



COPPE/UFRJ

CONVERSÃO DO BIOCIDA TRICLOSAN CATALISADA POR ENZIMAS
OXIDATIVAS E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA

Claudinei Fernandes de Melo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadoras: Márcia Walquíria de Carvalho
Dezotti
Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro
Outubro de 2010

CONVERSÃO DO BIOCIDA TRICLOSAN CATALISADA POR ENZIMAS
OXIDATIVAS E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA

Claudinei Fernandes de Melo

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof.^a Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti, D.Sc.

Prof.^a Daniele Maia Bila, D.Sc

Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Júnior, D.Ing.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof.^a Selma Gomes Ferreira Leite, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
OUTUBRO DE 2010

Melo, Claudinei Fernandes de

Conversão do biocida triclosan catalisada por enzimas oxidativas e avaliação da remoção da atividade antibacteriana/ Claudinei Fernandes de Melo. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010.

XX, 137 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadoras: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Daniele Maia Bila

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2010.

Referencias Bibliográficas: p. 125-137.

1. Tratamento enzimático. 2. Micropoluentes. 3. Triclosan. I. Dezotti, Márcia *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Com muito carinho, dedico essa tese a meus pais, meus irmãos, meus sobrinhos e a todos da minha grande família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Márcia Dezotti pelo empenho dedicado ao meu trabalho e pela enorme contribuição ao meu crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora Daniele Bila por toda a ajuda que me deu durante o doutorado.

À minha atual chefe e amiga Rosângela Paranhos, por tudo que fez para que eu pudesse terminar essa tese e por sempre me dizer que sou um “espetáculo”.

Aos professores Geraldo, Tito e Selma por terem aceitado participar dessa banca.

Ao professor Geraldo pela revisão no artigo da HRP.

À minha amiga Amanda pelas discussões sobre os nossos trabalhos, divagações e broncas (imerecidas) durante o período em que trabalhamos juntos.

À Milena que me ensinou o rigor com que os experimentos devem ser realizados.

Ao meu amigo Gustavo pela ajuda para implementar as metodologias analíticas (HPLC-UV e atividade antibacteriana), pelos inúmeros momentos divertidos e principalmente por seu grande exemplo de vida.

Aos amigos do Labpol, João Paulo, Bianca, Bárbara, Bruno, Samanta, Antonio, Simone e Marcela por toda a ajuda ao meu trabalho e pelos momentos sempre agradáveis que me proporcionaram.

Aos amigos do Laboratório de Bioprocessos Carol, Evaldo, Candida, Cláudia e Juliana que sempre quebravam um galho enorme.

À professora Leda que sempre deixou o LECC à disposição.

Às minhas amigas Helena e dona Lourdes que me proporcionaram um lar agradável durante muito tempo.

Às funcionárias da secretaria Paula e Luciana por serem sempre solícitas e cordiais quando precisei.

Às agências de fomento para a pesquisa CAPES, CNPq e FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

CONVERSÃO DO BIOCIDA TRICLOSAN CATALISADA POR ENZIMAS
OXIDATIVAS E AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA

Claudinei Fernandes de Melo

Outubro/2010

Orientadoras: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

Daniele Maia Bila

Programa: Engenharia Química

Triclosan é um biocida empregado em produtos de uso pessoal e sua presença em corpos d'água tem sido relatada em diversos países. Suspeita-se que esse composto esteja relacionado com o desenvolvimento de resistência em bactérias no ambiente aquático. Foram utilizadas as enzimas peroxidase de raiz-forte (HRP) e lacase de *Trametes versicolor* para catalisar a conversão de triclosan dissolvido em água ultrapura. O processo catalisado por HRP se mostrou mais apropriado para uma possível aplicação ao tratamento de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE), visto que a faixa de pH em que a conversão de triclosan foi máxima (6-7) está dentro da faixa de pH desses efluentes (6,5-7,5), que a conversão foi minimamente influenciada pela temperatura na faixa de 20-25 °C e que a eficiência catalítica da HRP foi superior à da lacase. A razão estequiométrica entre triclosan e H₂O₂ (de 0,83) foi maior do que o valor previsto (de 0,5) pelo ciclo catalítico da HRP. Um estudo cinético demonstrou que a atividade da HRP foi gradualmente reduzida durante a reação, provavelmente devido ao excesso de H₂O₂. A atividade antibacteriana da solução de triclosan foi significativamente reduzida pelo processo catalisado por HRP. Esse processo foi capaz de catalisar a conversão de triclosan em água ultrapura em concentrações similares àquelas em que é encontrado em matrizes ambientais aquosas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

CONVERSION OF THE BIOCIDES TRICLOSAN CATALYZED BY OXIDATIVE
ENZYMES AND EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY
REMOVAL

Claudinei Fernandes de Melo

October/2010

Advisors: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti
Daniele Maia Bila

Department: Chemical Engineering

Triclosan is an antimicrobial employed in personal care products and its presence in water bodies has been reported in several countries. This compound is suspected to be linked with the emergence of resistance in bacteria. The enzymes horseradish peroxidase (HRP) and laccase from *Trametes versicolor* were used to catalyze the conversion of triclosan in ultrapure water. The HRP-catalyzed process was the most appropriated for a future application to the treatment of effluents from sewage treatment plants (STP), since the pH of the maximum conversion of triclosan (6-7) was within the pH range of these effluents, the conversion was minimally influenced by temperature in the temperature range of 20-25 °C and, moreover, the catalytic efficiency of HRP was higher than that of laccase. The stoichiometric ratio between triclosan and H₂O₂ (0.83) was higher than the value predicted (0.5) by the catalytic cycle of peroxidases. A kinetic study showed that HRP has affinity for triclosan similar to that reported for laccase. HRP activity was gradually reduced during the enzymatic reaction probably due to excess H₂O₂. The antibacterial activity of triclosan solution was effectively reduced by the HRP-catalyzed process. This process has proved to be technically feasible for removing triclosan from ultrapure water at concentrations similar to those reported in environmental aqueous matrices.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Micropoluentes em ambientes aquáticos	4
3.2 O biocida triclosan.....	4
3.3 Propriedades físico-químicas do triclosan.....	6
3.4 Mecanismo de ação do triclosan	6
3.5 Ocorrência de triclosan em matrizes ambientais.....	7
3.6 Efeitos negativos relacionados com a presença de triclosan em ambientes aquáticos	8
3.7 Desenvolvimento de resistência bacteriana no ambiente aquático	10
3.8 Mecanismos de resistência ao triclosan	12
3.9 Processos de tratamento empregados na remoção do triclosan	16
3.10 Processos enzimáticos de tratamento.....	17
3.10.1 <i>Peroxidase de raiz-forte (HRP)</i>	<i>18</i>
3.10.2 <i>Lacases.....</i>	<i>26</i>
3.10.3 <i>Fatores que influenciam reações catalisadas pela lacase e pela HRP ..</i>	<i>33</i>
3.10.3.1 <i>Dosagem inicial de enzima.....</i>	<i>33</i>
3.10.3.2 <i>pH.....</i>	<i>34</i>
3.10.3.3 <i>Temperatura.....</i>	<i>35</i>
3.10.3.4 <i>Concentração do acceptor final de elétrons</i>	<i>36</i>
3.10.3.5 <i>Presença de substâncias que reduzem a inativação da enzima.....</i>	<i>37</i>
3.10.3.6 <i>Uso de mediadores-redox.....</i>	<i>38</i>
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Materiais.....	40
4.2 Avaliação da pureza e determinação do teor de proteínas das enzimas comerciais	42
4.3 Conversão de triclosan catalisada por lacase.....	43
4.3.1 <i>Determinação da atividade enzimática</i>	<i>44</i>
4.3.2 <i>Avaliação dos principais fatores que influenciam as reações catalisadas por lacase.....</i>	<i>45</i>

4.3.3	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos K_m, V_{max} e k_{cat}</i>	45
4.4	Conversão de triclosan catalisada por HRP	47
4.4.1	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	47
4.4.2	<i>Determinação de H_2O_2 durante a cinética de conversão de triclosan</i> ...	49
4.4.3	<i>Avaliação dos principais parâmetros que influenciam a conversão de triclosan catalisada pela HRP</i>	50
4.4.4	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos K_m, V_{max} e k_{cat}</i>	54
4.4.5	<i>Conversão de triclosan em concentração ambientalmente relevante</i>	54
4.5	Determinação da concentração de triclosan	58
4.6	Determinação da atividade antibacteriana	59
4.6.1	<i>Preparo das culturas de estoque</i>	59
4.6.2	<i>Preparo das culturas de trabalho e do pré-inóculo</i>	60
4.6.3	<i>Diluição das amostras e ensaio</i>	61
4.6.4	<i>Análise dos dados</i>	70
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	Avaliação da pureza, estimativa da massa molecular e determinação da atividade da lacase comercial	76
5.2	Avaliação da pureza, estimativa da massa molecular e determinação da atividade da HRP comercial	78
5.3	Comparação dos processos catalisados pela lacase e pela HRP em relação às faixas de pH e temperatura em que atuam	80
5.4	Comparação dos processos catalisados pela lacase e pela HRP em relação aos parâmetros cinéticos K_m, V_{max} e k_{cat}/k_m	88
5.5	Comparação entre as dosagens mínimas de enzima para atingir determinada conversão	91
5.6	Cinéticas de conversão do triclosan catalisada pela HRP	94
5.7	Determinação da relação estequiométrica entre H_2O_2 e triclosan	97
5.8	Conversão de triclosan catalisada pela HRP em presença de mediador-redox 100	
5.9	Avaliação da atividade antibacteriana	103
5.9.1	<i>Adaptação do método de macrodiluição de Suarez et al. (2007)</i>	103
5.9.2	<i>Avaliação da remoção da atividade antibacteriana</i>	111
5.9.3	<i>Avaliação da atividade antibacteriana dos mediadores-redox</i>	113
5.10	Conversão de triclosan em concentração ambientalmente relevante	117
6.	CONCLUSÕES	122

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	124
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1. Diferentes micropoluentes com anel fenólico convertidos pelo tratamento com HRP em estudos apresentados na literatura.....	22
Tabela 3.2. Conversões de estrogênios e avaliação da remoção da atividade estrogênica após o tratamento com HRP de uma mistura equimolar de E1, E2, E3 e EE2 em concentrações ambientalmente relevantes. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: pH 8, 25°C e razão molar H ₂ O ₂ -substrato de 0,5.	25
Tabela 3.3. Diferentes micropoluentes com anel fenólico convertidos pelo tratamento com lacase em estudos apresentados na literatura.	29
Tabela 3.4. Conversões de estrogênios e da atividade estrogênica após o tratamento com lacase de uma mistura equimolar de E1, E2, E3 e EE2 em concentrações ambientalmente. Os experimentos foram realizados em pH 7,0 e 25°C.....	32
Tabela 4.1. Principais características das enzimas lacase e HRP comercializadas pela Sigma-Aldrich.....	42
Tabela 4.2. Condições dos experimentos utilizados para avaliar o efeito dos principais parâmetros (pH, temperatura, razão molar [H ₂ O ₂]/triclosan, dose de HRP, tempo de reação e presença de mediador) da conversão de triclosan catalisada por HRP. A concentração inicial de triclosan foi de 20 µmol.L ⁻¹	51
Tabela 4.3. Fatores de diluição da amostra nos poços da microplaca após a diluição serial 2:1 seguindo o procedimento I.....	65
Tabela 4.4. Fatores de diluição da amostra nos poços da microplaca após a diluição serial 2:1 seguindo o procedimento II.	69
Tabela 5.1. Valores dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m da conversão de triclosan catalisada pela lacase e pela HRP.	90
Tabela 5.2. ANOVA para o ajuste do modelo logístico à curva dose-resposta do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana seguindo o procedimento I.	108
Tabela 5.3. ANOVA para o ajuste do modelo dose-resposta à curva do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana seguindo o procedimento I.	110
Tabela 5.4. Concentrações residuais de triclosan após o tratamento com três valores diferentes de atividade inicial de HRP. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 25°C, razão molar H ₂ O ₂ /triclosan de 1,5 e 5 h de reação.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Fórmula estrutural do triclosan.	5
Figura 3.2. Comparação das estruturas químicas do biocida triclosan, do composto estrogênico bisfenol-A e do hormônio da tireóide tiroxina.	10
Figura 3.3. Ilustração esquemática do funcionamento das bombas de efluxo da família RND. O antibiótico que está no meio externo atravessa as membranas externa e interna, passando pelo espaço periplasmático. Por meio da translocase na membrana citoplasmática, o antibiótico (ou biocida) é retirado do citoplasma e sai da célula passando pela proteína de fusão e do canal de proteínas. Adaptado de Aeschlimann (2003).	15
Figura 3.4. A) Grupo prostético heme das peroxidases; B) Estrutura tridimensional da HRP mostrando o grupo heme (de cor vermelha) no sítio ativo da molécula entre dois átomos de cálcio (esferas azuis). Extraído de Veitch (2004).	19
Figura 3.5. Ciclo catalítico das peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e a inativação da enzima. A enzima é inicialmente oxidada por H_2O_2 , gerando o composto I, que oxida um substrato fenólico. O composto II formado oxida outro substrato, e com isso a enzima retorna ao seu estado nativo. A peroxidase pode ser convertida em formas inativas por meio da reação do composto II com H_2O_2 , formando composto III, da reação de composto I com H_2O_2 , formando proteínas verde-heme (P-670) ou por meio do ataque de radicais livres resultando no composto III. Adaptado de Wesenberg <i>et al.</i> (2003) e Hong-Mei e Nicell (2008).	20
Figura 3.6. Estrutura tridimensional da lacase de <i>Trametes versicolor</i> mostrando os átomos de cobre (esferas verdes) do sítio ativo. D1, D2 e D3 são os domínios 1, 2 e 3 da proteína, respectivamente. COOH é o grupo carboxil livre e NH_2 o grupo amino livre das extremidades da proteína. Extraído de Piontek (2002).	26
Figura 3.7. Modelo do sítio catalítico da lacase de <i>Trametes versicolor</i> mostrando os centros de cobre T1, T2 e T3. Os resíduos de aminoácidos histidina (His), cisteína (Cys) e fenilalanina (Phe) estão coordenados com os núcleos de cobre. Extraído de Riva (2006).	27
Figura 3.8. Ciclo catalítico das lacases. Adaptado de Riva (2006).	28
Figura 3.9. Mecanismo de ação dos mediadores-redox. AFE e AFE _{red} : acceptor final de elétrons em seus estados oxidado e reduzido; E e E _{oxid} : enzima em seus estados reduzido e oxidado; S e S _{oxid} : substrato em seus estados reduzido e oxidado; M e M _{oxid} : mediador-redox em seus estados reduzido e oxidado; NS e NS _{oxid} : composto não-substrato em seus estados reduzido e oxidado, respectivamente; P: produtos.	39

Figura 4.1. Reator batelada com temperatura controlada por um banho térmico utilizado nas reações enzimáticas para determinação dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e k_{cat}	46
Figura 4.2. Correlação entre as unidades de atividade medida com fenol/AAP e atividade medida com ABTS.....	49
Figura 4.3. Estruturas químicas dos mediadores redox siringaldazina, catecol, ácido <i>p</i> -coumárico, protocatecuato (DHBE), siringaldeído, álcool veratrílico e ácido sirínico.	53
Figura 4.4. Fluxograma mostrando as etapas do procedimento experimental utilizado na conversão de triclosan catalisada por HRP em uma concentração ambientalmente relevante.	56
Figura 4.5. Aparato experimental utilizado para a extração em fase sólida das amostras de triclosan em concentração ambientalmente relevante.....	57
Figura 4.6. Fluxograma mostrando as etapas do procedimento experimental utilizado na extração em fase sólida (EFS) das amostras de triclosan em concentração ambientalmente relevante.	58
Figura 4.7. Sequência das etapas utilizadas na reidratação da cepa de <i>E. coli</i> K12 liofilizada da ATCC e na preparação das culturas de estoque.....	60
Figura 4.8. Procedimento I utilizado na diluição serial 2:1. (A) 100 μ L de tampão fosfato são adicionados nos poços de A2 a H12; (B) 300 μ L da amostra foram transferidos para os poços da coluna 1; (C) 200 μ L são simultaneamente transferidos dos poços da coluna 1 para os poços adjacentes da coluna 2, homogeneizados, e transferidos da coluna 2 para a 3 e, assim sucessivamente, até a coluna 11; (D) 200 μ L são descartados dos poços da coluna 11.....	63
Figura 4.9. Procedimento II utilizado na diluição serial 2:1 da amostra para o ensaio de atividade antibacteriana. (A) 100 μ L de tampão fosfato são transferidos para os poços de A2 a B12, de C2 a C12, de E2 a E12 e de G2 a G12; (B) 300 μ L da amostra são transferidos para os poços A1, C1, E1 e G1; (C) 200 μ L do poço A1 são transferidos para o poço A2, homogeneizado, e assim sucessivamente até o poço A12; o procedimento é repetido para as fileiras C, E e G; (D) 100 μ L de tampão são transferidos para os poços das fileiras B, D, F e H.....	67
Figura 4.10. Interpretação gráfica dos parâmetros I_{min} , I_{max} , FD50 e H do modelo sigmoidal ajustado a uma curva dose-resposta do ensaio de atividade antibacteriana.	71
Figura 5.1. Fluxograma ilustrando a sequência das etapas executadas na caracterização das enzimas comerciais, na seleção da enzima para conversão de triclosan e nos demais estudos realizados com a enzima selecionada.	75

- Figura 5.2. Foto do gel obtido da SDS-PAGE da lacase de *Trametes versicolor* comercializada pela Sigma-Aldrich e dos padrões de massa molecular em duplicata. As elipses em preto destacam as bandas da lacase. 76
- Figura 5.3. Relação quadrática entre o logaritmo da distância percorrida pelos padrões de massa molecular na corrida eletroforética ($\log d$) e o logaritmo de suas respectivas massas moleculares ($\log M_r$). O tracejado indica o logaritmo da distância percorrida pela lacase e a estimativa do logaritmo de sua massa molecular. 77
- Figura 5.4. Foto do gel obtido da SDS PAGE da HRP da Sigma-Aldrich em duplicata e dos padrões de massa molecular da BIO-RAD. As elipses em vermelho destacam as três bandas com melhor definição das corridas em duplicata da HRP. 78
- Figura 5.5. Relação quadrática entre o logaritmo da distância percorrida pelos padrões na corrida eletroforética ($\log d$) e o logaritmo de suas respectivas massas moleculares ($\log M_r$). Os tracejados indicam a faixa que compreende os logaritmos das distâncias percorridas pelas três bandas definidas da HRP e as respectivas estimativas dos logaritmos de suas massas moleculares. 79
- Figura 5.6. Concentrações residuais de triclosan após tratamento com lacase ativa (c/lac pH 5,0) e lacase inativa (c/lac pH 2,0) na ausência de luz ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 360 min e 0,8 U/mL). Experimentos-controle foram realizados agitando-se soluções de triclosan sem lacase e com luz (s/lac; c/luz) e sem lacase e sem luz (s/lac; s/luz). 81
- Figura 5.7. Efeito do pH na conversão de triclosan catalisada por lacase a 25 °C. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 60 min e 0,5 U/mL de lacase. 83
- Figura 5.8. Efeito do pH na atividade da lacase usando siringaldazina como substrato colorimétrico a 25 °C. Atividade relativa (%) é a atividade enzimática normalizada em relação ao seu valor máximo em pH 5. As reações foram realizadas com 1 mmol.L^{-1} de siringaldazina, em tampão citrato-fosfato... 84
- Figura 5.9. Efeito do pH na conversão de triclosan catalisada por HRP a 25 °C. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições reacionais: $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 0,1 U/mL de HRP, 60 min de reação e razão molar $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{triclosan}]$ de 1,5. 85
- Figura 5.10. Efeito da temperatura na conversão de triclosan catalisada por lacase. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 0,5 U/mL, 60 min e pH 5,0. 86
- Figura 5.11. Efeito da temperatura na conversão de triclosan catalisada por HRP. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 0,1 U/mL de HRP, 60 min de reação, 200 rpm, pH 7 e razão molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{triclosan}$ de 1,5. 87

- Figura 5.12. Gráfico de Lineweaver-Burk para a conversão de triclosan catalisada por lacase. As condições reacionais utilizadas foram as seguintes: 3,0 U/mL de lacase, tempo máximo de reação de 210 s, pH 5,0 e 25 °C. 88
- Figura 5.13. Gráfico de Lineaweaver-Burk para a conversão do triclosan catalisada pela HRP. As condições reacionais utilizadas foram: 1,0 U/mL de HRP, pH 7, tempo máximo de reação de 180 s, 25 °C e razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5. 89
- Figura 5.14. Determinação da concentração mínima de enzima para atingir a máxima conversão detectável (97%), com 6 h de reação a 25 °C, de uma solução de triclosan de 20 μmol.L⁻¹. As reações com HRP foram realizadas em pH 7 e com uma razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5, e as reações com lacase em pH 5. 92
- Figura 5.15. Efeito da atividade inicial de HRP na taxa de conversão do triclosan. Os experimentos foram realizados com uma concentração inicial de triclosan de 20 μmol.L⁻¹, razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5, em pH 7 e 25 °C..... 94
- Figura 5.16. Cinéticas de conversão de triclosan catalisada por HRP, de consumo de H₂O₂ e redução da atividade catalítica. Os experimentos foram realizados com uma concentração inicial de triclosan de 20 μmol.L⁻¹, 1,0 U/mL de HRP, pH 7, 25 °C e razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5..... 96
- Figura 5.17. Determinação da proporção estequiométrica entre triclosan e H₂O₂ na conversão catalisada por HRP. As condições reacionais utilizadas foram: 20 μmol.L⁻¹ de triclosan, 1 U/mL de HRP, 120 min de reação, pH 7 e 25 °C. 99
- Figura 5.18. Conversões de triclosan catalisadas pela enzima HRP na ausência de mediador-redox (CONT) e na presença de siringaldazina (SIRN), catecol (CATE), 3,4-dihidroxibenzoato de etila (DHBE), ácido siríngico (SIRC), ácido *p*-coumárico (COUM), álcool veratrílico (VERA) e siringaldeído (SIRD) na razão molar mediador/triclosan de 1,0. Os experimentos foram realizados com uma concentração inicial de triclosan de 20 μmol.L⁻¹, 0,1 U/mL de HRP, 60 min de reação, pH 7, 25 °C e razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5. 101
- Figura 5.19. Curva dose-resposta do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana utilizando o procedimento II para microdiluição. Amostra: solução de triclosan de 0,8 μmol.L⁻¹ em tampão-fosfato 1 mmol.L⁻¹ pH 8. Condições do ensaio: 8 h de incubação a 37 °C e 200 rpm, densidade inicial do inóculo de 5 × 10⁵ UFC/mL. O intervalo de cada ponto representa ±1 desvio-padrão. A linha representa o modelo logístico ajustado aos dados. 105
- Figura 5.20. Foto da microplaca do ensaio de atividade antibacteriana com *E. coli* K12, após 8 h de incubação (37 °C e 200 rpm) para uma solução de triclosan de 0,8 μmol.L⁻¹ que foi diluída por meio do procedimento I. Da esquerda para a direita estão as colunas de 1 até 12, e de cima para baixo, estão as fileiras de A até H. 106

- Figura 5.21. Curva dose-resposta do triclosan obtida no ensaio de atividade antibacteriana utilizando o procedimento I para microdiluição. Amostra: solução de triclosan de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão-fosfato 1 mmol.L^{-1} , pH 8. Condições do ensaio: 8 h de incubação, a 37°C e 200 rpm, e densidade inicial do inóculo de 5×10^5 UFC/mL. O intervalo de cada ponto representa ± 1 desvio-padrão. A linha representa o modelo logístico ajustado aos dados. 107
- Figura 5.22. Curva dose-resposta do triclosan obtida no ensaio de atividade antibacteriana utilizando o procedimento I para microdiluição. Amostra: solução de triclosan $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão-fosfato pH 8, 1 mmol.L^{-1} . Condições do ensaio: 8 h de incubação a 37°C e 200 rpm, densidade inicial do inóculo de 5×10^5 UFC/mL. O intervalo de cada ponto representa ± 1 desvio-padrão. A linha representa o modelo dose-resposta ajustado aos dados. 109
- Figura 5.23. Curvas dose-resposta da solução de HRP de $0,75 \text{ U/mL}$ e da solução de triclosan ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) não-tratada e tratada com HRP. As condições do tratamento foram as seguintes: $0,75 \text{ U/mL}$ de HRP, pH 7, 6 h, 25°C e razão molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{triclosan}$ de 1,5. Antes do ensaio, as soluções foram diluídas $25 \times$ com tampão fosfato pH 8. 112
- Figura 5.24. Curvas dose-resposta, no ensaio de atividade antibacteriana, dos mediadores-redox: catecol (A), protocatecuato (B), ácido siríngico (C) e siringaldeído (D). A concentração das soluções de mediador foi a mesma o utilizada nas reações enzimáticas ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, antes do ensaio, essas soluções foram diluídas $25 \times$ 114
- Figura 5.25. Curvas dose-resposta, no ensaio de atividade antibacteriana, do triclosan (A) e dos mediadores-redox: siringaldazina (B), ácido *p*-coumárico (C) e álcool veratrílico (D). A concentração das soluções de mediador foi a mesma o utilizada nas reações enzimáticas ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, antes do ensaio, essas soluções foram diluídas $25 \times$ 115
- Figura 5.26. Estimativas das potências antibacterianas relativas dos mediadores-redox no ensaio de atividade antibacteriana. A concentração de mediador nas soluções foi de 800 nmol.L^{-1} e, após a diluição serial e adição de inóculo, a faixa de concentrações “in vitro” foi de 13,6 a 400 nmol.L^{-1} . O limite de detecção da curva dose-resposta do triclosan foi de 22 nmol.L^{-1} 116

LISTA DE ABREVIATURAS

A.E.:	atividade enzimática
AAP:	4-aminoantipirina
ABTS:	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
ABTS ^{o+} :	radical cátion ABTS
ANOVA:	análise de variância estatística
ATCC:	American Type Collection Culture
ATP:	trifosfato de adenosina
c/:	com
CAS:	Chemical Abstracts Service
CATE:	catecol
cc:	centímetro cúbico
CE50:	concentração que provoca 50% de inibição em relação ao controle negativo
CLAE-EM:	cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massas
ϵ :	coeficiente de extinção molar
CONT:	experimento controle com enzima e sem mediador-redox
COUM:	ácido p-coumárico
Da:	Unidade de massa atômica Dalton, equivalente à massa de um átomo de ¹ H
DHBE:	3,4-dihidroxibenzoato de etila
DQO:	demanda química de oxigênio
E1:	estrona
E2:	17 β -estradiol
E3:	estriol
EC:	número EC (Enzyme commission)
EE2:	17 α -etinilestradiol
EPR:	ressonância magnética eletrônica
ETE:	estação(ões) de tratamento de efluentes
FabI:	enzima enoil-[proteína carreadora de acila] reductase
F_{calc} :	valor de F calculado
F_{crit} :	valor de F tabelado
FD:	fator de diluição

FD50:	fator de diluição que provoca 50% de inibição em relação ao controle negativo
FDA:	US Food and Drug Administration (agência governamental dos Estados Unidos que regula a liberação da venda de medicamentos e alimentos)
GL:	número de graus de liberdade
<i>H</i> :	coeficiente adimensional de Hill
H ₂ O ₂ /triclosan:	razão entre as concentrações molares de H ₂ O ₂ e triclosan
HBT:	1-hidroxibenzotriazol
HPLC:	cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-UV:	cromatografia líquida acoplada a detecção por ultravioleta
HRP:	enzima peroxidase de raiz-forte
<i>I</i> :	inibição do crescimento em porcentagem
<i>I</i> _{max} :	inibição máxima prevista pelo modelo sigmoidal
<i>I</i> _{min} :	inibição mínima prevista pelo modelo sigmoidal
InhA:	enzima enoil-[proteína carreadora de acila] redutase
<i>k</i> :	constante cinética de decaimento de primeira-ordem
<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m :	eficiência catalítica de uma reação enzimática
<i>k</i> _{cat} :	número de turnover de uma enzima
<i>K</i> _m :	constante de Michaelis-Menten para um dado substrato
<i>K</i> _{ow} :	coeficiente de partição octanol-água
lac:	lacase
LD:	limite de detecção
LQ:	limite de quantificação
mediador/triclosan:	razão entre as concentrações molares de mediador-redox e triclosan
M-H:	Müeller-Hinton
µg:	micrograma (1×10^{-6} g)
MQ:	média quadrática
<i>M</i> _r :	massa molecular
NAD ⁺ :	nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada
NADH:	nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
ng:	nanograma (1×10^{-9} g)
PEG:	polietilenoglicol
POA	Processos oxidativos avançados
pK _a :	logaritmo do inverso da constante de ionização de um ácido
R ² :	coeficiente de determinação

RND:	bombas de efluxo da família resistência-nodulação-divisão celular
rpm:	rotações por minuto
s/:	sem
S:	concentração de substrato em um dado instante
S_0 :	concentração inicial de substrato
SDS-PAGE:	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio
SIRC:	ácido sirínico
SIRD:	siringaldeído
SIRN:	siringaldazina
S_{\min} :	concentração de substrato para um tempo $t \rightarrow \infty$
SQ:	somas quadráticas
TCS:	triclosan
[triclosan]:	concentração de triclosan em mol/L
U:	unidade de atividade enzimática
$U_{\text{PhOH/AAP}}$	unidade de atividade de HRP medida por meio do ensaio com fenol e 4-aminoantipirina
U_{ABTS}	unidade de atividade de HRP medida por meio do ensaio com ABTS
UFC:	unidades formadores de colônia
VERA:	álcool veratrílico
V_{\max} :	velocidade máxima

1. INTRODUÇÃO

Durante as três últimas décadas, as pesquisas sobre a poluição aquática se concentraram, quase exclusivamente, em poluentes prioritários convencionais, tais como bifenilas policloradas, metais pesados, hidrocarbonetos poliaromáticos, DDT e seus derivados, dioxinas, pesticidas, entre outros. Hoje, esses poluentes são menos relevantes na maioria dos países desenvolvidos, visto que as emissões foram substancialmente reduzidas por meio da adoção de medidas legais apropriadas e a eliminação de muitas fontes de poluição.

Além disso, nos últimos 15 anos, o desenvolvimento de metodologias analíticas cada vez mais sensíveis e sua aplicação em monitoramento de amostras ambientais levaram à identificação de diversas substâncias, originadas do uso doméstico, presentes em rios, lagos, efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e água de abastecimento urbano, em concentrações tão baixas como alguns nanogramas por litro, os chamados micropoluentes. Alguns desses poluentes possuem atividade biológica em concentrações muito baixas como os desreguladores endócrinos e os antimicrobianos. Essa constatação tem gerado preocupação em grande parte da população e pesquisadores da área ambiental de países da Europa e dos EUA e, com isso, as pesquisas relacionadas com micropoluentes vêm ganhando cada vez mais destaque nesses países.

Considerando a possibilidade de uma ampla variedade de efeitos desconhecidos e riscos potenciais, a poluição por essas substâncias, que podem ter as fontes de água para abastecimento como receptáculos finais, deve ser mitigada. Tanto é que o princípio da precaução, delineado pela Comunidade Européia em relação à qualidade das águas de abastecimento, exige remoção eficiente de quaisquer substâncias que sejam potencialmente prejudiciais, mesmo que não haja uma clara relação entre sua ocorrência e efeitos negativos no ambiente aquático (TERNES *et al.*, 2004).

No entanto, as tecnologias atualmente empregadas no tratamento de esgoto doméstico e de águas de abastecimento não são eficientes na remoção de substâncias com atividade biológica a níveis abaixo dos quais seus efeitos não sejam observados. Esse fato torna relevante o desenvolvimento de processos de tratamento mais apropriados. Nesse sentido, diversos processos têm sido avaliados, tais como cloração,

ozonização, processos oxidativos avançados (POA), adsorção em carvão ativado, biorreatores com membrana, entre outros. No entanto, a remoção de micropoluentes por esses processos de tratamento não é seletiva e, por isso, sua eficiência é reduzida quando aplicados em matrizes complexas, nas quais esses poluentes estão em concentrações (da ordem ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$, juntamente com outros compostos orgânicos em concentrações muito maiores. Além disso, a oxidação não seletiva, por meio dos processos de cloração, ozonização e POA, dos diversos compostos orgânicos presentes em efluentes de ETE, pode dar origem a compostos cujos efeitos biológicos e toxicidade são desconhecidos. Nesse aspecto, os tratamentos enzimáticos são superiores a esses processos, devido a sua habilidade de converter poluentes de modo seletivo e por meio de reações ambientalmente benignas. Entre as enzimas utilizadas na conversão de compostos orgânicos, destacam-se as enzimas lacase e peroxidase de raiz-forte (HRP), pois catalisam a conversão de compostos recalcitrantes com estruturas químicas diferentes, mas preferencialmente os com grupo fenol, em oligômeros com mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade reduzidas.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal foi avaliar os processos catalisados por lacase e por HRP na conversão de triclosan em solução aquosa visando à remoção da atividade antibacteriana e os objetivos específicos foram:

- Avaliar isoladamente o efeito da temperatura e do pH nas taxas de conversão de triclosan;
- Determinar as afinidades pelo substrato triclosan e as eficiências catalíticas das enzimas;
- Determinar a dose mínima de enzima em cada processo para atingir uma taxa de conversão estabelecida;
- Realizar mais estudos com o processo enzimático que apresentar melhor desempenho catalítico, que requerer menor dosagem de enzima para atingir uma taxa de conversão estabelecida e que se mostrar mais apropriado para converter triclosan nas faixas de pH e temperatura dos efluentes de ETE. Esses estudos visam: (i) determinar a relação estequiométrica entre substrato e acceptor final de elétrons, (ii) avaliar o efeito da dose de enzima nas taxas de conversão (iii) avaliar a inativação durante a conversão de triclosan, (iv) selecionar mediadores-redox com baixa atividade antibacteriana que promovam aumento na taxa de conversão de triclosan, (v) avaliar a remoção da atividade antibacteriana após o tratamento enzimático e (vi) avaliar o desempenho da enzima em catalisar a conversão do biocida em uma concentração ambientalmente relevante.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Micropoluentes em ambientes aquáticos

Mais de um terço da água doce renovável e acessível do planeta é usado em atividades domésticas, industriais e agrícolas. A maioria dessas atividades leva à poluição das águas com a introdução de inúmeras substâncias presentes em solventes, produtos petroquímicos, detergentes, fármacos, hormônios sintéticos e naturais, produtos de uso pessoal, entre outros. Assim, não é de se admirar que a poluição das águas naturais se tornasse hoje questão de interesse público em muitos países.

A fonte, comportamento e tratamento de macropoluentes (que ocorrem em concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$ a mg/L) como ácidos, sais, nutrientes e matéria orgânica são relativamente bem conhecidas. No entanto, avaliar o impacto de micropoluentes (em concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$ a ng/L) no ambiente aquático é uma tarefa difícil que requer ferramentas avançadas de modelagem e técnicas analíticas para avaliar a ocorrência em matrizes ambientais, biodisponibilidade e efeitos biológicos desses poluentes isolados e em presença de outros compostos. Métodos para avaliar o potencial de substâncias químicas causarem danos à saúde humana também devem ser refinados. Além disso, tecnologias de mitigação para reduzir o impacto de micropoluentes, bem como as estratégias para minimizar sua introdução no meio ambiente ainda exigem desenvolvimentos (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006).

Entre os diversos micropoluentes encontrados em matrizes ambientais, destaca-se a classe dos antibióticos e biocidas visto que apresentam atividade biológica em concentrações extremamente baixas. Além disso, a ocorrência dessas substâncias pode estar relacionada com o desenvolvimento de resistência em microrganismos expostos (LIU, 2008).

3.2 O biocida triclosan

O triclosan (2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenil éter), conhecido comercialmente como Irgasan ou Irgacare, é um composto capaz de inibir o crescimento de fungos, vírus e principalmente bactérias (SCHWEIZER, 2001). Sua molécula possui um grupo fenol e átomos de cloro substituídos, conforme mostrado na Figura 3.1. Em baixas

concentrações, o triclosan atua como bacteriostático, inibindo o crescimento de bactérias, e em elevadas concentrações como um bactericida, inativando as bactérias por meio do rompimento da parede celular (AIELLO *et al.*, 2007).

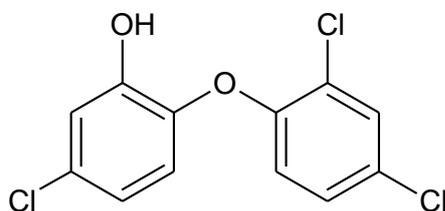


Figura 3.1. Fórmula estrutural do triclosan.

Cabe aqui fazer uma distinção entre antibiótico e biocida. Antibiótico é um agente quimioterápico que inibe um alvo específico dentro de uma *via* biossintética na célula, e é usado para tratar infecções bacterianas ou fúngicas em seres humanos e animais. Por outro lado, biocida é um composto com atividades antisséptica, desinfetante e/ou preservativa, que é utilizado para desinfecção de superfícies de ambientes contaminados, de peles e mucosas, prevenindo ou limitando infecções bacterianas, entre outros. Os biocidas, em altas concentrações, atuam em diversos alvos na célula, podendo ser muito mais seletivos, atuando em alvos específicos, em baixas concentrações (RUSSEL, 2003).

Triclosan é utilizado na formulação de uma ampla variedade de produtos de uso pessoal, como sabonetes antissépticos, desodorantes, cremes dentais, cosméticos, utensílios de cozinha, brinquedos infantis, tecidos, plásticos, entre outros (SCHWEIZER, 2001). Na medicina, esse composto é utilizado na erradicação de resistência a metilina em *Staphylococcus aureus*, na desinfecção da pele e feridas e na higiene oral para o controle de placa bacteriana e gengivite. O triclosan tem se mostrado efetivo quando utilizado de forma apropriada, como por exemplo, em hospitais para prevenir infecções hospitalares (LARSON *et al.*, 2004). No entanto, não existem dados que demonstrem quaisquer benefícios adicionais da adição de triclosan em produtos de uso pessoal. De acordo com um levantamento de estudos da literatura científica sobre o uso de triclosan para prevenção de infecções (AIELLO *et al.*, 2007), sabonetes comuns e antissépticos (com triclosan entre 0,1 e 0,45% m/v) possuem a mesma eficácia na prevenção de infecções comuns nos sistemas gastrointestinais e respiratórios e de

dermatites.

3.3 Propriedades físico-químicas do triclosan

Triclosan possui massa molecular de 289,54 g/mol, é pouco solúvel em águas (12 mg/L a 20 °C), exceto em pH alcalino, e possui elevada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos. Apresenta estabilidade térmica elevada, o que permite sua incorporação em vários materiais plásticos (SCHWEIZER, 2001). É um composto não ionizável em pH neutro (pKa de 8,1) e relativamente não volátil, com uma pressão de vapor de 4×10^{-6} mmHg (ORVOS *et al.*, 2002). Possui um coeficiente de partição octanol-água relativamente alto (log *Kow* de 5,4), o que sugere que, na forma protonada, esse composto possa ser sorvido em sedimentos de ambientes aquáticos (SINGER *et al.*, 2002).

Com base nesses dados, é de se esperar que triclosan tenha baixa mobilidade em solos e que não se volatilize a partir do solo (úmido ou seco) ou de águas de superfície. Em ambientes aquáticos, triclosan pode se sorver em superfície de sólidos suspensos e sedimentos e pode bioacumular em tecidos de organismos, causando efeitos nocivos aos organismos expostos.

3.4 Mecanismo de ação do triclosan

Embora a atividade bactericida do triclosan envolva múltiplos alvos celulares, diversos estudos têm mostrado que, em concentrações sub-letais, esse composto inibe a biossíntese de ácidos graxos em bactérias, por meio da inibição da enzima enoil-[proteína carreadora de acila] redutase (FabI) (YAZDANKHAH *et al.*, 2006). A FabI, uma enzima dependente de NADH, é um alvo atrativo para antibacterianos devido à importância da biossíntese de ácidos graxos para o crescimento e funcionamento de células bacterianas. A inibição dessa via afeta as outras vias biossintéticas dependentes como as de fosfolípidos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos, que constituem a parede celular (HEATH *et al.*, 1999; NELSON e COX, 2004).

A ligação do triclosan com a enzima FabI aumenta significativamente a afinidade da enzima pelo NAD⁺. A análise da estrutura cristalina de raios-X do complexo FabI-NAD⁺-triclosan confirma que ligações de hidrogênio e interações

hidrofóbicas entre triclosan, resíduos de aminoácidos da enzima e o cofator NAD^+ contribuem para a formação de um complexo ternário estável. Nesse complexo, o triclosan se liga de modo irreversível ao sítio de substrato enoil (intermediário da via biossintética de ácidos graxos), inativando a enzima, o que resulta na inibição da síntese de ácidos graxos (HEATH *et al.*, 1999). Levy *et al.* (1999) demonstraram que a ligação de triclosan ao sítio ativo da FabI se deve principalmente à interações de van der Waals e ligações de hidrogênio entre o grupo fenol da molécula de triclosan e resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima FabI.

3.5 Ocorrência de triclosan em matrizes ambientais

Triclosan tem sido encontrado em diversas amostras ambientais, como águas de superfície, efluentes de ETE e sedimentos. Considerando que esse composto é um componente de produtos de uso pessoal, é de se esperar que, após ser utilizado, resíduos contendo triclosan sejam liberados nos sistemas de coleta de esgoto, chegando até às ETE. De acordo com estudos de monitoramento nos EUA, Espanha, Suécia, Suíça e Austrália, as concentrações de triclosan nos afluentes de ETE estão na faixa de 0,1 a 16 $\mu\text{g/L}$ (KANTIANI *et al.*, 2008; McAVOY *et al.*, 2002; SINGER *et al.*, 2002; YING e KOOKANA, 2007). Embora uma fração significativa de triclosan seja removida por mecanismos de sorção e biodegradação nessas ETE (SINGER *et al.*, 2002; YING e KOOKANA, 2007), concentrações da ordem de ng/L e, em certos casos, de alguns $\mu\text{g/L}$, têm sido encontradas nesses efluentes. Ying e Kookana (2007) detectaram triclosan em efluentes de dezenove ETE da Austrália com concentrações entre 23 e 434 ng/L . Em um estudo realizado em cinco ETE dos EUA (McAVOY *et al.*, 2002), foi encontrado triclosan em concentrações entre 0,2 e 2,7 $\mu\text{g/L}$. Na Suíça, as concentrações de triclosan determinadas em efluentes de sete ETE variaram entre 110 e 650 ng/L (LINDSTRÖM *et al.*, 2002). Sendo assim, constata-se que a principal fonte de introdução de triclosan no ambiente aquático é o lançamento de efluentes de ETE em corpos d'água a jusante.

A ocorrência de triclosan em águas de superfície foi constatada em um trabalho realizado em 139 córregos de 30 estados dos EUA. Esse biocida esteve entre os sete compostos detectados com maior frequência, apresentando uma concentração média de 40 ng/L e uma concentração máxima de 140 ng/L (KOLPIN *et al.*, 2002). Na Suíça, as

concentrações de triclosan em águas de rios e lagos estiveram entre 0,4 e 74 ng.L⁻¹ (SINGER *et al.*, 2002). Na Espanha, um estudo de monitoramento mostrou que das 16 amostras de água de rio analisadas, metade apresentaram triclosan e, nessas amostras, as concentrações variaram entre 21 e 160 ng/L (KANTIANI *et al.*, 2008).

A contaminação de águas de superfície por triclosan também têm sido evidenciada pela presença de metiltriclosan em peixes. Esse composto é originado da metilação de triclosan em sistemas biológicos, como lodos ativados e biofilmes (BALMER *et al.*, 2003; LINDSTRÖM *et al.*, 2002).

3.6 Efeitos negativos relacionados com a presença de triclosan em ambientes aquáticos

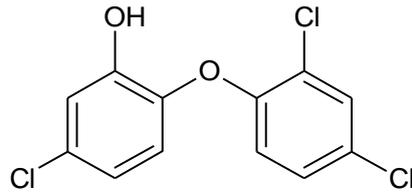
A presença de triclosan em matrizes ambientais, como córregos, rios, lagos, águas superficiais e sedimentos marinhos, tem sido largamente identificada e se deve provavelmente à incompleta remoção desse composto nas ETE. Diversos impactos negativos causados por esse biocida em ecossistemas aquáticos têm sido relatados.

Orvos *et al.* (2002) avaliaram a toxicidade causada pelo triclosan a vários organismos, como microrganismos de lodos ativados, algas, invertebrados e peixes e verificaram que a alga *Scenedesmus subspicatus* foi a que apresentou maior suscetibilidade, com uma CE50-96 h (expressa em relação à inibição do crescimento) de 1,4 µg/L. No entanto, após o período de exposição, as algas voltaram a crescer quando foram transferidas para um meio fresco sem triclosan, o que indica que, nesse caso, o biocida interfere no crescimento ao inativar as células. Considerando que as algas são produtores primários em ecossistemas aquáticos, o lançamento de resíduos de triclosan pode interferir em seu equilíbrio.

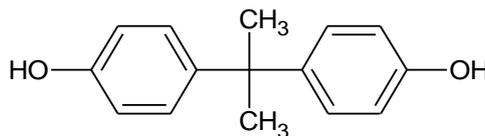
Outros estudos mostram que triclosan apresenta elevada toxicidade ao peixe *Oryzias latipes* (medaka japonês) e que, depois de metabolizado no organismo, o biocida pode ser fracamente estrogênico. A CL-96-h obtida, utilizando larvas do peixe com 24 h de vida foi de 602 µg/L e uma concentração de apenas 20 µg/L foi suficiente para elevar os níveis de vitelogenina hepática em indivíduos machos (ISHIBASHI *et al.*, 2004). Essa atividade estrogênica pode ser explicada pela semelhança estrutural do triclosan com o desregulador endócrino estrogênico bisfenol-A, conforme mostrado na

Figura 3.2.

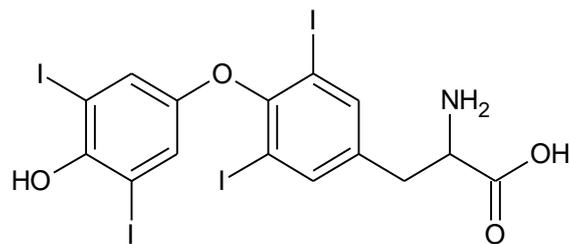
No entanto, outros estudos com o medaka japonês mostraram que triclosan é fracamente androgênico, ou seja, apresenta um potencial baixo de mimetizar ou interferir na ação de hormônios sexuais masculinos (FORAN *et al.*, 2000). Por outro lado, em organismos terrestres, como ratos Long-Evans (CROFTON *et al.*, 2007) e o sapo-boi americano *Rana catesbeiana* (VELDHOEN *et al.*, 2006), o triclosan foi capaz de alterar os níveis séricos de tiroxina, que é um hormônio da tireoide. Esse resultado sugere que triclosan é um desregulador endócrino tireoideano, o que se deve, provavelmente, à semelhança de sua molécula com a do hormônio tiroxina, conforme mostrado na Figura 3.2.



Triclosan



Bisfenol-A



Hormônio tiroxina

Figura 3.2. Comparação das estruturas químicas do biocida triclosan, do composto estrogênico bisfenol-A e do hormônio da tireóide tiroxina.

Além de efeitos agudos e crônicos que o triclosan pode causar em diversos organismos em ecossistemas aquáticos, o uso disseminado desse biocida tem sido relacionado com o desenvolvimento de bactérias resistentes a antibióticos.

3.7 Desenvolvimento de resistência bacteriana no ambiente aquático

Os efeitos indesejáveis do crescimento microbiano têm sido controlados há muito tempo por meio do uso de antimicrobianos. Desde então, já se sabe que a suscetibilidade a tais substâncias varia notadamente entre diferentes espécies de

organismos e entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie.

Resistência é a descrição da relativa não suscetibilidade de um microrganismo a um determinado tratamento sob um conjunto de condições específicas. Para agentes antibacterianos, a resistência é normalmente avaliada por meio da determinação da concentração mínima do agente para provocar um efeito definido (por exemplo, inibição do crescimento), em um determinado número de células. No entanto, existe uma mudança na suscetibilidade do organismo que faz com que o agente deixe de ser efetivo. Esse organismo não suscetível ao agente é denominado resistente. Organismos suscetíveis a um determinado antibiótico se tornam insensíveis por mutação ou pela incorporação de informação genética que codifica a resistência (KUMMERER, 2004).

O ambiente aquático pode ser um ambiente favorável ao desenvolvimento de resistência. Certas classes de antibióticos apenas inibem o crescimento dos patógenos e dependem de células do sistema imune para a sua eliminação, o que não acontece no meio ambiente. Além disso, em matrizes ambientais como sedimentos, lodos, águas de superfície e solo, os microrganismos estão em contato com uma mistura complexa de diferentes compostos ativos, o que pode dar origem a cepas com resistência a diversos antibióticos (KUMMERER, 2004).

Atualmente, existe uma enorme quantidade de trabalhos científicos sobre o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos utilizados nas medicinas humana e veterinária e os mecanismos pelos quais as bactérias desenvolvem resistência são, de certa forma, bem conhecidos. Por outro lado, ainda se desconhece como ocorre o desenvolvimento de cepas resistentes, assim como de genes de resistência, no meio ambiente, mesmo que sua ocorrência já venha sendo considerada como um problema ambiental (KUMMERER, 2004).

Smith *et al.* (1994) identificaram diversas limitações no atual entendimento da resistência a antimicrobianos e as dificuldades de interpretar dados de resistência a partir de amostras ambientais: (1) o uso de um antimicrobiano pode aumentar os níveis de resistência não apenas em relação a um antimicrobiano específico mas a muitos outros com modos de ação diferentes (denominada como resistência cruzada); (2) a resistência antibacteriana nem sempre responde de uma forma previsível, ou seja, não pode ser correlacionada com a quantidade presente de antimicrobiano; (3)

frequentemente, os dados existentes que são usados para avaliar os efeitos ambientais de antimicrobianos não são adequados para estabelecer por quanto tempo as bactérias mantêm resistência antibacteriana na ausência de exposição à antimicrobianos.

Se por um lado, o conhecimento da relação entre as concentrações sub-inibitórias de antimicrobianos e o desenvolvimento de resistência em bactérias presentes no meio ambiente é escasso e contraditório, por outro lado, existem muitas evidências de que resistência a antibióticos esteja presente em ambientes naturais e que essa resistência é compartilhada entre bactérias. A transferência e o surgimento de novas combinações de genes irão ocorrer com mais frequência em compartimentos com alta densidade bacteriana, como os biofilmes de tanques sépticos (aeróbios e anaeróbios) de ETE, bombas de água de abastecimento, sedimentos e solos. No entanto, não se sabe ainda qual a principal forma com que as bactérias adquirem resistência nesses ambientes, visto que podem absorver material genético de bactérias de efluentes específicos, como os de hospitais, antes de chegarem nas ETE ou no solo. Além disso, ainda está sob discussão se essas bactérias podem se tornar resistentes pela exposição a antibióticos e biocidas presentes no esgoto doméstico, ou seja, não está completamente esclarecido se a entrada de antibióticos no meio ambiente está de fato relacionada com o surgimento de bactérias resistentes no meio ambiente, visto que não se sabe se a concentração de antibiótico e a densidade de bactérias seria alta o suficiente, ou o tempo de exposição longo o suficiente para promover resistência ou selecionar bactérias resistentes (KUMMERER, 2004).

A elucidação dessas questões é de grande relevância visto que as bactérias resistentes podem ser transferidas da matriz ambiental em que se encontram para os seres humanos por meio da água de abastecimento, por meio de alimentos irrigados com água de superfície ou efluentes de ETE, por meio de alimentos cujo cultivo utilizou esterco de gado bovino ou, ainda, por meio de carne bovina contaminada com essas bactérias.

3.8 Mecanismos de resistência ao triclosan

Desde a década de 90 do século XX que cepas de bactérias resistentes a triclosan têm sido produzidas em laboratório por meio da exposição repetitiva ao agente em concentrações subletais. Desde os anos de 2000, diversos estudos têm relatado a

ocorrência de resistência a triclosan em microrganismos do ambiente aquático, incluindo alguns possivelmente patogênicos. Dentre esses, têm sido identificadas bactérias que apresentam resistência cruzada, ou seja, são resistentes ao próprio triclosan e a vários outros antibióticos (YAZDANKHAH *et al.*, 2006). Isso ocorre porque as bactérias que são expostas ao triclosan desenvolvem mecanismos de resistência que podem ser utilizados para a célula resistir a muitos outros antibióticos, como: (a) mutação do gene alvo e expressão aumentada do gene alvo; (2) detoxificação via bombas de efluxo; (3) degradação enzimática (SCHWEIZER, 2001).

A mutação do gene alvo consiste na modificação do gene que codifica a enzima-alvo do triclosan, a FabI. As bactérias que sofrem essa mutação, passam a expressar uma enzima mutante a FabI[G93S], que possui a mesma afinidade ao substrato triclosan. Essa enzima mutante forma um complexo ternário com NAD⁺ e triclosan que não é estável, ou seja, a ligação com triclosan não aumenta a afinidade da enzima por NAD⁺, diferente do que ocorre com a enzima FabI. Portanto, a ligação de triclosan ao sítio ativo não inativa a enzima (HEATH *et al.*, 1999). Bactérias que desenvolvem resistência a triclosan, por esse mecanismo, podem ser resistentes a outros antibióticos que também atuam na enzima FabI.

Como exemplo disso, tem-se a resistência a diazaborinas¹ em *Escherichia coli* que ocorre em bactérias expostas ao triclosan e que expressam a enzima FabI mutante (HEATH *et al.*, 1999). Outro exemplo é o que ocorre com a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria que causa tuberculose). Nessa bactéria, a enzima enoil redutase alvo do triclosan é a InhA, que desempenha o mesmo papel da FabI na síntese de ácidos graxos na *E. coli*. Cepas de *M. tuberculosis* expostas a triclosan, apresentam uma mutação no gene que codifica a enzima InhA, e passam a sintetizar versões mutantes dessa enzima: InhA[M161V] e InhA[A124V]. Essas enzimas mutantes apresentam afinidades muito menores ao triclosan e, conseqüentemente, ao antibiótico que compartilha o mesmo mecanismo de ação a isoniazida (PARIKH *et al.*, 2000). Portanto, a exposição ao triclosan pode estimular o surgimento de cepas mutantes de *M. tuberculosis* com resistência ao próprio triclosan e ao fármaco utilizado no seu controle a isoniazida.

¹Uma classe de antibióticos heterocíclicos que inibe a enzima FabI

O mecanismo de resistência a antibióticos mais frequente em bactérias é o efluxo ativo, por meio do qual o agente é expulso da célula às custas de energia, seja na forma de força motriz de prótons ou na forma de ATP. Bactérias com resistência a triclosan expressam bombas de efluxo da família resistência-nodulação-divisão celular (RND) (SCHWEIZER, 2001). Conforme mostrado na Figura 3.3, as bombas de efluxo RND possuem estruturas complexas e mediam a remoção de antibióticos das células através de duas membranas da célula: citoplasmática e externa. Essas bombas possuem componentes que formam um canal que abrange todo o envelope celular: (i) uma translocase na membrana interna, uma enzima que auxilia no transporte de moléculas através da membrana, (ii) um canal de proteínas na membrana externa e (iii) uma proteína de fusão na membrana periplasmática.

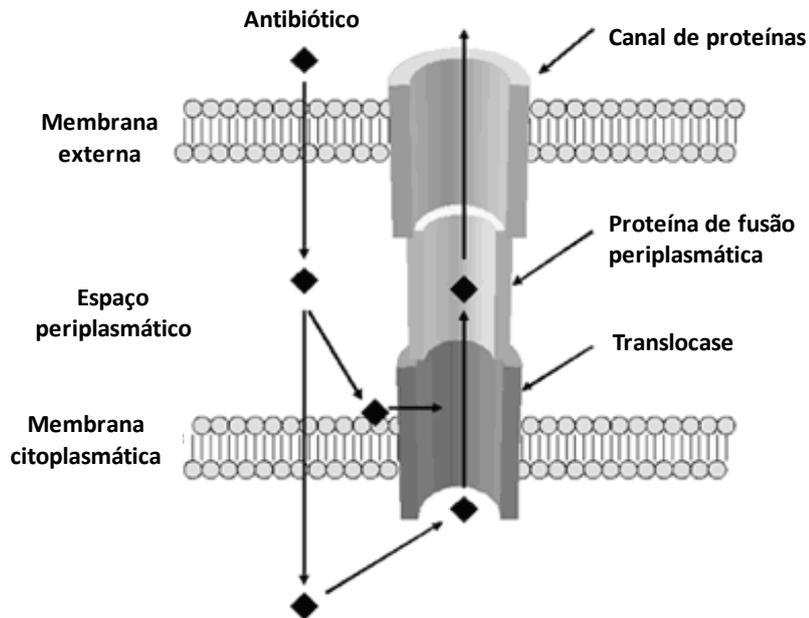


Figura 3.3. Ilustração esquemática do funcionamento das bombas de efluxo da família RND. O antibiótico que está no meio externo atravessa as membranas externa e interna, passando pelo espaço periplasmático. Por meio da translocase na membrana citoplasmática, o antibiótico (ou biocida) é retirado do citoplasma e sai da célula passando pela proteína de fusão e do canal de proteínas. Adaptado de Aeschlimann (2003).

Considerando que triclosan é um substrato da maioria de bombas de efluxo da família RND, a exposição ao triclosan pode selecionar cepas mutantes que expressam essas bombas. Neste caso, as cepas selecionadas também apresentariam resistência a outros antibióticos, visto que as bombas de efluxo transportam diversos outros antibióticos. Essa hipótese foi confirmada por Chuanchuen *et al.* (2001), que após cultivarem cepas da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em meio contendo triclosan, verificaram que a exposição ao agente selecionou cepas mutantes com resistência ao triclosan e a vários outros antibióticos. Além disso, verificou-se que as cepas resistentes expressaram com altas taxas o sistema de efluxo RND. Sanchez *et al.* (2005) também constataram que a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, após exposição ao triclosan, passou a expressar os genes que codificam as bombas de efluxo RND.

Outro mecanismo de resistência a triclosan é o da degradação catalisada por enzimas extracelulares. Esse mecanismo foi demonstrado para algumas bactérias, sem, no entanto, identificar as enzimas envolvidas. Cepas de *Pseudomonas putida* e *Alcaligenes xylosoxidans*, isoladas do solo, foram capazes de crescer em meio contendo 1% de triclosan (concentração utilizada em muitos produtos de uso pessoal) e o mecanismo de resistência sugerido foi o da degradação enzimática (MEADE e CALLAHAN, 2000 apud SCHWEIZER, 2001). Kagle e Hay (2001) apud SCHWEIZER (2001) demonstraram, por meio da determinação de $^{14}\text{CO}_2$, que *Sphingomonas* RD1 foi capaz de mineralizar pelo menos uma parte da molécula de triclosan marcado com ^{14}C .

3.9 Processos de tratamento empregados na remoção do triclosan

As ETE são projetadas normalmente para remoção de sólidos suspensos, matéria orgânica suspensa e solúvel e, em alguns casos, para remoção de nitrogênio e fósforo. Assim, embora parte do triclosan que chega a uma ETE seja removida por mecanismos de adsorção e/ou biodegradação durante o tratamento (SINGER *et al.*, 2002), concentrações significativas de triclosan têm sido encontrada nos efluentes dessas estações. As concentrações de triclosan que são comumente encontradas em efluentes de ETE mostram que a atual configuração dessas plantas de tratamento não é adequada para a remoção de triclosan a níveis em que não sejam observados seus efeitos. Esse micropolvente, quando associado com matéria orgânica dissolvida, pode ser transportado ao longo da ETE sem sofrer qualquer modificação (KHANAL *et al.*, 2006). Em função disso, diversos processos de tratamento têm sido avaliados, nos últimos anos, para aumentar os níveis de remoção de triclosan de matrizes aquosas.

O processo de lodos ativados, por exemplo, reduz significativamente a concentração de vários micropoluentes, como o triclosan, via biodegradação e/ou sorção no lodo. As remoções podem ser ainda mais altas quando são utilizadas idades de lodo mais elevadas (em torno de 15 dias, por exemplo) e/ou etapas de nitrificação e desnitrificação (JONES *et al.*, 2007). No entanto, as maiores remoções obtidas por esse processo não são suficientes para reduzir o triclosan a concentrações em que não sejam observados seus efeitos negativos no ambiente aquático.

Processos de tratamento avançados, como ozonização (SUAREZ *et al.*, 2007),

irradiação UV (ARANAMI e READMAN, 2007), fotocatalise (SON *et al.*, 2009) e adsorção em carvão ativado (BEHERA *et al.*, 2010) têm sido avaliados na remoção de triclosan e diversos micropoluentes de matrizes aquosas. De um modo geral, esses processos apresentam altas taxas de remoção de micropoluentes em água ultrapura. No entanto, a eficiência desses processos é significativamente reduzida em matrizes mais complexas, como os efluentes de ETE. No caso dos processos de ozonização e POA, que estão baseados no uso de agentes oxidantes de baixa seletividade, a redução da eficiência se deve ao consumo de agentes oxidantes pela reação com outros compostos orgânicos (e inorgânicos) que estão presentes em concentrações muito maiores do que os micropoluentes. E no caso do processo com carvão ativado, a redução da eficiência se deve à saturação dos sítios de adsorção pelos demais compostos orgânicos presentes nos efluentes de ETE (AURIOL *et al.*, 2006d). Esse contexto sugere que devam ser desenvolvidos processos de tratamento mais específicos e eficientes para matrizes aquosas complexas.

3.10 Processos enzimáticos de tratamento

Grande interesse tem sido expresso pelos processos enzimáticos no tratamento de efluentes líquidos, em função das vantagens apresentadas em relação aos processos convencionais, que incluem remoção seletiva de poluentes específicos, aplicação a compostos xenobióticos recalcitrantes, altas taxas de reação, operação em uma ampla faixa de pH e salinidade, redução no volume de lodo e simplicidade no controle do processo (IKEHATA *et al.*, 2004).

Embora os processos que utilizam enzimas purificadas possuam custo elevado, diversos estudos têm sido apresentados com melhorias na produção de enzimas, como o uso de substratos de custos reduzidos (lodo, resíduos agrícolas e de alimentos, por exemplo), descoberta de novas cepas, modificações nas condições de crescimento dos microrganismos produtores de enzimas, uso de indutores, entre outros (IKEHATA *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2006). As alternativas desenvolvidas nesses estudos podem melhorar a viabilidade econômica dos processos enzimáticos e tornar factível a sua aplicação em grande escala.

Dentre as diversas aplicações de processos enzimáticos na remoção de poluentes, destaca-se a aplicação de enzimas oxidativas para a conversão de compostos

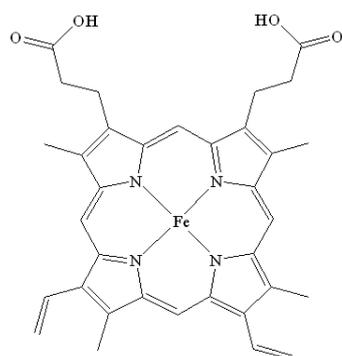
fenólicos. Essas enzimas catalisam, com seletividade e eficiência elevadas, a conversão desses compostos em produtos com reduzida toxicidade ambiental. Dentre essas enzimas, as peroxidases e as fenoloxidasas são as que têm sido mais aplicadas para o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos (DURAN e ESPOSITO, 2000; GIANFREDA *et al.*, 2006; KOBAYASHI e HIGASHIMURA, 2003).

Tendo em vista que a presença de anel fenólico está relacionada com a atividade biológica de diversos micropoluentes, as enzimas peroxidases e fenoloxidasas podem catalisar a conversão desses poluentes em produtos com atividade reduzida (AURIOL *et al.*, 2006a). No caso de micropoluentes como os desreguladores endócrinos estrogênicos, a modificação enzimática do anel fenólico pode remover a atividade estrogênica. E no caso do triclosan a conversão do anel fenólico pode remover a atividade antibacteriana.

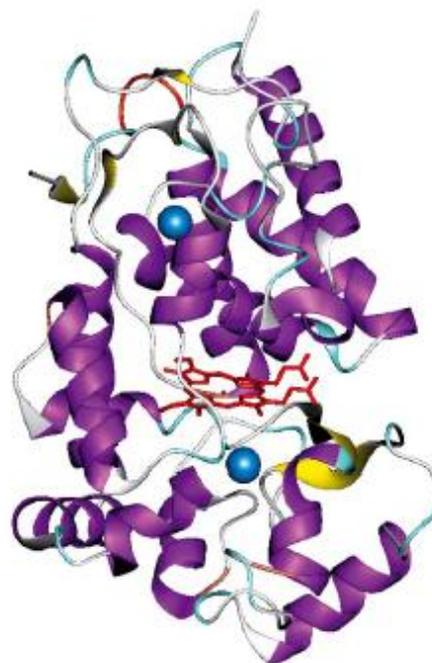
Nos próximos itens serão abordadas as características estruturais, ciclos catalíticos e os principais resultados da literatura sobre a aplicação das enzimas HRP e lacase na conversão de micropoluentes cujo anel fenólico está relacionado com um efeito biológico.

3.10.1 Peroxidase de raiz-forte (HRP)

A peroxidase de raiz-forte (HRP), encontrada nas raízes da erva raiz-forte (*Armoracia rusticana*), pertence à classe das peroxidases, enzimas que usam H_2O_2 ou outros peróxidos orgânicos como aceptores de elétrons para catalisar a oxidação de compostos orgânicos. A molécula da enzima, que possui massa molecular de aproximadamente 44 kDa, apresenta em seu sítio ativo o grupo prostético ferroprotoporfirina IX (grupo heme). A estrutura tridimensional está apresentada na Figura 3.4, na qual se observa o grupo heme no centro da molécula (VEITCH, 2004).



A



B

Figura 3.4. A) Grupo prostético heme das peroxidases; B) Estrutura tridimensional da HRP mostrando o grupo heme (de cor vermelha) no sítio ativo da molécula entre dois átomos de cálcio (esferas azuis). Extraído de Veitch (2004).

A HRP é provavelmente a peroxidase que tem sido mais estudada na remoção de compostos fenólicos (KHAN e NICELL, 2007). Embora, catalise preferencialmente substratos com grupo fenol, a enzima também atua em anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos, por meio do ciclo catalítico típico das peroxidases (REGALADO *et al.*, 2004), conforme mostrado na Figura 3.5.

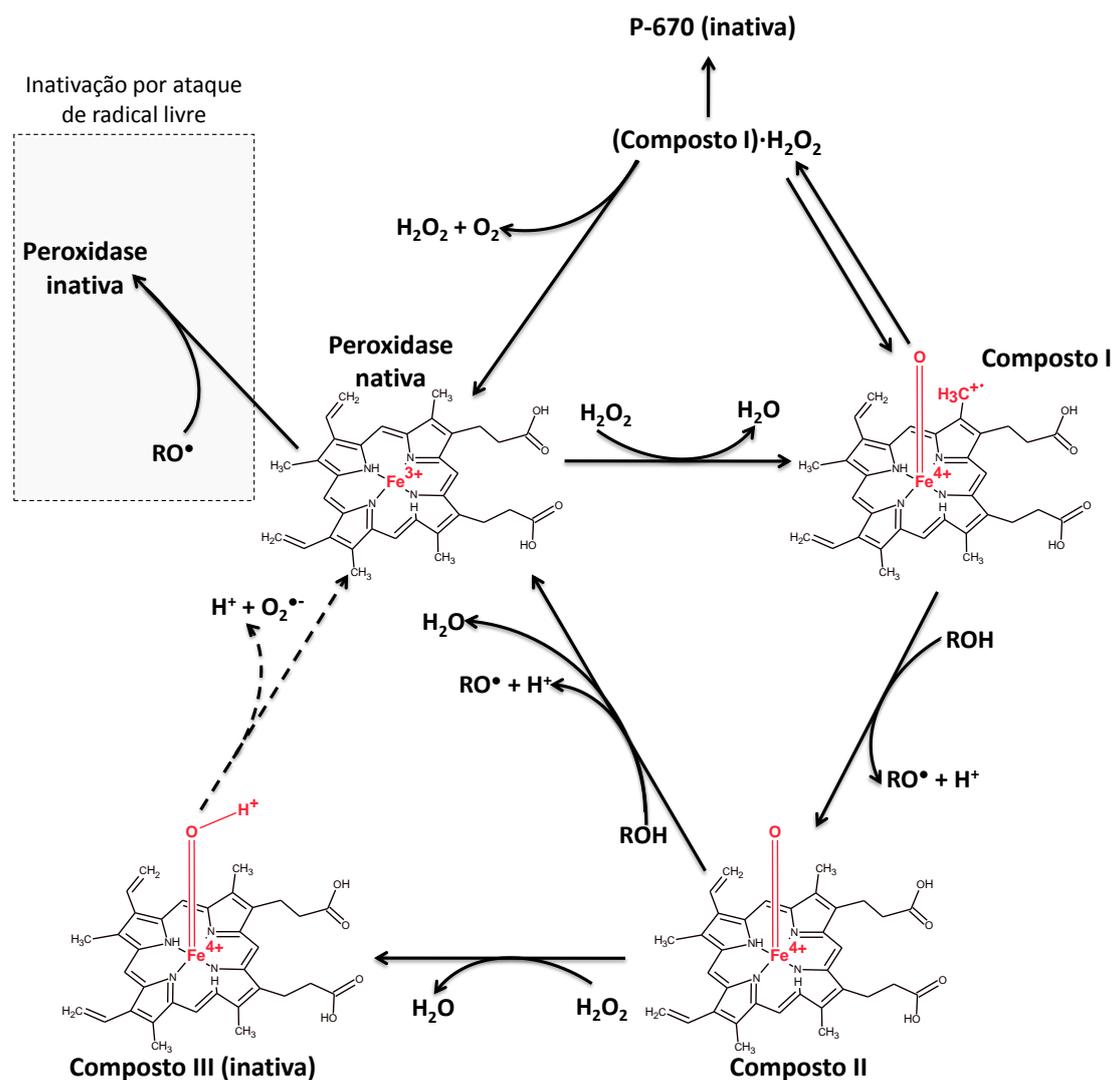


Figura 3.5. Ciclo catalítico das peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e a inativação da enzima. A enzima é inicialmente oxidada por H_2O_2 , gerando o composto I, que oxida um substrato fenólico. O composto II formado oxida outro substrato, e com isso a enzima retorna ao seu estado nativo. A peroxidase pode ser convertida em formas inativas por meio da reação do composto II com H_2O_2 , formando composto III, da reação de composto I com H_2O_2 , formando proteínas verde-heme (P-670) ou por meio do ataque de radicais livres resultando no composto III. Adaptado de Wesenberg *et al.* (2003) e Hong-Mei e Nicell (2008).

O ciclo catalítico da enzima consiste nas seguintes etapas: (i) a enzima férrica nativa é inicialmente oxidada por H_2O_2 , gerando o composto I, deficiente em dois elétrons, sendo um elétron abstraído do íon Fe^{3+} e outro do anel porfirínico, gerando, respectivamente, Fe^{4+} e radical cation porfirínico; (ii) em seguida, o composto I oxida um substrato doador de elétron, formando o composto II, um intermediário deficiente em um elétron; (iii) o composto II pode oxidar outra molécula de substrato e, com isso,

a enzima retorna ao seu estado nativo; (iv) o composto II pode reagir com H_2O_2 resultando no composto III, uma forma de peroxidase com atividade reduzida (MESTER e TIEN, 2000). A peroxidase também pode ser irreversivelmente inativada por meio do ataque de radicais livres e pela reação do composto I com H_2O_2 , formando proteínas verde-heme (P-670) (HONG-MEI e NICELL, 2008).

A principal vantagem da HRP na remoção de compostos fenólicos de efluentes é que essa enzima opera em amplas faixas de pH (geralmente de 5 a 9) e de temperatura (10 a 40°C) e na presença de contaminantes normalmente encontrados em efluentes (DURAN e ESPOSITO, 2000; KHAN e NICELL, 2007). Essas vantagens também têm sido exploradas na conversão de diversos micropoluentes com anel fenólico encontrados em efluentes de ETE, conforme mostrado na Tabela 3.1. Até o momento, não foram encontrados na literatura científica estudos sobre o uso da HRP para conversão de triclosan.

Tabela 3.1. Diferentes micropoluentes com anel fenólico convertidos pelo tratamento com HRP em estudos apresentados na literatura..

Composto	Referência
4-nonilfenol	Sakuyama <i>et al.</i> (2003)
4-octilfenol	Sakuyama <i>et al.</i> (2003)
Bisfenol-A	Sakuyama <i>et al.</i> (2003); Huang e Weber (2005)
E1	Khan e Nicell (2007)
E2	Auriol <i>et al.</i> (2008); Auriol <i>et al.</i> (2007c); Auriol <i>et al.</i> (2006c); Khan e Nicell (2007)
E3	Auriol <i>et al.</i> (2008); Auriol <i>et al.</i> (2007c); Auriol <i>et al.</i> (2006c); Khan e Nicell (2007)
EE2	Auriol <i>et al.</i> (2008); Auriol <i>et al.</i> (2007c); Auriol <i>et al.</i> (2006c); Khan e Nicell (2007)

O primeiro trabalho relatando a remoção de um micropoluente com anel fenólico pelo tratamento com HRP foi o de Sakuyama *et al.* (2003). Esses autores utilizaram o tratamento para converter o grupo fenólico do bisfenol-A, visando a remoção de sua atividade estrogênica. Para avaliar a atividade estrogênica, utilizaram um ensaio de indução de vitelogenina com o peixe medaka japonês (*Oryzias latipes*). Após o tratamento com HRP² de soluções de bisfenol-A com concentrações entre 0,5 e 5 mg.L⁻¹ a atividade estrogênica foi substancialmente reduzida.

Em um trabalho posterior, Auriol *et al.* (2006b) mostraram que o tratamento com HRP foi efetivo na remoção de estrogênios esteróides em concentrações ambientalmente relevantes. Utilizando uma mistura equimolar de E1, E2, E3 e EE2 com

² O tratamento foi realizado nas seguintes condições: 66.700 U.L⁻¹ de HRP, 2 h de reação, pH 8,0, 25 °C; 17,6 mmol.L⁻¹ de H₂O₂.

cada um a $0,36 \text{ nmol.L}^{-1}$ em água ultrapura, verificou-se que, após o tratamento com HRP (32 U.L^{-1} ; 1 h; pH 8; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; H_2O_2 a $0,72 \text{ nmol.L}^{-1}$), as concentrações residuais dos estrogênios foram menores do que seus respectivos limites de detecção (LD), conforme mostrado na Tabela 3.2. No entanto, para a remoção dessa mistura de estrogênios em efluente de ETE, foi necessária uma dosagem muito maior de enzima. Mantidas as demais condições reacionais utilizadas para o tratamento em água ultrapura (1 h; pH 8; $25 \text{ }^\circ\text{C}$; H_2O_2 a $0,72 \text{ nmol.L}^{-1}$), para que fosse possível remover os estrogênios de efluente de ETE, a níveis abaixo do LD, foi necessário aumentar significativamente a dose de HRP (8.000 U.L^{-1}). Isso pode ser devido a vários fatores, como o consumo de H_2O_2 devido à reação com compostos presentes no efluente, a presença de inibidores da HRP ou, ainda, o uso da HRP para a conversão de outros compostos. O consumo de H_2O_2 parece o menos provável, já que num trabalho posterior de Auriol *et al.* (2007b) foi mostrado que a dosagem ótima de H_2O_2 para a remoção de estrogênios em efluente de ETE foi a mesma que em água ultrapura.

Embora nos estudos apresentados em Auriol *et al.* (2006b e 2007b) tenha sido utilizada uma metodologia analítica bastante sensível para a determinação de estrogênios (concentração por extração em fase sólida e posterior quantificação por CLAE-EM), a concentração residual dessas substâncias após o tratamento com HRP ainda pode ser suficiente para induzir efeitos biológicos, como a atividade estrogênica. Assim, para avaliar a atividade residual após o tratamento com HRP, em um estudo posterior (AURIOL *et al.*, 2008b), foi utilizado um ensaio biológico baseado na interação com o receptor de estrogênio humano, proposto por Noguerol *et al.* (2006). Os autores verificaram que para remover a atividade estrogênica da mistura de estrogênios em água ultrapura (com cada um a $0,4 \text{ nmol.L}^{-1}$) a níveis inferiores ao LD do ensaio biológico, foi necessário aumentar o tempo de tratamento, mantendo a mesma dosagem de enzima utilizada anteriormente. Assim, a remoção da atividade da mistura de estrogênios em água ultrapura, a níveis inferiores do LD, ocorreu após 5 h de tratamento, utilizando 32 U.L^{-1} de HRP, conforme mostrado na Tabela 3.2. No entanto, remoções da atividade estrogênica, a níveis inferiores do LD, da mistura de estrogênios esteróides em efluente de ETE só foram alcançadas utilizando uma dosagem de HRP 10.000 U.L^{-1} e após 8 h de tratamento, conforme mostrado na Tabela 3.2. Embora, o tratamento com HRP tenha sido efetivo na remoção da atividade estrogênica do efluente de ETE contendo estrogênios esteróides em concentrações ambientalmente relevantes, a

eficiência do tratamento foi reduzida devido aos demais constituintes do efluente, tornando necessário o aumento da quantidade de enzima utilizada.

Tabela 3.2. Conversões de estrogênios e avaliação da remoção da atividade estrogênica após o tratamento com HRP de uma mistura equimolar de E1, E2, E3 e EE2 em concentrações ambientalmente relevantes. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: pH 8, 25°C e razão molar H₂O₂-substrato de 0,5.

[estrogênio] ^a (nmol.L ⁻¹)	Atividade enzimática ^f (U.L ⁻¹)	[H ₂ O ₂] (nmol.L ⁻¹)	Tempo de tratamento (h)	Matriz	Conversão ^b (%)	Remoção da atividade estrogênica ^c (%)
0,36	32	0,72	1	Água ultrapura ^d	~100	-
0,36	8.000	0,72	1	Efluente de ETE ^e	~100	-
0,4	32	0,8	5	Água ultrapura	-	99
0,4	10.000	0,8	8	Efluente de ETE	-	~100

^a Concentração de cada um dos estrogênios E1, E2, E3 e EE2 na mistura equimolar no início da reação.

^b Remoção calculada com base na quantidade residual de cada um dos estrogênios quantificados por CLAE- EM. Os LD variaram de 0,59 a 1,32 ng.L⁻¹ para a mistura em água ultrapura e de 1,74 a 3 ng.L⁻¹ para a mistura em efluente de ETE.

^c Remoção calculada com base na atividade estrogênica residual determinada pelo ensaio proposto Noguero *et al.* (2006), o limite de detecção do ensaio biológico foi de 9 ng.L⁻¹.

^d Água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q.

^e Efluente de ETE filtrado em membrana 0,45 µm.

^f Uma unidade de atividade foi definida como o número de micromoles de H₂O₂ consumido por minuto em pH 7,4 e 25°C.

Fonte : Auriol *et al.* (2006a, 2007a e 2008)

3.10.2 Lacases

As lacases (benzenodiol:dioxigênio oxidoreductase) estão presentes em plantas superiores e praticamente em todos os basidiomicetos (fungos verdadeiros) decompositores da madeira. A molécula desse grupo de enzimas é formada por uma cadeia polipeptídica glicosilada com massa molecular entre 60 a 80 kDa e possui quatro átomos de cobre em seu sítio ativo (PIONTEK *et al.*, 2002; SUSLA *et al.*, 2007), conforme mostrado na Figura 3.6.

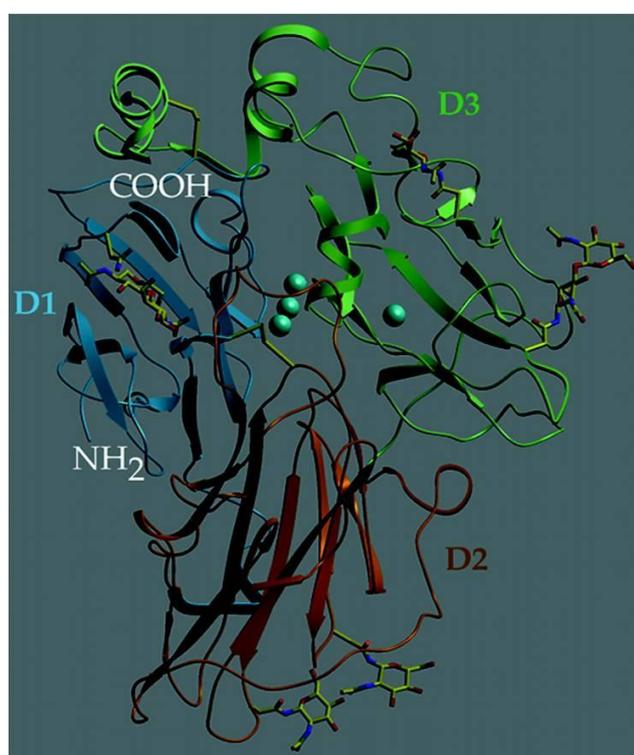


Figura 3.6. Estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor* mostrando os átomos de cobre (esferas verdes) do sítio ativo. D1, D2 e D3 são os domínios 1, 2 e 3 da proteína, respectivamente. COOH é o grupo carboxil livre e NH₂ o grupo amino livre das extremidades da proteína. Extraído de Piontek (2002).

Os centros das lacases são classificados em três tipos: T1, T2 e T3. O centro de cobre T1 confere a cor azul típica da proteína e exibe uma banda de absorção em 605 nm, detectável por ressonância paramagnética eletrônica (EPR). O centro T2 é formado por um átomo de cobre normal sem banda de absorção na região do UV-Vis, mas é detectável por EPR. T3 é um centro de cobre binuclear acoplado que exibe uma

banda de absorção em 330 nm, não detectável por EPR. Essas diferenças permitem que os átomos de cobre exerçam um papel importante no mecanismo catalítico da enzima. Em geral as lacases possuem um centro de cobre T1, um T2 e dois T3, conforme mostrado na Figura 3.7. Os centros de cobre T2 e T3 formam um agregado (“cluster”) trinuclear, que está envolvido na ligação do oxigênio durante sua redução a água. O átomo de cobre T1 está envolvido na oxidação do substrato doador de elétrons e os elétrons gerados são transferidos de volta aos átomos T2 e T3 (DURAN e ESPOSITO, 2000; TORRES *et al.*, 2003; WESENBERG *et al.*, 2003).

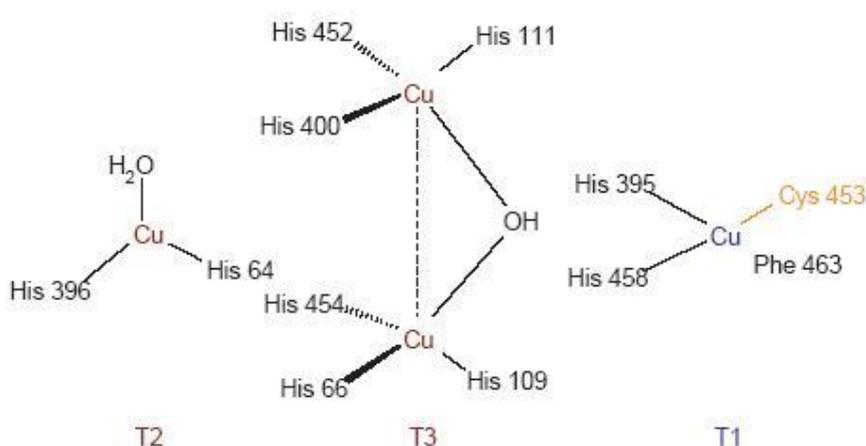


Figura 3.7. Modelo do sítio catalítico da lacase de *Trametes versicolor* mostrando os centros de cobre T1, T2 e T3. Os resíduos de aminoácidos histidina (His), cisteína (Cys) e fenilalanina (Phe) estão coordenados com os núcleos de cobre. Extraído de Riva (2006).

As lacases catalizam a oxidação de uma vasta gama de substratos, como corantes azo, clorofenóis, benzopirenos, difenilmetanos relacionados à lignina, derivados *N*-substituídos de *p*-fenilenodiaminas, hidrocarbonetos poliaromáticos e preferencialmente compostos fenólicos (PIONTEK *et al.*, 2002; WESENBERG *et al.*, 2003).

As reações catalisadas pela lacase acontecem por meio da transferência de um elétron do substrato doador de elétrons, que é oxidado de S para S[•], para um núcleo de cobre, que é reduzido de Cu²⁺ para Cu⁺. O resultado geral do ciclo catalítico é a redução de uma molécula de oxigênio, formando duas de água, e a oxidação simultânea de quatro moléculas de substrato gerando quatro radicais (RIVA, 2006), conforme

mostrado na Figura 3.8.

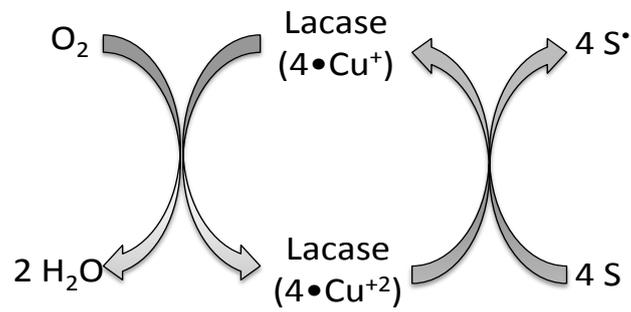


Figura 3.8. Ciclo catalítico das lacases. Adaptado de Riva (2006).

A oxidação de compostos fenólicos mediada pela lacase forma radicais livres (fenóxi ou fenoxil), os quais podem se acoplar formando dímeros, trímeros ou polímeros (KOBAYASHI e HIGASHIMURA, 2003; RIVA, 2006). Essa habilidade da lacase tem sido explorada na conversão de diferentes micropoluentes com anel fenólico, conforme mostrado na compilação de estudos da literatura apresentada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Diferentes micropoluentes com anel fenólico convertidos pelo tratamento com lacase em estudos apresentados na literatura.

Composto	Fonte de lacase	Referência
Triclosan	<i>Trametes versicolor</i>	Kim e Nicell (2006b)
	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Cabana <i>et al.</i> (2009, 2007a e 2007b)
4-nonilfenol	<i>Trametes versicolor</i>	Tsutsumi <i>et al.</i> (2001)
	<i>Trametes sp.</i>	Tanaka <i>et al.</i> (2001 e 2003)
	<i>Chaetomiaceae sp.</i>	Saito <i>et al.</i> (2004)
	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Cabana <i>et al.</i> (2007a e 2007b)
	<i>Clavariopsis aquatica</i>	Junghanns <i>et al.</i> (2005)
4-octilfenol	<i>Trametes sp.</i>	Tanaka <i>et al.</i> (2001 e 2003)
Bisfenol-A	<i>Chaetomiaceae sp.</i>	Saito <i>et al.</i> (2004)
	<i>Coriolopsis polyzona</i>	Cabana <i>et al.</i> (2007a e 2007b)
	<i>Trametes versicolor</i>	Diano <i>et al.</i> (2007)
	<i>Trametes versicolor</i>	Tsutsumi <i>et al.</i> (2001)
	<i>Trametes versicolor</i>	Kim e Nicell (2006c)
	<i>Trametes versicolor</i>	Soares (2005)
	<i>Trametes sp.</i>	Tanaka <i>et al.</i> (2001 e 2003)
	<i>Trametes villosa</i>	Fukuda <i>et al.</i> (2001)
Não informada	Modaressi <i>et al.</i> (2005)	
Genisteína	<i>Phanerochaete sordida</i>	Tamagawa <i>et al.</i> (2005)
E1	<i>Russula delica</i>	Graubard e Pincus (1941)
	<i>Phanerochaete sordida</i>	Tamagawa <i>et al.</i> (2005)
	<i>Trametes versicolor</i>	Auriol <i>et al.</i> (2007a e 2008)
E2	<i>Russula delica</i>	Graubard e Pincus (1941)
	<i>Trametes versicolor</i>	Tamagawa <i>et al.</i> (2005)
	<i>Trametes versicolor</i>	Auriol <i>et al.</i> (2007a e 2008)
E3	<i>Russula delica</i>	Graubard e Pincus (1941)
	<i>Trametes versicolor</i>	Auriol <i>et al.</i> (2007a e 2008)
EE2	<i>Trametes sp.</i>	Tanaka <i>et al.</i> (2001 e 2003)
	<i>Trametes versicolor</i>	Suzuki <i>et al.</i> (2003)
	<i>Trametes versicolor</i>	Auriol <i>et al.</i> (2007a e 2008)

Graubard e Pincus (1941) relataram pela primeira vez a oxidação de um composto fenólico catalisada pela lacase. Essa reação foi evidenciada pelo consumo de oxigênio dissolvido num meio reacional contendo lacase e estrogênios em solvente orgânico. Embora não fosse claro o objetivo desses pesquisadores, é de se esperar que não fosse a remoção da atividade biológica dos estrogênios. Com esse propósito a lacase

foi avaliada pela primeira vez por Tsutsumi *et al.* (2001), momento em que testes para determinar atividade estrogênica já estavam estabelecidos e as metodologias analíticas sensíveis o suficiente para quantificação de micropoluentes. Assim, Tsutsumi *et al.* (2001) relataram que o tratamento com lacase de *Trametes versicolor* foi eficiente na remoção da atividade estrogênica dos micropoluentes bisfenol-A e 4-nonilfenol, e supuseram que os produtos da reação fossem oligômeros insolúveis.

Fukuda *et al.* (2001) e Uchida (2001), utilizando lacase de *Trametes villosa*, confirmaram que os principais sub-produtos da oxidação do bisfenol-A foram compostos de alta massa molecular³ formados pelo acoplamento de radicais fenoxi. Estudos posteriores mostraram que o tratamento com lacase também pode ser utilizado na remoção de outros micropoluentes, como a genisteína (TAMAGAWA *et al.*, 2005) e os estrogênios esteróides E1 (TAMAGAWA *et al.*, 2006), E2 (SUZUKI *et al.*, 2003) e EE2 (SUZUKI *et al.*, 2003; TANAKA *et al.*, 2001; TANAKA *et al.*, 2003). Todos esses estudos, no entanto, registraram uma atividade estrogênica residual mesmo após a remoção do micropoluente a níveis inferiores ao LD da técnica de quantificação utilizada. Devido a isso, não é possível inferir se a atividade biológica residual é devida à presença de micropoluente que não foi degradado ou à presença de sub-produtos da oxidação enzimática com atividade estrogênica. Vale ressaltar que, nesses estudos foram utilizadas técnicas analíticas pouco sensíveis (com LD da ordem de 3 µg.L⁻¹) para detectar as baixíssimas concentrações em que esses micropoluentes apresentam atividade biológica. Além disso, foram tratadas soluções de micropoluentes em água ultrapura com concentrações da ordem de mg/L e, portanto, muito superiores àquelas relatadas em efluentes de ETE. Portanto, esses estudos demonstraram apenas que a lacase catalisa a oxidação de micropoluentes com anel fenólico formando produtos com maior massa molecular, sem, no entanto, avaliar se o tratamento pode remover a atividade biológica nas condições reais em que estão presentes no efluente de ETE, ou seja, em concentrações da ordem de ng.L⁻¹ e na presença de outros compostos orgânicos em concentrações muito maiores.

Auriol *et al.* (2007a), visando investigar essas questões remanescentes,

³ Os autores utilizaram análise de cromatografia de permeação em gel para estimar as massas dos subprodutos.

avaliaram o tratamento com lacase de uma mistura equimolar de quatro estrogênios esteróides em concentrações ambientalmente relevantes, com cada um a $0,4 \text{ nmol.L}^{-1}$ (cerca de $0,1 \text{ }\mu\text{g/L}$) em duas matrizes aquosas: água ultrapura e efluente de ETE. Nesse estudo, utilizou-se CLAE-EM para a quantificação das concentrações residuais de estrogênios, uma técnica bastante sensível com LD entre $0,6$ e 3 ng.L^{-1} , dependendo do estrogênio e da matriz analisada. Conforme mostrado na Tabela 3.4, os resultados mostraram que após 1 h de tratamento com $2 \times 10^4 \text{ U.L}^{-1}$ de lacase (a pH 7,0 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$), as concentrações residuais de estrogênios foram menores que seus respectivos LD tanto em água ultrapura como no efluente de ETE. Com isso, verifica-se que os constituintes do efluente de ETE não tiveram um impacto negativo na conversão dos estrogênios, visto que a quantidade de lacase requerida para a remoção completa dos estrogênios no efluente não foi maior do que utilizada em água ultrapura.

Em outro estudo, Auriol *et al.* (2008b) avaliaram a remoção da atividade estrogênica pelo tratamento com lacase da mistura de estrogênios esteróides em água ultrapura (cada um a $0,4 \text{ nmol.L}^{-1}$) e verificaram que a dose de lacase ($2 \times 10^4 \text{ U.L}^{-1}$) e o tempo de tratamento (1 h), necessários para a remoção dos estrogênios a níveis inferiores ao LD da quantificação por CLAE-EM, foram suficientes para a eliminação da atividade estrogênica a níveis inferiores ao LD do ensaio biológico, conforme mostrado na Tabela 3.4. No entanto, para a eliminação da atividade da mistura em efluente de ETE, foi necessário aumentar o tempo de tratamento de 1 para 8 h, mantendo a mesma dose de enzima ($2 \times 10^4 \text{ U.L}^{-1}$). Esse resultado sugere que, de alguma forma, os constituintes do efluente reduziram a eficiência do tratamento na remoção da atividade estrogênica. Contudo, deve-se levar em conta que os efluentes de ETE também contêm uma mistura de outras substâncias com atividade estrogênica, o que pode resultar em um efeito sinérgico no ensaio.

Tabela 3.4. Conversões de estrogênios e da atividade estrogênica após o tratamento com lacase de uma mistura equimolar de E1, E2, E3 e EE2 em concentrações ambientalmente. Os experimentos foram realizados em pH 7,0 e 25°C.

[estrogênio] ^a (nmol.L ⁻¹)	Atividade enzimática ^f (U.L ⁻¹)	Tempo de tratamento (h)	Matriz	Conversão de Estrogênios ^b (%)	Remoção da atividade estrogênica ^c (%)
0,4	2×10^4	1	Água ultrapura ^d	~100	~100
0,4	2×10^4	1	Efluente de ETE ^e	~100	97%
0,4	2×10^4	8	Efluente de ETE	~100	~100

^a Concentração de cada um dos estrogênios E1, E2, E3 e EE2 numa mistura equimolar.

^b Remoção calculada com base na quantidade residual de cada um dos estrogênios quantificados por CLAE acoplada a EM. Os LD variaram de 0,59 a 1,32 ng.L⁻¹ para a mistura em água ultrapura e de 1,74 a 3 ng.L⁻¹ para a mistura em efluente de ETE.

^c Remoção calculada com base na atividade estrogênica residual determinada pelo ensaio proposto Noguero *et al.* (2006).

^d Água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q.

^f Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de ABTS por min.

^g Remoção de ~100% indica que a concentração final de estrogênios foi inferior ao limites de detecção.

Fonte : Auriol *et al.* (2007b e 2008).

Assim como os demais micropoluentes com anel fenólico, o tratamento com lacase também pode ser utilizado na conversão de triclosan. Kim e Nicell (2006b) demonstraram que a lacase de *Trametes versicolor* catalisa a transformação de triclosan em soluções com 20 mg/L, diminuindo significativamente a inibição do crescimento da bactéria *Vibrio fischeri*. Esses resultados indicam ainda que os subprodutos da oxidação enzimática possuem atividade biológica muito menor do que a do triclosan ou mesmo nenhuma atividade. A habilidade do tratamento com lacase¹ de remover a atividade inibitória do triclosan foi confirmada por Murugesan *et al.* (2010), utilizando ensaios de inibição do crescimento com as bactérias *Escherichia coli* e *Sphingomonas* sp. PH-07.

Cabana *et al.* (2007a) utilizaram um extrato enzimático do fungo de degradação branca *Coriolopsis polyzona* contendo lacase para o tratamento de triclosan a 5 mg/L e obtiveram 65% de conversão após 8 h de reação. Por meio da análise de espectrometria de massas foi possível identificar os produtos da reação como dímeros, trímeros e tetrâmetros. Em trabalhos publicados posteriormente (CABANA *et al.*, 2009; CABANA *et al.*, 2007a), foi avaliado o tratamento com lacase de *C. polyzona* imobilizada em reatores com operação contínua e foram obtidas maiores remoções de triclosan com tempos relativamente curtos de retenção hidráulica (em torno de 150 min). No entanto, deve-se destacar que as concentrações utilizadas em todos esses estudos são muito maiores do que as concentrações em que os micropoluentes estão presentes em amostras ambientais.

3.10.3 Fatores que influenciam reações catalisadas pela lacase e pela HRP

As taxas de conversão de substratos catalisada pelas enzimas lacase e HRP dependem, assim como a conversão de substratos por enzimas oxidorreduativas de um modo geral, dos seguintes fatores: (i) dosagem inicial de enzima, (ii) pH, (iii) temperatura, (iv) concentração do aceptor final de elétrons, (v) presença de substâncias que diminuem a inativação de enzimas, (vi) presença de mediadores-redox, entre outros.

3.10.3.1 Dosagem inicial de enzima

A dosagem de enzima é normalmente expressa em unidades de atividade

¹ A lacase foi obtida por meio da purificação do caldo de cultivo do fungo *Ganoderma lucidum*

enzimática por unidade de volume do meio reacional. A atividade enzimática é a quantidade de substrato que em uma reação catalisada enzimaticamente é convertida em produto por unidade de tempo em condições determinadas. A unidade de atividade utilizada com maior frequência é a unidade internacional de atividade enzimática (U) que corresponde à quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de substrato por minuto nas condições do ensaio.

De um modo geral, o aumento da atividade inicial da enzima no meio reacional, aumenta a taxa de conversão do substrato. Sakuyama *et al.* (2003) usaram HRP na conversão de bisfenol-A e observaram que a remoção, com 1 min de reação, aumentou de 10 para 99% quando a dose inicial de lacase foi elevada de 300 para $6,7 \times 10^4$ U.L⁻¹.

A determinação da menor dose de enzima para atingir uma conversão estabelecida em um período de tempo definido é uma etapa importante, visto que a enzima é o principal componente do custo do tratamento enzimático. Assim, Modaressi *et al.* (2005), buscando minimizar a concentração de lacase utilizada no tratamento de bisfenol-A em uma solução de 1,0 mmol.L⁻¹ em água ultrapura, realizou uma série de experimentos com diferentes dosagens de enzima. Nesse estudo, foi estabelecido que a dosagem ótima fosse a atividade necessária para remover pelo menos 95% da concentração inicial de bisfenol-A após 3 h de tratamento. A dosagem ótima determinada foi de 10 U.L⁻¹.

3.10.3.2 pH

A atividade das enzimas é de um modo geral dependente do pH e, de acordo com o substrato utilizado, existe uma faixa de pH na qual essa atividade é máxima. Isso ocorre porque os resíduos de aminoácidos do sítio ativo agem como ácidos ou bases fracos com funções críticas que dependem de sua manutenção em certo estado de ionização. Além disso, em outras regiões da proteína, os resíduos de aminoácidos podem exercer um papel fundamental nas interações que mantêm a estrutura da proteína (NELSON e COX, 2004).

Uma maneira de investigar o efeito desse parâmetro em reações catalisadas enzimaticamente é sob condições de “stress” ou estridentes em relação à concentração de enzima. Isso significa que uma quantidade insuficiente de enzima é provida de modo

a evitar a completa conversão do substrato investigado (MODARESSI *et al.*, 2005).

Modaressi *et al.* (2005) e Kim e Nicell (2006), empregando condições estridentes na avaliação do efeito do pH na conversão de BFA catalisada pela lacase de *Trametes versicolor*, verificaram que o intervalo de pH em que foram obtidas as maiores conversões foi entre 5 e 6. Já para a conversão de estrogênios esteróides catalisada pela mesma enzima, a faixa ótima de pH foi um pouco diferente, entre 6 e 7 (AURIOL *et al.*, 2007b).

Por outro lado, o efeito do pH na conversão de DEE catalisada pela HRP é menos pronunciado do que no caso da lacase. Para a conversão de estrogênios esteróides catalisada pela HRP, AURIOL *et al.* (2006a) determinaram que a faixa ótima de pH foi entre 6 e 8. KHAN e NICELL (2007) relataram uma faixa ótima de pH similar, entre 4,5 e 8,5.

Cabana *et al.* (2007a) utilizaram a metodologia de planejamento fatorial de experimentos para avaliar o efeito do pH na remoção de 4-nonilfenol, bisfenol-A e triclosan. Esses autores verificaram que o da variável pH foi estatisticamente significativa e que, de acordo com o modelo obtido, as remoções mais elevadas ocorrem em pH 5.

3.10.3.3 Temperatura

A atividade catalítica das enzimas é altamente dependente da temperatura, porém, na medida em que se eleva a temperatura, dois efeitos ocorrem simultaneamente: a taxa de reação aumenta, como ocorre com a maioria das reações químicas, de acordo com a lei de Arrhenius, e a estabilidade da proteína diminui, devido à desativação térmica, que em níveis extremos pode desnaturar a enzima. Portanto, para uma reação catalisada por enzimas existe uma faixa de temperatura na qual a taxa de conversão de substrato é máxima (MARANGONI, 2002).

Auriol *et al.* (2006b) constataram que a influência da temperatura, no tratamento com HRP dos estrogênios esteróides E1, E2, E3 e EE2, foi significativa no intervalo de 5 a 35°C e que as maiores remoções foram obtidas entre 25 e 35°C. Outros autores obtiveram resultados similares para a remoção do xenoestrogênio BFA, como Sakuyama *et al.* (2003), utilizando HRP (20°C), e Sakurai *et al.* (2001) utilizando

peroxidase de *Coprinus cinereus* (25°C).

Cabana *et al.* (2007a) utilizaram a metodologia de planejamento fatorial de experimentos para avaliar o efeito da temperatura na remoção de 4-nonilfenol, bisfenol-A e triclosan. Esses autores verificaram que o efeito dessa variável foi estaticamente significativo e que, de acordo com o modelo obtido, as maiores remoções ocorrem a 50 °C. Vale destacar que, no modelo obtido, a interação entre as variáveis pH e temperatura também foi estatisticamente significativa.

3.10.3.4 Concentração do acceptor final de elétrons

Em reações de oxidorredução catalisadas por enzimas, o substrato enzimático (doador de elétrons) é oxidado e, a cada volta completa do ciclo catalítico, seus elétrons são transferidos para o acceptor final de elétrons, que por sua vez é reduzido. No ciclo catalítico das peroxidases, mostrado na Figura 3.5, verifica-se que duas moléculas de substrato são oxidadas para cada molécula de H₂O₂ reduzida. Assim, o aumento da concentração de H₂O₂ acelera a conversão de substrato catalisada pela HRP. Por outro lado, o excesso de H₂O₂ favorece a reação do composto II com peróxido, formando o composto III, uma forma menos ativa da enzima. A inativação da HRP ocorre muito rapidamente, sendo o tempo de meia-vida da ordem de minutos. Desse modo, nas reações catalisadas por peroxidases, a concentração de H₂O₂ no meio reacional (expressa geralmente como razão molar H₂O₂/substrato) é um fator importante, visto que efeitos inibitórios do H₂O₂ sobre a enzima podem ser causados pelo excesso de H₂O₂ e reduções nas taxas de conversão de substrato podem ser causadas por uma razão molar H₂O₂/substrato inferior ao valor ótimo.

Sakurai *et al.* (2001) avaliaram o efeito da dosagem de H₂O₂ na conversão de bisfenol-A catalisada pela peroxidase de *Coprinus cinereus*. Os autores verificaram que a eficiência aumentou até uma razão molar H₂O₂/substrato entre 1,9 e 2,5, e que acréscimos acima dessa faixa diminuíram a eficiência de remoção. Esses autores verificaram que, se assumissem que a razão molar ótima fosse 2, a razão H₂O₂ por grupo OH se tornaria 1, coincidindo com a razão molar ótima para remoção de fenol relatada por Flock *et al.* (1999 apud SAKURAI *et al.*, 2001) e Vasudevan e Li (1996 apud SAKURAI *et al.*, 2001)).

O ciclo catalítico da lacase (Figura 3.8) mostra que, em suas reações de oxidorredução, o oxigênio molecular atua como acceptor final de elétrons, o que permite que a enzima retorne a seu estado nativo podendo, assim, catalisar a oxidação de outras moléculas de substrato. Portanto, é de se esperar que quanto maior a concentração de oxigênio dissolvido na mistura reacional, maior será a taxa de conversão do substrato. No entanto, não foi encontrado nenhum estudo na literatura avaliando o efeito da concentração de oxigênio dissolvido na conversão de substratos fenólicos. Apesar disso, alguns estudos, como o de Kim e Nicell (2006a) e Auriol *et al.* (2007a), enfatizam em seu procedimento experimental, a necessidade de uma agitação vigorosa da mistura reacional antes da adição de lacase até atingir a saturação de oxigênio.

3.10.3.5 Presença de substâncias que reduzem a inativação da enzima

Mesmo quando as condições experimentais são ajustadas para maximizar a atividade e estabilidade catalítica, as enzimas estão sujeitas à inativação, principalmente devido a interações com os produtos da reação. Após a reação, os produtos devem se desligar do sitio ativo da enzima para não impedir a entrada de outras moléculas de substrato. No entanto, isso não acontece em algumas reações catalisadas por enzimas, devido às fortes interações moleculares do produto com o sitio ativo. Um recurso utilizado para contornar esse problema é a utilização de polímeros que apresentem maior afinidade com os produtos da reação do que a afinidade da enzima pelos produtos.

No caso das peroxidases, o polietilenoglicol (PEG) tem se mostrado um aditivo particularmente efetivo em reduzir a inativação. Dependendo da massa molecular do PEG, da quantidade de enzima e de substrato, pode diminuir a inativação durante as reações enzimáticas de 4 a 200 × (KIM e NICELL, 2006c).

No caso da lacase, aditivos como PEG, Ficoll e poli(vinil álcool) reduzem substancialmente as taxas de inativação da enzima. O PEG é um aditivo particularmente interessante porque não é tóxico e foi declarado próprio para consumo humano pelo FDA dos EUA (agência governamental que regula a liberação da venda de medicamentos e alimentos) (MODARESSI *et al.*, 2005). Kim e Nicell (2006b) verificaram que a adição de 50 mg/L de PEG de 35 kDa ao meio reacional, reduziu em 50% a quantidade de lacase utilizada na conversão de triclosan.

3.10.3.6 Uso de mediadores-redox

Mediadores-redox são compostos de baixa massa molecular que mediam a transferência de elétrons entre compostos que não são substrato e enzimas oxidativas, aumentando assim a gama de compostos que a enzima pode oxidar. No caso das enzimas oxidativas lacase e HRP, que atuam preferencialmente em compostos fenólicos, o uso de mediadores-redox permite que essas enzimas atuem em compostos não-fenólicos. Na Figura 3.9 são mostradas a oxidação de compostos que são substratos de uma enzima oxidativa, bem como a oxidação de compostos que não são substratos, em presença de mediadores-redox. Inicialmente, a enzima em seu estado reduzido transfere seus elétrons para o seu aceptor-final de elétrons (oxigênio, no caso da lacase, e peróxido de hidrogênio no caso da HRP), com isso a enzima passa para o seu estado oxidado. No momento em que ocorrem as interações enzima-substrato, o sítio ativo da enzima abstrai elétrons do substrato e libera o produto oxidado e, com isso, a enzima retorna ao seu estado reduzido novamente. Quando um mediador-redox está presente, este pode ser oxidado pela enzima e, subsequentemente, oxidar outra molécula, que pode ser substrato ou não da enzima, resultando na formação do produto oxidado e na regeneração do mediador. Dessa forma, o uso de mediadores oferece importantes possibilidades para aumentar a gama de compostos que podem ser oxidados pela ação da enzima oxidativa ou para criar modos múltiplos de ataque ao substrato, levando com isso, ao aumento da conversão do composto alvo.

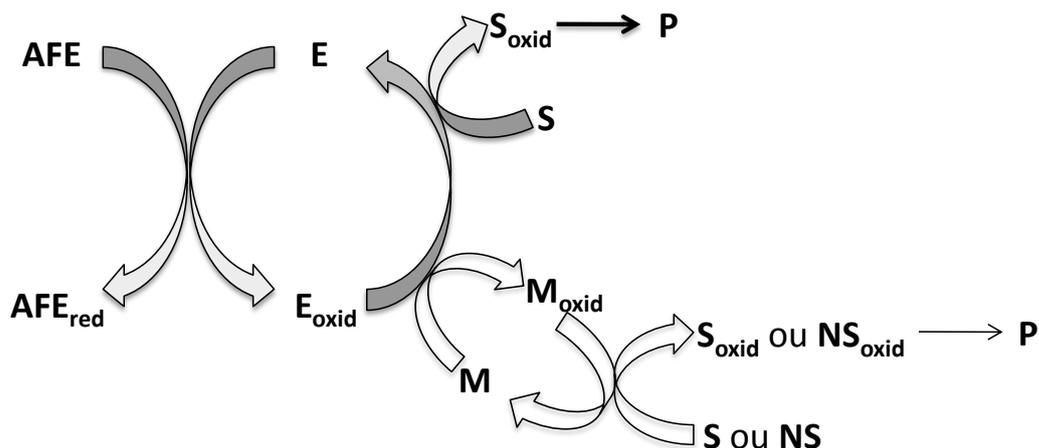


Figura 3.9. Mecanismo de ação dos mediadores-redox. AFE e AFE_{red}: acceptor final de elétrons em seus estados oxidado e reduzido; E e E_{oxid}: enzima em seu estados reduzido e oxidado; S e S_{oxid}: substrato em seu estados reduzido e oxidado; M e M_{oxid}: mediador-redox em seu estados reduzido e oxidado; NS e NS_{oxid}: composto não-substrato em seu estados reduzido e oxidado, respectivamente; P: produtos.

Na literatura são encontrados diversos estudos que utilizam mediadores-redox para aumentar as taxas de conversão de reações catalisadas pela lacase. Murugesan *et al.* (2010), por exemplo, avaliaram o uso de mediadores-redox na conversão de triclosan catalisada por uma lacase do fungo *Ganoderma lucidum* e, entre os vários mediadores testados, o 1-hidroxibenzotriazol (HBT) e siringaldeído aumentaram a conversão de triclosan de 56,5% para 90%, com um tempo de reação de 24 h. Ensaio de toxicidade com a bactéria *Escherichia coli* mostraram que os produtos da reação (dímeros e trímeros) possuem atividade inibitória muito menor do que triclosan. Por outro lado, os estudos sobre o uso de mediadores-redox para reações que utilizam HRP são escassos para aplicações ambientais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste item serão apresentados:

- Os reagentes e acessórios analíticos utilizados nos experimentos e metodologias analíticas;
- As metodologias empregadas na caracterização das enzimas lacase e HRP;
- As técnicas analíticas utilizadas na quantificação de triclosan e H₂O₂ e na determinação da atividade enzimática;
- Os protocolos experimentais utilizados na avaliação da atividade antibacteriana;
- As condições dos experimentos utilizados no estudo dos processos catalisado por lacase e catalisado por HRP na conversão de triclosan em concentrações da mesma ordem de grandeza do seu limite de solubilidade (12 mg.L⁻¹) e em concentrações ambientalmente relevantes.

4.1 Materiais

Preparados enzimáticos contendo lacase de *Trametes versicolor* e HRP foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil) e suas principais características estão descritas na Tabela 4.1.

Os reagentes triclosan, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, ácido cítrico, glicerol, fenol, 4-aminoantipira (AAP), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS), vermelho de fenol, siringaldazina, álcool veratrílico, 3,4-dihidroxibenzoato de etila, siringaldeído, ácido *p*-coumárico, ácido siríngico, pirocatecol e os meios em pó caldo Mueller-Hinton e caldo de soja tríplica foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Peróxido de hidrogênio a 30% (v/v), cloreto de bário, ácido sulfúrico e agar-agar foram adquiridos da VETEC. Metanol absoluto e acetonitrila (ambos grau HPLC) foram adquiridos da Tedia (Brasil).

Os cartuchos para extração em fase sólida OASIS HLB de 6 cc e 200 mg foram adquiridos da Waters.

No ensaio para determinação da atividade antibacteriana foram utilizados frascos

de cultura, tubos criogênicos e microplacas de 96 poços TPP e placas de petri descartáveis e alças microbiológicas da Krall.

A cepa de referência liofilizada da bactéria *Escherichia coli* K12 (ATCC 23716) foi adquirida da “American Type Colection Culture” (ATCC).

No preparo de todas as soluções aquosas, foi utilizada água ultrapura (com resistividade superior a 18,2 MΩ.cm) obtida a partir do sistema Milli-Q Biocell da Millipore.

Tabela 4.1. Principais características dos preparados enzimáticos contendo lacase e HRP comercializados pela Sigma-Aldrich.

	Lacase	HRP
Sinônimo	-	Doador:peróxido de hidrogênio oxidoreductase
EC	1.10.3.2	1.11.1.7
CAS	80948-15-3	9003-99-0
Código do produto	38429	P8125
Nome comercial	Laccase from <i>Trametes versicolor</i>	Peroxidase from horseradish
Atividade nominal	≥ 0,5U/mg	50 a 150U/mg de sólido
Unidade de atividade	1U corresponde a quantidade de enzima que converte 1μmol de catecol por minuto a pH 6,0 e 25°C	1 U corresponde a quantidade de enzima que forma 1,0mg de purpurogalina a partir de pirogalol em 20 segundos a pH 6,0 e 25°C
Fonte biológica	Caldo de cultivo de <i>Trametes versicolor</i>	Raízes da planta <i>Armoracia rustica</i>
Tipo	-	I
Forma	Pó	Pó liofilizado essencialmente livre de sais
Temperatura de armazenamento	2-8°C	2-8°C
Solubilidade	-	10 mg.L ⁻¹ (em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 6,0)

Fonte: [HTTP://sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com), acesso em 26/06/2008.

4.2 Avaliação da pureza e determinação do teor de proteínas dos preparados enzimáticos contendo as enzimas

A pureza dos preparados enzimáticos comerciais contendo lacase e HRP foi avaliada pela técnica SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo

dodecilsulfato de sódio) utilizando gel de corrida 10% e gel de nivelamento 4%. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie. Em canais paralelos às amostras, foi aplicada uma mistura de padrões de massas moleculares da BIO-RAD com as seguintes massas: 250, 150, 100, 75, 50, 37 e 25 kDa.

O teor de proteína dos preparados enzimáticos foi determinado pelo método de Bradford (1976). Este método é baseado na interação entre o corante azul brilhante de Coomassie e moléculas de proteínas com resíduos de aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas. Uma alíquota de 0,1 mL de uma solução de enzima de 5 g.L⁻¹ foi misturada com 1 mL de solução de corante¹ mediante agitação. Após 10 min, foi medida a absorvância a 595 nm em uma cubeta descartável. A concentração de proteína na solução de preparado enzimático foi determinada pela interpolação em uma curva de calibração formada por padrões de albumina de soro bovino com concentrações variando de 0,01 a 0,1 g.L⁻¹. O teor de proteínas no preparado enzimático foi calculado de acordo com a equação 1.

$$\text{T.P.(\%)} = \frac{C_{\text{proteínas}}}{C_{\text{enzima}}} \cdot 100\% \quad (1)$$

Onde: T.P. é o teor de proteínas em % no preparado enzimático, C_{enzima} a concentração de preparado enzimático em solução, em g.L⁻¹, e C_{proteínas} a concentração de proteínas no preparado, em g.L⁻¹, determinada pelo método de Bradford.

4.3 Conversão de triclosan catalisada por lacase

Antes do tratamento com lacase, foram realizados experimentos com a solução de triclosan para avaliar se, durante o período de reação, ocorre remoção de triclosan por outros mecanismos, como adsorção nas paredes dos recipientes, interações moleculares com a enzima ou fotólise pela iluminação utilizada no laboratório (lâmpada a vapor de mercúrio).

Para avaliar a remoção de triclosan por fotólise, 5 mL de triclosan foram agitados em um béquer transparente, exposto a luz de laboratório, em pH 5,0 e 25 °C, durante 6 h (s/ lac; c/ luz). Para avaliar a adsorção nas paredes do recipiente de vidro, o

¹ A solução de corante foi preparada pela dissolução de 100 mg de Coomassie Blue Brilhante em 50 mL de etanol 95 % seguida pela adição de 100 mL de ácido fosfórico 85 % m/v)

experimento foi realizado de modo similar, porém em um ambiente protegido da luz (s/ lac; s/ luz). A remoção de triclosan por interações moleculares com as enzimas foi avaliada por meio da agitação de 5 mL de triclosan, em um béquer de 10 mL na ausência de luz, contendo 0,8 U/mL de lacase inativa, durante 6 h, em pH 2,0 (c/ lac pH 2,0). Esses experimentos foram comparados com o tratamento da solução de triclosan com 0,8 U/mL de lacase, em pH 5,0, na ausência de luz, durante 6 h de agitação (c/ lac pH 5,0).

No tratamento com lacase, a reação foi iniciada pela adição de uma solução-estoque (preparada pela dissolução de preparado enzimático em água ultrapura) com uma concentração de 55,4 mg/mL. Essa solução-estoque possui uma atividade enzimática aproximadamente $50 \times$ superior à utilizada nos experimentos.

4.3.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade da solução-estoque de lacase foi determinada antes seu uso, utilizando um ensaio colorimétrico baseado na oxidação do ABTS. A mistura reacional consistiu de 0,2 mL de solução aquosa de ABTS 20 mmol.L^{-1} , 0,8 mL de tampão citrato-fosfato pH 5,0 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}/0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) saturado de oxigênio e 1 mL solução de lacase em tampão citrato-fosfato pH 5,0. A oxidação de ABTS, formando o radical cátion ABTS ($\text{ABTS}^{\circ+}$), foi monitorada a 420 nm, com coeficiente de extinção molar (ϵ) de $3.600 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 μmol de ABTS em seu radical cátion por minuto em pH 5,0 e 25 °C (FUKUDA *et al.*, 2001).

Para avaliar o efeito do pH na atividade catalítica da lacase, foi utilizado siringaldazina como substrato colorimétrico, segundo metodologia modificada de Szklarz *et al.* (1989), pois a oxidação do triclosan é mais similar à da siringaldazina do que do ABTS. Este método baseia-se na oxidação do substrato enzimático siringaldazina até sua forma quinona, que apresenta absorção em 525 nm ($\epsilon = 65.000 \text{ mol}^{-1}.\text{L.cm}^{-1}$). À uma cubeta de 2 mL, foram adicionados (i) 50 μL de solução-estoque de lacase, (ii) 1750 μL de tampão citrato-fosfato ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de fosfato - $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de citrato), com pH entre 2 e 8, (iii) 200 μL de siringaldazina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e (iv) 0,2 mL de água destilada. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 μmol de siringaldazina por minuto a

25 °C.

4.3.2 Avaliação dos principais fatores que influenciam as reações catalisadas por lacase

As influências dos parâmetros pH e temperatura na conversão de triclosan catalisada por lacase foram avaliadas utilizando uma concentração de triclosan de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ($5,8 \text{ mg.L}^{-1}$), afim de evitar as dificuldades analíticas quando se trabalha com concentrações muito baixas, similares àquelas encontradas em matrizes ambientais (da ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$). Nesses experimentos, as reações enzimáticas foram realizadas em frascos âmbar de 4 mL (*vial*), utilizando um volume reacional de 1 mL. O procedimento experimental consistiu em: (a) transferir volume de solução estoque de lacase, inferior a 5% do volume reacional; (b) adicionar 1 mL de solução de triclosan de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão citrato-fosfato com pH entre 3 e 9 ao frasco (preparada pela dissolução da solução estoque de triclosan em metanol de 10 mmol.L^{-1}) com a enzima; e (c) incubar os frascos em um “shaker” com temperatura controlada (entre 10 e 40 °C) e agitação de 200 rpm. Após um período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de um volume de H_3PO_4 3 mol/L suficiente para reduzir o pH para 2,0. Logo em seguida, as concentrações residuais de triclosan foram determinadas pelo método descrito posteriormente no item 4.5.

4.3.3 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e k_{cat}

Para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} , as reações enzimáticas foram realizadas em um reator de vidro âmbar de 10 mL, descrito na Figura 4.1, utilizando um volume reacional de 5 mL. A agitação foi provida por um agitador magnético. A temperatura de 25 °C foi controlada por meio de um banho térmico (TE 184, Tecnal, Brasil). Foram utilizadas soluções de triclosan com concentrações de 3 a $30 \mu\text{mol/L}$ em tampão citrato-fosfato pH 5,0 (10 mmol.L^{-1} - 20 mmol.L^{-1}).

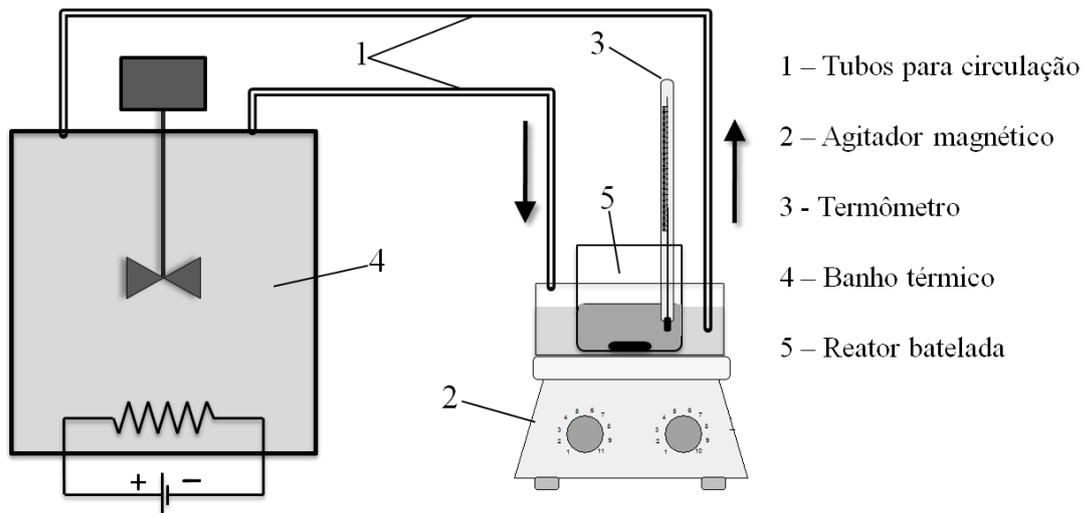


Figura 4.1. Desenho esquemático do reator batelada com temperatura controla por um banho térmico utilizado nas reações enzimáticas para determinação dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e k_{cat} .

Inicialmente, um volume de 5 mL de solução de triclosan foi agitado até atingir equilíbrio térmico (com o ambiente) e a saturação de oxigênio. Após determinação da atividade enzimática da solução-estoque de lacase, transferiu-se 15 U de lacase ao reator, atingindo uma atividade inicial de 3,0 U/mL no meio reacional. Alíquotas de 100 μL do meio reacional foram retiradas nos tempos 10, 40, 100 e 220 s e transferidas para frascos âmbar (vials) de 1 mL, os quais continham 100 μL de H_3PO_4 a 0,21 mol.L^{-1} para interromper a reação. As concentrações residuais de triclosan foram determinadas pelo método descrito posteriormente no item 4.5.

O parâmetro k_{cat} foi determinado de acordo com a equação 2:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]} \quad (2)$$

Onde $[E]$ é a concentração molar de enzima no meio reacional, V_{max} é taxa máxima de conversão de substrato estimada por meio do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

A concentração molar de lacase no meio reacional foi determinada conforme descrito na equação 3.

$$[\text{LAC}] (\text{mol/L}) = \frac{\frac{\text{A.E.}_{\text{reação}} (\text{U/mL})}{\text{A.E.}_{\text{solução-estoque}} (\text{U/mL})} \cdot C_{\text{enzima}} (\text{mg/L}) \cdot \frac{\text{T.P.} (\% \text{ m/m})}{100\%}}{Mr_{\text{lacase}} (\text{Da})} \quad (3)$$

Onde: [LAC] é a concentração de lacase no meio reacional (em mol/L), A.E._{reação} a atividade de lacase (em U/mL) no meio reacional, C_{enzima} a concentração de enzima comercial na solução-estoque, A.E._{solução-estoque} a atividade (em U/mL) da solução-estoque de lacase, Mr_{lacase} a massa molecular da lacase (determinada no item 4.2) e T.P. o teor de proteínas (em % m/m) da lacase comercial (determinado no item 4.2).

4.4 Conversão de triclosan catalisada por HRP

Antes do tratamento com HRP, foram realizados experimentos com a solução de triclosan para avaliar se, durante o período de reação, ocorre remoção de triclosan por outros mecanismos, como adsorção no vidro ou plástico dos recipientes, interações moleculares com a enzima ou fotólise pela iluminação do laboratório (lâmpada a vapor de mercúrio). Nesses experimentos a solução de triclosan foi agitada em um béquer transparente, em pH 7 e 25 °C, com enzima inativa e por um período máximo de 6 h.

No tratamento com HRP, a reação foi iniciada pela adição de uma solução-estoque (preparada pela dissolução da enzima em pó em água ultrapura) com uma concentração de 0,1 mg/mL. Essa solução-estoque possui uma atividade enzimática aproximadamente 30 vezes superior à utilizada nos experimentos.

4.4.1 Determinação da atividade enzimática

Para determinar a atividade de HRP, foram utilizados os ensaios colorimétricos com fenol/AAP e com ABTS.

No primeiro ensaio, o fenol atua como substrato redutor e AAP (4-aminoantipirina) como substrato cromogênico e a enzima HRP catalisa a conversão de moléculas de fenol a radicais fenóxi. Esses radicais reagem com AAP e H₂O₂ formando o corante quinoneimina. Esse ensaio não é indicado para medir a atividade enzimática durante a conversão de triclosan, devido à interferência dos produtos da reação (ZHANG e NICELL, 2000). O ensaio utiliza uma mistura reacional composta

por 10 mmol.L^{-1} de fenol, $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2O_2 em tampão fosfato pH 7,4 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), $2,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ de AAP e solução contendo HRP, em um volume total de 1mL. Uma unidade de atividade foi definida como o número de micromoles de H_2O_2 consumido por minuto a pH 7,4 e 25°C , que é proporcional à taxa de formação de quinoneimina ($\epsilon_{510 \text{ nm}} = 7.100 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A absorvância a 510 nm foi monitorada a cada segundo durante 1 min após o início da reação (NICELL e WRIGHT, 1997; WAGNER e NICELL, 2002).

No segundo ensaio, o substrato colorimétrico ABTS é oxidado na presença de H_2O_2 , formando o radical cátion ABTS ($\text{ABTS}^{\circ+}$). A taxa de formação desse radical cátion (que é proporcional à atividade enzimática) foi monitorada pela absorvância em 405 nm ($\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A mistura reacional consistiu de 0,170 mL de solução aquosa de ABTS 20 mmol.L^{-1} , 0,660 mL de tampão fosfato pH 6,0 ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), 1 mL de amostra contendo a enzima HRP em tampão pH 6,0 e 0,170 mL de H_2O_2 10 mmol.L^{-1} . Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que converte $1 \mu\text{mol}$ de ABTS em seu radical cátion por minuto em pH 6,0 e 25°C .

Foram preparadas soluções com quantidades de HRP na faixa utilizada nos tratamentos e suas atividades foram medidas por ambos os métodos (fenol/AAP e ABTS). Verificou-se uma relação linear entre os valores de atividade obtidos por esses métodos, conforme mostrado na Figura 4.2. A relação linear entre as unidades de atividade foi utilizada para converter unidade de atividade com ABTS (U_{ABTS}) em unidade de atividade com PhOH/AAP ($U_{\text{PhOH/AAP}}$) no tratamento de uma solução de triclosan em concentração ambientalmente relevante.

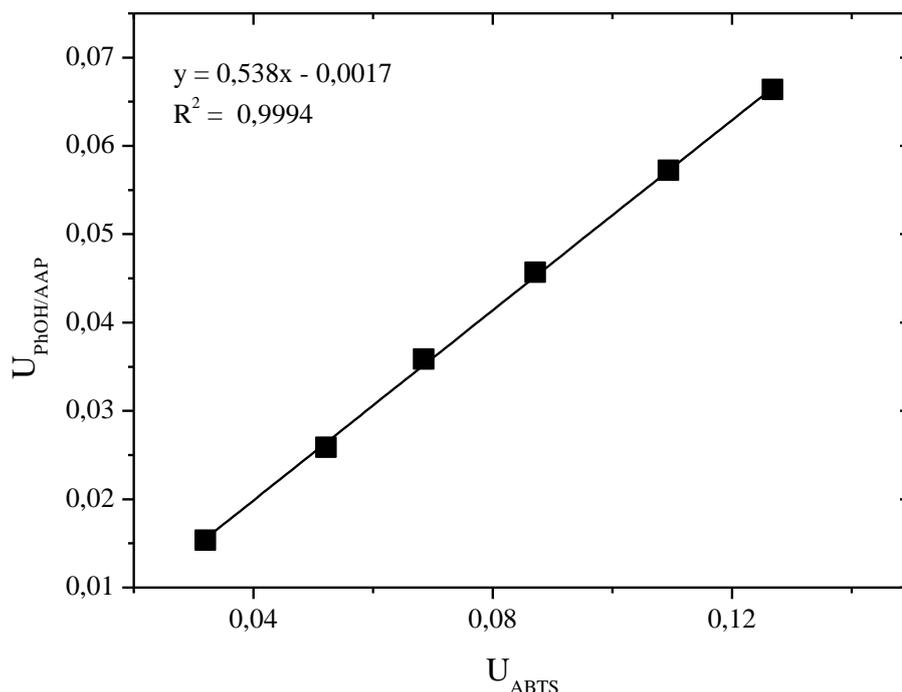


Figura 4.2. Correlação entre as unidades de atividade medida com fenol/AAP e atividade medida com ABTS.

4.4.2 Determinação de H_2O_2 durante a cinética de conversão de triclosan

Para a determinação da concentração de H_2O_2 durante a conversão de triclosan catalisada por HRP, foi utilizada HRP e vermelho de fenol, seguindo os procedimentos descritos por Kerem *et al.* (1999) e com modificações necessárias para que as reações fossem realizadas nos poços de uma microplaca.

Em intervalos regulares, foram retirados 400 μL do meio reacional e transferidos para quatro poços (sendo 100 μL em cada um). Em seguida, adicionaram-se: (i) 60 μL de tampão succinato de sódio pH 4,6 (100 mmol.L^{-1}), (ii) 20 μL de vermelho de fenol a 0,100 mg/L e (iii) 20 μL de HRP 98 mg/L em cada poço. Agitou-se a microplaca durante 5 min em um mini-shaker e, em seguida, adicionou-se 20 μL de KOH a 1 mol.L^{-1} para interromper a reação. A absorbância em 620 nm nos poços foi lida em uma leitora de microplacas da BIO-TEK modelo EL808. Foi obtida uma curva de calibração com 12 concentrações de H_2O_2 e em 4 réplicas, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras. A concentração de H_2O_2 comercial (de

35,3% v/v) foi determinada por espectrofotometria em 230 nm, no qual o coeficiente de extinção molar é $81 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.4.3 *Avaliação dos principais parâmetros que influenciam a conversão de triclosan catalisada pela HRP*

As influências dos parâmetros pH, temperatura, razão molar H_2O_2 /triclosan, presença de mediador-redox, tempo de reação e concentração de enzima na conversão de triclosan catalisadas por HRP foram avaliadas utilizando uma concentração de triclosan de $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($5,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Considerando que os efeitos desses parâmetros serão similares em concentrações da ordem de $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ou da ordem de $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, essa concentração de triclosan nesses experimentos foi selecionada de modo que fossem evitadas as dificuldades analíticas quando se trabalha com concentrações muito baixas, similares às aquelas encontradas em matrizes ambientais (da ordem de $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ou mesmo em $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$).

As condições dos experimentos utilizados para avaliar os efeitos dos principais parâmetros reacionais estão mostradas na Tabela 4.2..

Tabela 4.2. Condições dos experimentos utilizados para avaliar o efeito dos principais parâmetros (pH, temperatura, razão molar $[H_2O_2]/$ triclosan, dose de HRP, tempo de reação e presença de mediador) da conversão de triclosan catalisada por HRP. A concentração inicial de triclosan foi de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

PARÂMETRO AVALIADO						
CONDIÇÕES REACIONAIS	pH	Temperatura	$[H_2O_2]/$ [triclosan]	Dose de HRP	Tempo	Mediador
pH	3-9 ^a	7	7	7	7	7
Temperatura (°C)	25	10-40 ^b	25	25	25	25
Razão molar H_2O_2 /triclosan	1,5	1,5	0-1 ^c	1,5	1,5	1,5
Atividade inicial de HRP (U/mL)	0,10	0,10	0,10	0,1-1,0 ^d	0,25-1 ^e	0,10
Tempo de reação (min)	60	60	60	60	0-360 ^f	60
Razão molar mediador/triclosan	-	-	-	-	-	1 ^g

^a Os valores de pH avaliados foram 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Os experimentos foram realizados em duplicata.

^b As temperaturas avaliadas foram 10, 20, 30 e 40 °C

^c As concentrações utilizadas de H_2O_2 foram de: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15 e $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$

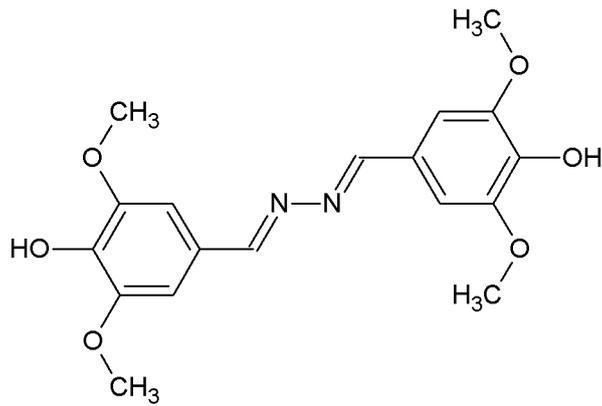
^d As atividades iniciais de HRP foram de 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 U/mL.

^{e,f} Foram realizadas quatro cinéticas, com medidas da concentração de triclosan nos tempos de 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 360 min. Foram utilizadas as seguintes atividades iniciais de HRP: 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 U/mL.

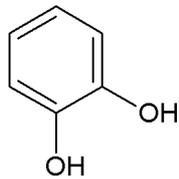
^g Os mediadores-redox foram testados individualmente no meio reacional. Um experimento sem mediador foi utilizado para fins de comparação. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e simultaneamente.

Nesses experimentos, as reações enzimáticas foram realizadas em frascos âmbar (*vials*) de 4 mL, com volume reacional de 1 mL. Volumes apropriados (inferiores a 5% do volume reacional) da solução-estoque de HRP foram adicionados aos vials. A dosagem de enzima variou de 0,1 a 1,0 U/mL. A reação foi iniciada pela adição de solução de triclosan $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com H_2O_2 , em tampão citrato-fosfato em diferentes pH ao vial contendo a enzima, com ou sem mediador-redox. A razão molar H_2O_2 /triclosan dessas soluções variou de 0,1 a 1,0 e o pH de 3 a 9. Em seguida, os vials foram mantidos em uma incubadora com agitação orbital em uma determinada temperatura (entre 10 e 40 °C) e agitação de 200 rpm. A reação nos frascos foi interrompida pela adição de um volume de H_3PO_4 a 3 mol.L^{-1} suficiente para reduzir o pH do meio reacional para 2,0. As concentrações residuais de triclosan foram determinadas de acordo com o método descrito posteriormente, no item 4.5. O efeito da adição de mediador-redox no meio reacional contendo triclosan, H_2O_2 e HRP foi avaliado na proporção molar (mediador/triclosan) de 1,0. As estruturas químicas dos mediadores-redox testados estão mostradas na Figura 4.3.

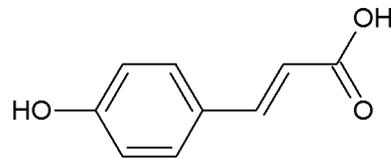
Siringaldazina



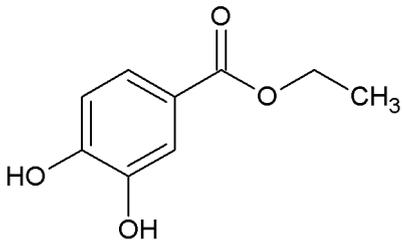
Catecol



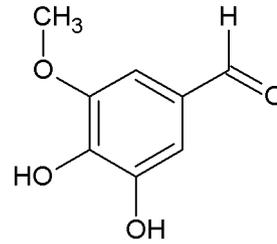
Ácido *p*-coumárico



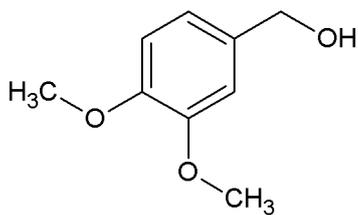
Protocatecuato



Siringaldeído



Álcool veratrílico



Ácido siríngico

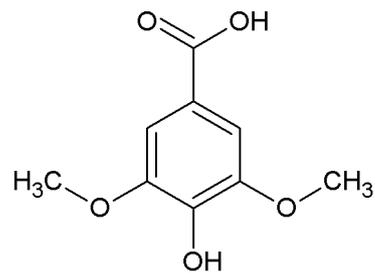


Figura 4.3. Estruturas químicas dos mediadores redox siringaldazina, catecol, ácido *p*-coumárico, protocatecuato (DHBE), siringaldeído, álcool veratrílico e ácido siríngico.

4.4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e k_{cat}

Para a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} , as reações enzimáticas foram realizadas no reator descrito na Figura 4.1. Misturas de H_2O_2 /triclosan foram preparadas em tampão citrato-fosfato (10 mmol.L^{-1} - 20 mmol.L^{-1}) com concentração de triclosan entre 3 e $30 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ e uma razão molar H_2O_2 /triclosan de 1,5.

Uma alíquota de 5 mL da mistura de H_2O_2 /triclosan foi transferida para o reator e, após atingir equilíbrio térmico, 5.0 U de HRP foi adicionado. Subsequentemente, alíquotas de 100 μL foram retiradas em intervalos de 30 s e transferidas para vials âmbar contendo 100 μL de H_3PO_4 a $0,21 \text{ mol.L}^{-1}$ para interromper a reação. Esse procedimento foi realizado para cada uma das concentrações de triclosan utilizadas. As concentrações residuais de triclosan foram determinadas de acordo com o método descrito no item 4.5. Os dados foram utilizados para determinar as taxas iniciais de reação e os gráficos de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk permitiram estimar os parâmetros K_m e V_{max} .

O parâmetro k_{cat} foi determinado por meio da equação (2, utilizando a concentração molar de HRP no meio reacional estimada por meio da equação 4:

$$[\text{HRP}](\text{mol/L}) = \frac{A.E_{\text{reação}}(\text{U/mL})}{A.E_{\text{solução-estoque}}(\text{U/mL})} \cdot [\text{HRP}]_{\text{solução-estoque}}(\text{mol/L}) \quad (4)$$

Onde: $[\text{HRP}]$ é a concentração de HRP no meio reacional (em mol/L), $A.E_{\text{reação}}$ a atividade de HRP (em U/mL) no meio reacional, $A.E_{\text{solução-estoque}}$ a atividade (em U/mL) da solução-estoque de HRP, $[\text{HRP}]_{\text{solução-estoque}}$ a concentração (em mol/L) da solução estoque de HRP determinada por espectrofotometria em 403 nm ($\epsilon_{403\text{nm}} = 0,102 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), de acordo com o procedimento descrito em Smith *et al.* (1992).

4.4.5 Conversão de triclosan em concentração ambientalmente relevante

A concentração de triclosan utilizada ($10 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$) foi similar às concentrações relatadas em efluentes de ETE (KANTIANI *et al.*, 2008). A solução foi preparada pela dissolução de um volume apropriado de solução-estoque de triclosan de 10 mmol.L^{-1} em tampão citrato-fosfato (10 mmol.L^{-1} - 20 mmol.L^{-1}) com H_2O_2 com uma razão molar

H₂O₂/triclosan de 1,5. As reações enzimáticas foram realizadas em um volume reacional de 200 mL em frascos de vidro âmbar de 500 mL (Duran, Schott), que foram incubados em uma incubadora com agitação a 25 °C. Quatro experimentos foram realizados simultaneamente com as seguintes atividades iniciais de HRP: 0, 0,5, 1,0 e 2,0 U/mL. Após 5 h de reação, ácido fosfórico concentrado foi adicionado à mistura reacional para reduzir o seu pH a 2,2. Logo em seguida, as amostras foram concentradas por extração em fase sólida, reconstituídas com 200 µL de acetonitrila/água pH 2,2 (55:45) e mantidas sob refrigeração (-20 °C) até o momento da análise cromatográfica, conforme mostrado no fluxograma da Figura 4.4.

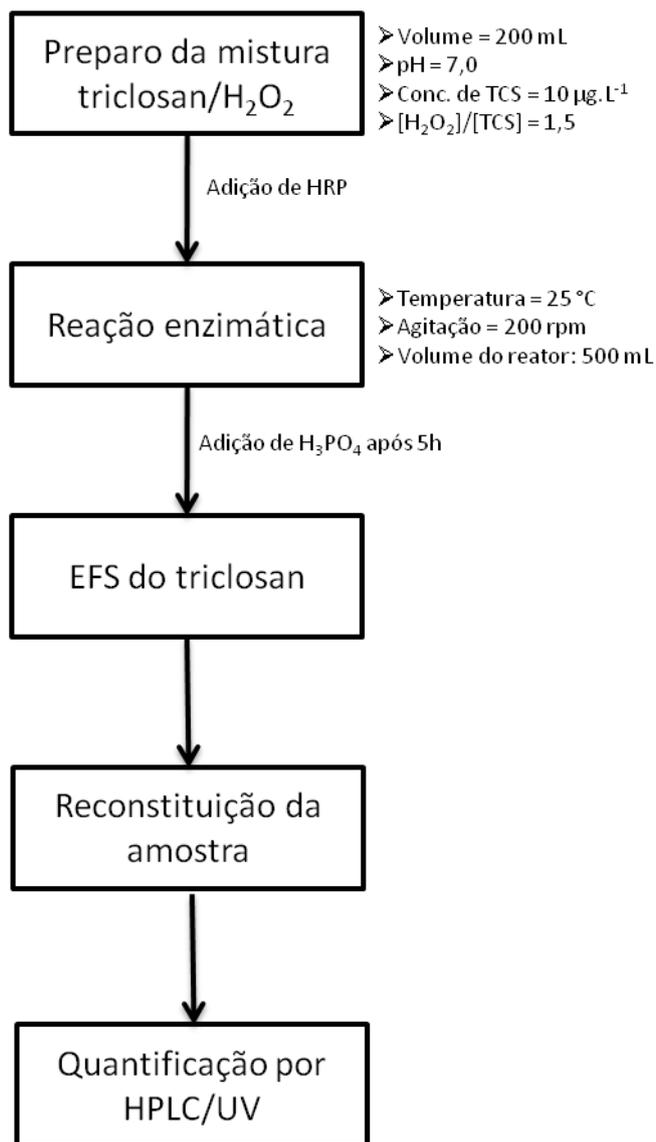


Figura 4.4. Fluxograma mostrando as etapas do procedimento experimental utilizado na conversão de triclosan catalisada por HRP em uma concentração ambientalmente relevante.

Cartuchos Oasis HLB cartridges (200 mg, 6 cc) da Waters (EUA) foram usados para a extração do triclosan das soluções tratadas. O sistema utilizado para a extração em fase sólida, com bomba de vácuo, manifold e cartuchos, está mostrado na Figura 4.5.

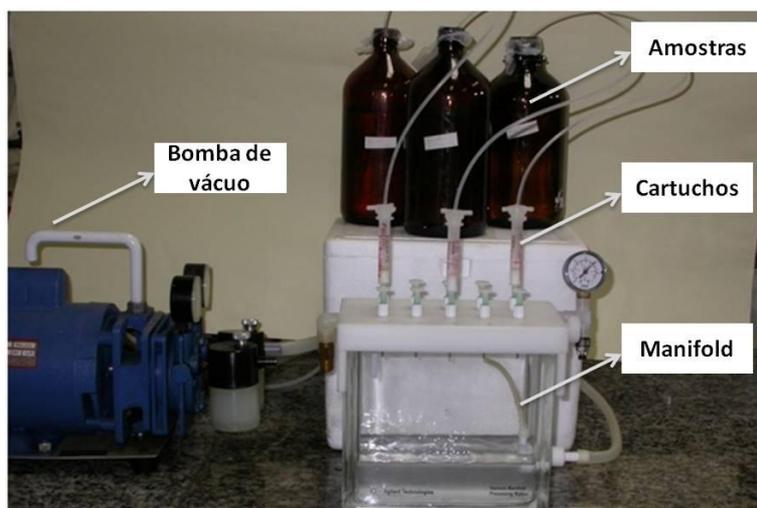


Figura 4.5. Aparato experimental utilizado para a extração em fase sólida das amostras de triclosan em concentração ambientalmente relevante.

Inicialmente, os cartuchos foram condicionados com a passagem de 2×3 mL de metanol seguido pela passagem de 2×3 mL de água em pH 2,2. Em seguida, as amostras (200 mL) foram passadas pelos cartuchos a uma vazão de 1 mL/min. Os cartuchos foram lavados com 2×3 mL de uma mistura de água/metanol a 5% (v/v) em pH 2,2 e secos com o auxílio de vácuo. O analito foi eluído dos cartuchos com 2×2 mL de metanol absoluto e o eluato coletado em um frasco âmbar de 4 mL (*vial*). O metanol foi evaporado sob um fluxo suave de nitrogênio, conforme mostrado no fluxograma da Figura 4.6. Os frascos com os extratos secos foram guardados em um dessecador até o momento em que foram reconstituídos com a fase móvel.

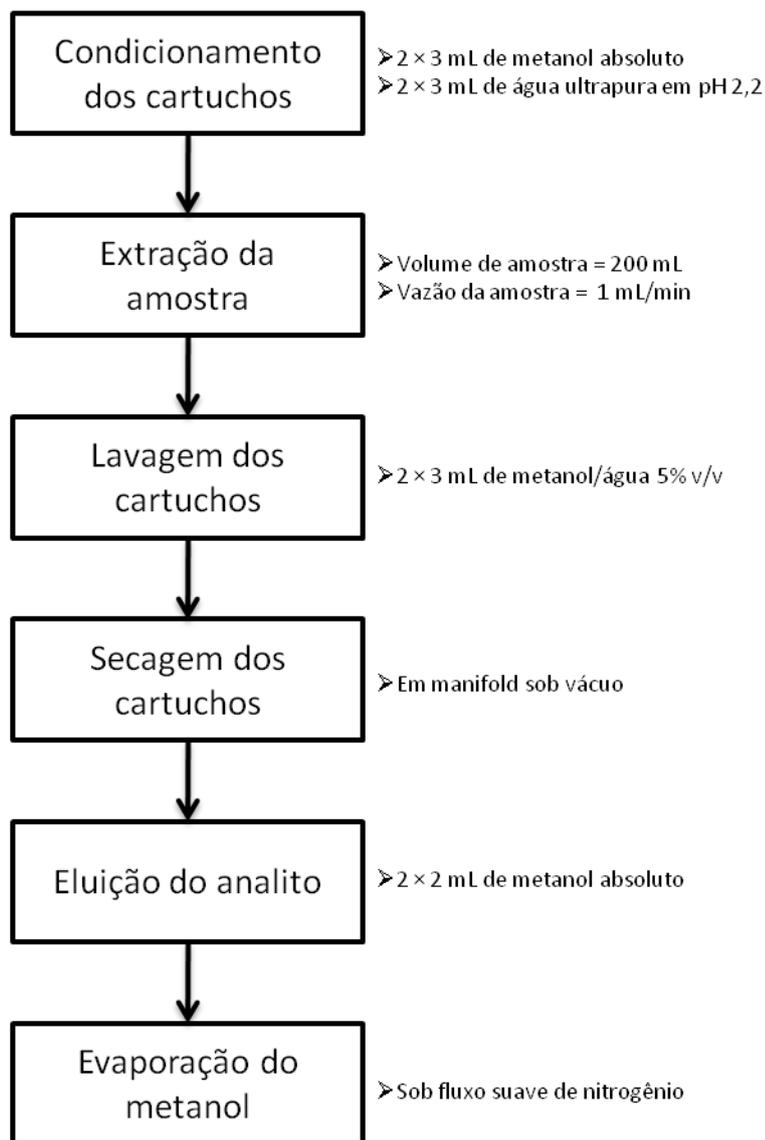


Figura 4.6. Fluxograma mostrando as etapas do procedimento experimental utilizado na extração em fase sólida (EFS) das amostras de triclosan em concentração ambientalmente relevante.

4.5 Determinação da concentração de triclosan

A concentração de triclosan foi determinada por meio de um equipamento de cromatografia da Shimadzu modelo LC-20A, equipado com uma coluna C18 da Shimadzu modelo Shim-Pack VP-ODS (tamanho 250,0 × 4,6 mm) e um detector UV/VIS. A temperatura da coluna foi mantida em 40 °C. O volume de amostra injetado na coluna foi de 20 µL e a detecção do triclosan foi realizada no comprimento de onda de 280 nm.

Para as amostras provenientes das reações com uma concentração inicial de triclosan de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, catalisadas por lacase e HRP, foi utilizada uma fase móvel composta por acetonitrila (80% v/v) e água ultrapura em pH 2,2 (20% v/v), a uma vazão de 1,3 mL/min.

Para as amostras provenientes do tratamento com HRP de uma solução de triclosan com uma concentração inicial de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (concentradas por EFS e reconstituídas com a própria fase móvel) foi utilizada uma fase móvel composta por acetonitrila (55% v/v) e água ultrapura em pH 2,2 (45% v/v), a uma vazão de 2,0 mL/min.

4.6 Determinação da atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana das amostras obtidas dos tratamentos enzimáticos foi avaliada por meio de um ensaio em que é medida a inibição do crescimento da *Escherichia coli* K12 na presença das soluções serialmente diluídas. Foi utilizado o protocolo descrito por Suarez *et al.* (2007) com as modificações necessárias para que o ensaio fosse realizado em microplacas de 96 poços, ao invés de tubos de cultura. A seguir serão descritos os procedimentos utilizados na reidratação da cepa de referência liofilizada, no preparo das culturas de estoque, do pré-inóculo e das culturas de trabalho, na realização do ensaio e na análise dos dados.

4.6.1 Preparo das culturas de estoque

Inicialmente, a cepa de referência liofilizada (adquirida da ATCC) foi reidratada com 10 mL de caldo Mueller-Hinton (M-H) estéril e em seguida transferida para um frasco de cultura estéril de 25 cm^2 , conforme fluxograma apresentado na Figura 4.7. A cepa recém-hidratada também foi utilizada para inocular duas placas de petri com agar M-H para verificar a pureza das colônias. De acordo com as instruções do manual da ATCC para essa cepa, as colônias devem ser uniformes, com aspecto molhado, circulares e um pouco mais turvas que o agar. Após incubação por 24 h a 37°C e 150 rpm, a cultura em meio líquido foi utilizada para inocular mais dois frascos com 10 mL de caldo M-H, que foram incubados nas mesmas condições (1º repique). Mais dois repiques foram realizados, sendo que as culturas do 3º repique foram utilizadas para o preparo das culturas de estoque. As culturas de estoque foram preparadas pela

adição de 1 mL da cultura proveniente do 3º repique em cada tubo criogênico contendo 1 mL de glicerol a 40% (v/v) estéril, após isso os tubos foram mantidos sob refrigeração a -20 °C.

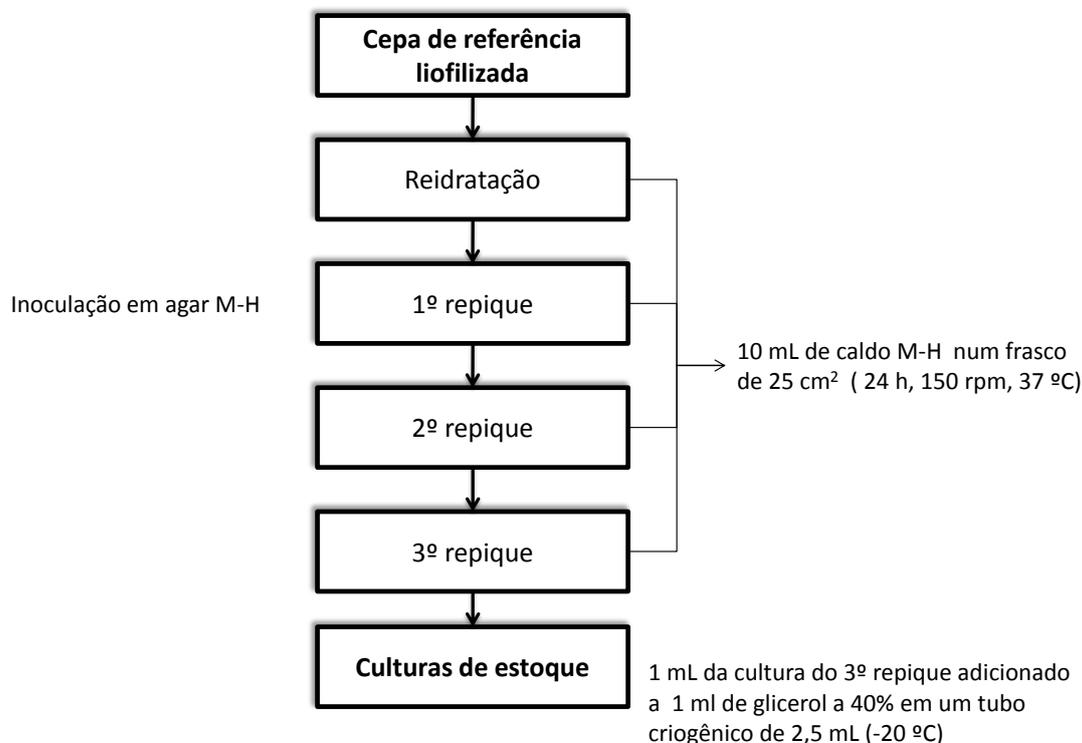


Figura 4.7. Sequência das etapas utilizadas na reidratação da cepa de *E. coli* K12 liofilizada da ATCC e na preparação das culturas de estoque.

4.6.2 Preparo das culturas de trabalho e do pré-inóculo

Um tubo criogênico com a cultura estoque obtida no item anterior foi descongelado sob condições assépticas e, em seguida, utilizado para inocular duas placas com agar M-H (primeiro repique), que foram incubadas por 24 h a 37 °C. Mais dois repiques seriais foram realizados, nas mesmas condições de incubação, para obter as culturas de trabalho. Essas culturas foram armazenadas a 5 °C, por no máximo um mês. Cada placa com a cultura de trabalho foi utilizada uma única vez para um novo repique.

As culturas de *E. coli* K12 utilizadas no ensaio (pré-inóculo), foram preparadas sempre no dia anterior à realização do ensaio. Com o auxílio de uma alça

microbiológica estéril, uma colônia individual de uma placa da cultura de trabalho, foi transferida para um frasco de cultura contendo 10 mL de caldo M-H estéril. Essa cultura foi incubada (37 °C e 150 rpm) em uma incubadora com plataforma de agitação (Nova Ética, modelo 430DB), durante a noite. No dia seguinte, de manhã, a densidade do inóculo foi ajustada, diluindo a cultura com caldo M-H, até atingir uma densidade de 1×10^8 UFC/mL, isto é, quando a absorvância a 625 nm do meio se igualava à absorvância de uma solução padrão de 0,5 de McFarland. Essa solução foi preparada de acordo com o protocolo a seguir:

- Acrescentou-se uma alíquota de 0,5 mL de BaCl_2 $0,048 \text{ mol.L}^{-1}$ (1,175% m/v de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 mL de H_2SO_4 $0,18 \text{ mol.L}^{-1}$ (1% v/v), agitando constantemente para manter a suspensão;
- Verificou-se a densidade correta do padrão McFarland através de um espectrofotômetro (Shimadzu, UVmini-1240) com fonte de luz de 1 cm e cubetas vidro. A absorvância em 625 nm deve variar de 0,08 a 0,10;
- Transferiu-se a suspensão de BaSO_4 , em alíquotas de 4 a 6mL, para tubos com tampa de rosca. Esses tubos foram selados hermeticamente e armazenados em local escuro, a temperatura ambiente;
- Agitou-se vigorosamente o controle de BaSO_4 em um agitador mecânico do tipo vórtex antes do uso.

4.6.3 Diluição das amostras e ensaio

Foram utilizados dois procedimentos (I e II) para a diluição de uma amostra na microplaca de 96 poços (geometria 8×12 e volume do poço de 300 μL). Em ambos os procedimentos, a amostra foi diluída serialmente na proporção 2:1 com tampão fosfato estéril (1 mmol.L^{-1} pH 8,0), de modo a obter diluições diferentes ao longo das linhas e iguais ao longo das colunas. No caso da curva padrão de triclosan, foi utilizada uma solução de triclosan de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ preparada pela dissolução da solução-estoque de triclosan em tampão fosfato.

O procedimento I foi realizado da seguinte maneira:

- Foram adicionados 100 μL de tampão fosfato nos poços de A2 a H12 (Figura 4.8a) com o auxílio de uma micropipeta de oito canais;

- 300 μL da amostra foram transferidos para os poços de A1 a H1 (Figura 4.8b);
- 200 μL foram pipetados de cada um dos poços da coluna 1 (com o auxílio da micropipeta de 8 canais), transferidos para os poços adjacentes da coluna 2 e, para homogeneizar a amostra diluída nesses poços (da coluna 2), 200 μL foram aspirados e dispensados pelo menos três vezes (Figura 4.8c);
- A etapa anterior foi repetida da coluna 2 para a coluna 3 e assim sucessivamente até a coluna 11, onde, após a homogeneização, foram retirados e descartados 200 μL de cada um dos poços (Figura 4.8d), de modo que após a diluição todos os poços tivessem o mesmo volume de 100 μL .

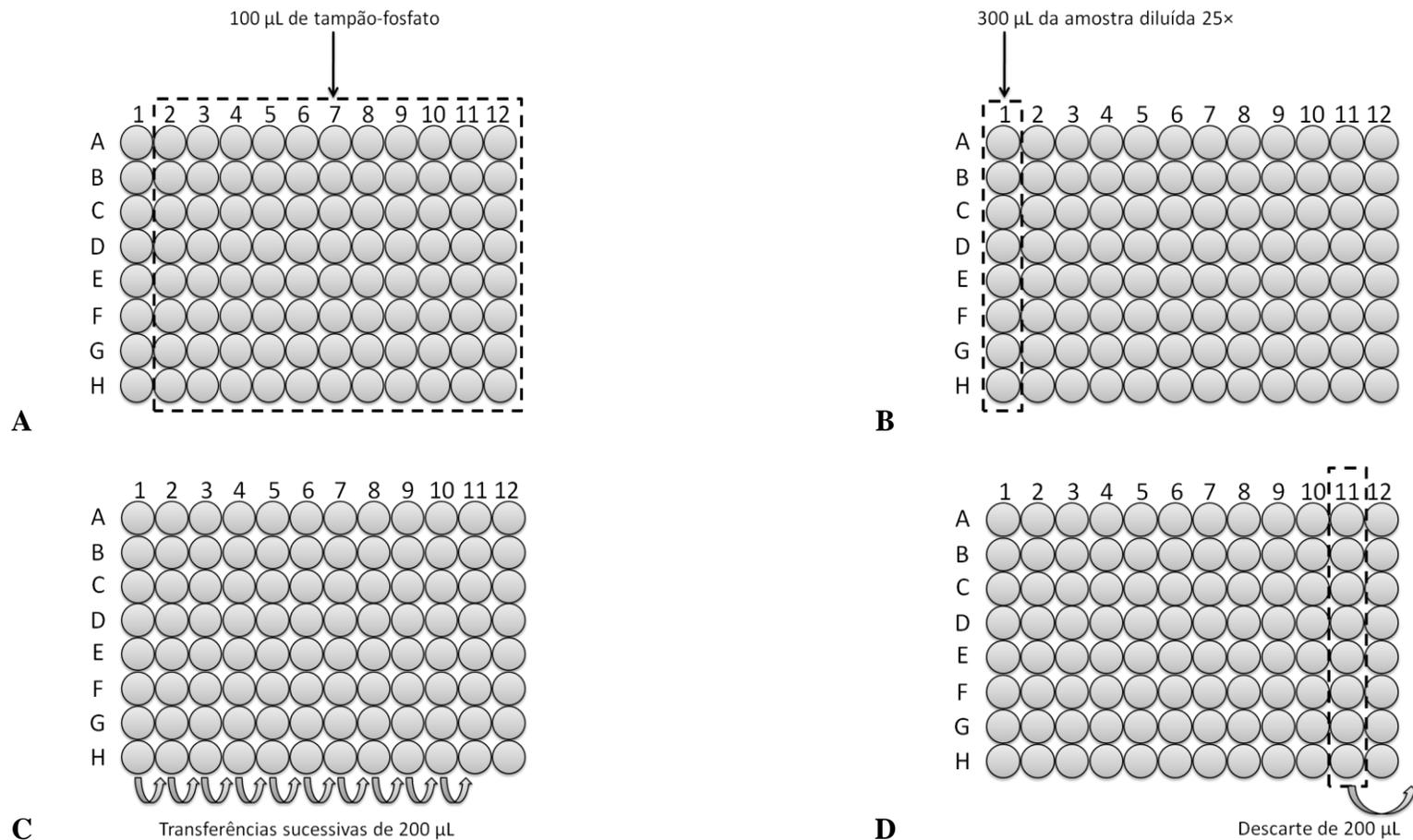


Figura 4.8. Procedimento I utilizado na diluição serial 2:1. (A) 100 µL de tampão fosfato são adicionados nos poços de A2 a H12; (B) 300 µL da amostra foram transferidos para os poços da coluna 1; (C) 200 µL são simultaneamente transferidos dos poços da coluna 1 para os poços adjacentes da coluna 2, homogeneizados, e transferidos da coluna 2 para a 3 e, assim sucessivamente, até a coluna 11; (D) 200 µL são descartados dos poços da coluna 11.

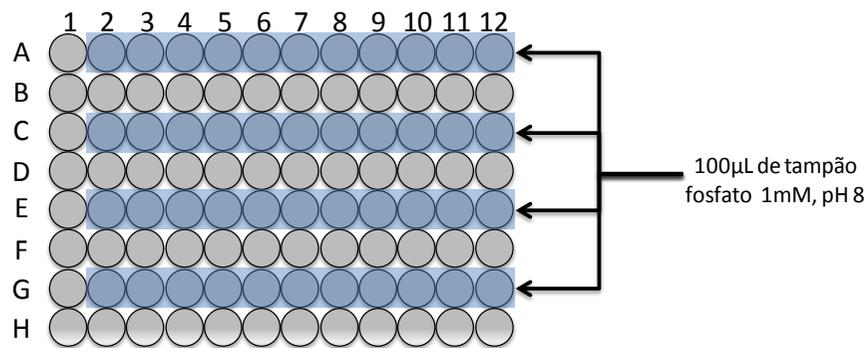
Após a diluição serial 2:1, seguindo o procedimento I, cada coluna continha a amostra com um determinado fator diluição, em oito réplicas, e a coluna 12 continha apenas tampão (controle negativo), conforme mostrado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Fatores de diluição da amostra nos poços da microplaca após a diluição serial 2:1 seguindo o procedimento I.

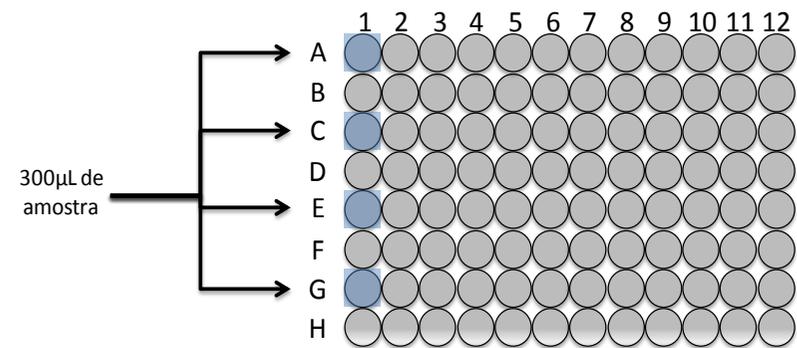
Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha												
A	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0
B	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0
C	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0
D	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0
E	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0
F	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0
G	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0
H	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0

A sequencia de etapas utilizada no procedimento II foi a seguinte:

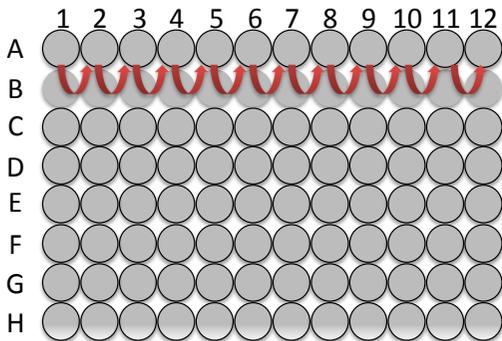
- Foram adicionados 100 μL de tampão fosfato nos poços: A2 a A12, C2 a C12, E2 a E12 e G2 a G12 com o auxílio de uma micropipeta de 12 canais, conforme mostrado na Figura 4.9a;
- 300 μL da amostra foram transferidos para os poços de A1, C1, E1 e G1, conforme mostrado na Figura 4.9b;
- Foram pipetados 200 μL do poço A1 com uma micropipeta monocanal e dispensados no poço A2 e, nesse mesmo poço, aspirados e dispensados pelo menos três vezes para homogeneizar a amostra; essa etapa foi repetida do poço A2 para o A3 e, assim sucessivamente até o A12, onde, após a homogeneização, foram retirados e descartados 200 μL (Figura 4.9c);
- A etapa anterior foi repetida para as linhas C, E e G (Figura 4.9c);
- 100 μL de tampão fosfato foram transferidos para os poços das linhas B, D, F e H (controle negativo), conforme mostrado na Figura 4.9d.



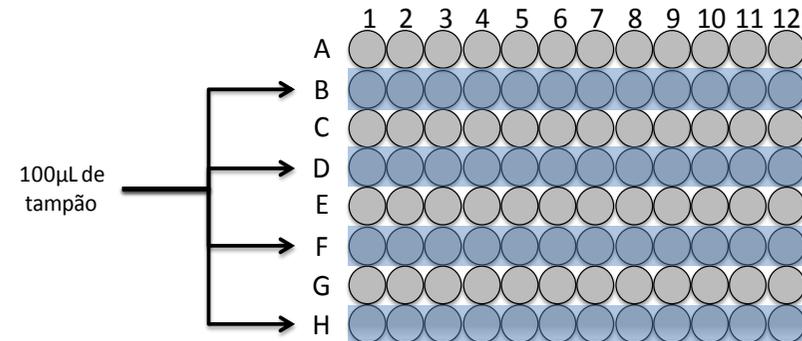
A



B



C



D

Figura 4.9. Procedimento II utilizado na diluição serial 2:1 da amostra para o ensaio de atividade antibacteriana. (A) 100 µL de tampão fosfato são transferidos para os poços de A2 a A12, de C2 a C12, de E2 a E12 e de G2 a G12; (B) 300 µL da amostra são transferidos para os poços A1, C1, E1 e G1; (C) 200 µL do poço A1 são transferidos para o poço A2, homogeneizado, e assim sucessivamente até o poço A12; o procedimento é repetido para as fileiras C, E e G; (D) 100 µL de tampão são transferidos para os poços das fileiras B, D, F e H.

Após a diluição serial 2:1, seguindo o procedimento II, as linhas A, C, E e G continham as diluições seriais da amostra, com 4 réplicas para cada um dos 12 fatores de diluição, e as linhas B, D, F e H continham apenas tampão (controle), conforme mostrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Fatores de diluição da amostra nos poços da microplaca após a diluição serial 2:1 seguindo o procedimento II.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha												
A	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0,011
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0,011
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0,011
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	1,000	0,667	0,444	0,296	0,198	0,132	0,088	0,0585	0,039	0,026	0,017	0,011
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Após a diluição serial da amostra (seja pelo procedimento I ou II), cada um dos poços da microplaca foi inoculado com 100 µL de uma cultura de *E. coli* K12 de 1×10^6 UFC/mL preparada pela diluição do pré-inóculo com caldo M-H estéril. Após a adição de inóculo na proporção 1:1, as concentrações de triclosan nos poços (ou os fatores de diluição da amostra) foram reduzidas à metade. Em seguida, a microplaca foi tampada, selada com fita crepe e incubada por 8 h a 37 °C e 200 rpm. Após esse período, a microplaca foi agitada vigorosamente para ressuspender as células depositadas e as absorbâncias dos poços foram medidas a 620 nm, em uma leitora de microplacas (BIO-TEK modelo EL808).

4.6.4 Análise dos dados

As medidas de absorbância foram convertidas em inibição do crescimento em porcentagem I de acordo com a equação 5.

$$I = \frac{(A_{A12-H12} - A)}{(A_{A12-H12} - A_{A1-H1})} \times 100 \quad (5)$$

Onde $A_{A12-H12}$ é a média das leituras de absorbância dos poços de A12 a H12 (controle negativo), A é a absorbância de um determinado poço e A_{A1-H1} é a média da absorbância dos poços de A1 a H1 em que a inibição foi de 100% (controle positivo).

As curvas dose-resposta foram obtidas pelo gráfico da inibição do crescimento *versus* fator de diluição (FD). As curvas obtidas foram ajustadas aos modelos sigmoidais logístico e dose-resposta, descritos nas equações 6 e 7, respectivamente:

$$I = I_{\max} + \frac{I_{\min} - I_{\max}}{1 + \left(\frac{FD}{FD50}\right)^H} \quad (6)$$

$$I = I_{\min} + \frac{I_{\max} - I_{\min}}{1 + 10^{(FD50-FD) \times H}} \quad (7)$$

Onde: I_{\max} e I_{\min} são, respectivamente, os valores máximo e mínimo da inibição do

crescimento previstos pelo modelo, FD50 é o fator de diluição “in vitro” que causa 50% de inibição de crescimento em relação ao controle negativo (sem triclosan) e H é o coeficiente adimensional de Hill, conforme ilustrados na Figura 4.10.

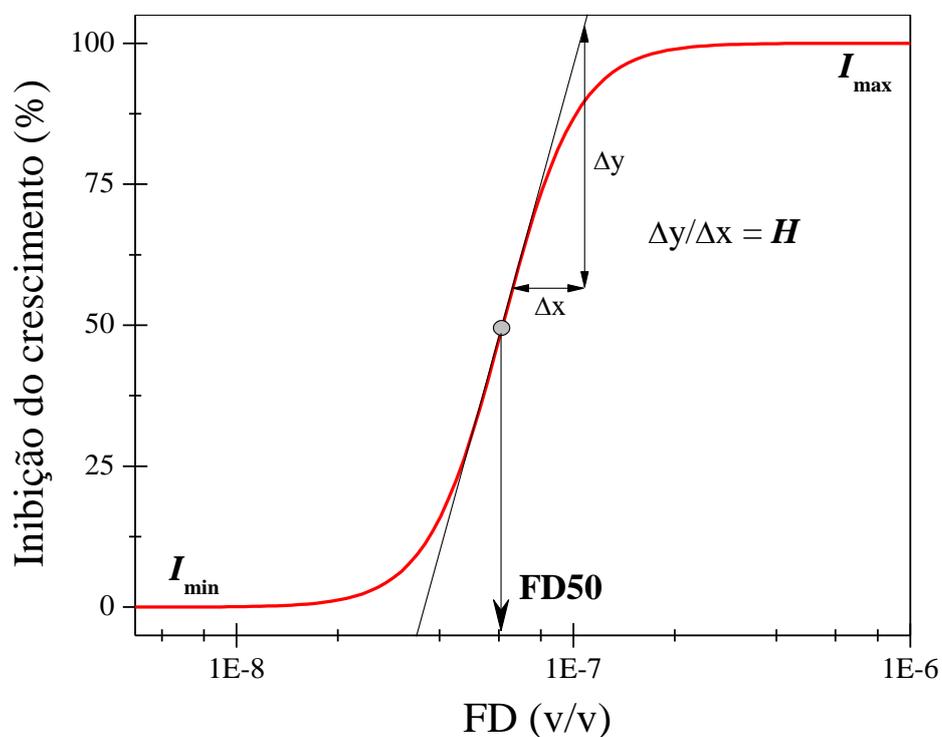


Figura 4.10. Interpretação gráfica dos parâmetros I_{min} , I_{max} , FD50 e H do modelo sigmoideal ajustado a uma curva dose-resposta do ensaio de atividade antibacteriana.

O ajuste das curvas dose-resposta do triclosan aos modelos sigmoideais foi avaliado por Análise de Variância Estatística (ANOVA), seguindo os algoritmos descritos por Barros Neto (2007) e utilizando o software Microsoft Excel 2007.

A concentração no limite de detecção (LD) da curva dose-resposta⁶ do triclosan ajustada ao modelo logístico foi determinada de acordo com a equação 8:

$$LD = 2 \cdot CE50 \cdot \left(\frac{I_{\min} - I_{\max}}{(I_{\min} + 3 \cdot DP_{I_{\min}}) - I_{\max}} - 1 \right)^{\frac{1}{H}} \quad (8)$$

Onde: LD é a concentração no limite de detecção do ensaio, CE50 a concentração de triclosan que causa 50% de inibição no ensaio, I_{\max} a inibição máxima estimada pelo modelo, I_{\min} a inibição mínima estimada pelo modelo, $DP_{I_{\min}}$ o desvio-padrão do parâmetro I_{\min} , H o coeficiente de Hill.

A concentração no LD da curva dose-resposta ajustada ao modelo dose-resposta foi determinada de acordo com a equação 9:

$$LD = 2 \cdot CE50 - 2 \cdot \log \left(\frac{I_{\max} - I_{\min}}{(I_{\min} + 3 \cdot DP_{I_{\min}}) - I_{\min}} - 1 \right)^{\frac{1}{H}} \quad (9)$$

Onde: LD é a concentração no limite de detecção do ensaio, I_{\max} a inibição máxima estimada pelo modelo, I_{\min} a inibição mínima estimada pelo modelo, $DP_{I_{\min}}$ o desvio-padrão do parâmetro I_{\min} , H o coeficiente de Hill.

A atividade antibacteriana das amostras foi expressa como concentração equivalente de triclosan - $[TCS]_{EQ}$ -, ou seja, a concentração da solução de triclosan que provoca no ensaio a mesma resposta obtida para a amostra. A concentração equivalente de triclosan foi estimada por meio da interpolação do máximo valor de inibição da curva da amostra no modelo sigmoidal ajustado à curva dose-resposta do triclosan, conforme descrito na equação 10. Visto que as concentrações de triclosan no ensaio foram reduzidas à metade com a adição de inóculo na proporção 1:1, conforme explicado no item 4.6.3, a concentração obtida na curva dose-resposta deve ser multiplicada por dois para obter o valor da concentração equivalente da solução testada.

⁶ O limite de detecção da curva dose-resposta foi definido como a inibição igual ao I_{\min} mais 3× o seu respectivo desvio-padrão.

$$[\text{TCS}]_{\text{EQ}} = 2 \cdot \text{CE50} - 2 \cdot \log \left(\frac{I_{\text{max}} - I_{\text{min}}}{I_{\text{amostra}} - I_{\text{min}}} - 1 \right)^{\frac{1}{H}} \quad (10)$$

Onde: $[\text{TCS}]_{\text{EQ}}$ é a concentração equivalente de triclosan, I_{max} a inibição máxima estimada pelo ajuste do modelo dose-resposta à curva do triclosan, I_{min} a inibição mínima da curva do triclosan, H o coeficiente de Hill da curva do triclosan e I_{amostra} o maior valor de inibição da amostra no ensaio.

A potência antibacteriana relativa (PA_{rel}) dos mediadores-redox foi avaliada por meio da relação entre a sua concentração equivalente de triclosan⁷, determinada de acordo com a equação 10, e a concentração da solução utilizada para a sua curva dose-resposta do triclosan ($0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$), conforme descrito na equação 11.

$$\text{PA}_{\text{rel}} = \frac{[\text{TCS}]_{\text{EQ}}}{[\text{TCS}]_{\text{curva}}} \cdot 100\% \quad (11)$$

Onde: $[\text{TCS}]_{\text{EQ}}$ é a concentração equivalente de triclosan da solução de um determinado mediador-redox na mesma concentração da solução utilizada para a curva dose-resposta do triclosan, $[\text{TCS}]_{\text{curva}}$ é a concentração da solução utilizada para a curva dose-resposta do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana.

⁷ A concentração equivalente do mediador foi estimada por meio da curva dose-resposta de uma solução de mediador de $0,8 \mu\text{g.L}^{-1}$, que é a mesma concentração utilizada na curva dose-resposta do triclosan,

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente serão apresentados os resultados obtidos na caracterização das enzimas comerciais lacase de *Trametes versicolor* e HRP adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich. Em seguida, os processos serão comparados em relação (i) às faixas de pH e de temperatura em que atuam, (ii) aos parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} e k_{cat}/K_m) e (iii) à dosagem mínima de enzima para atingir uma conversão estabelecida de triclosan, conforme ilustrado no fluxograma da Figura 5.1.

Para a enzima que apresentou o melhor desempenho catalítico, menor dosagem de enzima para atingir uma taxa de conversão e se mostrou mais apropriada para as faixas de pH e temperatura encontradas nos efluentes de ETE, foram realizados mais estudos visando: (i) determinar a relação estequiométrica entre substrato e aceptor final de elétrons, (ii) avaliar o efeito da dosagem de enzima nas taxas de conversão (ii) avaliar a inativação durante a conversão de triclosan, (iii) selecionar mediador(es)-redox que promovam aumento na taxa de conversão de triclosan, (iv) avaliar a remoção da atividade antibacteriana após o tratamento enzimático, (v) avaliar a atividade antibacteriana dos mediadores-redox e (vi) avaliar o desempenho da enzima em catalisar a conversão do agente em uma concentração ambientalmente relevante, conforme ilustrado no fluxograma da Figura 5.1.

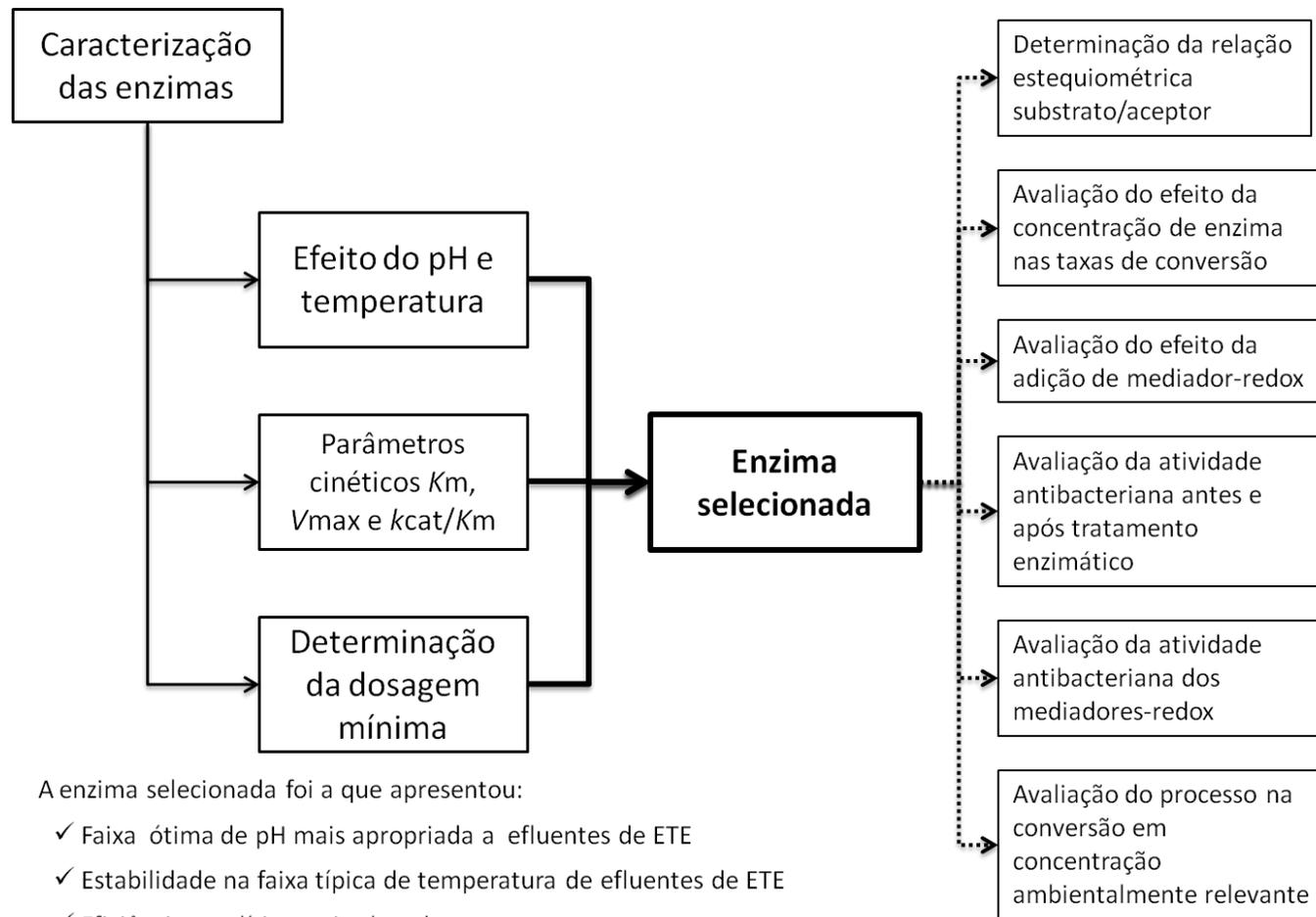


Figura 5.1. Fluxograma ilustrando a sequência das etapas executadas na caracterização das enzimas comerciais, na seleção da enzima para conversão de triclosan e nos demais estudos realizados com a enzima selecionada.

5.1 Avaliação da pureza, estimativa da massa molecular e determinação da atividade do preparado enzimático comercial contendo lacase

Antes do uso dos preparados enzimáticos para a conversão de triclosan, foram estimadas as massas moleculares das enzimas lacase e HRP presentes, e avaliadas as purezas dos preparados, por meio da técnica SDS-PAGE. Foram determinados também o teor de proteínas e a atividade enzimática desses preparados. Posteriormente, o teor de proteínas determinado foi utilizado para estimar o acréscimo de proteína na solução tratada e as massas moleculares foram utilizadas para estimar a concentração molar de enzima dissolvida na solução reacional.

Na Figura 5.2 é mostrada uma fotografia do gel da SDS-PAGE do preparado enzimático comercial contendo lacase de *Trametes versicolor* adquirido da Sigma-Aldrich com duas réplicas.

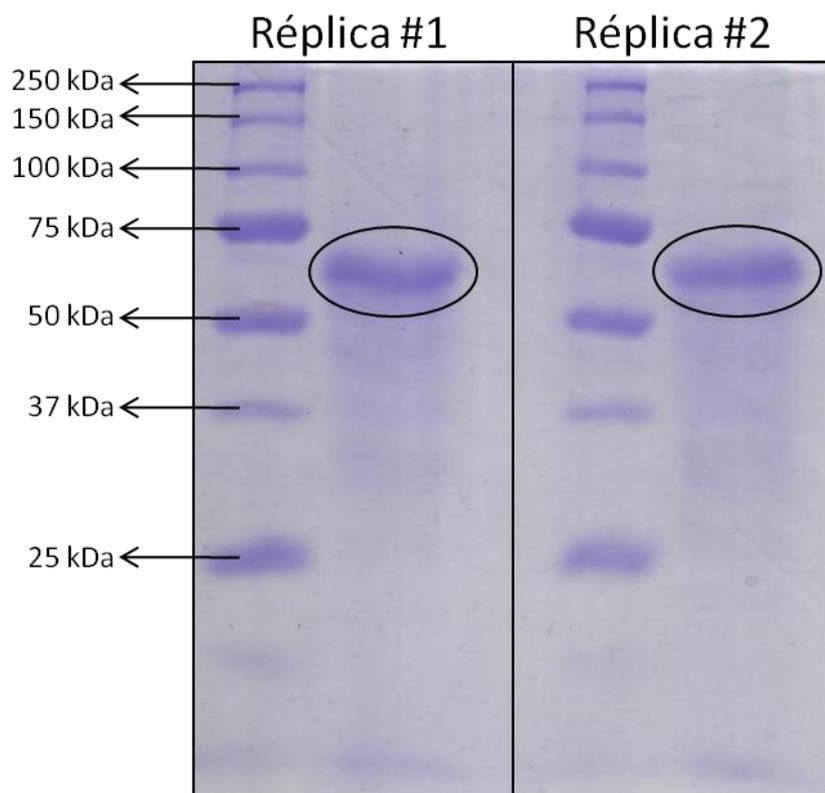


Figura 5.2. Foto do gel obtido da SDS-PAGE do preparado enzimático comercial contendo lacase de *Trametes versicolor* comercializado pela Sigma-Aldrich e dos padrões de massa molecular em duplicata. As elipses em preto destacam as bandas da lacase.

Na SDS-PAGE do preparado enzimático comercial, observou-se uma única banda definida, indicando que não existem outras proteínas, em concentrações expressivas, com tamanho na faixa de 25 a 250 kDa. Por meio de um gráfico log-log da distância percorrida pelo padrão *versus* sua respectiva massa molecular, foi estimada a massa molecular da lacase, conforme mostrado na Figura 5.3.

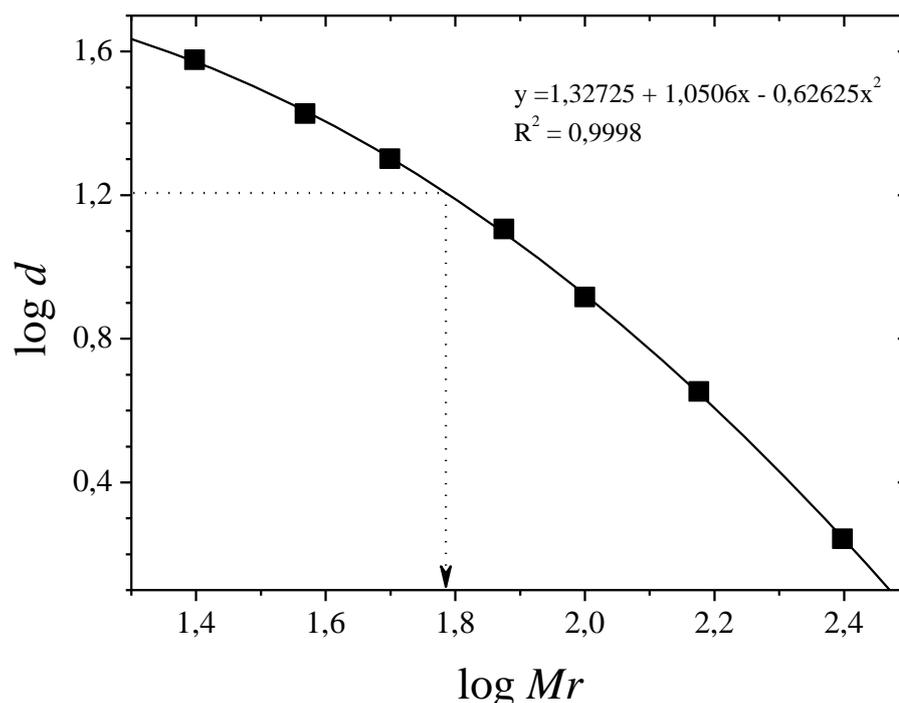


Figura 5.3. Relação quadrática entre o logaritmo da distância percorrida pelos padrões de massa molecular na corrida eletroforética ($\log d$) e o logaritmo de suas respectivas massas moleculares ($\log M_r$). O tracejado indica o logaritmo da distância percorrida pela lacase e a estimativa do logaritmo de sua massa molecular.

O logaritmo da distância percorrida apresentou uma dependência quadrática com o logaritmo da massa molecular do padrão, com um coeficiente de determinação superior (R^2) a 0,999. Por meio do modelo quadrático obtido, a massa molecular de lacase foi estimada em 58 (± 2) kDa. Esse resultado foi similar ao de uma lacase de *Trametes* sp. cepa AH28-2 (57 kDa), determinada por Xiao *et al.* (2003) usando cromatografia líquida de proteínas (FPLC) e a de uma lacase de *Trametes sanguinea* M85-2 (62 kDa), determinada por Nishizawa *et al.* (1995), usando SDS-PAGE.

O teor de proteínas do preparado enzimático comercial determinado pelo método de Bradford (1976) foi de apenas 0,8% (m/m). Como a principal proteína, presente no preparado enzimático comercial, é a da própria enzima, pode-se supor que outros compostos não proteicos, como agentes estabilizantes de proteínas, devam estar presentes.

A atividade do preparado enzimático, medida usando ABTS como substrato colorimétrico foi de 0,88 ($\pm 0,02$) U/mg (U por mg de sólido).

5.2 Avaliação da pureza, estimativa da massa molecular e determinação da atividade do preparado enzimático comercial contendo HRP

A SDS-PAGE do preparado enzimático comercial contendo HRP exibiu três bandas bem definidas com massas próximas ao do padrão de 37 kDa e uma banda bem intensa de proteínas com massas inferiores a 25 kDa, conforme mostrado na Figura 5.4.

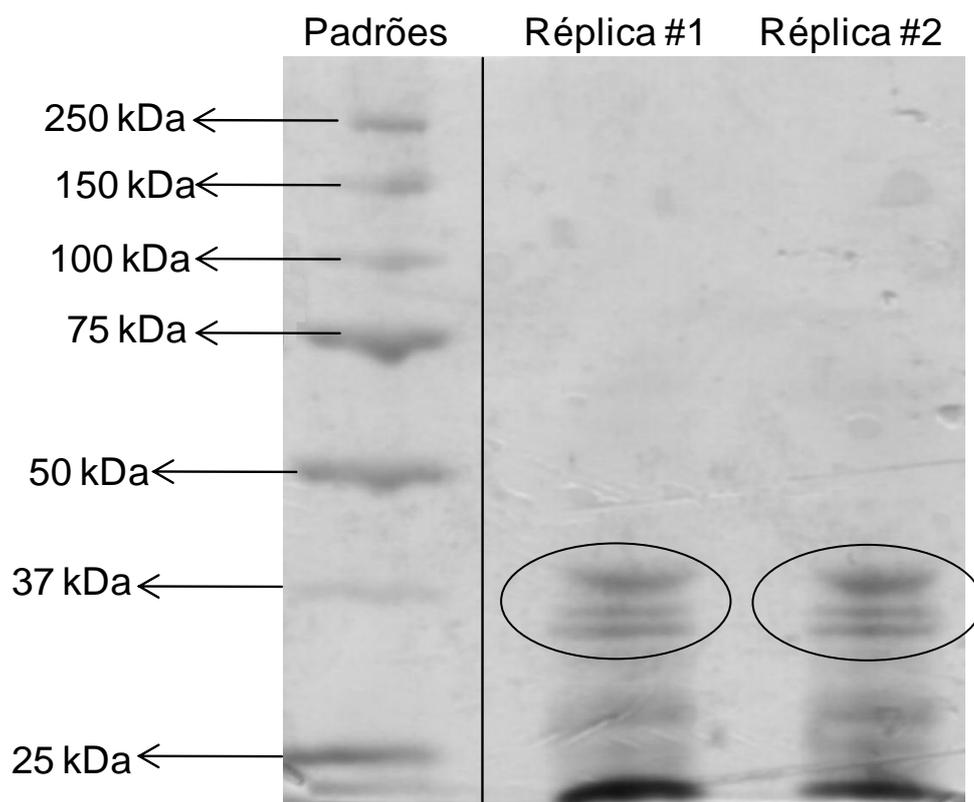


Figura 5.4. Foto do gel obtido da SDS PAGE da HRP da Sigma-Aldrich em duplicata e dos padrões de massa molecular da BIO-RAD. As elipses em vermelho destacam as três bandas com melhor definição das corridas em duplicata da HRP.

A presença de várias bandas na corrida eletroforética da HRP comercial sugere que o seu grau de pureza é baixo e que, além da HRP, outras proteínas estão presentes. Embora não tenha exibido uma única banda como a lacase, foi feita uma estimativa da faixa de massas moleculares que compreendem as três bandas observadas na SDS-PAGE, conforme mostrado na Figura 5.5.

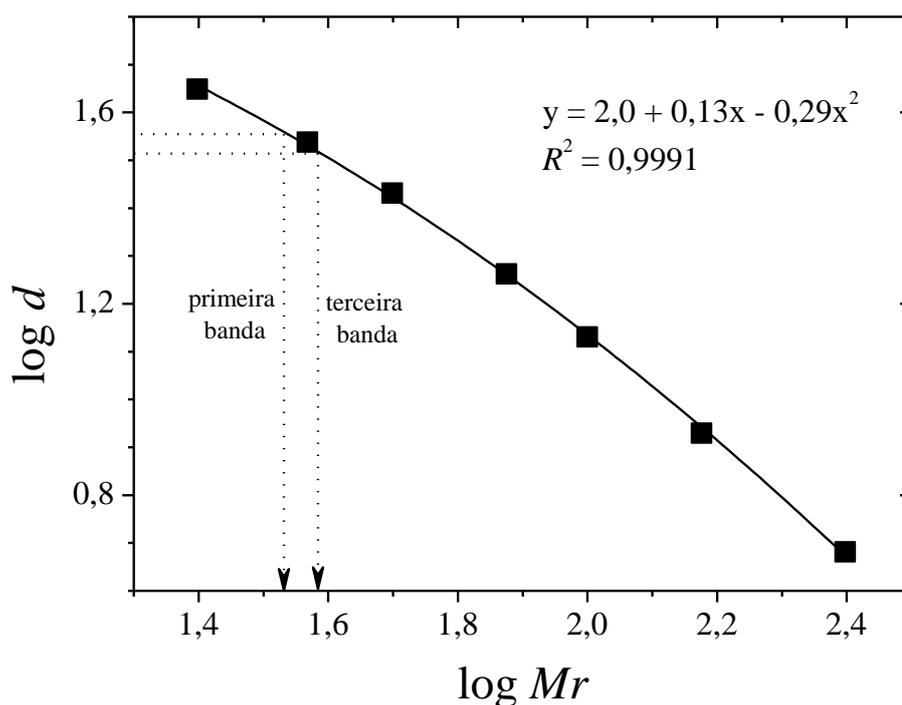


Figura 5.5. Relação quadrática entre o logaritmo da distância percorrida pelos padrões na corrida eletroforética ($\log d$) e o logaritmo de suas respectivas massas moleculares ($\log M_r$). Os tracejados indicam a faixa que compreende os logaritmos das distâncias percorridas pelas três bandas definidas da HRP e as respectivas estimativas dos logaritmos de suas massas moleculares.

A faixa de massas moleculares que compreende as três bandas principais foi de 34 a 39 kDa e, portanto, menor do que a massa molecular da HRP determinada por Regalado *et al.* (1996) como 44 kDa, utilizando a mesma técnica.

O teor de proteínas da HRP comercial foi de 28% (m/m), o que sugere que além de agentes estabilizantes, estão presentes outras proteínas em concentrações

significativas, visto que foram observadas várias bandas de proteínas na faixa próxima à massa molecular da HRP.

A atividade da HRP comercial utilizando o ensaio com ABTS foi de 275 (± 19) U/mg e utilizando o ensaio com PhOH/AAP foi de 148 (± 10) U/mg (U por mg de sólido).

5.3 Comparação dos processos catalisados pela lacase e pela HRP em relação às faixas de pH e temperatura em que atuam

Considerando que o triclosan pode ser removido por outros mecanismos que não sejam *via* catálise enzimática, como fotólise na presença de luz UV e visível (SANCHEZ-PRADO *et al.*, 2006), adsorção nas paredes do recipiente da solução e interações moleculares com a molécula de enzima, experimentos iniciais foram realizados para avaliar as remoções de triclosan por esses processos. Os resultados estão apresentados na Figura 5.6.

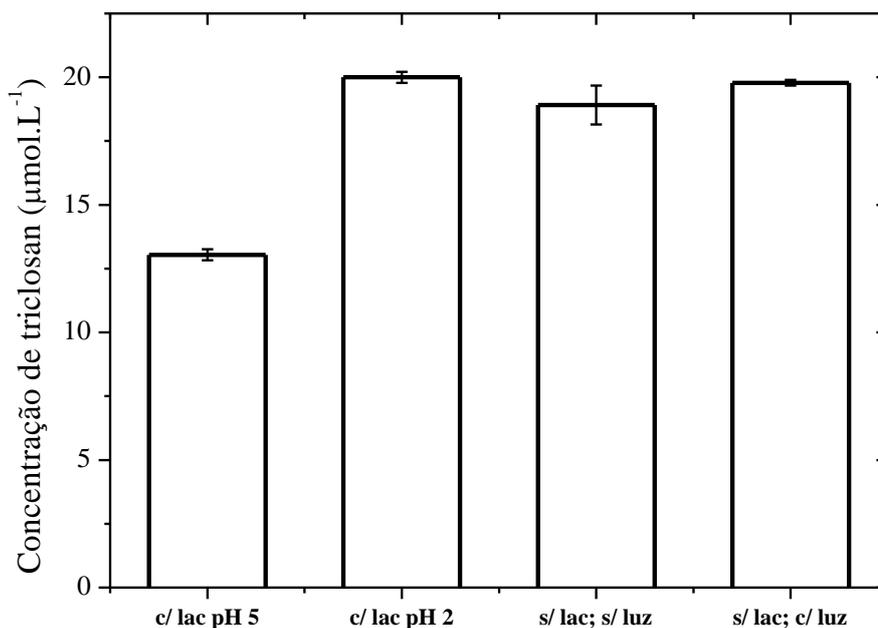


Figura 5.6. Concentrações residuais de triclosan após tratamento com lacase ativa (c/lac pH 5,0) e lacase inativa (c/lac pH 2,0) na ausência de luz (20 µmol.L⁻¹ de triclosan, 360 min e 0,8 U/mL). Experimentos-controle foram realizados agitando-se soluções de triclosan sem lacase e com luz (s/lac; c/luz) e sem lacase e sem luz (s/lac; s/luz).

Não houve qualquer remoção de triclosan na presença de luz ambiente do laboratório (iluminado por lâmpadas fluorescentes), tampouco por interações com a lacase desnaturada em pH 2. A remoção aconteceu apenas com lacase cataliticamente ativa, em pH 5, sugerindo que o triclosan é seu substrato. A temperatura do meio reacional aumentou de 25 para 35 °C, após 360 min de agitação, indicando que durante a reação a temperatura deva ser controlada, visto que influencia a velocidade das reações.

Experimentos similares preliminares foram realizados com HRP utilizando solução de triclosan com concentração inicial de 20 µmol.L⁻¹, em pH 7 e 360 min de reação. Os resultados (não mostrados) indicaram que não houve conversão de triclosan na ausência de HRP ou na ausência de H₂O₂, tampouco na ausência de ambos. Não foi observada remoção por interações com a enzima inativa.

Tendo em vista que as enzimas lacase e HRP foram capazes de catalisar a conversão de triclosan, foram avaliados isoladamente os efeitos da temperatura e do pH na conversão do substrato. A influência desses parâmetros foi avaliada sob condições estritas, ou seja, a atividade enzimática inicial e o tempo de reação foram selecionados de modo que não fossem suficientes para obter a remoção próxima de triclosan próxima de 100%. Além disso, um ligeiro excesso de H_2O_2 foi adicionado à mistura reacional para assegurar que a reação não fosse interrompida pela ausência do reagente.

O efeito do pH em reações enzimáticas é usualmente pronunciado visto que a atividade catalítica da enzima depende da estrutura tridimensional de seu sítio ativo e esta estrutura está relacionada com o pH do meio. Na Figura 5.7 é mostrada a influência do pH, na faixa de 2 a 8, na conversão de triclosan catalisada por lacase. Observa-se que a conversão ocorreu na faixa de pH de 4 a 7, atingindo valor máximo em pH 5. Esse resultado foi similar aos obtidos por Kim e Nicell (2006) e por Cabana *et al.* (2007) para a conversão de triclosan com lacase.

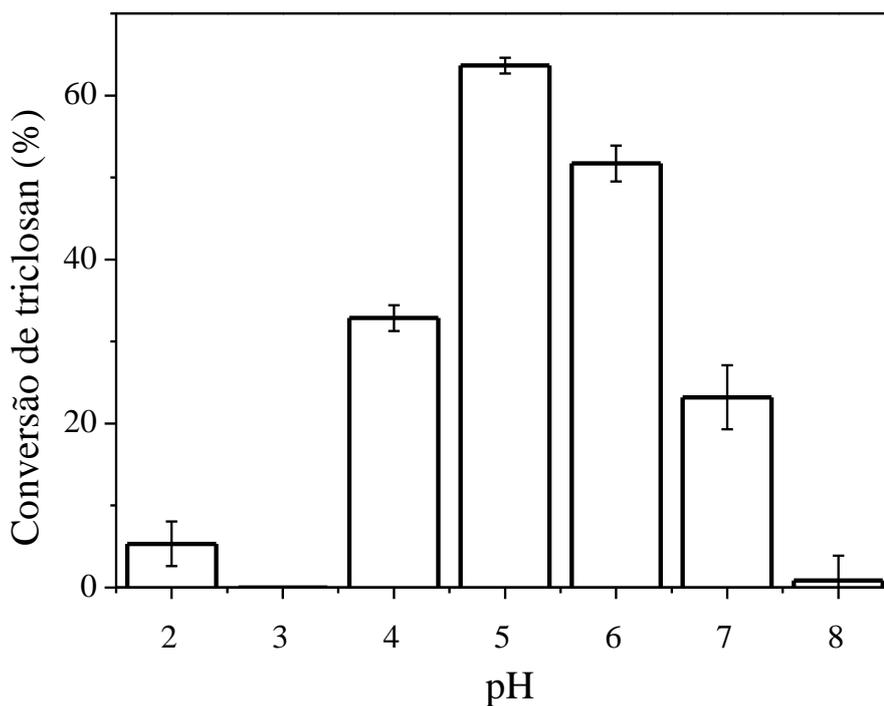


Figura 5.7. Efeito do pH na conversão de triclosan catalisada por lacase a 25 °C. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 60 min de reação e 0,5 U/mL de lacase.

A redução da conversão de triclosan com o aumento do pH acima de 5 poderia ser explicado pelo aumento da quantidade de moléculas de triclosan com o anel fenólico desprotonado, que pode diminuir a interação com a enzima, ou devido à redução da atividade enzimática. Para elucidar essa questão, avaliou-se o efeito do pH na atividade enzimática usando o substrato siringaldazina. Conforme pode ser verificado na Figura 5.8, a dependência da atividade de lacase em relação ao pH exibiu um comportamento similar ao da conversão do triclosan em função do pH. Assim, as baixas conversões de triclosan observadas em pH abaixo de 4 e acima de 7 podem ser atribuídas à desnaturação da enzima com o pH, o que altera a estrutura tridimensional da enzima, reduzindo sua atividade catalítica.

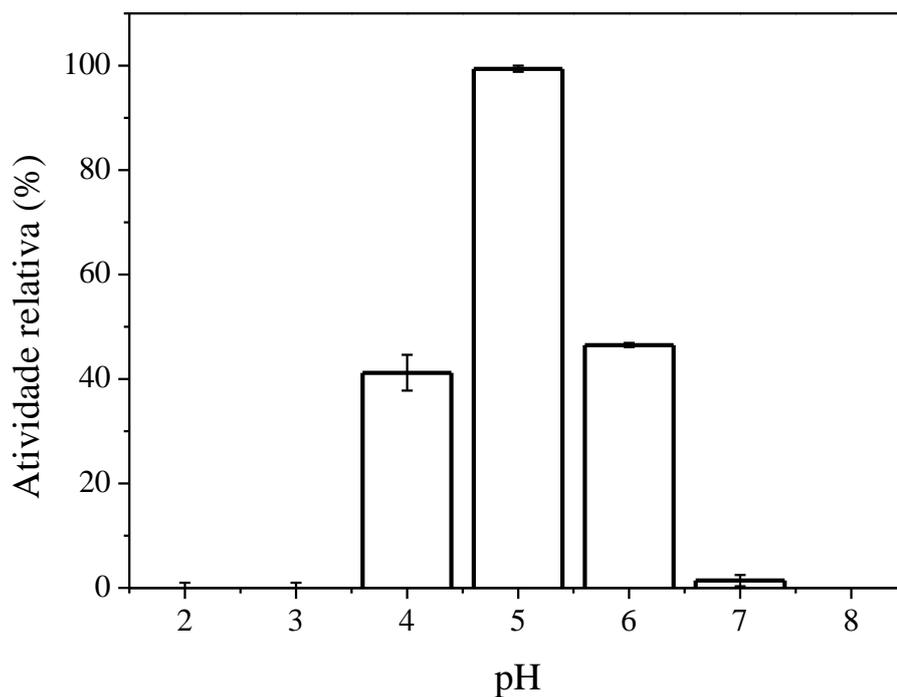


Figura 5.8. Efeito do pH na atividade da lacase usando siringaldazina como substrato colorimétrico a 25 °C. Atividade relativa (%) é a atividade enzimática normalizada em relação ao seu valor máximo em pH 5. As reações foram realizadas com 1 mmol.L⁻¹ de siringaldazina, em tampão citrato-fosfato.

O efeito do pH, na faixa de 3 a 9, na conversão de triclosan em presença de HRP foi bem menos pronunciado do que o observado para a lacase, conforme mostrado na Figura 5.9. Foi observada conversão de triclosan em todos os valores dentro da faixa estudada, atingindo conversão máxima na faixa de pH de 6 a 7.

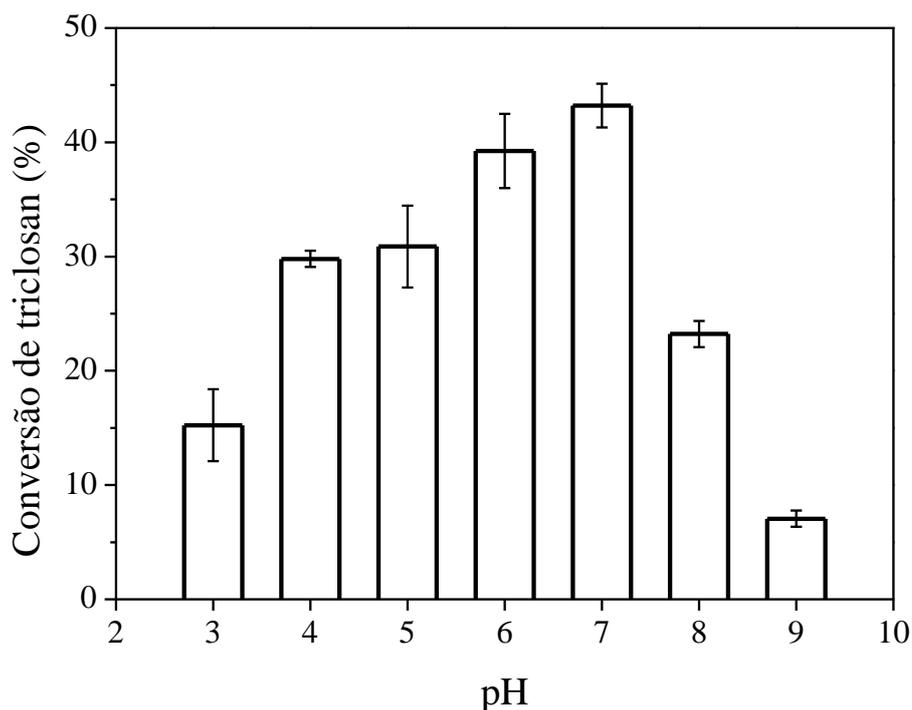


Figura 5.9. Efeito do pH na conversão de triclosan catalisada por HRP a 25 °C. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições reacionais: 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 0,1 U/mL de HRP, 60 min de reação e razão molar $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{triclosan}]$ de 1,5.

Assim, em relação a faixa de pH em que atua, o tratamento com HRP parece ser mais apropriado para efluentes de ETE, visto que apresenta uma faixa de conversão mais ampla que a da lacase. Além disso, os valores de pH em que foram obtidas as conversões de triclosan estiveram dentro da faixa típica de pH desses efluentes, que é entre 6,5 e 7,5 (JORDÃO e PESSÔA, 2009).

Dois efeitos ocorrem simultaneamente quando a temperatura aumenta em reações enzimáticas: o aumento da taxa de reação devido ao aumento da energia cinética dos reagentes, conforme enunciado pela lei de Arrhenius, e a redução da estabilidade da enzima devido à desnaturação térmica. O efeito da temperatura, entre 10 e 40 °C, na conversão de triclosan em presença de lacase é mostrado na Figura 5.10.

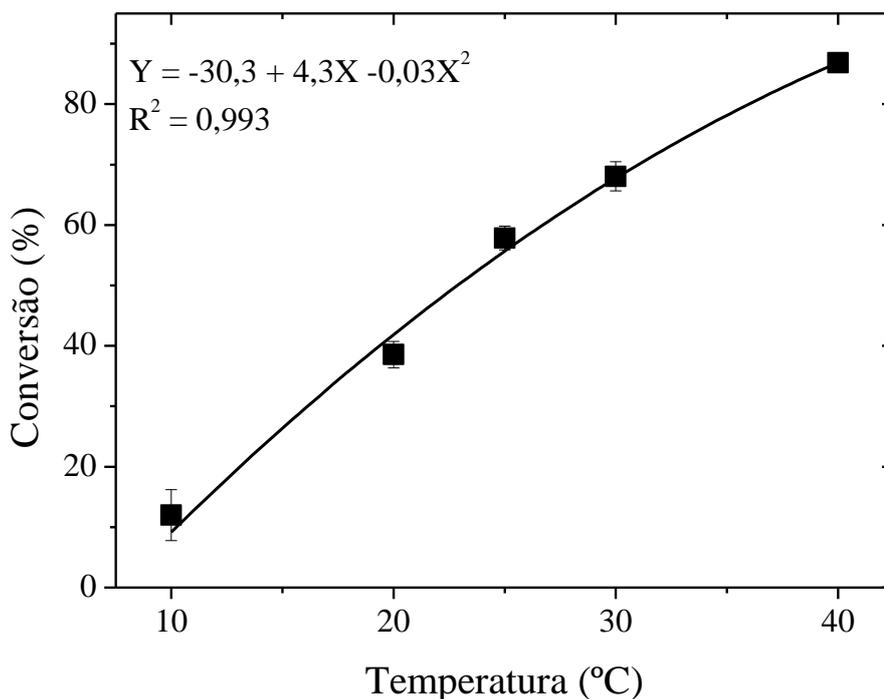


Figura 5.10. Efeito da temperatura na conversão de triclosan catalisada por lacase. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, 0,5 U/mL, 60 min e pH 5,0.

O efeito da temperatura na conversão catalisada por lacase foi significativo, aumentando a conversão de 12%, a 10 °C, para 88%, a 40 °C, além disso, a conversão exibiu uma dependência quadrática ($R^2 > 0,99$) com a temperatura nessa faixa. Embora não tenha sido observada uma temperatura ótima, supõe-se que seja acima de 40 °C, visto que a atividade da lacase (medida com o substrato colorimétrico ABTS) é máxima em 60 °C (DODOR *et al.*, 2004).

O efeito da temperatura na conversão de triclosan em presença de HRP é mostrado na Figura 5.11, na qual se verifica que, o aumento da temperatura, de 10 para 40 °C resultou em um aumento da conversão de 21% para 37%.

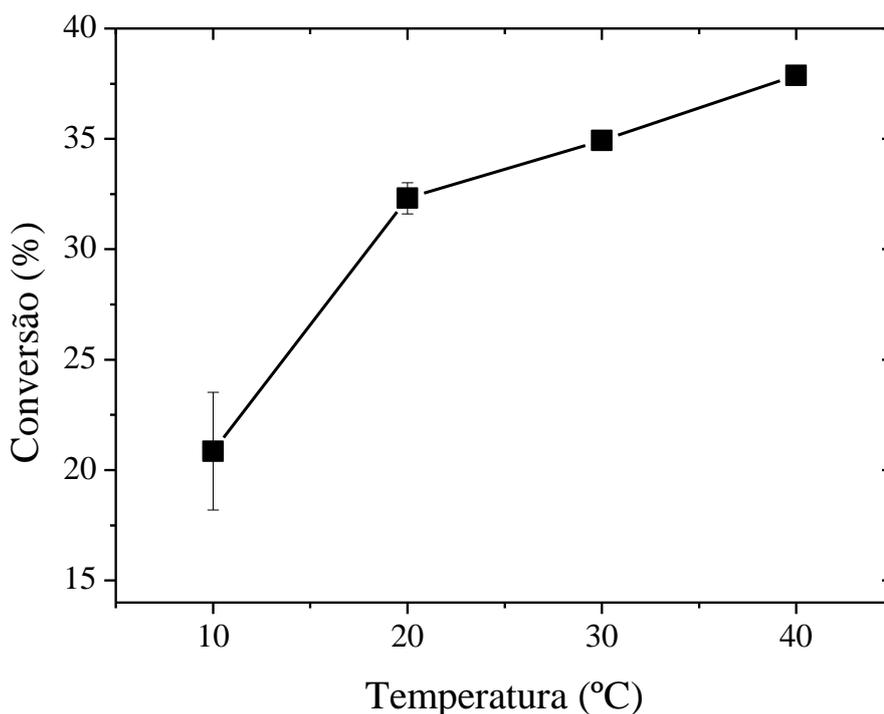


Figura 5.11. Efeito da temperatura na conversão de triclosan catalisada por HRP. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan, $0,1 \text{ U/mL}$ de HRP, 60 min de reação, 200 rpm, pH 7 e razão molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{triclosan}$ de 1,5.

Ao analisar a dependência da conversão com a temperatura, verificou-se que o ajuste dos dados a um modelo linear ou quadrático apresentou uma correlação muito baixa, o que sugere que outros tipos de modelo devam ser testados. Entre 20 e 25 °C, que é uma faixa típica de temperatura de efluentes de ETE de países tropicais (JORDÃO e PESSÔA, 2009), o efeito da temperatura na conversão de triclosan com HRP (aumentando de 32 para 33%) foi bem menos pronunciado do que com lacase (aumentando de 38 para 58%). Considerando uma possível aplicação do tratamento enzimático para remoção de triclosan de efluentes de ETE, processo catalisado por HRP parece mais apropriado, visto que sua eficiência seria muito menos impactada pelas oscilações na temperatura dos efluentes.

5.4 Comparação dos processos catalisados pela lacase e pela HRP em relação aos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} e k_{cat}/k_m

O ajuste das taxas de conversão de substrato nos instantes iniciais de uma reação enzimática a uma cinética de Michaelis-Menten, no caso de enzimas que seguem esse tipo de cinética, pode fornecer informações importantes sobre a eficiência catalítica e afinidade da enzima com o substrato. Na Figura 5.12 é mostrado o gráfico de Lineweaver-Burk para a conversão de triclosan em presença de lacase.

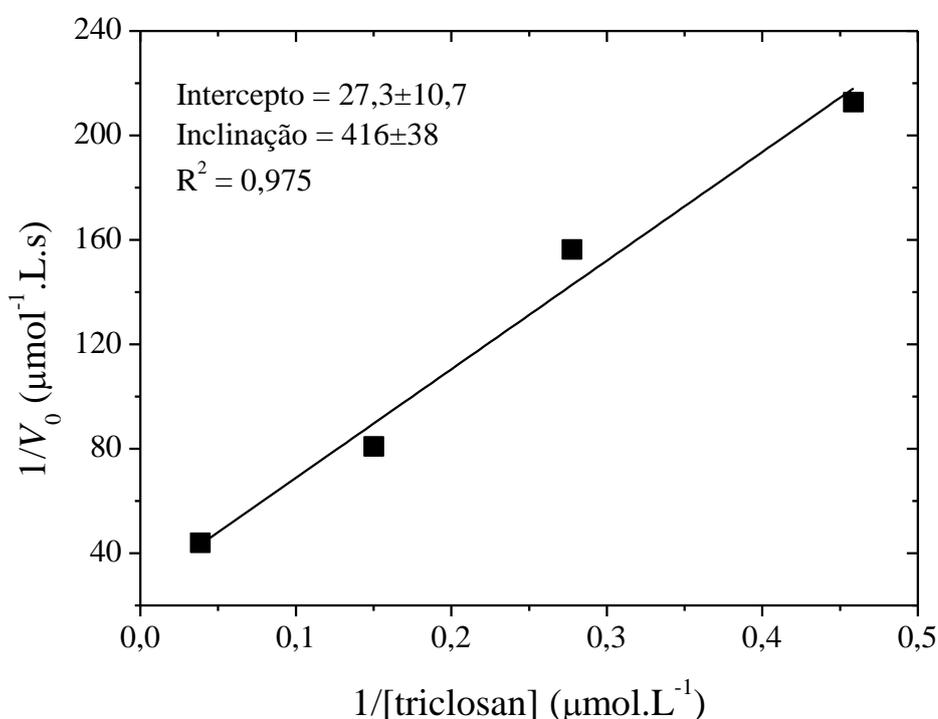


Figura 5.12. Gráfico de Lineweaver-Burk para a conversão de triclosan catalisada por lacase. As condições reacionais utilizadas foram as seguintes: 3,0 U/mL de lacase, tempo máximo de reação de 210 s, pH 5,0 e 25 °C.

A linearidade do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,975$) para a lacase indica que a conversão segue uma cinética de Michaelis-Menten, o que permitiu determinar os parâmetros cinéticos K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m , mostrados na Tabela 5.1.

O gráfico de Lineweaver-Burk para a conversão de triclosan em presença de HRP é mostrado na Figura 5.13.

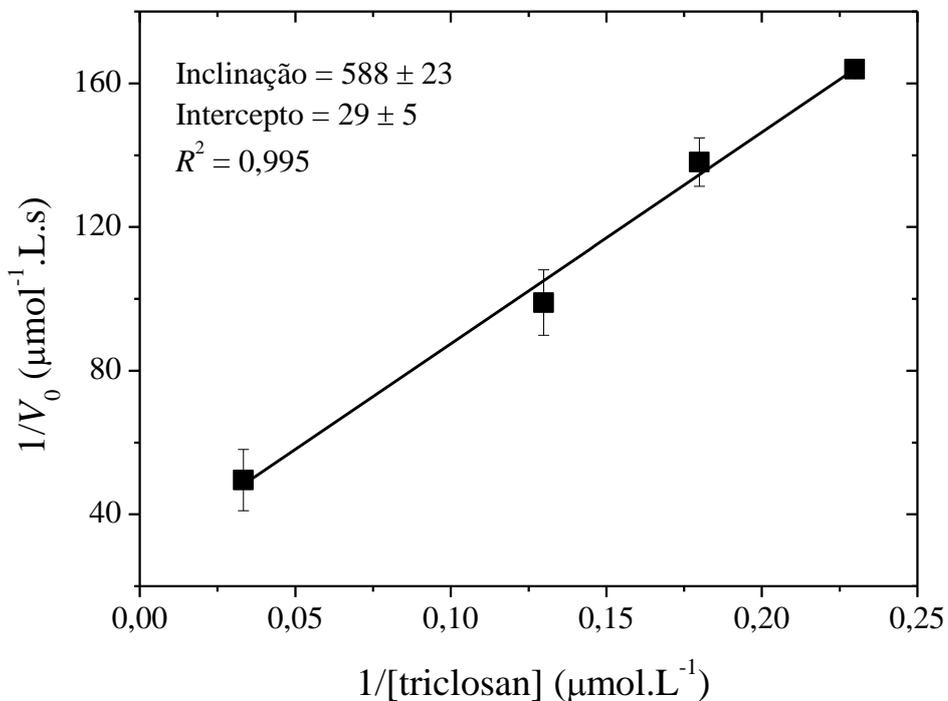


Figura 5.13. Gráfico de Lineweaver-Burk para a conversão do triclosan catalisada pela HRP. As condições reacionais utilizadas foram: 1,0 U/mL de HRP, pH 7, tempo máximo de reação de 180 s, 25 °C e razão molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{triclosan}$ de 1,5.

A linearidade do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk ($R^2 = 0,994$) para a HRP indica que a conversão segue uma cinética de Michaelis-Menten, o que permitiu determinar os parâmetros cinéticos K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m , mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Valores dos parâmetros cinéticos K_m , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_m da conversão de triclosan catalisada pela lacase e pela HRP.

Parâmetro (unidade)	HRP	Lacase
K_m ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	20	15
V_{max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	0,037	0,034
k_{cat} (s^{-1})	1,094	0,066
k_{cat}/K_m ($\text{mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$)	$5,47 \times 10^4$	$4,40 \times 10^3$

O parâmetro K_m representa a afinidade da enzima por seu substrato, e quando K_m é alto a afinidade é baixa (NELSON e COX, 2004). Os valores de K_m para a HRP e para a lacase foram similares, o que indica que a afinidade das enzimas pelo substrato triclosan são similares.

O valor de K_m para a conversão de triclosan em presença de lacase foi da mesma ordem de grandeza do determinado por Kim e Nicell (2006), que foi de $24 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Auriol *et al.* (2008), ao determinar as afinidades das enzimas lacase de *T. versicolor* e HRP pelos substratos E2, EE2, E1 e E3 (estrogênios esteróides), também verificaram que, para um determinado substrato, não houve diferença significativa entre os valores de K_m determinados para as enzimas, e que os valores de K_m dos substratos foram similares para uma mesma enzima.

O parâmetro k_{cat} corresponde à taxa de oxidação, ou seja, é a constante cinética de primeira-ordem efetiva para a quebra do complexo enzima-substrato, liberando os produtos da enzima e deixando a enzima livre para catalisar a conversão de outra molécula de substrato (MARANGONI, 2002). Assim, como o valor do k_{cat} determinado para a HRP foi uma ordem de grandeza maior do que o para lacase, a velocidade com que são liberados os produtos do complexo HRP-triclosan é bem maior do que do complexo lacase-triclosan. De acordo com Auriol *et al.* (2008), o parâmetro k_{cat} para a conversão de estrogênios esteróides com a enzima HRP é cerca de duas ordens de grandeza maior do que com a lacase

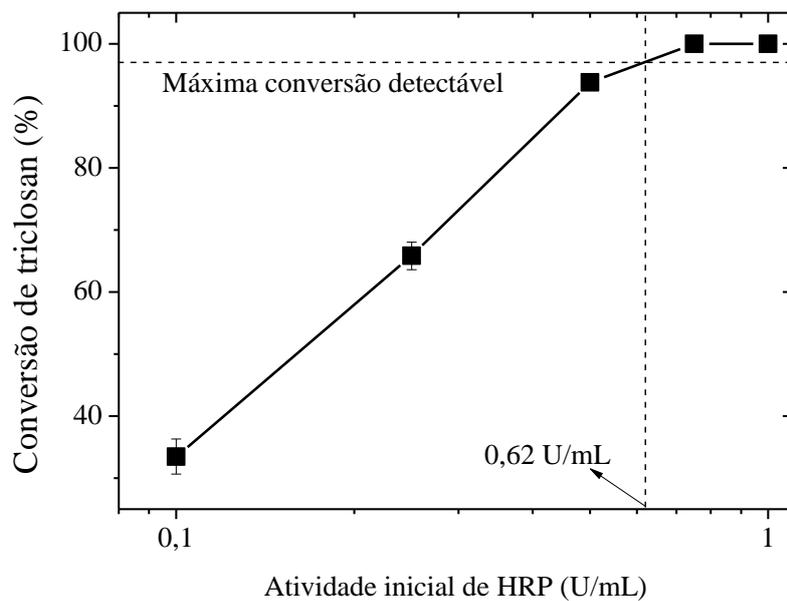
A razão k_{cat}/K_m representa a eficiência catalítica de uma enzima para um determinado substrato. Se uma enzima A apresenta uma razão k_{cat}/K_m maior do que uma

enzima B, para um mesmo substrato S, então o substrato S é mais específico para a enzima A do que para a B. Assim, verifica-se que o substrato triclosan é muito mais específico para a HRP do que para a lacase, visto que a razão k_{cat}/K_m para HRP foi uma ordem de grandeza maior do que para a lacase. Auriol *et al.* (2008) também verificaram que os estrogênios esteróides são substratos muito mais específicos para a HRP do que para a lacase.

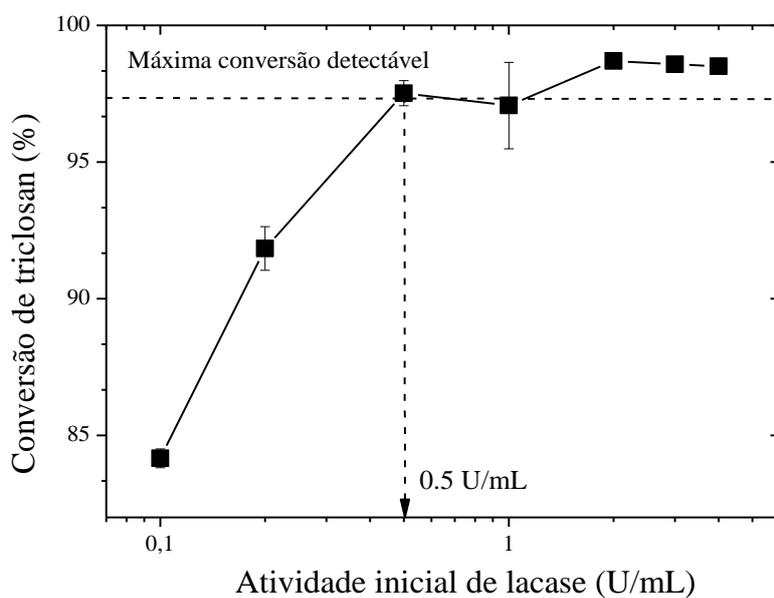
Considerando a aplicação do tratamento enzimático para a remoção de triclosan em efluentes de ETE, a enzima HRP, que apresentou maior especificidade, é a mais apropriada, visto que no efluente estão presentes vários outros compostos orgânicos em concentrações muito maiores.

5.5 Comparação entre as dosagens mínimas de enzima para atingir determinada conversão

O principal componente do custo em um tratamento enzimático é a enzima. Assim, sob condições ótimas de pH e temperatura, a quantidade de enzima deve ser a mínima possível para converter os substratos de interesse. Assim, foram comparadas as dosagens mínimas de lacase e de HRP para atingir uma conversão de triclosan de 97%, com 6 h de reação, a 25 °C. A concentração de enzima foi expressa como atividade enzimática inicial. Na Figura 5.14a, são mostradas as conversões de triclosan obtidas pelo processo catalisado por HRP com atividade inicial variando de 0,1 a 1,0 U/mL e na Figura 5.14b as conversões obtidas pelo processo catalisado por lacase com atividade inicial variando de 0,1 a 4,0 U/mL. Nesses experimentos, a máxima conversão de triclosan que pôde ser detectada foi de 97%, visto que o limite de detecção da técnica utilizada para quantificação (HPLC/UV) foi de $0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



A



B

Figura 5.14. Determinação da concentração mínima de enzima para atingir a máxima conversão detectável (97%), com 6 h de reação a 25 °C, de uma solução de triclosan de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As reações com HRP foram realizadas em pH 7 e com uma razão molar H_2O_2 /triclosan de 1,5, e as reações com lacase em pH 5.

Assim, para atingir a máxima conversão detectável foi necessária uma atividade

inicial de 0,62 U/mL para o processo com HRP e de 0,5 U/mL para o processo com lacase. No entanto, visto que a atividade enzimática expressa a quantidade de enzima em termos da taxa de conversão de um determinado substrato colorimétrico, e que a adição de enzima implica em um inconveniente aumento no teor da matéria orgânica da solução tratada, é importante avaliar a quantidade de proteínas que é acrescentado à solução em cada processo enzimático para atingir a remoção estabelecida.

A concentração de proteínas na solução de triclosan tratada com a dosagem mínima de lacase foi determinada como 9,12 mg.L⁻¹ e com a dosagem mínima de HRP foi de 0,63 mg.L⁻¹, de acordo com a equação 12.

$$C_{\text{proteínas}} = \frac{A.E._{\text{reação}} \text{ (U/mL)}}{A.E._{\text{solução-estoque}} \text{ (U/mL)}} \cdot C_{\text{enzima}} \text{ (mg/L)} \cdot \frac{T.P. \text{ (% m/m)}}{100\%} \quad 12$$

Onde: C_{proteínas} é a concentração de proteínas (em mg/L) no meio reacional, A.E._{reação} a atividade enzimática do meio reacional (em U/mL), A.E._{solução-estoque} é atividade enzimática da solução-estoque de enzima (em U/mL), C_{enzima} é a concentração de enzima em pó na solução-estoque (em mg.L⁻¹) e T.P. é o teor de proteínas determinado na enzima comercial (em % m/m).

Portanto, a dose mínima de lacase estimada para atingir a conversão de 97% de triclosan, com 6 h de reação, possui uma concentração de proteínas significativamente maior do que a concentração de proteínas na solução tratada com a dose mínima de HRP, para atingir a mesma conversão. Assim, a adição de HRP à solução de triclosan promove um acréscimo no teor de matéria orgânica da solução muito menor do que a lacase.

Além dessa vantagem, a HRP apresentou eficiência catalítica superior à da lacase na conversão de triclosan, conforme avaliado no item 5.4, as máximas conversões catalisadas por essa enzima foram observadas na faixa de pH dos efluentes de ETE e, além disso, a HRP foi mais estável do que a lacase na faixa típica de temperaturas de efluentes de ETE, conforme discutido no item 5.3. Dessa forma, o processo catalisado por HRP foi selecionado para investigar a influência de outros parâmetros reacionais e para avaliar a remoção da atividade antibacteriana.

5.6 Cinéticas de conversão do triclosan catalisada pela HRP

Na Figura 5.15 estão apresentadas as cinéticas de conversão de triclosan em presença de quatro concentrações diferentes de HRP (0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 U/mL) com tempos de reação de até 360 min.

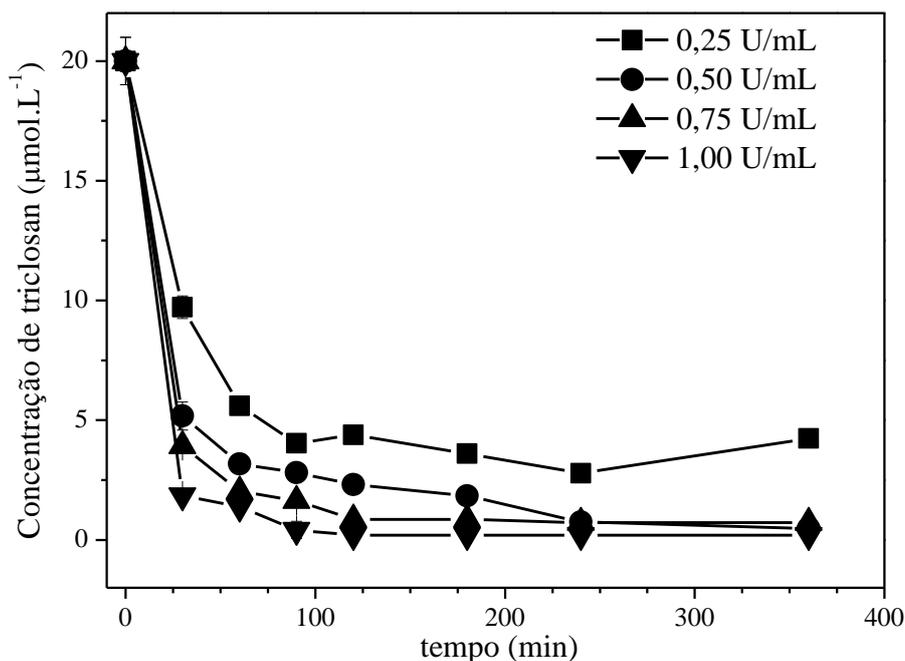


Figura 5.15. Efeito da atividade inicial de HRP na taxa de conversão do triclosan. Os experimentos foram realizados com uma concentração inicial de triclosan de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, razão molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{triclosan}$ de 1,5, em pH 7 e 25°C .

Observou-se que incrementos na concentração de enzima aumentam a velocidade da reação. Após 360 min de reação, com uma atividade inicial de HRP de 0,5 U/mL, a concentração residual de triclosan foi inferior a $0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

As cinéticas foram ajustadas ao modelo de decaimento de primeira ordem descrito na equação 13.

$$S = (S_0 - S_{\min})e^{-kt} + S_{\min} \quad (13)$$

Onde: S_0 é a concentração inicial de triclosan, S_{\min} é a concentração de triclosan em $t = \infty$ e k é a respectiva constante de cinética de decaimento de primeira-ordem.

No entanto, os coeficientes de correlação para o ajuste (R^2) foram baixos ($<0,8$), indicando que o modelo não é apropriado para a cinética de conversão com HRP nas condições utilizadas.

Conforme comentado no item 3.10.1, a enzima HRP pode sofrer inativação devido a várias reações paralelas, principalmente quando se utiliza excesso de H_2O_2 (KHAN e NICELL, 2007b). Para avaliar a inativação durante a conversão de triclosan, cinéticas foram realizadas para monitorar as reduções da atividade enzimática e da concentração de H_2O_2 . As curvas cinéticas obtidas estão apresentadas na Figura 5.16, que mostram simultaneamente a dependência com o tempo da conversão de triclosan, o consumo de H_2O_2 e a variação da atividade enzimática, para uma mistura reacional com $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triclosan e $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 . Nos tempos selecionados, alíquotas de $100 \mu\text{L}$ foram retiradas do meio reacional e, imediatamente, determinados a concentração de H_2O_2 e atividade enzimática com ABTS. As curvas obtidas foram ajustadas ao modelo descrito na equação 13.

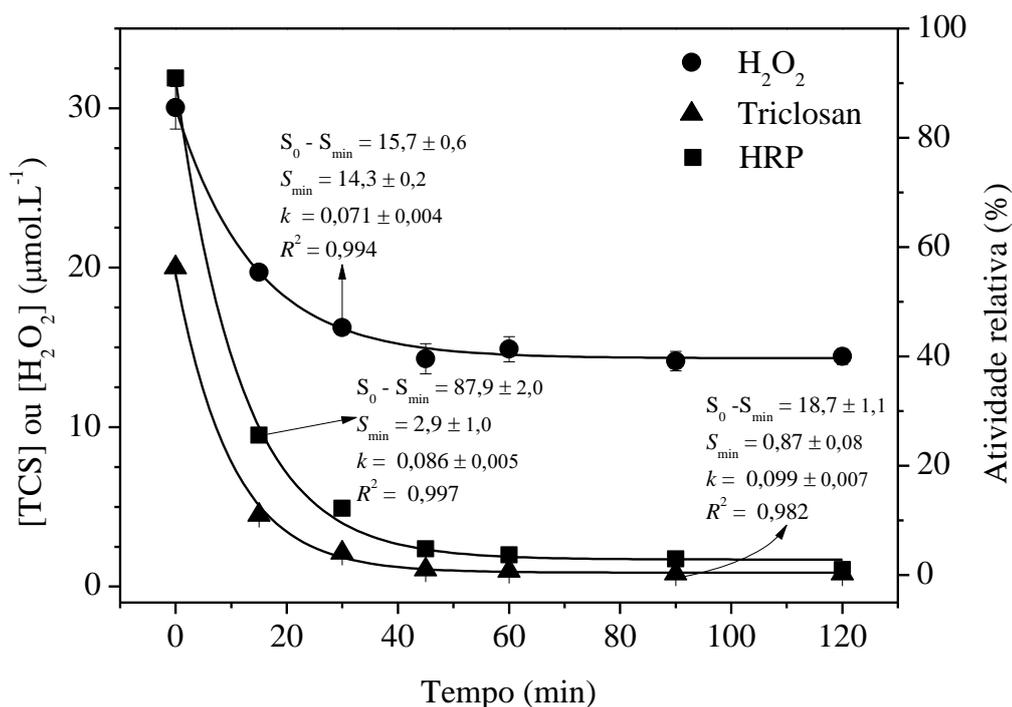


Figura 5.16. Cinéticas de conversão de triclosan catalisada por HRP, de consumo de H₂O₂ e redução da atividade catalítica. Os experimentos foram realizados com uma concentração inicial de triclosan de 20 µmol.L⁻¹, 1,0 U/mL de HRP, pH 7, 25 °C e razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5.

O bom ajuste dos dados experimentais ($R^2 > 0.99$ para todas as curvas) indicou que as reduções das concentrações de H₂O₂ e de triclosan e da atividade relativa de HRP seguiram um perfil de decaimento com o tempo de primeira ordem. A atividade relativa da HRP medida na mistura reacional, logo no início da reação, foi 9 pontos percentuais menor do que a mesma atividade medida em tampão pH 7. Essa redução imediata da atividade quando a enzima foi adicionada à mistura H₂O₂/triclosan pode ser explicada pela competição entre triclosan e o substrato colorimétrico ABTS pelos sítios ativos da HRP, resultando em uma redução da atividade medida.

Com o progresso da reação, a atividade da HRP foi gradualmente reduzida, assim como as concentrações de H₂O₂ e triclosan, até 45 min de reação. Nesse instante, triclosan atingiu a conversão máxima (>97%), porém, 5% da atividade de HRP e 14 µmol.L⁻¹ de H₂O₂ ainda permaneceram na mistura reacional. Embora não tenha sido detectada mais nenhuma conversão de triclosan e nem redução de H₂O₂, a atividade de

HRP continuou a reduzir até 120 min de reação.

Conforme mostrado no ciclo catalítico da HRP (Figura 3.5), a enzima HRP pode ser convertida em formas cataliticamente inativas por meio da reação com H_2O_2 , formando proteínas verde-heme, denominadas P-670, e composto III. A geração dessas formas inativas de peroxidase é significativa em condições reacionais de baixa concentração de substrato e excesso de H_2O_2 . A cinética de conversão de peroxidase na forma inativa P-670 é lenta e irreversível. A formação de composto III é reversível e seu retorno à forma nativa de peroxidase é lento, o que pode representar uma perda importante de atividade enzimática (HONG-MEI e NICELL, 2008). A inativação também pode ser causada pela interação com radicais livres ($RO\cdot$) gerados pela abstração de um elétron do grupo fenol do triclosan. No entanto, esse mecanismo de inativação não é significativo em concentrações baixas de substrato (HUANG *et al.*, 2005).

Dessa forma, pode-se supor que a inativação de HRP durante a conversão de triclosan pode ser devida principalmente à formação de P-670 e composto III, visto que foi utilizada uma concentração inicial de substrato baixa ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e que, ao final da reação, esteve presente uma quantidade H_2O_2 ($14 \mu\text{mol.L}^{-1}$) que não reagiu. Essas condições reacionais favorecem a inativação da peroxidase.

A concentração de H_2O_2 é um fator crítico em reações catalisadas por HRP, visto que um excesso de H_2O_2 pode aumentar a taxa de conversão de substrato e ao mesmo tempo pode reduzir a atividade da enzima por mecanismos de inativação. Para contornar esse problema, H_2O_2 pode ser gradualmente adicionado à mistura reacional durante a reação, a fim de evitar o uso de uma quantidade excessiva, mas assegurando que a concentração de H_2O_2 seja suficiente para manter as taxas de reação a níveis razoáveis. Hong-Mei e Nicell (2008) sugerem que H_2O_2 deve ser quimicamente gerado *in situ* em concentrações sub-estequiométricas para garantir o seu consumo completo ao final da reação.

5.7 Determinação da relação estequiométrica entre H_2O_2 e triclosan

Em reações enzimáticas de oxidorredução, nas quais a enzima catalisa a transferência de elétrons do substrato para o aceptor final de elétrons, a concentração de

acceptor é uma condição reacional importante. Assim, a proporção estequiométrica entre substrato e acceptor irá definir o número mínimo de moléculas de acceptor para que cada molécula de substrato seja oxidada. No caso das reações catalisadas por HRP, o acceptor final de elétrons é o H_2O_2 e, ao determinar a proporção estequiométrica entre H_2O_2 e triclosan, será definido a quantidade mínima de H_2O_2 necessária para oxidar uma quantidade estabelecida de triclosan.

A fim de determinar a relação estequiométrica entre triclosan e H_2O_2 na reação catalisada por HRP, em pH 7 e 25 °C, experimentos foram realizados com a razão molar H_2O_2 /triclosan variando entre 0 e 1. Como a concentração inicial de triclosan foi mantida constante em $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, as concentrações iniciais de H_2O_2 variaram de 0 a $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A atividade inicial de HRP (1 U/mL) e tempo de reação (120 min) foram selecionados de modo a garantir que a conversão de triclosan fosse limitada apenas pela concentração inicial de H_2O_2 . De modo que, foi considerado que H_2O_2 fosse consumido completamente em 120 min de reação. A relação entre concentração de triclosan convertido e concentração inicial de H_2O_2 está mostrada na Figura 5.17.

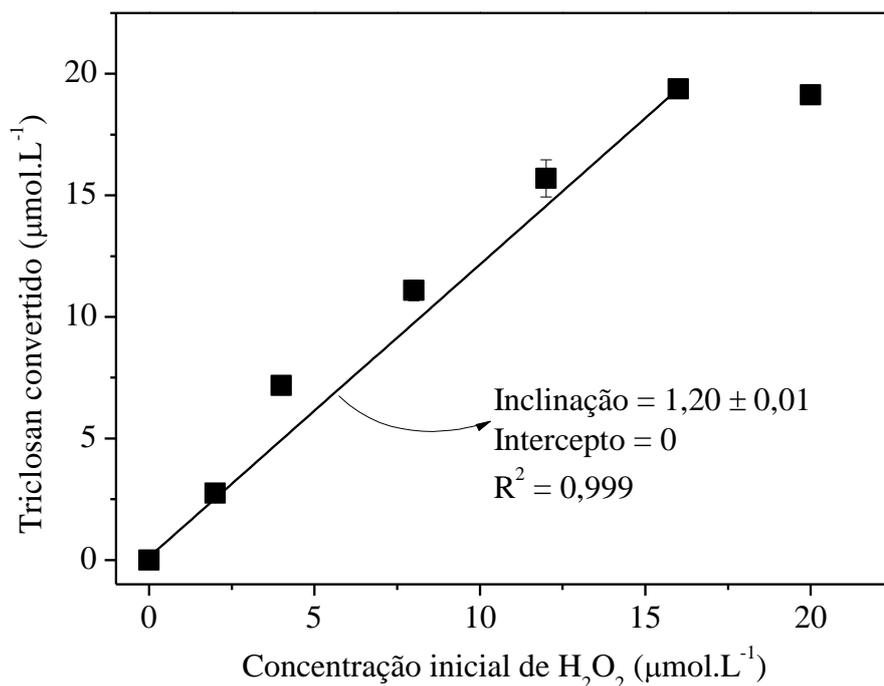


Figura 5.17. Determinação da proporção estequiométrica entre triclosan e H₂O₂ na conversão catalisada por HRP. As condições reacionais utilizadas foram: 20 μmol.L⁻¹ de triclosan, 1 U/mL de HRP, 120 min de reação, pH 7 e 25 °C.

Uma dependência linear da concentração triclosan convertido com a concentração de H₂O₂ foi verificada na faixa de concentrações entre 0 e 15 μmol.L⁻¹. A relação estequiométrica entre H₂O₂ e triclosan foi estimada pela inclinação da reta do trecho linear da curva, como 0,83 (± 0.01). Esse valor foi maior do que o previsto pelo ciclo catalítico da HRP, no qual cada molécula de H₂O₂ pode oxidar duas moléculas de substrato, resultando em uma relação estequiométrica teórica de H₂O₂/substrato de 0,5 (HONG-MEI e NICELL, 2008). Esse desvio do valor teórico foi relatado para outros substratos fenólicos como os estrogênios esteróides E2, EE2 e E3 (KHAN e NICELL, 2007a) e o aditivo de plásticos bisfenol-A (HONG-MEI e NICELL, 2008).

De acordo com Khan e Nicell (2007a), o desvio pode ser atribuído à característica dos produtos da reação, formados pela polimerização via acoplamento de radicais livres (RO[•]) produzidos a partir da oxidação enzimática. A proporção estequiométrica de 0,5 é esperada quando os radicais livres se acoplam para formar

apenas dímeros. Nos casos em que a proporção está entre 0,5 e 1,0, produtos com grupos fenólicos são possivelmente formados no início da reação e, como são substratos da HRP, esses produtos podem ser posteriormente oxidados para trímeros, tetrâmeros e outros oligômeros.

No caso da lacase, em que oxigênio dissolvido é o aceptor final de elétrons, é muito mais complexo realizar experimentos variando a concentração inicial de oxigênio, visto que este é adicionado ao meio por agitação do meio reacional e, portanto, durante todo o tempo de reação oxigênio é adicionado, fazendo com que a sua concentração seja muito similar em qualquer experimento. Além disso, é muito difícil medir a concentração de oxigênio dissolvido com volumes extremamente reduzidos, que no caso do presente estudo é de apenas 1 mL.

5.8 Conversão de triclosan catalisada pela HRP em presença de mediador-redox

Embora triclosan seja substrato da enzima HRP e o processo catalisado por HRP promova elevadas conversões do substrato, a enzima é passível de sofrer inativação por meio de diversos mecanismos, o que dificulta a sua reutilização. Desse modo, ao aplicar esse processo, é importante explorar alternativas que aumentem o seu desempenho e minimizem a quantidade utilizada. Dentre essas alternativas, destaca-se o uso de mediadores-redox, que são compostos cuja oxidação é prontamente catalisada pela enzima, formando radicais que também podem abstrair elétrons do triclosan, ampliando assim as formas de oxidar o substrato e, com isso, aumentando as taxas de conversão. Na Figura 5.18, são apresentadas as remoções de triclosan na ausência (controle) e presença de mediador-redox na proporção 1:1. Esses mediadores tem se destacado na conversão por meio do acoplamento oxidativo de substâncias que não são substrato de lacase e HRP, como sulfonamidas (BIALK *et al.*, 2005) e hidrocarbonetos poliaromáticos (CAÑAS *et al.*, 2007), o que diminui a mobilidade e biodisponibilidade dessas substâncias. Exceto a siringaldazina, os demais mediadores são ácidos húmicos modelo que podem estar presentes no solo, em diversas plantas e inclusive no esgoto doméstico (BIALK *et al.*, 2005).

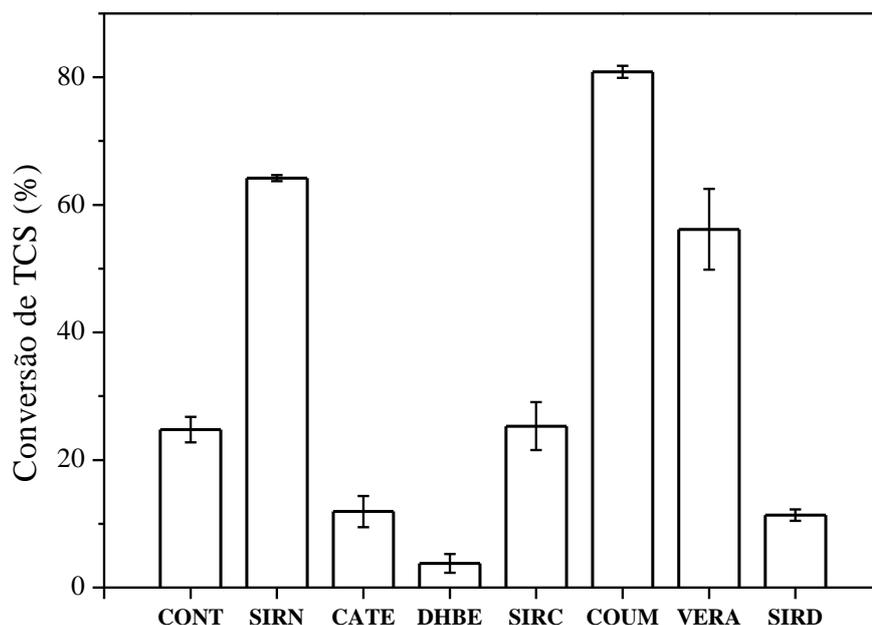


Figura 5.18. Conversões de triclosan catalisadas pela enzima HRP na ausência de mediador-redox (CONT) e na presença de siringaldazina (SIRN), catecol (CATE), 3,4-dihidroxibenzoato de etila (DHBE), ácido sirínico (SIRC), ácido *p*-coumárico (COUM), álcool veratrílico (VERA) e siringaldeído (SIRD) na razão molar mediador/triclosan de 1,0. Os experimentos foram realizados com uma concentração inicial de triclosan de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, 0,1 U/mL de HRP, 60 min de reação, pH 7, 25 °C e razão molar H_2O_2 /triclosan de 1,5.

A conversão de triclosan em presença do mediador ácido sirínico, na proporção molar utilizada, não foi significativamente diferente da obtida apenas com HRP. Além disso, a adição dos mediadores catecol, protocatecuato (DHBE) e siringaldeído inibiram a conversão com HRP.

Segundo Mechichi *et al.* (2006), o catecol e o protocatecuato também inibiram a descoloração do corante azul brilhante remazol R catalisada por lacase de *Trametes trogii*. De acordo com esse estudo, a inibição pode estar relacionada com a presença de dois grupos hidroxila na posição orto no anel aromático nesses compostos. No entanto, a adição de siringaldeído (um composto proveniente da degradação de lignina) aumentou significativamente a conversão de diversos clorofenóis (em pH 5,6) com lacase e peroxidase e, de forma menos expressiva, a conversão de cloroanilinas (PARK

et al., 1999). Murugesan *et al.* (2010) também verificaram que a adição de siringaldeído pode aumentar a conversão de triclosan catalisada por lacase de *Ganoderma lucidum* (em pH 4) de 59% para 84%. É provável que siringaldeído em pH neutro (ou básico) atue como inibidor em reações com HRP e em pH ácido atue como mediador-redox, aumentando as taxas de conversão.

A conversão de triclosan pelo processo catalisado por HRP aumentou de 25% para 56%, 64% e 80% com a adição de siringaldazina, álcool veratrílico e ácido *p*-coumárico, respectivamente, na proporção molar 1:1.

A siringaldazina é um substrato enzimático utilizado em ensaios colorimétricos para medir atividade de lacases e peroxidases, visto que é facilmente oxidada e os produtos da reação podem ser quantificados por espectrofotometria (ENOKI *et al.*, 2003). Não foram encontrados estudos na literatura utilizando siringaldazina como mediador-redox em reações catalisadas por enzimas oxidativas, embora outros substratos colorimétricos, como o ABTS e HBT, já tenham sido avaliados para a conversão com lacase (AURIOL *et al.*, 2007a; MURUGESAN *et al.*, 2010). No entanto, a toxicidade dos substratos sintéticos ABTS e HBT (e de seus produtos) impede sua aplicação na remoção de contaminantes ambientais (XU *et al.*, 2000).

O álcool veratrílico é um substrato facilmente oxidado pela lignina peroxidase que desempenha importante função na degradação da lignina pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, pois aumenta a gama de atuação de enzima para fragmentos não fenólicos de lignina (GOODWIN *et al.*, 1995). Álcool veratrílico também pode ser rapidamente convertido por HRP (MCELDOON e DORDICK, 1991), visto que possui substratos e ciclos catalíticos muito similares ao da lignina peroxidase. A rápida conversão de álcool veratrílico em presença de HRP favorece a sua utilização como mediador-redox em reações catalisadas por essa enzima.

Ácido *p*-coumárico é um ácido *p*-hidroxicinâmico encontrado com abundância no solo, onde se incorpora às substâncias húmicas. Esse composto é capaz de mediar a conversão de compostos recalcitrantes à degradação enzimática, como hidrocarbonetos poliaromáticos, benzo[a]pireno e fenantreno (CAMARERO *et al.*, 2008), esteróides recalcitrantes provenientes da polpa Kraft não-branqueada (GUTIERREZ *et al.*, 2007), corantes recalcitrantes (CAMARERO *et al.*, 2005), entre outros. No entanto, a adição

desse mediador diminui a conversão de triclosan catalisada por uma lacase de *G. lucidum* de 59% para 43% (MURUGESAN *et al.*, 2010).

Embora os subprodutos da conversão de triclosan em presença desses mediadores não tenham sido identificados, pode-se supor que sejam homo-oligômeros, formados pelo acoplamento de radicais livres de triclosan entre si ou de radicais de mediadores entre si, ou hetero-oligômeros, formados pelo acoplamento de radicais livres de triclosan e de mediadores. Bialk *et al.* (2005) propuseram, por meio da identificação dos subprodutos da reação, que a conversão de sulfonamidas (que são antibióticos bacteriostáticos), em presença HRP e mediada por ácidos húmicos modelo, ocorre por meio do acoplamento do radical fenóxi do mediador com o grupo anilínico da sulfonamida.

5.9 Avaliação da atividade antibacteriana

5.9.1 Adaptação do método de macrodiluição de Suarez *et al.* (2007)

O método utilizado para avaliar a inibição ao crescimento da *E. coli* K12 das amostras utilizou um protocolo baseado nos procedimentos descritos por Suarez *et al.* (2007) para o monitoramento da remoção da atividade antibacteriana durante a ozonização do triclosan. Nesse procedimento, para avaliar a atividade antibacteriana de uma amostra por macrodiluição, Suarez *et al.* (2007) utilizaram 14 tubos de cultura de vidro para fazer a diluição serial 2:1 do triclosan e mais um tubo para o controle negativo. Ao final da diluição, cada tubo continha 1,5 mL de triclosan diluído em tampão fosfato 1 mmol.L⁻¹, pH 8. Em seguida, cada tubo foi inoculado com 1,5 mL de *E. coli* K12 contendo 1×10⁶ UFC/mL. Após as 8h de incubação a 37 °C e 200 rpm, os tubos foram colocados em banho de gelo. Em seguida, foi retirada 1 mL de cada tubo (previamente agitado) e transferido para uma cubeta para medir a absorbância a 625 nm. Evidentemente, esse procedimento possui baixa reprodutibilidade, fornecendo apenas uma réplica para cada diluição da amostra testada, além de consumir muito tempo, materiais e reagentes. O ensaio se torna impraticável caso se utilize duplicata para cada diluição da amostra testada. Para justificar o uso de tubos de vidro, os autores argumentam que o triclosan possui fortes interações hidrofóbicas com materiais plásticos (polipropileno ou poliestireno), o que não permite o uso de tubos nem de microplacas de plástico.

Mesmo considerando a possibilidade da interação de triclosan com as paredes do recipiente, no presente estudo o ensaio foi adaptado para avaliar a atividade antibacteriana por microdiluição. As amostras foram diluídas e inoculadas com *E coli* K12 em uma microplaca de polipropileno, reduzindo o volume do ensaio, em cada diluição, de 3 mL para 200 µL, e aumentando o número de réplicas para cada diluição. Como não havia trabalhos na literatura descrevendo detalhadamente os procedimentos para a diluição em microplaca, foram utilizados dois métodos de microdiluição: procedimento I e procedimento II, descritos no item 4.6.3. No procedimento II, cada amostra é diluída, como o auxílio de uma micropipeta na proporção 2:1 em uma determinada fileira, obtendo 12 diluições da amostra. Em seguida o mesmo procedimento foi repetido mais 3 vezes em outras três fileiras da microplacas, conforme mostrado na Figura 4.9. Os demais poços (48 no total) foram utilizados como controle negativo. Esse procedimento foi testado para uma solução de triclosan de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A curva dose-resposta no ensaio está mostrada na Figura 5.19.

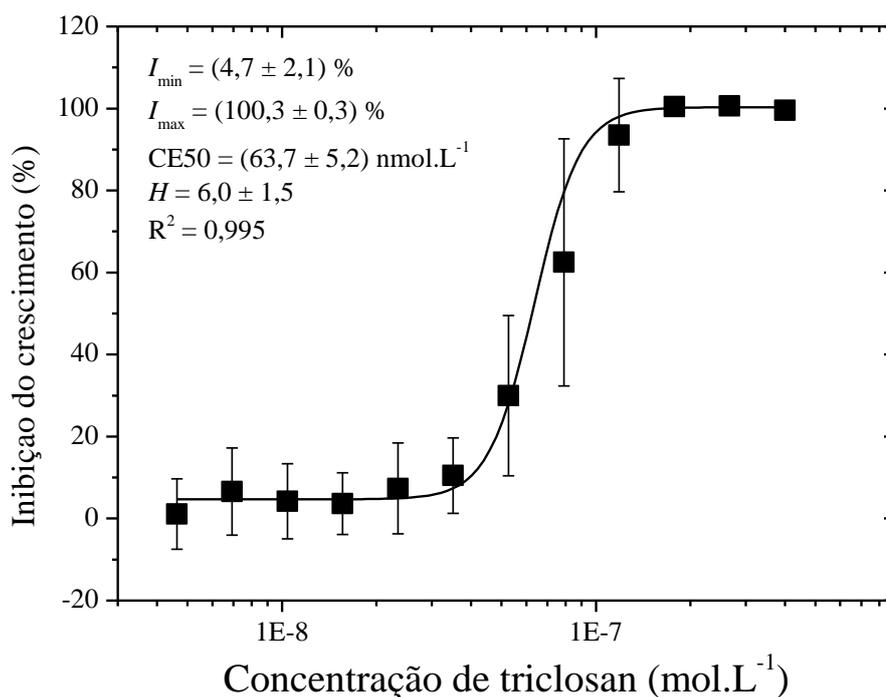


Figura 5.19. Curva dose-resposta do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana utilizando o procedimento II para microdiluição. Amostra: solução de triclosan de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão-fosfato 1 mmol.L^{-1} pH 8. Condições do ensaio: 8 h de incubação a 37°C e 200 rpm, densidade inicial do inóculo de 5×10^5 UFC/mL. O intervalo de cada ponto representa ± 1 desvio-padrão. A linha representa o modelo logístico ajustado aos dados.

No ensaio utilizando o procedimento II, a repetibilidade foi muito baixa para as diluições nas quais a inibição foi inferior a 100%, com desvio-padrão entre 7,5 e 30%. Apesar disso, a CE50 do triclosan no ensaio ($62,7 \text{ nmol.L}^{-1}$) foi similar à determinada por Suarez *et al.* (2007), utilizando macrodiluição, que foi de $61,7 \text{ nmol.L}^{-1}$. Esse resultado demonstrou que adsorção de triclosan nas paredes dos poços da microplaca não foi significativa a ponto de alterar a CE50 obtida no ensaio, o que permite a realização do ensaio usando o protocolo de microdiluição.

O ensaio foi repetido com a mesma solução de triclosan (de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$), mas dessa vez, utilizando o procedimento I para a microdiluição. Nesse procedimento, por meio de uma micropipeta de oito canais, são obtidas simultaneamente oito réplicas para cada uma das 11 diferentes diluições da amostra e para o controle negativo (apenas

tampão). Na Figura 5.20 é mostrada a foto de uma microplaca de 96 poços ao final do ensaio de uma solução de triclosan de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ diluída por meio do procedimento I.



Figura 5.20. Foto da microplaca do ensaio de atividade antibacteriana com *E. coli* K12, após 8 h de incubação (37°C e 200 rpm) para uma solução de triclosan de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ que foi diluída por meio do procedimento I. Da esquerda para a direita estão as colunas de 1 até 12, e de cima para baixo, estão as fileiras de A até H.

Na microplaca do ensaio, a diluição de triclosan é a mesma ao longo de uma coluna e aumenta da esquerda para a direita ao longo de uma mesma linha. A turbidez dos poços aumenta na medida em que aumenta a diluição de triclosan da esquerda para a direita, indicando que nas primeiras colunas à esquerda a inibição do crescimento diminui com o aumento da diluição da solução. Observa-se que nas quatro primeiras colunas da esquerda a inibição foi praticamente completa. Os poços da primeira coluna à direita são controle positivo (sem triclosan).

A curva dose-resposta do triclosan utilizando o procedimento I e o respectivo modelo logístico obtido do ajuste está mostrada na Figura 5.21.

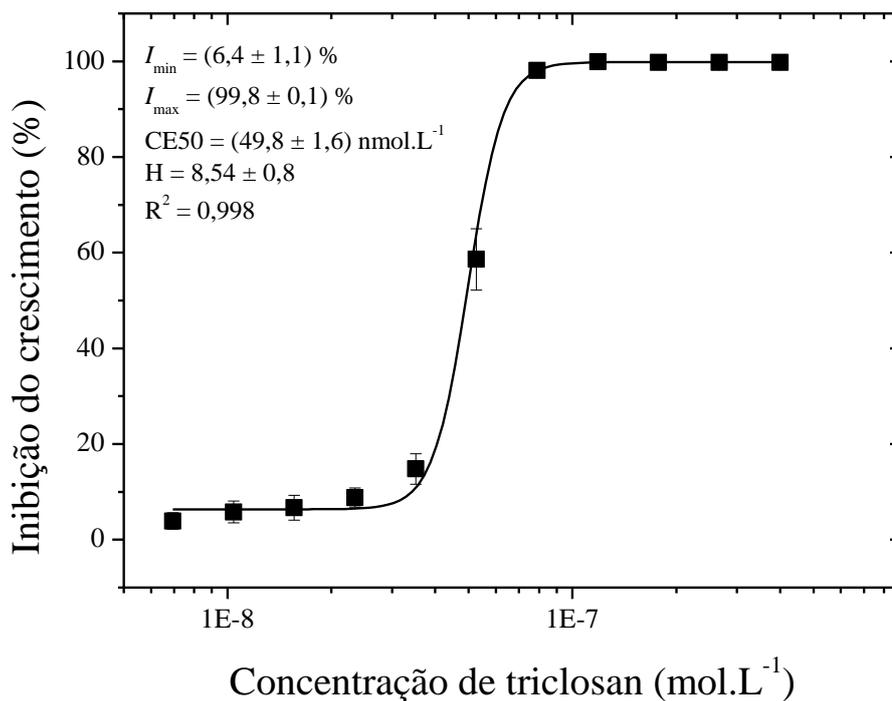


Figura 5.21. Curva dose-resposta do triclosan obtida no ensaio de atividade antibacteriana utilizando o procedimento I para microdiluição. Amostra: solução de triclosan de $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão-fosfato 1 mmol.L^{-1} , pH 8. Condições do ensaio: 8 h de incubação, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm, e densidade inicial do inóculo de $5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$. O intervalo de cada ponto representa ± 1 desvio-padrão. A linha representa o modelo logístico ajustado aos dados.

A repetibilidade obtida para cada diluição por meio do procedimento I foi significativamente maior do que a obtida para procedimento, com o desvio-padrão das inibições variando de 0,1 a 6%. A concentração de triclosan no limite de detecção do ensaio com a curva dose-resposta ajustada ao modelo logístico, determinado por meio da equação 8, foi de $33,8 \text{ nmol.L}^{-1}$.

A análise de variância estatística (ANOVA) para o ajuste do modelo logístico (equação 6) à curva dose-resposta mostrada na Figura 4.18 é mostrada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. ANOVA para o ajuste do modelo logístico à curva dose-resposta do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana seguindo o procedimento I.

FONTE DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F_{calc}	F_{crit}^1
Regressão (reg)	166127	3	55375	5491	2,7
Resíduos (res)	847,0	84	10,08		
Falta de ajuste (faj)	352,9	7	50,4	7,9	2,1
Erro puro (ep)	494,1	77	6,4		
Total	166974	87			

% de variância explicada = 99,49

% máxima de variância explicada = 99,70

¹Significância de 5% ($\alpha = 5\%$)

De acordo com Barros Neto *et al.* (1995), um modelo matemático é significativo, para descrever um conjunto de dados experimentais, quando ele apresenta regressão significativa e uma falta de ajuste que não seja significativa, ao nível de significância estipulado. Uma forma de testar a regressão e a falta de ajuste de um modelo é por meio da comparação entre F_{calc} para a regressão ($MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}}$) e F_{calc} para a falta de ajuste ($MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$) com o valor do teste F (F_{crit}), com os mesmos números de graus de liberdade. Assim, quanto maior for o valor do $MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}}$ em relação ao valor de F_{crit} ($MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}} > F_{\text{crit}}$), com um nível de significância estipulado, mais significativa é a regressão. Por outro lado, quanto menor o valor $MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$ em relação ao F_{crit} ($MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}} < F_{\text{crit}}$), menos significativa será a falta de ajuste. Analisando a Tabela 5.2, verificou-se que a porcentagem de variação explicada pela regressão é alta e que o valor de $MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}}$ é muito maior que F_{crit} para o mesmo número de graus de liberdade ($MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}} \gg F_{\text{crit}}$), o que indicaria uma regressão significativa não fosse pela evidência da falta de ajuste, confirmada pelo alto valor de $MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$ ($MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}} > F_{\text{crit}}$). Desse modo, foi testado o modelo sigmoidal dose-resposta (equação 7) para ajustar a curva dose-resposta do triclosan obtida por meio do procedimento II, conforme mostrado na Figura 5.22.

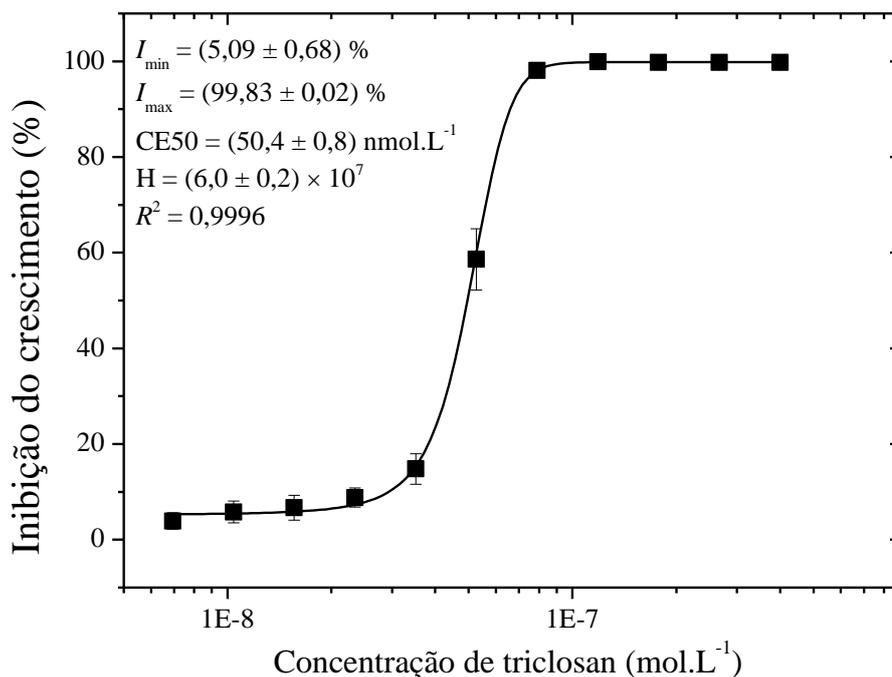


Figura 5.22. Curva dose-resposta do triclosan obtida no ensaio de atividade antibacteriana utilizando o procedimento I para microdiluição. Amostra: solução de triclosan $0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão-fosfato pH 8, 1 mmol.L^{-1} . Condições do ensaio: 8 h de incubação a 37°C e 200 rpm, densidade inicial do inóculo de $5 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$. O intervalo de cada ponto representa ± 1 desvio-padrão. A linha representa o modelo dose-resposta ajustado aos dados.

A concentração de triclosan no limite de detecção do ensaio com a curva ajustada ao modelo dose-resposta, determinada por meio da equação 9, foi de $22,8 \text{ nmol.L}^{-1}$, o que indica que a curva ajustada a esse modelo é mais sensível do que quando ajustada ao modelo logístico.

A Tabela 5.3 apresenta a ANOVA para o ajuste do modelo dose-resposta à curva dose-resposta do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana executado seguindo o procedimento I.

Tabela 5.3. ANOVA para o ajuste do modelo dose-resposta à curva do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana seguindo o procedimento I.

FONTE DE VARIACÃO	SQ	GL	MQ	F_{calc}	F_{crit}^1
Regressão (reg)	165862	3	55287	8412,8	2,7
Resíduos (res)	552,0	84	6,6		
Falta de ajuste (faj)	57,89	7	8,3	1,3	2,1
Erro puro (ep)	494,1	77	6,4		
Total	166414	87			

% de variância explicada = 99,66

% máxima de variância explicada = 99,70

¹Significância de 5% ($\alpha = 5\%$)

Portanto, pôde-se observar que o valor de MQ_{reg}/MQ_{res} foi maior que o seu respectivo F_{crit} . Além disso, o valor de MQ_{faj}/MQ_{ep} foi menor que o valor do F_{crit} , para o mesmo número de graus de liberdade. Assim, podemos concluir que a regressão apresentada pelo modelo foi significativa e que não houve evidências da falta de ajuste. Esses resultados, somados às altas porcentagens de variância explicada, indicam que o modelo dose-resposta, descrito na equação 7 é apropriado para descrever a curva dose-resposta do triclosan no ensaio de atividade antibacteriana.

Assim, para avaliar a atividade antibacteriana das amostras nesse trabalho foi utilizado o procedimento I e as curvas dose-resposta obtidas foram ajustadas por meio do modelo sigmoidal dose-resposta.

O valor da $CE50^1$ do triclosan obtida nesse trabalho ($50,4 \pm 0,8 \text{ nmol.L}^{-1}$), utilizando o procedimento I e o modelo dose-reposta, foi menor do que a $CE50$ determinada por Suarez *et al.* (2007) que foi de $62 (\pm 1) \text{ nmol.L}^{-1}$, indicando que a curva dose-resposta obtida por meio da microdiluição é mais sensível do que a obtida pela macrodiluição. Além disso, o protocolo baseado na microdiluição é mais reprodutível e mais prático de realizar do que o da macrodiluição. No entanto, as pequenas diferenças na sensibilidade observadas entre os métodos não comprometem a comparação entre as

¹ Concentração necessária para inibir 50% do crescimento da *E. coli* K12 em relação ao controle

atividades antibacterianas das soluções tratada e não-tratada.

5.9.2 Avaliação da remoção da atividade antibacteriana

Conforme avaliado no item 5.5, o processo catalisado por HRP apresenta elevada eficiência catalítica na conversão de triclosan, com reduzido acréscimo no teor de proteínas da solução, atuando em faixas de pH e de temperatura apropriadas aos efluentes de ETE. No entanto, é importante avaliar se os produtos formados após a reação enzimática apresentam atividade antibacteriana, e com isso saber se, a reação promoveu uma alteração no grupo fenólico da molécula de triclosan, que está relacionado com a atividade biológica do agente. Essa é uma das etapas mais importantes desse trabalho e para isso foi utilizado uma cepa de bactéria (*Escherichia coli* K12) que não desenvolveu mecanismos de resistência a antibióticos e, portanto, poderá fornecer medidas extremamente sensíveis da atividade inibitória do triclosan e/ou de seus produtos da reação enzimática.

As condições utilizadas no tratamento de triclosan com HRP (tempo e dosagem de enzima) foram selecionadas de modo que a dose de HRP fosse a menor possível para a máxima conversão detectável (> 97%), a fim de evitar possíveis interferências da enzima no ensaio biológico. Uma possível interferência está relacionada com a adição de proteínas, o que levaria a um estímulo no crescimento da *E. coli* K12. Além disso, como a atividade de HRP é desprezível após 2 h de reação, conforme mostrado na Figura 5.16, ao se utilizar um tempo de reação de 6 h, evita-se a possibilidade de triclosan ser convertido durante o ensaio biológico.

Assim, o tratamento foi realizado com uma dose de HRP um pouco maior (0,75 U/mL)¹ do que a dose mínima com 6 h de reação (item 5.5), visto que o tempo de reação foi reduzido para 5 h. concentração residual de H₂O₂ foi de 15 µmol.L⁻¹ e não foi suficiente para causar inibição no ensaio, visto que após a diluição com tampão-fosfato, a concentração é reduzida ainda mais, chegando a 0,6 µmol.L⁻¹ (ou 20 µg.L⁻¹).

Na Figura 5.23, são mostradas as curvas dose-resposta para as soluções de triclosan tratada e não tratada e de uma solução de HRP de 0,75 U/mL, em pH 7, (a

¹ As demais condições do tratamento foram: pH 7, 25 °C e razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5

mesma atividade utilizada no tratamento), com fatores de diluição “in vitro” variando de 0,0087 a 0.5. Vale lembrar que, antes do ensaio, todas as soluções foram diluídas 25 × com tampão fosfato.

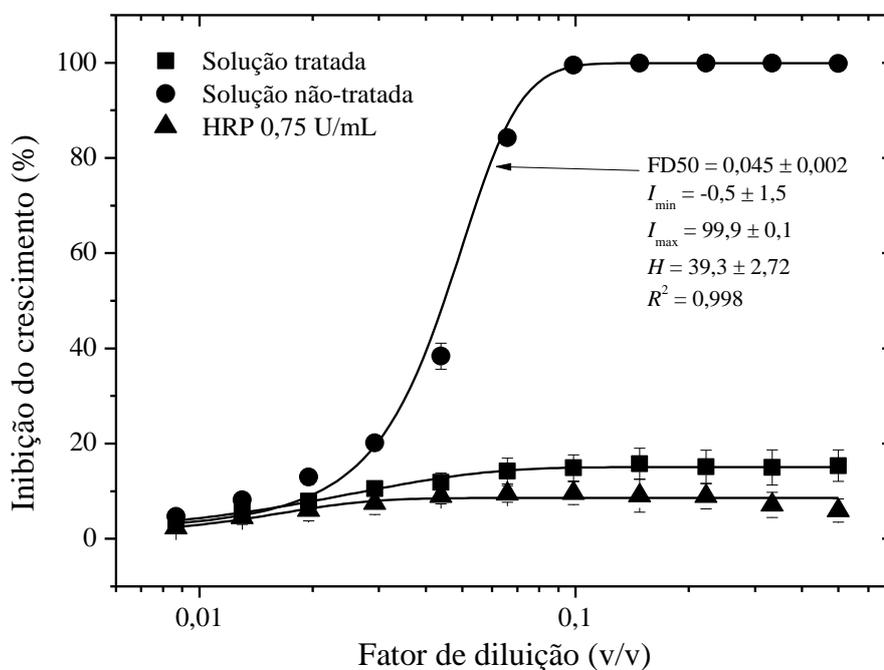


Figura 5.23. Curvas dose-resposta da solução de HRP de 0,75 U/mL e da solução de triclosan (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) não-tratada e tratada com HRP. As condições do tratamento foram as seguintes: 0,75 U/mL de HRP, pH 7, 6 h, 25 °C e razão molar H_2O_2 /triclosan de 1,5. Antes do ensaio, as soluções foram diluídas 25 × com tampão fosfato pH 8.

A curva para a solução de triclosan não-tratada (com 800 nmol.L^{-1} , após diluição de 25×) exibiu uma tendência sigmoide e foi ajustada ao modelo dose-resposta (equação 7), com uma CE50 de 36 nmol.L^{-1} . O fator de diluição no limite de detecção da curva foi de 0,011, que corresponde a uma concentração de triclosan de 17,6 nmol.L^{-1} .

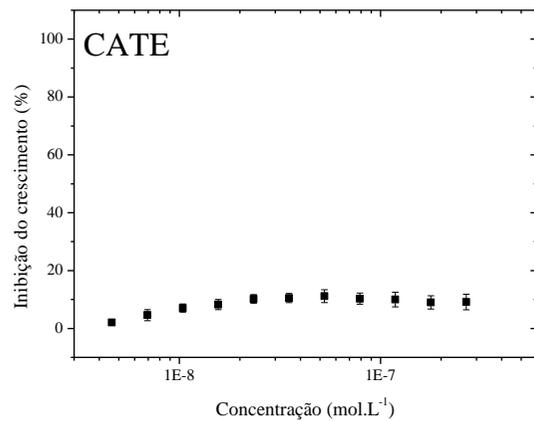
A curva da solução de HRP não exibiu um perfil sigmoide e, conseqüentemente, o modelo não se ajustou aos dados experimentais. A concentração equivalente de triclosan da solução de HRP, ou seja, a concentração de triclosan que apresentaria a mesma resposta no ensaio de atividade antibacteriana foi estimada, por

meio da equação 10, como $31,8 \text{ nmol.L}^{-1}$. A baixa inibição apresentada pela solução de HRP pode ser devida aos agentes estabilizantes presentes na HRP comercial.

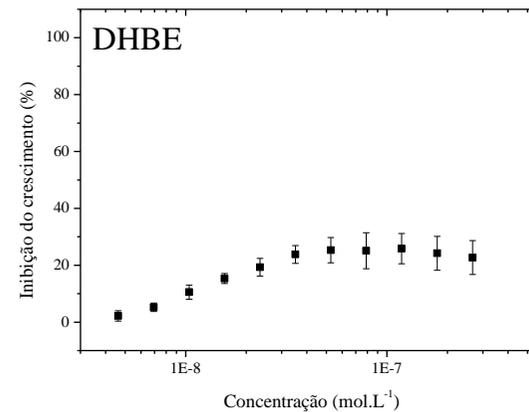
De modo similar à solução de HRP, a curva da solução de triclosan tratada com HRP não exibiu um perfil sigmoidal e, conseqüentemente, o modelo não se ajustou aos dados experimentais. A concentração equivalente de triclosan dessa solução foi determinada como $42,2 \text{ nmol.L}^{-1}$. Tendo em vista que a concentração de triclosan na solução não-tratada, após diluída $25 \times$, é de 800 nmol.L^{-1} , a remoção de equivalentes de triclosan foi de 95%, similar à remoção média determinada por HPLC que foi de 98%. Assim, pode-se inferir que a atividade residual seja devida ao triclosan que não foi convertido e que os produtos da reação enzimática não possuem atividade antibacteriana. Essa constatação é consistente com o mecanismo de reação de compostos fenólicos em presença de HRP, no qual os grupos fenólicos perdem um elétron, formando radicais livres, que se acoplam dando origem a dímeros e trímeros com menos (ou sem) grupos fenólicos.

5.9.3 Avaliação da atividade antibacteriana dos mediadores-redox

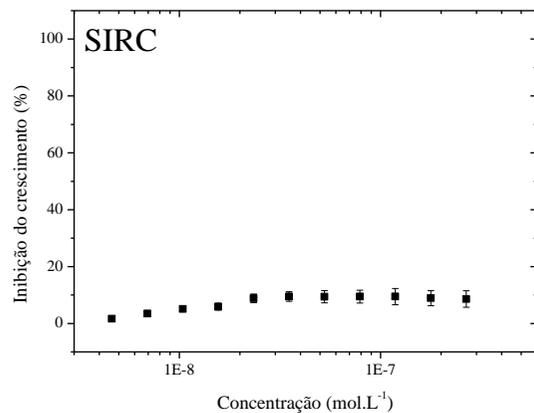
Os compostos que foram utilizados como mediadores-redox na conversão de triclosan por HRP, com exceção do álcool veratrílico, apresentam em suas moléculas estruturas fenólicas e, por isso, podem apresentar atividade antibacteriana. O efeito inibitório desses compostos foi avaliado por meio do ensaio de atividade antibacteriana, utilizando soluções de $20 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, que é a mesma concentração utilizada nas reações enzimáticas (que utilizam uma razão molar mediador/triclosan de 1,0). Da mesma forma que as soluções de triclosan, as soluções de mediador foram diluídas $25 \times$, para permitir a comparação com a curva dose-resposta do triclosan no ensaio. Os resultados do ensaio estão mostrados na Figura 5.24 e na Figura 5.25.



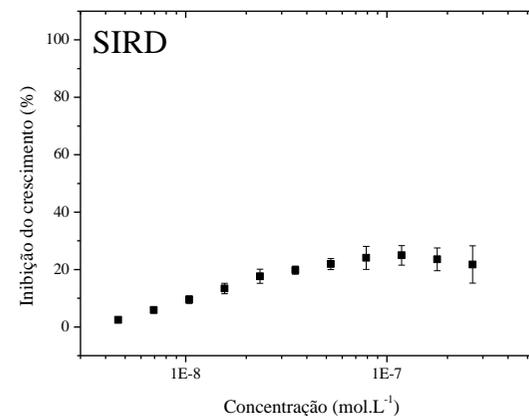
A



B

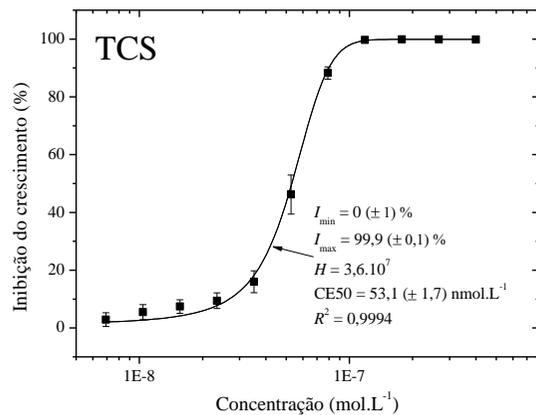


C

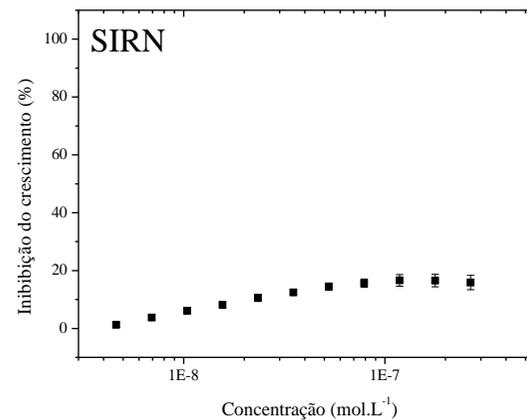


D

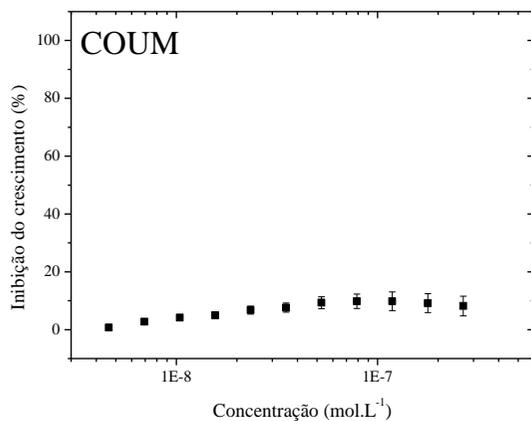
Figura 5.24. Curvas dose-resposta, no ensaio de atividade antibacteriana, dos mediadores-redox: catecol (A), protocatecuato (B), ácido siríngico (C) e siringaldeído (D). A concentração das soluções de mediador foi a mesma o utilizada nas reações enzimáticas ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, antes do ensaio, essas soluções foram diluídas $25\times$.



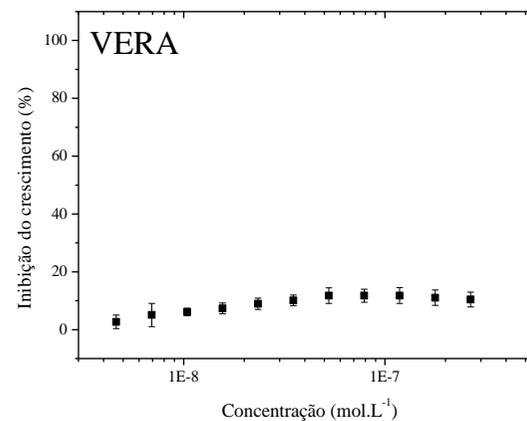
A



B



C



D

Figura 5.25. Curvas dose-resposta, no ensaio de atividade antibacteriana, do triclosan (A) e dos mediadores-redox: siringaldazina (B), ácido *p*-coumárico (C) e álcool veratrílico (D). A concentração das soluções de mediador foi a mesma o utilizada nas reações enzimáticas ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e, antes do ensaio, essas soluções foram diluídas $25\times$.

A atividade antibacteriana dos mediadores-redox foi, de um modo geral, bem menor do que a apresentada pelo biocida triclosan. Os mediadores que apresentaram maior atividade foram protocatecuato, siringaldazina e siringaldeído, exibindo curvas dose-resposta com valor máximo de inibição entre 20 e 30%.

Na Figura 5.26 é apresentada a potência antibacteriana relativa de cada um dos mediadores-redox que foram utilizados na conversão de triclosan em presença de HRP (item 5.8). A potência relativa foi estimada com base na concentração equivalente de triclosan da solução de mediador, que possui a mesma concentração de triclosan utilizada em sua curva dose-resposta (800 nmol.L^{-1}), conforme descrito na equação 11.

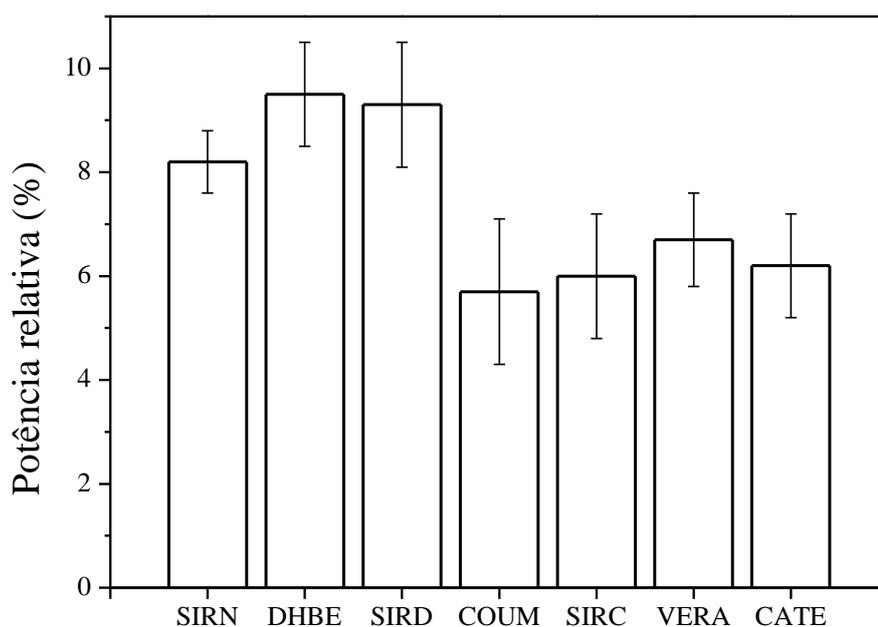


Figura 5.26. Estimativas das potências antibacterianas relativas dos mediadores-redox no ensaio de atividade antibacteriana. A concentração de mediador nas soluções foi de 800 nmol.L^{-1} e, após a diluição serial e adição de inoculo, a faixa de concentrações “in vitro” foi de $13,6$ a 400 nmol.L^{-1} . O limite de detecção da curva dose-resposta do triclosan foi de 22 nmol.L^{-1} .

A potência antibacteriana dos mediadores testados foi maior do que o menor valor de potência que pode ser medido, levando em consideração o limite de detecção do ensaio, que é de 2,8%. Os mediadores ácido *p*-coumárico, ácido siríngico, álcool

veratrílico e catecol apresentaram valores similares de potência antibacteriana, do mesmo modo que os valores de potência dos mediadores siringaldazina, protocatecuato e siringaldeído foram similares entre si e, ao mesmo tempo, maiores do que os apresentados pelos primeiros mediadores.

Os mediadores que se destacaram em aumentar a conversão de triclosan em presença de HRP, conforme mostrado no item 5.8, foram siringaldazina, ácido *p*-coumárico e álcool veratrílico e, entre esses, os dois últimos apresentaram potências antibacterianas significativamente menores.

Embora a atividade antibacteriana não tenha sido avaliada após a conversão de triclosan em presença de mediador, é provável que seja muito baixa, considerando que, após a reação, os grupos fenol do triclosan e dos mediadores tenham sido transformados, conforme discutido no item 5.8. Essa transformação faz com que esses compostos percam a característica estrutural chave para atuarem como inibidores do crescimento da *E. coli* K12. E ainda que uma parte de mediador não seja convertida, sua adição ao meio reacional não implicaria em um aumento expressivo da atividade antibacteriana da solução tratada, visto que os mediadores, de um modo geral, quando comparados ao triclosan (na mesma proporção molar) apresentaram baixa atividade antibacteriana.

5.10 Conversão de triclosan em concentração ambientalmente relevante

Embora o processo catalisado por HRP tenha se mostrado eficiente na conversão e remoção da atividade antibacteriana do triclosan, esses experimentos foram realizados com soluções de triclosan em uma concentração (5,8 mg/L) muito maior do que aquelas em que triclosan é encontrado em matrizes ambientais, que são da ordem de alguns microgramas por litro. Assim, o processo enzimático foi avaliado para a remoção de triclosan em uma solução com 10 µg/L (ou 34,5 nmol.L⁻¹), que é mais alta concentração determinada em afluentes de ETE da Espanha (KANTIANI *et al.*, 2008).

O tratamento foi realizado com três valores diferentes de atividade inicial de HRP (0,5, 1,0 e 2,0 U/mL), nas seguintes condições reacionais: 25°C, razão molar H₂O₂/triclosan de 1,5 e 5 h de reação. Embora a atividade da HRP seja praticamente nula após 2 h de reação, conforme mostrado na Figura 5.16, foi utilizado um tempo de

reação muito maior nesses experimentos para garantir que a conversão fosse limitada apenas pela atividade inicial de HRP. Além disso, é de se esperar que a inativação da HRP ocorra a partir de tempos de reação muito maiores, visto que é utilizada uma concentração de H_2O_2 ($51,8 \text{ nmol.L}^{-1}$) muito menor do que a utilizada no experimento da Figura 5.16, que foi de ($30 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).

As concentrações residuais das soluções tratadas e do controle estão mostradas na Tabela 5.4. A recuperação do analito (triclosan) pelo processo de extração em fase sólida foi estimada em 93,7%, por meio da extração de uma solução de triclosan com a mesma concentração utilizada nos tratamentos com 1,0 U/mL de HRP desnaturada (controle).

Tabela 5.4. Concentrações residuais de triclosan após o tratamento com três valores diferentes de atividade inicial de HRP. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 25°C , razão molar $\text{H}_2\text{O}_2/\text{triclosan}$ de 1,5 e 5 h de reação. A atividade de HRP foi medida por meio do ensaio com fenol/AAP ($U_{\text{PhOH/AAP}}/\text{mL}$) e por meio do ensaio com ABTS ($U_{\text{ABTS}}/\text{mL}$).

Atividade inicial de HRP		Concentração de triclosan ($\mu\text{g/L}$)
$U_{\text{PhOH/AAP}}/\text{mL}$	$U_{\text{ABTS}}/\text{mL}$	
0	0	$9,37 \pm 0,06$
0,27	0,5	$0,41 \pm 0,03$
0,54	1,0	< LD
1,1	2,0	< LD

Limite de detecção (LD) = $0,036 \mu\text{g/L}$

Limite de quantificação (LQ) = $0,101 \mu\text{g/L}$

Com uma atividade inicial de $1,0 U_{\text{ABTS}}/\text{mL}$ de HRP, foi possível reduzir a concentração de triclosan de $10 \mu\text{g/L}$ ($34,5 \text{ nmol.L}^{-1}$) para um valor abaixo de $0,036 \mu\text{g/L}$, resultando em uma remoção superior a 99,6%. A razão molar enzima/substrato utilizada nesse experimento foi de 0,98, aproximadamente uma molécula de enzima para cada de substrato, o que é muito superior à utilizada para converter 97% de triclosan em uma solução com concentração inicial de $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$, de que foi de $1,05 \times 10^{-3}$ (conforme determinado no item 5.5).

Para enzimas que seguem a cinética de Michaelis-Menten, como a HRP, a taxa de conversão inicial de reação v é dada pela equação 14:

$$v = \frac{k_{\text{cat}} [E_t][S]}{K_m + [S]} \quad (14)$$

Onde: K_m é o constante de Michaelis-Menten, $[E_t]$ é a concentração de enzimas, k_{cat} a constante cinética de primeira-ordem efetiva para a quebra do complexo enzima-substrato e $[S]$ concentração de substrato.

No entanto, para reações em que a concentração inicial de substrato é muito menor do que K_m ($[S] \ll K_m$), a velocidade inicial da reação passa a depender diretamente da eficiência catalítica k_{cat}/K_m , da concentração de enzima $[E_t]$ e da concentração inicial de substrato $[S]$, conforme mostrado na equação 15.

$$v = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \cdot [E_t][S] \quad (15)$$

A equação 16 é equivalente à equação 15, mas com a quantidade de enzima expressa em termos da razão $[E_t]/[S]$.

$$v = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \cdot \frac{[E_t]}{[S]} [S]^2 \quad (16)$$

Assim, caso fosse mantida a mesma razão molar $[E_t]/[S]$ utilizada em concentrações iniciais de substrato similares ao parâmetro K_m , a taxa de conversão de substrato reduziria consideravelmente, visto que varia diretamente com o quadrado da concentração de substrato. Assim, quando a concentração inicial de substrato é muito baixa, é necessário aumentar a razão molar $[E_t]/[S]$ de enzima na reação e/ou utilizar outra enzima com eficiência catalítica superior para que os tempos de reação não se tornem demasiadamente longos.

A análise dessas relações demonstra que, quando a concentração inicial de

triclosan diminuiu em várias ordens de grandeza (de 20×10^3 nmol.L⁻¹ para 34,5 nmol.L⁻¹), a probabilidade de uma molécula de triclosan encontrar uma enzima também diminuiu consideravelmente, o que torna necessário aumentar a quantidade de enzima para que a taxa de reação não seja demasiadamente baixa, conforme previsto pela equação 16.

Auriol *et al.* (2007b), utilizaram a mesma enzima para remoção de uma mistura de quatro estrogênios esteróides com concentração total de 1,52 nmol.L⁻¹, e obtiveram remoções próximas a 100%, mas com uma dosagem de enzima 10 vezes menor (0,032 U_{PhOH/AAP}/mL) e um tempo de reação cinco vezes menor (1 h) do que os utilizados no presente estudo. Esse resultado é consistente com o fato de que os estrogênios esteróides são substratos muito mais específicos para a HRP do que o triclosan, visto que a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) para a conversão de estrogênios esteróides (entre $6,47 \times 10^5$ e $1,13 \times 10^6$ mol⁻¹.L.s⁻¹) é significativamente maior do que para a conversão de triclosan ($5,47 \times 10^4$ mol⁻¹.L.s⁻¹).

A concentração de proteínas no meio reacional após a adição de 1,0 U/mL de HRP foi estimada em 1 mg/L, de acordo com a equação 12. Essa quantidade de HRP comercial adicionada implica no acréscimo de uma concentração de proteínas de apenas 1 mg por litro de solução, o que resulta em um aumento insignificante no teor de matéria orgânica. Considerando uma relação DQO/mg de proteína de 1,5 (MIRON *et al.*, 2000; AQUINO *et al.*, 2006), pôde-se estimar a DQO correspondente à proteínas em solução em 1,5 mgO₂.L⁻¹.

Vale ressaltar que o valor determinado para concentração de proteínas em solução é válido apenas para o preparado enzimático comercial contendo HRP (da Sigma-Aldrich) utilizado no presente trabalho, que apresenta um elevado teor de proteínas (28% m/m) e baixo grau de pureza, conforme discutido no item 5.1. Assim, é de se esperar que o teor de proteínas em solução seja ainda menor ao se utilizar preparado enzimático com grau de pureza mais elevado.

O processo catalisado por HRP foi capaz de converter triclosan em uma concentração muito menor do que K_m da reação (8,6 mg/L), com uma dose de enzima e um tempo de reação que não foram demasiadamente elevados. Consequentemente, o processo apresenta grande potencial de ser usado para remover triclosan em

concentrações similares às que são encontradas em amostras reais, como, por exemplo, em afluentes de ETE.

6. CONCLUSÕES

Embora tanto o processo catalisado por HRP como o processo catalisado por lacase tenham sido efetivos na conversão de triclosan, o processo com HRP é mais apropriado para atuar nas faixas de pH e de temperatura de efluentes de ETE e possui eficiência catalítica superior. Além disso, no processo com HRP o teor de proteínas dissolvido na solução reacional é muito menor do que no processo com lacase.

A conversão de triclosan foi significativamente influenciada pelas condições reacionais, como a atividade inicial de HRP, presença de mediadores-redox e razão molar H_2O_2 /triclosan, o que sugere que esses parâmetros devam ser otimizados ao aplicar esse processo. Os mediadores-redox ácido *p*-coumático, álcool veratrílico e siringaldazina, que possuem atividade antibacteriana muito baixa, aumentaram significativamente a taxa de conversão de triclosan, quando utilizados na razão molar mediador/triclosan de 1,0. Alguns desses mediadores, como o ácido *p*-coumático, são ácidos húmicos que podem estar presentes em efluentes de ETE.

A conversão de triclosan catalisada por HRP segue uma cinética de Michaelis-Menten e a afinidade da HRP por triclosan é similar à afinidade de lacase por esse substrato. O decaimento de triclosan, H_2O_2 e atividade de HRP durante a reação seguiu um padrão de primeira-ordem, sendo que, a redução da atividade de HRP pode ser devida a mecanismos de inativação relacionados com a presença de excesso de H_2O_2 .

A atividade antibacteriana de triclosan foi eficientemente reduzida pelo tratamento enzimático, indicando que o anel fenólico foi modificado para um grupo éter mais hidrofóbico por meio de mecanismos de acoplamento oxidativo, formando dímeros, trímeros e outros oligômeros, conforme indicado na literatura. Esses subprodutos apresentam maior hidrofobicidade do que o triclosan e, portanto, menores mobilidade e biodisponibilidade em matrizes aquosas, os quais podem ser removidos mais facilmente por microfiltração e/ou coagulação.

Além disso, foi demonstrada a viabilidade técnica do processo catalisado por HRP para a remoção de triclosan em uma concentração ambientalmente relevante, sem consumir uma grande quantidade de enzima ou sem requerer tempos demasiadamente longos de reação. Conseqüentemente, o processo é um candidato potencial para a

remoção de triclosan em matrizes ambientais complexas, como efluentes de ETE, nas quais um processo de tratamento seletivo é necessário visto que outros compostos orgânicos (e inorgânicos) estão presentes em concentrações muito maiores. O tratamento com HRP pode ainda remover outros micropoluentes que possuam anel fenólico, como os desreguladores endócrinos estrogênicos, com a vantagem de formar sub-produtos com atividade biológica reduzida.

De acordo com a revisão feita na literatura, esse é o primeiro trabalho relatando o uso da enzima HRP para a remoção da atividade antibacteriana de triclosan e para remoção em concentrações ambientalmente relevantes, em água ultrapura.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade a esse trabalho, propõe-se:

- A avaliação do desempenho catalítico de outras enzimas oxidativas na conversão de triclosan, como lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase de *Coprinus cinereus*;
- A identificação dos subprodutos da conversão enzimática de triclosan, com e sem mediadores-redox por técnicas analíticas, como a espectroscopia de massas e a de ressonância magnética nuclear, para elucidar os mecanismos de reação e avaliar a estabilidade das ligações químicas formadas nos subprodutos;
- A avaliação da estabilidade dos subprodutos da reação a agentes físicos e químicos, como radiação UV e visível, adsorção em sedimentos, hidrólise, alterações de pH e oxidação por microrganismos aeróbios e anaeróbios;
- A avaliação do uso de outros mediadores-redox naturais, como os provenientes da degradação da lignina ou da matéria orgânica natural presente no solo, visando o aumento das taxas de conversão enzimática de triclosan;
- A avaliação da remoção da atividade antibacteriana das soluções tratadas com enzimas utilizando ensaios com outras espécies de bactéria de relevância ambiental;
- A avaliação do desempenho dos processos enzimáticos em remover triclosan de efluentes de ETE em concentrações ambientalmente relevantes;
- A avaliação da remoção de triclosan por meio de enzimas imobilizadas em suportes de baixo custo e de reduzido impacto ambiental;
- Estudos sobre os mecanismos pelos quais HRP é inativada em baixas concentrações de substrato e determinação de um ponto ótimo para a taxa de adição de H₂O₂ ao meio reacional, de modo a minimizar a inativação da enzima e maximizar a conversão de substrato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESCHLIMANN, J.R., 2003, "The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria - Insights from the society of infectious diseases pharmacists", **Pharmacotherapy**, v. 23, n. 7, pp. 916-924.
- AIELLO, A.E., LARSON, E.L., LEVY, S.B., 2007, "Consumer antibacterial soaps: Effective or just risky?", **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, pp. S137-S147.
- AQUINO, S.F., SILVA, S.Q., CHERNICHARO, C.A.L., 2006, "Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado a análise de efluentes anaeróbios", **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 4, pp. 295-304.
- ARANAMI, K., READMAN, J.W., 2007, "Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater", **Chemosphere**, v. 66, n. 6, pp. 1052-1056.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., ADAMS, C.D., TYAGI, R.D., 2006a, "Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: Temperature and pH effects", **Water Research**, v. 40, n. 15, pp. 2847-2856.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., TYAGI, R.D., ADAMS, C.D., SURAMPALLI, R.Y., 2006b, "Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge", **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, pp. 525-539.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., TYAGI, R.D., ADAMS, C.D., 2007a, "Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater", **Water Research**, v. 41, n. 15, pp. 3281-3288.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., TYAGI, R.D., ADAMS, C.D., 2007b, "Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in wastewater", **Chemosphere**, v. 68, n. 10, pp. 1830-1837.
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., ADAMS, C.D., TYAGI, R.D., NOGUEROL, T.N., PINA, B., 2008, "Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*", **Chemosphere**, v. 70, n. 3, pp. 445-452.

- BALMER, M.E., POIGER, T., DROZ, C., ROMANIN, K., BERGQVIST, P.A., MÜLLER, M.D., BUSER, H.R., 2003, "Occurrence of Methyl Triclosan, a Transformation Product of the Bactericide Triclosan, in Fish from Various Lakes in Switzerland", **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 2, pp. 390-395.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.D., 2007, **Como fazer experimentos**. 3 ed. Campinas, Editora da Unicamp.
- BEHERA, S.K., OH, S.Y., PARK, H.S., 2010, "Sorption of triclosan onto activated carbon, kaolinite and montmorillonite: Effects of pH, ionic strength, and humic acid", **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1-3, pp. 684-691.
- BIALK, H.M., SIMPSON, A.J., PEDERSEN, J.A., 2005, "Cross-Coupling of Sulfonamide Antimicrobial Agents with Model Humic Constituents", **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 12, pp. 4463-4473.
- BRADFORD, M.M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, pp. 248-254.
- CABANA, H., JIWAN, J.L.H., ROZENBERG, R., ELISASHVILI, V., PENNINCKX, M., AGATHOS, S.N., JONES, J.P., 2007a, "Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*", **Chemosphere**, v. 67, n. 4, pp. 770-778.
- CABANA, H., JONES, J.P., AGATHOS, S.N., 2007b, "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, pp. 23-31.
- CABANA, H., JONES, J.P., AGATHOS, S.N., 2009, "Utilization of cross-linked laccase aggregates in a perfusion basket reactor for the continuous elimination of endocrine-disrupting chemicals", **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 6, pp. 1582-1592.

- CAMARERO, S., CANAS, A.I., NOUSIAINEN, P., RECORD, E., LOMASCOLO, A., MARTINEZ, M.J., MARTINEZ, A.T., 2008, "p-hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds", **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 17, pp. 6703-6709.
- CAMARERO, S., IBARRA, D., MARTINEZ, M.J., MARTINEZ, A.T., 2005, "Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, pp. 1775-1784.
- CAÑAS, A.I., ALCALDE, M., PLOU, F., MARTÍNEZ, M.J., MARTÍNEZ, Á.T., CAMARERO, S., 2007, "Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Is Strongly Enhanced by Phenolic Compounds Present in Soil", **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 8, pp. 2964-2971.
- CHUANCHUEN, R., BEINLICH, K., HOANG, T.T., BECHER, A., KARKHOFF-SCHWEIZER, R.R., SCHWEIZER, H.P., 2001, "Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects nfxB Mutants Overexpressing MexCD-OprJ", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 2, pp. 428-432.
- CROFTON, K.M., PAUL, K.B., DEVITO, M.J., HEDGE, J.M., 2007, "Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine", **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, n. 2, pp. 194-197.
- DIANO, N., GRANO, V., FRACONTE, L., CAPUTO, P., RICUPITO, A., ATTANASIO, A., BIANCO, M., BENCIVENGA, U., ROSSI, S., MANCO, I., MITA, L., DEL POZZO, G., MITA, D.G., 2007, "Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant", **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 69, n. 3-4, pp. 252-261.
- DODOR, D.E., HWANG, H.M., EKUNWE, S.I.N., 2004, "Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, pp. 210-217.

- DURAN, N., ESPOSITO, E., 2000, "Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review", **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, n. 2, pp. 83-99.
- ENOKI, M., DOI, Y., IWATA, T., 2003, "Oxidative Degradation of cis- and trans-1,4-Polyisoprenes and Vulcanized Natural Rubber with Enzyme-Mediator Systems", **Biomacromolecules**, v. 4, n. 2, pp. 314-320.
- FORAN, C.M., BENNETT, E.R., BENSON, W.H., 2000, "Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan", **Marine Environmental Research**, v. 50, n. 1-5, pp. 153-156.
- FUKUDA, T., UCHIDA, H., TAKASHIMA, Y., UWAJIMA, T., KAWABATA, T., SUZUKI, M., 2001, "Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 3, pp. 704-706.
- GIANFREDA, L., IAMARINO, G., SCENZA, R., RAO, M.A., 2006, "Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review", **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, n. 3, pp. 177-187.
- GOODWIN, D.C., AUST, S.D., GROVER, T.A., 1995, "Evidence for Veratryl Alcohol as a Redox Mediator in Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation", **Biochemistry**, v. 34, n. 15, pp. 5060-5065.
- GRAUBARD, M., PINCUS, G., 1941, "The Oxidation of Estrogens by Phenolases", **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 27, n. 3, pp. 149-152.
- GUTIERREZ, A., RENCORET, J., IBARRA, D., MOLINA, S., CAMARERO, S., ROMERO, J., DEL RIO, J.C., MARTINEZ, A.T., 2007, "Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators", **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 11, pp. 4124-4129.
- HEATH, R.J., RUBIN, J.R., HOLLAND, D.R., ZHANG, E.L., SNOW, M.E., ROCK, C.O., 1999, "Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis", **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, pp. 11110-11114.
- HONG-MEI, L., NICELL, J.A., 2008, "Biocatalytic oxidation of bisphenol A in a reverse micelle system using horseradish peroxidase", **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, pp. 4428-4437.

- HUANG, Q., WEBER, W.J., 2005, "Transformation and Removal of Bisphenol A from Aqueous Phase via Peroxidase-Mediated Oxidative Coupling Reactions: Efficacy, Products, and Pathways", **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 16, pp. 6029-6036.
- HUANG, Q., HUANG, Q., PINTO, R.A., GRIEBENOW, K., SCHWEITZER-STENNER, R., WEBER JR, W.J., 2005, "Inactivation of horseradish peroxidase by phenoxyl radical attack", **Journal of American Chemical Society**, v. 127, pp. 1431-1437.
- IKEHATA, K., BUCHANAN, I.D., SMITH, D.W., 2004, "Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment", **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 3 pp. 1-19.
- ISHIBASHI, H., MATSUMURA, N., HIRANO, M., MATSUOKA, M., SHIRATSUCHI, H., ISHIBASHI, Y., TAKAO, Y., ARIZONO, K., 2004, "Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin", **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 2, pp. 167-179.
- JONES, O.A.H., GREEN, P.G., VOULVOULIS, N., LESTER, J.N., 2007, "Questioning the Excessive Use of Advanced Treatment to Remove Organic Micropollutants from Wastewater", **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 14, pp. 5085-5089.
- JORDÃO, E.P.; PESSÔA, C.A., 2009, **Tratamento de Esgotos Domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental
- JUNGHANNS, C., MOEDER, M., KRAUSS, G., MARTIN, C., SCHLOSSER, D., 2005, "Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases", **Microbiology**, v. 151, n. 1, pp. 45-57.
- KANTIANI, L., FARRÉ, M., ASPERGER, D., RUBIO, F., GONZÁLEZ, S., LÓPEZ DE ALDA, M.J., PETROVIC, M., SHELVER, W.L., BARCELÓ, D., 2008, "Triclosan and methyl-triclosan monitoring study in the northeast of Spain using a magnetic particle enzyme immunoassay and confirmatory analysis by gas chromatography-mass spectrometry", **Journal of Hydrology**, v. 361, n. 1-2, pp. 1-9.

- KEREM, Z., JENSEN, K.A., HAMMEL, K., 1999, "Biodegradative mechanism of the brown-rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinonedriven-Fenton reaction", **FEBS Letters**, v. 446 pp. 49-54.
- KHAN, U., NICELL, J.A., 2007, "Horseradish peroxidase-catalysed oxidation of aqueous natural and synthetic oestrogens", **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82 pp. 818-830.
- KHANAL, S.K., XIE, B., THOMPSON, M.L., SUNG, S., ONG, S.K., VANLEEuwEN, J., 2006, "Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems", **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 21, pp. 6537-6546.
- KIM, Y.J., NICELL, J.A., 2006a, "Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A", **Bioresource Technology**, v. 97, n. 12, pp. 1431-1442.
- KIM, Y.J., NICELL, J.A., 2006b, "Laccase catalysed oxidation of aqueous triclosan", **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81 pp. 1344-1352.
- KIM, Y.J., NICELL, J.A., 2006c, "Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives", **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, pp. 1029-1037.
- KOBAYASHI, S., HIGASHIMURA, H., 2003, "Oxidative polymerization of phenols revisited", **Progress in Polymer Science**, v. 28, n. 6, pp. 1015-1048.
- KOLPIN, D.W., FURLONG, E.T., MEYER, M.T., THURMAN, E.M., ZAUGG, S.D., BARBER, L.B., BUXTON, H.T., 2002, "Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance", **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 6, pp. 1202-1211.
- KUMMERER, K., 2004, "Resistance in the environment", **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, pp. 311-320.
- LARSON, E.L., LIN, S.X., GOMEZ-PICHARDO, C., DELLA-LATTA, P., 2004, "Effect of antibacterial home cleaning and handwashing products on infectious disease symptoms - A randomized, double-blind trial", **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 5, pp. 321-329.

- LEVY, C.W., ROUJEINIKOVA, A., SEDELNIKOVA, S., BAKER, P.J., STUITJE, A.R., SLABAS, A.R., RICE, D.W., RAFFERTY, J.B., 1999, "Molecular basis of triclosan activity", **Nature**, v. 398, n. 6726, pp. 383-384.
- LINDSTRÖM, A., BUERGE, I.J., POIGER, T., BERGQVIST, P.A., MÜLLER, M.D., BUSER, H.R., 2002, "Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and Its Methyl Derivative in Surface Waters and in Wastewater", **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 11, pp. 2322-2329.
- LIU, M., 2008, *Effects of the Antimicrobial Agent Triclosan on Bacterial Resistance to Disinfection in Wastewater Treatment Processes*. Master of Science, College of Engineering and Mineral Resources at West Virginia University, Morgantown, West Virginia.
- MARANGONI, A.G., 2002, **Enzyme Kinetics - A modern Approach**. Chichester, John Wiley and Sons
- MCAVOY, D.C., SCHATOWITZ, B., JACOB, M., HAUKE, A., ECKHOFF, W.S., 2002, "Measurement of triclosan in wastewater treatment systems", **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 7, pp. 1323-1329.
- MCDONNELL, G., RUSSELL, A.D., 1999, "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance", **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, pp. 147-179.
- MCELDOON, J.P., DORDICK, J.S., 1991, "Thiol and Mn(2+)-mediated oxidation of veratryl alcohol by horseradish peroxidase", **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, pp. 14288-14293.
- MECHICHI, T., MHIRI, N., SAYADI, S., 2006, "Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes troglia*", **Chemosphere**, v. 64, n. 6, pp. 998-1005.
- MESTER, T., TIEN, M., 2000, "Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants", **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, n. 1, pp. 51-59.

- MIRON, Y., ZEEMAN, G., VAN LIER, J. B., LETTINGA, G., 2000, "The role of sludge retention time in the hydrolysis and acidification of lipids, carbohydrates and proteins during digestion of primary sludge in CSTR systems", **Water Research**, v. 34, n. 5, pp. 1705-1713.
- MODARESSI, K., TAYLOR, K.E., BEWTRA, J.K., BISWAS, N., 2005, "Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: Protective effect of PEG on enzyme activity", **Water Research**, v. 39, n. 18, pp. 4309-4316.
- MURUGESAN, K., CHANG, Y.Y., KIM, Y.M., JEON, J.R., KIM, E.J., CHANG, Y.S., 2010, "Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators", **Water Research**, v. 44, n. 1, pp. 298-308.
- NELSON, D.L.; COX, M.M., 2004, **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed. New York, W. H. Freeman
- NELSON, D.L.; COX, M.M., 2004, **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed. New York, W. H. Freeman
- NICELL, J.A.eWRIGHT, H., 1997, "A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 4, pp. 302-310.
- NISHIZAWA, Y., NAKABAYASHI, K., SHINAGAWA, E., 1995, "Purification and characterization of laccase from white rot fungus *Trametes sanguinea* M85-2", **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 1, pp. 91-93.
- NOGUEROL, S. BORONAT, S. JARQUE, D. BARCELÓ AND B. PIÑA, 2006 "Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods", **Talanta**, v. 69, n. 2, pp. 351–358.
- ORVOS, D.R., VERSTEEG, D.J., INAUEN, J., CAPDEVIELLE, M., ROTHENSTEIN, A., CUNNINGHAM, V., 2002, "Aquatic toxicity of triclosan", **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 7, pp. 1338-1349.
- PARIKH, S.L., XIAO, G., TONGE, P.J., 2000, "Inhibition of InhA, the Enoyl Reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by Triclosan and Isoniazid on the system", **Biochemistry**, v. 39, n. 26, pp. 7645-7650.

- PARK, J.W., DEC, J., KIM, J.E., BOLLAG, J.M., 1999, "Effect of Humic Constituents on the Transformation of Chlorinated Phenols and Anilines in the Presence of Oxidoreductive Enzymes or Birnessite", **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 12, pp. 2028-2034.
- PIONTEK, K., ANTORINI, M., CHOINOWSKI, T., 2002, "Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers", **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, pp. 37663-37669.
- REGALADO, C., ASENJO, J.A., PYLE, D.L., 1996, "Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reverse micelles", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, pp. 332-339.
- REGALADO, C., GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E., DUARTE-VÁZQUEZ, M.A., 2004, "Biotechnological applications of peroxidases", **Phytochemistry Reviews**, v. 3, n. 1, pp. 243-256.
- RIVA, S., 2006, "Laccases: blue enzymes for green chemistry", **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, pp. 219-226.
- ROMERO, M., TERRAZAS, E., VAN BAVEL, B., MATTIASSON, B., 2006, "Degradation of toxaphene by *Bjerkandera* sp. strain BOL13 using waste biomass as a cosubstrate", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, pp. 549-554.
- SAITO, T., KATO, K., YOKOGAWA, Y., NISHIDA, M., YAMASHITA, N., 2004, "Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 1, pp. 64-66.
- SAKURAI, A., TOYODA, S., SAKAKIBARA, M., 2001, "Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase", **Biotechnology Letters**, v. 23 pp. 995-998.
- SAKUYAMA, H., ENDO, Y., FUJIMOTO, K., HATANA, Y., 2003, "Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 3, pp. 227-231.

- SANCHEZ, P., MORENO, E., MARTINEZ, J.L., 2005, "The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump", **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, pp. 781-782.
- SANCHEZ-PRADO, L., LLOMPART, M., LORES, M., GARCÍA-JARES, C., BAYONA, J.M., CELA, R., 2006, "Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction", **Chemosphere**, v. 65, n. 8, pp. 1338-1347.
- SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, C.A., VON GUNTEN, U., WEHRLI, B., 2006, "The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems", **Science**, v. 313, n. 5790, pp. 1072-1077.
- SCHWEIZER, H.P., 2001, "Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics", **FEMS Microbiology Letters**, v. 202, n. 1, pp. 1-7.
- SINGER, H., MÜLLER, S., TIXIER, C., PILLONEL, L., 2002, "Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments", **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 23, pp. 4998-5004.
- SMITH, P., HINEY, M.P., SAMUELSEN, O.B., 1994, "Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: A critical evaluation of method and meaning", **Annual Review of Fish Diseases**, v. 4 pp. 273-313.
- SOARES, A., JONASSON, K., TERRAZAS, E., GUIEYSSE, B., MATTIASSON, B., 2005, "The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 6, pp. 719-725.
- SON, H.S., KO, G., ZOH, K.D., 2009, "Kinetics and mechanism of photolysis and TiO₂ photocatalysis of triclosan", **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, n. 2-3, pp. 954-960.
- SUAREZ, S., DODD, M.C., OMIL, F., VON GUNTEN, U., 2007, "Kinetics of triclosan oxidation by aqueous ozone and consequent loss of antibacterial activity: Relevance to municipal wastewater ozonation", **Water Research**, v. 41, n. 12, pp. 2481-2490.

- SUSLA, M., NOVOTNY, C., SVOBODOVA, K., 2007, "The implication of Dichomitus squalens laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures", **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, pp. 2109-2115.
- SUZUKI, K., HIRAI, H., MURATA, H., NISHIDA, T., 2003, "Removal of estrogenic activities of 17[beta]-estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi", **Water Research**, v. 37, n. 8, pp. 1972-1975.
- SZKLARZ, G.D., ANTIBUS, R.K., SINSABAUGH, R.L., LINKINS, A.E., 1989, "Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi", **Mycologia**, v. 81, n. 2, pp. 234-240.
- TAMAGAWA, Y., HIRAI, H., KAWAI, S., NISHIDA, T., 2005, "Removal of estrogenic activity of endocrine-disrupting genistein by ligninolytic enzymes from white rot fungi", **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, n. 1, pp. 93-98.
- TANAKA, T., NOSE, M., ENDO, A., FUJII, T., TANIGUCHI, M., 2003, "Treatment of nonylphenol with laccase in a rotating reactor", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 6, pp. 541-546.
- TANAKA, T., TONOSAKI, T., NOSE, M., TOMIDOKORO, N., KADOMURA, N., FUJII, T., TANIGUCHI, M., 2001, "Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp. in a rotating reactor", **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 4, pp. 312-316.
- TORRES, E., BUSTOS-JAIMES, I., LE BORGNE, S., 2003, "Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants", **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 46, n. 1, pp. 1-15.
- TSUTSUMI, Y., HANEDA, T., NISHIDA, T., 2001, "Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes", **Chemosphere**, v. 42, n. 3, pp. 271-276.
- UCHIDA, H., FUKUDA, T., MIYAMOTO, H., KAWABATA, T., SUZUKI, M., UWAJIMA, T., 2001, "Polymerization of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 287, n. 2, pp. 355-358.

- VEITCH, N.C., 2004, "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme", **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, pp. 249-259.
- VELDHOEN, N., SKIRROW, R.C., OSACHOFF, H., WIGMORE, H., CLAPSON, D.J., GUNDERSON, M.P., VAN AGGELEN, G., HELBING, C.C., 2006, "The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development", **Aquatic Toxicology**, v. 80, n. 3, pp. 217-227.
- WAGNER, M.eNICELL, J.A., 2002, "Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide", **Water Research**, v. 36, n. 16, pp. 4041-4052.
- WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I., AGATHOS, S.N., 2003, "White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents", **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1-2, pp. 161-187.
- XIAO, XIAO, Y., TU, TU, X., WANG, WANG, J., ZHANG, ZHANG, M., CHENG, CHENG, Q., ZENG, ZENG, W., SHI, SHI, Y., 2003, "Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2", **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 6, pp. 700-707.
- XU, F., KULYS, J.J., DUKE, K., LI, K., KRIKSTOPAITIS, K., DEUSSEN, H.J., ABBATE, E., GALINYTE, V., SCHNEIDER, P., 2000, "Redox Chemistry in Laccase-Catalyzed Oxidation of N-Hydroxy Compounds", **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, pp. 2052-2056.
- YAZDANKHAH, S.P., SCHEIE, A.A., HOIBY, E.A., LUNESTAD, B.T., HEIR, E., FOTLAND, T.O., NATERSTAD, K., KRUSE, H., 2006, "Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: An overview", **Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease**, v. 12, n. 2, pp. 83-90.
- YING, G.G., KOOKANA, R.S., 2007, "Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants", **Environment International**, v. 33, n. 2, pp. 199-205.

ZHANG, G., NICELL, J.A., 2000, "Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide", **Water Research**, v. 34, n. 5, pp. 1629-1637.