

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

ALINE CRISTINE HERMANN

**BIODEGRADAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS SULFAMETOXAZOL E
TRIMETOPRIMA POR ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS DE
BASIDIOMICETOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2015**

ALINE CRISTINE HERMANN

**BIODEGRADAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS SULFAMETOXAZOL E
TRIMETOPRIMA POR ENZIMAS LIGNINOLÍTIICAS DE
BASIDIOMICETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Prof. Dra. Giselle Maria Maciel

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz

**CURITIBA
2015**

ALINE CRISTINE HERMANN

**BIODEGRADAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS
SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA POR ENZIMAS
LIGNINOLÍTICAS DE BASIDIOMICETOS**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Membro 2 – Profa. Dra. Marlene Soares
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

Orientadora – Profa. Dra. Giselle Maria Maciel
Departamento Acadêmico de Química e Biologia UTFPR)

Coordenador de Curso – Prof. Ms. Alessandro Feitosa Machado

Curitiba, 26 de novembro de 2015.

Esta Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido **Gustavo**, pelo apoio, paciência, companheirismo, por me acalmar e me fazer sorrir quando estava desesperada. Você foi fundamental durante esta trajetória.*

*Aos meus pais, **Luiz e Elisa**, pelo estímulo e apoio na realização dos meus objetivos pessoais e profissionais, pelo amor, carinho e as valiosas lições de vida.*

*A minha irmã **Francine**, pela paciência, amor e companhia.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar sempre ao meu lado, dar-me força para superar as dificuldades diárias e por colocar pessoas especiais que tornam na nossa jornada na Terra mais agradável.

Aos meus queridos professores Dr^a. Giselle Maria Maciel e Dr. Marcus Vinicius de Liz, agradeço a disponibilidade, dedicação a este projeto, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pela companhia. Sem vocês este projeto não seria possível. Vocês são exemplos de profissionais em minha vida, admiráveis!

Aos professores Dr^a. Marlene Soares e Dr. Gustavo Henrique Couto, pelas valiosas contribuições dadas a este projeto, através das correções e considerações. Muito obrigado!

A todos os colegas do laboratório de Biotecnologia, Microbiologia e Contaminantes Ambientais pelo companheirismo durante o ano de 2015.

À preciosa amiga Aline Bisinella, pela companhia fiel e agradável, pela disposição em me auxiliar e por tentar me acalmar incontáveis vezes durante estes quatro anos de curso! Você é sensacional!

Ao Cleyton Makara, pelo auxílio nas análises cromatográficas, inclusive em feriados, pelos conhecimentos transmitidos e pela companhia. Muito obrigada!

Aos professores do DAQBI, por todo o conhecimento transmitido ao longo destes quatro anos de curso.

A UTFPR por disponibilizar os recursos e permitir o uso das dependências para a realização deste projeto.

RESUMO

HERMANN, Aline Cristine. **Biodegradação dos Antimicrobianos Sulfametoxazol e Trimetoprima por Enzimas Ligninolíticas de Basidiomicetos**. 2015. 66 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais – Departamento Acadêmico de Química e Biologia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

O sulfametoxazol (SMX) e a trimetoprima (TMP) estão entre os antibióticos mais utilizados no Brasil. Após administração eles não são totalmente metabolizados pelo organismo, sendo eliminados em sua forma inalterada, via urina, em porcentagens entre 10%-30% para TMP e 50%-70% para SMX. Estes compostos expelidos são conduzidos pelo sistema de esgoto até as estações de tratamento, as quais, em geral, não apresentam eficiência na remoção destas substâncias, permitindo que concentrações de SMX e TMP sejam lançadas nos rios, e, conseqüentemente, nas águas de abastecimento. Pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de encontrar métodos capazes de promover a degradação destes compostos. Técnicas de biodegradação têm sido exploradas e processos utilizando fungos e suas enzimas no tratamento de fármacos têm produzido resultados promissores. O fungo *Trametes* sp. foi cultivado em meios contendo concentrações variadas de CuSO_4 e bagaço de uva. A melhor condição para a produção da lacase foi obtida com a concentração de 2% de bagaço de uva e 1,5 mM de CuSO_4 adicionado apenas no quinto dia de cultivo. O extrato bruto, contendo enzimas, obtido pelo cultivo foi empregado nos ensaios de biodegradação *in vitro* de SMX e TMP. Foram testadas três concentrações de cada fármaco ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$), nas condições estático, agitado, na presença e na ausência do mediador ácido 4-hidroxibenzóico (AHB). Os resultados das análises por CLAE-DAD revelaram que a adição de 0,89 unidades de enzima promoveu a biodegradação de ambos os fármacos em todas as condições e concentrações testadas, atingindo degradação mínima de 17,48% e máxima de 35,76% para SMX, e mínima de 11,14% e máxima de 27,57% de TMP. A remoção de SMX ocorreu sob condições estáticas e agitadas, na presença ou ausência de AHB. As taxas de remoção das amostras submetidas a estas condições de tratamento indiferem estatisticamente para as concentrações de 2,5 e 5 mg.L^{-1} . A biodegradação de SMX na concentração de 7,5 mg.L^{-1} foi favorecida na presença de AHB sob condição agitada e desfavorecida em condição estática. A taxa de biodegradação de TMP nas concentrações de 2,5 e 7,5 mg.L^{-1} não é influenciada de forma significativa pela condição de biodegradação estática, agitada, na presença ou ausência do mediador. O tratamento de concentrações de 5 mg.L^{-1} é favorecido na presença de mediador, sob condição estática e desfavorecido na ausência do AHB na mesma condição.

Palavras-chave: Antibióticos. Fungos da Podridão Branca. Sulfametoxazol. Trimetoprima. Lacase. Contaminantes Emergentes.

ABSTRACT

HERMANN, Aline Cristine. **Antimicrobial biodegradation of sulfamethoxazole and trimethoprim by ligninolytic enzyme of Basidiomycetes**. 2015. 66 p. Degree Completion Work – Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

The sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) are among the most commonly used antibiotics in Brazil. After administration they are not completely metabolized by the body, being eliminated in its unchanged form via the urine, in percentages between 10% -30% for TMP and 50% -70% for SMX. These expelled compounds are led through the sewer system to the wastewater treatment plants, which in general do not show efficiency in the removal of these substances, allowing SMX and TMP concentrations are discharged into rivers, and hence the water supply. Research has been carried out in order to find methods to promote degradation of these compounds. Biodegradation techniques have been explored and processes using fungi and their enzymes in the treatment of drugs have produced promising results. The fungus *Trametes* sp. It was grown in media containing varying concentrations of CuSO_4 and grape pomace. The best condition for the production of the laccase obtained by the concentration was 2% of grape marc and 1,5 mM CuSO_4 added until the fifth day of culture. The crude extract containing enzymes, obtained by cultivation was used in biodegradation tests in vitro SMX and TMP. Three concentrations were tested for each drug (2,5 mg.L^{-1} , 5,0 mg.L^{-1} and 7,5 mg.L^{-1}) in static conditions, agitated, in the presence and absence of the mediator acid 4- hydroxybenzoic acid (HBA). The results of the analysis by HPLC-DAD revealed that the addition of 0,89 units of enzyme promoted the degradation of both drugs in all tested conditions and concentrations, reaching minimal degradation of 17,48% and a maximum of 35,76% for SMX and minimum 11,14% and maximum of 27,57% of TMP. Removal of SMX and stirred occurred under static conditions, in the presence or absence of HBA. The removal rates of the samples subjected to these treatment conditions indifferem statistically to concentrations of 2,5 and 5 mg.L^{-1} . The biodegradation of SMX at a concentration of 75 mg.L^{-1} was enhanced in the presence of HBA under agitated and disadvantaged condition in static condition. TMP biodegradation rate at concentrations of 2,5 and 7,5 mg.L^{-1} is not significantly influenced by static condition biodegradation, stirred in the presence or absence of a mediator. Treatment of 5 mg.L^{-1} concentrations is favored in the presence of mediator, under static and disadvantaged condition in the absence of HBA in the same condition.

Keywords: Antibiotics . White rot fungi . Sulfamethoxazole . Trimethoprim . Laccase . Emerging contaminants.

L ISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Fungos da podridão branca classificados quanto à habilidade de produção de enzimas lignocelulolíticas. | 27 |
| Figura 2 - Representação dos sítios ativos de cobre. Sítio T1 (Cu ₁), T2 (Cu ₄) e T3 (Cu ₂ -Cu ₃) da lacase de <i>Bacillus subtilis</i> | 29 |
| Figura 3 - Mecanismo de catálise da lacase. | 31 |
| Figura 4 - Etapas desenvolvidas no trabalho de biodegradação dos antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas ligninolíticas de basidiomicetos. | 32 |
| Figura 5 - Cultivo de <i>Trametes</i> sp. após 7 dias em AEM (28°C). | 33 |
| Figura 6 - Diagrama de Pareto. Interferência na produção de lacase em função da concentração de CuSO ₄ e bagaço de uva. | 42 |
| Figura 7 - Curvas analíticas e perfil cromatográfico para os fármacos TMP (A e B) e SMX (C e D). | 48 |
| Figura 8 – Perfil cromatográfico da biodegradação de 2,5 mg.L ⁻¹ de SMX sob condição agitada na presença de mediador. | 51 |
| Figura 9 - Perfil cromatográfico da biodegradação de 2,5 mg.L ⁻¹ de TMP sob condição estática na presença de mediador. | 54 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Atividade do fungo *Trametes* sp. em função da da pré-cultura. (■) Ágar-
Extrato de Malte a 2%; (▲) Ágar-Extrato de Malte a 2% e 7,5% de
bagaço de uva bordo; (●) Ágar-Extrato de Malte a 2% e 7,5% de
casca de arroz.....46
- Gráfico 2 - Atividade enzimática obtida nos testes de biodegradação após uma
hora de reação.47
- Gráfico 3 - Comparação entre a porcentagem de remoção de SMX nas quatro
condições testadas (agitado, estático, com mediador, sem mediador). .51
- Gráfico 4 - Comparação entre a porcentagem de remoção de TMP nas quatro
condições testadas (agitado, estático, com mediador, sem mediador). .53

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Compostos emergentes nos produtos de uso pessoal e industrial. | 16 |
| Quadro 2 - Características químicas dos compostos SMX e TMP. | 21 |
| Quadro 3 - Pesquisas envolvendo a biodegradação de substâncias utilizando fungos da podridão branca..... | 26 |
| Quadro 4 - Condições Cromatográficas para análise de TMP e SMX por HPLC- DAD..... | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Concentração de alguns contaminantes emergentes encontrados em ambientes aquáticos. | 18 |
| Tabela 2 - Concentrações de SMX e TMP encontrados em efluentes, afluentes e rios. | 22 |
| Tabela 3 - Remoção de SMX e TMP em estações de tratamento em diversos países..... | 23 |
| Tabela 4 - Planejamento fatorial fracionário com as variáveis bagaço de uva e CuSO ₄ em três concentrações. CuSO ₄ 0,5 mM (-1), 1mM (0) e 1,5 mM (+1), e bagaço de uva de 0,25% (-1), 0,5% (0) e 1% (+1)..... | 35 |
| Tabela 5 - Condições dos testes de biodegradação. | 39 |
| Tabela 6 - Composição dos meios de cultivo com variações nas concentrações de bagaço de uva (0,25%, 0,5% e 1,0%) e CuSO ₄ (0,5 mM, 1 mM e 1,5 mM): média+DP. | 41 |
| Tabela 7- Atividades obtidas pela variação da concentração de bagaço de uva: média + DP. | 43 |
| Tabela 8 - Taxa de remoção SMX após 24 horas de tratamento. | 49 |
| Tabela 9 - Taxa de remoção TMP após 24 horas de tratamento. | 52 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 15 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 3.1 | CONTAMINANTES EMERGENTES..... | 16 |
| 3.1.1 | Fármacos..... | 18 |
| 3.1.1.1 | Antibióticos: SMX e TMP | 19 |
| 3.2 | TRATAMENTOS PARA REMOÇÃO DOS FÁRMACOS | 22 |
| 3.2.1 | Tratamento Biológico: Fungos Basidiomicetos e Suas Enzimas Oxidativas | 24 |
| 3.3 | FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA | 25 |
| 3.3.1 | <i>Trametes</i> sp..... | 26 |
| 3.4 | ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS..... | 27 |
| 3.4.1 | Lignina Peroxidase | 27 |
| 3.4.2 | Manganês Peroxidase | 28 |
| 3.4.3 | Lacase | 28 |
| 3.4.3.1 | Estrutura | 29 |
| 3.4.3.2 | Mecanismos da catálise | 30 |
| 4 | PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS | 32 |
| 4.1 | MICROORGANISMO E MANUTENÇÃO | 32 |
| 4.2 | PREPARO DO INOCULO PARA CULTIVO LIQUIDO..... | 33 |
| 4.3 | PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM CULTIVO LIQUIDO | 33 |
| 4.3.1 | Estudo do Efeito da Concentração de Cobre e Bagaço de Uva | 34 |
| 4.3.2 | Estudo do Efeito da Concentração do Bagaço de Uva..... | 35 |
| 4.3.3 | Estudo do Efeito do Período de Adição de CuSO ₄ | 35 |
| 4.3.4 | Estudo do Efeito da Aclimação | 36 |
| 4.4 | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS | 36 |
| 4.5 | DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE | 37 |
| 4.6 | BIODEGRADAÇÃO DE SMX E TMP | 38 |
| 4.6.1 | Atividade da Lacase na Presença a SMX e TMP | 38 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.6.2 | Ensaio de Biodegradação..... | 38 |
| 4.6.3 | Análise de Biodegradação de SMX e TMP por CLAE-DAD | 40 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 5.1 | EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE..... | 41 |
| 5.1.1 | Estudo do Efeito e da Concentração de Cobre e Bagaço de Uva | 41 |
| 5.1.2 | Estudo do Efeito do Aumento da Concentração do Bagaço de Uva | 43 |
| 5.1.3 | Estudo do Efeito do Período de Adição de CuSO ₄ | 44 |
| 5.1.4 | Estudo do Efeito da Aclimação | 45 |
| 5.2 | BIODEGRADAÇÃO DE SMX E TMP | 46 |
| 5.2.1 | Atividade da Lacase na Presença de SMX e TMP | 46 |
| 5.2.2 | Determinação Cromatográfica dos Fármacos Puros por HPLC/DAD..... | 47 |
| 5.2.3 | Determinação da Taxa de Biodegradação | 49 |
| 5.2.3.1 | Sulfametoxazol | 49 |
| 5.2.3.2 | Trimetoprima | 52 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 55 |
| 7 | SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 56 |
| | REFERENCIAS..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural imprescindível para a vida na Terra. Este elemento está presente nos processos produtivos, alimentação e higiene, possuindo grande importância econômica, ambiental e social. A água, após ser consumida, torna-se água residual e precisa ser submetida a processos de tratamento capazes de remover a matéria orgânica e os contaminantes presentes, atendendo aos limites de lançamento exigidos pela legislação, garantindo assim a integridade deste bem e de todo ecossistema.

Porém, uma série de compostos não legislados tem ganhado atenção, pois 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 traço nas águas superficiais e subterrâneas (DAUGHTON e TERNES, 1999; BARCELÓ, 2003; PETROVIC *et al.*, 2014), causando preocupação quanto aos efeitos potenciais à saúde humana, animal e à dinâmica do ecossistema.

Uma das classes 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, permitindo que substâncias com atividade biológica sejam direcionadas para as estações de tratamento de efluentes, as quais são incapazes de removê-las eficientemente pelos tratamentos convencionais, permitindo seu lançamento e acúmulo nos corpos hídricos.

Nesse contexto os antibióticos merecem destaque, pois correspondem ao quinto grupo 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 e TERNES, 1999) e a exposição de diversos organismos a essas substâncias.

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

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 ETE na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (KARTHIKEYAN e MEYER, 2006). Estes antibióticos são considerados compostos de alto risco e de elevada relevância ambiental devido à ocorrência em águas superficiais e ecotoxicidade (BESSE e GARRIC, 2008). Um aumento gradual na frequência de bactérias isoladas que demonstram resistência ao SMX e ao TMP tem sido relatado (HUOVINEN *et al.*, 1995).

Em virtude das grandes quantidades consumidas destes antibióticos, das reduzidas taxas de metabolização pelo organismo, da ineficiência do sistema de tratamento de efluentes convencional na remoção de SMX e TMP e do baixo conhecimento dos efeitos reais que estas concentrações traço podem provocar a longo prazo no ecossistema, é uma necessidade atual desenvolver métodos de tratamentos capazes de remover estes compostos recalcitrantes ou reduzir a sua toxicidade a um baixo custo.

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, como técnicas empregando o processo fenton (SILVA, 2012), eletrocoagulação (BRENNER, 2009) e eletroquímicas utilizando eletrodo de diamante dopado com boro (DE AMORIM *et al.*, 2013). A aplicação das enzimas produzidas por basidiomicetos, especificamente os fungos da podridão branca, como agentes de biodegradação de fármacos é uma alternativa promissora, tendo em vista que estes fungos produzem enzimas capazes de biodegradar moléculas complexas, como a lignina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial das enzimas ligninolíticas lacase de *Trametes* sp. na biodegradação dos antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprima.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção das enzimas ligninolíticas lacase pelo cultivo estático do fungo da podridão branca *Trametes* sp.
- Avaliar *in vitro* a eficiência das enzimas na biodegradação dos antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprima, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

A produção e o consumo de substâncias biologicamente ativas são crescentes (DA CRUZ, 2012). Utilizadas para manutenção da saúde, limpeza e na produção agrícola, pecuária e industrial, após o uso são descartadas, lixiviadas ou eliminadas biologicamente em sua forma natural e/ou metabolizada, em sistemas de tratamento de efluentes, fossas sépticas ou diretamente em corpos hídricos.

O desenvolvimento da química analítica possibilitou identificar nos efluentes e nas águas a presença de vários compostos presentes nos produtos, denominados “contaminantes emergentes”. Esses micropoluentes não correspondem apenas aos produtos químicos produzidos nos últimos anos, mas também aos vários compostos orgânicos de origem exógena ou endógena que somente agora vêm sendo identificados em diferentes compartimentos ambientais (SODRÉ *et al.*, 2007). O quadro 1 apresenta uma lista com as principais classes de micropoluentes encontrados no ambiente.

| Classe de substância | Exemplos |
|---|---|
| Fármacos | |
| Antibióticos | Trimetoprim, eritromicina, lincomicina, sulfametazona. |
| Analgésicos e drogas anti-inflamatórias | Codeína, ibuprofeno, acetaminofeno, ácido acetil salicílico, diclofenaco, fenoprofeno. |
| Drogas psiquiátricas | Diazepam. |
| Reguladores lipídicos | Bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico. |
| Produtos de uso pessoal | |
| Fragrâncias | Nitropolicíclicos e macrocíclicos. |
| Agentes de protetor solar | Benzofenona, cânfora metilbenzilideno. |
| Repelentes | N,N-dietiltoluamida. |
| Surfactantes | Alquifenol etoxilados, alquifenóis (nonifenol e octifenol), alquifenol carboxilados. |
| Retardantes de chama | Difenil éteres polibromados (PBDEs), tetrabromo bisfenol A, Tris(2-cloroetil)fosfato. |
| Agentes e aditivos industriais | Agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos. |
| Produtos de desinfecção | Iodo-THMs, bromoácidos, bromoacetonitrilas, bromoaldeídos, cianoformaldeídos, bromatos, NDMA. |

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

Fonte: BARCELO, 2003.

Encontrados nas águas superficiais e subterrâneas em concentrações traço (MURRAY *et al.*, 2010), estes compostos não legislados no Brasil exigem tratamentos específicos para que sejam eliminados dos efluentes ou das águas, isto devido à sua complexibilidade química. Entretanto, as fossas sépticas (LABADIE *et al.*, 2007; DOUGHERTY *et al.*, 2010) e as águas residuárias da pecuária e da agricultura conduzem estes compostos até as águas superficiais e subterrâneas. O mesmo ocorre com o efluente que é encaminhado para as estações de tratamento de efluentes domésticos, hospitalares e industriais (PAL *et al.*, 2010), o qual, quando submetido ao sistema convencional de tratamento, gera um afluente não isento de compostos emergentes, devido à incapacidade destes sistemas de tratamento na remoção eficaz deste tipo de composto (LARSEN *et al.*, 2004). Como consequência, os contaminantes emergentes alcançam os corpos hídricos, sendo acumulados ao longo do tempo na água e nos sedimentos, podendo aparecer em pequenas concentrações na água potável. A tabela 1 apresenta as concentrações de alguns contaminantes emergentes já detectados em corpos hídricos.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de quantificar, qualificar e avaliar a ecotoxicidade e toxicidade destes compostos, os quais estão presentes nos ambientes aquáticos e, conseqüentemente, nas águas de abastecimento.

Suspeita-se que mesmo em pequenas concentrações, muitos micropoluentes sejam capazes de provocar danos à saúde humana e alterações no ecossistema (SANTANA, 2013). KIDD *et al.* (2007) propõem a ocorrência da feminização de peixes expostos ao hormônio sintético 17 α -etinilestradiol. 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.

Tabela 1- Concentração de alguns contaminantes emergentes encontrados em ambientes aquáticos.

| Contaminante | Uso | Concentração máxima (ng.L ⁻¹) | Referência | Tipo de corpo d'água | Local |
|---|--------------------------|---|---------------------------------|----------------------|------------------|
| Cafeína | Estimulante | 7,8 | Kurissery <i>et al.</i> , 2012 | Lago | Canadá |
| | | 16,1 | Weigel <i>et al.</i> , 2002 | Mar | Alemanha |
| Bisfenol A | Plastificante | 1760 | Sodré <i>et al.</i> , 2007 | Rio | Brasil |
| | | 14 | Kuch <i>et al.</i> , 2001 | Rio | Alemanha |
| 17 α - estinilestradiol | Anticoncepcional | 831 | Kolpin <i>et al.</i> , 2002 | Rio | EUA |
| Atrazina | Herbicida | 460 | Glassmeyer <i>et al.</i> , 2005 | Rio | EUA |
| Esterona | Hormônio | 22 | Mozaz <i>et al.</i> , 2004 | Rio | Espanha |
| DEET (N,N-dietil-meta- toluamida e N,N- dietil-3- metilbenzamida) | Repelente de Inseto | 69 | Kim <i>et al.</i> , 2007 | Rio | Coréia do Sul |
| Tricloran | Agente Antimicrobiano | 35 | Matamoros <i>et al.</i> , 2012 | Rio | Dinamarca |
| Amoxilina | Antibiótico | 17 | Locatelli <i>et al.</i> , 2011 | Rio | Brasil |
| Diclofenaco | Anti-inflamatório | 266 | Spongberg <i>et al.</i> , 2011 | Rio | Costa Rica |
| Diazepam | Antidepressivo | 90 | Valcárcel <i>et al.</i> , 2011 | Rio | Espanha |
| Acetaminofeno | Analgésico | 70 | Wang <i>et al.</i> , 2011 | Rio | EUA |
| Atenolol | Anti-hipertensivo | 690 | Kim <i>et al.</i> , 2009 | Rio | Coréia do Sul |

Fonte: SANTANA, 2013.

3.1.1 Fármacos

Dentre os micropoluentes ambientais aqueles 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 com diversas propriedades físico-químicas. Anualmente são fabricados toneladas de medicamentos, os quais são aplicados na medicina humana e veterinária. 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, disponibilizando estes compostos para os ambientes

aquáticos. Os fármacos excretados, e aqueles descartados de maneira incorreta, podem ainda ser encaminhados à rede coletora de esgoto, onde o efluente é submetido aos procedimentos para tratamento na ETE; porém o afluente não se torna isento de vários fármacos e hormônios (CHANG *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2011; STACKELBERG *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2009), disponibilizando estes contaminantes ao ambiente e causando problemas de cunho ambiental e saúde pública (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os fármacos são desenvolvidos para alterar funções bioquímicas e fisiológicas nos seres humanos e demais animais. Uma vez que estes compostos tornam-se disponíveis no meio ambiente, são capazes de manter sua atividade e atuar em organismos não alvo, causando efeitos negativos (JJEMBA, 2006). Além disto, estes compostos são susceptíveis a transformações no ambiente, através de processos bióticos e abióticos (TIXIER *et al.*, 2003).

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 *et al.*, 2007; VULLIET e CREN-OLIVÉ, 2011; YANG *et al.*, 2011; PETROVIC *et al.*, 2014; HIRSCH *et al.*, 1999).

3.1.1.1 Antibióticos: SMX e TMP

Os antibióticos são compostos naturais ou sintéticos, capazes de inibir crescimento ou provocar a morte de bactérias e fungos. (WALSH, C., 2003² *apud* GUIMARÃES *et al.*, 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 *et al.*, 2006).

² WALSH, C.; Antibiotics: Actions, Origins, Resistance, ASM Press: Washington, 2003.

Segundo dados da consultoria internacional IMS Health (IMS Health *apud* Veja, 2014)³, os antibióticos correspondem ao quinto remédio mais vendido no mundo, perdendo apenas para os 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 e 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 eficazmente 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).

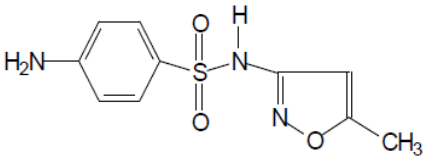
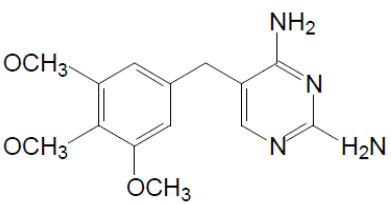
A presença de antibióticos no ambiente pode causar o aparecimento de bactérias resistentes, bem como recombinantes com maior patogenicidade (BAQUERO *et al.*, 2008; 1995; OHLSEN *et al.*, 2003). As bactérias podem adquirir resistência a um antibiótico quando contraem genes de resistência, obtidos por modificações no DNA da bactéria, provocadas por transferência horizontal de genes (GUARDABASSI e DALSGAARD, 2002; SUNDSFJORD *et al.*, 2004). A transferência de genes, segundo CAUMO *et al.* (2010) pode ocorrer de três formas: (i) transformação, bactérias trocam conteúdo genético pela captação direta de DNA; (ii) conjugação, transdução fago-mediada, pelo contato entre organismos com troca de DNA; (iii) transposição, mobilização de DNA no genoma do organismo. A alteração genética confere novas capacidades metabólicas ao indivíduo que recebe o DNA de outro microrganismo, permitindo sua adaptação a novos ambientes e condições (CAUMO, 2010).

O sulfametoxazol (SMX) e a trimetoprima (TMP) são antibióticos empregados geralmente de maneira conjunta (ex. Bactrim[®]). O sulfametoxazol foi o quarto antibiótico mais vendido em 2005, correspondendo a um consumo de 133

³ IMS Health. <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth>

toneladas e 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 bacteriostático e bloqueia a enzima di-hidropteroato sintetase (GUIMARÃES *et al.*, 2010), afetando a síntese bacteriana do ácido fólico (REESE, 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 *et al.*, 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®). As estruturas dos compostos compõem o quadro 2.

| 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 |  |

Quadro 2 - Características químicas dos compostos SMX e TMP.

Fonte: Adaptado de BRENNER, 2009.

A combinação entre o sulfametoxazol (SMX) e o trimetoprima (TMP) é indicada para o tratamento de infecções de origem bacteriana, tais como Infecções do trato respiratório e urinário, ouvidos, renal, gastrintestinais, pele e tecidos moles

(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).

O SMX e a TMP foram detectados em ETEs e águas superficiais em concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$. Alguns dados quanto à ocorrência de SMX e TMP em diferentes locais e concentrações estão contidos na tabela 2. Encontrados com frequência nas águas residuais, apresentam alta resistência aos tratamentos biológicos mais utilizados (VALCÁRCEL *et al.*, 2011).

Estudos demonstram um aumento gradual na frequência de bactérias isoladas que são resistentes ao SMX e ao TMP (HUOVINEN *et al.*, 1995). Além da resistência patogênica, a genotoxicidade pode ser preocupante. O sulfametoxazol foi capaz de induzir um efeito citotóxico em linfócitos humanos cultivados (ABOU-EISHA *et al.*, 2004).

Tabela 2 - Concentrações de SMX e TMP encontrados em efluentes, afluentes e rios.

| Substância | Local | Concentração | Referência |
|----------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Sulfametoxazol | Afluentes e efluentes de ETEs/EUA | 0,37-1,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ * | KARTHIKEYAN e MEYER, 2006 |
| | Afluentes e efluentes de ETE/Japão | 6,9-28 ng.L^{-1} | CHANG <i>et al.</i> , 2008 |
| | Rios/Japão | 0,37-0,56 ng.L^{-1} | CHANG <i>et al.</i> , 2008 |
| | Rios/Espanha | 32-952 ng.L^{-1} | VALCÁRCEL <i>et al.</i> , 2011 |
| Trimetoprima | Afluentes e efluentes de ETE/EUA | 0,55-1,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ * | KARTHIKEYAN e MEYER, 2006 |
| | Afluentes e efluentes de ETE/Japão | 11-42 ng.L^{-1} | CHANG <i>et al.</i> , 2008 |
| | Rios/Japão | 0,09-0,34 ng.L^{-1} | CHANG <i>et al.</i> , 2008 |
| | Rios/Espanha | 38-690 ng.L^{-1} | VALCÁRCEL <i>et al.</i> , 2011 |

*Concentrações máximas observadas.

3.2 TRATAMENTOS PARA REMOÇÃO DOS FÁRMACOS

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 dos micropoluentes em frações traço (DA CRUZ, 2012). Os

sistemas de tratamento de efluente são insuficientes para a remoção dos fármacos (TERNES,1998). A tabela 3 demonstra as taxas de remoção de SMX e TMP de diversas estações de tratamento, sendo possível verificar que a porcentagem de remoção é variada.

Os métodos convencionais utilizados nas ETEs têm-se mostrado pouco eficientes na remoção de fármacos nas águas residuárias, permitindo que os compostos emergentes como SMX e TMP sejam disponibilizados para o ambiente. Assim, é crucial o desenvolvimento de novos métodos de tratamento capazes de garantir a degradação desses contaminantes ou a transformação em produtos menos nocivos ao meio ambiente DA CRUZ (2012).

Tabela 3 - Remoção de SMX e TMP em estações de tratamento em diversos países.

| Composto (Classe) | Afluente | Efluente | % Remoção | Referência |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|--------------------------------------|
| Sulfametoxazol (Antibiótico) | 0,45 | 0,05 | < 90 | Jelic <i>et al.</i> , 2011 |
| | - | 0,6 µg.L ⁻¹ | 67 | Zhang <i>et al.</i> , 2008 |
| | 1090 ng.L ⁻¹ | 210 ng.L ⁻¹ | 81 | Yang <i>et al.</i> , 2005 |
| | 580 ng.L ⁻¹ | 250 ng.L ⁻¹ | 57 | Carballa <i>et al.</i> , 2004 |
| | 254 ng.L ⁻¹ | 175 ng.L ⁻¹ | n.r. | Sim <i>et al.</i> , 2011 |
| | 157 ng.L ⁻¹ | 70 ng.L ⁻¹ | < 60 | Miège <i>et al.</i> , 2009 |
| | 29 ng.L ⁻¹ | 10 ng.L ⁻¹ | < 66 | Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> ,2009 |
| | 0,65 µg.L ⁻¹ | 0,29 µg.L ⁻¹ | < 60 | McClure <i>et al.</i> , 2007 |
| | 390 ng.L ⁻¹ | 310 ng.L ⁻¹ | 20 | Brown <i>et al.</i> , 2006 |
| | 75 ng.L ⁻¹ | 51 ng.L ⁻¹ | n.r. | Clara <i>et al.</i> , 2005 |
| Trimetoprima (Antibiótico) | - | - | < 30 | Jelic <i>et al.</i> , 2011 |
| | - | 30 ng.L ⁻¹ | 88 | Gómez <i>et al.</i> , 2007 |
| | 230 ng.L ⁻¹ | 209 ng.L ⁻¹ | n.r. | Sim <i>et al.</i> , 2011 |
| | 205 ng.L ⁻¹ | 63 ng.L ⁻¹ | 69 | Behera <i>et al.</i> , 2011 |
| | 610 ng.L ⁻¹ | < 10 ng.L ⁻¹ | n.r. | Yang <i>et al.</i> , 2011 |
| | 281 ng.L ⁻¹ | 60 ng.L ⁻¹ | < 25 | Miège <i>et al.</i> , 2009 |
| | 2192 ng.L ⁻¹ | 1152 ng.L ⁻¹ | < 50 | Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> ,2009 |
| | 0,27 µg.L ⁻¹ | 0,26 µg.L ⁻¹ | < 5 | McClure <i>et al.</i> , 2007 |
| | 590 ng.L ⁻¹ | 180 ng.L ⁻¹ | 69 | Brown <i>et al.</i> , 2006 |
| | 320 ng.L ⁻¹ | 120 ng.L ⁻¹ | 62 | Gulkowska <i>et al.</i> , 2008 |

Fonte: DA CRUZ, 2012.

Vários autores têm tentado degradar especialmente o SMX, utilizando principalmente processos oxidativos avançados; porém, existe uma grande dificuldade em mineralizar este composto, ou degradá-lo sem que haja a formação de compostos tóxicos (TROVO *et al.*, 2009; GHAUCH *et al.*, 2013).

BRENNER (2009) testou a remoção de TMP e SMX em efluentes hospitalares aplicando a técnica de eletrocoagulação. Ao final dos ensaios foi possível constatar ausência de degradação do SMX e redução de 24% da carga inicial do TMP.

Silva (2012) avaliou a degradação da trimetoprima e do sulfametoxazol utilizando o processo fenton, que levou à degradação de 25,5 % do TMP e 96% do SMX. Já em processo foto-fenton, houve redução de 99,7% de SMX e 11,3% de TMP. Porém, os estudos apontaram para a geração de subprodutos da degradação, não ocorrendo a mineralização.

Estudos de degradação do SMX e TMP, através de técnicas eletroquímicas utilizando eletrodo de diamante dopado com boro geraram a mineralização de ambos compostos (DE AMORIM *et al.*, 2013).

Uma alternativa biológica pode ser baseada no uso de fungos da podridão branca e suas enzimas oxidativas.

3.2.1 Tratamento Biológico: Fungos Basidiomicetos e Suas Enzimas Oxidativas

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 complexas semelhantes à lignina (GUO, X. *et al.*, 2014; HOU, H. M. *et al.*, 2004; INOUE, Y. *et al.*, 2010; LIBARDI, 2010; MOREDO, N. *et al.*, 2003; WEN, X. *et al.*, 2009; ZHANG, Y. *et al.*, 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 *et al.*, 2007b; LLORET *et al.*, 2010). No entanto, são necessários mais estudos na área, devido às inúmeras substâncias presentes nas mais diversas matrizes ambientais.

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 (TAVARES, L. M. C., 2012), viabilizando o método.

3.3 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA

Os fungos causadores da podridão branca (do inglês *white-rot fungi*) da madeira, são basidiomicetos que se desenvolvem em materiais lenhosos como a madeira, atacando a estrutura e conferindo-lhe uma aparência esbranquiçada, o que justifica o nome deste grupo de fungos (BLANCHETTE, 1984)

Estes basidiomicetos são os únicos fungos capazes de metabolizar completamente a lignina, a celulose e a hemicelulose, a gás carbônico e água (KIRK e FARREL, 1987), permitindo a reciclagem de materiais lignocelulolíticos, como a madeira e resíduos agroindustriais. Esta propriedade deve-se à ação de um conjunto de enzimas, sintetizadas por estes fungos. Uma grande variedade de enzimas pode ser produzida, dentre as quais a manganês peroxidase (MnP), lacase, lignina peroxidase (LiP), celulasas, hemicelulasas, xilanases (MISHRA e LEATHAM, 1990; YANG *et al.*, 2013) entre outras. Cada uma dessas enzimas apresenta um mecanismo de ação e atua sobre determinadas condições, mas todas contribuem de maneira conjunta para a degradação da matéria.

Entre as enzimas envolvidas na degradação dos materiais vegetais, as responsáveis pela degradação da lignina, denominadas lignocelulolíticas, como a MnP, LiP, lacase e outras peroxidases, têm sido alvo de vários estudos (TAVARES,

2006). Isto porque são capazes de degradar a complexa molécula de lignina, que consiste em um polímero aromático, responsável por conferir rigidez e resistência às células vegetais. Em vista do seu elevado grau de recalcitrância e a existência de enzimas capazes de degradar esta estrutura, a utilização destas enzimas apresenta potencial para a biorremediação de poluentes com estruturas similares à lignina (POINTING, 2001). Várias pesquisas têm avaliado a biodegradação de compostos utilizando enzimas lignocelulolíticas, conforme quadro 3.

| Substância ser degradada | Fungo produtor de enzimas lignocelulolíticas | Referência | % de remoção |
|--|---|--------------------------------------|---|
| Tetraciclina and oxitetraciclina | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | WEN <i>et al.</i> , 2009 | 95% |
| Triclosan | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>T. versicolor</i> | INOUE <i>et al.</i> , 2010 | 100% |
| Sulfametoxazol | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | GUO <i>et al.</i> , 2014 | 74% |
| Sulfametoxazol, Citalopram, Fluoxetina, Diclofenaco, Ibuprofeno, Naproxeno, Carbamazepina, Diazepam. | <i>Bjerkandera adusta</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Bjerkandera</i> sp. | RODARTE-MORALES <i>et al.</i> , 2011 | Degradação completa de todas as substâncias exceto fluoxetina e diazepam, que foram removidos em percentagens de 23 de 57%. |

Quadro 3 - Pesquisas envolvendo a biodegradação de substâncias utilizando fungos da podridão branca.

3.3.1 *Trametes* sp.

O basidiomiceto *Trametes* sp. é um fungo da podridão branca amplamente aplicados em pesquisas de biodegradação da lignina (MOREDO *et al.*, 2013).

Os fungos da podridão branca promovem a deslignificação dos tecidos vegetais, sem necessariamente produzir e utilizar as mesmas enzimas lignocelulolíticas para isto. O fungo *Trametes* sp. sintetiza a lacase, a MnP e a LiP para degradação do mesmo material.

3.4 ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

As enzimas lignocelulolíticas apresentam baixa especificidade, são classificadas em fenoloxidasas, grupo que abrange as lacases, e heme peroxidases, classe à que pertence às enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase. Os fungos da podridão branca podem produzir uma ou mais enzimas lignocelulolíticas para degradar a lignina (WESENBERG *et al.*, 2003; MACIEL, 2012), característica que permite a divisão dos fungos da podridão em quatro grupo, conforme Figura 1.

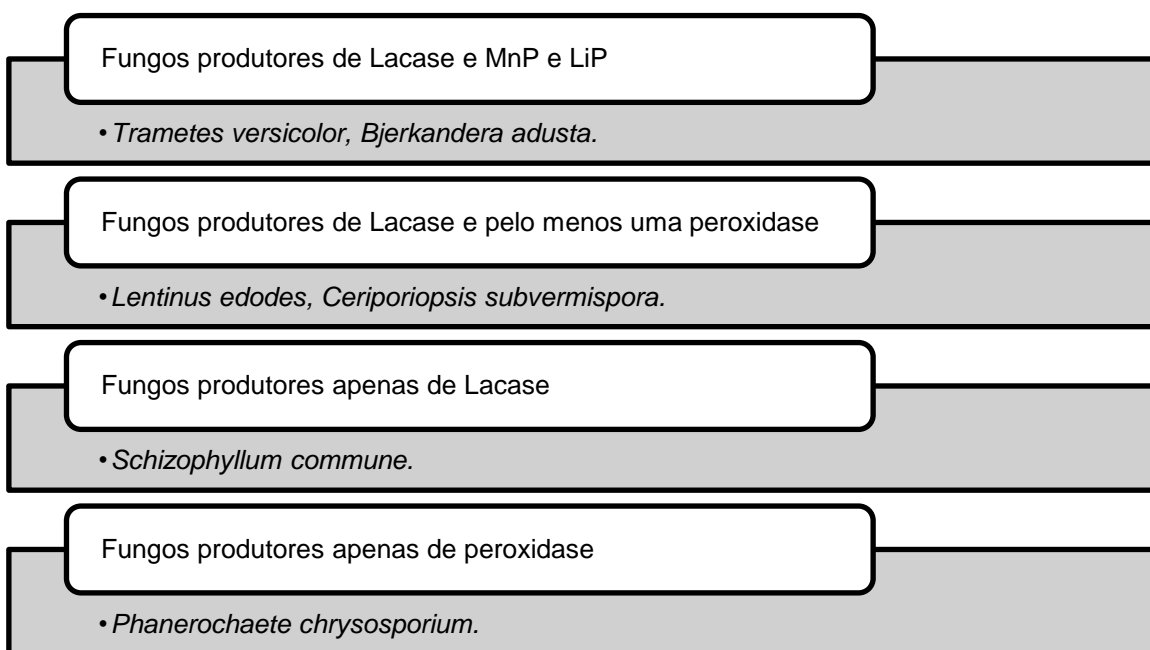


Figura 1- Fungos da podridão branca classificados quanto à habilidade de produção enzimas lignocelulolíticas.

Fonte: adaptado de MACIEL, 2012.

3.4.1 Lignina Peroxidase

A lignina peroxidase (E.C. 1.11.1.14) é uma glicoproteína heme. 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).

3.4.2 Manganês Peroxidase

A manganês peroxidase (E.C. 1.11.1.13), é uma heme proteína glicosilada, 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).

3.4.3 Lacase

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

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

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 e 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- etilbenzotiazolína-6-sulfonato)).

3.4.3.1 Estrutura

São compostas por quatro átomos de cobre em seu centro catalítico (Figura 2), por isso conhecidas como multicobreoxidases (LIBARDI, 2010).

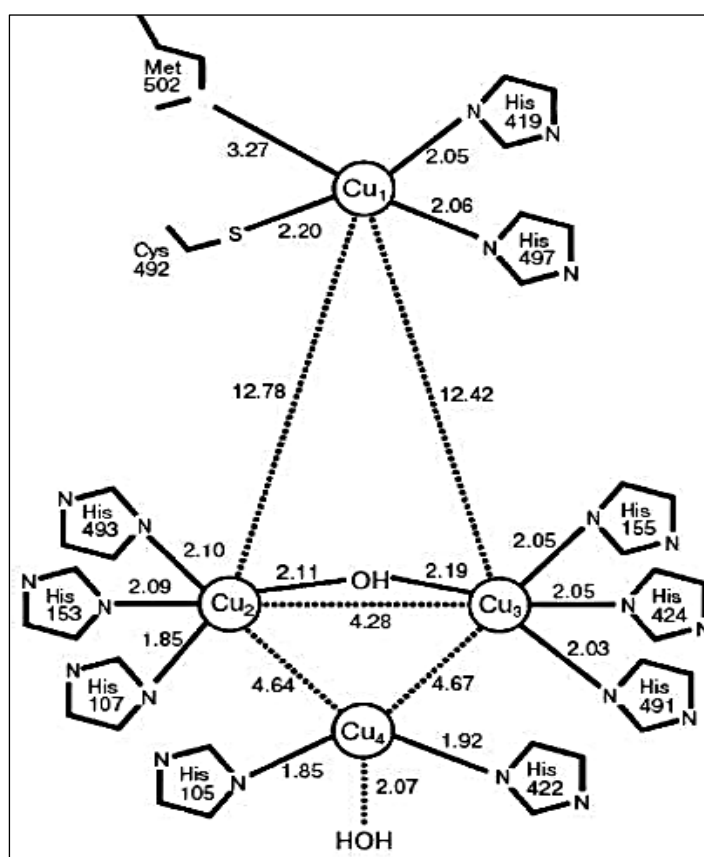


Figura 2 - Representação dos sítios ativos de cobre. Sítio T1 (Cu₁), T2 (Cu₄) e T3 (Cu₂-Cu₃) da lacase de *Bacillus subtilis*.

Fonte: Morozova *et al.* (2007).

A enzima lacase possui em sua estrutura um átomo de cobre do tipo 1, um átomo de cobre do tipo 2 e dois átomos de cobre do tipo 3. Cada tipo de átomo de cobre compõe um sítio ativo da enzima, totalizando três sítios, sendo cada um fundamental no mecanismo catalítico.

O sítio T1 é composto por cobre do tipo 1, possui em sua estrutura obrigatoriamente duas histidinas e um grupo sulfrídilo da cisteína, sendo o quarto ligante à leucina ou à fenilalanina (MOROZOVA *et al.*, 2007^a). Este sítio é o aceptor primário de elétrons, apenas compostos com potencial de ionização menor que o potencial redox do cobre do tipo 1 serão oxidados pela enzima (MOROZOVA *et al.*, 2007^a). O sítio T1 determina a eficiência da enzima (GIARDINA *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos são oxidados pela enzima, pois apresentam baixo potencial redox, permitindo que o Cobre do tipo 1 remova elétrons do composto. O sítio T1 possui banda de absorção na região da luz visível (600 nm).

O sítio T2 é constituído por cobre do tipo 2, o qual está ligado a 2 histidinas e uma molécula de água, funcionando como receptor de um elétron (MIN *et al.*, 2001; STRONG e CLAUS, 2011), O cobre 2 tem um papel importante na estabilização da ligação aniônica do cobre 3 no centro ativo (MADHAVI e LELE, 2009).

O sítio T3 é constituído por um par de átomos de cobre, ligados a seis moléculas de histidina, funcionando como receptor de 2 elétrons (MIN *et al.*, 2001). Os centros ativos do cobre 2 e 3 estão juntos e formam um centro trinuclear que está envolvido no mecanismo catalítico de ação da enzima (GOCHEV e KRASTANOV, 2007; MADHAVI e LELE, 2009).

3.4.3.2 Mecanismos da catálise

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, conforme Figura 3.

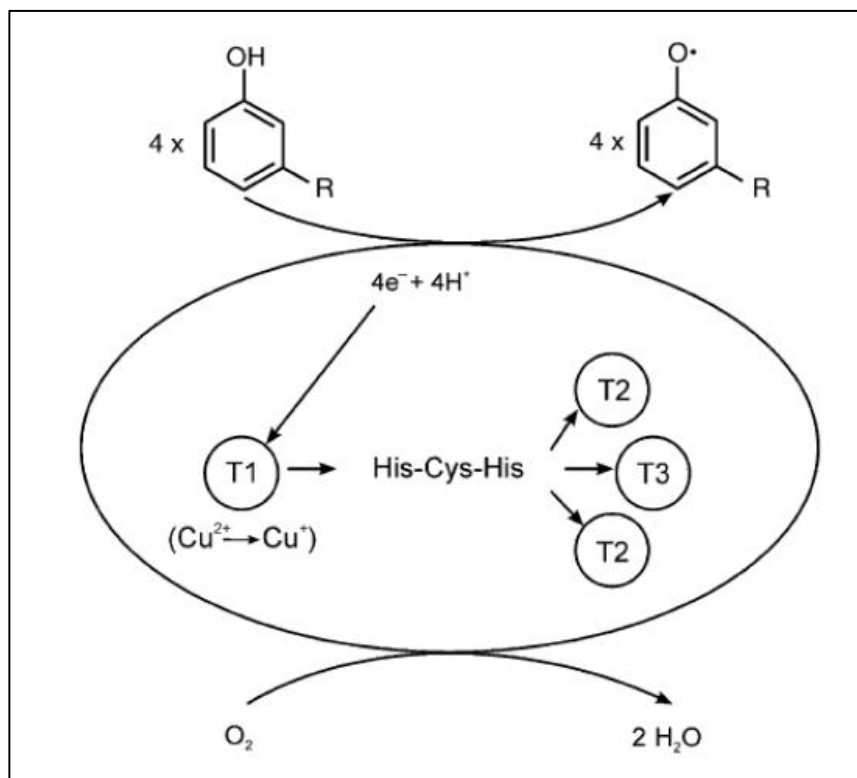


Figura 3 - Mecanismo de catálise da lacase.
 Fonte: BALDRIAN (2006).

Estas enzimas apresentam potencial redox variável, característica que é influenciada pela origem da lacase. As enzimas fungicas, 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 e SCHAUER, 2009).

A enzima lacase atua na ausência de mediadores, o que limita sua ação na presença de substratos grandes, os quais devido ao tamanho não penetram no sítio ativo da enzima. A ausência de mediadores também impede sua atuação frente a moléculas que apresentam um alto potencial redox. A presença de mediadores intermedia reações da lacase e do substrato (RIVA, 2006).

4 PROCEDIMENTOS METODOLOGICOS

A metodologia aplicada foi dividida em duas etapas, envolvendo as atividades indicadas na Figura 4.

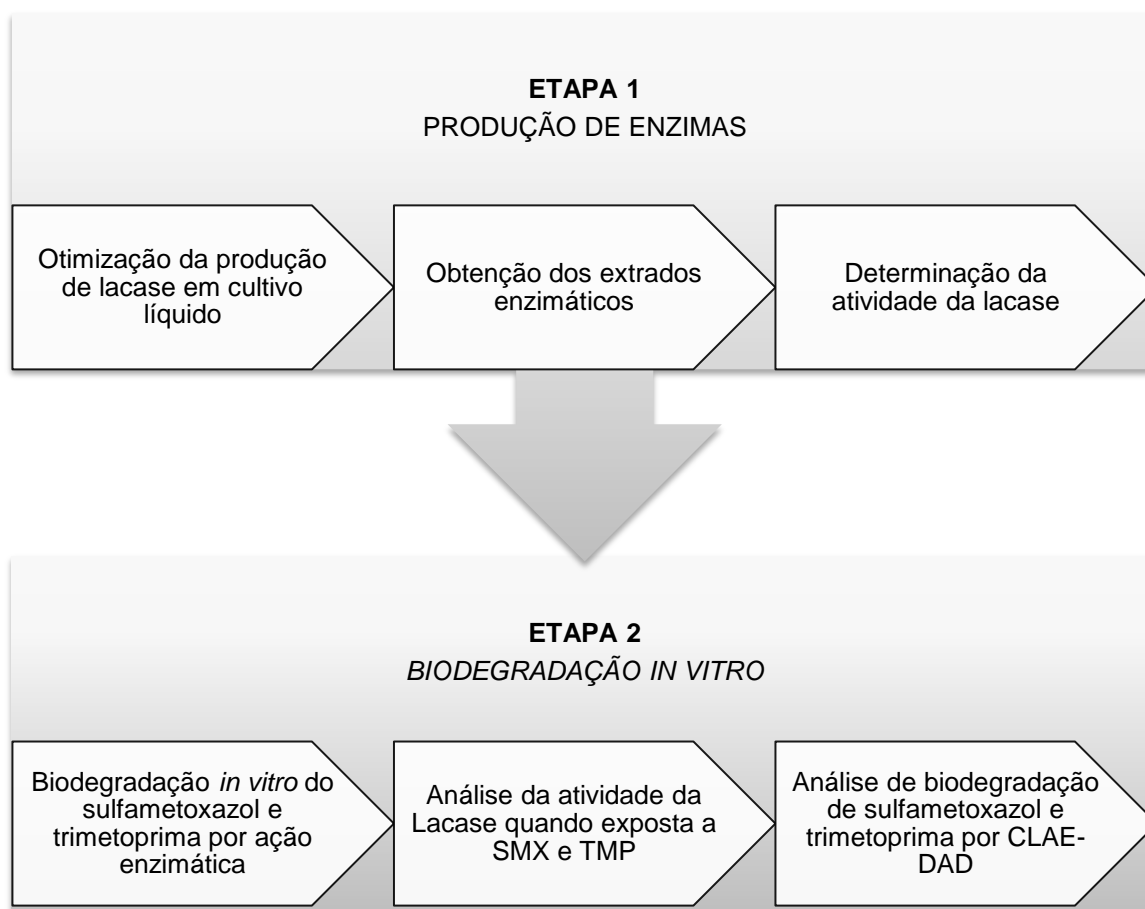


Figura 4 - Etapas desenvolvidas no trabalho de biodegradação dos antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas ligninolíticas de basidiomicetos.

4.1 MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO

O basidiomiceto *Trametes* sp. (Figura 5) foi o organismo selecionado para ser avaliado quanto ao potencial de biodegradação dos compostos SMX e TMP. A cepa empregada nos ensaios foi isolada no laboratório de Biotecnologia da

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. A cultura foi inoculada em placas de Petri contendo meio Ágar-Extrato de Malte a 2%, e incubada por sete dias, a 28°C e em seguida foi armazenada a temperatura de 4°C.



Figura 5 - Cultivo de *Trametes* sp. após 7 dias em AEM (28°C).

4.2 PREPARO DO INOCULO PARA CULTIVO LIQUIDO

O inóculo foi preparado através da transferência de um plug (12 mm) da placa contendo o cultivo de *Trametes* sp. armazenada a temperatura de 4°C. O plug foi posicionado no centro de uma placa contendo meio AEM, cultivada por sete dias, no escuro, na temperatura de 28°C. No sétimo dia de crescimento, o micélio foi utilizado como inóculo.

4.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM CULTIVO LIQUIDO

Os cultivos líquidos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados 50 mL de água destilada, CuSO_4 em diversas

concentrações e bagaço de uva Bordô (*Vitis labrusca*). O processamento do bagaço foi realizado em parceria com a UFPR, nos laboratórios vinculados a Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. O bagaço foi seco em estufa de circulação de ar por 36 horas, a 40 °C, sendo posteriormente moído (moinho de facas). O bagaço moído e seco foi armazenado sob refrigeração (-18°C). Os meios foram autoclavados (121°C por 15 minutos).

Após resfriamento do meio, foram inoculados três plugs (12mm) do inóculo viável de *Trametes* sp. (conforme descrito no item 4.2). Os frascos foram fechados com tampão de algodão e gaze, e os cultivos foram mantidos por sete dias a 28°C, no escuro e conduzidos em duplicata.

4.3.1 Estudo do Efeito da Concentração de Cobre e Bagaço de Uva

Avaliou-se a produção de lacase em meios constituídos apenas por bagaço de uva e CuSO_4 em três concentrações distintas, com o objetivo de determinar o efeito da concentração destes compostos na atividade da enzima lacase.

Para execução do teste, foi realizado um planejamento experimental fatorial com três níveis (-1, 0,+1) do tipo *Box-Behnken*. As concentrações de bagaço de uva e CuSO_4 empregadas no experimento, foram de 0,5% de bagaço de uva, 1 mM de CuSO_4 , incluiu-se uma concentração acima (+1) e outra abaixo (-1), para compor os três níveis.

Foram preparados meios de cultivo constituídos por concentrações de CuSO_4 de 0,5 mM (-1), 1mM (0) e 1,5 mM (+1), e concentrações de bagaço de uva de 0,25% (-1), 0,5% (0) e 1% (+1), conforme tabela 4.

Tabela 4 - Planejamento fatorial fracionário com as variáveis bagaço de uva e CuSO₄ em três concentrações. CuSO₄ 0,5 mM (-1), 1mM (0) e 1,5 mM (+1), e bagaço de uva de 0,25% (-1), 0,5% (0) e 1% (+1).

| Composição do Meio | Bagaço de Uva | CuSO ₄ |
|--------------------|---------------|-------------------|
| 1 | 0,25% | 0,5 mM |
| 2 | 0,25% | 1,0 mM |
| 3 | 0,25% | 1,5 mM |
| 4 | 0,50% | 0,5 mM |
| 5 | 0,50% | 1,0 mM |
| 6 | 0,50% | 1,5 mM |
| 7 | 1,00% | 0,5 mM |
| 8 | 1,00% | 1,0 mM |
| 9 | 1,00% | 1,5 mM |

4.3.2 Estudo do Efeito da Concentração do Bagaço de Uva

O cultivo do *Trametes sp.* foi conduzido em meios de cultivo compostos apenas por bagaço de uva, nas concentrações 1%, 1,5% e 2%.

4.3.3 Estudo do Efeito do Período de Adição de CuSO₄

O basidiomiceto foi cultivado em meio de cultura líquido, composto por 2% de bagaço de uva. Procedeu-se com a adição de 1,5 mM de CuSO₄ no quarto e no quinto dia, com o objetivo de avaliar se a adição do agente indutor da lacase durante a fase exponencial era um fator que interferia na atividade enzimática (NETO, 2012). Os testes foram conduzidos em duplicata para as duas condições. Uma duplicata sem a adição do CuSO₄ foi mantida como controle, na qual não houve a adição de CuSO₄.

4.3.4 Estudo do Efeito da Aclimação

O fungo *Trametes* sp. foi inoculado em três tipos de composição de meio de cultura sólido: (1) Ágar-Extrato de Malte a 2% (AEM); (2) Ágar-Extrato de Malte a 2% e 7,5% de bagaço de uva Bordo (AEM-BU); (3) Ágar-Extrato de Malte a 2% e 7,5% de casca de arroz (AEM-CA). Destes, os meios 2 e 3 eram constituídos por material lignolíticos, proporcionando o cultivo de *Trametes* sp. em meios aclimatados.

Os meios foram preparados, autoclavados e vertidos em placas de petri com diâmetros entre 90 mm e 96 mm. No centro de cada placa foi inoculado um plug de 12 mm da cultura de *Trametes* sp. As placas foram incubadas a temperatura de 28°C, mantidas no escuro por sete dias. O ensaio foi conduzido em triplicata.

Foram adicionados três plugs de cada cultura aclimatada, em um meio de cultivo líquido composto por 2% de bagaço de uva, com o objetivo de avaliar se a aclimação do fungo exerceria influência na atividade da lacase.

Os cultivos líquidos com inóculo aclimatado foram realizados em duplicata, e interrompidos após sete dias, o teste foi conduzido de forma estática (estufa a 28°C).

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

Após a etapa de produção enzimática, os meios de cultivo foram submetidos à filtração em papel filtro de 12,5 de diâmetro, 14 µm, espessura de 205 µm e gramatura de 80g/m². O filtrado foi centrifugado (centrífuga Quimis modelo Q - 222 T 28), por 20 minutos a 2.720 rpm. Alíquotas do extrato bruto obtido foram acondicionadas em eppendorfs e congeladas para posterior realização dos ensaios de biodegradação e atividade enzimática.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE

A atividade da lacase foi determinada espectrofotometricamente, através do acompanhamento da oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulphonate)) pela enzima (HOU *et al.*, 2004). A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 420 nm. Foram utilizadas cubetas de acrílico com caminho óptico de 1 cm.

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. A reação ocorreu a temperatura de 40°C e teve seu início pela adição de 150 µL do extrato bruto. A reação foi quantificada no quinto minuto, quando a solução foi transferida para cubeta e realizada a medição da absorbância. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro Bel (modelo UV-M51 UV/VIS).

Para a conversão da leitura de absorbância em segundos (abs/s) em Unidade de Enzima/Litro ($U \cdot L^{-1}$), foi utilizada a equação 1:

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

Onde:

Δabs : Absorbância final - absorbância inicial, ϵ = coeficiente de extinção molar do ABTS oxidado ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O radical catiónico do ABTS possui um coeficiente de extinção molar (ϵ) a 420 nm de $36\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 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 por minuto ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.6 BIODEGRADAÇÃO DE SMX E TMP

4.6.1 Atividade da Lacase na Presença a SMX e TMP

A atividade enzimática foi avaliada quando o extrato bruto foi exposto aos fármacos SMX e TMP. Foram adicionados em tubos de ensaio os fármacos em concentrações de 5 mg.L^{-1} e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$, tampão acetato (5 mM, pH 5) e 2 mL de extrato enzimático (atividade $0,89 \text{ U. L}^{-1}$). Após 1 hora de reação, sob condições estáticas, no escuro e a temperatura ambiente, foram retirados 150 μL da mistura os quais foram utilizados para determinação da atividade da enzima lacase, conforme item 4.7.

Para o experimento, foram estabelecidos dois controles, isentos de fármaco, constituídos apenas por tampão, extrato enzimático e água ultra pura. O experimento foi realizado em duplicata.

4.6.2 Ensaio de Biodegradação

Os experimentos de biodegradação *in vitro* foram baseados nas metodologias descritas por WEN *et al.* (2009), LLORET *et al.* (2010), INOUE *et al.* (2010) e ZHANG e GEISSEN (2010).

Os testes de biodegradação de SMX e TMP foram realizados de forma isolada. Foram conduzidos testes para cada um dos fármacos variando as condições de incubação da reação (estático e agitado) e o efeito provocado pela ausência ou presença de mediadores da reação.

Os fármacos SMX (Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$) e TMP (Sigma-Aldrich, $\geq 99,0\%$), foram utilizados na concentração inicial de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em concentrações superiores as encontradas no ambiente, para dispensar a utilização de técnicas de pré-concentração da amostra.

As reações foram conduzidas com a adição de 0,89 unidades de enzima, quantidade obtida pela adição de 2 mL do extrato bruto. Nos testes realizados na presença de mediadores, foi empregado 1 mM do ácido 2-hidroxibenzoico (AHB).

As reações foram realizadas em tubos de ensaio, em duplicata, e o volume final de reação foi de 5 mL, o qual foi atingido pela adição de tampão acetado de sódio, 50 mM, pH 5.

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.

Os testes foram conduzidos conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5 - Condições dos testes de biodegradação.

| Farmaco | Concentração inicial | Atividade Enzimática | Mediadores | Incubação |
|---------|---|------------------------|------------|---|
| SMX | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | 1 mM AHB | Shaker, 110 rpm, 37 °C, 24 horas, no escuro. |
| SMX | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | Ausente | Shaker, 110 rpm, 37 °C, 24 horas, no escuro. |
| SMX | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | 1 mM AHB | Estufa 37 °C, 24 horas, no escuro. |
| SMX | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | Ausente | Estufa 37 °C, 24 horas, no escuro. |
| TMP | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | 1 mM AHB | Shaker, 110 rpm, 37 °C, 24 horas, no escuro. |
| TMP | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | Ausente | Shaker, 110 rpm, 37 °C, 24 horas, no escuro. |
| TMP | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | 1 mM AHB | Estufa 37 °C, 24 horas, no escuro. |
| TMP | 2,5 mg.L ⁻¹ , 5 mg.L ⁻¹ e 7,5 mg.L ⁻¹ . | 447 U. L ⁻¹ | Ausente | Estufa 37 °C, 24 horas, no escuro. |

Ao final do período de 24 horas de tratamento, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 500 µL de metanol. As amostras foram mantidas em refrigerador a 4°C por 18 dias, até a realização das análises cromatográficas.

4.6.3 Análise de Biodegradação de SMX e TMP por CLAE-DAD

A biodegradação dos compostos SMX e TMP, foi avaliada pela presença ou ausência destas substâncias na amostra após o tratamento enzimático. A verificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD), permitindo determinar os compostos TMP e SMX.

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

Todas as amostras foram filtradas com filtro seringa (membrana de éster de celulose de 0,45 μ m) 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, foram adaptadas da metodologia proposta por AKAY *et al.*, 2002, sendo alterada a vazão, volume de injeção e composição da fase móvel.

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, compostas por seis concentrações (0,1 mg.L⁻¹, 1,5 mg.L⁻¹, 3,0 mg.L⁻¹, 4,5 mg.L⁻¹, 6,0 mg.L⁻¹ e 7,5 mg.L⁻¹). A equação da reta obtida em cada curva analítica foi utilizada para determinar as concentrações de fármaco presentes nas amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA LACASE

5.1.1 Estudo do Efeito e da Concentração de Cobre e Bagaço de Uva

O estudo avaliou a produção de lacase pelo cultivo do fungo *Trametes* sp. em três concentrações distintas de sulfato de cobre (0,5 mM, 1 mM e 1,5 mM) e bagaço de uva (0,25, 0,5% e 1%).

O bagaço de uva foi utilizado como substrato considerando que em sua composição estão presentes carboidratos (Ribeiro *et al.*, 2015), nitrogênio e outros componentes os quais podem ser utilizados pelo fungo para crescimento e produção de enzimas. PEREIRA (2015) verificou a presença de nitrogênio em bagaço de uva bordo na relação de 1,30 % (+/-10), ou seja, o resíduo apresenta nitrogênio disponível para atender a demanda do fungo pelo nutriente.

As atividades enzimáticas obtidas no experimento fatorial constam na tabela 7, onde os valores de atividade descritos correspondem à média da atividade obtida na duplicata.

Tabela 6 - Composição dos meios de cultivo com variações nas concentrações de bagaço de uva (0,25%, 0,5% e 1,0%) e CuSO₄ (0,5 mM, 1 mM e 1,5 mM): média+DP.

| Composição do Meio | Uva | CuSO ₄ | Atividade Enzimática (U. L ⁻¹) |
|--------------------|--------|-------------------|--|
| 1 | 0,25%, | 0,5 mM | 147,99 ± 50,11 |
| 2 | 0,25% | 1,0 mM | 161,73 ± 11,46 |
| 3 | 0,25% | 1,5 mM | 216,28 ± 10,59 |
| 4 | 0,50% | 0,5 mM | 153,43 ± 0,98 |
| 5 | 0,50% | 1,0 mM | 173,49 ± 64,12 |
| 6 | 0,50% | 1,5 mM | 238,93 ± 25,35 |
| 7 | 1,00% | 0,5 mM | 54,39 ± 6,03 |
| 8 | 1,00% | 1,0 mM | 172,24 ± 44,15 |
| 9 | 1,00% | 1,5 mM | 219,64 ± 38,42 |

As maiores atividades enzimáticas, foram obtidas nos cultivos de *Trametes* sp. inoculados nos meios com composição 3, 6 e 9. Nestes, foram adicionadas as maiores concentrações de sulfato de cobre (1,5 mM), o que demonstra elevação da atividade enzimática nesta concentração do indutor. GIARDINA *et al.* (1999) relataram que a adição de sulfato de cobre no cultivo de *Pleurotus ostreatus* aumentou proporcionalmente a atividade enzimática, atingindo máxima atividade (30.000 U.L^{-1}) quando $150 \mu\text{M}$ de CuSO_4 foi utilizado. No experimento também foi possível também verificar uma proporcionalidade entre a atividade e adição do agente indutor. Quando os cultivos foram inoculados com 1 mM de CuSO_4 a atividade enzimática reduziu em aproximadamente 24,73% quando comparada à obtida nas culturas com a concentração de CuSO_4 1,5 mM. As culturas que foram expostas a 0,5 mM de sulfato de cobre apresentaram uma atividade inferior as atividades obtidas pelo cultivo a 1,0 mM e 1,5 mM.

A composição do meio com 1% de bagaço de uva e 0,5 mM de CuSO_4 (meio 7), foi a mais desfavorável para a produção de lacase.

A concentração de bagaço de uva apresentou baixa relevância nas atividades enzimáticas quando comparada à interferência provocada pela variação do CuSO_4 , o fato é evidenciado pelo diagrama de pareto (figura 6). Possivelmente este resultado da baixa relevância do bagaço de uva esteja relacionado às concentrações avaliadas neste estudo.

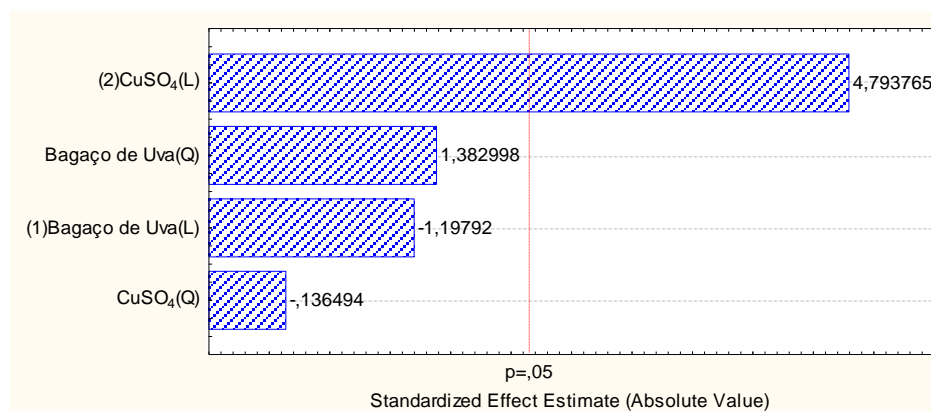


Figura 6 - Diagrama de Pareto. Interferência na produção de lacase em função da concentração de CuSO_4 e bagaço de uva.

5.1.2 Estudo do Efeito do Aumento da Concentração do Bagaço de Uva

Foi analisada a produção enzimática obtida em cultivos compostos apenas por bagaço de uva, submetidos a concentrações de 1%, 1,5% e 2% do material. O objetivo foi explorar a produção enzimática do fungo utilizando apenas o resíduo.

A tabela 8 apresenta as atividades obtidas, pela média da duplicata.

Tabela 7- Atividades obtidas pela variação da concentração de bagaço de uva: média + DP.

| Porcentagem Bagaço de Uva (%) | Atividade Enzimática (U.L ⁻¹) |
|-------------------------------|---|
| 1 | 1.108,00 ± 0,06 |
| 1,5 | 1.396,71 ± 0,04 |
| 2 | 1.440,89 ± 0,03 |

A utilização de bagaço de uva como substrato nas concentrações avaliadas possibilitou a produção de lacase pelo fungo sem adição de suplementos. O experimento 1 (1% de bagaço de uva) apresentou atividade superior à obtida no experimento 8 do Estudo do Efeito e da Concentração de Cobre e Bagaço de Uva do (item 5.1.1.), em ambos os testes os cultivos foram submetidos as mesmas condições cultivo e composição do meio, a diferença nos valores de atividade encontrados podem ser atribuídos a falta de padronização inoculo, sendo removidos plugs de diferentes áreas do cultivo, com viabilidade distinta. O uso do resíduo para este fim é uma alternativa promissora.

O bagaço de uva é um resíduo rico em compostos fenólicos, apresentando estrutura semelhante à lignina, fato que pode ter contribuído para a elevação das atividades enzimáticas. O bagaço de uva bordo empregado nos testes possuía 10,44±0,29 mg de ácido gálico em cada 100 gramas de amostra (MAKARA, C. N., 2015), substância que estimula a produção enzimática (GALHAUP e HALTRICH, 2001; PERALTA *et al.*, 2004) e 1,34 mg.100 g⁻¹ ácido cafeico, também apontado como agente indutor de lacase (KOROLJOVA SKOROVOGATKO *et al.*,1998; SOUZA *et al.* 2004).

O coeficiente de correlação entre os valores de atividade da lacase e a concentração de bagaço de uva, foi estabelecido, correspondendo a 0,83, p-value = 0,038 (p-value < 0,05), ou seja, existe correlação.

O R-ajustado da regressão linear é de 62,5%, isto significa que 62% da atividade enzimática é explicada pela variação da concentração de bagaço de uva.

5.1.3 Estudo do Efeito do Período de Adição de CuSO_4

O experimento que avaliou a produção de lacase apenas por bagaço de uva (5.1.2), revelou valores de atividade superiores àqueles em que foi adicionado o CuSO_4 , porém os estudos apontaram que a adição de CuSO_4 nos experimentos culminou em um incremento da produção enzimática. O objetivo do teste foi avaliar se a adição do CuSO_4 em determinado momento do crescimento do fungo poderia influenciar a atividade da enzima.

No teste, a concentração de bagaço de uva foi fixada em 2%, valor onde as maiores produtividades de lacase foram alcançadas no estudo 5.1.2. Novos testes com a adição de CuSO_4 foram realizados, na concentração de 1,5 mM, condição que proporcionou maior atividade enzimática no estudo 5.1.1. O CuSO_4 foi adicionado no quarto dia em duas amostras, e no quinto dia em outras duas. Foram mantidas duas amostras de controle, nas quais não foi adicionado CuSO_4 .

Os dados revelam que as amostras que receberam adição de cobre no quinto dia apresentaram atividade 17% superior as amostras do controle, e as amostras que receberam a mesma concentração do indutor no quarto dia apresentaram atividade 17% menor que as amostras do controle. O fato revela que a adição prematura do CuSO_4 reduz os níveis de atividade, e o momento mais adequado para adição do cobre no *Trametes sp.* utilizado, é após o quarto dia de cultivo, data em que o crescimento provavelmente encontra-se na fase exponencial. A adição de sulfato de cobre para indução da atividade da lacase, deve ocorrer durante fase exponencial, após 3 ou 4 dias de cultivo (NETO, 2012). Os resultados revelam que a fase exponencial de crescimento do fungo *Trametes sp.* no cultivo líquido, ocorre possivelmente após o quarto dia, por este motivo

adição de CuSO_4 no quinto dia foi eficiente. GALHAUP e HALTRICH (2001) avaliaram o efeito da adição de CuSO_4 no cultivo do fungo *Trametes pubescens* no momento da inoculação, e após 4 ou 8 dias de cultivo, sendo a maior atividade detectada pela adição do indutor após o quarto dia de cultivo.

5.1.4 Estudo do Efeito da Aclimação

Foi verificado se o cultivo do inóculo em meio cultivo sólido contendo resíduos agroindustriais seria capaz de alterar a atividade enzimática obtida nos cultivos líquidos, inoculados com os micélios aclimatados.

Os fungos aclimatados em casca de arroz apresentaram valores de atividade média no último dia de cultivo 34% superiores às observadas nos controles (AEM), os fungos cujo precultivo foi conduzido em bagaço de uva, obtiveram atividades médias 40% superiores ao controle.

Os resultados demonstram o efeito positivo na produção da enzima lacase quando utilizado inóculo aclimatado em meios compostos por resíduos lignocelulíticos, constatando que a pré-cultura pode melhorar a produção de lacase. Estudo semelhante foi realizado por MOREDO *et al.* (2013), neste, a pré-cultura do fungo *Phanerochaete chrysosporium* em resíduos lignocelulíticos (madeira, aparas, sementes de uva e farelo de cevada) impactou positivamente na produção de manganês peroxidase e lignina peroxidase.

Durante o estudo, a atividade da lacase foi acompanhada por sete dias, e alíquotas dos meios de cultivo foram removidas para posterior determinação da atividade de lacase. O gráfico 1 revela as atividades encontradas.

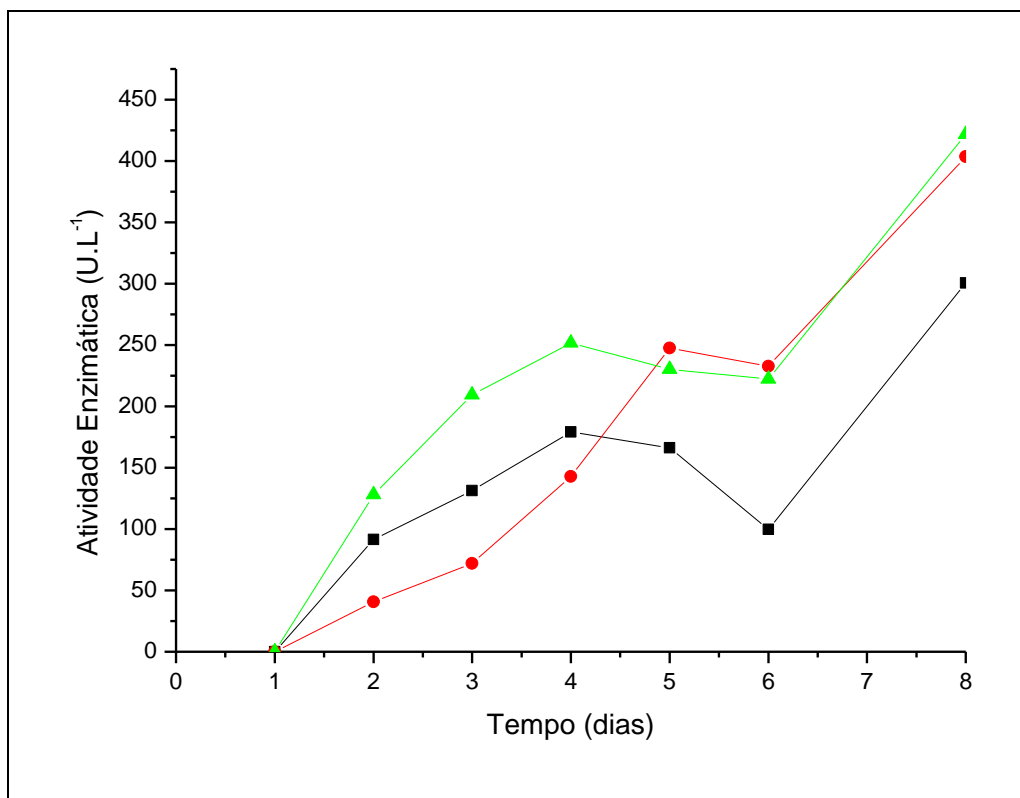


Gráfico 1- Atividade do fungo *Trametes* sp. em função da da pré-cultura. (■) Ágar-Extrato de Malte a 2%; (▲) Ágar-Extrato de Malte a 2% e 7,5% de bagaço de uva bordo; (●) Ágar-Extrato de Malte a 2% e 7,5% de casca de arroz.

As maiores atividades enzimáticas foram obtidas no oitavo dia para todos os cultivos, data em que os cultivos foram interrompidos em todos os testes. A menor atividade enzimática foi detectada no sexto, período que também apresentou menores índices de crescimento micelial nos cultivos sólidos (gráfico 1).

5.2 BIODEGRADAÇÃO DE SMX E TMP

5.2.1 Atividade da Lacase na Presença de SMX e TMP

A atividade das enzimas não foi inibida por nenhuma das concentrações dos fármacos empregados nos ensaios ($5,0 \text{ mg.L}^{-1}$, $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$), conforme gráfico 2. A produção de lacase foi estimulada proporcionalmente à concentração de fármaco.

Amostras submetidas às maiores concentrações de fármaco revelaram, após 1 hora, atividade superior à das amostras submetidas à menor concentração empregada ($SMX_{7,5} = 161,89 \text{ U.L}^{-1}$, $TMP_{7,5} = 184,59 \text{ U.L}^{-1}$, $SMX_{5,0} = 156,34 \text{ U.L}^{-1}$, $TMP_{5,0} = 167,61,59 \text{ U.L}^{-1}$). As amostras de controle isentas de fármaco, apresentaram o menor valor de atividade, $128,094 \text{ U.L}^{-1}$.

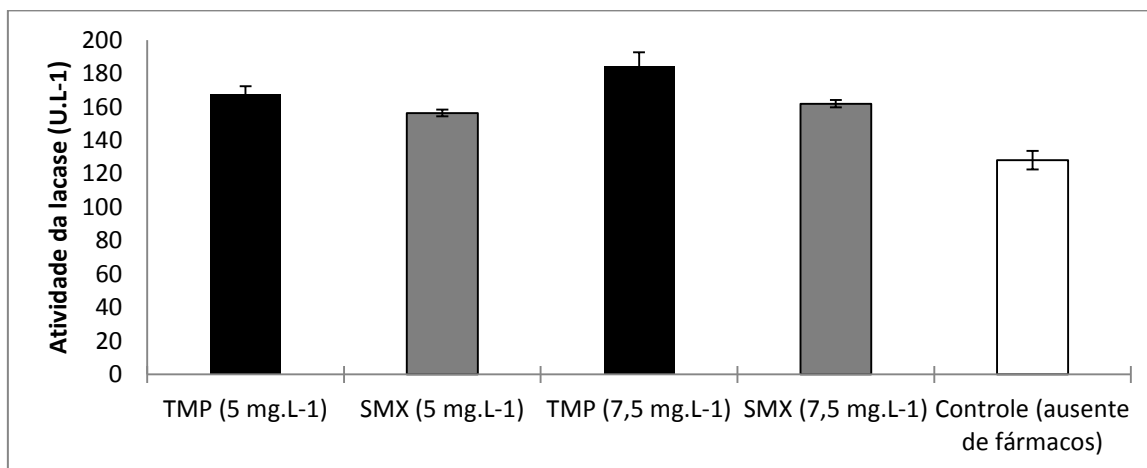


Gráfico 2 - Atividade enzimática obtida nos testes de biodegradação após uma hora de reação.

O SMX e TMP apresentam estrutura aromática, similar à lignina e o aumento da atividade enzimática proporcional à concentração de fármaco administrado nas amostras pode estar relacionada à indução da atividade de lacase. GUO *et. al* (2014) trataram concentrações de SMX de 10 mg.L^{-1} , 20 mg.L^{-1} e 30 mg.L^{-1} com *Phanerochaete chrysosporium*; os autores relataram que a atividade da lacase foi maior nos ensaios com maior concentração SMX.

5.2.2 Determinação Cromatográfica dos Fármacos Puros por HPLC/DAD

Foi desenvolvida uma metodologia para análise de cada fármaco, as quais se diferem pela composição da fase móvel e comprimentos de onda de absorção máxima. As condições de operação utilizadas constam quadro 4.

| Condições | Valores |
|-------------------------|--|
| Vazão | 1,0 mL.min ⁻¹ |
| Volume de injeção | 20 µL |
| Temperatura da coluna | 19,0°C ± 1,0 |
| Tipo de coluna | Coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) |
| 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: 7,8 |
| Deteção (DAD) | TMP: 206 nm, SMX: 266 nm |

Quadro 4 - Condições Cromatográficas para análise de TMP e SMX por HPLC-DAD.

Curvas analíticas foram elaboradas com 6 pontos, na faixa de concentração compreendida entre 0,10 e 7,5 mg.L⁻¹ (Figura 7). Em todos os casos foi observada coeficiente de correlação superior a 0,999, indicando uma boa linearidade na faixa testada.

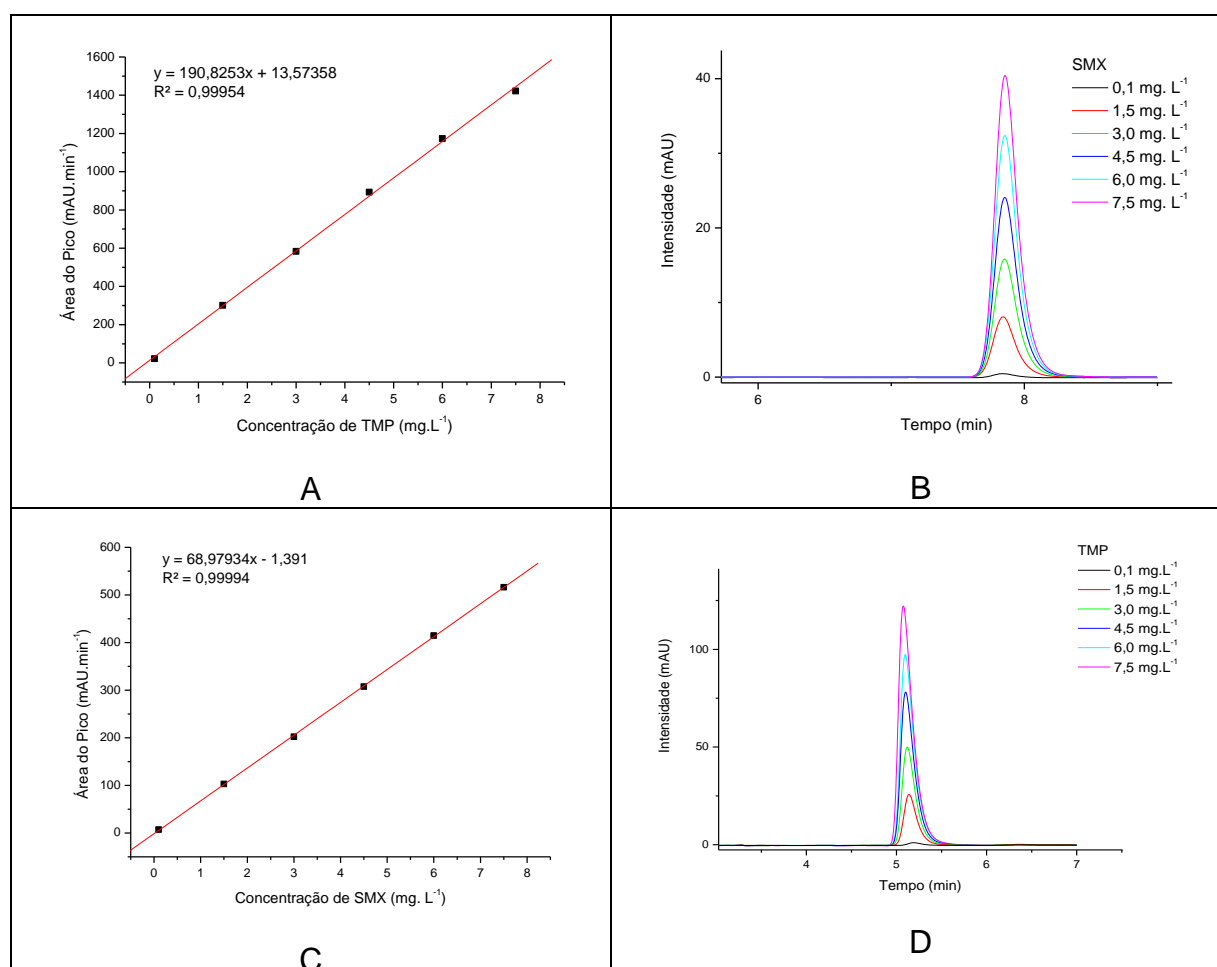


Figura 7 - Curvas analíticas e perfil cromatográfico para os fármacos TMP (A e B) e SMX (C e D).

5.2.3 Determinação da Taxa de Biodegradação

5.2.3.1 Sulfametoxazol

A biodegradação do SMX nas concentrações de 2,5, 5,0 e 7,5 mg.L⁻¹ foi constatada em todas as condições testadas (estático, agitado, com mediador e sem mediador). A tabela 9 apresenta as porcentagens de remoção de fármaco obtidas após 24 horas de tratamento enzimático.

Tabela 8 - Taxa de remoção SMX após 24 horas de tratamento.

| | Concentração inicial (mg.L ⁻¹) | Concentração após 24 h de tratamento (mg.L ⁻¹) | Concentração removida (mg.L ⁻¹) | Remoção (%) |
|-------------------------------|--|--|---|-------------|
| Agitado, com mediador | 2,5 | 1,75±0,03 | 0,74±0,03 | 29,78±1,25 |
| | 5,0 | 3,68±0,01 | 1,32±0,01 | 26,35±0,14 |
| | 7,5 | 5,69±0,18 | 1,81±0,18 | 24,08±2,38 |
| Agitado sem mediador | 2,5 | 1,86±0,05 | 0,64±0,04 | 25,62±1,82 |
| | 5,0 | 4,05±0,29 | 0,95±0,29 | 19,03±5,79 |
| | 7,5 | 6,00±0,10 | 1,50±0,10 | 20,05±1,32 |
| Estático, com mediador | 2,5 | 1,86±0,02 | 0,64±0,02 | 25,43±0,88 |
| | 5,0 | 3,96±0,01 | 1,04±0,01 | 20,75±0,18 |
| | 7,5 | 6,19±1,41 | 1,31±0,02 | 17,48±0,26 |
| Estático, sem mediador | 2,5 | 1,61±0,29 | 0,89±0,29 | 35,76±11,60 |
| | 5,0 | 3,80±0,00 | 1,20±0,00 | 23,99±0,08 |
| | 7,5 | 6,03±0,05 | 1,47±0,05 | 19,64±0,69 |

Para todas as condições e concentrações de SMX testadas, pode-se afirmar que a presença de 0,89 unidades de lacase na reação foi suficiente para degradar no mínimo 17,48% da molécula de SMX, e no máximo 35,76%.

Os resultados não revelam a existência de proporção entre a quantidade de enzimas requeridas por mg.L⁻¹ de fármaco a ser tratado.

As maiores taxas de biodegradação foram obtidas nas menores concentrações de fármaco empregadas. Observa-se que a quantidade de enzima aplicada nos ensaios (0,89 unidades) não foi suficiente para degradar totalmente os

fármacos em nenhuma das concentrações testadas. Considerando o modelo da cinética de Michaelis-Menten, provavelmente a pequena concentração de enzima aplicada frente as 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. As taxas de biodegradação foram decrescentes conforme o aumento da concentração de fármaco, fortalecendo a hipótese de saturação enzimática.

Os resultados indicam que a aplicação do extrato bruto enzimático de lacase, sem qualquer etapa de separação ou purificação, possibilita a remoção de fármacos a partir de soluções aquosas. O aumento das taxas de biodegradação de SMX e TMP provavelmente pode ser ampliado pelo tratamento dos fármacos com maiores concentrações da enzima lacase.

Os resultados de biodegradação obtidos na concentração de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$, sob condição de tratamento estática com mediador e estática sem mediador, apresentaram resultados com diferença estatística significativa indicada pelo teste de Turkey ($p > 0,005$), o que indica que um destes tratamentos favorece a remoção do fármaco quando comparado ao outro.

O tratamento enzimático de SMX na concentração de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ culmina em taxas de biodegradação maiores quando o tratamento ocorre em meio agitado na presença do mediador AHB. O tratamento do fármaco na concentração de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ é comprometido quando a condição para o tratamento é estática na presença de mediador.

A eficiência dos mediadores na biodegradação de $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ SMX parece ter sido influenciada pela perturbação no meio reacional, estático ou agitado. A presença do mediador em reações de biodegradação submetidas a agitação, resultou em taxas de remoção maiores que as obtidas em condição estática.

A biodegradação do SMX nas concentrações de $2,5$ e 5 mg.L^{-1} , nas diferentes condições testadas, não apresentou diferença estatística significativa pelo teste de Turkey ($p < 0,05$), o que indica que para estas concentrações indifere se o tratamento aplicado ocorre de forma estática, agitada na presença ou ausência de mediador AHB.

O gráfico 3 apresenta as porcentagens de biodegradação para cada condição e concentração de SMX.

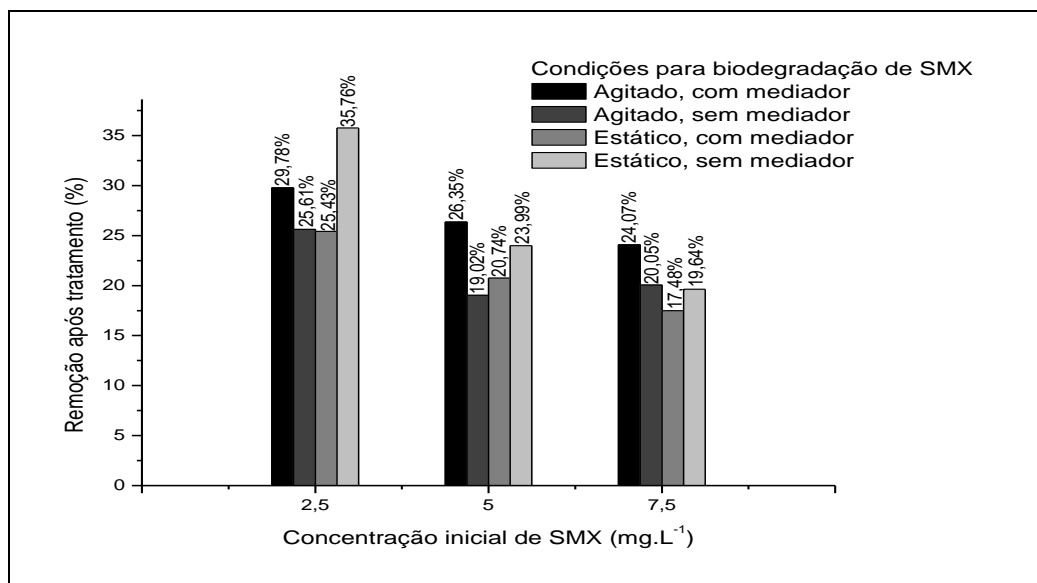


Gráfico 3 - Comparação entre a porcentagem de remoção de SMX nas quatro condições testadas (agitado, estático, com mediador, sem mediador).

A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico da biodegradação do SMX na concentração de 2,5 mg.L⁻¹, exposta ao tratamento enzimático na presença de mediador em meio agitado. O cromatograma demonstra a redução da área do pico de SMX quando as amostras foram submetidas ao tratamento enzimático.

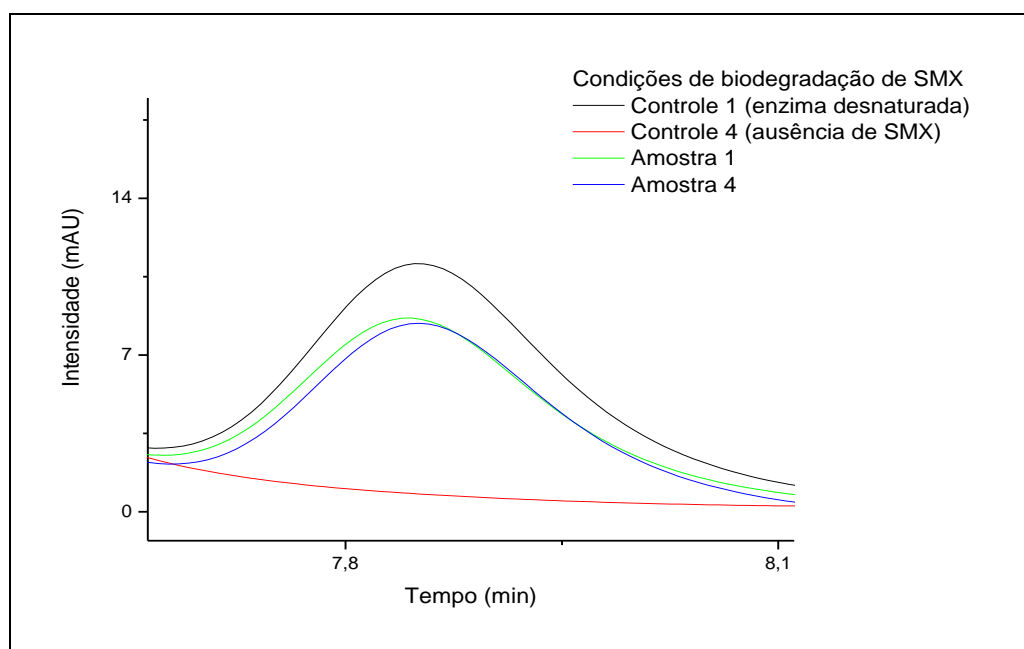


Figura 8 - Perfil cromatográfico da biodegradação de 2,5 mg.L⁻¹ de SMX sob condição agitada na presença de mediador.

5.2.3.2 Trimetoprima

A TMP foi biodegradada em todas as condições e concentrações testadas. As porcentagens de remoção constam na tabela 10 e gráfico 4.

Tabela 9 - Taxa de remoção TMP após 24 horas de tratamento.

| | Concentração inicial (mg.L ⁻¹) | Concentração após 24 h de tratamento (mg.L ⁻¹) | Concentração removida (mg.L ⁻¹) | Remoção (%) |
|-------------------------------|--|--|---|-------------|
| Agitado, com mediador | 2,5 | 1,81±0,18 | 0,69±0,18 | 27,76±7,03 |
| | 5,0 | 4,30±0,12 | 0,70±0,12 | 14,08±2,47 |
| | 7,5 | 6,66±0,00 | 0,83±0,00 | 11,14±0,02 |
| Agitado sem mediador | 2,5 | 1,84±0,15 | 0,66±0,15 | 26,27±5,97 |
| | 5,0 | 4,33±0,12 | 0,67±0,12 | 13,36±2,45 |
| | 7,5 | 6,30±0,13 | 1,20±0,13 | 15,97±1,79 |
| Estático, com mediador | 2,5 | 1,84±0,02 | 0,66±0,02 | 26,28±0,81 |
| | 5,0 | 3,89±0,03 | 1,11±0,03 | 22,21±0,58 |
| | 7,5 | 5,97±0,28 | 1,52±0,28 | 20,33±3,74 |
| Estático, sem mediador | 2,5 | 1,98±0,05 | 0,52±0,05 | 20,86±1,95 |
| | 5,0 | 4,43±0,16 | 0,57±0,16 | 11,44±3,12 |
| | 7,5 | 6,47±0,33 | 1,03±0,33 | 13,70±4,36 |

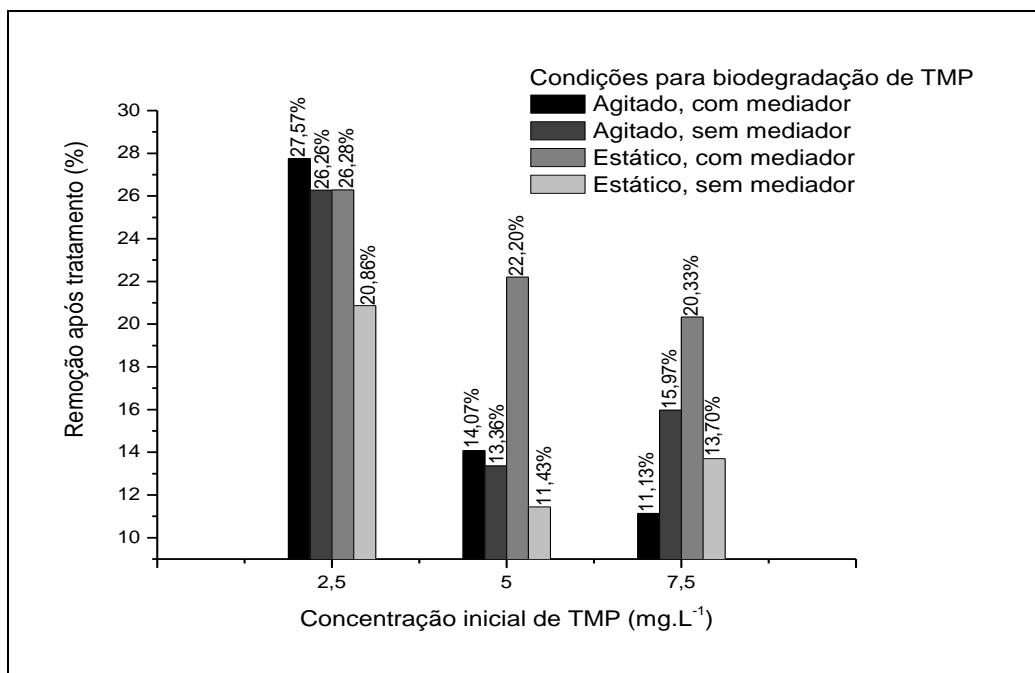


Gráfico 4 - Comparação entre a porcentagem de remoção de TMP nas quatro condições testadas (agitado, estático, com mediador, sem mediador).

A presença de 0,89 unidades de enzima no meio recional permitiu a degradação de 11,14% a 27,76% da concentração de TMP.

Os resultados de biodegradação obtidos na concentração de 5 mg.L⁻¹ de TMP, na presença e ausência de mediador apresentaram resultados com diferença estatística significativa pelo teste de Turkey ($p > 0,005$). A condição de biodegradação estática na presença de mediador AHB favoreceu a remoção do fármaco, já a ausência do mediador, na mesma condição, tornou o processo menos eficaz na redução do composto testado.

Os resultados de biodegradação obtidos nas concentrações de 2,5 e 7,5 mg.L⁻¹, sob as condições estática ou agitado, na presença ou ausência de mediador, não apresentaram pelo Teste de Turkey diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A Figura 9 apresenta o perfil cromatográfico da biodegradação do TMP na concentração de 2,5 mg.L⁻¹, exposta ao tratamento enzimático na presença de mediador em meio estático. O cromatograma demonstra a redução da área do pico de TMP quando as amostras foram submetidas ao tratamento enzimático.

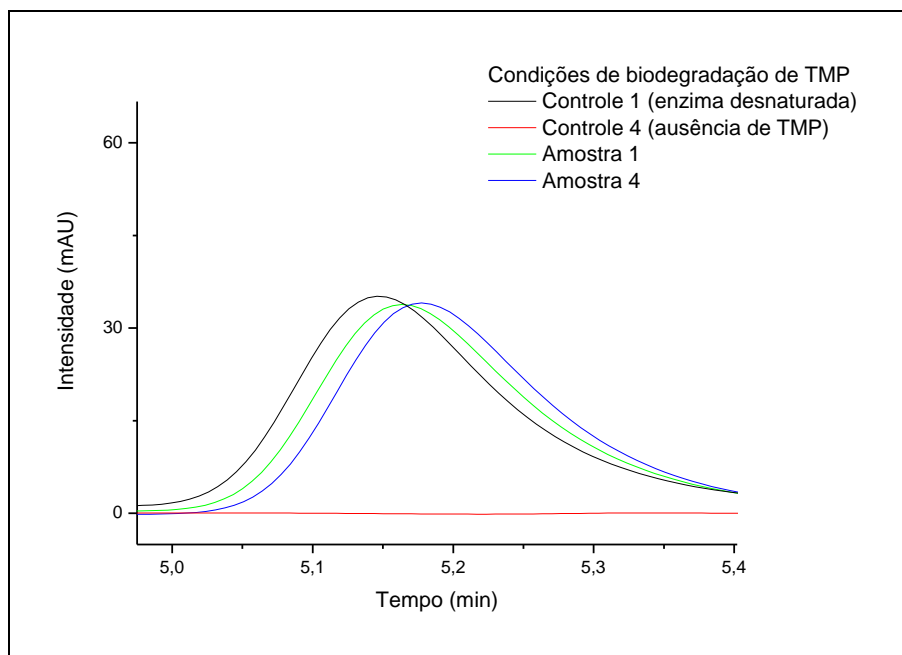


Figura 9 - Perfil cromatográfico da biodegradação de 2,5 mg.L⁻¹ de TMP sob condição estática na presença de mediador.

6 CONCLUSÃO

A atividade enzimática de *Trametes sp.* foi influenciada pela concentração do bagaço de uva e do sulfato de cobre, revelando que as melhores produções de lacase ocorreram na concentração de 2% de bagaço de uva e 1,5 mM de CuSO_4 no meio de cultivo. A adição do CuSO_4 só favoreceu a produção enzimática quando adicionada aos cultivos no quinto dia, fase de crescimento exponencial do fungo *Trametes sp.* A aclimatação do inóculo em meio de cultivo contendo bagaço de uva e casca de arroz promoveu maiores níveis de atividade da lacase quando comparado ao inóculo preparado sem aclimatação, utilizando apenas meio constituído por AEM.

O tratamento enzimático dos fármacos SMX e TMP utilizando extrato bruto contendo lacase promoveu a biodegradação dos antimicrobianos testados.

A porcentagem de remoção de SMX alcançou valores entre 17,48% e 35,76%, ocorrendo sob condições estáticas ou agitadas, na presença ou ausência de AHB. As taxas de remoção das amostras submetidas a estas condições de tratamento indeferem estatisticamente para as concentrações de 2,5 e 5 mg.L^{-1} . A biodegradação de SMX na concentração de 7,5 mg.L^{-1} foi favorecida na presença de AHB sob condição agitada e desfavorecida em condição estática.

As amostras contendo TMP apresentaram porcentagens de biodegradação entre 11,14% e 27,76%. A remoção de TMP nas concentrações de 2,5 e 7,5 mg.L^{-1} não foi influenciada de forma significativa pelas condições de biodegradação. O tratamento de concentrações de 5 mg.L^{-1} é favorecido na presença de mediador, sob condição estática, e desfavorecido na ausência do AHB na mesma condição

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar a produção de lacase pelo fungo *Trametes* sp. utilizando o bagaço de uva, sulfato de cobre e outros suplementos, para aumentar a produção da enzima em cultivo líquido.

Realizar uma cinética de produção de biomassa e de lacase por um período mínimo de 15 dias, para determinar os picos de crescimento fúngico e de atividade enzimática.

Acompanhar a biodegradação de SMX e TMP e atividade de lacase nos tempos de reação 30, 60, 24 e 48 horas de reação.

Otimizar as condições de biodegradação, avaliando outros mediadores e aplicando diferentes concentrações de enzima.

Inserir nos estudos de biodegradação uma amostra de lacase comercial para comparar os resultados obtidos com a lacase produzida no laboratório

REFERENCIAS

ABOU-EISHA, A., MARCOS, R., CREUS, A. 2004. 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. **J Pharm Biomed Anal**, v. 30(4), p. 1207-13, nov. 2002.

ANKLEY, G. T.; BROOKS, B. W.; HUGGETT, D. B.; SUMPTER, J. P. Repeating History: pharmaceuticals in the environment. **Environmental Science e Technology, Easton**, v. 15, p. 8211-8217, 2007.

ANVISA. National Health Surveillance Agency, National assembly for the regulation of the drug Market (2006). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/monitora/cmed/index.htm>>.

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. 2008.

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

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.

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: determianção, 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.

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

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.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 183-190, dez. 2010

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.

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.

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, 2003

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.

COLLINS, P. J. AND DOBSON, A. D. W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3444-345, 1997

DA CRUZ, L. H. **Estudo da potencialidade de processos oxidativos avançados na degradação de poluentes emergentes (fármacos)**. Dissertação (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.

DE AMORIM, K. P.; ROMUALDO, L. L.; ANDRADE, L. S. Electrochemical degradation of sulfamethoxazole and trimethoprim at boron-doped diamond electrode: Performance, kinetics and reaction pathway. **Separation And Purification Technology**, v. 120, p. 319-327, out. 2013.

DOUGHERTY, P. W.; SWARZENSKI, R.S.; DINICOLA, M. Reinhard Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface. Water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. **J Environ Qual**, v. 39, p. 1173–1180, jul. 2010.

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

GHAUCH, A.; AYOUB, G.; NAIM, S. Degradation of sulfamethoxazole by persulfate assisted micrometric Fe⁰ in aqueous solution. Degradation of sulfamethoxazole by persulfate assisted micrometric Fe⁰ in aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 1168-1181, mai. 2013.

GIARDINA, P., *et al.* Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, v. 34, p. 655-663, 1999.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story, **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 369-385, 2010

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

GOCHEV, V. K.; KRASTANOV A. I. Fungal laccases, **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v.13, p 75-83, 2007.

GUARDABASSI, L.; DALSGAARD, A. **Occurrence and fate of antibiotic resistance bacteria in sewage**. Danish Environmental Protection Agency, projecto nº 722. Disponível em: <http://www.miljøstyrelsen.dk/udgiv/publications/2002/87-7972-266-0/pdf/87-7972-267-9.pdf>. Acesso em: 08 de dez. 2015.

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., out. 2014.

HIRSCH, R.; *et al.* 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.

JJEMBA, P.K., 2006. Excretion and ecotoxicity of pharmaceuticals and personal care products in the environment. **Ecotoxicolgy Environmental Safety**, v. 63, p. 113-130, jan. 2005.

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, 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. *Ann. Ver. Microbiol.*, v. 41, p. 465-505, 1987

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

LABADIE, P.; CUNDY, A. B.; STONE, K.; ANDREWS, M.; VALBONESI, S.; HILL, E.M. Evidence for the migration of steroidal estrogens through river bed sediments. *Environ Sci Technol*, v. 41, n. 12, p. 4299–4304, 2007.

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 lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *Microbiologist*, v. 16, p. 65-68, 1983.

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.

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

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase properties and applications, **Bioresources**, v. 4, p.1694-1717, 2009

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.

MIN, K. L.; KIM, Y. W.; JUNG, H. S.; HAH, Y. C., Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, n. 2, p. 279-286, 2001

MISHRA, C., LEATHAM, G. F., 1990. Recovery and fractionation of the extracellular degradative enzymes from *Lentinula edodes* cultures cultivated in a solid lignocellulosic substrato. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, n. 1, p. 8-15, 1990.

MIKOLASCH, A., SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 605 – 624, 2009.

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., (2007a), Laccase-Mediator Systems and Their applications: A Review, **Applied Biochemistry And Microbiology**, v. 43, p. 523-535. 2007.

MURRAY, K.; THOMAS, S.; BODOUR, A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3462-3471, dez. 2010.

NETO, S. L. P. **Caracterização de Lacase de *Peniphora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química), Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, da Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

OHLSSEN, K.; TERNES, T.; WERNER, G.; WALLNER, U.; LOFFLER, D.; ZIEBUHR, W.; WITTE, W.; HACKER, J. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene

transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 711-716, ago. 2003.

OISHI, S. Effects of Butyl Paraben on the male reproductive system in mice. **Archives of toxicology**, v. 76, p. 423-429, jun. 2002.

OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes e no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Fitossanidade), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.

PAL, A.; GIN, K. Y.; LIN, A. Y.; REINHARD, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 6062-6069, nov. 2010.

PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M.; BÔER, C. G., As principais oxidoredutases 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, D. **Desenvolvimento de microcápsulas bioativas de coprodutos de suco e vinho da uva visando sua aplicação como antioxidante natural em patê de carne de frango**. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

PETROVIC, M.; SKRBIC, B.; ZIVANCEV, J.; FERRANDO - CLIMENT, L.; BARCELO, DAMIA. 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: pp. 20-33, jul. 2001.

REESE, R. E. *et al.* Manual de antibióticos, 2 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1995.

RIBEIRO, F.; RIBANI, R. H.; FRANCISCO, T. M. G; SPARES, A. A.; PONTAROLO, R.; HAMINIUK, C.W.I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 1007, p. 72-80, Dez. 2015.

RIVA; S. Laccases: blues enzymes for green chemistry. **Tends in Biotechnology**, v. 24, p. 221-226, 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.

BLANCHETTE, R. A. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential ligninolytic degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 647-653, set. 1984.

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.

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.

SAYADI, S.; ELLOUZ, R. Screening of White rot fungi for the treatment of olive mill waste-water. **Journal Chemical Technology Biotecnochnology**. v. 57, p. 141-146, 1993.

SILVA, F. L. **Estudo da degradação do trimetoprim e do sulfametoxazol utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) eletrogerado por eletrodos de difusão gasosa (EDG)**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) - Programa de Pós-graduação em Química Analítica e Inorgânica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

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) **Soc. Ecotoxcol.**, v. 2, n. 2, p. 187-196, mai. 2007.

SOUZA, C. G. M., TYCHANOWICZ, G. K., SOUZA, D. F., PERALTA, R. M. Production of lacacase 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.; CLAUS, H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, p. 373-434, 2011

SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G. S.; HALORSEN, B.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S. O.; LITTAUER, P.; DAHL, K. H. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 112, p. 815-837, 2004.

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. Dissertação (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 Res.**, v. 32, n. 11, p. 3245-3260, fev. 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, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. **Environ. Sci. Technol.**, v. 37, n. 6, p. 1061- 1068, jun. 2003.

TROVO, A. G.; NOGUEIRA, R. F. P.; AGUERA, A.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; SIRTORI, C.; MALATO, S. Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation. **Water Research**, v.43, p. 3922-3931, abr. 2009.

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>>. Acesso 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.

WILSON, K.; WALKER, J. M. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. Reino Unido: Cambridge University Press, 2010

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.

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**, 45, n.16, p. 5218-5228, jul. 2011.

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.