

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MAIRE OLIVEIRA DA SILVA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LACASES DO FUNGO *Trametes villosa* PARA O
TRATAMENTO DE EFLUENTES**

CURITIBA

2024

MAIRE OLIVEIRA DA SILVA

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LACASES DO FUNGO *Trametes villosa* PARA O
TRATAMENTO DE EFLUENTES**

**PRODUCTION AND APPLICATION OF LACCASES FROM THE FUNGUS
Trametes villosa FOR THE TREATMENT OF EFFLUENTS**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia
Ambiental do Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).
Orientadora: Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2024



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Curitiba



MAIRE OLIVEIRA DA SILVA

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LACASES DO FUNGO TRAMETES VILLOSA PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 16 de Dezembro de 2024

Dra. Giselle Maria Maciel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Ana Paula Stafussa, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Dra. Isabela De Andrade Arruda Fernandes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Utfpr)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 19/12/2024.

Dedico este trabalho à minha adorável vovó Hermínia, que comemorou cada pequeno passo que dei em direção à realização deste sonho. Mesmo não estando mais entre nós, gostaria que soubesse que suas orações não foram em vão.
Um dia nos reencontraremos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus, pois, sem Ele, não teria chegado até aqui.

A Ele seja dada toda honra, glória e louvor para sempre!

Agradeço imensamente aos meus pais por sempre apoiarem meus estudos, pelo suporte financeiro e emocional, e por estarem ao meu lado em todos os desafios. Espero, um dia, poder retribuir ao menos uma parte de tudo que me proporcionaram. Aos meus irmãos, sou grata por aliviarem meus fardos quando tudo começa a ficar difícil demais e por nunca me deixarem esquecer que, neste mundo, eu não caminho sozinha.

Às minhas amigas Nathalia e Thais, que sempre trouxeram alegria nos momentos em que mais precisei e, mesmo de longe, se fizeram presentes em meus dias, obrigada por estarem sempre dispostas a me ouvir e por nunca deixarem nossa amizade enfraquecer.

Aos meus companheiros nesta jornada acadêmica, Eduardo, Alessandra, Nayara e Ludmila, que sempre estiveram dispostos a me estender a mão e oferecer ajuda, espero poder dividir a bancada com vocês novamente em um futuro próximo.

Agradeço, em especial, à minha orientadora, Giselle Maria Maciel, pela imensa paciência e compreensão, e por sua gentileza ao me corrigir sem nunca me desmotivar. Sou profundamente grata pela oportunidade de crescimento e por todos os ensinamentos.

Aos professores do PPGCTA que, de forma direta ou indireta, compartilharam seu conhecimento comigo, permitindo que minha experiência de aprendizado fosse extremamente enriquecedora e significativa, deixo minha mais profunda gratidão e reconhecimento pelo impacto que tiveram em minha trajetória acadêmica e profissional.

Agradeço ao Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná por fornecer suporte para a realização dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os efluentes hídricos possuem um grande impacto ambiental devido à ineficácia no tratamento de contaminantes emergentes, uma vez que altas concentrações de micropoluentes e produtos químicos recalcitrantes não são completamente eliminados nas estações de tratamento convencionais. O objetivo deste trabalho foi avaliar o tratamento de efluentes hospitalares e têxteis através da aplicação de extrato bruto contendo lacase. O extrato bruto foi produzido pelo fungo *Trametes villosa* e apresentou uma atividade enzimática de lacase de 11754 U/L. Os resultados das amostras de efluente hospitalar demonstraram uma redução considerável de 70% para cafeína, 97% para pirazinamida, 74% para rifampicina, 66% para sulfametoxazol e 64% para trimetoprima. Os compostos fenólicos apresentaram uma remoção média de 64% nos efluentes hospitalares e 98% nos efluentes têxteis. A demanda química de oxigênio apresentou um aumento inesperado nas amostras hospitalares e uma redução mínima nas amostras de efluentes têxteis. A análise de remoção de cor do efluente têxtil demonstrou uma redução de área espectral de 3,79% para a amostra tratada com 500 U/L de lacase e uma redução de área espectral de 18,03% para amostras tratadas com 1000 U/L de lacase. Os metais analisados não apresentaram redução significativa com o tratamento enzimático. No ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*, houve redução de toxicidade em algumas amostras após o tratamento enzimático. Os resultados concluem que a lacase manteve sua atividade enzimática após o tratamento das amostras, demonstrando assim sua resistência em meio a misturas complexas de poluentes.

Palavras-chave: fármacos; contaminantes emergentes; corantes têxteis; oxidorreduções.

ABSTRACT

Water effluents have a significant environmental impact due to their ineffectiveness in treating emerging contaminants since most micropollutants and recalcitrant chemicals are not eliminated in conventional treatment plants. This work aimed to evaluate the treatment of hospital and textile effluents by applying a crude enzymatic extract containing laccase. The crude extract was produced by *Trametes villosa*, which showed a laccase activity of 11754 U/L. The hospital effluent samples showed a considerable reduction of 70% for caffeine, 97% for pyrazinamide, 74% for rifampicin, 66% for sulfamethoxazole, and 64% for trimethoprim. Phenolic compounds showed an average removal of 64% in hospital effluents and 98% in textile effluents. The chemical oxygen demand showed an unexpected increase in the hospital samples and a minimal reduction in the textile effluent samples. The analysis of color removal from the textile effluent showed a spectral area reduction of 3.79% for the sample treated with 500 U/L laccase and a spectral area reduction of 18.03% for samples treated with 1000 U/L laccase. The metals analyzed showed no significant reduction with enzymatic treatment. In the phytotoxicity test with *Lactuca sativa*, a reduction in the toxicity of some samples was observed after enzymatic treatment. The results conclude that laccase maintained its enzymatic activity after treating the samples, thus demonstrating its resistance to complex mixtures of pollutants.

Keywords: pharmaceuticals; emerging contaminants; textile dyes; oxidoreductases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Processo de inoculação do meio de cultivo para obtenção de extrato enzimático utilizando a cepa de <i>Trametes villosa</i> em meio semissólido.	23
Figura 2. Processo de obtenção de extrato enzimático utilizando a cepa de <i>Trametes villosa</i> em meio semissólido.	23
Figura 3. Representação gráfica da área espectral do ensaio com efluente têxtil tratado enzimaticamente com a enzima lacase em atividade inicial de 500 U/L com comprimento de onda entre 450-750 nm.	34
Figura 4. Representação gráfica da área espectral do ensaio com efluente têxtil tratado enzimaticamente com a enzima lacase em atividade inicial de 1000 U/L com comprimento de onda entre 450-750 nm.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de média (mg/L) e desvio padrão das concentrações de cafeína e antibióticos presentes no efluente hospitalar após o tratamento enzimático analisados por CLAE-EM.....	29
Tabela 2. Resultados da taxa de remoção (%) dos antibióticos e de cafeína após o tratamento enzimático, calculados a partir das médias de concentração dos fármacos determinados por CLAE-EM.....	30
Tabela 3. Análise de metais do efluente hospitalar (EH), antes e após o tratamento enzimático com lacase, analisada através da espectrometria de absorção atômica em chama (EAAC).....	32
Tabela 4. Resultado da fitotoxicidade do efluente hospitalar em sementes de <i>L. sativa</i> , antes e após o tratamento com lacase.	33
Tabela 5. Análise de metais do efluente têxtil (ET), antes e após o tratamento o tratamento enzimático com lacase.....	38
Tabela 6. Resultado da fitotoxicidade do efluente têxtil em sementes de <i>L. sativa</i> , antes e depois do tratamento com lacase.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
CLAE- EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
ETE	Estações de tratamento de esgoto
DQO	Demanda química de oxigênio
BDA	Ágar Batata Dextrose
ABTS	2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
TMP	Trimetoprima
SMZ	Sulfametoxazol
PYZ	Pirazinamida
RFC	Rifampicina
EAAC	Espectrometria de absorção atômica com chama

LISTA DE SÍMBOLOS

CO ₂	Dióxido de carbono
P	Fósforo
N	Nitrogênio
H ₂ O	Água
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
CuSO ₄	Sulfato de cobre
MgSO ₄	Sulfeto de magnésio
MnSO ₄	Sulfeto de manganês
FeSO ₄	Sulfato de ferro
ZnSO ₄	Sulfato de zinco
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amônio
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
mL	Mililitro
mV	Milivolt
L	Litro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.	FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA	15
2.2.	LACASE.....	16
2.3.	EFLUENTES HOSPITALARES	18
2.4.	EFLUENTE TÊXTIL	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.2.	MÉTODOS	22
3.2.1.	CULTIVO DO MICRORGANISMO	22
3.2.2.	PRODUÇÃO,	22
3.2.3.	Tratamento enzimático com lacase livre.....	23
3.2.4.	Parâmetros avaliados nos efluentes pré e pós- tratamento enzimático.....	24
3.2.4.1.	Fenólicos totais.....	24
3.2.4.2.	Demanda Química de Oxigênio (DQO)	24
3.2.4.3.	Análise de metais	24
3.2.4.4.	Cromatografia líquida-acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM)	25
3.2.4.5.	Bioensaio de toxicidade	25
3.2.5.	Análise espectrofotométrica em modo varredura	27
3.2.5.1.	Análise Estatística	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1.	PRODUÇÃO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	27
4.2.	ANÁLISE DO TRATAMENTO ENZIMÁTICO EM EFLUENTE HOSPITALAR	
	28	
4.2.1.	Remoção de fármacos.....	28
4.2.2.	Avaliação fenólicos totais	31
4.2.3.	Avaliação da DQO	31
4.2.4.	Análise de metais	32
4.2.5.	Ensaio Ecotoxicológico	33
4.3.	TRATAMENTO EM EFLUENTE TÊXTIL	34

4.3.1.	Remoção de cor	34
4.3.2.	Avaliação de fenólicos totais	36
4.3.3.	Demanda Química de Oxigênio.....	37
4.3.4.	Análise de metais	37
4.3.5.	Ensaio ecotoxicológico	38
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6.	REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes nas águas residuais foram identificados como um problema ambiental e de saúde crítico. Os vários compostos químicos presentes nos efluentes podem ser encontrados em concentrações que variam de alguns nanogramas a vários microgramas por litro, sendo alguns biologicamente ativos e com potencial para causar danos aos ecossistemas (NGUYEN et al., 2020).

Todos os dias, milhares de litros de efluentes contendo poluentes como medicamentos, corantes, naftol, nitratos, ácido acético, sabões e metais passam pelas estações de tratamento de esgoto. Quando não são devidamente tratados, são liberados no meio aquático, causando a contaminação das águas superficiais e subterrâneas (NETO et al., 2023).

As tecnologias convencionais de tratamento de águas residuais foram concebidas para remover a maior parte dos sólidos em suspensão, dos elementos orgânicos dissolvidos e dos nutrientes das águas residuais; no entanto, nem todos os produtos químicos podem ser removidos através destes métodos (KOSMA et al., 2020).

Uma alternativa ecológica e promissora aos tratamentos químicos convencionais é a biorremediação, que envolve a utilização de vários organismos, como plantas, algas, fungos e bactérias, para converter contaminantes tóxicos em derivados químicos menos tóxicos do que o seu estado inicial, utilizando a transformação dos compostos mediada por enzimas (ARAÚJO; WOLFF; CARISSIMI, 2019; SUTAONEY et al., 2022).

Neste contexto, as lacases (EC 1.10.3.2), também conhecidas como enzimas ligninolíticas, são excelentes escolhas, tendo em conta a sua versatilidade de substrato, baixa exigência catalítica e capacidade de oxidar vários compostos aromáticos e metais (CUADRA; DE, 2021; DEBNATH; SAHA, 2020). As lacases são enzimas multicobre oxidase produzidas por diferentes organismos, principalmente basidiomicetos de podridão branca, que possuem lacases com elevado potencial redox, facilitando a abstração de elétrons dos substratos. Atuam também como mediadores redox durante o ataque das lacases à lignina, com a concomitante redução do oxigénio a água (RIEDI et al., 2022; TRAN; URASE; KUSAKABE, 2010).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Verificar a eficiência da lacase fúngica livre produzida a partir do cultivo de *Trametes villosa* como biocatalisador para o tratamento de poluentes emergentes provenientes de efluentes reais da indústria têxtil e hospitalar.

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir lacases a partir do cultivo de *Trametes villosa* em meio semissólido;
- Testar a eficácia da lacase no tratamento de efluente hospitalar, avaliando os parâmetros de concentração de fármacos por cromatografia líquida, demanda química de oxigênio, compostos fenólicos, remoção de metais pesados e ensaio de ecotoxicidade utilizando sementes de *L. sativa*.
- Aplicar lacases do extrato bruto enzimático no tratamento de efluente real da indústria têxtil, monitorando os parâmetros de cor, fenólicos, remoção de metais pesados e ensaio de ecotoxicidade utilizando sementes de *L. sativa*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fungos da podridão branca

Os fungos da podridão branca são pertencentes a um grupo diversificado e abundante classificado no filo Basidiomycota. Podem ser encontrados com maior frequência em regiões de climas temperados a tropicais, apresentando uma variedade de morfologias (FERREIRA-SILVA et al., 2022). Estes organismos são conhecidos por sua capacidade em degradarem a maioria das substâncias poliméricas encontradas na madeira, como, por exemplo: a lignina, a celulose e a hemicelulose (MARIANO et al., 2020; UBER, 2021).

Os fungos da podridão branca desempenham um papel primordial no ciclo do carbono, com suas habilidades adaptativas que permitem que cresçam e tolerem condições ambientais desfavoráveis, agindo como degradadores naturais do material lignocelulósico (BILAL et al., 2019). Além disso, demonstram capacidade de degradar uma ampla gama de compostos farmacologicamente ativos, como antibióticos, analgésicos, reguladores lipídicos, medicamentos antivirais e desreguladores endócrinos. Isso se deve ao seu poderoso sistema enzimático ligninolítico extracelular, que inclui peroxidases extracelulares, lacase extracelular, e ao sistema intracelular do citocromo P450 (CYP450), entre outros (LIN et al., 2023).

O sistema enzimático exclusivo destes microrganismos possui grande capacidade de converter os poluentes industriais complexos e recalcitrantes em produtos e subprodutos menos prejudiciais, minimizando assim o impacto no meio ambiente e no ecossistema. Entre as espécies mais comumente estudadas de fungos da podridão branca estão: *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* (FLAKSBERG, 2021).

Os fungos do gênero *Trametes* (Polyporales, Basidiomycota) possuem a capacidade de degradar simultaneamente todos os polímeros da lignocelulose e atuam como um dos principais decompositores da madeira e da serrapilheira das plantas, desempenhando um papel central no ciclo do carbono, na formação do solo e, conseqüentemente, na manutenção dos ecossistemas florestais (TOMÉ et al., 2022).

Diversos estudos demonstram a ampla aplicação deste gênero para a remoção de potenciais contaminantes em várias águas residuais, como fábricas de celulose e

plantas de branqueamento, águas residuais municipais, farmacêutica, têxtil, fábrica de azeite e águas residuais de biorrefinaria (DASGUPTA et al., 2024).

Uma espécie importante deste gênero é o fungo *Trametes villosa*, pois possui grande potencial para produzir lacases, peroxidases e celulasas em diferentes substratos lignocelulósicos. Ensaio bioquímicos demonstraram seu potencial para produzir enzimas ligninolíticas utilizando bagaço de cana como substrato em diferentes temperaturas de 20 °C a 33 °C e pH de 4,60 a 9,38 (CONIGLIO et al., 2020; TOMÉ et al., 2022).

Lacases provenientes do fungo *Trametes villosa* já foram descritas em diferentes estudos em aplicações diversas (BRAGA et al., 2024; FERREIRA-SILVA et al., 2022; RIEDI et al., 2022).

2.2. Lacase

Lacases (EC 1.10.3.2) são glicoproteínas diméricas ou tetraméricas, e sua arquitetura molecular é comum à família de enzimas multicobre oxidases, pois normalmente possuem um sítio catalítico contendo quatro átomos de cobre. Essa enzimas são oxidoredutases capazes de catalisar vários substratos, utilizando o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons (BRUGNARI et al., 2021).

Geralmente ocorrem em bactérias, plantas, insetos e são amplamente distribuídas em fungos, pois possuem papel vital em seu ciclo de vida, estando envolvidas na formação de basidiomas, formação de conídios, esporulação, patogênese em plantas, na síntese de melanina e outros pigmentos (JANUSZ et al., 2020).

As lacases apresentam a habilidade de catalisar, por abstração de um elétron, uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas, com concomitante redução de oxigênio para água (KATO; BACKES; PERALTA, 2020).

Fungos da podridão branca apresentam lacases com alto potencial redox, facilitando a abstração de elétrons dos substratos, que também atuam como mediadores redox durante o ataque da lacase à lignina. Para que a atividade catalítica da enzima ocorra de forma eficiente, é necessário que haja quatro átomos de cobre em seu sítio ativo, sendo estes caracterizados pela presença de um íon de cobre tipo 1, um íon de cobre tipo 2 e dois íons de cobre tipo 3 (RIEDI et al., 2022; SANTOS, 2020).

O cobre tipo 1 é o aceptor primário dos elétrons durante a catálise, onde os substratos são oxidados, juntamente com a redução de um oxigênio molecular para a água pela transferência de quatro elétrons. Este átomo possui uma coordenação trigonal com duas histidinas e uma cisteína, enquanto oito resíduos de histidina servem como ligantes para os átomos de cobre tipo 2 e tipo 3 (JANUSZ et al., 2020).

Desta forma, a degradação catalisada por lacase ocorre quando um elétron é transferido para a lacase e estabilizado no centro ativo do átomo de cobre. Em seguida, o átomo de cobre é regenerado por meio de uma reação acoplada ao oxigênio molecular, produzindo água como subproduto. O grau de degradação depende significativamente das propriedades estruturais do composto oxidado. Fatores como a presença de anéis aromáticos ou heterocíclicos, a presença de grupos doadores de elétrons, ligações conjugadas e substituintes facilmente oxidáveis desempenham papéis essenciais na determinação da eficiência da degradação (TRAN; URASE; KUSAKABE, 2010).

Estas enzimas possuem uma grande relevância para estudos, devido ao seu alto nível de eficiência catalítica, o que permite sua aplicação nas mais variadas áreas de estudos, como por exemplo: quebra de biomassa vegetal, branqueamento de corantes têxteis, biorremediação da água e do solo, formação de pigmentos, desenvolvimento de testes clínicos e aplicações nos campos dos biossensores, biorreatores e células de biocombustíveis (CONTATO et al., 2021).

Semião et al. (2023) demonstrou a eficácia da terra diatomácea na imobilização da enzima lacase, provando ser um suporte barato, viável e reutilizável. Além disso, estas enzimas podem sintetizar vários produtos terapêuticos, como fármacos, trazendo menores danos ao meio ambiente, quando comparados com outras soluções, por sua habilidade de catalisar reações, produzindo apenas água como único subproduto (SYBUIA et al., 2024).

É importante mencionar que a lacase ainda não é amplamente utilizada, devido a alguns obstáculos, principalmente problemas relacionados com a sua instabilidade sob condições operacionais, como a rápida perda de atividade e dificuldades na recuperação de enzimas que limitam as suas aplicações industriais (ZDARTA et al., 2019). Além disso, existem limitações relacionadas a durabilidade, preços elevados e condições operacionais rigorosas, bem como, as lacases livres que são irrecuperáveis e se perdem no meio (DESKA; KOŃCZAK, 2019).

2.3. Efluentes hospitalares

Os hospitais são conhecidos por serem grandes consumidores de água, gerando diariamente um fluxo residual significativo de esgoto. Estes compostos possuem diversas substâncias orgânicas tóxicas, em diferentes concentrações. Resultado das atividades de diagnóstico, laboratório, ambulatório, enfermaria, lavanderia, pesquisa e principalmente as excretas de pacientes contendo resíduos dos medicamentos (GOMES et al., 2019).

Os produtos químicos farmacêuticos possuem um mecanismo próprio de ação e um tempo de vida no organismo, seu papel é fundamental tanto na cura de doenças quanto na contribuição decisiva para o aumento da longevidade e da qualidade de vida (RODRIGUES et al., 2020).

Muitas dessas substâncias farmacológicas são eliminadas sem a completa absorção pelos pacientes. Sabe-se que, após a utilização profilática e/ou terapêutica, os produtos farmacêuticos são excretados, principalmente através da urina e das fezes, sob a forma do composto original ou de produtos farmacêuticos parcialmente metabolizados, que podem perturbar o equilíbrio ambiental se não forem corretamente tratados (GHESTI PIVETTA; DO CARMO CAUDURO GASTALDINI, 2019).

Esse grupo de compostos farmacêuticos representa grande risco, pois pode gerar bioacumulação, persistência no ambiente e alta toxicidade, visto que, mesmo em baixas concentrações, são capazes de causar efeitos negativos, devido à introdução contínua em ambientes aquáticos, como rios, oceanos e lagoas, podendo atingir o lençol freático (LU et al., 2023).

No estudo de Caminada et al. (2023), foi identificado o surgimento de organismos resistentes a antibióticos no lodo de estações de tratamento, comprovando a ineficácia no método de tratamento utilizado para a eliminação de bactérias que estão se tornando multirresistentes a diferentes tipos de antibióticos.

A exposição a estes contaminantes é provavelmente a dificuldade mais ameaçadora atualmente para o tratamento de efluentes hospitalares, podendo ter um efeito prejudicial à saúde humana, como o aumento da resistência microbiana aos antibióticos, perturbações endócrinas e câncer (CHOWDHURY, 2022; SILVA; ABRANTES; NOGUEIRA, 2024).

É notável que os avanços científicos na saúde melhoram a cada dia à medida que novos medicamentos são introduzidos. Por outro lado, tornou-se bastante visível

que novas doenças e bactérias resistentes aos antibióticos persistem no ambiente (KHAN et al., 2021).

As estações de tratamento de esgoto (ETEs) convencionais são uma das principais fontes de lançamento de fármacos, metabólitos e produtos de transformação no meio aquático, uma vez que muitos desses compostos não são totalmente eliminados pelos processos convencionais de tratamentos utilizados, pois geralmente essas estações não são equipadas para o tratamento de compostos como os fármacos (ARAÚJO; WOLFF; CARISSIMI, 2019; GHESTI PIVETTA; DO CARMO CAUDURO GASTALDINI, 2019).

Por conta dessa alta demanda por métodos eficazes, o tratamento de esgoto tem sido amplamente estudado, como, por exemplo, tratamentos biológicos (lodo ativado, biorreator de membranas, reatores anaeróbicos de fluxo ascendente, filtros de gotejamento) em associação com tratamento ternário envolvendo oxidação (ozonização ou processo de oxidação avançada - POA) e adsorção (carvão ativado fluidizado em pó ou micro grãos) para remoção de produtos farmacêuticos (MANSOURI et al., 2021). O efluente tratado de forma ineficiente representa uma ameaça à macro e microflora e à fauna dos corpos hídricos superficiais e ao fornecimento de água de boa qualidade à população, causando doenças de veiculação hídrica.

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2023), somente no Brasil, entre 2007 e 2020, 662 surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar foram notificados, envolvendo mais de 156 mil doentes e alcançando a marca de 152 óbitos relacionados.

Sendo assim, o tratamento de efluentes hospitalares deve ser aperfeiçoado para que sua destinação final seja adequada, para as elevadas taxas de patógenos e fármacos (ZAGUI, 2022).

Recentemente, a aplicação de enzimas isoladas atraiu atenção particularmente significativa para a degradação de contaminantes. O tratamento enzimático pode ter maior especificidade para poluentes de concentrações muito baixas e recalcitrantes, gerando subprodutos menos prejudiciais em comparação com outras tecnologias físico-químicas, como filtração por membrana densa, oxidação avançada e adsorção de carvão ativado granular (BARBER; LIU; SMITH, 2020).

Os microrganismos são capazes de transformar poluentes em produtos mais simples, como: CO₂, H₂O, P e N, devido à presença de um sítio reacional onde uma

enzima específica tem a via metabólica induzida pelo poluente e muitas vezes é capaz de executar reações químicas, essenciais para o processamento e subsequente transformação do contaminante suscetível a este processo (MOFATTO, 2020).

2.4. Efluente têxtil

A indústria têxtil é uma fonte imprescindível para a economia em muitos países, como China, Índia, Paquistão, Brasil, Bangladesh e Malásia, porém também são grandes fontes de poluição ambiental (KISHOR et al., 2021).

Com o rápido aumento da urbanização e da industrialização nas últimas décadas, também foi observado um grande aumento na produção de águas residuais. O consumo de água por unidade de produção na indústria têxtil é muito elevado, representando cerca de 15–25% dos efluentes têxteis, sendo consumidos cerca de 30 a 50 L de água por kg de tecido, o que a torna um dos maiores geradores de águas residuais (GARG; GARG; MUKHERJI, 2020).

Anualmente, 700.000 toneladas de efluentes têxteis são produzidas e esses resíduos, descartados de forma incorreta, podem causar grandes ameaças ambientais e efeitos tóxicos aos seres vivos (ALMEIDA; DILARRI; CORSO, 2016; DARWESH; MATTER; EIDA, 2019). A descarga direta de águas residuais não tratadas contendo corantes em corpos d'água naturais tem um impacto negativo na atividade fotossintética do ecossistema aquático (AZANAW et al., 2022).

Além de uma grande quantidade de corantes, como, por exemplo, as classes de corantes azo, antraquinona e trifenilmetano, as águas residuais da indústria têxtil também podem conter uma elevada carga de sais, álcalis, ligantes, dispersantes, compostos orgânicos voláteis, surfactantes, clorobenzenos, agentes redutores, dioxinas, ftalatos, fenóis, pentaclorofenol, detergentes e metais pesados que são lavados com água durante o processo de coloração, tornando-os perigosos se lançados diretamente nos corpos hídricos como ameaças ambientais e efeitos tóxicos aos seres vivos (PANDEY et al., 2023).

Os corantes perdidos durante o tingimento e os não totalmente absorvidos às fibras alvo são descartados diretamente nos recursos aquáticos, como rios, lagoas, córregos e lagos junto (KISHOR et al., 2021).

Para o tratamento de efluentes tingidos, vários métodos são utilizados, como processos físicos (adsorção, floculação e filtração), métodos químicos (oxidação

química, oxidação fotocatalítica, eletrólise e reagente de Fenton) e atividades biológicas (bio-sorção, biodegradação e degradação enzimática) (DARWESH; MATTER; EIDA, 2019).

Embora existam muitos métodos físico-químicos para a remoção de corantes de águas residuais têxteis, normalmente são utilizadas uma combinação de diferentes métodos para alcançar a máxima eficiência no tratamento. A fim de criar métodos mais ecológicos e econômicos, o uso de agentes microbianos para tratamento de efluentes tem se tornado muito comum (MOYO; MAKHANYA; ZWANE, 2022).

Os microrganismos de maior interesse usados na biorremediação de águas residuais são as algas, leveduras, fungos e bactérias. Os diferentes sistemas enzimáticos microbianos, como o sistema de degradação da lignina dos fungos da podridão branca, estão sendo extensivamente explorados para estudar as características dessas enzimas e verificar sua adequação para a decomposição de compostos coloridos (SHARIF; NASREEN; KALSOOM, 2020). Faccioli et al. (2021), destaca que enzimas, especialmente lacases sintetizadas por fungos, são alternativas promissoras para o tratamento e descoloração de efluentes têxteis devido à sua eficiência catalítica.

Segundo Dhir et al. (2022), os fungos produtores de Lacase possuem grande capacidade para remoção/remediação de corantes, podendo ser explorados para o desenvolvimento de tecnologias e no tratamento em larga escala de águas residuais contendo corantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia, Laboratório de Ecotoxicologia, Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA), e Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), localizados no campus Curitiba/PR, sede Ecoville.

A cepa fúngica, *Trametes villosa*, utilizada neste estudo, foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR (campus Curitiba). A amostra do efluente têxtil foi coletada em uma indústria têxtil, localizada na cidade de Curitiba, Brasil, enquanto o efluente hospitalar foi coletado no Hospital Regional da Lapa São

Sebastião e gentilmente cedido pelo Laboratório de Contaminantes Ambientais, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

3.2. Métodos

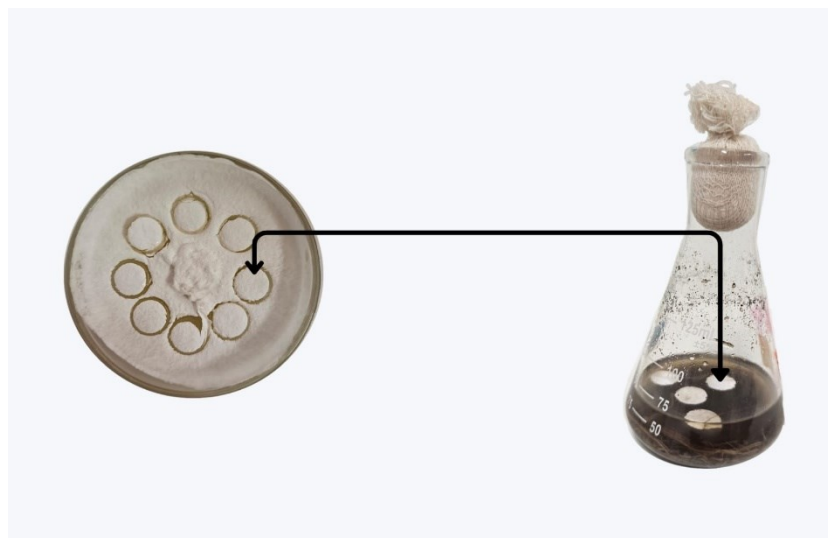
3.2.1. Cultivo do microrganismo

O fungo *Trametes villosa* foi mantido sob refrigeração a 4 °C em Ágar batata dextrose (BDA) para preservar sua viabilidade. O cultivo para crescimento micelial foi realizado em placas contendo meio de BDA por um período de sete dias, em uma estufa com temperatura controlada de 28 °C. Após o crescimento das colônias, estas foram cuidadosamente recortadas (Figura 1) utilizando tubos de ensaio estéreis. Os fragmentos resultantes foram reservados para inoculação em um meio otimizado, adequado para a produção de lacases.

3.2.2. Produção, extração e determinação da atividade enzimática

Os extratos enzimáticos foram produzidos de acordo com Modkovski et al. (2021). Para isso, preparou-se 50 mL de meio de cultura composto de casca de arroz (10 g/L); bagaço de uva bordô (5 g/L); bagaço de cana (20 g/L); glicose (10 g/L); fosfato de potássio (KH_2PO_4) (3 g/L); peptona (5 g/L); soluções a 1 mM de sulfato de manganês (MnSO_4), sulfato de cobre (CuSO_4), sulfato de ferro (FeSO_4), sulfato de zinco (ZnSO_4) e sulfato de magnésio (MgSO_4). O meio foi autoclavado durante 20 minutos a 121 °C. Os micélios fúngicos, previamente preparados descritos no item 3.2.1, foram inoculados ao meio, e para cada Erlenmeyer, foram adicionados 4 plugs de colônia em torno de 2,5 cm (Figura 1). Os frascos foram incubados em estufa a uma temperatura de 28 °C por um período de sete dias em quadruplicatas.

Figura 1. Processo de inoculação do meio de cultivo para obtenção de extrato enzimático utilizando a cepa de *Trametes villosa* em meio semissólido.



Fonte: A autora (2024)

Após o período de incubação, o extrato foi filtrado em bomba a vácuo e sua atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro UV-visível (BEL M-51). O método compreende a oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) 10 mM, na faixa de 420 nm (HOU et al., 2004) em acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) a 40 °C, durante 5 minutos. Em seguida, o extrato bruto foi congelado e armazenado a -18 °C. Para o cálculo da atividade de lacase, foi utilizada a seguinte equação (1):

$$(1) \quad \text{Atividade (U/mL)} = \frac{\text{Volume final (mL)} \times \text{Absorbância} \times \text{Fator diluição}}{\epsilon \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times \text{Caminho óptico (cm)} \times \text{Volume de amostra (mL)} \times \text{Tempo de reação (min)}}$$

Onde, o coeficiente de extinção molar (ϵ) do ABTS a 420 nm = $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ou 36 mM.

3.2.3. Tratamento enzimático com lacase livre

As amostras contendo o efluente hospitalar e têxtil foram tratadas individualmente com o extrato bruto enzimático ajustado na concentração inicial de 500 U/L de atividade de lacases, em um volume de 30 mL. As amostras foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL e levadas ao shaker em temperatura ambiente ($\pm 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$) sob agitação de 120 rpm por uma, duas e vinte e quatro horas. Após tratamento, as amostras foram mantidas no congelador a -18 °C, para experimentos posteriores.

3.2.4. Parâmetros avaliados nos efluentes pré e pós- tratamento enzimático

3.2.4.1. Fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). O processo de quantificação foi minimizado à escala de volume total de 1,0 mL. Dessa solução, foram adicionados 600 µL de água ultrapura, 50 µL de reagente Folin-Ciocalteu, 200 µL de amostra e 150 µL Na₂CO₃ a 15%. As amostras ficaram protegidas da luz por um período de uma hora e, em seguida, a absorbância foi determinada a 760 nm em espectrofotômetro (UV M51, BEL Engineering, Monza, MB, Itália). Foi utilizada para quantificação dos fenóis totais uma curva de calibração de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg/L.

3.2.4.2. Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO é um parâmetro que quantifica a matéria orgânica suscetível ao processo de oxidação por meio de agentes químicos, utilizando o dicromato de potássio em meio ácido como agente oxidante em amostras líquidas. O resultado da demanda química de oxigênio foi expresso em miligramas de oxigênio por litro (HEINZ, 2016).

As soluções de ensaio de DQO foram preparadas de acordo com o método de refluxo fechado colorimétrico em espectrofotômetro, seguindo o descrito em 5220B, APHA (2005). A digestão da amostra foi realizada a 150 °C por 2 h em bloco digestor e a leitura do ensaio por espectrofotometria pela absorção do íon Cr³⁺ na região de 600 nm.

3.2.4.3. Análise de metais

A análise quantitativa de traços de metais foi analisada no LAMAQ através da espectrometria de absorção atômica em chama (do inglês, Flame Atomic Absorption Spectrometry - FAAS) de injeção manual, da GBC, no modelo Avanta.

Os metais analisados foram: Cromo, Níquel, Cobre, Zinco e Chumbo. As condições instrumentais utilizadas foram: chama do tipo ar/acetileno, fluxo de combustível de 1,72 L/min, lâmpada de cátodo oco monoelementar com comprimento de onda 324,7 nm para o Cu, 357,9 nm para o Cr, 217,0 nm para o Pb e 283,3 nm,

213,9 nm para o Zn e 341,5 nm para Ni. Todas as determinações foram feitas em triplicatas (n=3) e acompanhadas de um branco analítico.

3.2.4.4. Cromatografia líquida-acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM)

As concentrações de antibióticos nas misturas de reação mediadas por lacase foram determinadas no LAMEAA por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM), em equipamento modelo 8045, marca Shimadzu. Para as análises, foi utilizada a coluna Poroshell C18, 100x2,7mm, 2,1µm, 150 x 30 mm, 3,5 µm, a 45 °C. A fase móvel consistiu em uma solução de acetato de amônia 5mM e Metanol (MeOH), com um tempo de retenção de 16 minutos para a Pirazinamida, 8 minutos para a cafeína, 4 minutos para sulfametoxazol, 11 minutos para trimetoprima e 14 minutos para rifampicina, em um fluxo de 0,25 mL/min. A coluna foi mantida a 45 °C e o volume de injeção utilizado foi de 10 µL.

Para as condições da espectrometria de massa, foi utilizado o nitrogênio como gás de colisão, a 350 °C, com fluxo de 12 L/min.

3.2.4.5. Bioensaio de toxicidade

Esta análise tem o objetivo de avaliar a toxicidade aguda, na qual podem ser observados os efeitos toxicológicos de resíduos puros ou diluídos sobre o processo de germinação das sementes e sobre o desenvolvimento das radículas durante os primeiros dias de crescimento.

A fitotoxicidade das amostras após o tratamento enzimático foi verificada por meio do teste de germinação utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*). A variedade de alface utilizada foi adquirida em estabelecimentos comerciais e possui um percentual de germinação de 97%, prazo de validade em 06/2026 e é um produto livre de defensivos agrícolas (informação dada pelo fornecedor: RENASEM Prod. /Comerc RS00342/2005).

A fitotoxicidade foi avaliada por meio do teste de germinação e alongação radicular e por meio de metodologia adaptada por Sobrero e Ronco (2008), Young et al. (2012), ISO 17126 (2005). Desta forma, 18 sementes de alface foram distribuídas espaçadamente em placas de Petri, contendo um papel filtro qualitativo de 80 g/m² e poro médio de 14 micra (Figura 2). Em seguida, as sementes foram postas em contato com 3,0 mL de amostras dos efluentes tratados com suas

respectivas concentrações 0%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% e 100%, onde 0% representa o controle positivo com a água destilada e para o controle negativo utilizou-se glifosato a 5%. Os experimentos foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas no escuro por 120h a 22 ± 2 °C.

Figura 2. Preparo das amostras para o ensaio de germinação de sementes *Lactuca sativa*.



Fonte: A autora (2024)

O índice de germinação (IG) foi calculado usando a equação (2), onde CMR é o comprimento médio da raiz, MSG é a média das sementes germinadas, MCR é a média do comprimento da raiz e MSC é a média das sementes germinadas para o controle (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017).

O índice de crescimento relativo (IGR) foi calculado usando a Eq. (3), onde RCM é o comprimento médio das raízes da amostra e MRC é o comprimento médio das raízes do controle. O IGR foi dividido em três categorias: efeitos de inibição ($0 < RGI < 0,8$), efeitos não significativos ($0,8 < RGI < 1,2$) e efeitos de estimulação ($RGI > 1,2$) (UTZIG et al., 2019).

$$IG = (CMR/MSG)/(MCR/MSC) \times 100 \quad (2)$$

$$IGR = RCM/MRC \quad (3)$$

As análises estatísticas foram realizadas com o software gratuito PSPP (Public Software for People and Professionals, Estados Unidos). Os resultados foram analisados pelo teste de variância de um fator (ANOVA) e teste de Dunnett com um limite de significância de $p < 0,05$.

3.2.5. Análise espectrofotométrica em modo varredura

A análise espectrofotométrica de varredura na região do visível foi realizada com amostras de efluente têxtil não tratado e tratado enzimaticamente (SANTOS et al., 2022).

O efluente têxtil foi testado antes e após tratamento, em duas concentrações iniciais de atividade enzimática, sendo estas 500 e 1000 U/L em um volume total de 15 mL de efluente têxtil, que foram acondicionadas no shaker a 25°C em uma agitação de 120 rpm, por vinte e quatro horas.

Para a análise de dados, foi feita a varredura do efluente em espectrofotômetro UV-visível (BEL M-51), utilizando um comprimento de onda entre 450 e 750 nm. Após a leitura, foi realizada a integração da área espectral de cada amostra para determinação da porcentagem de redução de cor nas amostras tratadas em relação ao controle. O pico máximo de absorção de cor do efluente também foi determinado espectrofotometricamente e considerado para a avaliação da eficácia do tratamento enzimático.

3.2.5.1. Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para calcular as médias dos efluentes pré e pós-tratamento enzimático, utilizando o teste de Tukey para determinar as comparações múltiplas das médias obtidas. A ANOVA foi realizada por meio do software estatístico PSPP. A significância estatística foi determinada por valores de p menores que 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de extratos enzimáticos

O meio de cultivo semissólido demonstrou ser eficiente na indução de produção da enzima lacase, resultando em uma atividade com média de 11754 U/L e desvio-padrão 1,83 U/L no extrato bruto. A produção das enzimas lacase a partir do fungo *Trametes villosa* foi avaliada previamente por Modkovski (2021), que obteve uma produção de lacase induzida com atividade enzimática de 17000 U/L. Ao utilizar cascas de arroz, bagaço de uva bordô e bagaço de cana, se agrega valor a produtos com baixo custo e ampla disponibilidade, que a princípio seriam descartados,

minimizando assim o impacto ambiental causado pelo acúmulo dos mesmos na natureza.

A literatura relata diversos estudos que comprovam a eficácia de oligoelementos em aumentar a capacidade enzimática de fungos. Yamanaka et al. (2008) observaram em estudo com *T. villosa*, onde a presença de cobre demonstrou estimular a produção da lacase e apresentou uma atividade enzimática de 731 U/L.

De acordo com Akpinar et al. (2017), resíduos de pêssego obtidos da indústria de suco de fruta juntamente com Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , NH_4NO_3 , Tween 80 como indutores de lacase foram eficazes na produção de lacase por *Pleurotus eryngii*.

Knezevic et al. (2014) relataram que a presença de Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} afetou a atividade enzimática de forma positiva, com um aumento de mais de 50% na produção de lacase produzida pelo fungo *Trametes gibbosa* em comparação ao controle. Em outro estudo, a produção de lacase por *Pleurotus ferulae* foi otimizada utilizando Cu^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} como indutores enzimáticos, resultando em uma atividade de lacase de 6832 U/L, quatro vezes maior do que a atividade controle (DING et al., 2014).

Os dados obtidos demonstraram que as fontes de carbono utilizadas na produção dos extratos ofereceram suporte nutricional para o crescimento dos fungos filamentosos utilizados, que por sua vez, foram bons indutores enzimáticos (CORRÊA, 2023).

Os resíduos industriais utilizados no meio semissólido foram eficazes em fornecer substratos lignocelulósicos necessários para o crescimento fúngico, bem como a consequente indução da produção da enzima lacase. Este processo agrega valor a esses resíduos ao transformá-los em produtos de maior utilidade. Contribuindo para a redução do impacto ambiental associado ao descarte inadequado desses materiais e convertendo um resíduo de baixo valor econômico em um produto de alto valor agregado.

4.2. Análise do tratamento enzimático em efluente hospitalar

4.2.1. Remoção de fármacos

As remoções de antibióticos por meio do tratamento com lacase livre foram avaliadas nos efluentes hospitalares, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. As amostras foram analisadas no período de uma hora,

duas horas e 24 horas e os resultados obtidos foram aplicados estatisticamente ao método ANOVA, revelando diferenças significativas entre as médias dos grupos testados (Tabela 1).

De acordo com o teste de Tukey, o grupo controle, sem a adição do extrato enzimático, apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo com tratamento (p -valor < 0,001).

Tabela 1. Resultados de média (mg/L) e desvio padrão das concentrações de cafeína e antibióticos presentes no efluente hospitalar após o tratamento enzimático analisados por CLAE-EM.

Amostras	Cafeína	TMP	SMZ	PYZ	RFC
Controle	1398 ± 196 ^a	10,5 ± 1,1 ^a	11,8 ± 1,1 ^a	37,2 ± 0,4 ^a	22,8 ± 2,0 ^a
Efluente 1h	395 ± 35,6 ^b	3,2 ± 0,11 ^b	4,0 ± 0,4 ^b	2,4 ± 1,4 ^b	6,3 ± 0,8 ^b
Efluente 2h	416 ± 5,5 ^c	3,3 ± 0,03 ^b	4,7 ± 0,3 ^b	1,4 ± 0,9 ^b	6,0 ± 0,4 ^b
Efluente 24h	414 ± 41,33 ^c	3,2 ± 0,09 ^b	4,0 ± 0,2 ^b	0,9 ± 0,2 ^b	5,0 ± 0,7 ^b

Nota: Médias com a mesma letra nas colunas não são estatisticamente diferentes. Controle: amostras compostas pelo efluente e pelo extrato enzimático desnaturado; TMP: trimetoprima; SMZ: sulfametoxazol; PYZ: pirazinamida; RFC: rifampicina.

Ao comparar as médias obtidas nos três tempos após o tratamento, foi possível notar que o período de reação não apresenta grandes interferências nas taxas de remoção. Os resultados obtidos no pós-tratamento com a lacase demonstram a eficácia da enzima em remover diversos compostos de um mesmo efluente. De acordo com Navada e Kulal (2019), a lacase produzida pelo fungo *Trametes hirsuta* na presença do mediador ABTS foi capaz de degradar o antibiótico Cloranfenicol, obtendo, assim, degradação de 82% em 48 horas.

As amostras demonstraram uma remoção máxima de 70% para cafeína, 97% para pirazinamida, 74% para rifampicina, 66% para sulfametoxazol e 64% para trimetoprima após 24 horas de reação (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da taxa de remoção (%) dos antibióticos e de cafeína após o tratamento enzimático, calculados a partir das médias de concentração dos fármacos determinados por CLAE-EM.

Amostras	Taxa de remoção (%)		
	1 hora	2 horas	24 horas
Cafeína	72%	70%	70%
TMP	64%	63%	64%
SMZ	67%	60%	66%
PYZ	96%	93%	97%
RFC	67%	70%	74%

Nota: TMP: trimetoprim; SMZ: sulfametoxazol; PYZ: pirazinamida; RFC: rifampicina.

Os resultados obtidos destacam uma remoção eficaz da cafeína, que é conhecida por sempre estar associada a substâncias farmacologicamente ativas em amostras de efluentes (GÓMEZ et al., 2007). A cafeína é frequentemente relatada como um medicamento devido principalmente às suas múltiplas aplicações, especialmente em sua forma combinada com outros medicamentos, como o paracetamol (MOSLAH et al., 2018).

O uso de lacase do fungo *Trametes versicolor* na degradação de quatro produtos farmacêuticos foi avaliado por Alharbi et al. (2019), individualmente, no período de 48 horas, e foi possível observar uma remoção completa alcançada nas primeiras 8 horas de incubação, resultando em 100% de remoção de diclofenaco, 95% para trimetoprima, 85% para carbamazepina e uma degradação moderada de 56% para sulfametoxazol. A remoção dos quatro medicamentos testados individualmente foi mais eficaz do que quando testados em misturas nas mesmas condições. Isso evidencia a instabilidade dos efluentes reais, uma vez que vários fatores bióticos e abióticos podem influenciar diretamente a taxa de degradação desses compostos.

Segundo Mojtabavi et al. (2023), a lacase comercial imobilizada foi capaz de remover 85% do ciprofloxacino das águas residuais hospitalares. Após um período de 3 horas de incubação, a imobilização permitiu a preservação da estrutura da enzima em temperaturas elevadas e ambientes de pH severo.

Esses resultados demonstram que a enzima lacase, presente no extrato bruto de *T. villosa*, é eficiente na remoção de compostos farmacêuticos e pode chegar a altas taxas de remoção mesmo na ausência de mediadores químicos.

4.2.2. Avaliação fenólicos totais

Para a análise dos fenólicos totais foram utilizadas amostras em triplicatas com tempo reacional de 24 horas. Os resultados obtidos foram avaliadas estatisticamente pelo teste de Tukey ($P = <0,001$). O uso da lacase demonstrou eficácia moderada para o tratamento de compostos fenólicos em águas residuárias hospitalares. As amostras neste tratamento apresentaram uma média para compostos fenólicos de 32,03 mg/L na amostra controle e 12,75 mg/L para a amostra tratada com extrato bruto de lacase, com taxa de remoção de 64,5%.

Compostos fenólicos são poluentes ambientais gerados na fabricação de muitos produtos industriais como papéis, metais, resinas, plásticos, pesticidas e produtos farmacêuticos (XU; YANG, 2013).

Villegas et al. (2016) afirma que compostos fenólicos são poluentes prioritários com alta toxicidade mesmo em baixas concentrações.

Os resultados anteriores mostraram uma grande quantidade de cafeína presente no efluente hospitalar estudado, e uma redução significativa desse composto pode ter uma ligação direta com os resultados de fenólicos totais, visto que a cafeína é relatada como um dos componentes principais em amostras que demonstram, também, a presença de compostos fenólicos (MAGALHÃES et al., 2016).

4.2.3. Avaliação da DQO

A DQO da amostra de água residuária hospitalar apresentou um aumento significativo quando comparada à amostra controle, que apresentou um valor médio inicial de 313,4 mg L⁻¹ de O₂ e aumentou para 715,1 mg L⁻¹ de O₂ após o tratamento enzimático. Alguns estudos relatam o aumento da DQO no tratamento de efluentes com a enzima lacase. Silva et al. (2012) obtiveram um aumento no valor da DQO (de 182,4 mg L⁻¹ de O₂) em relação à solução não tratada de um efluente sintético contendo o corante turquesa remazol G.

Cristóvão et al. (2009) também relataram um aumento significativo na DQO de um efluente simulado contendo corantes reativos (de 394 para 3.383 mg/L de O₂) após o tratamento com lacase. Ao subtrair os valores correspondentes à enzima, a média do efluente tratado mostrou-se semelhante aos valores iniciais, isso se deve à complexidade do efluente.

4.2.4. Análise de metais

De acordo com a resolução CONAMA 357/05 (2005) o nível máximo de chumbo permitido em efluentes líquidos industriais tratados antes de serem lançados em corpos hídricos é de 0,5 mg/L. As amostras de efluente hospitalar demonstraram teores dentro do limite imposto pela legislação para esse elemento químico (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de metais do efluente hospitalar (EH), antes e após o tratamento enzimático com lacase, analisada através da espectrometria de absorção atômica em chama (EAAC).

	Cr	Cu	Zn	Ni	Pb
Amostras	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)
Controle	-	0,454	1,192	0,024	0,025
EH1	-	0,355	1,092	0	0
EH2	-	0,269	1,045	0	0
EH3	-	0,57	0,957	0	0

Nota: Cr: cromo; Cu: cobre; Zn: zinco; Ni: níquel; Pb: chumbo.

Nas amostras de efluente hospitalar não foram observadas concentrações de cromo, porém, quanto ao cobre e zinco, não se notou diferenças significativas após o tratamento enzimático, já para os metais níquel e chumbo foi observada uma redução total em amostras tratadas. Metais podem ser precipitados ou quelados pelas lacases (AHMADI et al., 2021), e compostos presentes no efluente e oxidados pela lacase podem ter contribuído na remoção de alguns metais.

De acordo com Paganini et al. (2004), a toxicidade do cobre, zinco e outros metais pode ser diretamente influenciada pelo pH e pela quantidade de matéria orgânica contida no meio. Segundo Lorenzo et al. (2005), a atividade enzimática da lacase foi testada na presença de Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} , e se mostrou sensível a todos os compostos orgânicos testados, embora um leve efeito indutor tenha sido detectado em uma concentração de Cu^{2+} menor que 1 mM. No presente trabalho, a atividade de lacase não foi significativamente inibida pelos metais nas concentrações determinadas no efluente, considerando que a enzima conseguiu oxidar a cafeína e antibióticos. No entanto, não foi possível determinar um efeito indutor pela presença do cobre.

4.2.5. Ensaio Ecotoxicológico

Após cinco dias de crescimento na BOD, o comprimento da raiz, considerado como parâmetro subletal, foi medido e apresentado como um parâmetro sensível para a comparação da fitotoxicidade (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017).

O comprimento médio da raiz dos controles negativos em duplicatas e amostras de tratamento foi utilizado pelo teste de Dunnett, onde foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) para o grupo testado.

De acordo com os resultados obtidos após a germinação das sementes de alface na presença de efluentes tratados enzimaticamente, foi possível observar um resultado inesperado em amostra com o efluente puro hospitalar, que apresentou um estímulo na germinação das sementes na diluição de 6,25% (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado da fitotoxicidade do efluente hospitalar em sementes de *L. sativa*, antes e após o tratamento com lacase.

Amostras	Diluições	CR (cm)	CV(%)	GI(%)	ICR	Efeito
Controle Negativo	-	22,1 ± 6,5	29,2		-	-
Efluente puro	6,25%	28,0 ± 8,9	32	144,1	1,3	E
	12,5%	18,2 ± 5,9	32,4	77,7	0,8	SES
	25%	16,4 ± 5,3	33,3	69,9	0,8	SES
	50%	12,3 ± 4,8	38,8	52,6	0,6	I
	100%	9,4 ± 2,7	27,8	40,3	0,4	I
Efluente tratado com enzima	6,25%	23,7 ± 9,7	41,1	107,1	1,1	SES
	12,5%	21,2 ± 8,4	40,4	96,1	1	SES
	25%	25,1 ± 7,7	30,6	113,7	1,1	SES
	50%	21,8 ± 7,0	32,1	98,8	1	SES
	100%	13,3 ± 5,2	39,1	59,9	0,6	I

Nota: Comprimento da raiz (CR); Coeficiente de variação (CV); Índice de germinação (IG); índice de crescimento relativo (ICR); Sem efeito significativo (SES): $0.8 \leq x \leq 1.2$; Efeito inibitório (I): $0 < x < 0.8$; (E) Estimulo do alongamento da raiz: $x > 1.2$; (-): Não calculado.

Hillis et al. (2011) observaram que o uso de sementes de alface (*L. sativa*) foi uma ferramenta valiosa para a avaliação da fitotoxicidade de antibióticos, e a medida do comprimento da raiz (CR) foi o parâmetro mais sensível aos efeitos dos antibióticos. Os autores determinaram que o antibiótico levofloxacino foi o mais fitotóxico e o trimetoprima foi o mesmo fitotóxico (sulfametoxazol ficou em intervalo de fitotoxicidade intermediário) dentre os antibióticos avaliados.

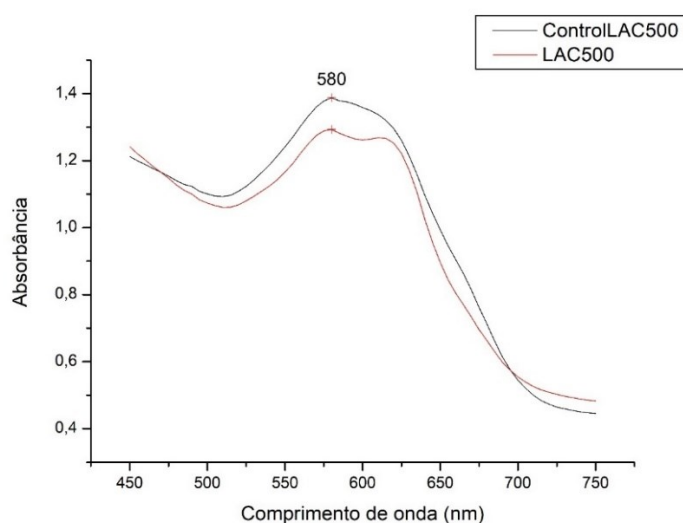
De um modo geral, o tratamento enzimático reduziu o impacto negativo dos antibióticos no desenvolvimento da raiz de *L. sativa* e contribuiu para o aumento dos valores de ICR (índice de crescimento relativo).

4.3. Tratamento em efluente têxtil

4.3.1. Remoção de cor

Para a análise de varredura, foi integrada a área do espectro de cada amostra de efluente (antes e após o tratamento), assim como avaliada a presença de um pico máximo de absorbância no comprimento de onda de 580 nm. Foi possível observar uma redução de área espectral de 3,79% e uma redução de altura do pico máximo em 580 nm de 6,81% para as amostras com atividade inicial de 500 U/L (LAC 500) (Figura 3).

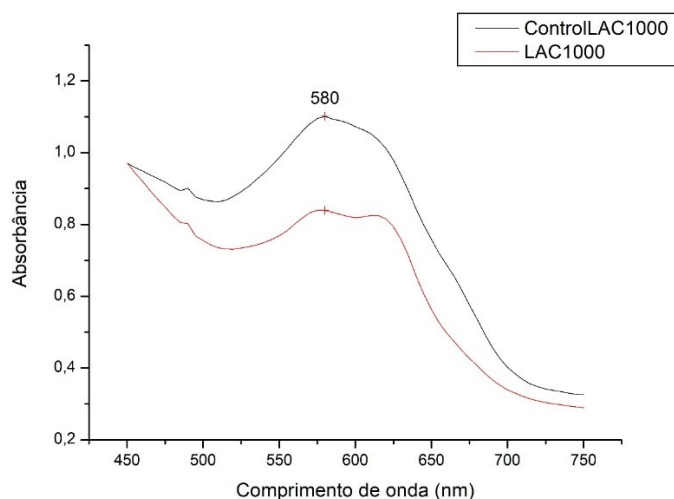
Figura 3. Representação gráfica da área espectral do ensaio com efluente têxtil tratado enzimaticamente com a enzima lacase em atividade inicial de 500 U/L com comprimento de onda entre 450-750 nm.



Fonte: A autora (2024)

Para as amostras com atividade inicial de 1000 U/L (LAC 1000), foi obtido uma redução de área espectral de 18,03% e uma redução de altura do pico máximo em 580 nm de 23,76% (Figura 4).

Figura 4. Representação gráfica da área espectral do ensaio com efluente têxtil tratado enzimaticamente com a enzima lacase em atividade inicial de 1000 U/L com comprimento de onda entre 450-750 nm.



Fonte: A autora (2024)

Foi possível observar uma redução maior na área espectral da amostra de efluente tratada com LAC 1000, obtendo uma redução seis vezes maior em relação a amostra LAC 500, demonstrando assim que a quantidade de unidades enzimáticas é proporcional à redução de cor no efluente tratado.

Iqbal, Nadeem e Zafar (2021), verificaram que a eficiência da lacase do fungo *Pleurotus ostreatus- P1* resultou em uma descoloração de 90% no efluentes têxteis .

A lacase se mostrou capaz de descolorir a água residual têxtil em até 35% após 3 h de incubação e foi capaz de descolorir as misturas de corantes desenvolvido por Ademakinwa e Agboola(2015).

A atividade descolorante da lacase purificada, proveniente de um fungo *Trametes* sp. Provou ser eficiente na remoção de 62,0% em relação ao Azul de Bromotimol e 46,1% Verde Malaquita (LING et al., 2015).

Em um estudo diferente, a descoloração de RB5 foi otimizada usando extrato bruto da lacase do fungo *Trametes pubescens* com o mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (RORIZ et al., 2009).

Chairin et al. (2013) também relataram a descoloração eficiente de corantes sintéticos usando a lacase purificada do fungo *Trametes polyzona*.

Grande parte dos estudos com fungos do gênero *Trametes*, utilizaram mediadores ou enzimas purificadas. De acordo com Khlifi et al. (2010), a descoloração de um efluente da indústria têxtil por lacase de *Trametes trogii* na ausência de mediadores não foi capaz de descolorir o efluente eficientemente.

No entanto, De Paula et al. (2022) observaram uma maior descoloração de efluente têxtil real com extratos enzimáticos de *M. arundinis* e *T. villosa* na ausência de mediadores químicos (HBA e HBT).

O extrato enzimático bruto do *Trametes villosa* demonstrou ser capaz em reduzir a cor do efluente neste trabalho, entretanto acredita-se que com o auxílio de mediadores químicos a remediação do efluente possa ser otimizada.

4.3.2. Avaliação de fenólicos totais

As amostras antes e após o tratamento enzimático foram avaliadas de forma similar ao procedimento descrito na seção 4.2.2. As amostras de efluente têxtil tratadas enzimaticamente, apresentaram a eficácia de 98,5% na remoção dos compostos fenólicos, com média de 52,30 mg/L para o controle e 1,37 mg/L para a amostra após o tratamento com extrato bruto contendo lacase.

De acordo com Rahmani et al. (2020), a lacase livre apresentou um impacto positivo semelhante, com uma taxa de remoção de 98,5% do composto 2,4-DNP, usado na fabricação de tintas, conservantes de madeira, herbicidas, pesticidas.

De maneira semelhante, o conteúdo fenólico foi diminuído nas águas residuárias da destilaria de vinho usando uma cultura de crescimento de *Trametes pubescens* (STRONG; BURGESS, 2008).

A eficiência da lacase de *Trametes versicolor* provou ser eficaz na transformação de um grande número de compostos fenólicos diferentes, quando testados sozinhos ou em misturas complexas, a partir de uma amostra de águas residuais de lagar de azeite (CANFORA et al., 2008).

O uso da lacase demonstrou viabilidade e eficácia para o tratamento de compostos fenólicos em águas residuais de indústria têxtil, reafirmando a eficácia das lacases na transformação de misturas fenólicas, tanto simples quanto complexas, e

demonstra seu potencial como ferramenta eficiente para a desintoxicação de resíduos fenólicos.

4.3.3. Demanda Química de Oxigênio

As amostras de efluente têxtil apresentaram valor médio de DQO de 497,2 mg L⁻¹ de O₂, o que foi reduzido para 404 mg L⁻¹ de O₂ após o tratamento enzimático (LAC).

Segundo Khouni et al. (2011), o tratamento com lacase comercial apresentou uma descoloração de 98% da coloração do efluente têxtil estudado. No entanto, apesar da melhoria na remoção de cor, a aplicação do tratamento enzimático não demonstrou um efeito direto na remoção de DQO.

Em estudo de remediação de um lodo de esgoto primário, foi observado que as enzimas celulase e protease, individualmente testadas, demonstraram pouco ou nenhum impacto na remoção da DQO. Entretanto, a mistura das duas enzimas resultou em uma redução de 97% de remoção total de DQO (ROMAN; BURGESS; PLETSCHE, 2006).

O extrato enzimático da lacase avaliado neste trabalho não demonstrou uma redução tão significativa da DQO do efluente têxtil, mas acredita-se que a utilização de mediadores, ou mesmo de outras enzimas em conjunto, possa aumentar a eficácia da lacase na redução da DQO.

4.3.4. Análise de metais

De acordo com o Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA) na resolução 070/09 (2009) em seu anexo 7, os teores máximos de cromo, níquel, cobre e zinco permitidos em efluentes de indústrias têxteis são, respectivamente, 0,5 mg/L, 2,0 mg/L, 1,0 mg/L e 5,0 mg/L. Todas as amostras apresentaram os teores dos compostos abaixo do limite imposto pela legislação para esses compostos.

Nas amostras de efluente têxtil, não foi observada redução significativa para os metais cromo e zinco, já as amostras de cobre apresentaram um aumento após o tratamento enzimático, e isso pode ter ocorrido pela presença do metal utilizado no meio de produção enzimática. Assim como nos efluentes hospitalares, o tratamento

enzimático do efluente têxtil também demonstrou uma redução dos metais Ni e Pb (Tabela 5).

Compostos de cromo e metais pesados, como cobre, arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, níquel, cobalto e certos produtos químicos auxiliares, foram relatados como a principal causa de efeitos tóxicos em efluentes têxteis (BHATIA et al., 2017).

Tabela 5. Análise de metais do efluente têxtil (ET), antes e após o tratamento o tratamento enzimático com lacase.

	Cr	Cu	Zn	Ni	Pb
Amostras	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)	Conc. (mg/L)
Controle	0,346	0,08	1,368	0,050	0,033
Efluente tratado	0,363	0,107	1,547	0,0255	0,016

Nota: analisada através da espectrometria de absorção atômica em chama (EEAC).

Cr: cromo, Cu: cobre, Zn: zinco, Ni: níquel, Pb: chumbo.

Estudos têm demonstrado que metais pesados como cobre, chumbo e cromo, frequentemente encontrados em efluentes industriais, podem inibir a atividade da lacase ligando-se aos sítios ativos da enzima ou causando alterações estruturais, reduzindo assim sua capacidade de oxidação (SENTHILVELAN; KANAGARAJ; PANDA, 2018). A presença destes metais no efluente têxtil pode ter afetado a capacidade catalítica da enzima, a qual não reduziu significativamente o parâmetro de DQO e removeu parcialmente a coloração do efluente.

A estabilidade enzimática em relação aos componentes de efluentes complexos é um fator importante que pode inviabilizar a aplicação de lacases fúngicas (SUN et al., 2021). No entanto, a otimização do processo de tratamento (alteração de parâmetros como atividade inicial da enzima, diluição do efluente, etc) e a imobilização das lacases podem aumentar a eficácia do tratamento enzimático.

4.3.5. Ensaio ecotoxicológico

Nas amostras de efluente têxtil, foi possível observar uma inibição importante da germinação das sementes de *L. sativa* nas diluições de 50 e 100% (Tabela 6). No entanto o tratamento enzimático contribuiu para a redução desse efeito, reduzindo

particularmente a toxicidade da amostra de efluente a 100% (apesar de não eliminar completamente o efeito inibitório).

De acordo com Cantele et al. (2017) a descoloração dos corantes sintéticos tratados com extrato bruto de lacase não produziu efeitos de inibição sobre as sementes de *L. sativa*, corroborando o resultado obtido neste estudo.

Tabela 6. Resultado da fitotoxicidade do efluente têxtil em sementes de *L. sativa*, antes e depois do tratamento com lacase.

Amostras	Diluições	CR (cm)	CV(%)	GI(%)	ICR	Effect
Controle Negativo	-	22,1±6,5	29,2		-	-
Efluente puro	6,25%	20,0 ± 5,8	29	85,3	0,9	SES
	12,5%	18,2 ± 5,9	32,4	77,7	0,8	SES
	25%	16,4 ± 5,3	33,3	69,9	0,8	SES
	50%	12,3 ± 4,8	38,8	52,6	0,6	I
	100%	9,4 ± 2,7	27,8	40,3	0,4	I
Efluente tratado com enzima	6,25%	21,3 ± 7,2	33,6	88,3	1,0	SES
	12,5%	20,8 ± 7,0	34,2	85,9	0,9	SES
	25%	19,0 ± 7,7	40,5	78,5	0,9	SES
	50%	14,8 ± 5,2	35,1	61,1	0,7	I
	100%	12,8 ± 6,1	47,7	52,8	0,6	I

Notas: Comprimento da raiz (CR); Coeficiente de variação (CV); Índice de germinação (IG); índice de crescimento relativo (ICR); Sem efeito significativo (SES): $0.8 \leq x \leq 1.2$; Efeito inibitório (I): $0 < x < 0.8$; (E) Estimulo do alongamento da raiz: $x > 1.2$; (-): Não calculado.

Os resultados obtidos nas amostras estudadas destacam que os contaminantes encontrados nos efluentes podem retardar o processo de crescimento das plantas (GOMES et al., 2019), além de acumular esses componentes transferindo-os ao longo das teias tróficas que podem afetar toda uma dinâmica populacional (BELLINO et al., 2018).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a eficácia do extrato bruto de *T. villosa* no tratamento de efluentes hospitalares e efluentes têxteis, bem como a eficiência na redução de compostos fenólicos presentes nas águas residuais. Porém, o tratamento enzimático não apresentou o resultado esperado em relação a alguns parâmetros, como no caso do aumento da DQO no efluente hospitalar e o estímulo de crescimento das sementes de alface. Geralmente, a enzima livre possui uma maior instabilidade em meio a efluentes, e nossos resultados concluem que a lacase manteve sua atividade catalítica quando aplicada no tratamento das amostras, considerando que houve alteração nos resultados de diversos parâmetros monitorados antes e após o tratamento. No entanto, não foi possível determinar o período no qual ela se manteve ativa ou mesmo se foi afetada parcialmente pela presença de metais. Estudos futuros poderão demonstrar a estabilidade das lacases de *T. villosa* e sua resistência em meio a misturas complexas de poluentes na ausência de procedimentos de imobilização ou mediadores químicos.

6. REFERÊNCIAS

- ADEMAKINWA, A. N.; AGBOOLA, F. K. Bioremediation of textile dye solutions, textile dye mixtures and textile effluents by laccase from *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud (1918) (Fungi: Ascomycota). 15 dez. 2015.
- AHMADI KHOZANI, M., EMTIAZI, G., AGHAEI, S.S. *et al.* Application of fungal laccase for heavy metals precipitation using tannin as a natural mediator. **Int. J. Environ. Sci. Technol.** v. 18, p. 2335–2344, 2021.
- AKPINAR, M.; OZTURK UREK, R. Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 98, 30 maio 2017.
- ALHARBI, S. K. *et al.* Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from *Trametes versicolor*: Transformation products and toxicity of treated effluent. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 6, p. 399–408, 2 nov. 2019.
- ALMEIDA, É. J. R. DE; DILARRI, G.; CORSO, C. R. A indústria têxtil no Brasil: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. 2016.
- ARAÚJO, R. K. D.; WOLFF, D. B.; CARISSIMI, E. Fármacos em águas residuárias: efeitos ambientais e remoção em wetlands construídos. **Revista DAE**, v. 67, n. 218, p. 137–155, 2019.
- BARBER, E. A.; LIU, Z.; SMITH, S. R. Organic Contaminant Biodegradation by Oxidoreductase Enzymes in Wastewater Treatment. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 122, jan. 2020.
- BELLINO, A. *et al.* Efeitos de antibióticos na germinação de sementes e no desenvolvimento radicular do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 135–141, 1 fev. 2018.
- BHATIA, D. *et al.* Biological methods for textile dye removal from wastewater: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 19, p. 1836–1876, 2 out. 2017.
- BILAL, M. *et al.* Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation - A review. **Journal of Environmental Management**, v. 234, p. 253–264, 15 mar. 2019.
- BRAGA, D. M. *et al.* Produção e imobilização de lacases provenientes de monocultivo e cocultivo de *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* para biodegradação sustentável de ciprofloxacina. **Process Biochemistry**, v. 141, p. 132–143, 1 jun. 2024.
- BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005.** , 2005. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcdaltrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf>

BRUGNARI, T. et al. Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market—an overview. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 131, dez. 2021.

CANFORA, L. et al. Oxidative Transformation of Natural and Synthetic Phenolic Mixtures by *Trametes versicolor* Laccase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1398–1407, 1 fev. 2008.

CANTELE, C. et al. Synthetic dye decolorization by *Marasmiellus palmivorus*: Simultaneous cultivation and high laccase-crude broth treatment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 314–322, out. 2017.

CHAIRIN, T. et al. Biodegradation of Bisphenol A and Decolorization of Synthetic Dyes by Laccase from White-Rot Fungus, *Trametes polyzona*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 539–545, 1 jan. 2013.

CHOWDHURY, E. K. Disastrous consequence of coronavirus pandemic on the earning capacity of individuals: an emerging economy perspective. **SN Business & Economics**, v. 2, n. 10, p. 153, 19 set. 2022.

CONIGLIO, R. O. et al. Enzymatic hydrolysis of barley straw for biofuel industry using a novel strain of *Trametes villosa* from Paranaense rainforest. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 8, p. 753–762, 1 set. 2020.

CONTATO, A. G. et al. Prospection of Fungal Lignocellulolytic Enzymes Produced from Jatoba (*Hymenaea courbaril*) and Tamarind (*Tamarindus indica*) Seeds: Scaling for Bioreactor and Saccharification Profile of Sugarcane Bagasse. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 533, 5 mar. 2021.

CORRÊA, A. **Produção de enzimas lignocelulolíticas por *trametes versicolor* e *trichoderma asperellum* utilizando bagaço de uva e farelo de trigo como substratos**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 28 fev. 2023.

CRISTÓVÃO, R. O. et al. Treatment and kinetic modelling of a simulated dye house effluent by enzymatic catalysis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6236–6242, dez. 2009.

CUADRA, S. DE LA; DE, F. Engineering of a fungal laccase as biocatalyst for organic synthesis. 22 fev. 2021.

DARWESH, O. M.; MATTER, I. A.; EIDA, M. F. Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 1, p. 102805, 1 fev. 2019.

DASGUPTA, D. et al. Mycoremediation of different wastewater toxicants and its prospects in developing value-added products: A review. **Journal of Water Process Engineering**, v. 58, p. 104747, 1 fev. 2024.

DE PAULA, N. M. et al. Biotechnological potential of fungi from a mangrove ecosystem: Enzymes, salt tolerance and decolorization of a real textile effluent. **Microbiological Research**, v. 254, p. 126899, 1 jan. 2022.

DEBNATH, R.; SAHA, T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101645, 1 jul. 2020.

DESKA, M.; KOŃCZAK, B. Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process – State of the art. **Process Biochemistry**, v. 84, p. 112–123, 1 set. 2019.

DHIR, B. Degradation of Dyes Using Filamentous Fungi. Em: MUTHU, S. S.; KHADIR, A. (Eds.). **Dye Biodegradation, Mechanisms and Techniques: Recent Advances**. Singapore: Springer, 2022. p. 51–66.

DING, Z. et al. Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 121–129, mar. 2014.

FERREIRA-SILVA, V. et al. *Trametes lactinea* and *T. villosa* collected in Brazil are able to discolor indigo carmine. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, p. e2021abb0356, 2022.

FLAKSBERG, D. A. DE P. **Efeito de indutores naturais e sintéticos na produção de lacases fúngicas**. bachelorThesis—[s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 30 nov. 2021.

GARG, N.; GARG, A.; MUKHERJI, S. Descoloração e degradação ecológica do corante têxtil amarelo reativo 145 por *Pseudomonas aeruginosa* e *Thiosphaera pantotropha*. **Journal of Environmental Management**, v. 263, p. 110383, 1 jun. 2020.

GHESTI PIVETTA, G.; DO CARMO CAUDURO GASTALDINI, M. Presence of emerging contaminants in urban water bodies in southern Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 17, n. 2, p. 329–337, abr. 2019.

GOMES, M. P. et al. Effects of Ciprofloxacin and Roundup on seed germination and root development of maize. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 2671–2678, 15 fev. 2019.

GÓMEZ, M. J. et al. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 993–1002, 1 jan. 2007.

HERATH, I. S. et al. Textile dye decolorization by white rot fungi – A review. **Bioresource Technology Reports**, v. 25, p. 101687, fev. 2024.

HILLIS, D. G. et al. Effects of Ten Antibiotics on Seed Germination and Root Elongation in Three Plant Species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 220–232, 1 fev. 2011.

HOU, H. et al. Aumento da produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* e seu uso para a descoloração do corante antraquinona. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 30 jul. 2004.

IQBAL, K.; NADEEM, A.; ZAFAR, U. Biostoning of textile effluent with laccase enzyme. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 56, n. 2, p. 115–124, 23 jun. 2021.

JANUSZ, G. et al. Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 966, 31 jan. 2020.

KATO, C.; BACKES, E.; PERALTA, R. **APLICAÇÃO DE LACASES EM SÍNTESE ORGÂNICA PARA OBTENÇÃO DE BIOATIVOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE: UMA REVISÃO**. [s.l.: s.n.].

KHAN, M. T. et al. Hospital wastewater as a source of environmental contamination: An overview of management practices, environmental risks, and treatment processes. **Journal of Water Process Engineering**, v. 41, p. 101990, jun. 2021.

KHLIFI, R. et al. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1–3, p. 802–808, 15 mar. 2010.

KHOUNI, I. et al. Decolourization of the reconstituted textile effluent by different process treatments: Enzymatic catalysis, coagulation/flocculation and nanofiltration processes. **Desalination**, v. 268, n. 1, p. 27–37, 1 mar. 2011.

KISHOR, R. et al. Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 105012, 1 abr. 2021.

KNEŽEVIĆ, A. et al. The effect of trace elements on wheat straw degradation by *Trametes gibbosa*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 152–156, dez. 2014.

KOSMA, C. I. et al. Assessment of multiclass pharmaceutical active compounds (PhACs) in hospital WWTP influent and effluent samples by UHPLC-Orbitrap MS: Temporal variation, removals and environmental risk assessment. **Environmental Research**, v. 191, p. 110152, 1 dez. 2020.

LIN, J. et al. Environmental impacts and remediation of dye-containing wastewater. **Nature Reviews Earth & Environment**, v. 4, n. 11, p. 785–803, nov. 2023.

LING, Z.-R. et al. Uma lacase extracelular com potente capacidade de descoloração de corantes do fungo da podridão branca *Trametes* sp. LAC-01. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 785–793, 1 nov. 2015.

LORENZO, M. et al. Inibição da atividade da lacase de *Trametes versicolor* por metais pesados e compostos orgânicos. **Chemosphere**, v. 60, n. 8, p. 1124–1128, 1 ago. 2005.

LU, J. et al. Iron-based biochar as efficient persulfate activation catalyst for emerging pollutants removal: A review. **Chinese Chemical Letters**, v. 34, p. 108357, 1 mar. 2023.

MANSOURI, F. et al. Removal of Pharmaceuticals from Water by Adsorption and Advanced Oxidation Processes: State of the Art and Trends. **Applied Sciences**, v. 11, n. 14, p. 6659, jan. 2021.

MARIANO, L. G. et al. Identification and control of wood-deteriorating fungi. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, p. e0082020, 23 out. 2020.

Métodos Padrão para Exame de Água e Esgoto. 21ª Edição, Associação Americana de Saúde Pública/Associação Americana de Obras Hidráulicas/Federação do Meio Ambiente Aquático, Washington DC. APHA, , 2005.

MODKOVSKI, T. A. et al. Simultaneous Removal of Textile Dyes by Adsorption and Biodegradation Using *Trametes villosa* Laccase Immobilized on Magnetic Particles. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, n. 12, p. 512, 10 dez. 2021.

MOFATTO, P. M. B. APLICAÇÃO DE UM BIORREATOR ENZIMÁTICO PARA REMOÇÃO DE FÁRMACOS ANTES DA ETAPA DE CLORAÇÃO FINAL DE UMA ETA. 2020.

MOJTABAVI, S. et al. Bioremoval and biodegradation of ciprofloxacin from hospital wastewater effluent by the efficient and recyclable laccase@hercynite magnetic nanoparticles. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 6, p. 111599, 1 dez. 2023.

MOSLAH, B. et al. Pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater samples in north-eastern Tunisia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18226–18241, 1 jul. 2018.

MOYO, S.; MAKHANYA, B. P.; ZWANE, P. E. Use of bacterial isolates in the treatment of textile dye wastewater: A review. **Heliyon**, v. 8, n. 6, p. e09632, jun. 2022.

NETO, F. S. et al. Research Progress and Trends on Utilization of Lignocellulosic Residues as Supports for Enzyme Immobilization via Advanced Bibliometric Analysis. **Polymers**, v. 15, n. 9, p. 2057, jan. 2023.

NGUYEN, L. N. et al. Laccase–syngaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor: Removal efficiency and effluent toxicity. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 477–484, jan. 2016.

NGUYEN, L. N. et al. A Novel Approach in Crude Enzyme Laccase Production and Application in Emerging Contaminant Bioremediation. **Processes**, v. 8, n. 6, p. 648, jun. 2020.

PAGANINI, W. DA S.; SOUZA, A. DE; BOCCHIGLIERI, M. M. Avaliação do comportamento de metais pesados no tratamento de esgotos por disposição no solo. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 9, p. 225–239, set. 2004.

PANDEY, D. et al. Dye removal from simulated and real textile effluent using laccase immobilized on pine needle biochar. **Journal of Water Process Engineering**, v. 53, p. 103710, 1 jul. 2023.

PRIAC, A.; BADOT, P.-M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, 1 mar. 2017a.

PRIAC, A.; BADOT, P.-M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188–194, 1 mar. 2017b.

RAHMANI, H. et al. Efficient removal of 2,4-dinitrophenol from synthetic wastewater and contaminated soil samples using free and immobilized laccases. **Journal of Environmental Management**, v. 256, p. 109740, 15 fev. 2020.

RESOLUÇÃO CEMA 070/09., 2009. Disponível em: <https://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/2020-09/anexo_7_cema_70-09_padroes_para_o_lancamento_de_efluentes_liquidos.pdf>

RIEDI, H. DE P. et al. Synthesis and Characterization of Laccase Enzyme Aggregates From *Trametes villosa* for Simultaneous Elimination of Rifampicin and Isoniazid. **International Journal of Environmental Research**, v. 16, n. 3, p. 25, 4 abr. 2022.

ROMAN, H. J.; BURGESS, J. E.; PLETSCHE, B. I. Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 963–967, 16 maio 2006.

RORIZ, M. S. et al. Aplicação da abordagem metodológica de superfície de resposta para otimizar a descoloração do Preto Reativo 5 por lacase bruta de *Trametes pubescens*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1, p. 691–696, 30 set. 2009.

SANTOS, C. S. A. DOS. **Síntese de corantes naturais pela oxidação de compostos fenólicos utilizando lacases fúngicas.**

SEMIÃO, M. A. et al. Synergistic treatment of textile wastewaters using spent diatomaceous earth loaded with laccases: A cost-effective and eco-friendly approach. **Journal of Water Process Engineering**, v. 56, p. 104552, 1 dez. 2023.

SENTHILVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Effective bioremoval of syntan using fungal laccase to reduce pollution from effluent. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 7, p. 1429–1440, 1 jul. 2018.

SHARIF, A.; NASREEN, Z.; KALSOOM, R. B. AND S. 8. Microbial degradation of textile industry effluents: A review. **Pure and Applied Biology (PAB)**, v. 9, n. 4, p. 2361–2382, 23 out. 2020.

SILVA, L. O. P. DA; ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. DA R. O uso indiscriminado de antimicrobianos durante a pandemia da COVID-19 como possível fator influenciador da resistência bacteriana em efluentes hospitalares no Brasil. **CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES**, v. 17, n. 3, p. e4360–e4360, 1 mar. 2024.

SILVA, M. C. et al. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). **Química Nova**, v. 35, p. 889–894, 2012.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.

SOBRERO, M.S.; RONCO, A. **Ensayo de Toxicidad aguda con semillas de lechuga. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad del Agua: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.** IDRC, Ottawa, pp. 71–79. Ottawa: [s.n.].

STRONG, P. J.; BURGESS, J. E. Fungal and enzymatic remediation of a wine lees and five wine-related distillery wastewaters. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6134–6142, 1 set. 2008.

SUN, Y. et al. Purification and Characterization of a Thermo- and pH-Stable Laccase From the Litter-Decomposing Fungus *Gymnopus luxurians* and Laccase Mediator Systems for Dye Decolorization. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 3 ago. 2021.

SUTAONEY, P. et al. Feasibility and potential of laccase-based enzyme in wastewater treatment through sustainable approach: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 57, p. 86499–86527, 1 dez. 2022.

SYBUIA, P. A. et al. Aplicação do fungo da podridão branca *Trametes* sp. (C3) lacase na remoção de paracetamol de soluções aquosas. **Journal of Water Process Engineering**, v. 57, p. 104677, 1 jan. 2024.

TOMÉ, L. M. R. et al. Hybrid Assembly Improves Genome Quality and Completeness of *Trametes villosa* CCMB561 and Reveals a Huge Potential for Lignocellulose Breakdown. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 142, fev. 2022.

TRAN, N. H.; URASE, T.; KUSAKABE, O. Biodegradation Characteristics of Pharmaceutical Substances by Whole Fungal Culture *Trametes versicolor* and its Laccase. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 8, n. 2, p. 125–140, 2010a.

TRAN, N. H.; URASE, T.; KUSAKABE, O. Biodegradation Characteristics of Pharmaceutical Substances by Whole Fungal Culture *Trametes versicolor* and its Laccase. **Journal of Water and Environment Technology**, v. 8, n. 2, p. 125–140, 2010b.

UBER, T. Produção De Lacases Por Fungos Da Podridão Branca e Aplicação Na Descoloração Do Corante Verde Malaquita. 1 jan. 2021.

UTZIG, L. M. et al. Resposta de ecotoxicidade do clorpirifós em larvas de *Aedes aegypti* e sementes de *Lactuca sativa* após oxidação UV/H₂O₂ e UVC. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 449–456, 1 mar. 2019.

VAITHYANATHAN, V. K.; VAIDYANATHAN, V. K.; CABANA, H. Laccase-Driven Transformation of High Priority Pesticides Without Redox Mediators: Towards Bioremediation of Contaminated Wastewaters. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 11 fev. 2022.

VILLEGAS, L. G. C. et al. A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. **Current Pollution Reports**, v. 2, n. 3, p. 157–167, 1 set. 2016.

XU, D.-Y.; YANG, Z. Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater. **Chemosphere**, v. 92, n. 4, p. 391–398, 1 jul. 2013.

YAMANAKA, R. et al. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 78–84, mar. 2008.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, n. 2, p. 182–186, fev. 2012.

ZAGUI, G. S. **Antibióticos e bactérias multirresistentes em esgoto e águas superficiais receptoras: riscos da propagação de genes codificadores de ESBL, de carbapenemases e de tolerância aos metais no contexto da saúde única.** Doutorado em Enfermagem em Saúde Pública—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 21 dez. 2022.

ZDARTA, J. et al. Multi-faceted strategy based on enzyme immobilization with reactant adsorption and membrane technology for biocatalytic removal of pollutants: A critical review. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107401, 15 nov. 2019.