudos (TAVARES, 2006), devido à capacidade de degradar a complexa molécula de lignina (polímero aromático) e compostos com estruturas semelhantes a esta (POINTING, 2001).

A utilização destas enzimas ligninolíticas apresenta potencial para a biorremediação de poluentes (POINTING, 2001). Várias pesquisas têm avaliado a biodegradação de compostos recalcitrantes e de composição semelhante à lignina, utilizando enzimas ligninolíticas produzidas por fungos da podridão branca, conforme Quadro 4.

Quadro 4. Pesquisas envolvendo a biodegradação de substâncias farmacêuticas utilizando fungos da podridão branca

Substância ser degradada	Fungo produtor de enzimas ligninolíticas	Referência
Tetraciclina e oxitetraciclina	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Wen; Jia; Li, 2009
Triclosan	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Trametes versicolor</i>	Inoue et al., 2010
Sulfametoxazol	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Guo; Zhu; Li, 2014
Sulfametoxazol, Citalopram, Fluoxetina, Diclofenaco, Ibuprofeno, Naproxeno, Carbamazepina, Diazepam, Celestolide, Galaxolide, Tonalide	<i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Bjerkandera sp.</i>	Rodarte-Morales et al., 2011

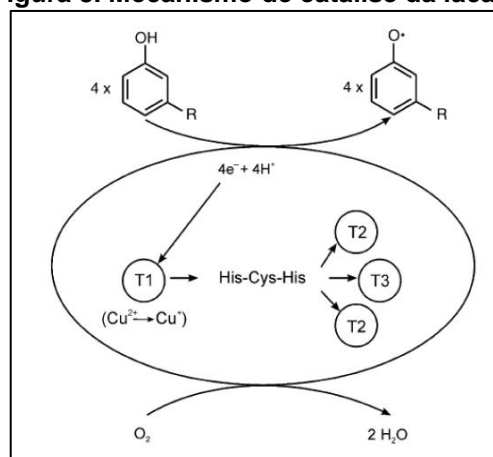
a) Lacase

As enzimas lacases (E.C. 10.1.2.3) são fenoloxidasas, produzidas por fungos, insetos, bactérias e vegetais (AGUIAR, 2008; MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

Estão envolvidas nos processos de morfogênese, degradação da lignina, destoxificação e formação de pigmentos (MOROZOVA et al., 2007^a).

São compostas por quatro átomos de cobre em seu centro catalítico (Figura 3), por isso, conhecidas como multicobreoxidases (LIBARDI JUNIOR, 2010).

Figura 3. Mecanismo de catálise da lacase



Fonte: BALDRIAN (2006)

A lacase catalisa oxidações em compostos fenólicos, pela remoção de um elétron contido no substrato fenólico associado à redução de Cu^{+2} em Cu , a enzima retorna em sua forma Cu^{+2} promovendo a redução de O_2 em água (BREEN; SINGLETON, 1999). Apresentam o potencial de oxidar uma série de substâncias, tanto de origem natural (fenóis, polifenóis e fenóis metoxilados), como de origem sintética, como o ABTS (2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfonato)).

A catálise da lacase tem início com a redução do cobre tipo 1 (T1) por um substrato com potencial redox inferior ao Cu_1 . Os elétrons são transferidos do cobre tipo 1 pelos aminoácidos da cadeia polipeptídica para os sítios T2 (Cu_4) e T3 (Cu_2 e Cu_3) que, constituem um centro trinuclear, onde o oxigênio molecular é reduzido a água.

Estas enzimas apresentam potencial redox variável, característica que é influenciada pela origem da lacase. As enzimas fúngicas apresentam alto potencial redox (0,6 e 0,8 V); enzimas com reduzido potencial redox (0,4 V e 0,6 V), são encontradas em insetos, bactérias e vegetais (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

A enzima lacase pode atuar na ausência de mediadores para degradar substratos, porém a reação é limitada ao tipo de substrato. Substratos com elevado potencial redox e/ou grandes, que resultam em impedimento estérico dificultando o acesso dessas moléculas ao centro ativo da enzima, podem ter sua oxidação facilitada pela presença de mediadores. Os mediadores atuam como substratos intermediários para a enzima e, quando oxidados, formam radicais capazes de interagir os substratos grandes e de elevado potencial redox (RIVA, 2006).

b) Lignina peroxidase

A lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) é uma glicoproteína com grupo heme no sítio ativo. A LiP catalisa compostos fenólicos, hidratos de carbono aromáticos, entre outros que apresentam extrema resistência ao ataque microbiano (TAVARES, 2006). A enzima precisa do H_2O_2 como mediador. Atua oxidando os substratos pela transferência de elétrons, e formando radicais intermediários (radicais fenoxi e cátions do álcool veratrílico), os quais são submetidos às ações enzimáticas, como o acoplamento de radicais, polimerização, clivagem da cadeia lateral, desmetilação e adição intramolecular e arranjo (WONG, 2009).

c) Manganês peroxidase

A manganês peroxidase (EC. 1.11.1.13), é uma heme proteína glicolisada, encontrada em diferentes fungos. A enzima precisa do H_2O_2 como mediador. A MnP catalisa a oxidação do Mn (II), com redução do substrato, em Mn (III). O produto gerado é constituído de um complexo formado por Mn (III) e agentes quelantes, como

o oxalato. Este complexo quelado é excretado pela enzima, e atua como um reativo de reduzido peso molecular, mediador de substratos fenólicos. A oxidação de substratos não fenólicos por Mn (III) pode ocorrer, para isto, devem ser formados radicais reativos, os quais surgem na presença de mediadores, neste caso os ácidos orgânicos, como o oxalato e o malonato (WESENBERG et al., 2003; WONG, 2009).

3.2.2.3 Produção de enzimas ligninolíticas por fungos da podridão branca

A obtenção de enzimas ligninolíticas a baixo custo e viáveis comercialmente, pode ocorrer pela seleção de fungos capazes de produzir enzimas, utilizando como substrato os resíduos lignocelulolíticos, que são indutores naturais desta classe de enzimas (ELISASHVILI et al., 2006).

Cada gênero e espécie de fungo possui seu metabolismo próprio, com necessidades nutricionais e condições de cultivo específicas, as quais quando atendidas promovem seu crescimento e produção de enzimas lignocelulolíticas. Assim, o fungo selecionado para o cultivo é um dos fatores que mais interfere na produção enzimática. Além do fungo utilizado, a produção de enzimas é influenciada pelos seguintes fatores: concentração do inóculo, composição nutricional do meio de cultura (carbono, nitrogênio, fósforo e potássio), temperatura, pH, agitação e taxa de oxigenação, período de interrupção do cultivo, presença de indutores e ausência de inibidores (TAVARES, 2006).

Em geral, a enzima lacase tem sua produção estimulada, independente do fungo, em faixa de pH de 4,5 e 6,0, e temperatura de incubação de 25°C a 30°C (THURSTON, 1994). O cultivo agitado favorece a produção da enzima, porém quando excessivo pode provocar *stress* mecânico e reprimir a produção (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003). Substâncias com a mesma complexibilidade da lignina atuam como indutoras da lacase nos cultivos (TAVARES, 2006).

A síntese de LiP e MnP é estimulada por altas taxas de oxigenação e reprimida quando submetida a cultivos agitados (WESENBERG et al., 2003).

O conhecimento a respeito do comportamento enzimático em função das condições de cultivo e do fungo selecionado é fundamental para o desenvolvimento de processos e aplicação industrial.

a) Cultivos com *Trametes* sp. e *Inonotus splitgerberi*

Os basidiomicetos *Inonotus splitgerberi* e *Trametes* sp. são fungos da podridão branca de gêneros amplamente aplicados em pesquisas de biodegradação da lignina (MOREDO et al., 2003).

Fungos do gênero *Inonotus* podem produzir lignina peroxidase. Em estudo o *Inonotus splitgerberi* apresentou formação de halos de oxidação indicando a produção de fenoxidases, xilanase e celulases (BACHMANN, et al, 2011). Porém, não existem relatos sobre a produção de LiP pelo fungo na base de dados BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase).

O basidiomiceto *Trametes* sp. sintetiza a lacase, a MnP e a LiP para degradação da lignina. Algumas substâncias mostraram-se indutoras da lacase em *Trametes versicolor*, entre elas: ácido ferúlico, xenobiótico 2,5-xilidina, nonifenol, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)), 1-hidroxibenzotriazole (BOURBONNAIS et al., 1997, CHEN, et al. 2003). Lorenzo e colaboradores (2002) verificaram a indução da lacase em cultivos compostos por materiais lignocelulolíticos, como semente de uva, talos de uva e farelo de cevada. *Trametes villosa*, foi induzida a produzir a lacase pela adição de ácido violúrico (LI; XU; ERIKSSON, 1999). A produção de LiP foi estimulada na mesma espécie de *Trametes* pela presença de 2-cloro-1,4-dimethoxybenzene no meio (TEUNISSEN; FIELD, 1998).

3.3 DETERMINAÇÃO DE SMX E TMP POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é umas das técnicas mais empregadas na quantificação de fármacos em matrizes como esgoto e águas (DA CRUZ, 2012). O método analítico permite a separação de distintas espécies químicas que constituem uma amostra. A separação é promovida devido às interações das moléculas da amostra (soluto), com a fase estacionária (coluna cromatográfica) e móvel (solvente). A análise por CLAE permite não apenas separar compostos, mas também quantificar e identificar (CHUST, 1990). A identificação dos compostos é feita pelo detector, acoplado ao CLAE, o qual deve ser escolhido conforme as características das espécies químicas que se deseja separar (CHUST, 1990). O detector de arranjo de diodos (DAD) e os espectrômetros de massa (MS) são os mais empregados em CLAE (DA CRUZ, 2012).

Akay e Ozkan (2002) determinaram a presença simultânea de SMX e TMP por CLAE, utilizando um detector ultravioleta, com eluição isocrática, coluna C18, fase móvel composta por metanol: água (60:40 v/v), acidificada em pH 3, com ácido ortofosfórico 10%.

Da Cruz (2012) determinou SMX, TMP e diclofenaco, utilizando um detector de arranjo de diodos, com eluição por gradiente, coluna C18, com fase móvel composta por H₂O/acetonitrila/trietilamina (77:22:1 v/v, pH 5,9) para TMP, e acetonila para determinação de SMX.

3.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios de atividade biológica permitem estimar a concentração e/ou potência de uma substância, através da resposta biológica produzida pela interação da mesma com um agente biológico (RANG et al., 2007).

Entre as técnicas, existem os testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos, que permitem avaliar se determinado antimicrobiano é capaz de

inibir o crescimento de um microrganismo. Diferentes técnicas podem ser aplicadas para mensurar a sensibilidade, *in vitro*, apresentada por bactérias expostas a antimicrobianos, entre elas a técnica de concentração inibitória mínima.

Para a realização dos testes de sensibilidade, é feita a adição de caldo em tubos ou microplacas, podendo ser utilizado o ágar, em placa de petri. Aos meios, são adicionadas várias concentrações dos agentes antimicrobianos. Em seguida, são inoculadas aos meios, suspensão padrão de uma bactéria. O material é incubado, a 35°C, e após 24 horas é determinada a concentração inibitória mínima (CIM).

Diversas bactérias podem ser empregadas nos ensaios antimicrobianos. A inibição da atividade bacteriana em função da exposição de SMX e TMP pode ser testada pelas bactérias que são conhecidas como sensíveis à ação da combinação de SMX e TMP, conforme Quadro 5.

Quadro 5. Bactérias sensíveis à ação de sulfametoxazol + trimetoprima

Grau de sensibilidade	Bactérias sensíveis
<p>Microrganismos geralmente sensíveis a SMX, por análise <i>in vitro</i>, concentração inibitória mínima < 80 mg L⁻¹</p>	<p>Cocos: <i>Branhamella catarrhalis</i></p> <p>Bastonetes gram-negativos: <i>Haemophilus influenzae</i> (betalactamase positivo, betalactamase negativo), <i>Haemophilus parainfluenzae</i>, <i>E. coli</i>, <i>Citrobacterfreundi</i>, <i>Citrobacter spp.</i>, <i>Klebsiella oxytoca</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, outras <i>Klebsiella spp.</i>, <i>Enterobacter cloacae</i>, <i>Enterobacter aerogenes</i>, <i>Hafnia alvei</i>, <i>Serratia marcescens</i>, <i>Serratia liquefaciens</i>, outras <i>Serratia spp.</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Morganella morganii</i>, <i>Shigella spp.</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>, outras <i>Yersinia spp.</i>, <i>Vibrio cholerae</i>.</p> <p>Diversos bacilos gram-negativos: <i>Edwardsiella tarda</i>, <i>Alcaligenes faecalis</i>, <i>Pseudomonas cepacia</i>, <i>Burkholderia (Pseudomonas) pseudomallei</i>.</p> <p>Baseado em experiência clínica: <i>Brucella</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Nocardia asteroides</i>, <i>Pneumocystis carinii</i>, <i>Cyclospora cayetanensis</i>.</p>
<p>Microrganismos parcialmente sensíveis a SMX, concentração inibitória mínima = 80-160 mg L⁻¹.</p>	<p>Cocos: <i>Staphylococcus aureus</i> (metecilino-sensíveis e metecilino-resistentes), <i>Staphylococcus spp.</i> (coagulase - negativo), <i>Streptococcus pneumoniae</i> (penicilino-sensíveis, penicilino-resistentes).</p> <p>Bacilos gram-negativos: <i>Haemophilus ducreyi</i>, <i>Providencia rettgeri</i>, outras <i>Providencia spp.</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Salmonella enteritidis</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (anteriormente denominado <i>Xanthomonas maltophilia</i>).</p> <p>Bastonetes gram-negativos: <i>Acinetobacter lwoffii</i>, <i>Acinetobacter anitratus</i> (principalmente <i>A. baumannii</i>), <i>Aeromonas hydrophila</i></p>

Fonte: Adaptado da Bula Bactrim®

4 METODOLOGIA

Para a aplicação e avaliação do processo de oxidação biológico e químico, na degradação do SMX e TMP, o trabalho foi dividido em três etapas (Figura 4).

Figura 4. Etapas envolvidas para realização da pesquisa

<p>ETAPA 1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Otimização da produção de enzimas ligninolíticas (lacase, MnP e LiP). •Estudo cinético, dosagem de lacase, MnP, LiP, açúcares redutores, proteínas totais, compostos fenólicos, do cultivo de <i>Trametes sp.</i> e <i>Inonotus splitgerberi</i> nas condições otimizadas. •Obtenção dos extratos enzimáticos.
<p>ETAPA 2 DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> •Biodegradação <i>in vitro</i> do sulfametoxazol e trimetoprima por ação enzimática (lacase comercial e extrato enzimático bruto). •Degradação do sulfametoxazol e trimetoprima por fotólise. •Combinação dos processos de oxidação química e biológica
<p>ETAPA 3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA</p>	<ul style="list-style-type: none"> •Avaliação da atividade antibacteriana através da determinação da concentração mínima inibitória sobre crescimento de <i>E. coli</i>.

4.1 ETAPA 1 - PRODUÇÃO DE ENZIMAS

4.1.1 Basidiomicetos

As enzimas ligninolíticas foram produzidas em escala laboratorial, através do cultivo de duas espécies de basidiomicetos, *Trametes sp.*, disponível na coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia (Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Brasil), e *Inonotus splitgerberi*, isolado e cedido pela Embrapa Florestas (Colombo, Paraná, Brasil). As cepas foram mantidas a 4°C, em ágar extrato de malte (AEM).

4.1.2 Preparo do inóculo para cultivo líquido

O inóculo foi preparado através da transferência de um disco (12 mm de diâmetro) do cultivo *Trametes* sp. ou *Inonotus splitgerberi* para uma placa de petri contendo meio AEM. As culturas foram mantidas a 28°C, até que os micélios atingissem a borda da placa de petri (inóculo viável). O inóculo viável, foi obtido no sétimo dia para *Trametes* sp. e décimo quinto dia para *Inonotus splitgerberi*.

4.1.3 Produção enzimática em cultivo líquido

Os cultivos líquidos para a produção enzimática foram preparados em frascos erlenmeyer de 250 mL, adicionados 50 mL de meio, definido nos delineamentos experimentais (seção 4.1.4). Todos os meios foram autoclavados a 121°C, 1 atm, durante 15 minutos. Após resfriamento do meio, foram adicionados três discos (12 mm de diâmetro) de inóculo viável (AEM com micélio do fungo). Os frascos foram fechados com tampão de algodão e gaze, para permitir a aeração. Os cultivos foram mantidos em estufa a 28°C.

4.1.4 Delineamentos experimentais

4.1.4.1 Produção enzimática por *Trametes* sp.

A produção das enzimas ligninolíticas pelo fungo *Trametes* sp. foi avaliada em função da composição do meio nutricional. Um delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} , foi escolhido para o estudo, e foram avaliados, portanto, sete fatores, em dois níveis de concentração, totalizando 8 composições distintas de meio de cultura. No delineamento, buscou-se induzir a atividade de lacase e MnP, enzimas

que já foram detectadas em fungos do mesmo gênero (Rogalski et al.,1990; Johansson et al., 1993).

A produção enzimática foi avaliada em função da presença/ausência dos componentes: glicose, $C_6H_{12}O_6$, (0 ou 10 g L⁻¹) como fonte de carbono, fosfato de potássio, KH_2PO_4 (0 e 3 g L⁻¹) como fonte de potássio e fósforo, peptona de carne (0 ou 5 g L⁻¹) como fonte de nitrogênio, sulfato de manganês, $MnSO_4$, (0 ou 1mM) como indutor de MnP, sulfato de cobre, $CuSO_4$ (0 ou 1 mM) como indutor de lacase, bagaço de uva bordô, *Vitis labrusca* (0 ou 5 g L⁻¹) e casca de arroz (0 ou 10 g L⁻¹), como estimuladores de enzimas ligninolíticas (MOREDO et al., 2003; ELISASHVILI et al., 2006). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a matriz do delineamento experimental (Tabela 4), em duplicata.

Tabela 4. Planejamento fatorial fracionário (2^{7-4}) para selecionar as variáveis significativas para a produção de lacase por *Trametes sp.*

Composição do Meio	Glicose (g L ⁻¹)	Peptona (g L ⁻¹)	Casca de arroz (g L ⁻¹)	Bagaço de uva (g L ⁻¹)	KH_2PO_4 (g L ⁻¹)	$MnSO_4$ (mM)	$CuSO_4$ (mM)
1	0	0	0	5	3	1	0
2	10	0	0	0	0	1	1
3	0	5	0	0	3	0	1
4	10	5	0	5	0	0	0
5	0	0	10	5	0	0	1
6	10	0	10	0	3	0	0
7	0	5	10	0	0	1	0
8	10	5	10	5	3	1	1

Os cultivos foram interrompidos no sétimo dia, e as atividades enzimáticas de lacase, MnP e LiP foram determinadas conforme descrito na seção 4.2.1. A composição de meio que mais favoreceu a produção de lacase foi selecionado, e utilizado em uma cinética de 15 dias, com monitoramento os parâmetros: Atividade de lacase, MnP e LiP, açúcares redutores, compostos fenólicos e proteínas totais.

4.1.4.2 Produção de LiP por *Inonotus splitgerberi*

A produção das enzimas pelo fungo *Inonotus splitgerberi* foi avaliada em função do meio nutricional. Foi realizado um delineamento experimental fatorial fracionário, com sete fatores, em dois níveis. O objetivo do experimento foi promover a produção de LiP, já que algumas espécies do gênero produzem esta enzima (XU et al., 2017).

A produção enzimática foi avaliada em função da concentração dos componentes: glicose, $C_6H_{12}O_6$, (0 ou 5 g L⁻¹) como fonte de carbono, peptona de carne (0 ou 2,5 g L⁻¹) como fonte de nitrogênio, sulfato de manganês, $MnSO_4$, (0 ou 0,1 mM) como indutor de MnP, sulfato de cobre, $CuSO_4$ (0 ou 1 mM) como indutor de lacase, álcool veratrílico (0,1 ou 0,4 mM) como indutor de Lignina Peroxidase, bagaço de uva bordô, *Vitis labrusca* (5 ou 10 g L⁻¹) e casca de arroz (10 ou 20 g L⁻¹), como estimuladores de enzimas ligninolíticas (MOREDO et al., 2003; ELISASHVILI et al., 2006). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com a matriz do delineamento experimental (Tabela 5), em duplicata.

Tabela 5. Planejamento fatorial para a produção de enzimas ligninolíticas por *Inonotus splitgerberi*.

Composição do Meio	Glicose (g L ⁻¹)	Peptona (g L ⁻¹)	Casca de arroz (g L ⁻¹)	Bagaço de e uva (g L ⁻¹)	Álcool veratrílico (mM)	MnSO ₄ (mM)	CuSO ₄ (mM)
1	0	0	10	10	0,4	0,1	0
2	5	0	10	5	0,1	0,1	1
3	0	2,5	10	5	0,4	0	1
4	5	2,5	10	10	0,1	0	0
5	0	0	20	10	0,1	0	1
6	5	0	20	5	0,4	0	0
7	0	2,5	20	5	0,1	0,1	0
8	5	2,5	20	10	0,4	0,1	1

Os cultivos foram interrompidos no sétimo dia, e a presença das enzimas lacase, MnP e LiP foram avaliadas conforme descrito na seção 4.2.1. A composição de meio que mais favoreceu a produção de LiP foi selecionado, e utilizado em uma cinética de 15 dias, com monitoramento os parâmetros: Atividade de lacase, MnP e LiP, açúcares redutores, compostos fenólicos e proteínas totais.

4.1.4.2.1 Otimização da composição do meio de cultivo para a produção de LiP por *Inonotus splitgerberi*.

Um delineamento experimental do tipo *Box-Behnken Design* foi realizado para determinar a condição ótima da composição do meio, partindo dos resultados do planejamento fatorial, em que os fatores peptona, casca de arroz e o sulfato de cobre mostraram-se significativos para a produção de LiP. As variáveis reais e codificadas constam na Tabela 6.

Tabela 6. Níveis das variáveis estudadas para otimização da produção de LiP no delineamento experimental Box-Behnken, com 3³, e 3 pontos centrais

Composição do meio	Peptona (%)	CuSO ₄ (mM)	Casca de arroz (%)
1	0,25	0,1	0,25
2	2,00	0,1	0,25
3	0,25	0,50	0,25
4	2,00	0,50	0,25
5	0,25	0,25	0,1
6	2,00	0,25	0,1
7	0,25	0,25	0,50
8	2,00	0,25	0,50
9	1,00	0,1	0,1
10	1,00	0,50	0,1
11	1,00	0,1	0,50
12	1,00	0,50	0,50
13	1,00	0,25	0,25
14	1,00	0,25	0,25
15	1,00	0,25	0,25

4.1.5 Cinética final de produção enzimática por *Trametes sp.* e *Inonotus splitgerberi*

A cultura de *Trametes sp.*, otimizada para lacase, e a de *Inonotus splitgerberi* otimizada para a produção de LiP, foram submetidas a uma cinética de quinze dias, e diariamente, dois cultivos foram interrompidos, e o extrato utilizado para avaliação dos seguintes parâmetros: atividade de lacase (seção 4.2.1), manganês peroxidase (seção 4.2.1), lignina peroxidase (seção 4.2.1), evolução do pH, consumo de açúcares redutores (seção 4.2.2), concentração de compostos fenólicos (seção 4.2.3) e proteínas totais (seção 4.2.4).

4.1.6 Obtenção dos extratos enzimáticos

Após a etapa de produção, os cultivos líquidos foram filtrados em papel filtro (80 g), permitindo a retenção da maior parte do micélio e obtenção do filtrado, que foi centrifugado a 8113 g por 15 minutos. O sobrenadante, extrato enzimático, foi utilizado para determinações enzimáticas, dosagem de açúcares redutores, compostos fenólicos, proteínas totais e nos experimentos de biodegradação. As determinações foram realizadas através de técnicas de absorvância, utilizando espectrofotômetro Bel UV-M51 UV-VISÍVEL, com faixa de operação de 200 a 1000 nm.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 Determinação da atividade de lacase, MnP e LiP

A atividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente a 420 nm, através do acompanhamento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulphonate) (HOU et al., 2004). Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,55 mL de

tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) e 300 µL de ABTS (10 mM). Os tubos foram colocados em banho termostático a 40°C, e a reação teve seu início pela adição de 150 µL do extrato enzimático. A quantificação de lacase foi realizada no quinto minuto, quando a solução foi transferida para cubeta e realizada a medição da absorbância.

A atividade da enzima MnP foi avaliada através de espectrofotometria a 270 nm, pela oxidação do sulfato de manganês II (WARIISHI; VALLI; GOLD, 1992). Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,1 mL de tampão malonato de sódio (50 mM, pH 4,5), 300 µL de sulfato de manganês (10 mM) e 300 µL extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 300 µL de H₂O₂ (0,5 mM), e acompanhada por 5 minutos.

A atividade da enzima LiP foi determinada espectrofotometricamente a 651nm pela oxidação do Azure B (ARORA; GILL, 2001). Em tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL de tampão tartarato de sódio (125 mM, pH 3), 500 µL de Azure B (0,160 mM) e 500 µL de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 500 µL de H₂O₂ (2 mM), e acompanhada por 5 minutos.

Para a conversão da leitura das absorbâncias em segundos (abs/s) em Unidade de Enzima/Litro (U L⁻¹), foi utilizada a Equação 7.

$$U L^{-1} = ((\Delta abs)/\epsilon V t) 10^6 \quad (7)$$

Onde: Δabs : Absorbância final - absorbância inicial, ϵ = coeficiente de extinção molar. ABTS: 36,00 M⁻¹ cm⁻¹, Sulfato de Manganês II: 11590 M⁻¹ cm⁻¹ e Azure B: 48,80 Mm⁻¹ cm⁻¹, V=quantidade de extrato enzimático (L), T=tempo de reação (minutos).

Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol do substrato ABTS/sulfato de manganês ou Azure B por minuto.

4.2.2 Determinação da concentração de açúcares redutores

A quantificação de açúcares redutores foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) (SAQIB; WHITNEY, 2011). Em tubos de ensaio foram

adicionados 1 mL de amostra e 4 mL de DNS. Os frascos foram agitados por 30 segundos, incubados no banho em fervura por 5 minutos e resfriados em banho de gelo por 1 minuto. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro UV-vis em 540 nm. A curva padrão foi preparada com glicose, no lugar da amostra, em seis concentrações compreendidas entre 0,15 e 0,9 mg L⁻¹ (Apêndice A).

4.2.3 Determinação da concentração de compostos fenólicos

A quantificação do teor de compostos fenólicos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Em balões de 10 mL foram adicionados 5 mL de água destilada, 0,150 mL de amostra e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos de reação, foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 15 %, e os balões foram avolumados e armazenados no escuro por 2 horas. Após este tempo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-vis em 765 nm. A curva padrão foi preparada com ácido gálico, no lugar da amostra, em seis concentrações compreendidas entre 0,05 e 0,5 mg mL⁻¹ (Apêndice A).

4.2.4 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração proteínas totais nos extratos foi quantificada pelo método de Bradford. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,25 mL de amostra e 2,5 mL do reagente de Bradford. A leitura de absorbância foi realizada no quinto minuto a 595 nm. Curvas analíticas foram elaboradas com albumina bovina, no lugar da amostra, em seis concentrações compreendidas entre 25 e 150 mg L⁻¹ (Apêndice A).

4.2.5 Análise de biodegradação de SMX e TMP por CLAE-DAD

A biodegradação dos compostos SMX e TMP foi avaliada pela presença ou ausência dos fármacos na amostra após os tratamentos. A quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD).

O equipamento utilizado foi o cromatógrafo Agilent (modelo 1260), equipado com detector DAD (Modelo 1260), injetor automático, operado com coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm; 5µm) e pré-coluna C18 da mesma marca.

Todas as amostras foram filtradas com filtro seringa (membrana de éster de celulose de 0,45 µm) antes da análise por CLAE, e armazenadas em vial até a realização das análises. Os solventes empregados apresentavam grau HPLC.

As condições de operação para determinação dos fármacos SMX e TMP, seguiram a metodologia proposta por Hermann, et al., 2015. As condições de operação constam Quadro 6.

Quadro 6. Condições cromatográficas para análise de TMP e SMX

Condições	Valores
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL
Temperatura da coluna	Temperatura ambiente
Tipo de coluna	Coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5µm)
Eluição isocrática	TMP: Metanol/H ₂ O (30:70), ajustado para pH 3,0 com ácido ortofosfórico. SMX: Metanol/H ₂ O (35:65), ajustado para pH 3,0 com ácido ortofosfórico
Tempo de retenção (min)	TMP: 4,8; SMX: 8,5
Deteccção (DAD)	TMP: 206 nm, SMX: 266 nm

Para determinação da concentração de SMX e TMP nas amostras após o tratamento enzimático, foram elaboradas curvas analíticas a partir dos padrões puros de TMP e SMX (Apêndice A), compostas por seis concentrações (1, 2, 40, 60, 80 e 100 mg L⁻¹). A equação da reta obtida em cada curva analítica foi utilizada para determinar as concentrações de fármaco presentes nas amostras.

4.3 ETAPA 2 - DEGRADAÇÃO *IN VITRO*

4.3.1 Degradação biológica: ação enzimática

Os experimentos de biodegradação *in vitro* foram baseados nas metodologias descritas por Wen; Jia; Li, et al. (2009), Lloret et al. (2010), Inoue et al. (2010), Zhang e Geissen (2010). Soluções dos fármacos SMX (Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$) e TMP (Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$) foram preparadas separadamente, nas concentrações iniciais de 50 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1} . A enzima lacase foi adicionada como agente de degradação, o ensaio foi realizado com a adição de 50 unidades da enzima, de fonte comercial (lacase pura, produzida por *Trametes versicolor*, Sigma-Aldrich), e do extrato enzimático produzido por *Trametes* sp. A presença e a ausência dos seguintes mediadores foram avaliadas: 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazol-6-sulfonato, ABTS (0 ou 1 mM) e 1-hidroxibenzotriazole, HBT (0 ou 1 mM), ambos como mediadores de lacase, e peróxido de hidrogênio (0 ou 25 mg L^{-1}) como mediador MnP e LiP.

O volume final de reação foi de 5 mL, o qual foi atingido pela adição de tampão acetado de sódio, 5 mM, pH 5. As reações foram incubadas no escuro, a 37°C , agitação de 120 rpm, com duração de 24 horas.

Os testes de biodegradação de SMX e TMP foram realizados separadamente. As reações foram realizadas em tubos de ensaio, em duplicata. Para cada condição e concentração de fármaco, foram adicionados tubos controle (brancos), nos quais as reações foram processadas na ausência das enzimas (inativadas pelo calor). Em cada condição estudada, foi incluído um controle composto por todos os reagentes empregados exceto o fármaco. As condições experimentais constam na Tabela 7.

Tabela 7. Degradação de SMX e TMP nas concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹, na presença/ausência de HBT, ABTS e peróxido de hidrogênio

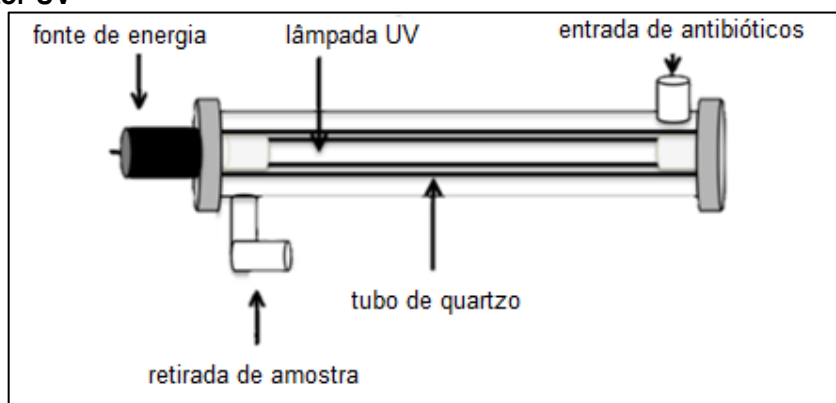
Tipo de lacase	Conc. inicial de SMX ou TMP (mg L ⁻¹)	Conc. inicial de HBT (mM)	Conc. inicial de ABTS (mM)	Conc. inicial de peróxido de hidrogênio (mg L ⁻¹)
Extrato enzimático / lacase comercial	100	0	0	25
	100	1	0	25
	100	0	1	25
	50	0	0	25
	50	1	0	25
	50	0	1	25
	100	0	0	0
	100	1	0	0
	100	0	1	0
	50	0	0	0
	50	1	0	0
	50	0	1	0

Ao final do período de 24 horas de tratamento, a reação enzimática foi interrompida por aquecimento (10 minutos em banho aquecido a 90°C). As amostras foram mantidas a 4°C até a realização das análises cromatográficas (seção 4.2.5) e testes antimicrobianos (seção 4.4).

4.3.2 Degradação química: fotólise direta

Os antibióticos SMX e TMP foram utilizados na concentração inicial de 50 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹, respectivamente, mantendo a proporção do medicamento comercial (20:1 m/m). A degradação química foi realizada em um reator UV de bancada (Germitec, modelo GPJ-Jr), com um volume útil de um litro, lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão (28 W), separada do meio de reação por tubo de quartzo e taxa de fluxo de 10 mL s⁻¹ (Figura 5). As amostras foram removidas nos tempos de reação: 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min.

Figura 5. Reator UV



4.3.3 Degradação combinada

Os antibióticos SMX e TMP foram utilizados na concentração inicial de 50 mg L⁻¹ e 10 mg L⁻¹, conforme combinação farmacêutica (20:1 m/m). A solução foi tratada quimicamente, conforme descrito na seção 4.3.1. Alíquotas do efluente tratado por fotólise foram removidas nos tempos 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 min, e submetidas ao tratamento enzimático. O tratamento enzimático foi realizado com a aplicação de extrato bruto de *Trametes* sp., contendo 50 unidades de lacase. A degradação biológica foi realizada conforme descrito na seção 4.3.1.

4.4 ETAPA 3 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

A atividade antibacteriana de SMX e TMP após os tratamentos foi avaliada utilizando *Escherichia coli* (ATCC 25922). As bactérias foram pré-cultivadas a 37°C, durante 24 horas em ágar Mueller-Hinton. A turbidez da suspensão bacteriana foi ajustada ao padrão McFarland 0,5. Esta suspensão bacteriana foi utilizada para ensaios bacterianos de concentração inibitória mínima (MIC), preparados de acordo com o WIEGAND et al., 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *TRAMETES SP.*

A produção enzimática depende do fungo utilizado e da composição do meio de cultivo, por isso, é fundamental selecionar um fungo capaz de produzir as enzimas desejadas e definir a composição do meio capaz de garantir que estas proteínas sejam produzidas nas maiores quantidades no menor tempo. A Tabela 8 mostra os resultados da produção enzimática pelo fungo *Trametes sp.* nas oito composições de meio testadas (mencionadas na Tabela 4). A produção das enzimas lacase, MnP e LiP foi, como esperado, influenciada pela composição do meio. Considerando os valores e o desvio padrão da atividade de LiP, não foi possível observar influência da composição do meio na produção dessa enzima.

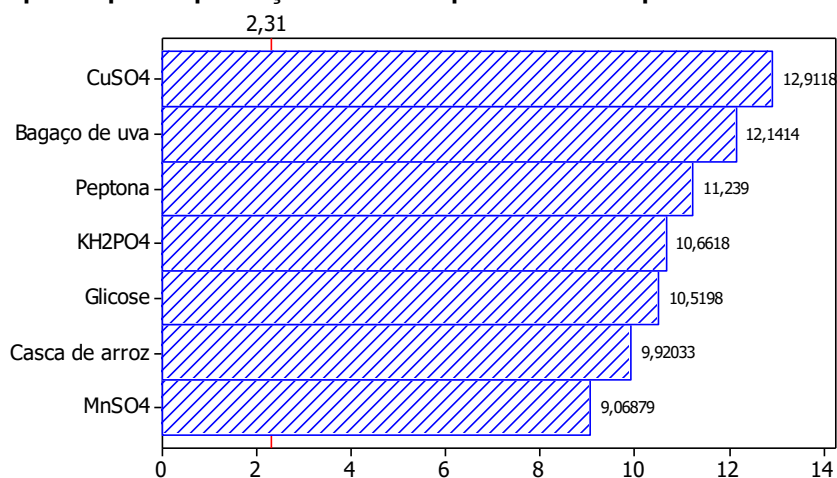
Tabela 8. Produção de lacase, MnP e LiP por *Trametes sp.* através do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} . Os melhores resultados de produção de Lacase e MnP estão destacados

Composição do meio de cultivo	Lacase (U L ⁻¹)	MnP (U L ⁻¹)	LiP (U L ⁻¹)
1	250,33 ± 15,40	ND*	0,33 ± 0,12
2	302,83 ± 18,31	ND*	0,29 ± 0,01
3	496,00 ± 83,28	7,62 ± 4,31	0,29 ± 0,08
4	419,78 ± 241,99	ND*	0,28 ± 0,03
5	509,44 ± 14,30	0,64 ± 0,90	0,25 ± 0,01
6	186,00 ± 11,16	ND*	0,24 ± 0,07
7	113,01 ± 106,69	1,01 ± 1,43	0,37 ± 0,11
8	3975,56 ± 381,52	ND*	0,27 ± 0,00

*ND: Atividades enzimáticas não detectadas.

Todas as variáveis testadas foram classificadas como significativas, Figura 6, e apresentaram efeito positivo com nível de confiança de 95% para a produção de lacase.

Figura 6. Diagrama de Pareto. Significância das variáveis do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} para a produção de lacase por *Trametes sp.*



Os parâmetros estatísticos da falta de ajuste, erro puro e teste F foram utilizados para avaliar se o modelo proporcionou um ajuste satisfatório (Tabela 9). A falta de ajuste do modelo obtido não foi significativa e o teste F mostrou que o modelo utilizado ajustou adequadamente os dados experimentais. O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo linear foi de 0,99 (R ajustado de 0,98), indicando que 98% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo. A Equação 8 demonstra a resposta obtida para os dados da composição do meio.

$$y = -781,6 + 4394 \text{ glicose} - 4695 \text{ peptona} + 414,4 \text{ casca de arroz} + 507,2 \text{ bagaço de uva} + 445,4 \text{ KH}_2\text{PO}_4 + 378,8 \text{ MnSO}_4 + 539,3 \text{ CuSO}_4 \quad (8)$$

Tabela 9. Análise de variância da atividade de lacase em função das variáveis analisadas

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calculado	P-valor
Soma dos efeitos	23602246	7	3371749	120,78	0
Puro Erro	223337	8	27917		
Total Soma dos Quadrados	23825583	15	27917		

Analisando o diagrama de Pareto (Figura 6), o sulfato de cobre foi a variável que apresentou o efeito mais significativo para a produção de lacase. A concentração de cobre de fato pode causar indução ou inibição da enzima, dependendo da espécie e linhagem do fungo e está relacionada à sensibilidade destes ao cobre

(BIRHANLIAND e YESILADA, 2017). O efeito positivo da presença de Cu^{+2} na cultura está de acordo com Qin et al. (2017). Estes autores comparam o efeito da adição de Cu^{+2} (1 mM) no cultivo líquido com *Trametes versicolor* (cepa 50001) e constataram que a produção de lacase foi 121% superior em relação ao meio com ausência de cobre. Asgher et al. (2004) também demonstraram que a adição de 1 mM de sulfato de cobre a um meio de cultura sólido com *Trametes versicolor* (cepa IBM-04) causou aumento na atividade total de lacase. A adição de cobre, segundo Chen et al. (2003), pode aumentar a síntese da enzima, pois o cobre atua como um inibidor de uma protease extracelular que degrada a lacase. Além disso, Collins e Dobson (1997) relataram que a adição de cobre pode aumentar os níveis de RNA mensageiro, segundo os autores, a adição de 400 μM de cobre foi suficiente para elevar os níveis de RNA mensageiro de lacase após 15 minutos, com aumento progressivo durante seis horas.

Os resíduos lignocelulósicos possuem compostos fenólicos, conhecidos por induzir a síntese de lacase (LORENZO et al., 2002). O efeito positivo do bagaço de uva e da casca de arroz nos cultivos foi observado neste estudo, sendo a presença de bagaço de uva o segundo fator que mais contribuiu para a produção da enzima. Os bons resultados obtidos com bagaço de uva podem ser justificados pela composição do resíduo. No bagaço utilizado foi detectada a presença de dois ácidos fenólicos, o ácido gálico e o ácido cafeico, nas concentrações de $1044 \pm 0,29$ mg e $0,0134$ mg por grama de bagaço, respectivamente (MAKARA, 2015). Ambos os compostos já foram reportados como indutores de lacase (KOROLJOVA SKOROVOGATKO et al., 1998; SOUZA et al., 2004; GALHAUP e HALTRICH, 2001; PERALTA et al., 2004). Souza et al. (2004) analisaram a composição química do bagaço de uva *Vitis vinifera* L, e detectaram a presença de carbono na forma de frutose ($0,0891 \text{ g g}^{-1}$) e glicose ($0,0795 \text{ g g}^{-1}$), os dois açúcares são facilmente assimiláveis pelo fungo, e podem estar presentes no bagaço utilizado contribuindo na produção de biomassa fúngica e, conseqüente, no aumento de produção enzimática. Os resultados revelam que o bagaço de uva pode fornecer ao fungo vários compostos que atuam como indutores de lacase, permitindo que o resíduo seja valorizado e aplicado para a produção de enzimas. A casca de arroz, no entanto, foi um dos compostos que menos contribuiu para indução da enzima, mesmo possuindo uma fração considerável de lignina em sua estrutura, tipicamente 22% (KUMAR et al.

2010), a qual é responsável por induzir a atividade da enzima. O resultado está de acordo com a literatura, Risdianto et al. (2012) avaliaram a produção de lacase por *Marasmius* sp., *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* na presença de diversos resíduos agroindustriais, e verificaram que a casca de arroz, utilizada na concentração de 350 g L⁻¹, foi o resíduo que menos induziu a atividade da enzima, sendo detectada apenas nas culturas de *Marasmius* sp. e *Trametes hirsuta*, com pico de produção de 400,56 U L⁻¹ (8º dia) e 51,53 U L⁻¹ (4º dia). Em estudos de deslignificação, Lopes (2016) relatou que a casca de arroz possui grande resistência ao ataque microbiano, especialmente devido às grandes quantidades de cinzas e sílica que acabam contribuindo para este bloqueio. Os diferentes graus de indução de lacase pelos resíduos casca de arroz e o bagaço de uva podem também ser justificados pela diferença na natureza das ligninas, que influencia na sua composição, impactando na produção enzimática (SCHUWAZE, 2007).

A presença de peptona de carne foi positiva para a produção da enzima, este resultado está de acordo com Leatham e Kirk (1982) que relataram que o nitrogênio pode aumentar a produção de lacase por alguns fungos. Collins e Dobson (1997) verificaram uma correlação direta entre a concentração de nitrogênio e a expressão de lacase em *Trametes versicolor* (cepa 290), o experimento indicou que o nitrogênio regulou a nível transcricional a expressão das enzimas. Galhaup et al. (2002) sugerem que a concentração de nitrogênio no meio não é exatamente proporcional à atividade de lacase; os autores verificaram que um pequeno aumento na concentração de nitrogênio não elevou a produção de lacase, porém, a redução de nitrogênio levou à diminuição da atividade. Ryan et al. (2015) demonstraram que culturas líquidas de *Trametes versicolor* (cepa PPRI #3845) produzem atividade enzimática ligninolítica mais alta em resposta a um meio suficiente em nitrogênio (peptona, 10 g L⁻¹) que em concentrações entre 20 g L⁻¹ (alta) e 2 g L⁻¹ (baixo). Além da concentração de nitrogênio, o tipo de nitrogênio tem sido destacado como um fator de influência na produção de lacase. Neste estudo foi utilizada uma fonte orgânica de nitrogênio, a qual tem mostrado os melhores resultados para produção da enzima quando comparada a fontes inorgânicas. Strong (2011) obteve resultados interessantes quando demonstrou que a adição de nitrogênio orgânico a uma cultura líquida de *Trametes pubescens* (cepa MB89 i) produziu mais lacase (peptona > extrato de

levedura> extrato de malte) do que a adição de nitrogênio inorgânico (KNO_3 > NH_4NO_3 > NH_4Cl > H_2NCNH_2). Hou et al. (2004) também demonstraram que a adição de nitrogênio orgânico (peptona e extrato de levedura) a um meio de cultura líquido por *Pleurotus ostreatus* (cepa 32) produziu mais enzima do que a adição de nitrogênio inorgânico (uréia, sulfato de amônio e tartarato de amônio).

A presença de fosfato mostrou-se importante para a produção de lacase por *Trametes* sp., porém, não foi encontrado na literatura nenhum estudo relacionado à produção desta enzima por este fungo em função da concentração de KH_2PO_4 no meio. Sacchetto (2009) avaliou a produção de lacase por *Botryosphaeria rhodina* (cepa MAMB-05) na ausência/presença de KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e KH_2PO_4 , o estudo indicou que a produção de lacase foi favorecida pela presença de fosfato, e a melhor produção também foi obtida pelo uso de KH_2PO_4 , com produção de lacase sete vezes superior à produção na ausência de KH_2PO_4 .

A glicose, como fonte de carbono, contribuiu para a síntese de lacase, o resultado está de acordo com Galhaurp et al. (2002) que observam elevada atividade de lacase por *Trametes pubescens* em meios contendo altas concentrações de glicose, onde o aumento na concentração de glicose de 10 g L^{-1} para 40 g L^{-1} refletiu em uma produção cinco vezes maior de lacase.

O MnSO_4 mostrou ser um fator significativo para a produção de lacase na cepa testada. Em estudo conduzido por Kannaiyan et al. (2015) cultivos de *Dichomitus squalens* e *Ceriporiopsis subvermispora* apresentaram maior produção de lacase quando expostos a concentrações de MnSO_4 e o CuSO_4 , demonstrando a existência de uma interação entre estes compostos, capaz de elevar a atividade de lacase.

Para a produção de LiP e MnP as variáveis testadas não apresentaram efeito significativo (Figura 7 e 8). Rogalski et al. (1990) avaliaram a produção de lacase, MnP e LiP em quatro cepas de *Trametes versicolor*, e observaram que cada cepa de *Trametes* precisa de uma composição de meio específica para a produção significativa destas enzimas; logo, para a cepa testada os fatores avaliados não influenciaram a produção das enzimas MnP e LiP, devido ao metabolismo do fungo, ou devido aos fatores e níveis selecionados para o estudo.

Figura 7. Diagrama de Pareto. Significância das variáveis do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} para a produção de MnP por *Trametes* sp.

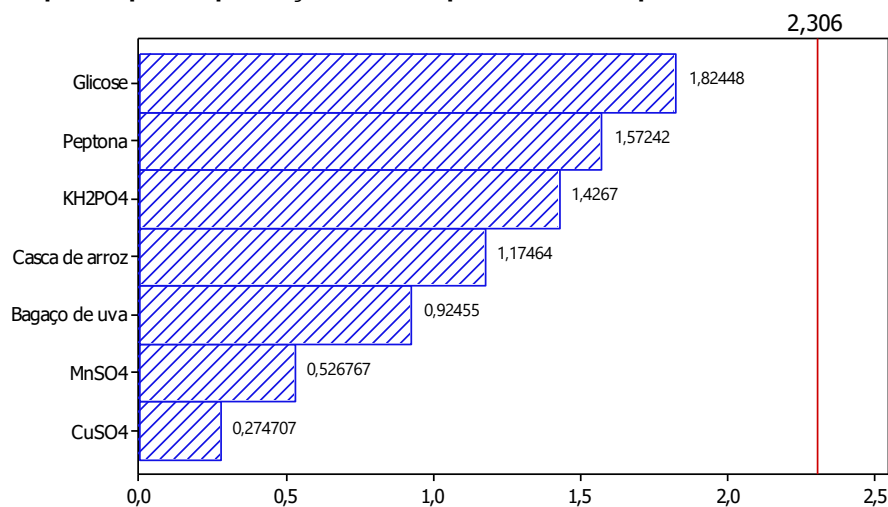
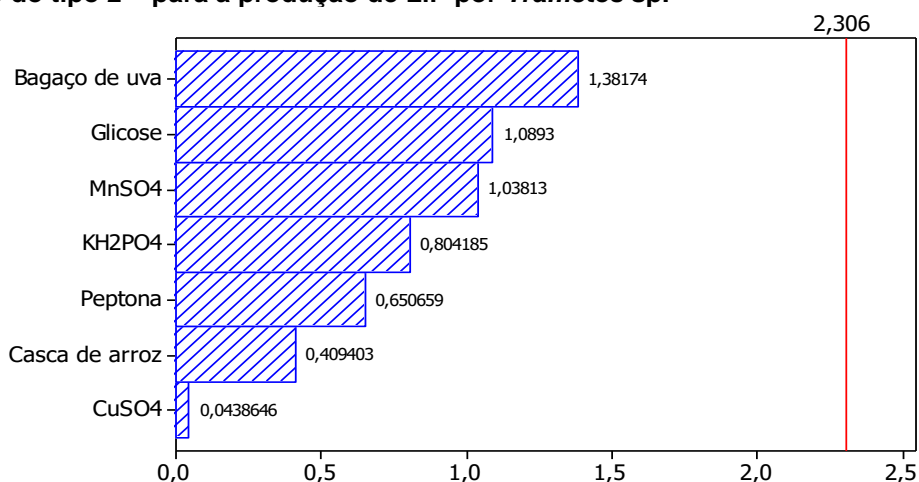


Figura 8. Diagrama de Pareto. Significância das variáveis do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2^{7-4} para a produção de LiP por *Trametes* sp.



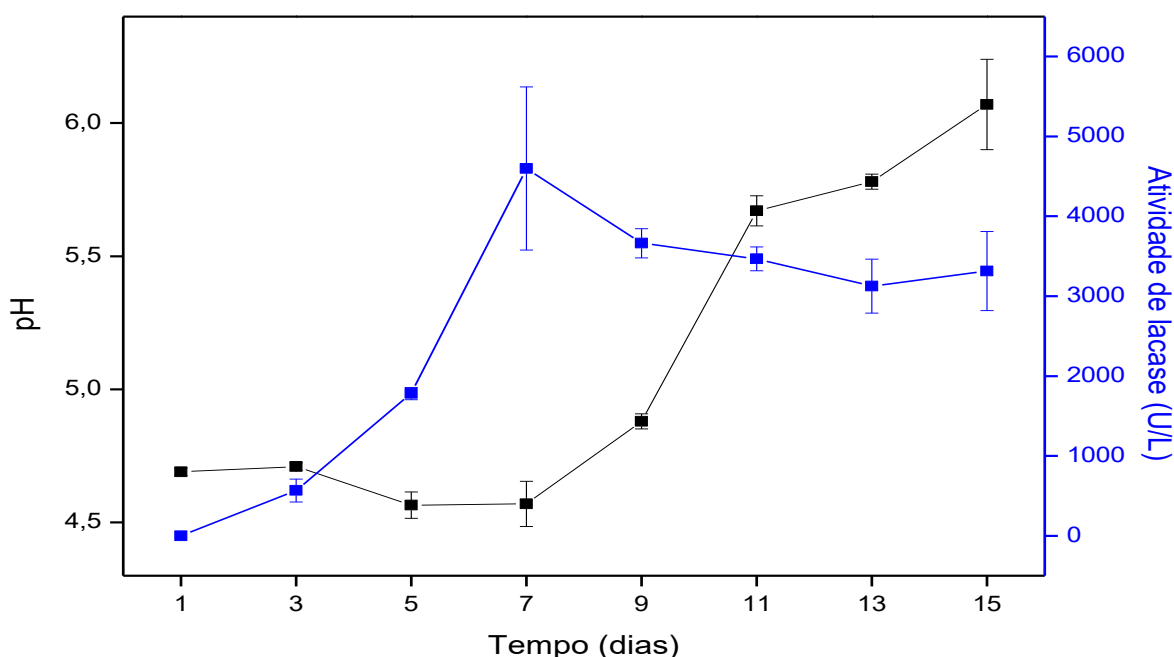
5.1.2 Cinética de *Trametes* sp.

A Figura 9 apresenta a cinética da produção de lacase na melhor condição selecionada no estudo de otimização (cultivo 8). O pico de atividade de lacase (4599 U L⁻¹) foi obtido no 7º dia de cultivo, em pH $4,57 \pm 0,085$, valor próximo ao considerado ideal para atividade de lacase (pH = 4,5), após este dia, a atividade de lacase foi estabilizada. Outros valores de produção de lacase por *Trametes* em meio contendo resíduos lignocelulósicos são reportados na literatura. Lorenzo et al. (2002)

alcançaram produção entre 500-600 U L⁻¹ de lacase entre os dias 24 e 37, pelo cultivo de *Trametes versicolor* (cepa CBS 100.29) em meio contendo cevada. Moredo et al. (2003) obtiveram 250 U L⁻¹ de lacase 25º dia em cultivo de *Trametes versicolor* (cepa CBS100.29) em meio suplementado com farelo de cevada, Bakkiyaraj et al. (2013) reportaram produção de 4643 U L⁻¹ pelo fungo *Trametes hirsuta* (cepa 141) utilizando farelo de arroz, um valor de atividade de lacase similar ao encontrado neste estudo.

O pH do meio não foi controlado e aumentou durante o estudo cinético (Figura 9) atingindo no último dia de cultivo pH 6,07 ± 0,17. Este comportamento é devido a produção de metabólitos que são secretados pelo próprio fungo. A produção enzimática.

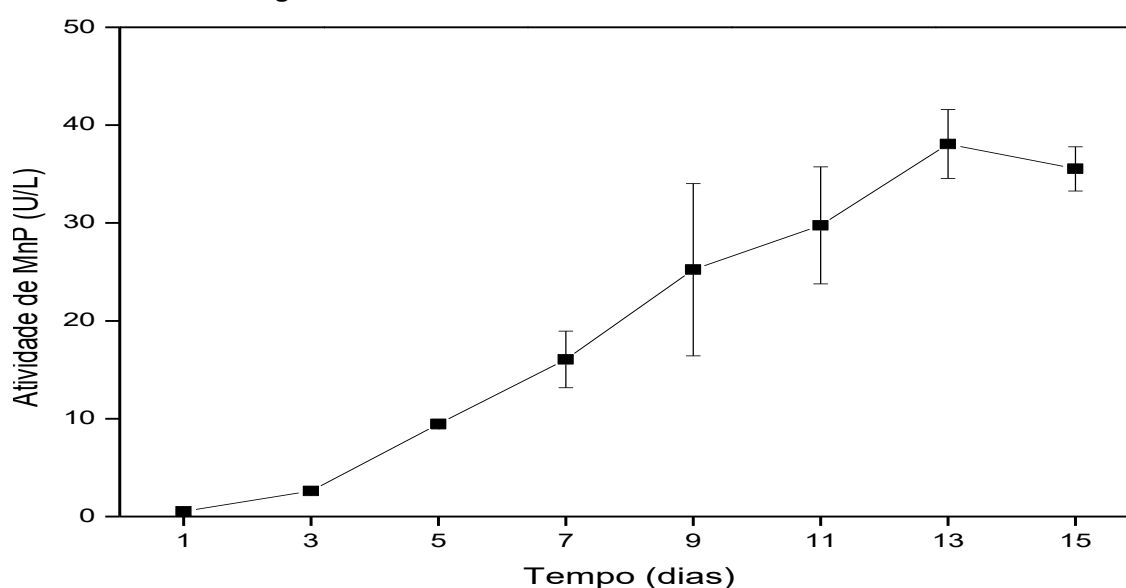
Figura 9. Cinética de produção de lacase por *Trametes* sp. nas melhores condições de produção: 10 g L⁻¹ C₆H₁₂O₆, 3 g L⁻¹ KH₂PO₄, 5 g L⁻¹ peptona de carne, 1 mM de MnSO₄, 1 mM de CuSO₄, 5 g L⁻¹ *Vitis labrusca* e 10 g L⁻¹ casca de arroz



A presença de MnP foi detectada, conforme Figura 10, o pico da atividade foi de 38 U L⁻¹, obtido no 13º do crescimento. A baixa produção de MnP está de acordo com o observado por Lorenzo et al. (2002), que demonstraram que os resíduos lignocelulósicos têm efeito negativo para a produção de MnP. Esses autores testaram a produção de MnP por *Trametes versicolor* (cepa CBS 100.29) utilizando resíduos

agroindustriais como indutores de enzimas ligninolíticas. A produção máxima obtida foi de 162 U L^{-1} de MnP na cultura controle e de 70, 36 e 14 U L^{-1} nas culturas com cevada, talo de uva, semente de uva, respectivamente. Os autores sugerem que a presença de resíduos ligninolíticos pode mudar a via metabólica do fungo para a produção de lacase.

Figura 10. Cinética de MnP produzida por *Trametes* sp. nas melhores condições de produção: $10 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $3 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 5 g L^{-1} peptona de carne, 1 mM de MnSO_4 , 1 mM de CuSO_4 , 5 g L^{-1} *Vitis labrusca* e 10 g L^{-1} casca de arroz



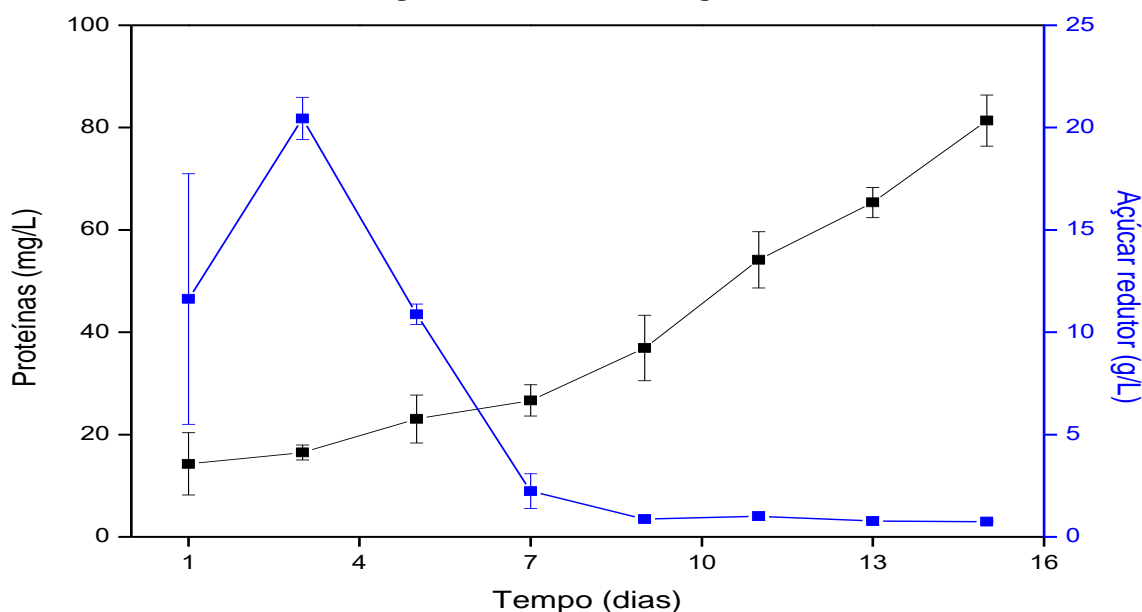
Nos ensaios cinéticos foram detectados níveis reduzidos de lignina peroxidase, sendo que a atividade máxima quantificada foi de $0,36 \pm 0,04 \text{ U L}^{-1}$ durante o primeiro dia de cultivo. Lorenzo et al. (2002) também obtiveram baixa produção de LiP em culturas de *Trametes versicolor* (cepa CBS 100.29) com incorporação de resíduos linocelulósicos no meio de cultivo. A expressão de peroxidases fúngicas em cultivos laboratoriais geralmente é baixa, e o mecanismo de indução é difícil de ser determinado (CONESA et al., 2000); porém neste estudo sua presença foi detectada mesmo na ausência de indutores.

A concentração de proteínas totais (Figura 11) aumentou gradativamente de $14,27 \pm 6,10 \text{ mg L}^{-1}$ (dia 1) para $81,37 \pm 5,01 \text{ mg L}^{-1}$ (dia 15), podendo estar relacionada à produção de biomassa fungica e a produção de lacase, MnP e outras enzimas, como

a celulase, cuja presença elevada foi reportada por Mswaka e Magan (1998) em cultivos de *Trametes modesta* e *T. pocas*.

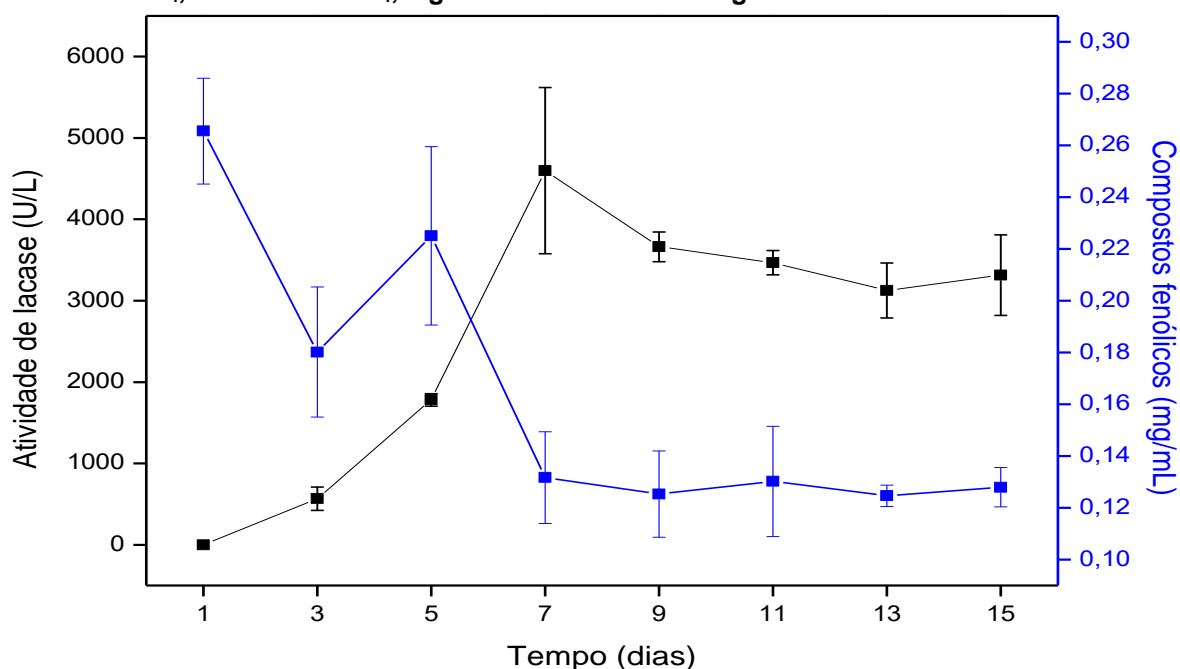
A concentração de glicose, medida pela análise de açúcares redutores (Figura 11), aumentou no 3º dia, e reduziu no 4º dia, atingindo níveis baixos a partir do 7º dia ($2,24 \pm 0,84 \text{ g L}^{-1}$) e estabilizando a concentração entre os dias 9 e 15 (na média de $0,82 \pm 0,16 \text{ g L}^{-1}$). Os resultados estão de acordo com o observado por Lorenzo et al. (2002) que também verificaram aumento na concentração de glicose nos primeiros dias de cultivo (dia 2) por *Trametes versicolor* (cepa CBS 100,29), seguida de redução para um valor de quase $0,5 \text{ g L}^{-1}$ nos últimos estágios de cultivo. O aumento da concentração de glicose no período inicial pode ter ocorrido devido à presença dos materiais ligninocelulósicos no meio, neste caso o bagaço de uva e casca de arroz, que podem possuir na sua composição polissacarídeos vegetais, como celulose e pectina, que provavelmente foram hidrolizados e convertidos em glicose no terceiro dia. O consumo de glicose pelo fungo ocorreu até o sétimo dia, quando a fonte de carbono praticamente esgotou e a produção de lacase atingiu seu pico de produção. Este efeito foi relatado por Galhaurp et al. (2002) que afirmam que a glicose pode funcionar como repressora da lacase, permitindo que a enzima só seja produzida diante da diminuição da concentração de açúcar no meio.

Figura 11. Cinética de glicose consumida e produção de proteínas por *Trametes* sp. nas melhores condições de produção: $10 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $3 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 5 g L^{-1} peptona de carne, 1 mM de MnSO_4 , 1 mM de CuSO_4 , 5 g L^{-1} *Vitis labrusca* e 10 g L^{-1} casca de arroz



A concentração de compostos fenólicos reduziu em 51% até o sétimo dia, permanecendo praticamente estável (na média de $0,13 \pm 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) até o último dia de cultivo. Este comportamento pode ter sido provocado pela degradação das substâncias fenólicas presentes no meio pela lacase (Figura 12), isto porque no sétimo de cultivo foi detectada a maior produção da enzima, promovendo a rápida degradação dos compostos fenólicos. Esta resposta está em acordo com o observado por Allard-Massicotte et al. (2017) que verificaram que quanto maior a quantidade de lacase no meio mais rápida é a degradação.

Figura 12. Cinética de compostos fenólicos versus produção de lacase por *Trametes sp.* nas melhores condições de produção: $10 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $3 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 5 g L^{-1} peptona de carne, 1 mM de MnSO_4 , 1 mM de CuSO_4 , $5 \text{ g L}^{-1} \text{ Vitis labrusca}$ e 10 g L^{-1} casca de arroz



5.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *INONOTUS SPLITGERBERI*

A Tabela 10 mostra os resultados da produção enzimática pelo fungo *Inonotus splitgerberi*. As maiores atividades de lacase e Mnp foram obtidas no cultivo com composição 7 e de LiP no meio com composição 1, 4 e 7.

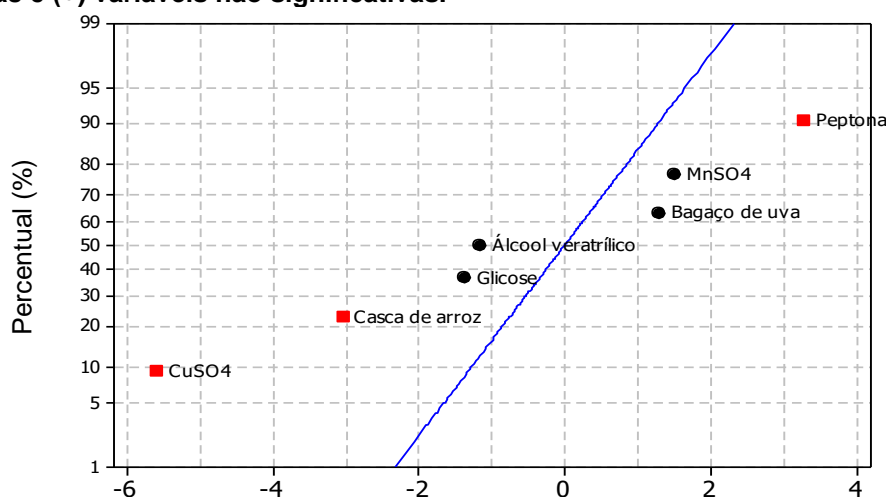
Tabela 10. Resultados do delineamento experimental fatorial fracionário do tipo 2⁷⁻⁴ para a produção de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase por *Inonotus splitgerberi*.

Composição do meio de cultivo	Lacase (U L ⁻¹)	MnP (U L ⁻¹)	LiP (U L ⁻¹)
1	ND*	ND*	0,55 ± 0,16
2	ND*	0,10 ± 0,13	0,30 ± 0,05
3	30,44 ± 36,85	ND*	0,37 ± 0,09
4	ND*	ND*	0,61 ± 0,03
5	12,77 ± 1,31	0,02 ± 0,02	0,23 ± 0,04
6	ND*	ND*	0,29 ± 0,02
7	55,33 ± 36,80	0,14 ± 0,20	0,55 ± 0,00
8	0,64 ± 0,26	ND*	0,31 ± 0,02

*ND: Atividades enzimáticas não detectadas.

Nenhum fator apresentou significância para a produção de lacase ou MnP. As variáveis significativas ($p < 0,05$) para a produção de LiP foram o sulfato de cobre, a casca de arroz e a peptona, apenas o último fator apresentou efeito positivo, conforme gráfico de probabilidade normal dos efeitos padronizados (Figura 13). O álcool veratrílico geralmente é reportado na literatura como indutor de LiP, porém, neste estudo não apresentou efeito significativo para a produção da enzima.

Figura 13. Gráfico de probabilidade normal dos efeitos padronizados. Efeito das variáveis na composição do meio para a produção de LiP por *Inonotus splitgerberi*. (■) variáveis significativas e (●) variáveis não significativas.



A presença de compostos de lignina em cultivos para a produção de LiP já foi reportada como não indutível. Zanirun et al. (2009) compararam a produção de

lignina peroxidase por *Pycnoporus* sp. na presença e ausência de compostos ligninicos, e verificaram que os meios com estes compostos apresentaram produção inferior ($0,19 \text{ U L}^{-1}$) à obtida nos meios com o componente ausente ($0,3 \text{ U L}^{-1}$). Isto provavelmente ocorre porque os compostos de lignina, apesar de ricos em fontes de carbono não são substratos para o crescimento do fungo, que precisa de outras fontes de carbono, prontamente disponíveis, para depois utilizar a lignina, produzindo para isto as LiP's.

A indução de LiP por peptona está de acordo com a literatura. Zeinab et al. (2013) verificaram que a concentração de nitrogênio no meio de cultura é fundamental para a produção de LiP. No estudo, fontes de nitrogênio como a peptona e a uréia estimularam a produção de LiP em cepas de *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus ostreatus*; sendo que a produção máxima de LiP foi obtida a 0,30% de uréia na concentração do meio com cultivo com as cepas de *P. chrysosporium* e *P. ostreatus*.

O modelo foi avaliado (Tabela 11), e a falta de ajuste não foi significativa e o teste F mostrou que o modelo utilizado responde adequadamente os dados experimentais. O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo linear foi de 0,87 (R ajustado de 0,77), o que indica que 77% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo.

Tabela 11. Análise de variância da atividade de LiP por *Inonotus splitgerberi* em função das variáveis analisadas

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calculado	P-valor
Soma dos efeitos	0,29666	7	0,042380	8,34	0,004
Puro Erro	0,04066	8	0,005082		
Total Soma dos Quadrados	0,33732	15	0,005082		

5.2.1 Otimização de Lip

No experimento Box-Behnken foram testadas três concentrações das três variáveis consideradas significativas para a produção de LiP: peptona, sulfato de cobre e casca de arroz. As concentrações de peptona foram elevadas, pois a variável

apresentou efeito significativo positivo e as concentrações da casca de arroz e sulfato de cobre foram reduzidas, pois apresentaram efeito significativo negativo. A produção enzimática obtida no ensaio consta na Tabela 12.

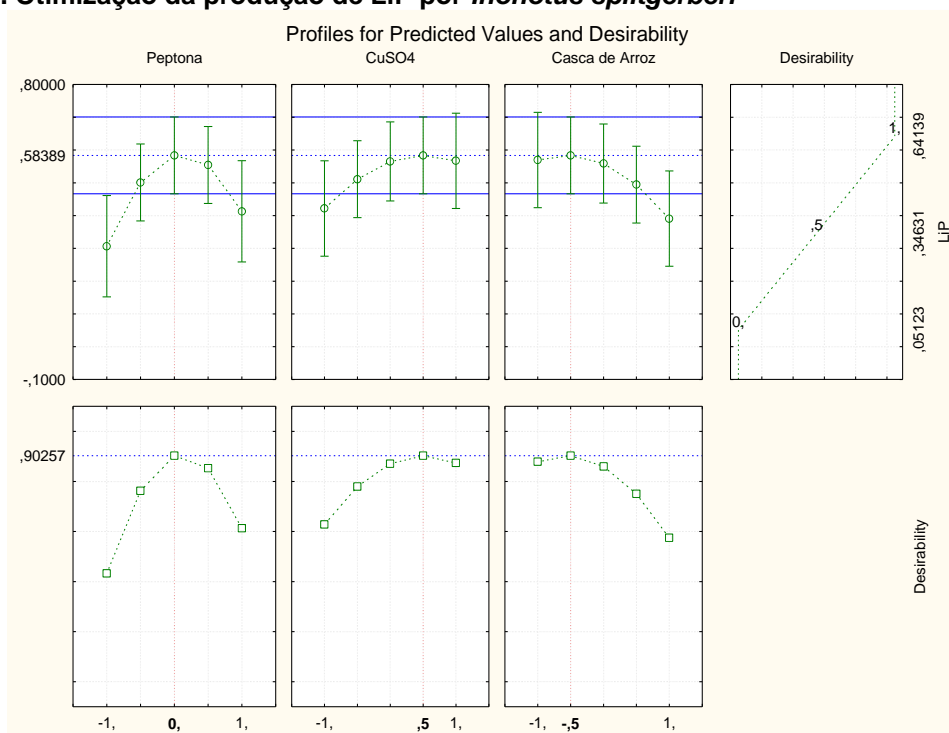
Tabela 12. Delineamento experimental Box-Behnken para avaliação das variáveis significativas para a produção de lignina peroxidase pelo fungo *Inonotus splitgerberi*

Composição do meio de cultivo	Peptona (%)	CuSO ₄ (mM)	Casca de arroz (%)	Lacase (U L ⁻¹)	MnP (U L ⁻¹)	LiP (U L ⁻¹)
1	0,25	0,1	0,25	ND*	ND*	0,05
2	2	0,1	0,25	8,69	ND*	0,27
3	0,25	0,5	0,25	47,23	ND*	0,36
4	2	0,5	0,25	14,47	ND*	0,35
5	0,25	0,25	0,1	5,89	ND*	0,21
6	2	0,25	0,1	5,90	ND*	0,44
7	0,25	0,25	0,5	28,91	ND*	0,11
8	2	0,25	0,5	7,96	10,37	0,24
9	1	0,1	0,1	10,21	0,52	0,41
10	1	0,5	0,1	18,72	5,19	0,51
11	1	0,1	0,5	8,30	3,21	0,41
12	1	0,5	0,5	18,26	8,01	0,29
13	1	0,25	0,25	20,04	4,23	0,64
14	1	0,25	0,25	16,84	4,68	0,55
15	1	0,25	0,25	28,92	15,03	0,47

*ND: Atividades enzimáticas não detectadas.

Os resultados da Tabela 12 foram analisados e as seguintes concentrações foram determinadas como ideais para a produção de LiP, conforme Figura 14: Peptona 1%, álcool veratrílico a 0,1 mM, CuSO₄ a 0,38 mM, glicose a 5 g L⁻¹, bagaço de uva a 1% e casca de arroz a 0,18%, a cinética de quinze dias foi realizada utilizando esta composição.

Figura 14. Otimização da produção de LiP por *Inonotus splitgerberi*



O modelo foi avaliado (Tabela 13), a falta de ajuste não foi significativa e o teste F mostrou que o modelo utilizado ajustou adequadamente os dados experimentais. O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o modelo linear foi de 0,89 (R ajustado de 0,71), o que indica que 71% da variabilidade na resposta pode ser explicada pelo modelo.

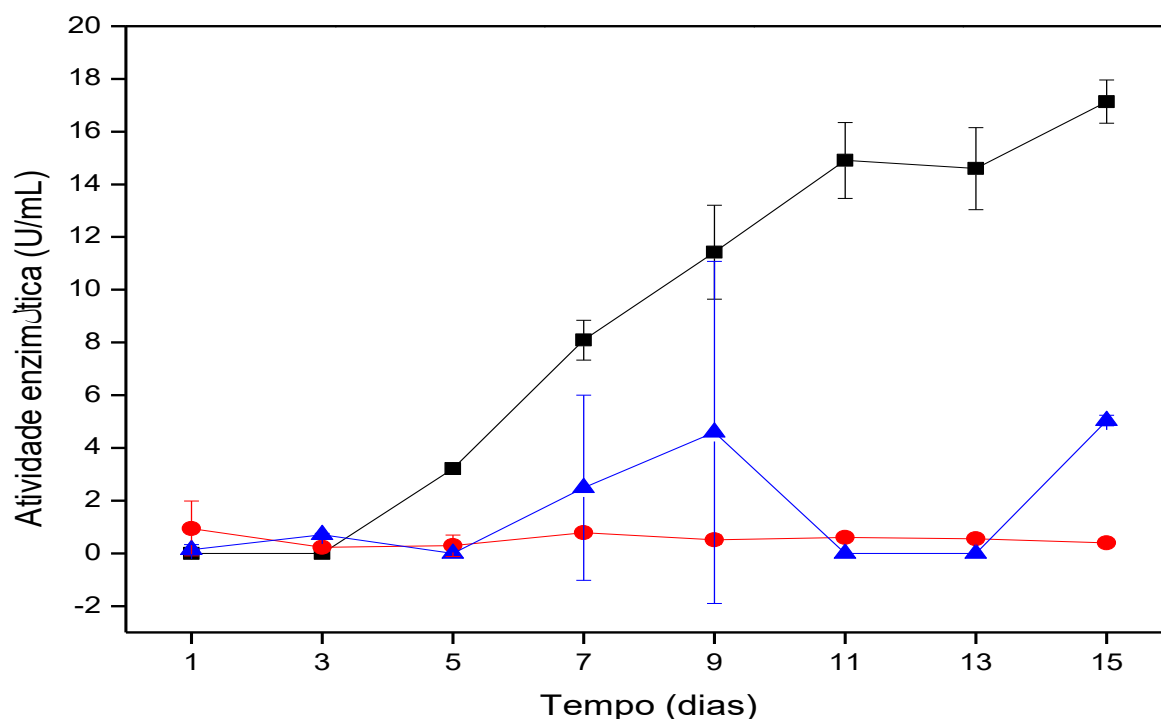
Tabela 13. Análise de variância da atividade enzimática em função das variáveis analisadas

	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calculado	P-valor
(1) Peptona L+Q	0,224599	2	0,112299	15,20073	0,007497
(2) CuSO ₄ L+Q	0,035975	2	0,017987	2,43476	0,182678
(3) Casca de Arroz L+Q	0,054856	2	0,027428	3,71261	0,102722
1*2	0,014126	1	0,014126	1,91207	0,225303
1*3	0,002730	1	0,002730	0,36960	0,569777
2*3	0,010922	1	0,010922	1,47839	0,278295
Puro Erro	0,036939	5	0,007388		
Total Soma dos Quadrados	0,361810	14	0,112299		

5.2.2 Cinética de *Inonotus splitgerberi*

A cinética de *Inonotus splitgerberi* (Figura 15) foi realizada a partir das condições otimizadas para a produção de LiP. As maiores produções enzimáticas foram obtidas no primeiro e sétimo dia para LiP ($0,94 \text{ U L}^{-1}$ e $0,79 \text{ U L}^{-1}$, respectivamente), no 6° dia para MnP ($5,61 \pm 1,61 \text{ U L}^{-1}$) e 15° dia para a lacase ($17,14 \pm 0,82 \text{ U L}^{-1}$).

Figura 15. Evolução da atividade enzimática de LiP, lacase, MnP em relação ao tempo de cultivo de *Inonotus splitgerberi*. (■) atividade de lacase (U L^{-1}) (▲) atividade de MnP (U L^{-1}) e (●) atividade de LiP (U L^{-1}). Condições otimizadas de produção: $5 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 1% peptona de carne, $0,1 \text{ mM}$ de álcool veratílico, $0,38 \text{ mM}$ de CuSO_4 , 1% de bagaço de uva *Vitis labrusca* e 0,18% de casca de arroz



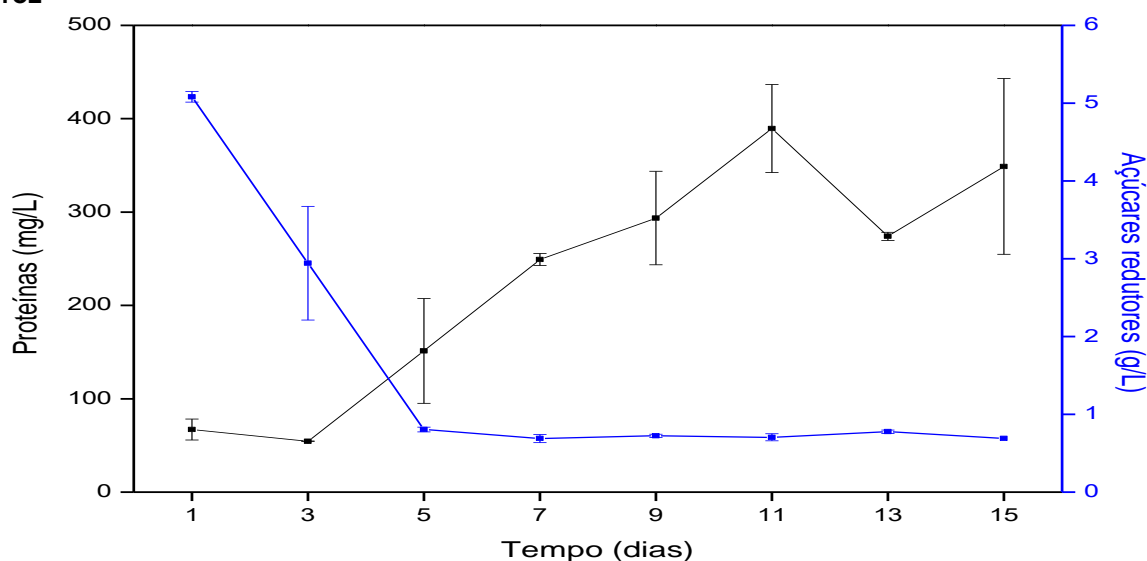
Os picos de produção de LiP e MnP estão de acordo com a literatura, já que são as primeiras enzimas que atuam na degradação da lignina; porém, a produção enzimática obtida neste estudo foi inferior aos valores reportados em outros estudos. Xu et al. (2017) realizaram cultivos com *Inonotus obliquus*, a produção de LiP foi de $123,4 \text{ U mL}^{-1}$, no quarto dia de cultivo, ainda no mesmo experimento os autores

observaram a produção máxima de 159 U mL^{-1} de MnP no segundo dia, porém não houve produção de lacase até o 12º dia de cultivo (período analisado).

Os reduzidos valores de atividade podem estar relacionados ao pH do meio, pois após 24 horas de cultivo o pH atingiu $4,83 \pm 0,03$, e aumentou até o último dia de cultivo (15º dia) quando alcançou $8,38 \pm 0,03$. A atividade ótima de LiP depende do microrganismo produtor da enzima, em geral a atividade ótima assumida de LiP é obtida em pH. Assim, o elevado pH do meio pode ter sido responsável pela redução da atividade da enzima. Zanirun et al. (2009) verificaram que o ponto isoelétrico das isoenzimas de lignina peroxidase produzidas por *Bjerkandera adustawere* é de 3,0 a 3,1, e ao atingir pH 7 no meio houve eliminação da atividade de LiP.

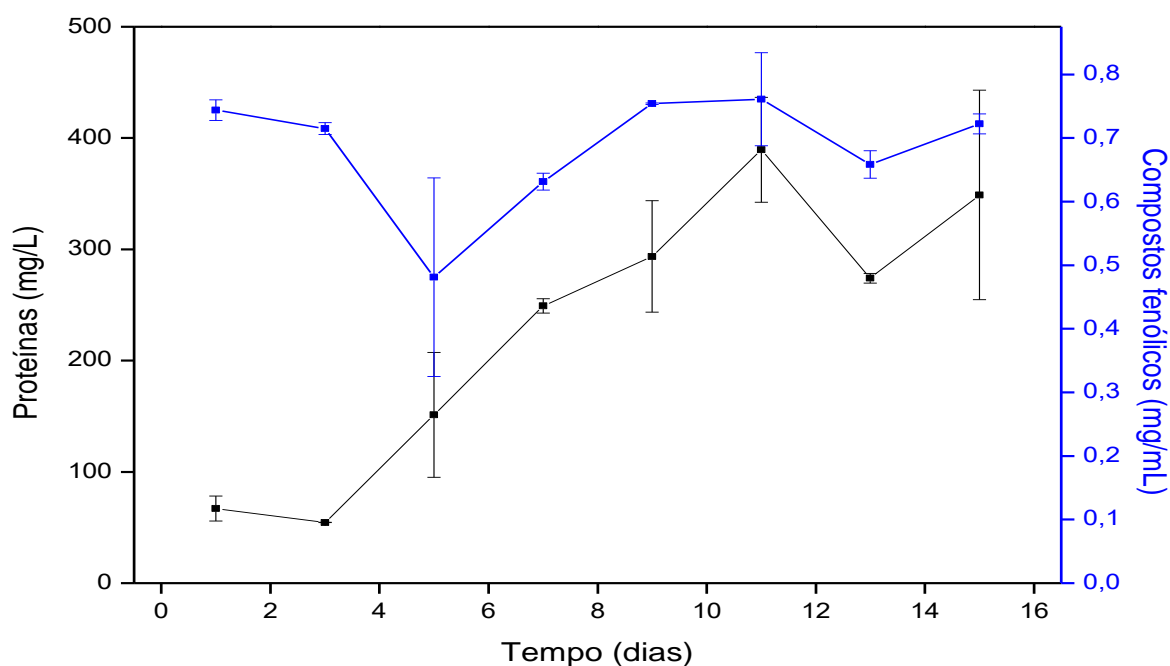
A concentração de glicose, medida na forma de açúcares redutores (Figura 16), diminuiu drasticamente do primeiro ao quinto dia, atingindo a concentração de $0,805 \pm 0,030 \text{ mg L}^{-1}$. Devido o esgotamento da fonte de carbono, houve a produção de lacase, conforme efeito reportado por Galhaurp et al. (2002). Além da lacase, a baixa concentração de açúcares promoveu a produção de outras enzimas, isto porque a quantidade de proteínas aumentou com o esgotamento do carbono. A concentração de açúcares praticamente estabilizou entre o 5º e 15º dia, atingindo no último dia de cultivo a concentração de $0,69 \text{ g L}^{-1} \pm 0,00$.

Figura 16. Cinética de glicose consumida e produção de proteínas por *Inonotus splitgerberi* em condições otimizadas para produção de LiP: $5 \text{ g L}^{-1} \text{ C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 1% de peptona de carne, 0,1 mM de álcool veratílico, 0,38 mM de CuSO_4 , 1% de bagaço de uva *Vitis labrusca* e 0,18% de casca de arroz



A presença de compostos fenólicos durante a cinética da reação, Figura 17, indica que as enzimas produzidas foram insuficientes para degradar os compostos fenólicos presentes no bagaço de uva e casca de arroz.

Figura 17. Cinética de compostos fenólicos versus produção de proteínas por *Inonotus splitgerberi*, em condições otimizadas para produção de LiP: 5 g L⁻¹ C₆H₁₂O₆, 1% peptona de carne, 0,1 mM de álcool veratílico, 0,38 mM de CuSO₄, 1% de bagaço de uva *Vitis labrusca* e 0,18% de casca de arroz



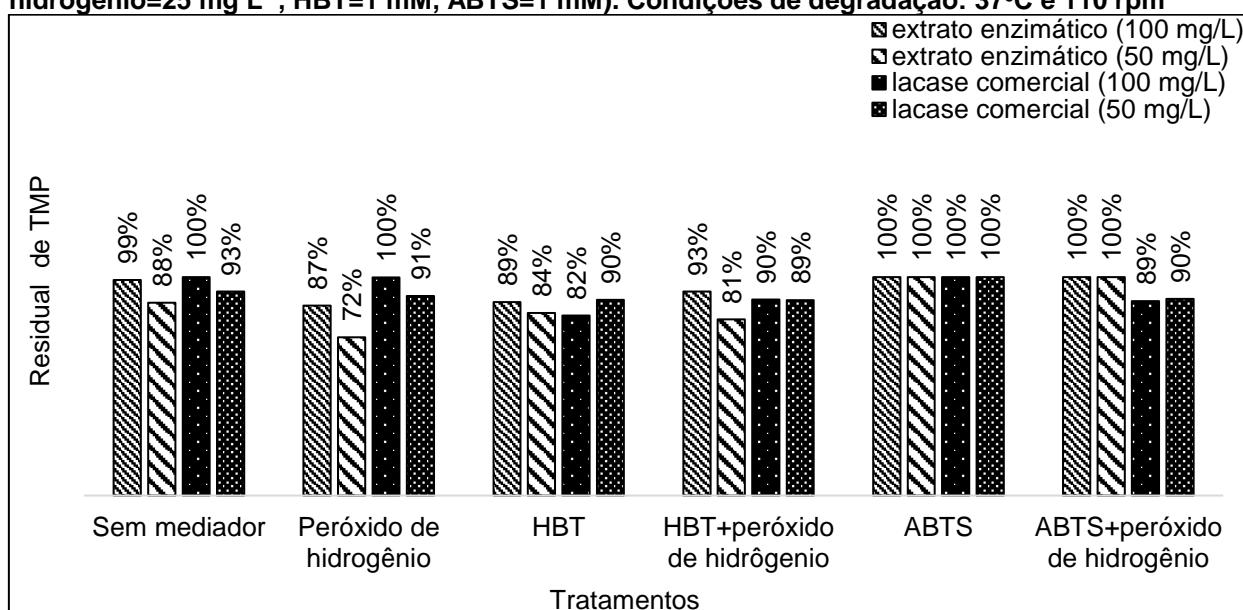
5.3 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA

A lacase é uma enzima capaz de degradar substratos fenólicos, porém incapaz de oxidar a maior parte dos compostos recalcitrantes não fenólicos (XU et al., 1996). Devido a esta limitação, as lacases podem ser combinadas com mediadores, moléculas pequenas que atuam como transportadoras de elétrons entre as enzimas e os compostos alvo, favorecendo a oxidação do substrato. O ABTS e o HBT são mediadores que têm demonstrado bons resultados na degradação de compostos recalcitrantes (ZENG et al., 2017; GARCÍA-GALÁN et al., 2011). Neste estudo foi avaliada a degradação dos fármacos pela aplicação de 50 unidades de lacase, na presença destes dois mediadores. Também foi testado o efeito do peróxido de

hidrogênio, considerando que enzimas como a MnP, cuja presença foi identificada no extrato enzimático produzido por *Trametes* sp., dependem de H_2O_2 para que o processo de catálise ocorra.

A Figura 18 mostra a remoção de TMP em cada um dos tratamentos avaliados. Fica evidente que a degradação depende do tipo de lacase aplicada, dos mediadores e da quantidade do fármaco.

Figura 18. Residual de trimetoprima após 24 horas de degradação enzimática utilizando 50 unidades de lacase (extrato ou comercial), na ausência/presença de mediadores (peróxido de hidrogênio=25 mg L⁻¹, HBT=1 mM, ABTS=1 mM). Condições de degradação: 37°C e 110 rpm



Na ausência de mediadores, as maiores taxas de remoção de TMP foram obtidas na menor concentração do fármaco (50 mg L⁻¹). O resultado demonstra que a quantidade de enzima aplicada foi insuficiente para degradar o TMP tanto na menor como na maior concentração. Considerando o modelo da cinética de Michaelis-Menten, provavelmente a pequena concentração de enzima aplicada frente às grandes quantidades de substrato utilizadas nos testes provocou saturação da mesma (WILSON e WALKER, 2010), ou seja, todos os sítios ativos estavam ocupados por moléculas de substrato ou produto. O tipo de enzima utilizada foi outro fator determinante na degradação sem mediadores, o extrato enzimático e a lacase comercial promoveram a remoção de 11,73 e 6,64% do fármaco, respectivamente, o

que demonstra maior eficiência do extrato frente a enzima comercial. O resultado pode ser atribuído à diversidade de enzimas que podem ser encontradas no extrato enzimático, as quais podem atuar sobre a molécula de TMP em conjunto, e promover a degradação de forma cooperativa, o mesmo não ocorre com a lacase comercial, que é insenta de outras proteínas.

A utilização de peróxido potencializou os resultados, especialmente nos experimentos realizados com extrato. Este resultado pode ser atribuído à presença de enzimas dependentes de peróxido de hidrogênio no extrato de *Trametes* sp., capazes de atuar na degradação do TMP em conjunto com a lacase. No extrato utilizado foi identificada a presença de MnP, que pode ter contribuído na degradação, este tipo de enzima é dependente de peróxido de hidrogênio, o que justifica o fato das maiores degradações terem sido obtidas quando utilizado o extrato enzimático e peróxido de hidrogênio.

A utilização de ABTS promoveu degradação apenas na presença de H₂O₂ e enzima comercial. Libardi Junior (2010) afirma que cada tipo de lacase possui faixa de atuação ótima para cada tipo de substrato. Isto justifica as diferentes respostas obtidas entre a lacase comercial e a lacase do extrato bruto, pois são enzimas produzidas por fungos diferentes, com pH ótimo para o substrato provavelmente distinto. O fato da lacase comercial não degradar o TMP quando na presença de ABTS e degradar TMP apenas na presença de ABTS + H₂O₂ pode ser explicada devido a alguma reação entre os três fatores, capaz de possibilitar a degradação.

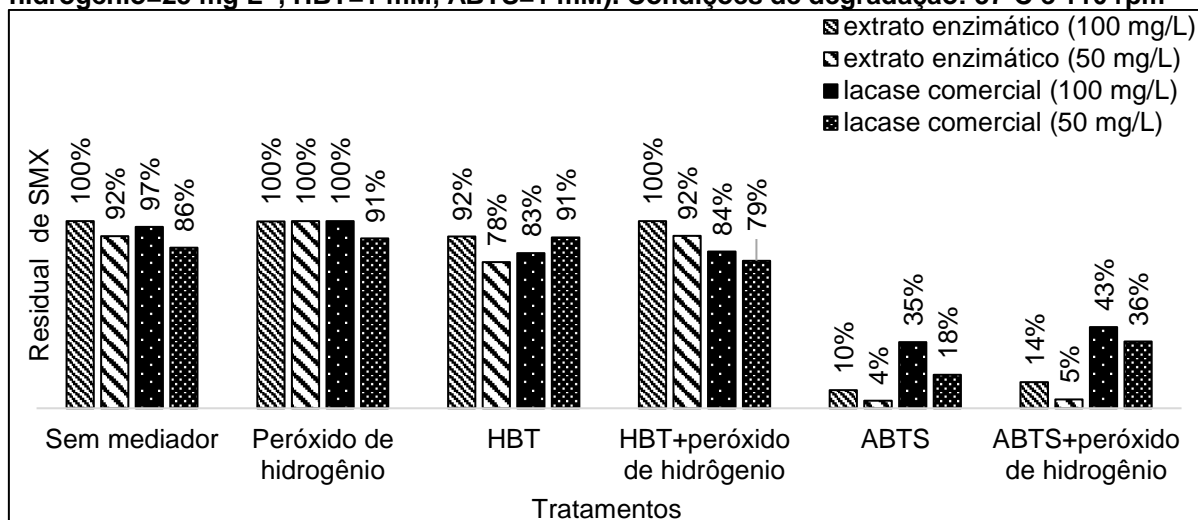
O HBT foi o melhor mediador para a reação de degradação de TMP, promovendo remoção superior a 10% em todas as condições testadas. A presença de H₂O₂ favoreceu a degradação nas reações com concentração inicial do fármaco de 50 mg L⁻¹, e desfavoreceu na concentração de 100 mg L⁻¹. Os melhores resultados de degradação com HBT foram obtidos pela lacase comercial na ausência de peróxido de hidrogênio e pelo extrato enzimático na presença de H₂O₂, com degradação de 16,45 ± 4,74% e 17,53 ± 4,08% respectivamente.

Os resultados apontam que a degradação de TMP pode ocorrer na ausência de mediadores. Nesta condição a aplicação de extrato enzimático é mais eficiente na degradação que a lacase comercial devido à diversidade de enzimas presentes no extrato fúngico. Os resultados ainda indicam que a lacase não é a principal enzima envolvida na degradação TMP, comprovando o resultado obtido por Araujo et al.

(2017) no qual os autores afirmam que não existe relação entre a presença da lacase a degradação de TMP.

O SMX na concentração de 50 mg L⁻¹ foi degradado na ausência de mediadores, atingindo taxas de remoção de 7,92% apenas pela aplicação do extrato enzimático e 14,13% utilizando a enzima comercial. Nos testes com concentração de 100 mg L⁻¹ de SMX, apenas as amostras tratadas com enzima comercial apresentaram degradação (remoção de 2,94%). Os resultados (Figura 19) indicam que para SMX, na ausência de mediadores, a degradação foi favorecida pelo uso da enzima comercial, ou seja, a degradação de SMX depende da lacase. Estudos confirmam o potencial da degradação do SMX através da lacase, porém as taxas de remoção obtidas neste estudo foram inferiores às reportadas na literatura. Provavelmente a quantidade de enzima aplicada foi pequena diante da concentração do fármaco. Guo e colaboradores. (2014) testaram a degradação de 10 mg L⁻¹ de SMX, pelo extrato de *Phanerochaete chrysosporium*, e após 24 horas de reação obtiveram degradação de 53%. Araujo et al. (2017) avaliaram a degradação de 50 mg L⁻¹ de SMX, pelo cultivo *Pleurotus ostreatus* e após 15 dias, observaram degradação de 74%. Xia e colaboradores (2014) obtiveram degradação, na ausência de mediadores, de 42% e 50% após 24 e 48 horas, respectivamente. A utilização de H₂O₂ desfavoreceu a degradação em todas as condições. Xia e colaboradores (2014) obtiveram degradação, na ausência de mediadores, de 42% e 50% após 24 e 48 horas, respectivamente.

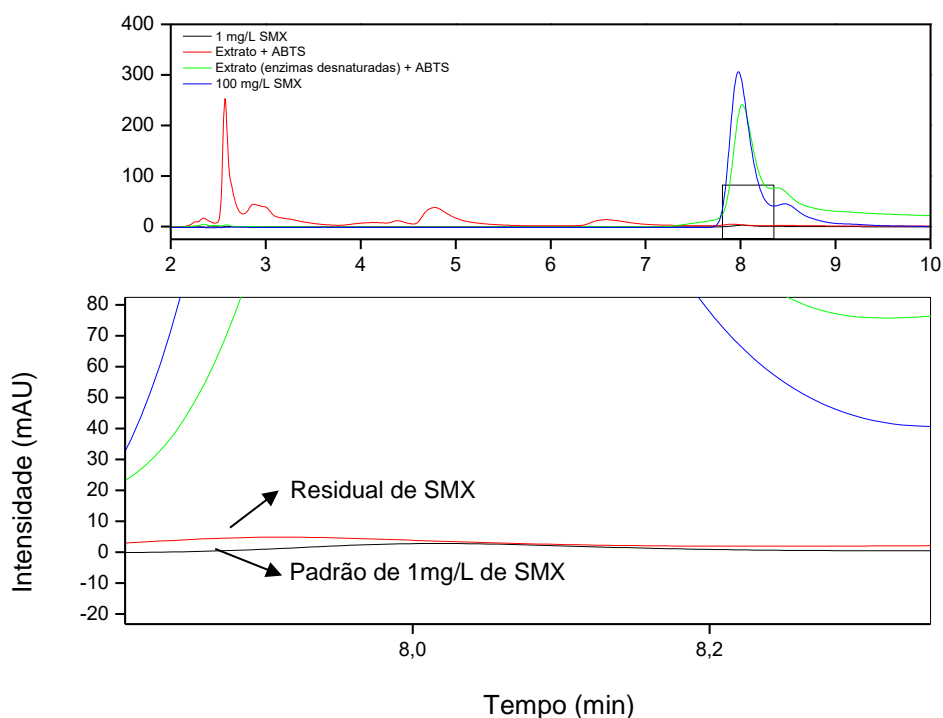
Figura 19. Residual de sulfametoxazol após 24 horas de degradação enzimática utilizando 50 unidades de lacase (extrato ou comercial), na ausência/presença de mediadores (peróxido de hidrogênio=25 mg L⁻¹, HBT=1 mM, ABTS=1 mM). Condições de degradação: 37°C e 110 rpm



O uso dos mediadores HBT e ABTS favoreceu a remoção de SMX, especialmente quando foram combinados com o extrato do fungo *Trametes* sp., o que revela uma maior afinidade entre os mediadores e a lacase do extrato bruto. Os sistemas extrato bruto+HBT e lacase comercial+HBT, promoveram a remoção de 21,81% e 8,6% respectivamente, já a aplicação do mediador redox ABTS combinado com extrato bruto e enzima comercial promoveu degradação de 95,91% e 82,17%, respectivamente. Analisando a Figura 20, é possível observar que após o tratamento do fármaco com extrato enzimático+ABTS, o pico de Sulfametoxazol ficou um pouco acima do padrão de 1 mg L⁻¹ de SMX, evidenciando o elevado grau de remoção.

Os resultados revelam que o SMX pode ser removido na ausência de mediadores e, neste caso, a aplicação da enzima comercial é mais eficiente. Entretanto, maiores degradações podem ser obtidas pelo uso de mediadores químicos como ABTS e HBT, os quais quando combinados com extrato enzimático, obtido por *Trametes* sp., são mais eficientes na remoção quando comparados ao uso da lacase comercial. O ABTS foi o melhor mediador para degradação de SMX, promovendo taxas de degradação até 77% superiores às obtidas com HBT.

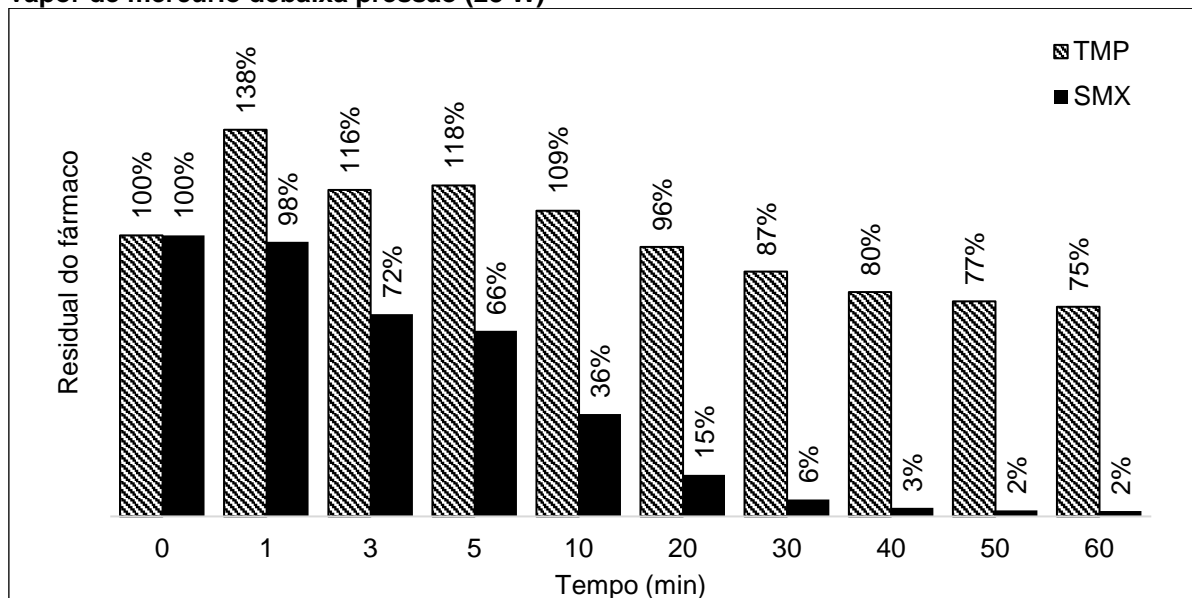
Figura 20. Cromatograma de degradação de 95,91% de SMX após 24 horas de tratamento do fármaco com 50 unidades de lacase (extrato) e ABTS (1 mM). Condições de degradação: 37°C e 110 rpm



5.4 DEGRADAÇÃO QUÍMICA POR FOTÓLISE DIRETA

Através do monitoramento do processo de fotólise por cromatografia em fase líquida foram obtidos os resultados apresentados na Figura 21. Os resultados indicam que o tratamento com radiação UVC pode promover a degradação de ambos fármacos. O SMX e o TMP são propensos a sofrer fotólise abaixo 310 nm (ABELLÁN et al., 2009); por isso, o processo de fotólise direta, com aplicação de energia de espectro de emissão de $\lambda=254$ nm, foi capaz de degradar as moléculas.

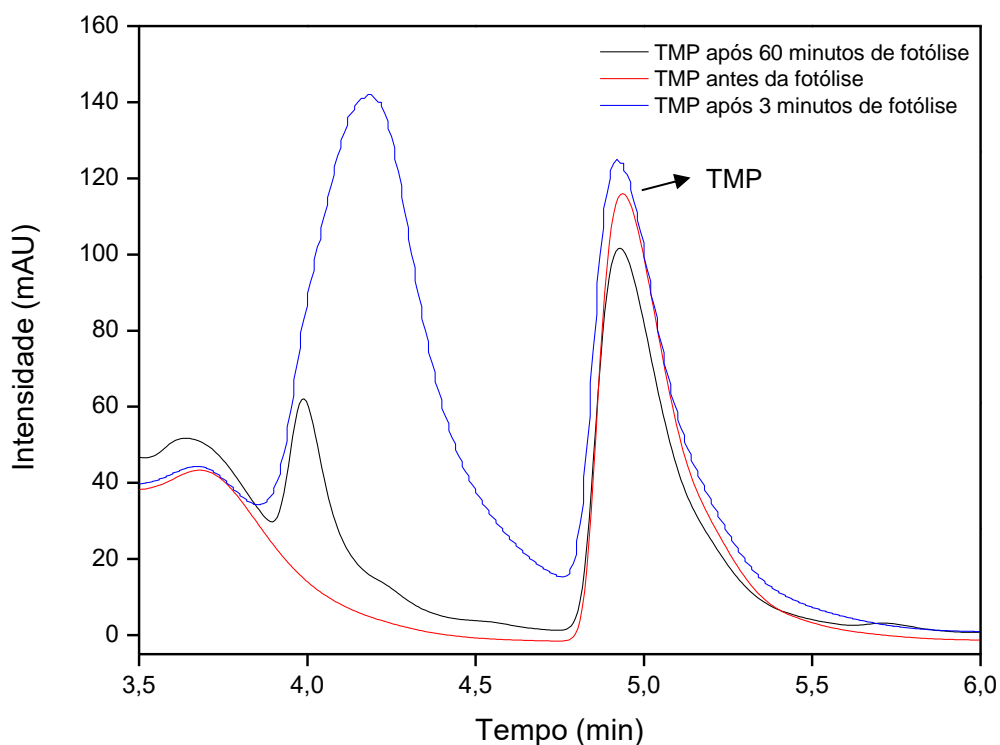
Figura 21. Oxidação química de SMX e TMP através fotólise direta em reator com lâmpada de vapor de mercúrio debaixo pressão (28 W)



O TMP foi a molécula mais resistente ao tratamento com UVC. O primeiro indício de degradação ocorreu após 20 minutos de reação, resultando em 4% de remoção. Estendendo-se o tratamento até 60 minutos de irradiação a degradação alcançou valores de 63% de remoção. O resultado está de acordo com Alharbi et al. (2017) que verificou 75% de remoção de 5 mg L⁻¹ após 90 min de exposição. Sirtori et al. (2010) constataram que 50% de 20 mg L⁻¹ foi removido após 780 minutos, com degradação total obtida em 1100 minutos.

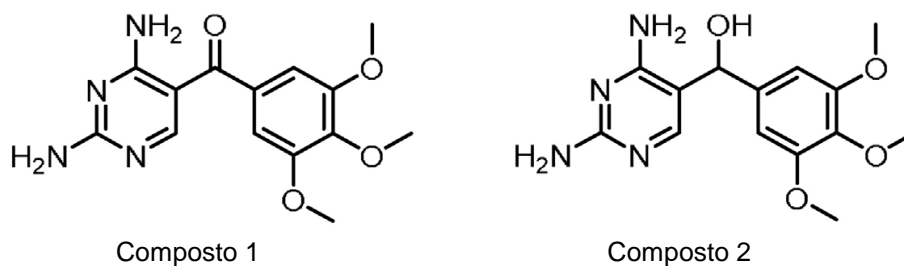
A concentração de TMP entre 1 e 10 minutos foi superior a concentração inicial, este efeito pode ser atribuído ao surgimento de intermediários de degradação. capazes de absorver a luz no mesmo comprimento de onda do TMP, na Figura 22, comprova que após o início da fotólise, houveram reações no meio, com surgimento de metabólitos, que influenciaram na linha base do TMP.

Figura 22. Metabólitos gerados durante a fotólise direta de TMP em reator com lâmpada de vapor de mercúrio debaixo pressão (28 W)



Após 10 minutos de reação a concentração de TMP diminuiu rapidamente, este comportamento já foi reportado por Sirtori et al. (2010), segundo os autores a reação inicial lenta é causada pela irradiação, e a mais rápida induzida pela formação de espécies altamente reativas de oxigênio, geradas por um produto da degradação do TMP (composto 1, Figura 23), derivado trimethoxybenzoylpyrimidine.

Figura 23. Compostos majoritários na degradação de TMP por fotólise

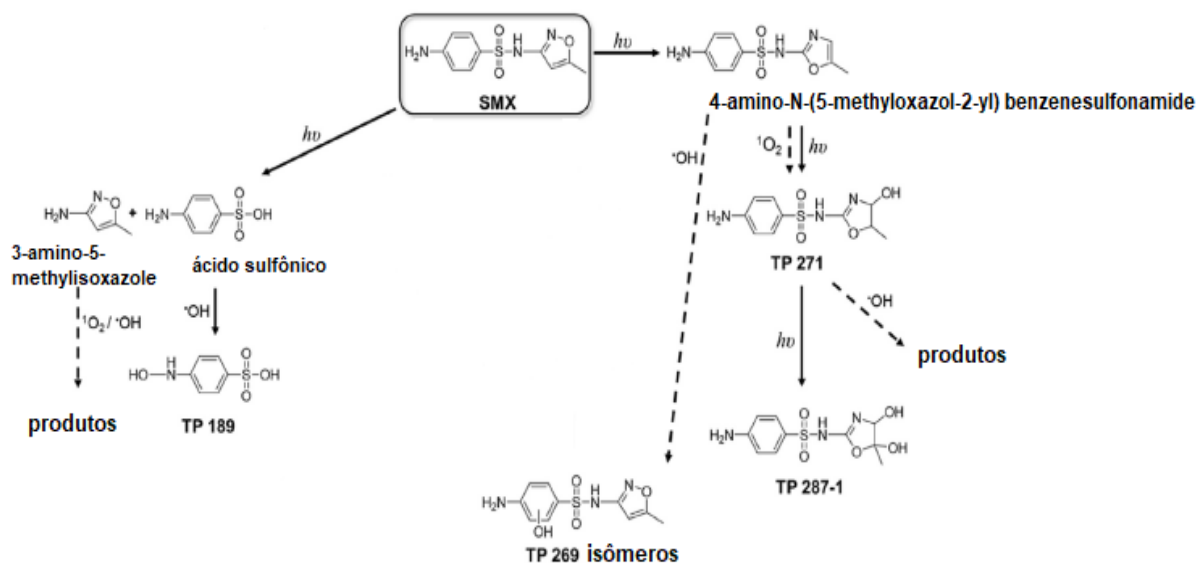


Fonte: SIRTORI et al., 2010

Sirtori et al. (2010) sugerem que a degradação de TMP envolve reações de hidroxilação, dimetilação e clivagem, dando origem a produtos. Neste estudo, não foram identificados os metabólitos gerados durante a reação; porém, em teste semelhante, Alharbi et al. (2017) identificaram a presença de 5 produtos após a fotólise de TMP. Duas estruturas (Figura 23) foram encontradas em abundância e já haviam sido descritas por Sirtori et al. (2010); as outras três foram detectadas em menores quantidades, sendo duas delas isômeros de TMP, o que demonstrou que a degradação de TMP forma produtos e não resulta na mineralização do composto.

O desempenho da fotólise na degradação de SMX foi diferente do obtido com o TMP. A remoção SMX pela fotólise foi rápida. Este comportamento está de acordo com o observado por outros autores (ALHARBI et al., 2017). A degradação da sulfanamida ocorreu após 3 minutos de exposição a radiação, degradando 28% do fármaco. O aumento do tempo de exposição elevou a degradação, atingindo remoção máxima de 98% após 50 minutos. Resultados semelhantes foram obtidos por Nasuhoglu et al. (2011), Bastos (2012) e Alharbi et al. (2017) que detectaram, respectivamente, 100% de remoção após 20 minutos de exposição (concentração inicial 24 mg L⁻¹), 99% de degradação após 30 minutos (concentração inicial 22,6 mg L⁻¹), e mais de 90% de degradação após 3 minutos (concentração inicial de 5 mg L⁻¹). A reação da fotólise de SMX envolve várias vias de reação, resultando em produtos da degradação distintos (Figura 24). Em estudo semelhante, Alharbi et al. (2017) identificaram 12 produtos de degradação de SMX. Moore e Zhou (1994) e Yang et al. (2017), constataram que um dos principais produtos primários gerados é um isômero de SMX, o 4-amino-N-(5-methyloxazol-2-yl) benzenesulfonamide, formado pela quebra entre a ligação de nitrogênio e oxigênio do anel de isoxazol, provocando o rearranjo do anel formando o oxazol. Também foram reportadas a formação do ácido sulfônico e 3-amino-5-methylisoxazole (NASUHOGLU et al., 2011; YANG et al., 2017), ambos resultantes da clivagem da ligação N-S.

Figura 24. Via de reação proposta por fotólise para SMX. As setas sólidas representam as rotas principais, e as setas pontilhadas representam as rotas secundárias



Fonte: YANG et al., 2017

5.5 TRATAMENTO COMBINADO

Amostras de cada um dos tempos de fotólise foram submetidas ao tratamento enzimático, através da aplicação do extrato de *Trametes* sp. O tratamento combinado não promoveu aumento significativo na degradação total para nenhum dos fármacos ($p > 0,05$), ou seja, a ação enzimática não foi capaz de remover os fármacos além dos resultados já obtidos pela fotólise, conforme Figuras 25 e 26.

Figura 25. Comparação entre o residual obtido ao final da fotólise e o tratamento combinado de TMP - tratamento enzimático por 24 h do residual obtidos nos tempos 1-60 minutos de fotólise

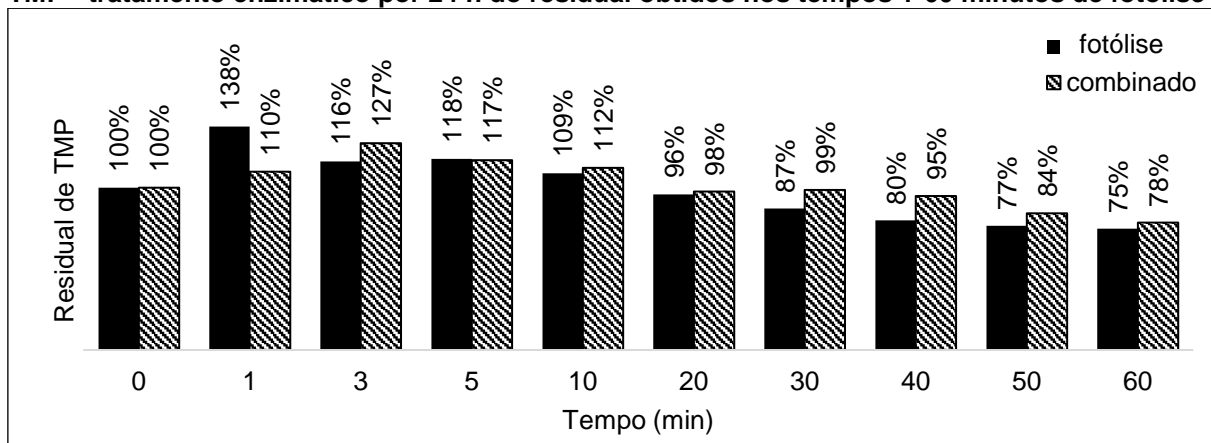
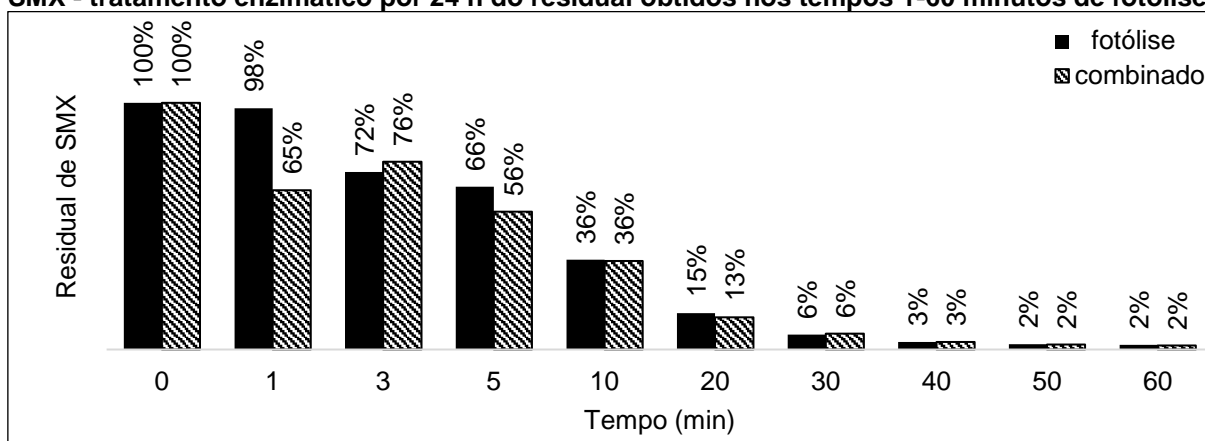
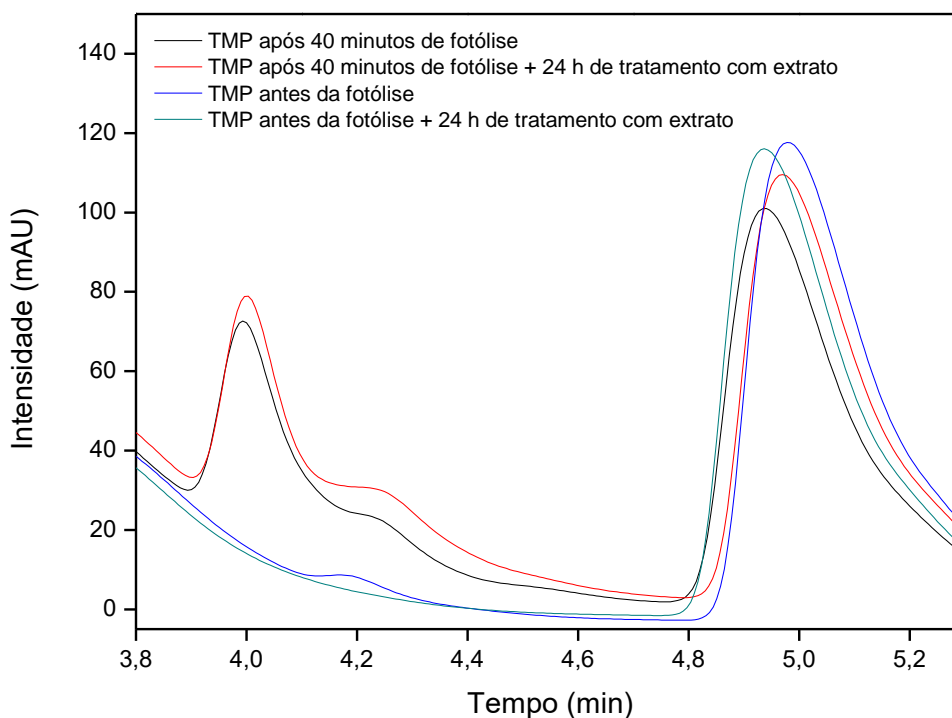


Figura 26. Comparação entre o residual obtido ao final da fotólise e o tratamento combinado de SMX - tratamento enzimático por 24 h do residual obtidos nos tempos 1-60 minutos de fotólise



Algumas amostras do tratamento combinado de TMP, apresentam concentração final de TMP superior à concentração obtida após a fotólise. Este resultado pode ser explicado devido à formação de moléculas durante o tratamento enzimático (Figura 27), indicando a ação das enzimas na degradação de compostos.

Figura 27. Comparação entre o residual obtido ao final da fotólise e o tratamento combinado de TMP - tratamento enzimático por 24 h do residual obtidos nos tempos 1-60 minutos de fotólise



Analisando a ação enzimática sobre o residual de SMX após fotólise, em cada um dos tempos, pode-se afirmar que para SMX o tratamento combinado foi mais eficiente que a fotólise apenas nos tempos 1 e 5 minutos, indicando que os metabólitos gerados nestes tempos estavam mais disponíveis ao ataque enzimático. Após 30 minutos de fotólise não houve remoção do fármaco pelo tratamento combinado, isto pode ser explicado devido à formação de produtos durante a fotólise, com estrutura que não pode ser degradada pela lacase. Considerando os possíveis produtos majoritários da reação de fotólise, apenas o TP 269 (Figura 24) possui grupamento fenólico vulnerável ao ataque das lacases, os demais subprodutos majoritários, são estruturas aromáticas não fenólicas, cuja oxidação só possível por meio de mediadores sintéticos (AGUIAR, 2008).

5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

A toxicidade das soluções de fármaco tratadas por fotólise e tratamento combinado (fotólise seguido de tratamento enzimático) foi avaliada e os resultados constam na Tabela 14.

Tabela 14. Inibição do crescimento de *E. coli* ATCC 25922 quando exposta ao efluente tratado por fotólise e tratamento combinado

Tempo (min)	Porcentagem de inibição de <i>E. coli</i> . (%)	
	Fotólise	Combinado
0	92,2 ± 0,65	89,7 ± 1,26
50	89,7 ± 1,55	85,2 ± 2,60
60	85,7 ± 0,04	80,8 ± 0,799

Durante o processo de fotólise a toxicidade da solução de SMX e TMP reduziu entre o tempo zero e 60 minutos de forma gradativa em 7%. O resultado indica, que os metabólitos gerados na fotólise possuem toxicidade inferior a inicial dos fármacos.

Após a fotólise, as amostras foram submetidas ao tratamento enzimático, que em todos casos promoveu a redução da toxicidade quando comparado aos resultados de toxicidade obtidos na fotólise. Em termos de redução na concentração dos fármacos, a ação enzimática é desprezível, porém a ação enzimática foi capaz de reduzir a toxicidade na média de 5% em relação a fotólise. Cabe ressaltar, que neste estudo, as estratégias para remoção de TMP foram ineficazes, ao contrário do SMX, cuja fotólise foi capaz de degradar 98%, devido a este fato, os elevados níveis de inibição podem estar associados a presença de TMP, ainda na forma inalterada.

6 CONCLUSÕES

O fungo *Trametes* sp. revelou-se um bom produtor da enzima lacase, produzindo 4599 U.L⁻¹ no sétimo dia de cultivo, em meio composto por KH₂PO₄, glicose, peptona de carne, sulfato de manganês, sulfato de cobre, casca de arroz e bagaço de uva Bordô (*Vitis labrusca*, seca). Nesta composição, foram ainda detectadas a presença de LiP, no primeiro dia, com produção máxima de 0,35 U L⁻¹, e MnP no 15º com atividade de 35,53 U L⁻¹. A produção das enzimas utilizando materiais de custo reduzido, como neste trabalho, viabiliza sua produção e aplicação.

O fungo *Inonotus splitgerberi* produziu baixas quantidades de enzimas ligninolíticas, mesmo após a otimização do cultivo para a produção de lignina peroxidase, cuja atividade máxima foi obtida no primeiro dia para LiP (0,94 U L⁻¹), no sexto dia para MnP (5,61 U L⁻¹) e décimo quinto dia para a lacase (17,14 U L⁻¹).

A degradação biológica de TMP e SMX utilizando enzimas e mediadores é possível. Após 24 horas de reação, a 37°C, 110 rpm, pela ação da lacase do extrato bruto de *Trametes* sp., foram alcançadas taxas de remoção de 27,51% de TMP, na ausência de mediadores, e 96% de SMX na presença de ABTS. Os maiores níveis de degradação foram obtidos nas amostras de fármacos tratadas com extrato enzimático, este resultado, deve-se a diversidade de enzimas contida no extrato bruto, frente a presença exclusiva de lacase na enzima comercial.

A degradação química através de fotólise promoveu a degradação de 98% em 50 minutos de SMX, e de 63% em 60 minutos de TMP, mostrando-se uma alternativa rápida para a transformação dos compostos.

Os tratamentos combinados em geral não reduziram a concentração do fármaco, porém atenuaram a toxicidade das amostras, conforme inibição de *E. coli*, revelando papel importante das enzimas no processo.

REFERÊNCIAS

- ABELLÁN, M. N.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S. Photocatalytic degradation of antibiotics: The case of sulfamethoxazole and trimethoprim. **Catalysis Today**, v. 144, p. 131-136, 2009.
- ABOU-EISHA, A.; MARCOS, R.; CREUS, A. Genotoxicity studies on the antimicrobiano drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 564, p. 51-56, 2004.
- AGUIAR, J. F. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- AKAY, C.; OZKAN; S. A. Simultaneous LC determination of trimethoprim and sulphamethoxazole in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 4, p. 1207-13, nov. 2002.
- ALHARBI, S. K., et al. Photolysis and UV/H₂O₂ of diclofenac, sulfamethoxazole, carbamazepine, and trimethoprim: Identification of their major degradation products by ESI-LC-MS and assessment of the toxicity of reaction mixtures. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 112, p. 222-234, jul. 2017.
- ALLARD-MASSICOTTE, R.; CHADJAA, H.; MARIONOVA, M. Phenols removal from hemicelluloses pre-hydrolysate by laccase to improve butanol production. **Fermentation**, v. 31, n. 3, jun. 2017.
- AMÉRICO, J. H. P.; TORRES, N. H.; AMÉRICO, G. H. P.; CARVALHO, S. L. Ocorrência, Destino e Potenciais Impactos dos Fármacos no Ambiente. **Revista Saúde e Biologia**, v.8, n. 2, p. 59-72, mai./ago., 2013.
- ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R.; Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v. 53, p. 51-59, out. 1999.
- ANKLEY, G. T.; BROOKS, B. W.; HUGGETT, D. B.; SUMPTER, J. P. Repeating History: pharmaceuticals in the environment. **Environmental Science e Technology**, v. 15, p. 8211-8217, dez. 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. National assembly for the regulation of the drug Market (2006). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/monitora/cmed/index.htm>>.
- ARAUJO, C. A. V., et al. Simultaneous Removal of the Antimicrobial Activity and Toxicity of Sulfamethoxazole and Trimethoprim by White Rot Fungi. **Water Air Soil Pollut**, p. 228: 341, 2017.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 28, n. 7-8, p. 602-605, mai. 2001.

ASGHER, M.; IQBAL, H. M. N.; ASAD, M. J. Kinetic characterization of purified laccase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 in solid-state bio-processing of corncobs. **BioResources**, v. 7, n.1, p. 1171-1188, 2012.

BACHMANN, V. et al. **Screening de Macrofungos Potencialmente Produtores de Enzimas Fenoloxidativas, Xilanolíticas e Celulolíticas**. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011, Caxias do Sul. RS. Anais (on line). Caxias do Sul: SINAIFERM, 2011. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/897105> Acesso em 09/07/17.

Bactrim® (Sulfametoxazol + Trimetoprima). Guilherme N. Ferreira. Rio de Janeiro: Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. Bula de remédio.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 215-242, mar. 2006.

BAQUERO, F.; MARTINEZ, J. L.; CANTON, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, jun. 2006.

BARCELÓ, D. Emerging pollutants in water analysis. **Trends Analysis Chemical. Barcelona**, v. 22, n. 10, p. XIV – XVI, nov. 2003.

BASTOS, R. V. Estudo da degradação do antibiótico sulfametoxazol em solução aquosa por fotólise. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Universidade São Paulo, São Paulo, 2012.

BESSE, J. P.; GARRIC, J. Human pharmaceuticals in surface waters implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. **Toxicology Letters**, v. 176, n. 2, p. 104-123, jan. 2008.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, fev. 2003.

BIRHANLI, E., YEŞİLADA, O. The effect of various inducers and their combinations with copper on laccase production of *Trametes versicolor* pellets in a repeated-batch process. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p.587-599, fev. 2017.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G.; LEECH, D.; FREIERMUTH, B. Reactivity and mechanism of laccase mediators for pulp delignification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4627-4632, dez. 1997.

BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248, 1976

BREEN, A.; SINGLETON, F. L. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 252-258, jun.1999.

BRENNER, C. G. B. **Antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprina em efluente hospitalar: determinação, degradação através da eletrocoagulação e identificação de subprodutos e metabólitos**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2009.

CABANA, H., JONES, J. P., AGATHOS, S. N. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 1, p. 23-31, jul. 2007b.

CAMPANHA, M. B.; et al. A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, n. 10, p. 7936-7947, dez. 2014.

CAVALCANTE, A. M. **Técnicas Oxidativas para a Remoção de Matéria Orgânica de uma Corrente de Soda Exausta de Refinaria de Petróleo**, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

CHANG, H.; HU, J. Y.; SHAO, B. Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters. **Environmental Science e Technology**, v. 41, n. 10, p. 3462-3468, abr. 2007.

CHANG, H.; HU, J.; ASAMI, M.; KUNIKANE, S. Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 390-393, mar. 2008.

CHEE-SANFORD, J. C.; AMINOV, R. I.; KRAPAC, I. J.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R.I. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1494-1502, abr. 2001.

CHEN, S.; MA, D.; GE, W.; BUSWELL J. A. Induction of laccase activity in edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, p.142-148, nov. 2003.

CHRISTENSEN, F. M. Pharmaceuticals in the environment – a human risk? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 212-221, jul. 1998.

CHUST, R. B. Introdução à cromatografia de líquidos (HPLC). Boletim SPQ, n. 39, p. 43-53, 1990.

COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3444-3450, set. 1997.

CONESA, A.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; PUNT, P. J. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 3016–3023, 2000.

CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscópicas multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

DA CRUZ, L. H. **Estudo da potencialidade de processos oxidativos avançados na degradação de poluentes emergentes (fármacos).** Tese (Doutorado em Química Analítica) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 6, p. 907-938, dez. 1999.

ELISASHVILI, V.; PENNINGKX, M.; KACHLISHVILI, E.; ASATIANI, M.; KVESITADZE, G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 998–1004, 2006.

FALADE, A. O., et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. **MicrobiologyOpen.**, v. 6, n. 1, p. 1-14, fev. 2017.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122-159, set. 2006.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, p. 504-511, jan. 2000.

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 225-232, 2001.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. increased production of laccase by the wood rotting basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2002.

GARCÍA-GALÁN, et al. Biodegradation of sulfamethazine by *Trametes versicolor*: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC–QqTOF-MS. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 5505–5512, 2011.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química. Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, fev. 2007.

GOEBEL, A., MCARDELL, C. S.; JOSS, A.; SIEGRIST, H.; GIGER, W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. **Science of the Total Environment**, v. 372, n. 2-3, p. 361-371, jan. 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, fev. 2010.

GUO, X.; ZHU, Z.; LI, H. Biodegradation of sulfamethoxazole by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Molecular Liquids**, v.198, p. 169-172, out. 2014.

HALLING-SORENSEN, B.; NORS NIELSEN, S.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN LUTZHOFT, H. C.; JORGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: a review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357- 393, jan. 1998.

HERMANN, A. C. **Biodegradação dos antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas ligninolíticas de basidiomicetos**. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia em Processos Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 109-118, jan. 1999.

HOU, H. M.; ZHOU, J. T.; WANG, J.; DU, C.H.; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415-1419, jul. 2004.

HUOVINEN, P.; SUNDSTRÖM, L.; SWEDBERG, G.; SKÖLD, O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. **Antimicrobiano Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 279-289, fev. 1995.

INOUE, Y.; HATA, T.; KAWAI, S.; OKAMURA, H.; NISHIDA, T. Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, p. 764-767, abr. 2010.

JOHANSSON, T.; WELINDER, K. G.; NYMANN, P. O. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 1, p. 57–62, jan.1993.

JJEMBA, P.K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceuticals and personal care products in the environment. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 63, p. 113-130, jan. 2006.

KANNAIYAN, R.; et al. Nutrient media optimization for simultaneous enhancement of the laccase and peroxidases production by coculture of *Dichomitus squalens* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 62, n. 2, p. 173–85. 2015.

KARTHIKEYAN, K. G.; MEYER, M. T. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. **Science of the Total Environment**, v. 361, p.196-207, mai. 2006.

KIDD, K. A.; BLANCHFIELD, P. J.; MILLS, K. H.; PALACE, V. P.; EVANS, R. E.; LAZORCHAK, J. M.; FLICK, R. W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of The National Academy Of Sciences Of The United States Of Ame**, v. 41, n. 12, p. 8897-8901, mai. 2007.

KIRK, T. K., FARREL, R. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review. Microbiology.**, v. 41, p. 465-505, out. 1987.

KOROLJOVA SKOROBOGATKO, O. V., STEPANOVA, E. V., GAVRILOVA, V. P., MOROZOVA, O. V., LUBIMOVA, N. V., DZCHAFAROVA, A. N., JAROLOV, A. I., MAKOWER, A. Purification and characterization of the constutive formo f laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v 28, p. 47-54, Agosto 1998.

KUMAR, P. S.; et al. Thermodynamic and kinetic studies of cadmium adsorption from aqueous solution onto rice husk. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v. 27, n.2, p. 347-355, Jun, 2010.

LARSEN, T. A.; LIENERT, J.; JOSS, A.; SIEGRIST, H. How to avoid pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 295-304, mar. 2004.

LEATHAM, G. F., KIRK, T. K. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 16, n. 1, p. 65-67, jan. 1983.

LI, K.; XU, F.; ERIKSSON, K. E. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2654– 60, 1999.

LIBARDI JÚNIOR, N. **Estudo de Lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Univille, Joinville, 2010.

LIU, S.; YING, G. G.; ZHAO, J. L.; CHEN, F.; YANG, B.; ZHOU, L. J.; LAI, H. J. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1367-1378, jan. 2011.

LLORET, L.; EIBES, G.; LU-CHAU, T. A.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 124-131, jun. 2010.

LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 385-393, jun. 2010.

LOPES, V. C. P. Recursos microbianos ligninolíticos: potencial para deslignificação e produção de ligninases, Tese (Doutorado em Ciências biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

LORENZO, M.; MOLDES, D.; RODRÍGUEZ, C. S.; SANROMÁN, A. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*, **Bioresource Technology**, v. 82, p. 109-113, set. 2002.

MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138-146, jul. 2016.

MACIEL, G. M. **Interações dos fungos *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst e *Trametes* sp. com o herbicida picloram: mecanismos de tolerância e biosorção**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAKARA, C. N. Extração e caracterização de compostos bioativos presentes no bagaço de uva. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MANSILLA, H. D.; YEBER, M. C.; FREER, J.; RODRÍGUEZ, J.; BAEZA, J. Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. **Water Science Technology**, v. 35, n. 4, p. 273-278, 1997.

MARGOT, J.; et al. Sulfamethoxazole and isoproturon degradation and detoxification by a laccase-mediator system: Influence of treatment conditions and mechanistic aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 47-59, jun. 2015.

MCLAUGHLIN D. J.; HIBBETT, D. S.; LUTZONI, F.; SPATAFORA, J. W.; VILGALYS, R. The search for the fungal tree of life. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 488-497, set. 2009.

MIKOLASCH, A., SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 605 – 624, jan. 2009.

MISHRA, C., LEATHAM, G. F. Recovery and fractionation of the extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures cultivated in a solid lignocellulosic substrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, n. 1, p. 8-15, nov. 1989.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the atibaia river, São Paulo state (Brazil). **J. Braz. Chem. Soc**, v. 22, n. 8, p. 1452-1462, 2011.

- MOORE, D. E., ZHOU, W. Photodegradation of sulfamethoxazole: a chemical system capable of monitoring seasonal changes in UVB intensity. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 5, p. 497-502, jan. 1994
- MOREDO, N.; LORENZO, M.; DOMINGUEZ, A.; MOLDES, D.; CAMESELLE, C.; SANROMAN, A. Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 19, p. 665-669, out. 2003.
- MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V.; YAROPO, Y. I., Laccase-mediator systems and their applications: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, p. 523-535, 2007a.
- MSWAKA, A., & MAGAN, N. Wood degradation, and cellulase and ligninase production, by *Trametes* and other wood-inhabiting basidiomycetes from indigenous forests of Zimbabwe. **Mycological Research**, v. 102, n. 11, 1399-1404, 1998.
- NASUHOGLU, D.; YARGEAU, V; BERK, D. Photo-removal of sulfamethoxazole (SMX) by photolytic and photocatalytic processes in a batch reactor under UV-C radiation (max = 254 nm). **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 67-75, 2011.
- OISHI, S. Effects of Butyl Paraben on the male reproductive system in mice. **Archives of Toxicology**, v. 76, p. 423-429, jun. 2002.
- PABLOS, V. M.; et al. Acute and chronic toxicity of emerging contaminants, alone or in combination, in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. **Environ Sci Pollut Res**, v. 22, n. 7, p. 5417-5424, jan. 2015.
- PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G. As principais oxidorredutases de uso industrial. In: Said, S. and Pietro, R. C. L. R., (Eds.), **Enzimas Como Agentes Biotecnológicos**. Legis Summa, Ribeirão Preto, Brazil, p. 161-184, 2004.
- PEREIRA, C. D. S.; et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548-549, p. 148-154, jan. 2016.
- PETROVIC, M.; SKRBIC, B.; ZIVANCEV, J.; FERRANDO - CLIMENT, L.; BARCELO, D. Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. **The Science of the Total Environment**, v. 468-469, p. 415-428, jan. 2014.
- POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 20-33, jul. 2001.
- PRASAD, M. H.; PUSHPAVATHI, K.; DEVI, G. S.; REDDY, P. P. Reproductive epidemiology in sulfonamide factory workers. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 47, n. 2, p. 109-114, 1996.
- QIN, Y. et al. Laccase Enzyme from *Trametes versicolor* with a high decolorizing ability on malachite green. **EC Microbiology**, v 10, n. 3, p. 127-133, ago. 2017

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; GARDNER, P. *Farmacologia*. Elsevier, 6ª ed. 2007.

REESE, R. E.; BETTS, R. F. *Manual de antibióticos*, 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1995.

RILEY; R. R. et al. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. **PNAS**, v. 111, n. 27, p. 9923-9928, jul. 2014.

RISDIANTO, H, et al. Optimisation of laccase production using white rot fungi and agriculture wastes in solid state fermentation. **Journal of engineering science**. v. 44, n. 2, p. 93-105, jun. 2012.

RIVA; S. Laccases: blues enzymes for green chemistry. **Tends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219-226, mai. 2006.

RODARTE-MORALES, A. I.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; LEMA, M. J. Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 27, n. 8, p.1839 -1846, jan. 2011.

ROGALSKI et al. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. **Acta Microbiologica Polonica**, v. 40, n. 3/4, p. 221-234, 1991.

RYAN, D; LEUKES, W.; BURTON, S. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*, **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 579-587, fev. 2007.

SACCHETTO, J. P. Otimização da produção de Lacase por *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em óleo de soja como única fonte de carbono. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

SANTANA, J. S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal**. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SAQIB A. A. N.; WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 4748-4750, 2011.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p. 725-759, 2006.

SCHUWARZE, F. W. M. R. Wood decay under microscope. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 133-170, nov. 2007.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965

SIRTORI, C.; et al. Effect of water-matrix composition on trimethoprim solar photodegradation kinetics and pathways. **Water Research**, v. 44, p. 2735 – 2744, 2010.

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F.; J. BRAZ. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187-196, mai. 2007.

SOUZA, C. G. M., TYCHANOWICZ, G K., SOUZA, D. F., PERALTA, R. M. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. **Journal Basic Microbiology**, v. 44, pp 129-136, abril, 2004.

STACKELBERG, P. E.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; ZAUGG, S. D.; HENDERSON, A. K.; REISSMAN, D. B. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 329, p. 99-113, mar. 2004.

STRONG, P. J. Improved Laccase Production by *Trametes pubescens* MB89 in TAVARES, A. P. M. **Produção de Lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2006.

TAVARES, L. M. C. **Produção e aplicação de extratos enzimáticos brutos produzidos em fermentação em sólido estado por aspergillus niger a partir de resíduos agroindustriais na extração de óleo essencial de cróton grewoides**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2012.

TERNES T. A. Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. **Water Research.**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, fev. 1998.

TEUNISSEN, P. J; FIELD, J. A. 2-Chloro-1,4-dimethoxybenzene as a mediator of lignin peroxidase catalyzed oxidations. **FEBS Lett**, v. 439, p. 219–23, 1998.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases, **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

TIXIER, C.; SINGER, H. P.; OELLERS, S.; MULLER, S. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 6, p. 1061- 1068, jun. 2003.

USGS. *United States Geological Survey*. Disponível em <<http://toxics.usgs.gov/regional/emc/index.html>>. Acessado em: mai. de 2016.

VALCÁRCEL, Y.; GONZÁLEZ ALONSO, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J. L.; GIL, A.; CATALÁ, M. 2011. Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid region (Spain) and potential ecotoxicological risk. **Chemosphere**, v. 84, p. 1336-1348, jun. 2011.

Veja. A era pós-antibiótico. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/saude/a-era-pos-antibiotico>>. Acessado em: 30 nov. 2014.

VULLIET, E.; CREN-OLIVÉ, C. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2929-2934, out. 2011.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* - kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23688-23695, jul. 1992.

WEN, X.; JIA, Y.; LI, J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* - A white rot fungus. **Chemosphere**, v. 75, p. 1003-1007, fev. 2009.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, dez. 2003.

WIEGAND, I.; HILPERT K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Protocol Nature**, 2008.

WILSON, K; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, 7 ed. p. 581., 2010.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, p.174-209, mai. 2009.

XIA, G., WEI, Z.; LI, L. Biodegradation of sulfamethoxazole by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Molecular Liquids**, v. 198, p. 169-172, 2014.

XU, F. et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential substrate specificity, and stability. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1292, n. 2, p. 303-311, fev. 1996.

XU, X.; XU, Z.; SHI, S.; LIN, M. Lignocellulose degradation patterns, structural changes, and enzyme secretion by *Inonotus obliquus* on straw biomass under submerged fermentation. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 415-423, 2017.

YANG, S.; HAI, F. I.; NGHIEM, L. D.; PRICE, W. E.; RODDICK, F.; MOREIRA, M. T.; MAGRAM, S. F. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 97-108, fev. 2013.

YANG, X.; FLOWERS, R. C.; WEINBERG, H. S.; SINGER, P. C. Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. **Water Research**, v. 45, n.16, p. 5218-5228, jul. 2011.

YANG, Y.; et al. Degradation of sulfamethoxazole by UV, UV/H₂O₂ and UV/persulfate (PDS): Formation of oxidation products and effect of bicarbonate. **Water Research**, v. 118, p. 196-207, 2017.

ZANIRUN, Z.; ABD-AZIZ, S.; LING, F. H. and HASSAN, M.A. Optimisation of lignin peroxidase production using locally isolated *Pycnoporus* sp. through factorial design, **Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 296-305, 2009.

ZEINAB, H. K.; SAID, M. B. E., SAAD, M. M., DOUAA, H. A. A. Optimization of cultural conditions for lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus*. **Acad. J. Biotechnol.** v. 1, n. 6, p 87-95, 2013.

ZENG, S.; QIN, X.; XIA, L. Degradation of herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, v 119, p. 92-100, 2017.

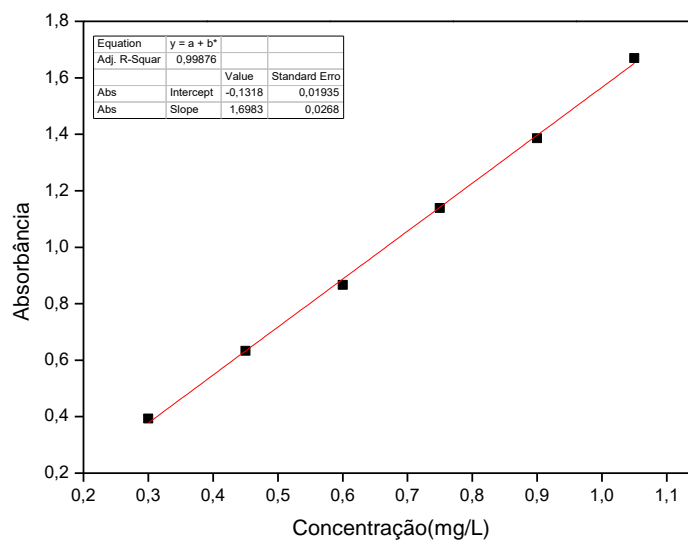
ZHANG, Y.; GEISSEN, S. U. In vitro degradation of carbamazepine and diclofenac by crude lignin peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 1089-1092, nov. 2010.

ZHOU, J. L.; ZHANG, Z. L.; BANKS, E.; GROVER, D.; JIANG, J. Q. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 655-661, jul. 2009.

APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

Metodologia: Ácido 3,5-dinitrosalisílico, DNS, (SAQIB; WHITNEY, 2011)

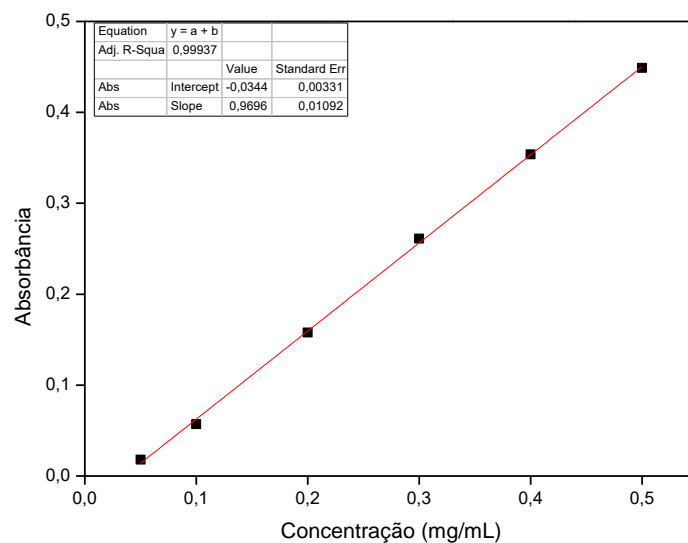
Figura 28. Curva analítica para determinação de açúcares redutores



APÊNDICE B - CURVA PADRÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Metodologia: Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965)

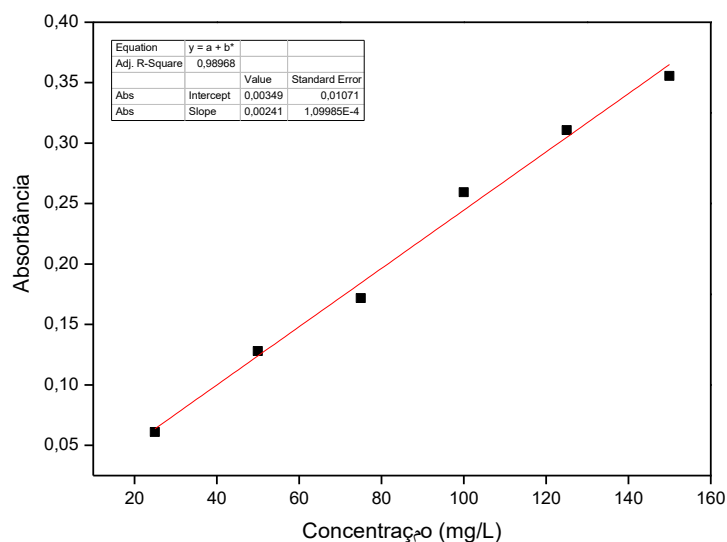
Figura 29. Curva analítica de compostos fenólicos



APÊNDICE C - CURVA PADRÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Metodologia: método de Bradford (BRADFORD, 1976)

Figura 30. Curva analítica para proteínas totais



APÊNDICE D - CURVA PADRÃO DE SMX E TMP

Curvas analíticas, Figura 31, foram elaboradas nas condições descritas na seção 4.2.5., com 6 pontos, na faixa de concentração compreendida entre 1 e 100 mg L⁻¹. A menor concentração avaliada para ambos os fármacos foi de 1 mg L⁻¹, os erros destes picos estão na ordem de 4,1% para SMX e 3,32% para TMP, ambos são aceitáveis perante normativa da ANVISA (2003), que estabelece que o limite de quantificação seja representado como 10 vezes a razão entre o erro do coeficiente linear e a inclinação da curva analítica, desta forma, estes valores foram adotados como limites de quantificação do método.

Figura 31. Curvas analíticas e perfil cromatográfico para os fármacos SMX (A e B) e TMP (C e D).

