

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS – PPGCAMB**

**VANESSA RUANA FERREIRA DA SILVA**

**BIOCONVERSÃO ENZIMÁTICA DE CLORTETRACICLINA  
E DOXICICLINA POR MEIO DO USO DE LACASE: TOXICIDADE *IN VITRO*  
E *IN SÍLICO***

**LAGES**  
**2022**

**VANESSA RUANA FERREIRA DA SILVA**

**BIOCONVERSÃO ENZIMÁTICA DE CLORTETRACICLINA E DOXICICLINA  
POR MEIO DO USO DE LACASE: TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN SÍLICO***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Ambientais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientador: Profa. Dra. Aniela Pinto Kempka

**LAGES  
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Silva, Vanessa Ruana Ferreira da  
Bioconversão enzimática de clortetraciclina e doxiciclina por  
meio do uso de lacase: toxicidade in vitro e in silico / Vanessa  
Ruana Ferreira da Silva. -- 2022.  
82 p.

Orientadora: Anieli Pinto Kempka  
Coorientadora: Liziane Schittler Moroni  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação , Lages, 2022.

1. Bioconversão. 2. Lacase. 3. Tetraciclina. 4. Poluente  
emergente. 5. Toxicidade. I. Kempka, Anieli Pinto. II. Moroni,  
Liziane Schittler . III. Universidade do Estado de Santa Catarina,  
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação .  
IV. Título.

**VANESSA RUANA FERREIRA DA SILVA**

**BIOCONVERSÃO ENZIMÁTICA DE CLORTETRACICLINA E DOXICICLINA  
POR MEIO DO USO DE LACASE: TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN SÍLICO***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Ambientais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Orientador: Profa. Dra. Aniela Pinto Kempka

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora:

---

Professora Dra. Aniela Pinto Kempka  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Coorientadora:

---

Professora Dra. Liziane Schittler Moroni  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:

---

Professora Dra. Indianara Fernanda Barcarolli  
Universidade do Estado de Santa Catarina

---

Professora Dra. Margarete Dulce Bagatini  
Universidade Federal da Fronteira Sul

Lages, 18 de fevereiro de 2022.

Aos meus pais José Cosmo da Silva e  
Rosimeire Ferreira e ao meu esposo Luiz  
Eduardo de Nez com muito amor!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me resguardar nos momentos de angústia e me felicitar em com acontecimentos magníficos da vida.

Aos meus pais José Cosmo da Silva e Rosimeire Ferreira, que sempre acreditaram que eu era capaz, que compartilharam seus ensinamentos da vida comigo e me ensinaram muito sobre amor.

Ao meu esposo, Luiz Eduardo de Nez, por compartilhar a vida ao meu lado, pelo companheirismo, suporte e pelo apoio todo esse tempo, essa conquista também é sua.

A minha família pelo apoio e incentivo nas horas difíceis, sendo o meu refúgio.

A minha orientadora, Dra. Aniela Pinto Kempka, por ter acreditado em mim, me escolhido, o alicerce nessa pesquisa, por todos os seus ensinamentos, orientações e dedicação. Sou muito grata por cada instante, lhe admiro muito.

A minha coorientadora, Dra. Liziane Schittler Moroni, que sempre esteve presente, e me auxiliou em grandes feitos dessa pesquisa. Minha gratidão e admiração.

Ao Dr. Dennis Goss de Souza, por ter acreditado em mim desde a graduação, por todos os ensinamentos e todo o incentivo e apoio, foi de suma importância para o ingresso neste Programa de Pós-graduação.

Ao corpo docente da Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – PPGCAMB, pelas disciplinas ministradas e contribuição para a minha formação.

Agradeço a oportunidade pela bolsa Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-Graduação - PROMOP contribuindo para minha total dedicação à pesquisa desenvolvimento deste estudo.

A todos que participaram de forma direta ou indireta nesses dois anos de Pós-graduação me apoiando e incentivando para realização desse sonho.

A todos meus cordiais agradecimentos.

## RESUMO

A presença de poluentes emergentes como produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, produtos de desinfecção, em águas superficiais e subterrâneas, pode ter um efeito adverso sobre o meio ambiente e os seres humanos. Há, portanto, uma necessidade iminente de detectar e remover esses compostos de águas residuais. Este estudo, teve como objetivo realizar a bioconversão de fármacos do grupo das tetraciclinas. Para a bioconversão, foi utilizada uma lacase de *Aspergillus* sp. Os antibióticos utilizados consistiram em amostras comerciais de formulações farmacêuticas de tetraciclina e de doxiciclina. A bioconversão enzimática foi realizada com 10 mL solução de antibiótico e 0,3 µL da lacase. A mistura foi incubada a 30°C e 150 rpm, pelos tempos de 15 min a 120 min. Foi realizada a varredura espectral das amostras antes e após a bioconversão enzimática. Os testes de toxicidade *in vitro* foram realizados com células microbianas (*Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*), células humanas (polimorfonucleares do sangue humano) e células vegetais (sementes de *Lactuca sativa* L.). A toxicidade *in silico* foi determinada nos possíveis produtos da bioconversão, sendo utilizado o software T.E.S.T (*Toxicity Estimation Software Tool*), versão 5.5.1, que estima a toxicidade com base na estrutura molecular, sendo aplicado o método *Consensus*. Os resultados mostraram que não houve toxicidade dos produtos da bioconversão nas células microbianas, contudo, houve toxicidade nas células humanas e vegetais. Para as células polimorfonucleares do sangue humano, houve redução da viabilidade celular na ordem de 50%. Para as células vegetais, o grau de fitotoxicidade ficou em 3, ou seja, as amostras dos produtos da bioconversão são fitotóxicas. Na ecotoxicidade *in silico*, para a tetraciclina e a doxiciclina apresentaram toxicidade para *Daphnia magna*, bioconcentração e toxicidade para o desenvolvimento e mutagenicidade. Dos quatro subprodutos analisados, três apresentaram toxicidade para *Daphnia magna*, um apresentou bioconcentração, a toxicidade para o desenvolvimento variou de tóxico a moderadamente tóxico e a mutagenicidade foi positiva para dois. O estudo demonstrou que a bioconversão pode levar a produtos iguais ou mais tóxicos do que a molécula original e estudos adicionais com ênfase nos produtos da bioconversão enzimática dos antibióticos de tetraciclina são necessários, para contribuir com informações mais robustas sobre a toxicidade.

**Palavras-chave:** Bioconversão. Lacase. Tetraciclina. Poluente emergente. Toxicidade

## ABSTRACT

The presence of emerging pollutants such as pharmaceuticals, toiletries, disinfection products in surface and groundwater can have an adverse effect on both the environment and in humans. There is, therefore, an imminent need to detect and remove these wastewater compounds. This study aimed to perform the bioconversion of drugs from the tetracycline group. For the bioconversion, a laccase of *Aspergillus* sp was used. The antibiotics used consisted of commercial samples of pharmaceutical tetracycline and doxycycline formulations. Enzymatic bioconversion was performed with 10 mL antibiotic solution and 0.3  $\mu$ L of laccase. The mixture was incubated at 30°C and 150 rpm, for 15 min to 120 min. Spectral scanning of samples before and after enzymatic bioconversion was performed. *In vitro* toxicity tests were performed with microbial cells (*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*), human cells (human blood polymorphonuclear) and plant cells (*Lactuca sativa* L. seeds). *In silico* toxicity was determined in the possible bioconversion products, using the Software T.E.S.T (Toxicity Estimation Software Tool), version 5.5.1, which estimates toxicity based on molecular structure, with the consensus method being applied. The results showed that there was no toxicity of bioconversion products in microbial cells, however, there was toxicity in human and plant cells. For the polymorphonuclear cells of human blood, there was a reduction in cell viability in the order of 50%. For plant cells, the degree of phytotoxicity was 3, i.e. the samples of bioconversion products are phytotoxic. In the *in silico* ecotoxicity, tetracycline and doxycycline showed toxicity to *Daphnia magna*, bioconcentration and toxicity for development and mutagenicity. Of the four by-products analyzed, three presented toxicity to *Daphnia magna*, one presented bioconcentration, developmental toxicity ranged from toxic to moderately toxic and mutagenicity was positive for two. The study demonstrated that bioconversion can lead to products equal to or more toxic than the original molecule and additional studies with emphasis on the enzymatic bioconversion products of tetracycline antibiotics are needed to contribute more robust information on toxicity.

**Keywords:** Bioconversion. Laccase. Tetracycline. Emerging pollutant. Toxicity