

Degradação do repelente DEET pelas lacases do *Pleurotus ostreatus*

Degradation of repellent DEET by *Pleurotus ostreatus* laccases

Erika Campos Santos¹, Elaine Sousa Nunes¹, Thiago Souza Bulhões², Kátia Maria de Souza³, Mariângela Fontes Santiago¹

Como citar:

Santos EC, Nunes ES, Bulhões TS, Santiago MF. Degradação do repelente DEET pelas lacases do *Pleurotus ostreatus*. REVISA. 2019; 8(2): 160-9. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v8.n2.p160a169>

REVISA

1. Faculdade de Farmácia -
Universidade Federal de Goiás.
Goiânia, GO, Brasil.

2. Instituto de Patologia
Tropical e Saúde Pública -
Universidade Federal de Goiás.
Goiânia, GO, Brasil.

3. Instituto Federal de
Educação, Ciência e Tecnologia
de Goiás. Goiânia, GO, Brasil.

Recebido: 20/04/2019
Aprovado: 5/06/2019

RESUMO

Objetivo: Avaliar a capacidade de remediação do DEET em meio líquido, pelo fungo de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* usando como indutor enzimático os resíduos sólidos do cacau e realizar bioensaios de toxicidade com as amostras pós-tratamento, para aplicações em tratamentos de águas. **Método:** Foi realizada a produção enzimática com resíduos do Cacau. A biorremediação com o caldo enzimático foi realizada em erlenmeyers de 250mL, contendo a solução do composto, tampão acetato de sódio pH 5 e o caldo batata, incubados à 28°C, com rotação de 120 rpm, por 48 horas. Já com o fungo ativo, o mesmo foi incubado a 28 °C e teve em seu meio a adição do composto. As amostras foram quantificados em Cromatografia líquida de alta performance (CLAE). O teste de adsorção foi feito com o fungo autoclavado e analisado após 14 dias. **Resultado:** O composto se apresentou possivelmente tóxico e a remediação mostrou uma tendência linear de degradação com o fungo de 39%. **Conclusão:** *Pleurotus ostreatus* é um candidato promissor para o tratamento de contaminações geradas por DEET. **Descritores:** Remediação; *Pleurotus ostreatus*; DEET; Cromatografia Líquida de Alta Pressão; Lacase.

ABSTRACT

Objective: We evaluated the remediation capacity of DEET in liquid medium by the white decomposition fungus *Pleurotus ostreatus* using the solid residues of cocoa as an enzymatic inducer and performed toxicity bioassays with the post-treatment samples, for water treatment applications. **Method:** Enzymatic production with cocoa residues was performed. Bioremediation with the enzyme broth was performed in a 250mL erlenmeyer flasks, containing the solution of the compound, sodium acetate buffer pH 5 and the potato broth, incubated at 28 °C, with rotation of 120 rpm, for 48 hours. With the active fungus, the same was incubated at 28 °C and had in its culture medium the addition of the compound. The samples were quantified in high performance liquid chromatography (HPLC). The adsorption test was performed with the autoclaved fungus and analyzed after 14 days. **Results:** The compound was possibly toxic and the remediation showed a linear tendency of degradation of 39% with the fungus. **Conclusion:** *Pleurotus ostreatus* is a promising candidate for the treatment of contaminants generated by DEET. **Descriptors:** Remediation; *Pleurotus ostreatus*; DEET; Chromatography, High Pressure Liquid; Laccase.

ORIGINAL

Introdução

O crescimento constante da demanda e oferta de novos produtos químicos levou ao aumento da variedade e quantidade de muitos compostos químicos oriundos dos efluentes industriais, esgotos sanitários e de outras atividades antrópicas nos diversos compartimentos ambientais.¹⁻²

Devido ao crescimento demográfico e socioeconômico ocorridos nas últimas décadas, os índices de poluição dos recursos hídricos têm aumentado, ocasionando perda da qualidade da água no que tange aos parâmetros físicos, químicos e bacteriológicos.^{2,18}

A contaminação das águas superficiais e subterrâneas tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna e motivo de preocupação crescente devido aos riscos que tais compostos representam à biota e ao ser humano, em razão de seus efeitos deletérios associados.^{10,14}

O progresso constante da química analítica nas últimas décadas, e particularmente a crescente sensibilidade, melhorou drasticamente a detecção de traços de contaminantes orgânicos mesmo dentro de matrizes tão complexas como águas residuais.³ A partir da cromatografia líquida e espectrometria de massa em tandem (UHPLC-MS /MS), muitos laboratórios quantificam de forma rotineira e confiável dezenas de fármacos e produtos para cuidados pessoais em várias amostras de água em concentrações abaixo de 1 ng. L⁻¹.¹⁵

Entre os contaminantes orgânicos comumente monitorados na água, o repelente dietiltoluidina (DEET) tornou-se de particular interesse quando o primeiro reconhecimento de estudo de contaminantes de águas residuais em riachos dos EUA revelou sua ocorrência em 74% das amostras analisadas.⁸ Desde então, pesquisas subsequentes confirmaram sua ocorrência em várias matrizes de água na Europa, Ásia, América e África.¹⁷

Tal presença do DEET em águas ambientais e sua detecção em água potável levantaram preocupações relacionadas à saúde pública e à eficácia do tratamento de água para atenuação.⁴ Nos últimos anos, o estresse hídrico contínuo

e crescente interesse pela reutilização da água potável estimularam ainda mais a pesquisa na remoção de vários contaminantes de águas residuais, incluindo DEET, por processos de tratamento alternativos, convencionais e avançados. Entre esses tratamentos pode-se incluir biológico, adsorção, membrana e tecnologias oxidativas.¹²

Tendo isso em vista o presente estudo visa avaliar a capacidade de remediação do DEET pela lacase proveniente do fungo de decomposição branca *Pleurotus ostreatus* utilizando da biomassa vegetal de cacau procedente de resíduos industriais como potencial indutor enzimático e realizar bioensaios de toxicidade com as amostras após seus tratamentos.

Método

Os experimentos foram realizados durante o ano de 2018 no laboratório de Enzimologia e Materiais Bioativos (LENZIBIO) dentro da faculdade de farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Para a realização dos experimentos foi utilizado o fungo *Pleurotus ostreatus*. A cepa faz parte da coleção do LENZIBIO e foi cedida pelo Laboratório de Sistemática e Fisiologia

Microbiana - Departamento de Ciências de Alimentos - FEA/UNICAMP. O repelente N,N - dietil - meta -toluamida (DEET) foi gentilmente doado pela indústria farmacêutica Cifarma Científica Farmacêutica, cujo lote é USHA047984, com peso líquido de 0,300 kg e peso bruto de 0,317 kg. A solução estoque do repelente para uso na biorremediação foi preparada utilizando 10 µg do repelente diluídos em 1000 mL de água destilada, resultando em uma concentração final de 10 µg.L⁻¹ de DEET. Após o preparo, a solução estoque foi armazenada em frasco de 1000 mL na geladeira à 4 °C.

O meio de cultura sólido utilizado na pesquisa foi o BGA (batata, glicose e ágar) e o líquido foi o Caldo de Batata preparado artesanalmente e Dextrose (CBD), tendo como indutor enzimático o cacau a 1%. Após o preparo do meio cultivo sólido BGA, o mesmo foi auto clavado e em capela de fluxo laminar, foram distribuídos cerca de 20 mL do meio em placas de Petri (10 cm de diâmetro) até a solidificação. Em cada placa foi adicionado um disco de 5 mm de diâmetro do fungo extraído de uma placa matriz e posteriormente foram incubadas em Estufa BOD (TE-391, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 28°C durante 7 dias, tempo suficiente para o crescimento ótimo do fungo.⁵ Após este período, os fungos foram armazenados em geladeira à 4°C, para avaliar o crescimento.

Produção enzimática. A produção de Lacases pelo fungo *Pleurotus ostreatus* foi realizada por um período de seis dias em que há o pico máximo de atividade enzimática. Os erlenmeyers foram levados à capela de fluxo laminar e o fungo foi transferido ao meio de cultivo líquido, com o cacau à 1%, devidamente autoclavado. Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL, contendo em cada um deles 60 mL de meio líquido e 5 discos de 5mm de fungo. Os erlenmeyers foram colocados em Incubadora Refrigerada com Agitação (TE-421, Tecnal, São Paulo, Brasil), com rotação de 120 rpm, por seis dias à 28 °C e no decorrer deste período de tempo, a produção de Lacases foi avaliada.

A metodologia utilizada para avaliar a produção de Lacases pelo fungo *Pleurotus ostreatus* utiliza a seringaldazina como substrato da enzima.²¹ A mistura de reação é composta por: 10µL do caldo enzimático (sobrenadante do erlenmeyer), 890µL de solução tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 5,0) e 100µL de seringaldazina 1,0 mmol.L⁻¹ preparada em etanol absoluto. A reação enzimática baseia-se na oxidação da seringaldazina ($\epsilon = 65.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) pela Lacases e foi iniciada pela adição da seringaldazina à mistura. A velocidade da oxidação foi acompanhada por 5 minutos a 525 nm em espectrofotômetro (SP-2000 UV Meter, Spectrum, Shanghai, China). O branco foi realizado utilizando 10µL do caldo enzimático e 990µL de solução tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 5,0) sem adição de seringaldazina.

Para determinação do cálculo de atividade enzimática foi utilizada a Equação:¹¹

$$U = \frac{10^6 \times Abs}{\epsilon \times R \times t}$$

Na qual:

Abs = Absorbância no comprimento de onda específico (nm);

ϵ = Coeficiente de extinção molar para cada substrato (L.mol⁻¹.cm⁻¹);

R = Quantidade de extrato bruto (mL);

t = Tempo de reação (min).

U= Quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol.L⁻¹ de substrato por minuto.

O resultado é expresso em U.mL⁻¹.

Avaliação da estabilidade enzimática em diferentes temperaturas e pH ótimo. Para determinação da temperatura ótima do extrato bruto de Lacases, segue-se a seguinte metodologia⁵ modificada pelo laboratório: a atividade enzimática foi avaliada em diferentes temperaturas variando da temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) a 80°C, com intervalo de 10°C analisada a cada 10 min durante 1 hora, sendo que a seringaldazina foi utilizada como substrato. Na determinação do melhor pH para atividade do extrato bruto de Lacases, utilizou-se tampão acetato 50mM para pH de 3,0 a 5,0 e tampão fosfato para pH de 6,0 a 8,0.

Biorremediação do DEET com caldo enzimático. Após 7 dias na incubadora refrigerada com agitação, os erlenmeyers foram retirados da incubadora e o caldo enzimático foi filtrado e armazenado em refrigerador para a realização da biorremediação. Antes de iniciar o tratamento enzimático, a atividade enzimática da lacase foi calculada para determinar o volume de caldo enzimático que seria utilizado na biorremediação.

A biorremediação do repelente seguiu uma metodologia já proposta¹² com algumas modificações. Foram utilizados 27 erlenmeyers de 250mL, que incluía as amostras testes, controle negativo (enzima inativada), branco e tempo zero, todos em triplicata (Tabela 1).

Tabela 1 - Substâncias utilizadas na biorremediação do repelente

Componentes	Teste	Controle (enzima inativada)	Branco	Tempo Zero
Solução Tampão Acetato de Sódio (50mmol.L ⁻¹ ; pH 5,0)	10mL	10mL	20mL	10mL
Solução Estoque de DEET (10µg.L ⁻¹)	10mL	10mL		10mL
Extrato enzimático (200 e 400U)	*	Enzima Inativada**	*	*

* A quantidade do extrato enzimático foi escolhida com base na atividade enzimática da amostra para se obter 200 e 400 U

** A enzima foi inativada por aquecimento em micro-ondas até o início de fervura do caldo enzimático (30 segundos).

Biorremediação com o fungo. Foi também realizado a biorremediação com o fungo ativo. Os fungos foram cultivados em placa de Petri, utilizando BDA padrão durante sete dias. Posteriormente, foram transferidos 5 discos para o meio de cultura líquido e incubados a 28°C ± 2°C por 7 dias e adicionou-se DEET na concentração de 10 µL/L sob fluxo laminar em todos os erlenmeyers e retirou as alíquotas nos dias 0, 3, 5, 7,10, 12 e 14. Sendo estas amostras armazenadas em congelador e levado posteriormente para análise no HPLC.

Teste de adsorção. O teste de adsorção serve para avaliar se os fungos possuem a capacidade de reduzir a concentração do DEET pelo mecanismo de adsorção na biomassa.¹⁷ Os fungos foram cultivados em placa de Petri, utilizando BDA padrão durante sete dias. Posteriormente, foram transferidos 5 discos para o meio de cultura líquido e incubados a 28°C ± 2°C por 7 dias e em seguida a este período aquecido por 6 minutos em micro-ondas com o objetivo

de matar o fungo e eliminar as atividades das enzimas. Ao resfriar a temperatura ambiente, foi adicionado DEET na concentração de 10µg/L sob fluxo laminar para manter as condições de esterilidade. Os frascos foram novamente incubados por 14 dias e ao final deste período foram retiradas as amostra para análise da concentração final do DEET.

Quantificação e detecção do repelente. A quantificação do repelente foi realizada em parceria com Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET). Foi utilizado a Cromatografia Líquido de Alta Eficiência (LC-20A; Shimadzu; Série Prominence, Quioto, Japão), com detector na Ultravioleta/Visível (UV/Vis), em Photodiode Array Detector (PDA) SPD-M20A. A metodologia seguida foi a descrita por com as seguintes condições cromatográficas.⁷

Coluna: C18 (250mm x 4,6mm e 5µm);

Comprimento de onda: 350nm para Oxitetracilina em PDA;

Fase móvel: Ácido Fórmico 0,2 % :Acetonitrila (35:65);

Fluxo: 1mL/min;

Comprimento de onda: 240nm;

Volume de injeção: 50µL.

A curva de calibração foi construída com as seguintes concentrações de DEET: 0,05 µg.mL⁻¹, 0,10 µg.mL⁻¹, 0,25 µg.mL⁻¹, 0,5 µg.mL⁻¹, 1,0 µg.mL⁻¹, 2,5 µg.mL⁻¹

Teste de toxicidade com *Allium cepa*. Para realização do teste de toxicidade com *Allium cepa* (cebola), foram adquiridos comercialmente vários bulbos de cebola, que variaram de 65 a 90 g. As raízes velhas foram retiradas e os bulbos desinfetados superficialmente com álcool etílico a 70%.¹⁹ Em seguida foram colocados para germinar em água destilada, no escuro, à temperatura ambiente. Somente a base do bulbo permaneceu imersa na água, que foi renovada a cada 24h.

Depois de dois dias os bulbos foram então transferidos para béqueres de 100mL, onde receberam a solução com o composto de interesse. As diluições foram preparadas com água destilada e realizadas em duplicata. Em paralelo foram realizados ensaios de controle negativo apenas com água destilada. Após 24 horas de tratamento (tratamento agudo), 3 raízes por bulbo foram selecionadas aleatoriamente e coletadas. O sistema-teste retornou às mesmas condições anteriores, onde permaneceu até que complete 72 horas de tratamento (tratamento sub-crônico) e mais 3 raízes foram coletadas. Durante o ensaio, a solução teste foi renovada a cada 24 horas.

Após a coleta, os bulbos foram colocados novamente em água destilada e após 48 horas (período de recuperação), foi avaliado o potencial de crescimento das raízes. As raízes coletadas foram fixadas em Carnoy I (álcool etílico-ácido acético, 3:1), a 4°C, por 24 horas.

Preparo das lâminas para análise microscópica. Foram retiradas três raízes do total de raízes fixadas por bulbo, e encaminhadas para lavagem e recuperação da hidratação normal. Posteriormente, as raízes foram submetidas à hidrólise ácida (HCl 1N a 60°C, em estufa) por aproximadamente 10 minutos. Realizada a hidrólise ácida, as raízes foram lavadas novamente para a primeira etapa da coloração, onde foram imersas em Reativo de Schiff e mantidas no escuro por 2 horas. Após a coloração, as raízes foram lavadas e separadas as regiões meristemáticas, as quais serão individualmente apoiadas sobre a

lâmina, coberta com uma gota de Orceína acética 1% e esmagadas entre lâmina e lamínula, para análise no microscópio.

Análise das lâminas. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum. Foram observadas as 3 raízes por bulbo, tanto após as primeiras 24 horas como após as 72 horas de tratamento com a solução teste.

Pelo menos 500 células foram analisadas por raiz, em cada caso, totalizando 1500 células. Os parâmetros microscópicos analisados foram os índices de divisão e de fases, para avaliação dos potenciais citotóxicos e alterações morfológicas (aberrações mitóticas), também como indicador do potencial genotóxico. Eles foram definidos da seguinte forma:

Índice de Divisão (ID - %) - número de células em divisão/número de células observadas X 100;

Índice de Fases (IF - %) - número de células em uma determinada fase mitótica/número de células em mitose X 100.

Resultados e Discussão

Produção enzimática. Foi utilizado o resíduo do cacau como material vegetal com potencial de induzir a produção de Lacases de *Pleurotus ostreatus*. O parâmetro para escolha do resíduo do cacau foi o aumento da atividade dessa enzima no meio de cultivo. Houve a produção de Lacases pelo *Pleurotus ostreatus* com o meio de cultivo líquido e sua produção foi maior no 7º dia de incubação.

Determinação da temperatura ótima. As Lacases são tolerantes a elevadas faixas de temperaturas e pH e são ideais para a aplicação em processos industriais.²⁰ O valor de temperatura ótima foi de 20°C para o extrato bruto testado apresentando atividade máxima de 3184,62 U.mL⁻¹.

Determinação do pH ótimo. O valor de pH ótimo foi de 5,0 para o extrato bruto testado, tendo atividade enzimática 3966,15 U.mL⁻¹.

Biorremediação com o caldo enzimático. O caldo com 200U de atividade enzimática mostrou a tendência de não realizar a biorremediação do repelente apesar das variações experimentais, sendo que resultados iguais foram obtidos com 400U de atividade enzimática (dados não demonstrados).

Biorremediação pela Lacase do fungo. O fungo mostrou pelas médias das áreas dos Picos dos cromatogramas uma tendência linear de degradação (biorremediação) do DEET apresentando uma remoção de até 39% do repelente considerando o maior ponto com o menor ponto.

Teste de adsorção. O teste mostrou uma área média em 14 dias de 77500 indicando que não houve adsorção pelo fungo.

Teste de toxicidade com *Allium cepa*. Observou-se um estímulo dos bulbos da cebola para o crescimento das raízes somente após a troca da solução com DEET pela água. A microscopia obtida no teste com DEET demonstrou alterações celulares quando comparada a microscopia obtida no teste com água destilada onde se podia observar até mesmo as fases mitóticas.

Por se constituir de um material lignocelulósico, os resíduos vegetais têm o potencial de contribuir para o crescimento de fungos decompositores de madeira, bem como para a maior produção de suas enzimas assim como foi observado com o uso do cacau.

O uso de resíduos vegetais como indutores de Lacases é uma abordagem

promissora, uma vez que constitui uma estratégia alternativa aos indutores sintéticos, até então utilizados devido à necessidade de se obter elevadas quantidades da enzima para o suprimento das suas diversas aplicações, além de se tornar economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do acúmulo dos indutores sintéticos na natureza.

Temperatura ótima. O valor de temperatura ótima pode ser observado na Figura 1. Baseado no teste estatístico ANOVA, as temperaturas de 20°C, 30°C e 40°C são estatisticamente semelhantes. Nas temperaturas de 70° e 80°C não apresentaram atividade enzimática alguma, indicando que a partir de 70°C a proteína é desnaturada.

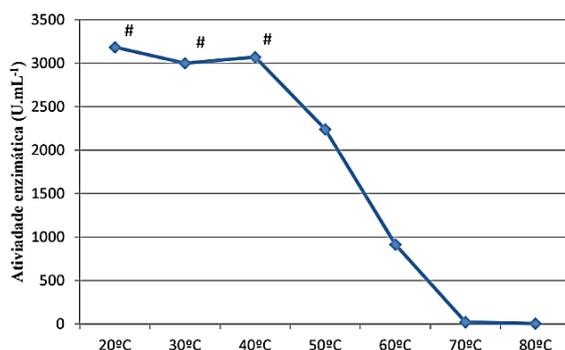


Figura 1 - Atividade enzimática no extrato bruto enzimático em diferentes temperaturas.
#- grupos estatisticamente semelhantes

pH ótimo. O pH de ótimo de lacases fúngicas é geralmente ácido, embora isso dependa do substrato utilizado.²³ O valor de pH ótimo foi de 5,0 para o extrato bruto testado (Figura 2). As Lacases de *Pleurotus ostreatus* também mostrou elevada atividade em pH 6 e pH 7 com baixa atividade para pH 8. De acordo com o teste estatístico ANOVA e Tukey com $p=0,0036$, os pHs 6 e 7 foram estatisticamente semelhantes, enquanto o pH 5 apresentou maior atividade enzimática 3966,15 U.mL⁻¹.

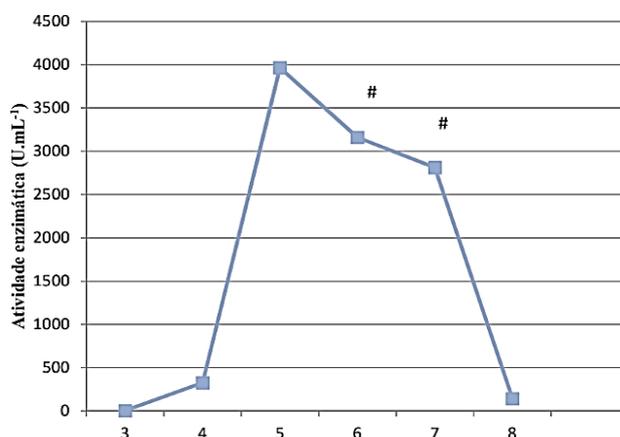


Figura 2 - Atividade enzimática no extrato bruto enzimático em diferentes pH's.
#- grupos estatisticamente semelhantes

Biorremediação. É possível observar na Figura 3A que tende a não ocorrer a biorremediação do repelente. Teve algumas variações experimentais,

como no ponto de 4 horas. Já a biorremediação com o fungo ativo (Figura 3B), pode-se observar pelas médias das áreas dos Picos dos cromatogramas uma tendência linear de degradação (biorremediação) do DEET com o tempo apresentando uma remoção de até 39% do repelente considerando o maior ponto com o menor ponto.

Como pode ser corroborado com estudos anteriores em que os resultados experimentais mostraram que o DEET não foi removido pela Lacase isoladamente, um dos possíveis fatores que pode estar relacionado a baixa eficiência de remoção de DEET pelas Lacases e a variação dos resultados, pode ser devido à presença do grupo eletrônico ($-\text{CO} - \text{N} [\text{CH}_2 - \text{CH}_3]_2$) na estrutura química do DEET.²²

Os bioprocessos desenvolvidos neste trabalho podem ser aprimorados através da utilização de mediadores e aplicado no tratamento de água de abastecimento e águas residuais, como por exemplo, efluentes de indústrias farmacêuticas e de estações de tratamento de esgoto promovendo assim uma melhora na ação das Lacases no repelente.²²

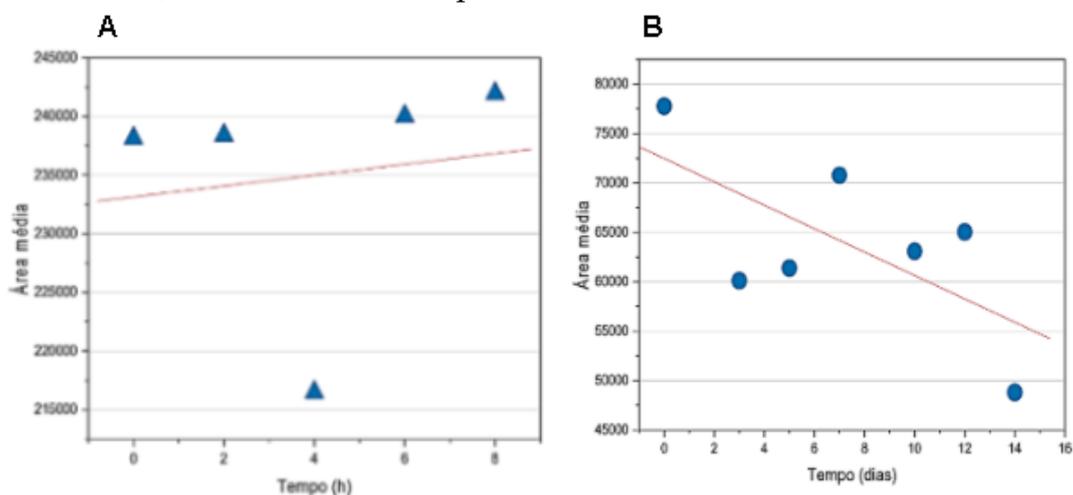


Figura 3- Avaliação da degradação do DEET com caldo de atividade enzimática 200U (A) e com o fungo ativo (B) medido pelas áreas dos picos dos cromatogramas.

Teste de toxicidade com *Allium cepa*. A solução somente com a água (Figura 4A) permitiu observar as fases de divisão e o arcabouço das células do bulbo. Se comparada a solução com o DEET (Figura 4B), é possível observar alterações celulares. Pode-se então induzir que o DEET reage com as células, sendo um composto com possível capacidade tóxica.

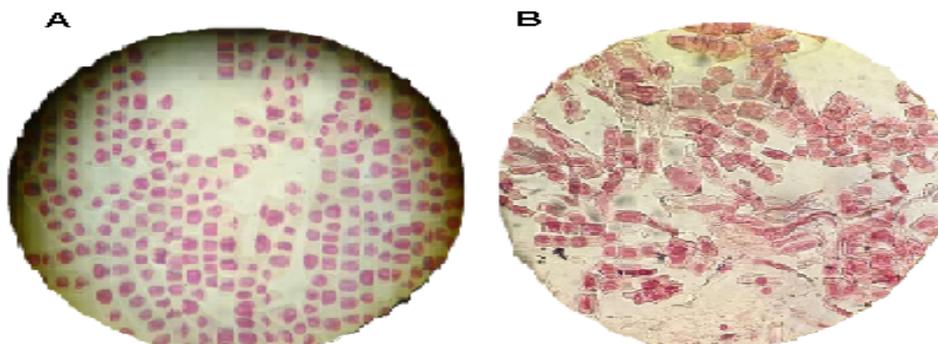


Figura 4- Microscopia obtida do teste com *Allium cepa* com água (A) e DEET (B)

Conclusão

Os resultados obtidos da parte experimental em meio de cultura sólido com o fungo *Pleurotus ostreatus* indicou uma tendência para aplicação do mesmo em biorremediação de ambientes contaminados com esse tipo de repelente. Porém devido a variação dos resultados, é necessária a realização de mais estudos com uma abordagem mais eficaz para a metodologia, uma vez, também, que os resultados obtidos no presente estudo não foram viáveis para o tratamento de água com o caldo enzimático, mas o tratamento com o fungo ativo podem ser promissores, principalmente em efluentes industriais contaminados por produtos destinados ao cuidado pessoal, como é o caso dos repelentes.

Referências

1. Anumol T, Merel S, Clarke BO, Snyder SA. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for rapid analysis of trace organic contaminants in water. Chem. Central J. 2013; 7:104 DOI:[10.1186/1752-153X-7-104](https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-104)
2. Barbieri JC. Gestão ambiental empresarial. 4.ed. São Paulo: Editora Saraiva; 2016.
3. Bradley PM, Journey CA, Romanok KM, Barber LB, Buxton HT, Foreman WT, Furlong EF, Glassmeyer ST, Hladik ML, Iwanowicz LR, Jones DK, Kolpin DW, Kuivila KM, Loftin KA, Mills MA, Meyer MT, Orlando JL, Reilly TJ, Smalling KL, Villeneuve DL. Expanded target-chemical analysis reveals extensive mixed-organic-contaminant exposure in US streams. Environmental science & technology. 2017; 51(9):4792-4802.
4. Ebele AJ, Abdallah MAE, Harrad S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. Emerging Contaminants. 2017;3(1):1-16.
5. Garcia TA. Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*. Tese de doutorado em Biologia Molecular [tese]. Brasília: Universidade Nacional de Brasília; 2006.
6. Alpendurada, MF. "13th Symposium on the Chemistry and Fate of Modern Pesticides and 7th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment 7-10 October, Porto, Portugal." International Journal of Environmental Analytical Chemistry. 2014; 93(15):1565. <https://doi.org/10.1080/03067319.2013.871717>
7. Kaale E, Chambuso M, Kitwala J. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. Food Chem. 2008;107(3): 1289-1293.
8. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environ. Sci. Technol. 2002;36 (6):12021211 DOI: 10.1021/es011055j
9. Legeay S, Clere N, Apaire-Marchais V, Faure S, Lapied B. Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. European journal of pharmacology. 2018; 825:92-98.
10. Peiyue LI, Rui T, Chenyang X, Jianhua WU. Progress, opportunities, and key fields for groundwater quality research under the impacts of human activities in China with a special focus on western China. Environmental Science and Pollution Research. 2017; 24(15):13224-13234.
11. Menezes CR, Silva IS, Durrant IR. Bagaço de Cana: Fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. Estudos Tecnológicos em Engenharias. 2009;5(1):68-78.
12. Merel S, Snyder SA. Critical assessment of the ubiquitous occurrence and fate of the

- insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide in water. *Environment International*. 2016; 96:98-117.
13. Moraes RL. Remoção de Hormônios Sexuais Sintéticos por Carbonização Hidrotermal e por Fungos de Decomposição Branca [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás;2012.
14. Pereira AR, Freitas DAF. Uso de Microorganismos para Biorremediação de Ambientes Impactados. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*. 2012;6(6):975-1006.
15. Prosen H, Fontanals N, Borrull F, Marcé RM. Determination of seven drugs of abuse and their metabolites in surface and wastewater using solid-phase extraction coupled to liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry. *Journal of separation science*.2017;40(18): 3621-3631.
16. ZongPan S, [YongHong](#) , [JingJing](#) Z, [Jing](#) Z, [ZhenTian](#) Y, Chen B , [ZhengBo](#) H. Binding characteristics of the odorant binding protein AsinOBP1 of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) with the mosquito repellent DEET. *Acta Entomologica Sinica* .2018; 61(1):139-148.
17. Silva CB. Redução do Acefato Utilizando Lacases Produzidas por *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* com *Trichoderma* Isolados do Cerrado [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás;2011.
18. Soares AFS, Leão MMD. Contaminação dos mananciais por micropoluentes e a precária remoção desses contaminantes nos tratamentos convencionais de água para potabilização. *Assuntos Gerais - Doutrina Internacional*.2015;14:36-85.
19. Souza VH E. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em *Allium cepa*. [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis; 2006.
20. Unuofin JO, Moubashher HA, Okoh AI, NWODO UU. Heterologous production of a temperature and pH-stable laccase from *Bacillus vallismortis* fmb-103 in *Escherichia coli* and its application. *Process Biochemistry*.2017;55:77-84. doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00337
21. Szklarz GD, Antibi RK, Sinsabaugh RL, Linkins AE. Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. *Mycology*.1989; 81:234- 240.
22. Tran NH, HU J, Urase T. Removal of the insect repellent N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) by laccase-mediated systems. *Bioresource Technology*. 2013; 147:667-671. doi: 10.1016/j.biortech.2013
23. Heng F, An Q, Meng G, Wu XJ, Dai YC, Si J, Cui BK. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. 2017; 102:758-770. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.089.

Autor correspondente:

Mariângela Fontes Santiago
Universidade Federal de Goiás/Faculdade de Farmácia
Rua 240, esquina com 5ª Avenida, s/n, Setor Leste
Universitário. CEP: 74605-170. Goiânia, Goiás, Brasil.
mariangelafs@gmail.com