



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUACAO
IFG CAMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

LAIS CAMARGO DE LACERDA MEDRADO

**BIORREMEDIAÇÃO DO ANTIBIÓTICO OXITETRACICLINA UTILIZANDO
LACASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Pleurotus ostreatus***

Goiânia, 2017.

**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUACAO
IFG CAMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS**

Lais Camargo de Lacerda Medrado

**BIORREMEDIAÇÃO DO ANTIBIÓTICO OXITETRACICLINA UTILIZANDO
LACASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Pleurotus ostreatus***

Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG (PPGTPS- IFG) - Dissertação de Mestrado Profissional. Área de Concentração: Tecnologia de Sistemas de Produção Limpa. Linha de Pesquisa: Fontes renováveis de água.

Orientador: Prof. Dra. Mariângela Fontes Santiago

Goiânia, 2017

Medrado, Lais Camargo de Lacerda

Biorremediação do antibiótico oxitetraciclina utilizando lacases produzidas pelo fungo *pleurotus ostreatus*. / Lais Camargo de Lacerda Medrado. – – Goiânia, 2017.

109 f. il. col.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás, Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Tecnologia de Processos Sustentáveis, 2017.

Orientadora: Mariângela Fontes Santiago

1. Oxitetraciclina – biorremediação. 2. Lacase – enzima.
3. *Pleurotus ostreatus*. I. Santiago, Mariângela Fontes. II. Título.

CDD 628.51

Código 001.2018

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Claudineia Pereira de Abreu CRB1/1956

Biblioteca Clarice Lispector, Campus Anápolis
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás



INSTITUTO FEDERAL
Goiás
Câmpus Goiânia

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
IFG CÂMPUS GOIÂNIA
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS SUSTENTÁVEIS

Laís Camargo de Lacerda Medrado

**“BIORREMEDIAÇÃO DO ANTIBIÓTICO OXITETRACILINA
UTILIZANDO LACASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Pleurotus*
ostreatus”**

Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em
Tecnologia de Processos Sustentáveis do IFG
(PPGTPS - IFG) - Dissertação de Mestrado-
Profissional. Área de Concentração: Tecnologia de
Sistemas de Produção Limpa. Linha de Pesquisa:
Fontes Alternativas de Águas.

Prof(a). Dr(a). MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO (presidente e orientadora – UFG)

Assinatura *Mariângela Fontes Santiago*

Prof(a). Dr(a). FERNANDO SCHIMIDT (avaliador – IFG)

Assinatura *F. Schmidt*

Prof(a). Dr(a). JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA (avaliadora externa – UEG)

Assinatura *Joelma Abadia M. de Paula*

Aprovado em: 18/12/2017

AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu que eu chegasse até aqui.

À Professora Dr^a Mariângela Fontes Santiago pela orientação e apoio.

Aos meus pais, Clínio e Marlene, pelo incentivo, suporte e orações incessantes.

A todos os amigos e familiares que torceram por mim e propiciaram momentos de alegria e descontração durante essa caminhada.

À Luane Garcia e Jhébica Golveia que tanto me ensinaram, sempre dispostas a ajudar. Muito obrigada, de coração!

À Déborah Bezerra, pela ajuda com a secagem das enzimas. Você é um doce!

À Tereza Cristina, pela ajuda e dedicação nas análises de CLAE. Meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e orientação na realização das análises.

Ao Professor Dr Luiz Carlos Cunha pela gentileza que possibilitou a utilização do equipamento de CLAE nas dependências do NEPET-UFG.

À Professora Dr^a Joelma Abadia e à Universidade Estadual de Goiás por disponibilizarem o equipamento *spray dryer* para realização da secagem das enzimas.

Ao Instituto Federal de Goiás e à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás que me deram suporte para realização desta pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

TÍTULO: BIORREMEDIAÇÃO DO ANTIBIÓTICO OXITETRACICLINA UTILIZANDO LACASES PODUZIDAS PELO FUNGO *Pleurotus ostreatus*

AUTOR: LAIS CAMARGO DE LACERDA MEDRADO

ORIENTADOR: DRA. MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO

RESUMO

Os antibióticos são lançados constantemente no meio ambiente, ora pelas excretas humanas ou animais, ora provenientes de resíduos de indústrias farmacêuticas não tratados de forma eficaz ou, ainda, através do descarte incorreto de medicamentos vencidos ou não utilizados completamente. A presença de antibióticos em recursos hídricos tem se tornado uma preocupação crescente em todo mundo, haja vista que pode ocasionar o aparecimento de genes de resistência em bactérias patogênicas. Diversas estratégias têm sido estudadas para remediação destes compostos. A enzima lacase pertence ao grupo das multicobre oxidases, que é produzida, principalmente, por fungos e, em razão de sua baixa especificidade a substratos, é capaz de oxidar diversos poluentes, demonstrando potencial no tratamento de efluentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da enzima lacase, líquida e seca em *spray dryer*, produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* e induzida com resíduos vegetais, biorremediar o antibiótico oxitetraciclina. Para tanto, preparou-se meio de cultura Caldo Batata Dextrose, acrescentando-se 1% (m/v) de material vegetal e 5 discos de 5mm de cultura do fungo. Foram realizados controles positivo (indução com xilidina e cobre) e negativo (sem adição de indutores), para estabelecer parâmetros de produção enzimática. A produção foi avaliada por 9 dias e a lacase, produzida no dia de pico de atividade enzimática, foi caracterizada quanto à temperatura e pH ótimos, estabilidade, atividade frente a diferentes substratos, teste de catalase e gel de atividade por eletroforese. Determinou-se, então, que o extrato bruto contendo enzima lacase, apresenta maior atividade em pH 5 a 30°C, é mais estável à temperatura ambiente em pH 6, oxida melhor o substrato siringaldazina e que o pico de produção se dá no 7º dia de cultivo. Após a caracterização, procedeu-se a secagem do extrato. Foram testados 3 adjuvantes (Aerosil®, Goma Arábica e Maltodextrina) para auxiliar na proteção da enzima durante a secagem em *spray dryer*. O adjuvante Aerosil® não foi capaz de proteger a enzima ocasionando perda de 95% de atividade imediatamente após a secagem. Os adjuvantes maltodextrina e goma arábica não apresentaram diferença significativa na atividade residual logo após a secagem. Porém, durante 30 dias de armazenamento, o extrato seco com goma arábica apresentou maior estabilidade, mantendo 32,5% de atividade, enquanto com maltodextrina manteve 17,3%. O extrato seco com maltodextrina foi escolhido para realizar os testes de biorremediação, uma vez que apresentou maior atividade absoluta em relação aos outros extratos. A biorremediação foi realizada colocando-se um volume correspondente a 200U de atividade enzimática, do extrato seco e do extrato líquido, em contato com uma solução de oxitetraciclina a 10mg.L⁻¹. A biorremediação foi analisada durante 24 horas e a quantificação da degradação do antibiótico foi feita por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. Ambos os extratos foram capazes de degradar o antibiótico oxitetraciclina.

PALAVRAS-CHAVE: lacase; indutores; *pleurotus ostreatus*; secagem; *spray drying*; oxitetraciclina; biorremediação.

TITLE: BIORREMEDICATION OF OXYETRACYCLINE ANTIBIOTIC USING LACCASES

PRODUCED BY FUNGUS *Pleurotus ostreatus*

AUTHOR: LAIS CAMARGO DE LACERDA MEDRADO

ADVISER: DRA. MARIÂNGELA FONTES SANTIAGO

ABSTRACT

Antibiotics are constantly released into the environment, either through human or animal excreta, or from waste from untreated pharmaceutical industries, or by incorrect disposal of overdue or unused drugs. The presence of antibiotics in water resources has become a growing concern worldwide, since it may lead to the emergence of resistance genes in pathogenic bacteria. Several strategies have been studied for remediation of these compounds. The enzyme laccase belongs to the group of multicobalt oxidases, which is mainly produced by fungi and, because of their low specificity to substrates, are able to oxidize several pollutants, demonstrating potential in the treatment of effluents. The objective of this work was to evaluate the capacity of laccase enzyme, liquid and dry spray dryer, produced by the *Pleurotus ostreatus* fungus and induced with plant residues, bioremediate the antibiotic oxytetracycline. For this, the Dextrose Potato Broth culture medium was prepared by adding 1% (m/v) of plant material and 5mm disks of fungus culture. Positive controls (xylydine and copper induction) and negative (non-inducer) were performed to establish enzymatic production parameters. The production was evaluated for 9 days and the laccase, produced on the peak day of enzymatic activity, was characterized in terms of temperature and pH, stability, activity against different substrates, catalase test and activity gel by electrophoresis. It was then determined that the crude extract containing laccase enzyme shows higher activity at pH 5 at 30 ° C, is more stable at room temperature at pH 6, better oxidizes the syringaldazine substrate, and that peak production occurs at 7 ° day of cultivation. After characterization, the extract was dried. Three adjuvants (Aerosil®, Gum arabic and Maltodextrin) were tested to assist in the protection of the enzyme during drying in spray dryer. The Aerosil® adjuvant was not able to protect the enzyme causing 95% loss of activity immediately after drying. Adjuvants maltodextrin and gum arabic showed no significant difference in residual activity shortly after drying. However, during 30 days of storage, the dry extract with gum arabic presented greater stability, maintaining 32.5% of activity, while with maltodextrin maintained 17.3%. The dried extract with maltodextrin was chosen to perform the bioremediation tests, since it presented greater absolute activity in relation to the other extracts. The bioremediation was performed by placing a volume corresponding to 200U of enzymatic activity, of the dry extract and the liquid extract, in contact with an oxytetracycline solution at 10mg.L⁻¹. The bioremediation was analyzed during 24 hours and the quantification of the degradation of the antibiotic was done by High Performance Liquid Chromatography. Both extracts were able to degrade the antibiotic oxytetracycline.

KEYWORDS : laccase; inductors; *pleurotus ostreatus*; drying; spray drying; oxytetracycline; bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por antibióticos	20
Figura 2 – Estrutura química básica das tetraciclinas	23
Figura 3 – Fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
Figura 4 – Representação da estrutura proteica da enzima lacase exibindo os íons cobre.....	30
Figura 5 – Esquema do processo de oxidação catalisado pela Lacase	30
Figura 6 – Equipamento de secagem <i>spray dryer</i>	34
Figura 7 – Indutores utilizados na produção enzimática	39
Figura 8 – Erlenmeyers contendo o meio de cultura e indutores para produção de lacase do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	40
Figura 9 – Erlenmeyers preparados para biorremediação	47
Figura 10 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo com indutores xilidina e sulfato de cobre (controle positivo). B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	50
Figura 11 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo sem adição de indutores ao meio (controle negativo). B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	51
Figura 12 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de acerola. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	51
Figura 13 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de açaí. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	52
Figura 14 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de bagaço de cana. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	52

Figura 15 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de cacau. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	53
Figura 16 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de coco. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	53
Figura 17 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de cupuaçú. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	54
Figura 18 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de milho. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	54
Figura 19 – A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de palha de guariroba. B) Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo	55
Figura 20 – Atividade enzimática no dia de pico de produção, para os extratos brutos induzidos com açáí (Aça), cacau (Cac), palha de guariroba (Gua), coco (coc), milho (Mil), bagaço de cana (Can), cupuaçu (Cup), acerola (Ace), controle positivo (CP) e controle negativo (CN)	58
Figura 21 – Atividade enzimática para o extrato bruto induzido com resíduo de açáí, em seu sétimo dia de cultivo, variando-se pH e temperatura	60
Figura 22 – Atividade residual do extrato bruto a 25° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação	62
Figura 23 – Atividade residual do extrato bruto a 30° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação	63
Figura 24 – Atividade residual do extrato bruto a 40° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação	63
Figura 25 – Atividade residual do extrato bruto a 50° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação	64
Figura 26 – Atividade residual do extrato bruto a 60° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação	65

Figura 27 – Atividade do extrato bruto na presença e na ausência de catalase	68
Figura 28 – Gel de eletroforese em condições não-desnaturantes do extrato enzimático bruto, do 1° ao 9° de cultivo, induzido com resíduo de açai	69
Figura 29 – Gel de eletroforese em condições não-desnaturantes do extrato enzimático bruto no 5° e 6° dia de cultivo. Os números 1 e 2 indicam possível formação de bandas	70
Figura 30 – Extrato enzimático bruto após secagem em spray dryer. A) Extrato sem adição de adjuvante, B) Extrato seco com Aerosil®, C) Extrato seco com Goma Arábica, D) Extrato seco com Maltodextrina	72
Figura 31 – Atividade enzimática do extrato bruto antes da secagem, sem adição de adjuvantes (E. Bruto) e após 30 minutos de incorporação dos adjuvantes Aerosil, Maltodextrina (Malto) e Goma Arábica (Goma)	73
Figura 32 – Atividade enzimática residual do extrato bruto imediatamente após a secagem, das formulações sem adição de adjuvantes (E. Bruto) e com os adjuvantes Aerosil®, Maltodextrina (Malto) e Goma Arábica (Goma)	74
Figura 33: Curva de calibração da solução de oxitetraciclina	77
Figura 34: Concentração do antibiótico oxitetraciclina nos meios reacionais após 0,1,2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de reação com extrato enzimático	81
Figura 35: Cromatogramas da oxitetraciclina em cada tempo de tratamento, primeiro com o extrato líquido e segundo com extrato seco	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de cada reagente utilizado no preparo dos géis eletroforéticos suficiente para uma mini placa	44
Tabela 2 – Proporção de reagentes para o preparo do Tampão da Amostra	44
Tabela 3 – Condições dos parâmetros para secagem do extrato bruto em <i>spray dryer</i>	45
Tabela 4 – Composição das formulações para secagem	46
Tabela 5 – Condições adotadas para quantificação de oxitetraciclina em CLAE	49
Tabela 6 – Atividade enzimática do extrato bruto frente a diferentes substratos	66
Tabela 7 – Rendimento percentual do processo de secagem do extrato bruto sem adição de adjuvantes e com os adjuvantes Aerosil®, Maltodextrina e Goma Arábica, calculado para cada uma das secagens, com respectivas médias e desvio-padrão.....	71
Tabela 8 – Atividade enzimática, atividade residual e umidade para os extratos secos com aerosil®, maltodextrina (Malto) e goma arábica (Goma), tendo como parâmetro a atividade enzimática obtida antes da secagem com os adjuvantes já incorporados	75
Tabela 9: Média das áreas dos picos, média das concentrações e porcentagem de remoção do antibiótico oxitetraciclina durante a biorremediação com o extrato enzimático bruto líquido	78
Tabela 10: Média das áreas dos picos, média das concentrações e porcentagem de remoção do antibiótico oxitetraciclina durante a biorremediação com o extrato enzimático bruto seco com maltodextrina	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação e principais indicações dos antibióticos	21
Quadro 2 – Estudos de biorremediação usando lacases fúngicas	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD – ágar batata dextrose

ABS – absorvância

ABTS – 2,2'azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico)

ANOVA - análise de variância

APS – persulfato de amônia

BOD – biochemical oxygen demand

CBD – caldo batata dextrose

CLAE – cromatografia a líquido de alta eficiência

dag.Kg⁻¹ – decagrama por kilograma

DNS – ácido 3,5-dinitrossalicílico

OMS – organização mundial de saúde

M/V – massa/volume

PDA – photodiode array detector

QSQ- Quantidade suficiente para

SDS – dodecil sulfato de sódio

TEMED – tetrametiletenodiamina

U.mL⁻¹ – unidade de atividade enzimática por mililitro

UV/VIS – ultravioleta visível

ξ – coeficiente de absorvidade molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVOS.....	17
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	17
1.2.2 <i>Específicos</i>	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR ANTIBIÓTICOS	18
2.2 CLASSES DE ANTIBIÓTICOS – TETRACICLINAS	21
2.3 TRATAMENTOS E OUTRAS DESTINAÇÕES DADOS AOS ANTIBIÓTICOS.....	24
2.4 ENZIMA LACASE.....	26
2.4.1 <i>Fungos produtores</i>	26
2.4.2 <i>Classificação e mecanismo de ação</i>	28
2.4.3 <i>Aplicação da Lacase como biorremediadores</i>	31
2.5 SECAGEM DE ENZIMAS EM <i>SPRAY DRYER</i>	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ORIGEM E MANUTENÇÃO DO FUNGO.....	37
3.1.1 <i>Preparação do meio de cultura</i>	37
3.1.2 <i>Manutenção do fungo</i>	37
3.2 ESCOLHA DO MATERIAL VEGETAL PARA INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE.....	38
3.3 PRODUÇÃO DE LACASE.....	39
3.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE	40
3.5 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	41
3.6 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES	42
3.7 SELEÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO PARA ETAPAS SEGUINTEs.....	42
3.8 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMO	42
3.9 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DA ENZIMA EM TEMPERATURA E PH ÓTIMO.....	42
3.10 ATIVIDADE DA ENZIMA UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS	43
3.11 TESTE COM CATALASE.....	43
3.12 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	43
3.13 SECAGEM DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO EM <i>SPRAY DRYER</i>	45
3.14 AVALIAÇÃO DO RENDIMENTO E ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO APÓS SECAGEM	46
3.15 BIORREMEDIAÇÃO DO ANTIBIÓTICO OXITETRACICLINA.....	47
3.16 QUANTIFICAÇÃO DA REMOÇÃO DE OXITETRACICLINA	48
3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	50
4.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E PH ÓTIMOS	59
4.3 ESTABILIDADE DA ENZIMA EM DIFERENTES PH'S E TEMPERATURAS	61
4.4 ATIVIDADE UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS.....	66
4.5 ENSAIO COM CATALASE	67
4.6 ELETROFORESE.....	69
4.7 RENDIMENTO E ESTABILIDADE DO EXTRATO BRUTO INDUZIDO COM RESÍDUO DE AÇAÍ NO PROCESSO DE SECAGEM EM <i>SPRAY DRYER</i>	70
4.7.1 <i>Rendimento</i>	71
4.7.2 <i>Análise da atividade enzimática das formulações pré e imediatamente após secagem</i>	72
4.7.3 <i>Estabilidade do extrato enzimático bruto seco</i>	75
4.8 BIORREMEDIAÇÃO DO ANTIBIÓTICO OXITETRACICLINA	77

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	82
5.1 CONCLUSÕES.....	82
5.2 SUGESTÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE A – ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO-SE PH E TEMPERATURA	100
APÊNDICE B – RESULTADOS DOS TESTES DE LINEARIDADE, PRECISÃO E EXATIDÃO.....	109

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são fármacos utilizados para combater e prevenir doenças provocadas por bactérias tanto na medicina humana quanto na veterinária (REGITANO; LEAL, 2010). Estas substâncias são largamente utilizadas e, devido a isto, a contaminação ambiental por parte destes compostos vem se tornando preocupante (VASCONCELOS, 2011). Os antibióticos entram no ambiente de várias formas, dentre elas, através das excretas e da lavagem de tratamentos tópicos tanto de humanos quanto de animais, por meio da utilização do estrume ou do lodo de tratamento de esgoto como meio de adubação de lavouras, possibilitando que estes compostos sejam absorvidos pelos tecidos vegetais, também podem ser lançados no ambiente durante o seu processo de fabrico e formulação, e por descartes inapropriados (CAPLETON et al., 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõem, em suas respectivas resoluções nº 306/04 e nº 358/05, sobre o armazenamento, transporte, tratamento e disposição final dos Resíduos de Serviços de Saúde, bem como estabelecem critérios para o licenciamento ambiental dos sistemas de tratamento e disposição final destes resíduos. Os órgãos supracitados consideram como resíduos aqueles medicamentos que, porventura, não foram utilizados até o término da terapia, que venceram ou apresentaram problemas no lote de fabricação, indicando o tratamento térmico por incineração para a eliminação dos mesmos (ANVISA, 2004; CONAMA, 2005).

O aumento no consumo destes fármacos, que segundo Juan Du et al. (2017) foi de aproximadamente dois bilhões de unidades-padrão por ano nos últimos 10 anos, somado à alta taxa de fármaco não metabolizado e ao descarte e tratamento inapropriado tem ocasionado problemas ambientais, pois seu acúmulo no meio ambiente pode acarretar a morte de microrganismos menos resistentes e a formação de outros super-resistentes (REGITANO; LEAL, 2010; LIEBERMAN, 2003).

A eliminação destes compostos do meio tornou-se um desafio para pesquisadores de diversas áreas, haja vista que a utilização indiscriminada de antibióticos ao invés de tratar doenças infecciosas, pode torná-las incuráveis (CARVALHO; SANTOS, 2016). Pesquisas utilizando biorremediação para reduzir ou remover este tipo de contaminante tem ganhado destaque (LIMA et al., 2015). Segundo Patel et al. (2017) a utilização de lacase como agente biorremediador é promissora, pois os requisitos simples de catálise e baixa especificidade a substratos tornam esta enzima capaz de oxidar uma gama de compostos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Produzir, caracterizar e secar em *spray dryer* a enzima lacase do fungo *Pleurotus ostreatus* e testar sua capacidade de degradação do antibiótico oxitetraciclina.

1.2.2 Específicos

- Testar diferentes materiais vegetais como indutores para a produção de lacase;
- Selecionar o extrato produzido com o melhor indutor e caracterizá-lo quanto a temperatura e pH ótimos, atividade frente a diferentes substratos, estabilidade em diferentes pH's e temperatura, influência da catalase e perfil de atividade por eletroforese;
- Secar o extrato enzimático bruto em *spray dryer* utilizando diferentes adjuvantes de secagem;
- Avaliar a atividade enzimática residual, umidade e estabilidade do extrato bruto após secagem;
- Aplicar o extrato bruto líquido e seco na biorremediação do antibiótico oxitetraciclina e avaliar sua remoção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação ambiental por antibióticos

Os antibióticos são fármacos largamente utilizados e estão entre os medicamentos mais bem-sucedidos já desenvolvidos pela ciência, representando o triunfo da medicina do século XX quando se refere ao tratamento de doenças infecciosas (MARTINEZ, 2014; BENTLEY; BENNETT, 2003). Eles são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, capazes de impedir ou combater infecções bacterianas tanto na medicina humana quanto na veterinária (REGITANO; LEAL, 2010; KÜMMERER, 2009a).

Juan Du et al. (2017) relataram que o consumo de antibióticos aumentou de 54,1 bilhões para 73,6 bilhões de unidades-padrão nos últimos 10 anos. Essas substâncias são produzidas com o intuito de manterem suas propriedades químicas até que o propósito terapêutico seja alcançado e, por isso, 50% a 90% de uma dosagem de fármaco pode ser excretado sem que tenha sido metabolizado pelo organismo (BILA; DEZOTTI, 2003; MULROY, 2001). O aumento no consumo devido ao uso indiscriminado de antibióticos, somado ao descarte inapropriado de medicamentos, que não foram totalmente utilizados, em esgotos domésticos ou lixo comum, tem acarretado problemas ambientais (CAPLETON et al., 2006).

Os antibióticos podem contaminar o ambiente de várias formas, sendo os recursos hídricos o meio mais atingido. Thomas (2008), Larsson et al. (2007) e Li et al. (2008) verificaram que em alguns países asiáticos e europeus, unidades de produção e fabricação de antibióticos apresentaram concentração total desse fármaco nas estações de tratamento de esgoto de até vários mg.L⁻¹. Além disso, o uso de antibióticos como a estreptomicina na produção de frutos nos Estados Unidos, por exemplo, contribui para o aumento da concentração desses resíduos em águas superficiais e subterrâneas, uma vez que eles podem ser arrastados pelas águas das chuvas e de irrigação (KÜMMERER, 2009b).

Contudo, as principais formas de contaminação por antibióticos se dão através do seu uso na medicina humana e veterinária. O consumo humano desses medicamentos considerando a taxa de prescrição e a ingestão sem prescrição ao redor do mundo, varia de país para país (MÖLSTAD et al., 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), muitas vezes os antibióticos têm sido utilizados inapropriadamente e, em diversas situações, sem base em evidências que comprovem sua real necessidade (NOVARETTI et al. 2014). Pesquisas feitas na

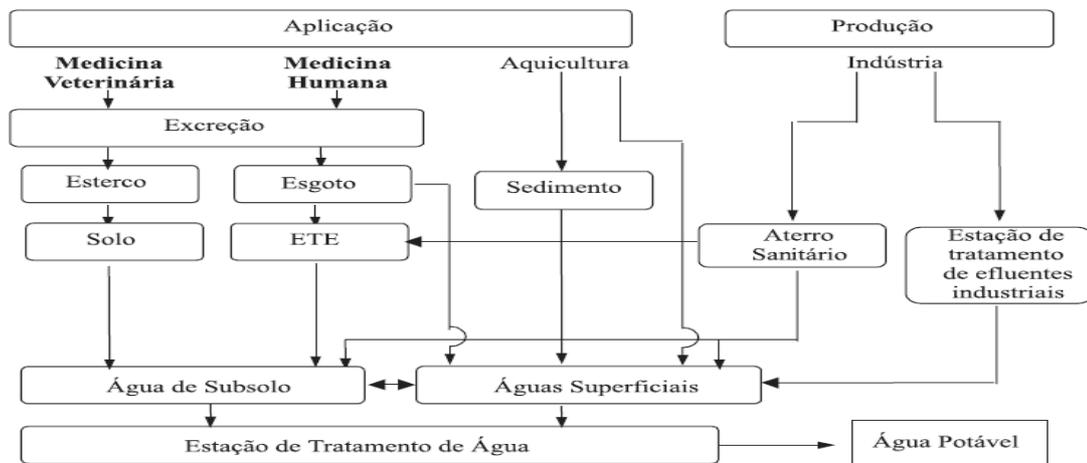
Europa por Cars et al. (2001) e Vaccheri et al. (2002) demonstraram que França, Espanha, Portugal e Bélgica apresentaram o maior consumo de antibióticos e que Holanda, Dinamarca, Suécia, Alemanha e Áustria apresentaram o menor consumo entre as nações europeias. Em 2010, o Brasil ocupava a 8ª posição entre os países com maior mercado farmacêutico do mundo (SANTOS; FERREIRA, 2012). Dados mais recentes em termos de utilização de fármacos foram publicados em 2014, evidenciaram o Brasil na 4ª posição mundial entre os mercados mais consumidores de medicamentos e, ainda, que as vendas de antibióticos no país representaram 40% do total segundo o Sindicato das Indústrias Farmacêuticas (NOVARETTI et al., 2014).

Os antibióticos de uso veterinário entram no ambiente através da aplicação direta nas águas de superfície para o tratamento de aquiculturas, através das excretas e da lavagem de tratamentos tópicos dos animais e da utilização de estrume como meio de adubação (BOXALL et al., 2002). Pesquisas feitas por Hirsch et al. (1999), Kolpin et al. (2002) e Yang e Carlson (2003), na Alemanha e nos EUA detectaram pequenas quantidades de antibióticos em águas superficiais próximas à extensiva criação de gado onde estes medicamentos são administrados para tratar ou prevenir doenças e, também, como aditivos na alimentação animal para aumentar a taxa de crescimento e eficiência alimentar. Em um estudo feito por Campagnolo et al. (2002), nos EUA, foi observado a existência de várias classes de antibióticos em tanques de armazenamento de dejetos de suínos, com concentrações da ordem de mg.L^{-1} , e em águas superficiais e subterrâneas nas proximidades de fazendas com criação de aves e suínos onde se utilizava estrume como adubo para lavouras.

O excessivo uso desses medicamentos em humanos e animais, somado à alta taxa de fármacos não metabolizados, ao uso em plantações e ao uso de estrume como adubo, resulta em concentrações desses compostos em águas superficiais e subterrâneas em várias partes do mundo, como foi observado nos estudos feitos por Hirsch et al. (1998) na Alemanha, Desbrow (1998) na Inglaterra, Ternes et al. (1999) e Stumpf et al. (1999) no Brasil, Winkler et al. (2001) no Canadá, Kolpin et al. (2002) nos EUA, Azzam et al. (2017) no Egito, Araújo et al. (2017) em Portugal, Zhang et al. (2018) no sul da China. Além disso, a falta de um tratamento específico e eficaz nas estações de tratamento de esgoto contribui para a não eliminação desses resíduos e pode os fazer retornar para o consumo humano, conforme pode ser observado na Figura 1. Assim, a presença destes metabólitos em rios e lagos favorece o surgimento de bactérias super-resistentes, podem causar efeitos tóxicos e atuar como perturbadores endócrinos em diversos organismos vivos

e, inclusive, em humanos (HIRSCH et al., 1999; KÜMMERER, 2009b; ACOSTA, 2016).

Figura 1: Rotas de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por antibióticos



Fonte: Bila e Dezotti (2003)

Segundo Carvalho e Santos (2016) nos últimos anos a União Europeia tem concentrado esforços, aumentando a vigilância no consumo e investindo em pesquisas sobre contaminação ambiental, visando diminuir o lançamento de resíduos de antibióticos no meio e, conseqüentemente, evitando que bactérias super-resistentes se desenvolvam. Ainda segundo os autores, os meios utilizados para reduzir o impacto ambiental dos antibióticos, conforme se depreende nas ações adotadas na União Europeia, demonstra o reconhecimento dos males que os mesmos podem causar à cadeia natural, envolvendo todos os membros dos locais atingidos, direta ou indiretamente. No entanto, a resistência desenvolvida por microrganismos se consubstancia em obstáculos, por ser um processo naturalmente evolutivo (KÜMMERER, 2009b).

Embora seja um fenômeno natural, a resistência aos antibióticos pode ser agravada e acelerada pelo uso excessivo e inadequado desses fármacos na medicina humana e veterinária e, por conseguinte, sua ocorrência no meio ambiente (LIEBERMAN, 2003). Dessa forma, a redução e eliminação desses compostos no meio tornam-se um dos atuais desafios para os pesquisadores das mais diversas áreas, pois, segundo a Organização Mundial de Saúde a resistência a antimicrobianos é caracterizada como uma crise global de saúde pública que deve ser gerenciada com urgência (WHO, 2015). Uma vez que os agentes causadores de doenças infecciosas, que outrora eram iminentemente combatidas pelo uso de

antibióticos, podem se mutar, gerando problemas de saúde pública, haja vista que os efeitos das atuais ferramentas, ao invés de tratá-los, podem transformá-los em incuráveis (KÜMMERER, 2009b; CARVALHO; SANTOS, 2016). Pesquisas feitas por Mackie et al. (2006) e Koike et al. (2007) em águas subterrâneas de locais onde havia criação de suínos, nos EUA, detectaram a presença de genes de resistência a tetraciclina nas amostras analisadas. Na China, Wu et al. (2010) também observaram genes de resistência e resíduos de tetraciclina no solo de locais com extensiva criação de suínos. Tamminen et al. (2010) verificaram a presença de vários genes de resistência às tetraciclinas em amostras de sedimentos em fazendas de aquicultura na Suécia e Finlândia. Estes estudos apontaram a capacidade dos microrganismos de adquirirem resistência quando são submetidos a constante contato com estes agentes antimicrobianos.

Na era pré-antibiótica, por exemplo, mais de 80% das pessoas infectadas por *Staphylococcus aureus* morriam e, com o advento dos antibióticos, especialmente a penicilina, o número de mortalidade devido à esta infecção diminuiu radicalmente (LOWY, 2003). Estudos realizados por Bal e Gould (2005) demonstraram que com aumento da resistência bacteriana, apenas 20% das espécies ora sensíveis à penicilina ainda estão suscetíveis a este medicamento, sendo que, doentes infectados por *Staphylococcus aureus* resistentes tem probabilidade 40% maior de morrer em comparação com doentes acometidos por bactérias ainda sensíveis a este antibiótico.

2.2 Classes de antibióticos – Tetraciclinas

Os antibióticos são de origem natural, semissintéticos ou sintéticos e podem ser classificados em 12 grupos, de acordo com suas propriedades químicas, mecanismo de ação e espectro de atividade, conforme especificado pela ANVISA (2007) e resumido no Quadro 1.

Quadro 1: Classificação e principais indicações dos antibióticos

Classe	Indicações Clínicas
Aminoglicosídeos	Septicemias, infecções do trato urinário, endocardites, infecções respiratórias, intra-abdominais, meningites em recém-nascidos, infecções oculares, osteomielites e infecções de articulações
Cloranfenicol	Infecção por enterococos resistentes à vancomicina, salmoneloses, tratamento de rickettsioses ou erlichiose.

Estreptograminas	Restritas às infecções causadas por estafilococos resistentes à oxacilina e estafilococos com sensibilidade diminuída ou resistentes à vancomicina;
Glicopeptídeos	Usada como alternativa aos beta-lactâmicos em pacientes alérgicos.
Lincosaminas	Infecções intra-abdominais, pélvicas, pulmonares, odontogênicas, sinusites, otite crônica, osteomielites, erisipela e infecções de pele por estreptococos ou estafilococos.
Macrolídeos	São utilizados como alternativa terapêutica em pacientes alérgicos à penicilina
Nitroimidazólicos	Usado para tratar grande variedade de infecções por anaeróbios, como abscesso cerebral, pulmonar, bacteremia, infecções de partes moles, osteomielite, infecções orais e dentárias, sinusite crônica, infecções intra-abdominais.
Oxazolidinonas	Possui atividade contra uma ampla variedade de patógenos, entre eles: <i>Clostridium spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> e <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Quinolonas	Infecções dos tratos genito-urinário, gastrointestinal, respiratório, osteomielites, partes moles.
Sulfonamidas	infecções do trato urinário, altas e baixas, uretrites e prostatites agudas ou crônicas, tratamento de otite média, sinusite e exacerbação aguda de bronquite crônica, profilaxia da pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i> e toxoplasmose,.
Tetraciclinas	Podem ser utilizadas no tratamento de infecções causadas por clamídias, riquetsias, cólera, brucelose e actinomicose. São alternativas no tratamento de infecções causadas por <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Haemophilis ducreyi</i> , <i>Treponema pallidum</i> em pacientes com traqueobronquites e sinusites.
β-Lactâmicos	Pneumonias, sinusite, faringite, meningites, infecções cutâneas e do aparelho reprodutor.

Fonte: Autora (2017) com dados da ANVISA (2007)

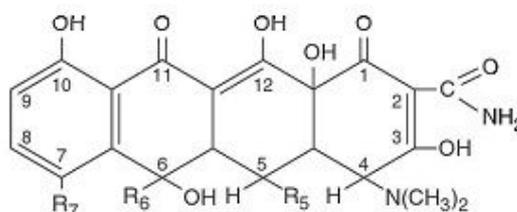
Pesquisas feitas por Lima et al. (2008) e Guimarães et al. (2010) evidenciaram que o grupo de antibióticos β-Lactâmicos ao qual pertencem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, monobactams, representam cerca de 50% do total de vendas de antibióticos em todo Brasil. Isso se deve ao fato destes medicamentos serem usados como primeira escolha para tratar uma gama de infecções, pois são de amplo espectro de atuação.

As demais classes de antibióticos são frequentemente usadas como alternativa para o tratamento de infecções em que o microrganismo apresenta resistência à β-Lactâmicos ou em casos específicos em que a infecção não é tratável por esta classe (ANVISA, 2007; LIMA et al. 2008; GUIMARÃES et al. 2010). Porém, uma atenção especial é dada às classes de quinolonas e tetraciclinas. As

quinolonas chegaram a representar cerca de 19% do total de vendas de antibióticos em 2004, isso porque este grupo é frequentemente usado em infecções muito comuns, como as do trato genito-urinário, gastrointestinal e respiratório (ANVISA, 2007; GUIMARÃES et al. 2010). Já as tetraciclinas são de baixa toxicidade, possuem preços acessíveis e atuam em vários tipos de microrganismos, em especial, naquelas infecções causadas por clamídias, riquetsias, cólera, brucelose e actinomicose, mas é seu uso indiscriminado na medicina veterinária que tem causado vários problemas ambientais, principalmente no que se refere a resistência de grupos variados de bactérias (ANVISA, 2007; REGITANO; LEAL, 2010).

As tetraciclinas são uma família de substâncias que possuem um núcleo tetracíclico formado por 4 anéis com seis carbonos, fundidos linearmente, como observado na Figura 2, que podem ser produzidas por microrganismos do gênero *Streptomyces* sp. Todas as tetraciclinas formam quelatos insolúveis com cátions metálicos divalentes como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , e também com o cátion Al^{3+} (ATTWOOD, et al., 2003). Elas possuem elevado poder de sorção no solo, o que possivelmente ocasiona a morte de microrganismos presentes nele, contamina águas subterrâneas e superficiais e promove o desenvolvimento de bactérias super-resistentes. Dessa forma, faz-se necessário a obtenção de informações mais criteriosas a respeito desse tipo de contaminação, bem como o desenvolvimento de metodologias que a mitiguem (VAZ JÚNIOR, 2010; MAIA et al., 2010).

Figura 2: Estrutura química básica das tetraciclinas.



Fonte: Katzung, Masters e Trevor (2014).

Da classe das tetraciclinas, o composto de maior utilização no mercado é a oxitetraciclina, que se tornou a base antibiótica mais empregada no campo. Na criação de bovinos e suínos são importantes na prevenção e tratamento de diarreias, pneumonias, mastites, podridão dos cascos e anaplasmoses (FERREIRA, 2005; MARTINS et al., 2008). Na aquicultura e avicultura, este medicamento pode ser adicionado diretamente à água ou em rações, como também pode ser injetado, para prevenir e tratar infecções causadas por *Mycoplasma gallisepticum*, *Escherichia coli* e *Salmonella* (GASTALHO et al., 2014). Além disso, no Brasil a oxitetraciclina

também pode ser utilizada como bactericida no tratamento de tubérculos e sementes, áreas das sementeiras e viveiros em culturas de ameixa, batata, berinjela, café, fumo, jiló, maracujá, pepino, pêssego, pimenta, pimentão, tomate e plantas ornamentais (SNVS, 1985).

2.3 Tratamentos e outras destinações dados aos antibióticos

A resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2015, dispõe que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente nos corpos d'água após o devido tratamento e desde que obedeçam às condições, padrões e exigências dispostos nesta e em outras normas aplicáveis. Neste contexto, indústrias dos mais diversos ramos de produção desenvolvem seus sistemas de tratamento de esgoto, de modo a obedecer aos parâmetros de potabilidade exigidos pelos órgãos reguladores.

As indústrias farmacêuticas, em especial, possuem efluentes com diversos tipos de contaminantes que, muitas vezes, não são eliminados pelos sistemas convencionais de tratamento de esgoto (OULTON et al., 2010). Tanto que, segundo Deegan et al. (2011), cerca de metade do efluente de indústrias farmacêuticas produzido no mundo todo é lançado nos corpos hídricos sem tratamento efetivo. Ainda segundo o mesmo autor, o tratamento dado a estes efluentes geralmente envolvem uma etapa físico-química, utilizada para remover material coloidal, cor, turbidez, odor, corrigir pH, metais pesados; seguido de um tratamento biológico com bactérias aeróbicas e anaeróbicas, que visa a destruição de compostos biodegradáveis. Contudo, estes processos de tratamentos não são eficientes para a remoção de compostos recalcitrantes, como é o caso dos antibióticos, que apresentam baixa biodegradabilidade devido ao tamanho de suas moléculas (ALMEIDA et al., 2004; ACOSTA, 2016).

Em virtude da falta de eficiência na remoção de antibióticos nas estações de tratamento de esgoto, várias pesquisas têm sido realizadas com o intuito de desenvolver metodologias para a remoção destes contaminantes, visto que, como já citado, sua presença no meio ambiente pode causar, entre outros males, a formação de cepas bacterianas super-resistentes (LIEBERMAN, 2003; ALMEIDA et al., 2004; REGITANO; LEAL, 2010). As pesquisas para remoção de antibióticos envolvem, entre outras metodologias, (i) a utilização de processos oxidativos avançados (ELMOLLA; CHAUDHURI, 2010), (ii) biorremediação, por meio da utilização da enzima lacase (ALEXANDRINO et al., 2017), (iii) carbonização hidrotermal (BAI,

SHEN; QI, 2017), (iv) hidrólise ácida e alcalina (MITCHELL et al., 2014).

Shi et al. (2014) utilizou lacase de *Eodinodontium taxodii* livre e imobilizada em Fe₃O₄ na remoção de antibióticos sulfonamidas. Ambas as formas de lacase, apresentaram resultados significativos na remoção destes antibióticos, porém, quando se adicionou mediadores derivados de lignina houve remoção de mais de 95% das sulfonamidas, em 30 minutos de incubação com uma concentração de lacase de 0,2U.mL⁻¹ (SHI et al., 2014). Ding et al. (2016) avaliou a capacidade da lacase em degradar 14 tipos de antibióticos das classes sulfonamidas, tetraciclinas e quinolonas. Os autores relataram que a taxa de remoção de cada antibiótico excedeu 70% em 15 minutos de contato com a enzima e foram bem próximas de 100% quando o tempo de contato foi de 180 minutos (SHI et al., 2014).

Apesar da realização de vários estudos visando o desenvolvimento de metodologias para a eliminação de antibióticos nos efluentes de indústria farmacêutica, a ANVISA e o CONAMA, em suas respectivas resoluções n° 306/04 e n° 358/05, só consideram como resíduos aqueles medicamentos que, porventura, não foram utilizados até o término da terapia, que venceram ou apresentaram problemas no lote de fabricação, indicando o tratamento térmico por incineração para a eliminação dos mesmos (ANVISA, 2004; CONAMA, 2005). Nenhum dos órgãos supracitados estabelecem limites para a concentração de antibióticos em água potável. De forma análoga a estes órgãos, o Regulamento para Lançamento de Águas Residuárias em Rede de Esgoto Fornecida pela Companhia de Distritos Industriais de Goiás – Goiasindustrial, de 2009, em seu artigo 9º, apenas dispõe que indústrias com atividades farmacêuticas deverão realizar processos de inativação de antibióticos e hormônios que apresentam eficiência de 90% na eliminação desses compostos. Mas não se posiciona a respeito de concentrações máximas que serão permitidas para despejo nos corpos hídricos. Além disso, nenhuma metodologia específica para remoção de fármacos em estações de tratamento de água e esgoto doméstico é aplicada. Desprezando-se, dessa forma, os meios de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por parte de antibióticos, através das excretas humanas e animais, das utilizações destes compostos em aquicultura e em lavouras (BOXALL et al., 2002; VAZ-MOREIRA et al., 2014).

Segundo a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp), a água que é captada nos rios e lagos passa pelas seguintes etapas de tratamento: Pré-cloração, Pré-alcanilização, Coagulação, Floculação, Decantação, Filtração, Pós-alcalinização, Desinfecção, Fluoração e depois segue para o consumo. Já no tratamento de esgoto, a mesma companhia segue dois

procedimentos, uma para o esgoto líquido e outra para os sólidos resultantes do tratamento do esgoto líquido. As etapas de tratamento para o esgoto líquido são: Gradeamento, Caixa de areia, Decantador primário, Tanques de aeração, Decantador secundário e descarte do líquido nos corpos hídricos. A parte sólida gerada através do tratamento do esgoto líquido, passa pelas seguintes etapas: Entrada do lodo primário, Entrada do lodo secundário, Adensadores, Flotadores, Digestadores, Filtros prensa, Esteira e disposição das tortas formadas em aterros sanitários (SABESP, 2017).

As etapas de tratamento de água e esgoto doméstico convencionais não são eficientes para remover compostos recalcitrantes como os antibióticos e hormônios. Dessa forma, o que se observa, é uma remoção parcial desses compostos através de tratamento biológico, como no caso da etapa de digestadores, onde o foco principal não é a remoção desses fármacos (DEEGAN et al., 2011). Assim, a água tratada para o consumo humano pode conter esses contaminantes, bem como o esgoto após o tratamento, que vai integrar os corpos d'água novamente.

2.4 Enzima Lacase

2.4.1 Fungos produtores

A lacase foi identificada pela primeira vez em uma árvore japonesa produtora de Laca, chamada de *Rhus vernicifera Stokes* (Anacardiaceae) (MOROZOVA et al., 2007; GIARDINA et al., 2010). Ela foi uma das primeiras enzimas a ser estudada e foi descrita pela primeira vez, em 1883, por Yoshida (MAYER; STAPLES, 2002). Em 1896, Bertrand e Laborde descobriram fungos produtores de lacase e, a partir daí elas começaram a ser encontradas em uma ampla variedade de fungos, bem como, em alguns insetos, plantas e bactérias, sendo abundantemente produzidas pelos chamados fungos de 'podridão branca', responsáveis pela degradação da lignina (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009; KUNAMNENI et al., 2007).

Os fungos de podridão branca são fungos basidiomicetos capazes de produzir, simultaneamente, enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradar substratos lignocelulósicos. Estes fungos, excretam enzimas que degradam polímeros de lignina em moléculas menores, que são mais facilmente absorvidas por eles e utilizadas como nutrientes (VALASKOVÁ, 2005; TUOMELA et al. 2000). As enzimas envolvidas na degradação da lignina são: (i) lignina leroxidase, (ii) manganês peroxidase, (iii) lacase, (iv) glucose e glioxal-oxidase e (v) celbiose-

quinona oxidoreductase, sendo que, o mecanismo do processo enzimático de degradação está relacionado com as condições ambientais e as espécies fúngicas envolvidas, uma vez que, microrganismos diferentes podem produzir conjuntos de enzimas lignolíticas diferentes (PALMIERI et al., 1997; KUNAMNENI, 2007). Duas classes de enzimas lignolíticas, fenoloxidasas (lacase) e peroxidases (lignina e manganês) são mais frequentemente produzidas por diversos tipos de cepas de fungos, porém, as lacases tem recebido especial atenção (THURSTON, 1994; REDDY; D'SOUZA, 1994; CULLEN, 1997; LEONOWICZ et al., 2001; LLORET et al., 2013; SHI et al., 2014).

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* é um potente organismo ligninolítico conhecido. Esse fungo produz um sistema enzimático composto por lignina peroxidase, manganês peroxidase e a glioxal oxidase (RAJARATHANAM et al., 1992). O fungo *Pycnoporus cinnabarinus* produz lacase como a única enzima ligninolítica e o *Pycnoporus sanguineus* produz, além da lacase, as enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase. Já o fungo *Pleurotus ostreatus* produz lacase e manganês peroxidase, mas não é capaz de produzir lignina peroxidase (PALMIERI et al., 1997; EGGERT et al., 1996). Além de outras enzimas, há relatos de produção de lacase pelos fungos *Trametes versicolor* (CORDI et al., 2007), *Tricholoma mongolicum* (MIAO et al., 2010), *Xylaria polymorpha* (CHAPARRO et al., 2009), *Trichoderma atroviride*, *T. longibrachiatum* e *T. viride* (GOCHEV; KRASTANOV, 2007), *Aspergillus sclerotiorum* e *Cladosporium cladosporioide* (BONUGLI-SANTOS et al., 2010).

As lacases podem apresentar isoformas, ou seja, diferentes formas moleculares com alterações na sequência de aminoácidos, mas que catalisam as reações com os mesmos substratos (MALONE et al., 2007). Dong et al. (2005) e Pezzela et al. (2009) identificaram que diferentes cepas, condições de cultivo, estado fisiológico do microrganismo e, principalmente, a presença de algum indutor no meio de cultura, podem influenciar nos tipos de lacase que serão produzidas. Mansur et al. (2003), Giardina et al. (1999) e Palmieri et al. (2003) estudaram a produção de lacase pelo *Pleurotus ostreatus* com diferentes meios de cultivo e produção, e observaram sua capacidade de produzir isoenzimas com variação de massa molar entre 60 e 67kDa.

O *Pleurotus ostreatus* (Figura 3) é um fungo produtor de lacase, pertencente à classe dos basidiomicetos, que tem se destacado, em relação a outros fungos produtores dessa enzima, por apresentar grande adaptabilidade, produtividade e por ser de fácil cultivo, o que diminui os custos de produção (GUNDECIMERMAN,

1999). Por ser um fungo degradador de lignina, estudos sobre seu cultivo utilizando resíduos lignocelulósicos como palha de arroz (BONATTI et al., 2004), batatas secas (MORAIS et al., 2002), extrato de trigo (GERN et al., 2008), casca de café (SILVA et al., 2012), grão de cervejaria (GREGORI et al., 2008), resíduos de laranja (ALEXANDRINO et al., 2007), entre outros, tem apresentado como resultados um aumento de produção em relação a cultivos sem esses tipos de indutores.

Figura 3: Fungo *Pleurotus ostreatus*



Fonte: Simões (2015)

O desenvolvimento de metodologias que aumentam a produção enzimática e diminuem os custos, pode viabilizar a aplicação de lacase em diversos processos biotecnológicos, principalmente em processos de biorremediação (ALEXANDRINO et al., 2007).

2.4.2 Classificação e mecanismo de ação

As enzimas são compostos de natureza proteica que atuam como catalisadores de reações bioquímicas. Elas são capazes de acelerar uma reação em milhares de vezes, fornecendo caminhos alternativos e menos energéticos, sem, contudo, participar dela como reagente ou produto, tornando-se passíveis de serem usadas em diversos tipos de atividade industrial como no ramo farmacêutico, alimentício, têxtil, papel e celulose, produção de álcool, cosméticos, entre outros (TALENS-PERALES et al., 2016). Suas propriedades as fazem preferíveis em relação aos catalisadores químicos, pois elas atuam em concentrações muito baixas, em condições suaves de temperatura e pH, apresentam fácil controle de atividade, alta especificidade ao substrato, baixa toxicidade, baixo impacto ambiental e, além

disso, os produtos apresentam melhor qualidade (SANCHEZ; DEMAIN, 2017).

Segundo a União Internacional de Bioquímica (IUB) as enzimas podem ser divididas em seis classes: (i) Oxirredutases: catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxi-redução; (ii) Transferases: catalisam reações com transferências de grupos funcionais; (iii) Hidrolases: catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes; (iv) Liases: catalisam quebra de ligações covalentes com remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico; (v) Isomerasas: catalisam reações de conversão entre isômeros ópticos ou geométricos; (vi) Ligases: catalisam reações de formação de novas moléculas a partir de duas já existentes (SANCHEZ; DEMAIN, 2017).

Nas últimas décadas, pesquisas tem dispensado especial atenção ao grupo de enzimas das oxirredutases, sobretudo às enzimas lacases (benzenodiol: dioxigênio oxidorredutase, EC 1.10.3.2), pois elas são capazes de catalisar reações de oxidação em diversos grupos de fenóis, aminas e na lignina, ao passo que reduz oxigênio molecular a água (GUIMARÃES et al., 2017). As lacases, também chamadas de fenoloxidasas, são glicoproteínas que integram o grupo de enzimas multinucleares cuja estrutura peptídica apresenta íons metálicos. Elas são caracterizadas por possuírem 4 átomos de cobre catalíticos, que podem ser classificados em tipo 1, 2 e 3 (COUTO; HERRERA, 2006; KUNAMNENI et al., 2007; XIMENES et al., 2009). O cobre tipo 1 ou T1 (Cu I) é responsável por catalisar a transferência de elétrons, oxidando o substrato, e por conferir a cor azul-esverdeada às lacases. O cobre tipo 2 ou T2 (Cu II) atua no sítio catalítico e atividade redox da proteína, transferindo elétrons para o aceptor final, oxigênio, que é reduzido a água. O cobre tipo 3 ou T3 (Cu III) se apresenta em um sítio bi-nuclear, composto por dois átomos de Cu III, atuando como intermediário na redução de O₂ (GUIMARÃES et al., 2017; KUNAMNENI et al., 2007; XIMENES et al., 2009). Os cobres tipo T2 e T3 formam um sítio tri-nuclear, como pode ser observado na Figura 4.

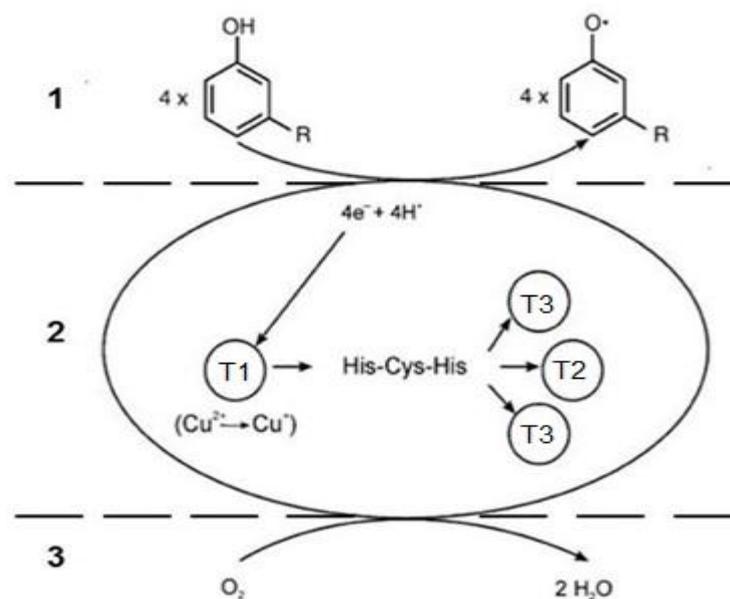
Figura 4: Representação da estrutura proteica da enzima lacase exibindo os íons cobre



Fonte: Ximenes et al., (2009)

O esquema da Figura 5 ilustra o processo de oxirredução que é catalisado pelo sítio ativo da enzima lacase, em que (1) ocorre oxidação do substrato e redução do cobre T1, em seguida, (2) o cobre T1 transfere elétrons para os cobres T2/T3 e, então, (3) o oxigênio molecular é reduzido a água através da interação com o sítio T2/T3 (BALDRIAN, 2006; GARCIA, 2016)

Figura 5: Esquema do processo de oxidação catalisado pela Lacase



Fonte: Adaptado de Garcia (2016)

Como observado, durante o ciclo catalítico há oxidação de quatro moléculas de substratos para produzir quatro moléculas de radicais livres hidroxi-fenólicos ou amino-aromáticos, enquanto ocorre a redução de uma molécula de oxigênio a duas moléculas de água (RIVA, 2006).

Segundo Mikolasch e Schauer (2009), as lacases podem ser classificadas como de alto potencial redox, produzidas principalmente pelos fungos de podridão branca; e de baixo potencial redox, que são produzidas comumente por insetos, bactérias, leveduras e vegetais. O potencial redox das lacases fúngicas está compreendido entre 0,4 e 0,8V, sendo que aquelas que apresentam um potencial de 0,4 a 0,6V são classificadas como de baixo potencial redox e as que apresentam potencial entre 0,6 e 0,8V são denominadas de alto potencial redox (GOICHEV; KRASTANOV, 2007; MOROZOVA et al., 2007b; BRIJWANI et al., 2010).

De acordo com Baldrian (2009), as lacases geralmente são caracterizadas como enzimas azuis devido a presença de íons cobre, mas também podem ser denominadas de enzimas amarelas ou brancas, quando o íon de cobre tipo 1 está ausente em sua estrutura. O mesmo autor revela que há divergência em considerar ou não as lacases brancas e amarelas como lacases propriamente ditas, porém, elas apresentam afinidades a uma gama de substratos semelhantes.

As lacases amarelas não contém o cobre tipo 1, podendo apresentar um átomo de manganês em sua estrutura. Essa mudança em seu sítio ativo, faz com que essa enzima seja capaz de oxidar lignina não-fenólica e álcool veratrílico na ausência de mediadores (ITABAINA JUNIOR; SOUZA, 2017). Segundo os mesmos autores a produção desse tipo de lacase foi verificada nos fungos *Gaeumannomyces graminis*, *Agaricus bisporus*, *Schizophyllum commune*, *Panus tigrinus*, *Phlebia radiata*, *Colorius versicolor* e *Phlebia tremellosus*. Já as lacases brancas são constituídas por um átomo de zinco, um átomo de cobre e dois átomos de ferro em seu sítio ativo, o que leva a um aumento no potencial redox da enzima e, conseqüentemente, em seu espectro de atuação. Elas foram encontradas nos fungos *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguíneus*, *Trametes hirsuta* e *Phlebia radiata* (ITABAINA JUNIOR; SOUZA, 2017).

2.4.3 Aplicação da Lacase como biorremediadores

Devido a crescente preocupação com o meio ambiente, tecnologias de produção mais limpas e de descontaminação ambiental vêm sendo desenvolvidas. Dentro desse contexto, a biorremediação, processo pelo qual plantas, bactérias,

algas, fungos e suas enzimas são utilizados para reduzir ou remover contaminantes ambientais, tem ganhado destaque (LIMA et al., 2015).

A enzima lacase tem sido bastante estudada como agente biorremediador devido sua capacidade de oxidar compostos fenólicos e alguns não fenólicos, como poluentes ambientais altamente recalcitrantes, atuando na desintoxicação de efluentes oriundos de indústrias de agrotóxicos, têxtil, petroquímica, papel e celulose, farmacêutica, e em diversos processos de descontaminação ambiental (COUTO; HERRERA, 2006; PATEL; SINGHANIA; PANDEY, 2017). Os requisitos simples de catálise da lacase, presença de substrato e de O₂, bem como sua aparente estabilidade, tornam esta enzima atraente para aplicações biotecnológicas, pois elas são capazes de oxidar, polimerizar e transformar compostos fenólicos em derivados menos tóxicos (MAJEAU et al., 2010).

Diversas pesquisas mostraram que lacases fúngicas são capazes de catalisar reações de oxidação de diversos tipos de contaminantes ambientais. No Quadro 2 são apresentados alguns destes estudos.

Quadro 2: Estudos de biorremediação usando lacases fúngicas.

Fonte produtora de lacase	Aplicação	Referência
<i>Coriolus versicolor</i>	Oxidação de Bisfenol A	Okazaki et al., 2002
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	Potin et al., 2004
<i>Echinodontium taxodii</i>	Biorremediação de sulfonamidas	Shi et al., 2014
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Biorremediação de anti-inflamatórios e estrogênios	Lloret et al., 2013
<i>Panus tigrinus</i>	Biotransformação de ácidos húmicos do solo	Zavarzina et al., 2004
<i>Phragmites australis</i>	Biodegradação de antibióticos veterinários	Alexandrino et al., 2017
<i>Pleurotus osteratus</i>	Biorremediação de solo contaminado com creosoto	Eggen, 1999
<i>Pyricularia oryzae</i>	Oxidação de ácido ferúlico	Carunchio et al., 2001
<i>Pyricularia oryzae</i>	Biodegradação de fenóis	Lante et al., 2000
<i>Trametes hirsuta</i>	A oxidação enzimática dos alcenos	Niku-Paavola e Viikari, 2000
<i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de antraceno e benzo(a)pireno	Collins et al., 1996

<i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de antibióticos sulfonamidas, tetraciclina e quinolona	Ding et al., 2016
<i>Trametes versicolor</i>	Biorremediação de diclofenaco, naproxeno, indometacina, ibuprofeno e fenoprofeno	Tran et al., 2010
<i>Trametes villosa</i>	Transformação do fungicida cyprodinil	Kang et al., 2002

Fonte: Autora (2017)

2.5 Secagem de enzimas em *spray dryer*

Apesar do desenvolvimento de várias metodologias para obtenção de enzimas, a produção dessas proteínas para fins comerciais ainda enfrenta problemas, pois, a comercialização desses produtos depende da manutenção de sua atividade e estabilidade por longos períodos de tempo (SAMBORSKA et al., 2005). Os extratos enzimáticos em meio aquoso são de difícil transporte, armazenamento e, além disso, apresentam pouca estabilidade, devido ao fato da água possibilitar a contaminação por microrganismos e facilitar uma série de degradações físicas, como agregação e precipitação, e químicas, como oxidação e deaminação, durante as etapas de purificação, transporte, estocagem e aplicação (ARAKAWA et al., 1993; NAMALDI et al., 2006).

Nesse sentido, o processo de secagem de enzimas permite que essas proteínas desidratadas apresentem uma série de vantagens quando comparadas com extratos enzimáticos aquosos (DE PAZ, 2002). As enzimas secas apresentam aumento no prazo de validade, conservação de sua atividade biológica, maior praticidade no manuseio, transporte e armazenamento, facilitando, dessa forma, sua comercialização (LIAO et al., 2003). Dentre as operações de transformação de produtos líquidos em formulações em pó, a técnica de secagem em *spray dryer* se mostra como uma boa opção, pois, tem sido frequentemente empregada na indústria em processos de secagem de alimentos, fármacos, sabões e enzimas (SCHAFFAZICK et al., 2003; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; PEIGHAMBARDUST, et al., 2011; PERRONE et al., 2013).

A técnica de *spray drying*, também chamada de nebulização, consiste em transformar um material em estado fluido em partículas sólidas. A secagem é realizada da seguinte maneira: (i) um sistema de bombeamento com controle de vazão leva o fluido até o bico atomizador (bico de 'spray'), (ii) pequenas gotículas são formadas e lançadas na câmara de secagem, (iii) outro sistema de bombeamento e controle de vazão lança o ar aquecido dentro da câmara de

secagem, onde ele entra em contato com as gotículas do fluido promovendo a secagem, (iv) o material seco é direcionado para um separador tipo ciclone onde o produto será coletado (MASTERS, 1979; ROSA et al., 2006). A Figura 6 ilustra, esquematicamente, um equipamento de secagem do tipo *spray dryer*.

Figura 6: Equipamento de secagem *spray dryer*



Fonte: Rosa et al., (2006)

As partes que compõe o *spray dryer* apresentado na Figura 6 são: (1) chave de comando geral, (2) controle da temperatura de secagem, (3) controle de bombeamento do líquido, (4) câmara de secagem, (5) ciclone ou separador do pó seco, (6) indicador da temperatura de saída do produto e (7) recipiente coletor do pó seco.

A secagem de fluidos em *spray dryer* é um fenômeno complexo que exige o controle de uma série de variáveis, como os parâmetros operacionais temperatura de entrada e saída do ar, vazão do ar e vazão do fluido (AMERI; MAA, 2006). Além desses parâmetros a serem controlados no equipamento de secagem, o teor de sólidos totais e a adição de adjuvantes interferem significativamente no rendimento do processo, bem como na manutenção da estabilidade do produto, absorção de umidade pós secagem, morfologia das partículas, atividade de água, influenciando, dessa forma, nas características e qualidade do produto final (CAL; SOLLOHUB, 2010). Dentre estes parâmetros, a temperatura é a variável mais crítica, por

influenciar diretamente na conservação das propriedades de substâncias termolábeis. Pelo fato das gotículas atomizadas e as partículas de pó secas manterem uma temperatura bem abaixo da temperatura de entrada do ar de secagem ao longo do processo, a temperatura do ar de saída deve ser controlada mais rigorosamente. Isso porque somente nos últimos estágios de secagem, quando a atividade de água do material é baixa, a temperatura das partículas pode subir, mas, ainda assim, continuará inferior à temperatura do ar que sai do equipamento. Por isso, a técnica de secagem em *spray dryer* pode ser aplicada em diversos materiais termossensíveis, como fármacos, microrganismos, alimentos, proteínas, entre outros (MILLQIST-FUREBY et al., 1999; SANTOS, 2012).

No caso de secagem de enzimas, a escolha do adjuvante que será adicionado à amostra é uma etapa fundamental, pois estes compostos podem atuar como protetores e estabilizadores das moléculas. Os adjuvantes protetores colaboram com a manutenção da estrutura da molécula de proteína evitando possível desnaturação, e os adjuvantes estabilizadores contribuem para a manutenção da atividade enzimática durante o processo de estocagem (BELGHITH et al., 2001). Os adjuvantes mais comumente usados são: tween, maltodextrina, celobiose, glicose, lactose, sucrose, trealose, polímeros carboximetilcelulose, celulose micro-cristalina, dextrana, goma arábica, glicerol, manitol, propilenoglicol, sorbitol, xilitol e dióxido de silício coloidal (SHIOTA, 2014).

Nos últimos anos, pesquisas envolvendo secagem de enzimas em *spray dryer* têm sido desenvolvidas. Silva (2010) testou vários adjuvantes para secagem da enzima lipase e observou que, imediatamente após a secagem, houve manutenção de 96,7, 93,2 e 90,6% da atividade quando se utilizou, respectivamente, os adjuvantes lactose, maltodextrina DE10 e β -ciclodextrina na concentração de 10% combinados com 0,1% de Tween. O mesmo autor relatou que após 8 meses da secagem, a enzima estabilizada com β -ciclodextrina foi a que apresentou melhor atividade residual, aproximadamente 70%. Shiota (2014) avaliou o processo de secagem das enzimas endoglucanase e xilanase em *spray dryer*, utilizando vários adjuvantes, e concluiu que a adição dos estabilizadores maltodextrina e goma arábica até um percentual de 10% de sólidos totais no extrato enzimático, contribuiu para a manutenção de mais de 90% de atividade residual. Belghith et al. (2001) observaram a manutenção praticamente constante da atividade de celulasas estabilizadas com 3% de maltodextrina, durante 8 meses. Namaldi et al. (2006), observou que a adição de 2% de maltodextrina a uma protease alcalina, proporcionou a manutenção de 82% de atividade enzimática durante 6 meses de

estocagem. Santos (2012) utilizou a proporção de 2/1 entre a quantidade de extrato enzimático e a quantidade de adjuvante nas formulações de secagem. Obteve-se melhores resultados quando a mistura entre os adjuvantes dextrina e dióxido de silício coloidal foram na proporção de 1/1. Após 120 dias de secagem e armazenamento à temperatura ambiente, observou-se a conservação de 91,62% da atividade proteolítica e 85,75% da atividade lipolítica. Com base nestas pesquisas, é evidente que a secagem de enzimas através da técnica de *spray drying* proporciona uma maior estabilidade e facilidade de manuseio e armazenamento desses produtos.

Dentre os adjuvantes que podem ser utilizados no processo de secagem de enzimas, atenção especial é dada a maltodextrina, goma arábica e dióxido de silício coloidal. Estes adjuvantes, quando comparados com outros, geralmente apresentam melhores resultados na manutenção de atividade pós secagem e durante armazenamento, como pode ser observado nos trabalhos de Belghith et al. (2001), Namaldi et al. (2006), Silva (2010), Santos (2012) e Shiota (2014).

A maltodextrina consiste em unidades de α -D-glicose, um produto de amido parcialmente despolimerizado, solúvel em água, com baixa densidade e alto peso molecular (BEMILLER; WHISTLER, 1996). Elas são frequentemente usadas como adjuvantes de secagem pois reduzem a higroscopicidade e facilitam a secagem, evitando a aglomeração do produto durante o processo e conferindo uma granulação mais homogênea. Além disso, a maltodextrina protege o aroma, evita a oxidação e melhora a estabilidade do produto pós secagem (BHANDARI; HARTEL, 2005).

A goma arábica é um heteropolissacarídeo complexo de estrutura altamente ramificada de galactose, arabinose, ramnose e ácido glicurônico. Ela tem sido usada como adjuvante em secagem por pulverização devido a sua capacidade de emulsificação, baixa viscosidade quando em solução aquosa e efetividade em reduzir a higroscopicidade dos pós (AZEREDO, 2005; ALLOUE et al., 2007). Além disso, assim como a maltodextrina, a goma arábica proporciona retenção de substâncias voláteis e protege contra oxidação, porém, possui custo mais elevado (McNAMEE et al., 1998).

O dióxido de silício coloidal é um material inorgânico, com baixa densidade e grande capacidade de adsorção. As partículas de sílica envolvem as partículas do ingrediente ativo, reduzindo as forças de atração e minimizando a ocorrência de aglomerações do produto. Ele melhora o aspecto dos pós, diminuindo a formação de pontes e buracos, além de propiciar aumento no rendimento (ROWE et al., 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental (Lenzibio) e as análises de cromatografia foram feitas no Laboratório NEPET, ambos na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. A secagem dos extratos enzimáticos brutos foi realizada no Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais da Universidade Estadual de Goiás – Campus Anápolis.

3.1 Origem e manutenção do fungo

A linhagem do *Pleurotus ostreatus* foi cedida pelo Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana do Departamento de Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas (Unicamp).

3.1.1 Preparação do meio de cultura

Foi preparado um caldo de batata artesanal acrescido de dextrose e ágar. O caldo de batata foi preparado através do cozimento de 3 batatas grandes (aproximadamente 250 gramas) cortadas em rodelas de, aproximadamente, 1cm de espessura em 1 litro de água, durante 30 minutos em panela de pressão. Depois, as batatas foram amassadas junto com a água de cozimento e o caldo resultante foi coado, para retirar resíduos de casca e o excesso de polpa.

Para a manutenção do fungo foi preparado um meio de cultura Ágar Batata Dextrose (ABD), onde se utilizou 200mL do caldo de batata preparado conforme metodologia supracitada, 20g de dextrose (Vetec) e 15g de ágar (Himedia) para um litro de água.

3.1.2 Manutenção do fungo

O meio de cultura Ágar Batata Dextrose (ABD) foi autoclavado à temperatura de 120°C e pressão de 1 atm, durante 20 minutos.

Foram colocados 20mL de meio de cultura ABD em cada placa de petri, esperou-se o meio solidificar e inoculou-se 1 disco de 6mm da cultura de *Pleurotus ostreatus* no centro da placa.

Durante o período de crescimento do fungo, aproximadamente 7 dias, as

placas foram mantidas em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 28°C e, depois, foram armazenadas sob refrigeração a 4°C, sendo repicadas mensalmente para manutenção da cultura.

3.2 Escolha do material vegetal para indução da produção de lacase

Para verificar a influência de indutores naturais para a produção de lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus*, foram escolhidos os seguintes resíduos vegetais: bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* L. Poaceae), casca de côco verde (*Cocos nufera* L. *Palmae* Arecaceae), fruto de cacau (*Theobroma cacao* L. Sterculiaceae), fruto de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum. Sterculiaceae) fruto/semente de açaí (*Euterpe pleracea* Mart. Arecaceae), fruto/semente/casca de acerola (*Malpighia glabra* D.C Malpighiaceae), palha de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc. Arecaceae) e sabugo de milho (*Zea mays* L. Poaceae).

O bagaço da cana-de-açúcar, casca de côco verde, sabugo de milho e palha de guariroba foram coletados em feiras na cidade de Goiânia – Goiás. Resíduos de açaí foram doados por produtores de polpa em Belém – Pará. Resíduos de cupuaçu e cacau foram cedidos pela Unidade de Extração de Matéria Vegetal da Natura®, em Benevides – Pará. O resíduo de acerola foi obtido em plantação caseira de aceroleiras na cidade de Goiânia – Goiás.

A secagem do bagaço de cana-de-açúcar, acerola e palha de guariroba foi feita ao ar livre, durante 48 horas. Os outros resíduos foram secos em estufa com circulação de ar forçado, a 40°C até que estivessem completamente secos, aproximadamente 24 horas. Todos os resíduos foram triturados até que se obtivesse um pó fino, em moinho de facas tipo willye, modelo Star FT50, marca Fortinox, como pode ser observado na Figura 7. Após a moagem, os resíduos foram armazenados em dessecadores.

Figura 7: Indutores utilizados na produção enzimática



Fonte: Autora (2017)

3.3 Produção de lacase

Para produção de lacase, seguiu-se metodologia proposta por Golveia (2016), com algumas modificações. Para tanto, utilizou-se 200mL de caldo de batata artesanal e 5g de dextrose para preparar 1 litro de meio de cultura para produção enzimática. Colocou-se 60mL deste meio de cultura e 1% (m/v) de material vegetal indutor em erlenmeyers de 250mL. Autoclavou-se os meios a 1atm e 120°C por 20 minutos e, depois inoculou-se 5 discos de 6mm da cultura do *Pleurotus ostreatus*, ora crescida em meio sólido ABD, em cada um dos erlenmeyers. Estes foram mantidos sob agitação de 150 rpm à temperatura de 28°C, em uma incubadora refrigerada com agitação – Shaker (Marca: Tecnal, Modelo: TE-421), por 9 dias. A Figura 8 apresenta os erlenmeyers antes de serem dispostos no shaker.

Figura 8: Erlenmeyers contendo o meio de cultura e indutores para produção de lacase do fungo *Pleurotus ostreatus*



Fonte: Autora (2017)

Como parâmetros, foram feitos controles negativos, apenas microrganismo e meio de cultura sem adição de indutores; e positivos, microrganismo e meio de cultura com adição de 0,0005% de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e $0,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,5-xilidina, conhecidos indutores de lacase, conforme descrito por Garcia (2006).

3.4 Avaliação da produção de lacase

Com o intuito de determinar o dia de pico de produção enzimática, foram feitas análises de atividade diariamente desde o momento da inoculação do fungo no meio de cultura até o décimo dia.

A determinação da atividade enzimática da lacase seguiu a metodologia proposta por Szklarz et al. (1989), em que a siringaldazina, absorvidade molar (ϵ) = $65000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, foi utilizada como substrato na reação. No entanto, a quantidade e o tipo de tampão foram alterados de modo a facilitar essa análise.

O volume final da mistura reacional foi de 1mL, composto por: $890 \mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 5,0; $10 \mu\text{L}$ de extrato enzimático bruto e $100 \mu\text{L}$ de siringaldazina (Sigma Chemical Company) $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, preparada em etanol absoluto. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro UV-Vis (Marca: Thermo Scientific, Modelo: Genesys 10S), à temperatura ambiente e 525 nm , por 5 minutos, iniciados a partir da adição de siringaldazina. Todas as análises foram feitas em triplicata.

A amostra utilizada para correção do background (branco) do espectrofotômetro também apresentava o volume final de 1mL e era composta por: $990 \mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 5,0 e $10 \mu\text{L}$ de extrato enzimático

bruto. A siringaldazina não foi adicionada de modo a evitar o início da reação de oxidação do substrato.

Leonowicz e Grzywnowicz (1981) propôs uma equação para quantificar a produção enzimática de fungos, utilizando a siringaldazina como substrato. Esta equação foi modificada e usada para calcular a atividade enzimática do extrato bruto em relação a absorvância e ao tempo de reação. Assim, tem-se a Equação 1:

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

Onde:

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

ϵ = Coeficiente de absorvância molar, específico para cada substrato ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$);

R = Quantidade de extrato bruto (mL);

t = Tempo de reação em minutos.

Dessa forma, o resultado da equação (U) é a concentração enzimática na solução expressada em $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, sendo que uma unidade de U é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de substrato por minuto.

3.5 Determinação de proteínas

A determinação da concentração de proteínas nos extratos brutos, foi feita segundo o método colorimétrico proposto por Bradford (1976). Utilizou-se albumina sérica bovina (BSA – Sigma) para construir uma curva padrão e, a partir dela, determinar a concentração de proteínas nos extratos.

Para as análises, deixou-se reagir 1 mL da solução de Bradford com 100 μL de amostra, durante 15 minutos. Após esse período, procedeu-se a leitura de absorvância, à temperatura ambiente, em 595 nm. Para o branco, utilizou-se água no lugar da amostra.

As análises foram feitas no momento da inoculação do fungo no meio e durante todos os dias de produção enzimática. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.6 Determinação de açúcares redutores

A determinação da concentração de açúcares redutores nos extratos brutos, foi feita utilizando o método colorimétrico proposto por Miller (1959). Utilizou-se dextrose (Vetec) para construir uma curva padrão e, então, determinar a concentração de açúcares redutores nos extratos.

A mistura reacional era composta por: 50 μ L de extrato bruto e 1mL do reagente de Miller – DNS (ácido dinitrossalicílico). A mistura foi fervida em banho-maria por 5 minutos e, posteriormente, foram adicionados 4mL de água destilada. Procedeu-se a leitura da absorbância à temperatura ambiente e 545nm.

3.7 Seleção do extrato enzimático bruto para etapas seguintes

As análises de caracterização, secagem e biorremediação foram feitas apenas com o extrato enzimático bruto obtido a partir do resíduo que melhor induziu a produção enzimática.

3.8 Determinação da temperatura e pH ótimo

Para a determinação da temperatura e pH ótimo, foram feitas análises de atividade enzimática segundo a metodologia descrita no item 3.4, alterando-se os pH's do tampão e variando a temperatura.

Os pH's analisados foram: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0, todos na concentração de 50mmol.L⁻¹. E as temperaturas foram: 25, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C.

Cada um dos pH's contendo a amostra foram incubados em cada uma das temperaturas, até que a temperatura da mistura (tampão/amostra) fosse igual à temperatura na qual estavam incubados. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.9 Determinação da estabilidade da enzima em temperatura e pH ótimo

A partir dos ensaios de temperatura e pH ótimo, foram selecionados os tampões de pH's 5,0, 6,0 e 7,0 e as temperaturas 25, 30, 40, 50 e 60°C, para se determinar a estabilidade do extrato enzimático bruto.

Amostras de 10 μ L do extrato bruto foram adicionadas em 890 μ L de tampões de cada um dos pH's selecionados e incubados nas temperaturas supracitadas por 24 horas.

As análises de atividade foram realizadas conforme descrito no item 4.4, de hora em hora até completar 6 horas de incubação e, por último, analisou-se a atividade após 24 horas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

3.10 Atividade da enzima utilizando diferentes substratos

Foi analisada a atividade enzimática do extrato bruto frente aos substratos ABTS, catecol e guaiacol, os quais são largamente utilizados em determinações de atividade de lacases provenientes dos mais diversos tipos de fungos, como, por exemplo, do *Pycnoporus sanguineus* (GARCIA, 2006), *Pycnoporus coccineus* (JOUANI et al. 2005), *Pycnoporus cinnabarinus* (RECORD et al, 2002), *Trichophyton rubrum* (JUNG et al, 2002) e *Pleurotus ostreatus* (ASSIS, 2015).

A avaliação da atividade enzimática seguiu a metodologia descrita no item 3.4, utilizando ABTS (Sigma Aldrich), catecol (Sigma Aldrich) e guaiacol (Sigma Aldrich) nas concentrações de 1mmol.L^{-1} . As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda 420, 470 e 465nm, respectivamente (SZKLARZ et al., 1989).

Os valores de coeficientes de absorvidade molar utilizados para calcular a atividade enzimática através da equação 1 foram de $36000\text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$ para o ABTS, $26900\text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$ para o catecol e $26600\text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$ para o guaiacol (SZKLARZ et al. 1989).

3.11 Teste com catalase

Para a realização do teste de catalase seguiu-se o proposto por Mayer e Staples (2002), em que incubou-se $10\mu\text{L}$ de extrato enzimático bruto e $50\mu\text{L}$ de solução de catalase 5U (Sigma Aldrich) em $840\mu\text{L}$ de tampão acetato de sódio 50mmol.L^{-1} pH 5,0, durante 30 minutos. A seguir, adicionou-se à mistura $100\mu\text{L}$ de siringaldazina $1,0\text{ mmol.L}^{-1}$ e acompanhou-se a reação durante 5 minutos a 525nm, para, posteriormente, determinar a atividade enzimática residual.

3.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise eletroforética não-desnaturante foi realizada para avaliar a produção enzimática durante nove dias de cultivo do fungo *Pleurotus ostreatus* em meio de cultura utilizando o açaí como material vegetal indutor.

O experimento foi realizado em um sistema de eletroforese Mini-Protean tetra

cell em cuba vertical (Marca: Bio-Rad). Foram utilizados dois tipos de géis, concentrador (7,5%) e de corrida (12%), cujas composições estão descritas na Tabela 1, conforme proposto por Golveia (2016).

Tabela 1: Quantidade de cada reagente utilizado no preparo dos géis eletroforéticos suficiente para uma mini placa

Gel de corrida	Quantidade (mL)	Gel concentrador	Quantidades (mL)
Água MILIQ	0,95	Água MILIQ	1,8
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,50	Tris-HCl 0,5M pH 6,8	0,75
Acilamida 30%	2,40	Acilamida 30%	0,4
SDS 10%	0,10	SDS 10%	0,03
APS 10%	0,045	APS 10%	0,015
TEMED	0,005	TEMED	0,003

Fonte: Golveia (2016)

Primeiramente, o gel de corrida foi adicionado em uma mini placa e, após sua polimerização, adicionou-se o gel concentrador. Nos poços formados no gel concentrador, foram adicionados 5 μ L de extratos brutos produzidos do primeiro ao nono dia de cultivo juntamente com 5 μ L de tampão da amostra, preparado como descrito na Tabela 2.

Tabela 2: Proporção de reagentes para o preparo do Tampão da Amostra

Reagentes	Quantidade
Água MILIQ	qsp 10mL
Tris – HCl/SDS 4x	7 mL
Glicerol	3 mL
SDS	1g
β -mercaptoetanol	0,6mL
Azul de bromofenol	1,2 mg

Fonte: Golveia (2016)

A corrida foi realizada à temperatura ambiente, em corrente constante de 15mA, com voltagem inicial de 90V até que as amostras percorressem o gel concentrador e, depois, de 120V até o final da corrida, como descrito por Garcia (2016). Para a revelação, o gel de corrida foi colocado em tampões acetato 50mmol.L⁻¹, nos pH's 4, 5 e 6, por 15 minutos em cada tampão. A coloração do gel foi feita com solução ABTS 0,5 mmol.L⁻¹ em tampão acetato pH 5 (GONÇALVES; STEINER, 1996, modificado).

3.13 Secagem do extrato enzimático bruto em *spray dryer*

A secagem do extrato enzimático bruto contendo lacase do fungo *Pleurotus ostreatus* foi realizada em mini *spray dryer* com fluxo co-corrente (modelo LM-MSD 1.0 - LABMAQ® do Brasil LTDA), no Laboratório de Secagem e Armazenamento de Produtos Vegetais da Universidade Estadual de Goiás – Campus Anápolis.

As condições adotadas para secagem do extrato bruto foram similares às propostas por Shiota (2014) e Silva (2010) durante otimização do processo de secagem de celulase e lipase, respectivamente, admitindo-se algumas modificações para melhor adequação ao equipamento utilizado. Os parâmetros adotados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Condições dos parâmetros para secagem do extrato bruto em *spray dryer*

Parâmetros	Condições
Vazão de alimentação	0,3 L/h
Vazão do ar de secagem	4,5 L/min
Pressão do ar de atomização	4,5 Kgf/cm ³
Temperatura do ar de entrada	100°C
Temperatura do ar de saída	80°C

Fonte: Autora (2017)

O bico nebulizador, responsável pela atomização do líquido na entrada da câmara de secagem, foi o de duplo fluido de 1mm.

O teor de sólidos presentes no extrato bruto foi quantificado, em triplicata, em uma balança determinadora de umidade por infravermelho (Marte, modelo ID50), no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Federal de Goiás. A partir do valor obtido para umidade presente em 1g de amostra, por subtração, foi possível calcular a porcentagem de teor de sólidos presente no extrato enzimático bruto (2,06%).

Foram adicionados adjuvantes para auxiliar no processo de secagem até que o teor de sólidos na formulação atingisse 10%. Também foi feita a secagem do extrato bruto sem a adição de nenhum adjuvante.

Os adjuvantes escolhidos foram o Dióxido de Silício Coloidal (Aerosil®), Goma Arábia (Vetec) e Maltodextrina (Sigma Aldrich), pois foram usados por Silva (2010) e Santos (2012) na secagem de lipases e peptidases, onde obteve-se resultados satisfatórios. Cada um desses adjuvantes foi adicionado isoladamente ao extrato bruto, conforme valores demonstrados na Tabela 4, de modo a se obter 50g

de formulação (extrato mais adjuvante), observando a concentração de 10% de sólidos totais. Devido ao baixo rendimento apresentado pelo extrato bruto sem adição de adjuvante em testes preliminares, a quantidade de extrato para secagem foi de 100g.

Tabela 4: Composição das formulações de secagem

Componente	Quantidade (g)
Extrato Bruto	45,92
Adjuvante	4,08

Fonte: Autora (2017)

Cada uma das misturas extrato/adjuvante ficou sob agitação, em agitador magnético, durante 30 minutos antes de se iniciar o processo de secagem, de modo que o adjuvante incorporasse às moléculas da enzima e a mistura ficasse homogênea.

Alíquotas de 1mL de cada uma das formulações foram coletadas para determinação da atividade enzimática do extrato bruto incorporado aos adjuvantes antes do processo de secagem, de modo a verificar possíveis interferências destes compostos no extrato bruto antes mesmo da secagem.

As formulações foram pesadas antes e após a secagem para posterior determinação do rendimento e, depois, os pós obtidos foram armazenados em frascos plásticos à temperatura ambiente.

3.14 Avaliação do rendimento e estabilidade do extrato bruto após secagem

Foram realizadas 4 secagens, as quais continham 50g de formulação para cada um dos adjuvantes e uma de 100g para o extrato bruto. O rendimento do processo foi calculado através do percentual entre a massa total de pó coletada e a massa de sólidos alimentada no equipamento (5g), da mesma forma que proposto por Souza (2003) e apresentado na Equação 2.

$$R = \frac{M_2}{M_1} \times 100$$

Onde:

R: é o rendimento, em porcentagem, do pó após processo de secagem;

M₁: é a massa de sólidos totais presente na formulação antes da secagem;

M₂: é a massa do pó obtida após a secagem.

A avaliação da estabilidade da enzima foi realizada através da medida de atividade enzimática, conforme item 3.4, imediatamente após a secagem, após 15 e 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente em recipiente plástico fechado.

Os pós obtidos foram diluídos em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0, até peso equivalente ao da formulação antes da secagem (50g), e a atividade enzimática foi determinada conforme procedimento descrito no item 4.4.

Também foi avaliado a umidade dos pós imediatamente após a secagem, depois de 15 e 30 dias, em balança determinadora de umidade por infravermelho (Marte, modelo ID50).

3.15 Biorremediação do antibiótico oxitetraciclina

A biorremediação do antibiótico oxitetraciclina seguiu a metodologia proposta por Golveia (2016), com algumas modificações. Para os ensaios, foi preparada uma solução contendo o antibiótico oxitetraciclina (Sigma Aldrich) à concentração de 20mg.L⁻¹. Um volume de extrato enzimático bruto líquido induzido com resíduos de açaí, correspondente a 200U de atividade enzimática, foi adicionado em um erlenmeyer contendo 10mL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 e 10mL da solução de oxitetraciclina 20mg.L⁻¹ (correspondendo a uma concentração final de 10 mg.L⁻¹ de oxitetraciclina na mistura reacional). Após os erlenmeyers serem preparados os frascos foram cobertos com papel alumínio devido a fotoinstabilidade do antibiótico e colocados sob agitação a 150 RPM e 25°C durante 24 horas. A Figura 9 apresenta os erlenmeyers preparados para biorremediação.

Figura 9: Erlenmeyers preparados para biorremediação



Fonte: Autora (2017)

Durante a biorremediação, as soluções foram amostradas, em triplicata, em 9 momentos: no tempo 0 e após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de reação. Com o intuito de parar a atuação da enzima, adicionou-se 200 μ L de NaOH 1mol.L⁻¹ ao final de cada tempo em 3 erlenmeyers. Após a interrupção da reação, foram retiradas alíquotas de 5mL em cada um dos erlenmeyers para posterior análise de remoção do antibiótico.

Além das soluções para biorremediação, foi preparado um controle nas mesmas condições das outras soluções, porém, o extrato enzimático bruto foi submetido a aquecimento até o início da fervura do caldo, aproximadamente 30 segundos, no aparelho micro-ondas, com o intuito de inativar a enzima. Também foi feito um controle sem a adição da enzima. Foram coletadas amostras dos controles apenas 24 horas após o início da reação.

O procedimento de biorremediação foi repetido utilizando-se a enzima seca em *spray dryer*, nas mesmas condições acima descritas, de modo a verificar possíveis interferências na degradação do antibiótico pelos adjuvantes usados na secagem da enzima. Para tanto, a enzima seca foi diluída em tampão acetato de sódio 50mM pH 5 até que a massa da solução atingisse 50g (massa da formulação antes da secagem). A atividade da enzima diluída foi calculada e, então, um volume correspondente a 200U de atividade enzimática foi adicionado a 10mL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 e 10mL da solução de oxitetraciclina 20mg.L⁻¹.

3.16 Quantificação da remoção de Oxitetraciclina

As análises quantitativas de degradação do antibiótico foram realizadas em equipamento de Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência – CLAE (LC-20A; Shimadzu; Série Prominence), com detector Ultravioleta/Visível (UV/Vis), em *Photodiode Array Detector* – PDA (SPD-M20A), no Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas (NEPET) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, seguindo a metodologia proposta por Kaale et al. (2008) alterando-se o tipo da coluna e o tampão utilizado durante a corrida cromatográfica, nas condições expostas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições adotadas para quantificação de oxitetraciclina em CLAE

Parâmetro	Condições
Coluna	C-18, 250 x 4,6 mm
Comprimento de onda	350 nm para Oxitetraciclina em PDA
Fase móvel	Tampão fosfato (pH = 2,5): Acetonitrila (75:25)
Fluxo	1 mL.min ⁻¹
Temperatura	30 °C
Volume de injeção	20 µL

Fonte: Kaale et al. (2008) com adaptações

Para a validação do método foi realizado teste de linearidade e, para tanto, foi construída uma curva padrão utilizando-se soluções de oxitetraciclina padrão analítico (Sigma Aldrich) nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,25, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 mg.L⁻¹, a partir da qual foi possível testar a linearidade do método através do coeficiente de correlação. Realizou-se também testes de precisão e exatidão, com o intuito de legitimar as adaptações ao método proposto por Kaale et al (2008). No teste de precisão, foram feitas 6 leituras de amostras com concentração de trabalho (CT) 10mg.L⁻¹ e no teste de exatidão foram feitas triplicatas de amostras com controle de qualidade alto (CQA) apresentando concentração de 12mg.L⁻¹, controle de qualidade médio (CQM) 5mg.L⁻¹ e controle de qualidade baixo (CQB) 0,3mg.L⁻¹.

A porcentagem de remoção da oxitetraciclina foi avaliada após 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de reação, tendo como base a concentração do antibiótico no controle contendo o extrato enzimático fervido, conforme Equação 3:

$$R = 100 - \left[\frac{(T \times 100)}{C} \right]$$

Onde:

R= % de remoção do antibiótico;

C= Concentração do antibiótico no controle contendo enzima inativa, em mg.L⁻¹;

T= Concentração do antibiótico após o tratamento, em mg.L⁻¹.

3.17 Análise estatística

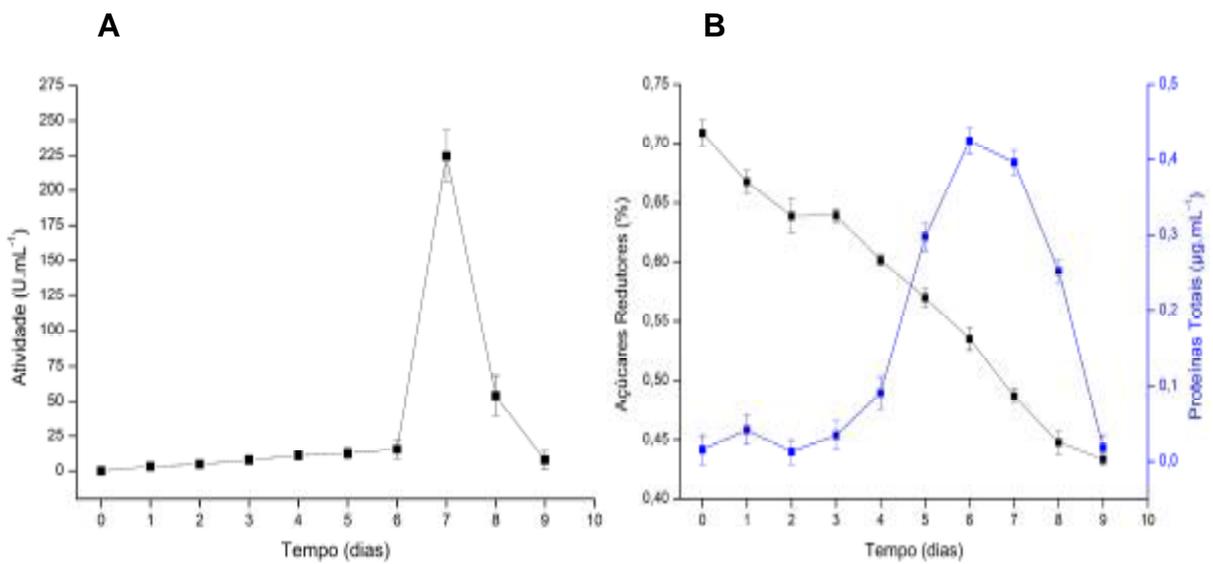
Os gráficos foram construídos no Software Origin versão 8.0. Para comparação dos grupos realizou-se análises de variância aplicando-se os testes ANOVA e Tukey, no programa Bioestat versão 5.0, ao nível de significância de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção Enzimática

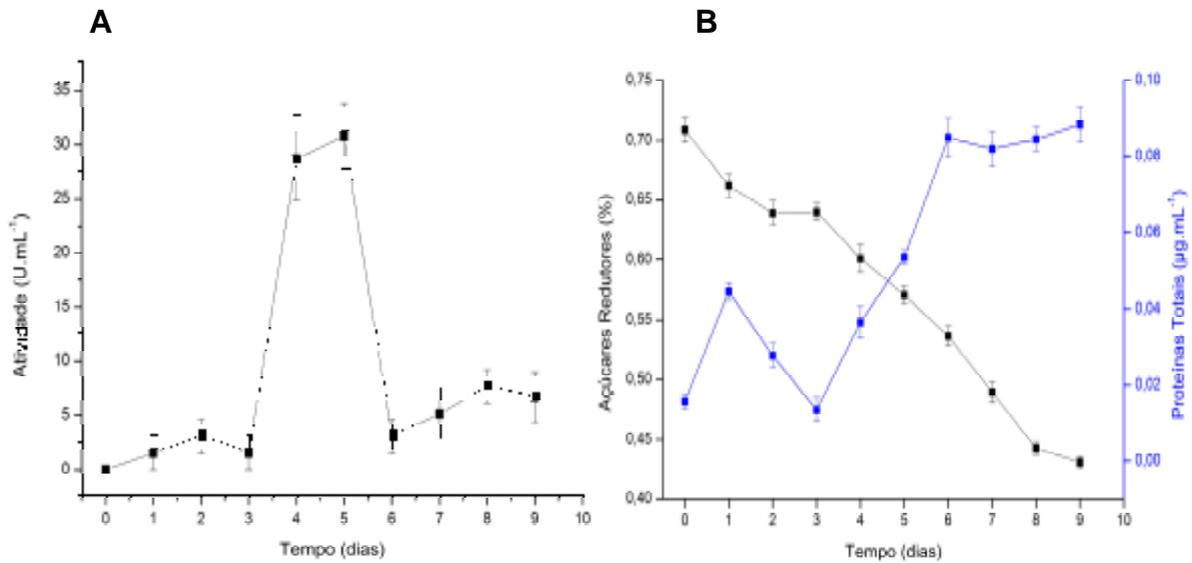
Neste trabalho, testou-se a capacidade de induzir a produção enzimática dos resíduos de acerola, açaí, bagaço de cana, cacau, coco, cupuaçu, milho e palha de guariroba. Além disso, meios de cultura contendo indutores sintéticos (xilidina e cobre) e meio sem nenhum tipo de indutor, foram cultivados. Os meios de cultivo foram observados durante 9 dias, sendo que a cada 24 horas realizaram-se análises de atividade enzimática, açúcares redutores e proteínas totais. Os resultados obtidos podem ser observados nas Figuras de 10 a 19.

Figura 10: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo com indutores xilidina e sulfato de cobre (**controle positivo**). **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



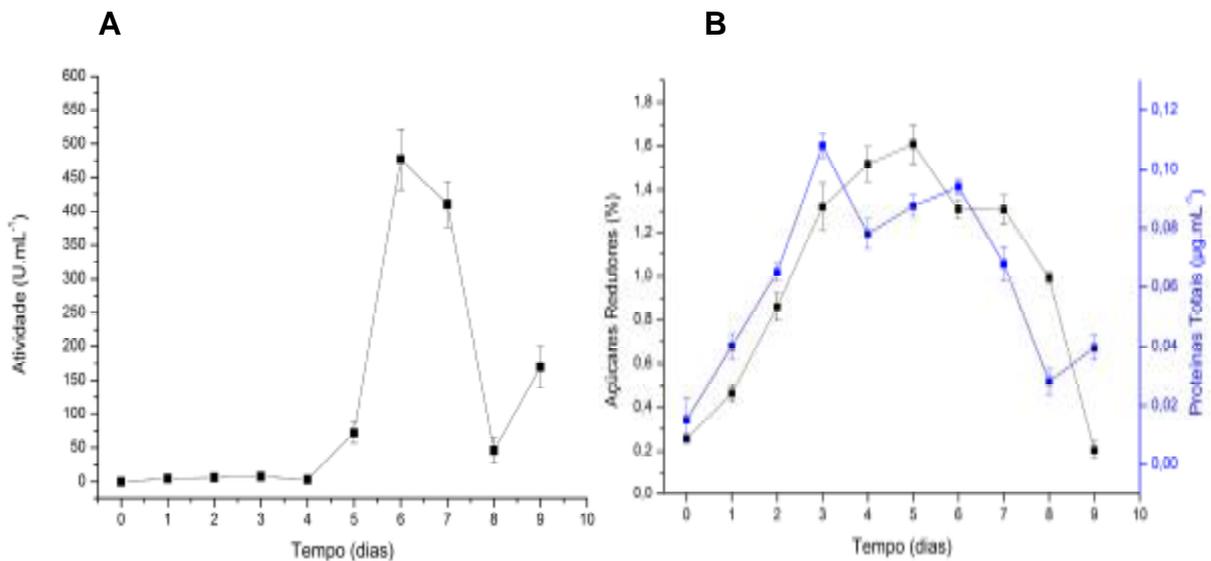
Fonte: Autora (2017)

Figura 11: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo sem adição de indutores ao meio (**controle negativo**). **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



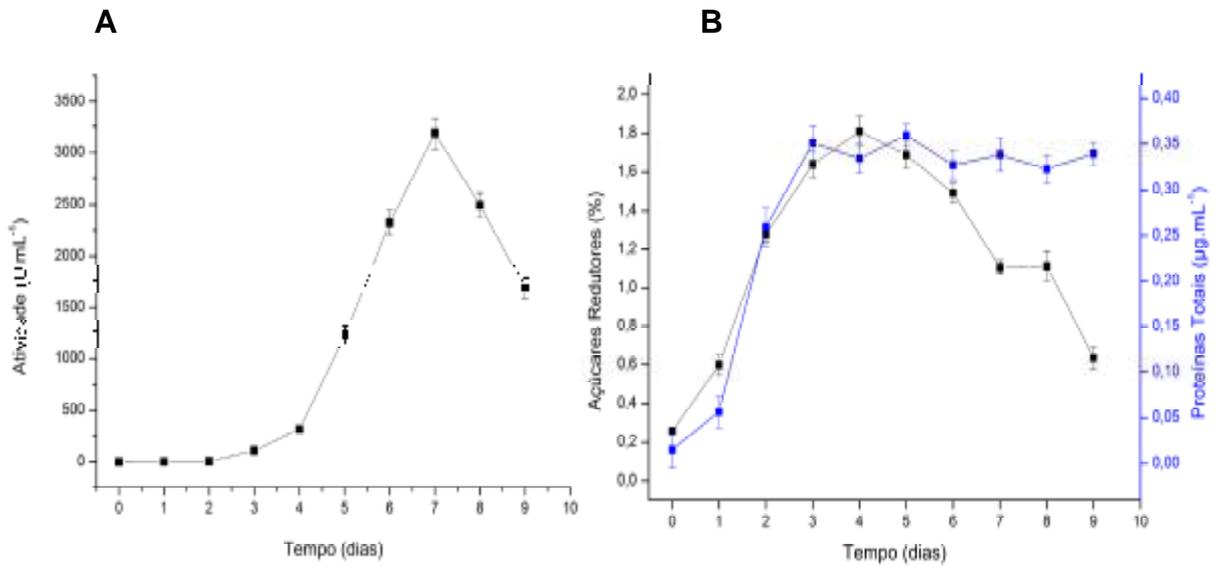
Fonte: Autora (2017)

Figura 12: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de acerola. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



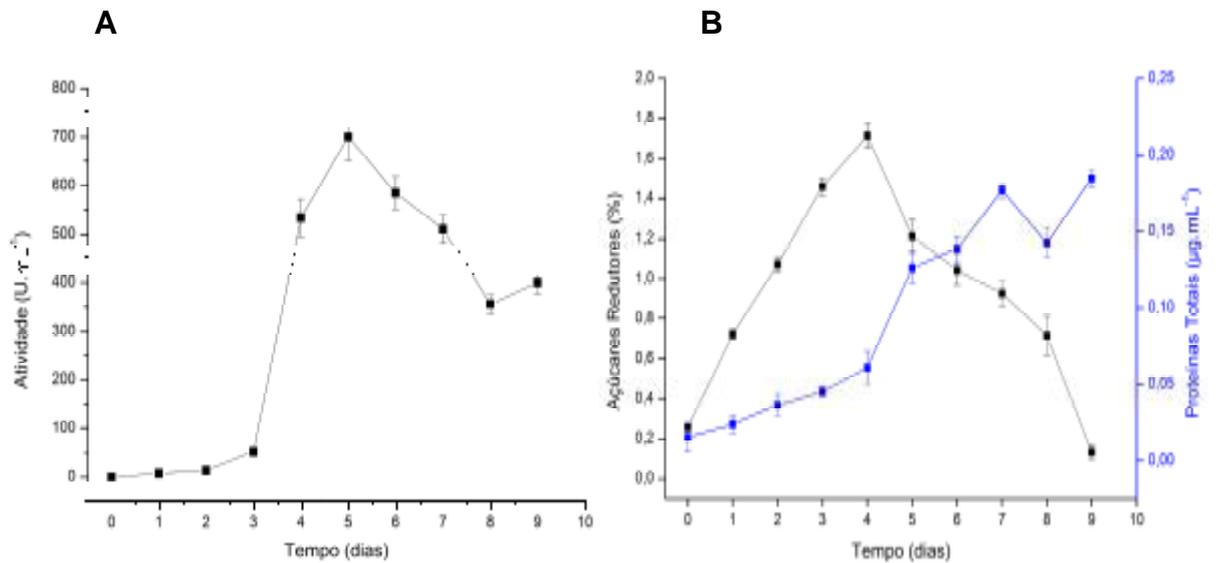
Fonte: Autora (2017)

Figura 13: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de **açaí**. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



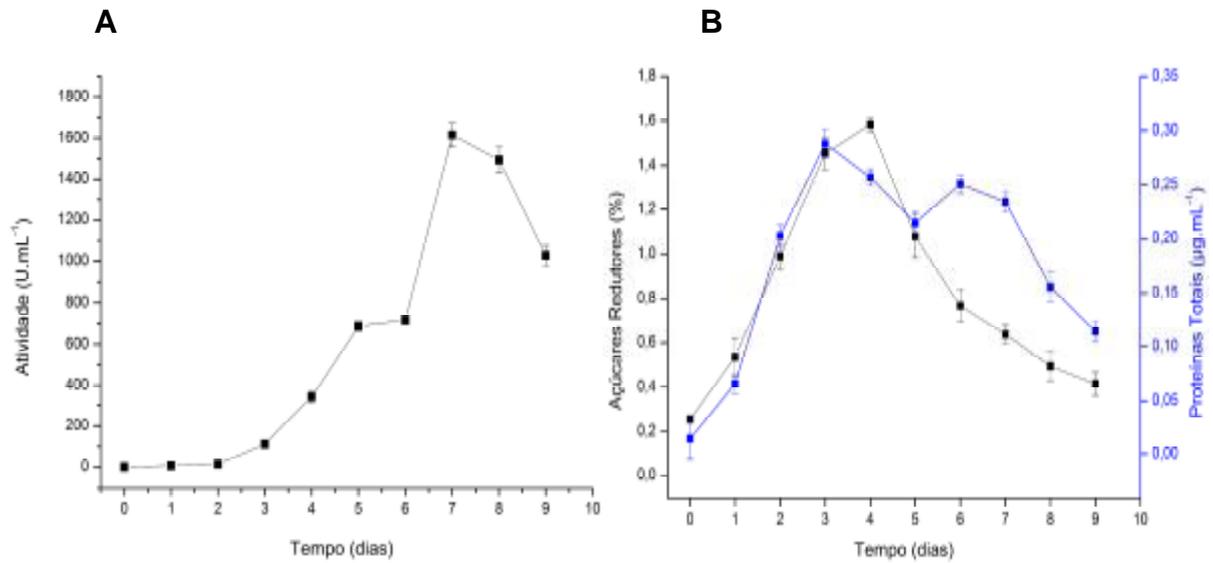
Fonte: Autora (2017)

Figura 14: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de **bagaço de cana**. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



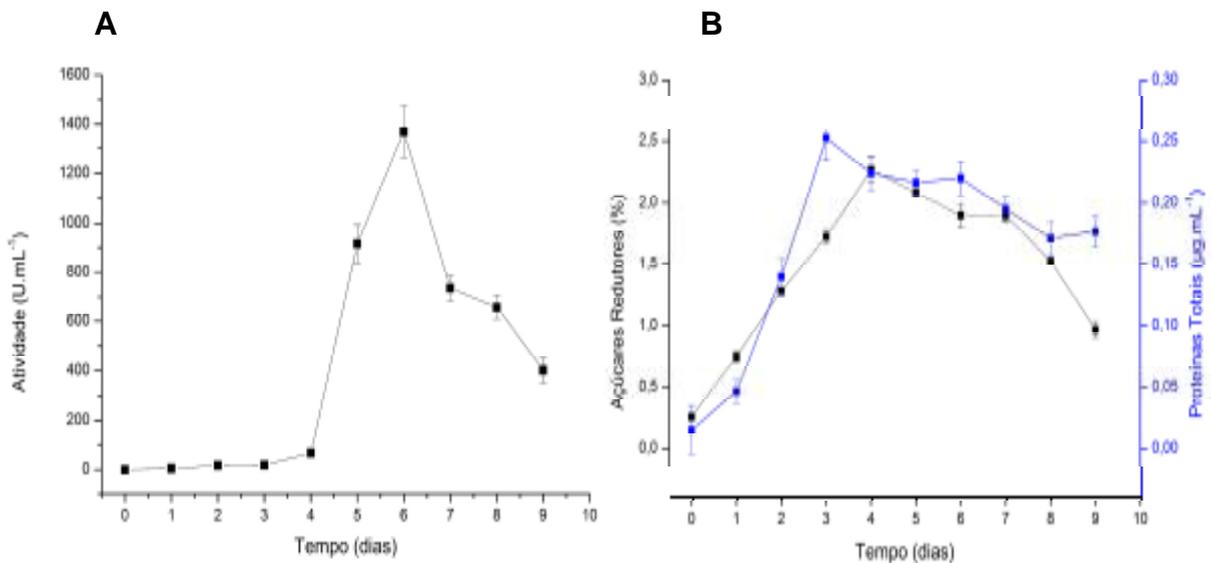
Fonte: Autora (2017)

Figura 15: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de **cacau**. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



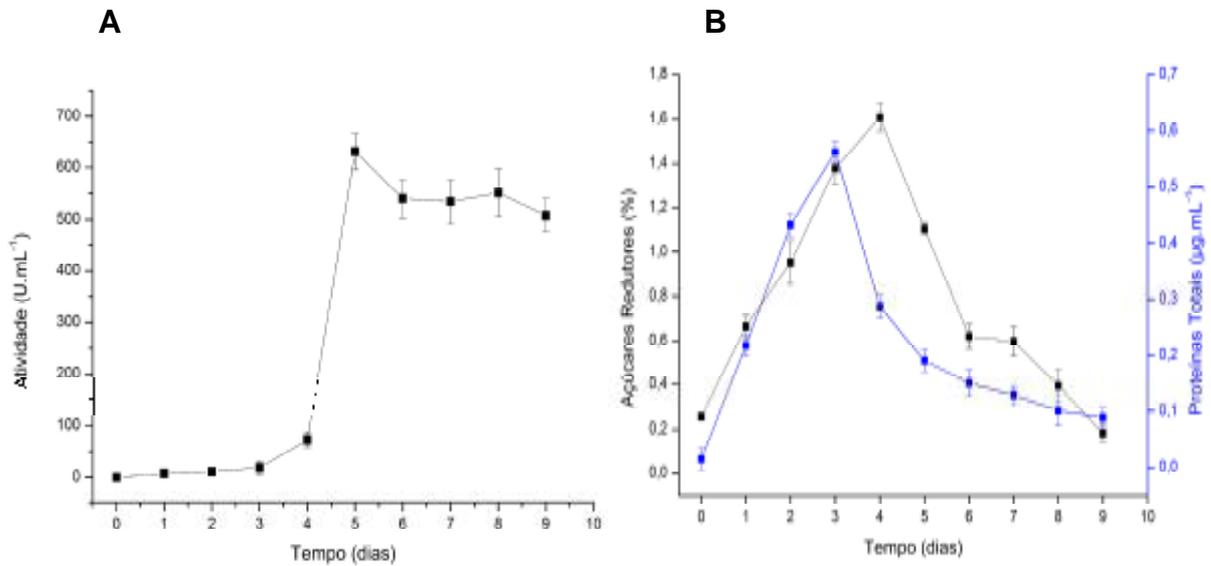
Fonte: Autora (2017)

Figura 16: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de **coco**. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



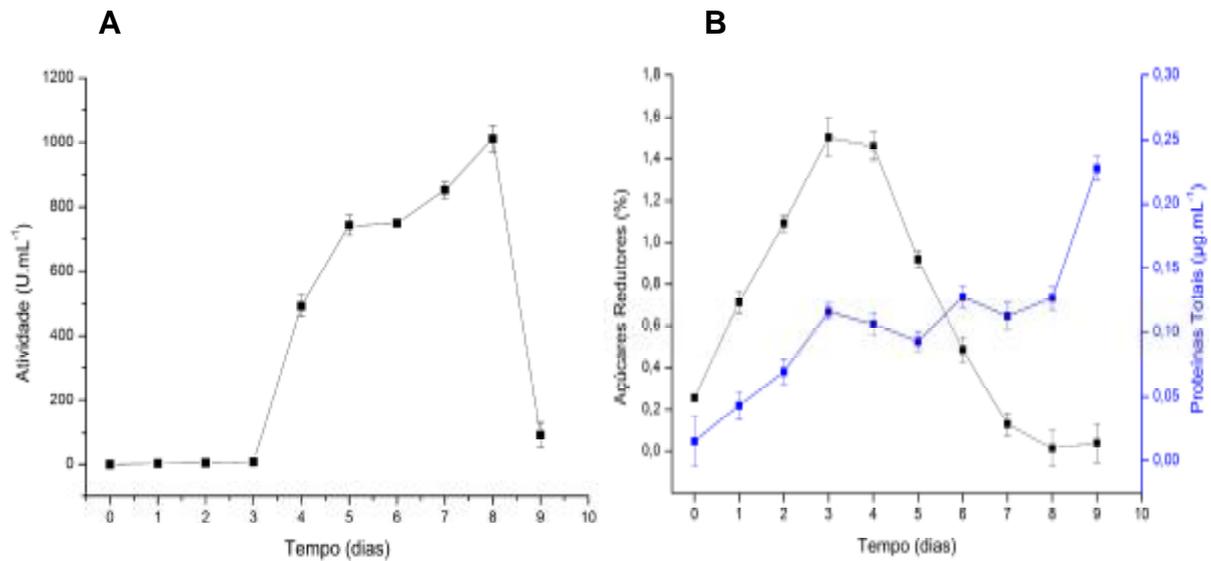
Fonte: Autora (2017)

Figura 17: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de **cupuaçu**. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



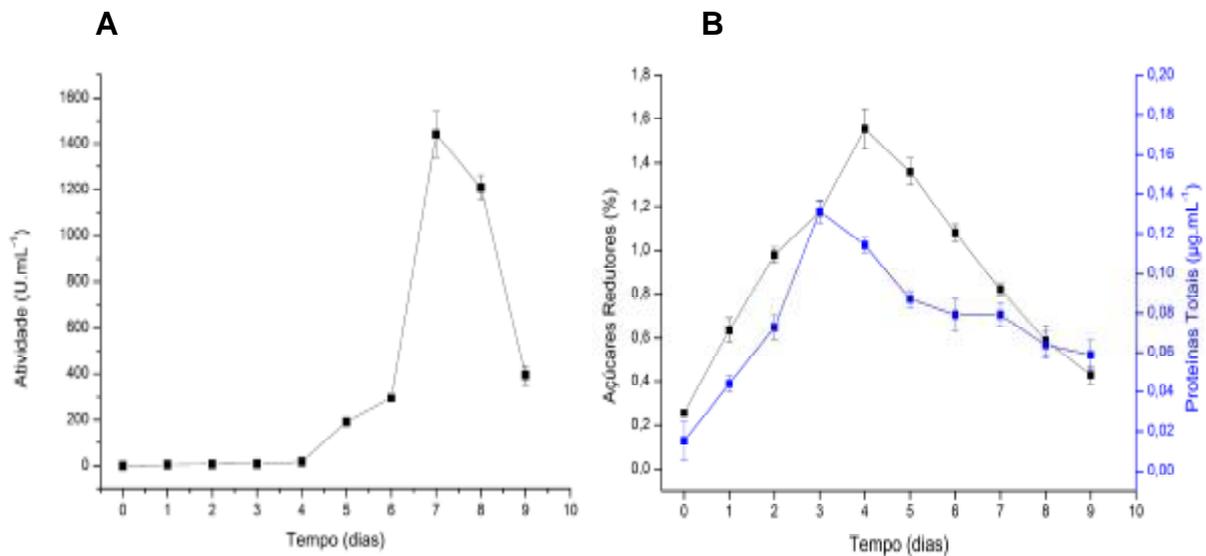
Fonte: Autora (2017)

Figura 18: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de **milho**. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



Fonte: Autora (2017)

Figura 19: A) Atividade enzimática durante 9 dias de cultivo do fungo induzido com resíduos de **palha de guariroba**. **B)** Açúcares redutores e proteínas totais presentes no caldo durante 9 dias de cultivo.



Fonte: Autora (2017)

A partir dos dados obtidos nas análises e como pode ser observado nos gráficos acima, todos os meios de cultura que continham resíduos vegetais apresentaram produção de lacase superior aos controles positivo (xilidina e cobre) e negativo (sem indutores). Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Marco (2014) e Golveia (2016), que também adicionaram 1% de diversos materiais vegetais aos meios de cultivos contendo *Aspergillus foetidus* e *Picnoporus sanguineus*, respectivamente, e obtiveram aumento na produção enzimática quando comparados com meios de cultivos contendo indutores sintéticos ou sem adição de indutores.

A utilização de material vegetal como indutor em cultivos de fungos de decomposição branca, tem proporcionado um aumento na produção enzimática quando comparados a cultivos sem nenhum tipo de indução ou com adição de indutores sintéticos como xilidina e sulfato de cobre (GOLVEIA, 2016). Estes fungos são conhecidos por degradarem moléculas de lignina através da produção de enzimas lignolíticas, como a lacase e um grupo de peroxidases. Dessa forma, o aumento da produção enzimática em meios contendo resíduos vegetais pode ser justificada pelo fato destes materiais serem ricos em fibras lignocelulósicas, induzindo o fungo a produzir enzimas para quebrarem as moléculas de lignina (ALEXANDRINO et al., 2007).

Couto et al. (2006) utilizaram resíduos lignocelulósicos de semente de uva para produção de lacase do fungo *T. hirsuta*, e observaram que no meio de cultura

contendo esse resíduo houve produção enzimática três vezes superior ao meio contendo outros tipos de indutores. Lorenzo et al. (2002) adicionaram semente e talos de uva e farelo de cevada às culturas submersas de *T. versicolor*, e obtiveram um aumento na produção enzimática de aproximadamente dez vezes em relação às culturas que não tinham resíduos. Morais et al. (2005) analisaram aumento na produção de enzimas do fungo *P. ostreatus* ao se adicionar resíduos agroindustriais de tomate, batata e pimenta aos meios de cultura.

O Brasil é um dos maiores países produtores agrícolas, o que o torna responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos que podem causar problemas ambientais (FONSECA-MALDONADO, 2014; MARCO, 2014). Assim, além de aumentar a produção de enzimas, a utilização desses resíduos, que ora seriam descartados, torna-se uma alternativa sustentável e promissora para agregar valor este tipo de materiais.

O pico de produção da lacase se deu entre o 5° e o 8° dia de cultivo, com valores de atividade enzimática entre 476,92 U.mL⁻¹ e 3184,62 U.mL⁻¹. Em diversos estudos utilizando cepas de *Pleurotus ostreatus* para produção de lacase, o pico de produção se deu nos mais variados dias, evidenciando que as condições de cultivo, do meio de cultura, do tipo de indutor e até a linhagem da cepa podem interferir na produção enzimática. Silva et al. (2012), por exemplo, obtiveram atividade enzimática de 22,5 U.mL⁻¹ no 12° dia de cultivo em meio extrato de levedura suplementado com casca de café. Já Zhu, Bao e Huang (2016), utilizaram caldo de batata dextrose acrescido de 1% de extrato de levedura, sendo o pico de produção no 5° dia de cultivo. A partir daí, os autores adicionaram 2 mmol.L de cobre ao meio e, no 10° dia, a atividade de lacase observada foi de 2575 U.mL⁻¹. Edae (2016), por sua vez, cultivou colônias de *Pleurotus ostreatus* obtidas em folhas de eucalipto em meio de cultura ágar batata dextrose, contendo palha de feijão, e obteve atividade de 0,1284 U.mL⁻¹ no 10° dia de cultivo.

O tipo e a concentração das fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultura também podem afetar a produção de lacase. Bollag e Leonowicz (1984), observaram que várias culturas de basidiomicetos que foram cultivados em meio líquido rico em açúcar diminuíram a capacidade de produção dessa enzima. Eggert et al. (1996), reportaram que o uso de concentrações excessivas de glicose como fonte de carbono em meios de cultura contendo cepas que produzem lacase, causou um efeito inibitório na produção desta enzima. Bettin et al. (2009) também mostraram que os maiores valores de produção de lacase foram obtidos em meios de cultura contendo baixas concentrações de fontes de carbono. Esses dados corroboram com

o que foi encontrado neste estudo, uma vez que a produção enzimática aumentou à medida que a concentração de açúcar no meio começou a diminuir, como pode ser observado nas Figuras 10 a 19.

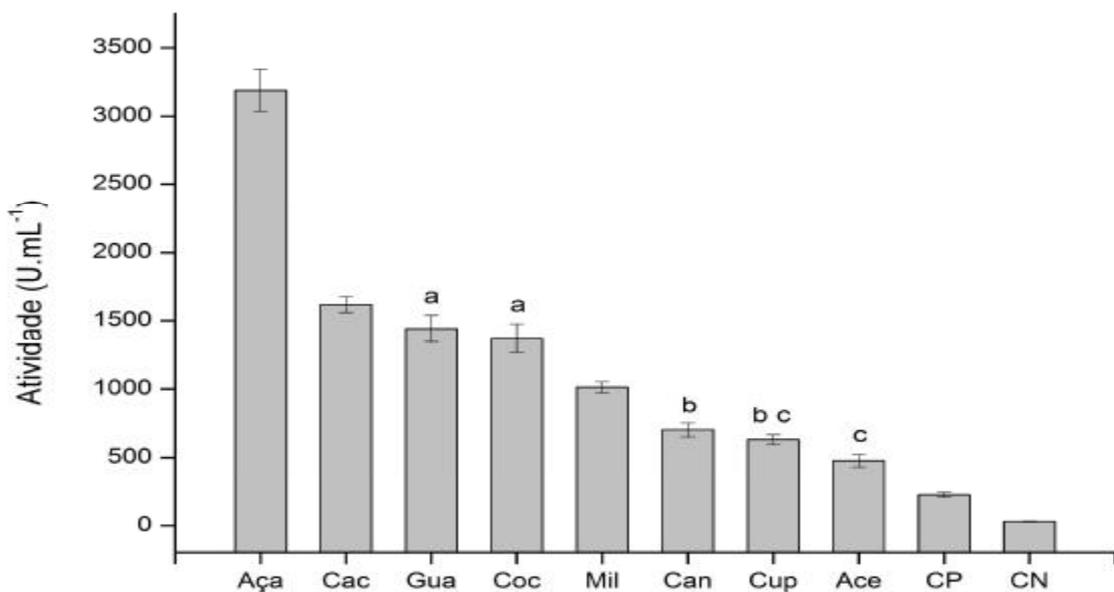
Os gráficos também evidenciam que a concentração de açúcar nos meios contendo resíduos, aumentou nos primeiros dias de cultivo para, depois, decrescer. Esse aumento em relação a concentração inicial pode ser explicado pelo fato de os resíduos conterem alguns tipos de açúcares redutores, que podem ter sido liberados no decorrer da produção enzimática, haja vista que nos meios de cultura controles (positivo e negativo) não foram observados aumentos nas concentrações de açúcares. Putrino (2016), avaliou a quantidade de açúcares redutores nas fibras do coco verde *in natura* após contato com enzimas e obteve uma concentração de 532,27 μ mol de glicose/g de fibra de coco. Santos et al. (2014) caracterizaram a biomassa de sabugo de milho *in natura* antes de qualquer tratamento e obtiveram 17,88% de açúcares redutores. Neves et al. (2015) encontraram valores de 1,72mg de glicose/100 g de polpa de açaí e Santos et al. (2008) encontraram valores entre 0,50 e 26,65mg de glicose/100g de polpa, em polpas comerciais do mesmo fruto.

Os meios de cultura utilizados neste trabalho não foram suplementados com nenhuma fonte de nitrogênio, razão pela qual verificam-se concentrações de proteínas próximas a zero no início do cultivo. Nota-se que um aumento na concentração de proteínas foi acompanhado de aumento na atividade enzimática, em todos os meios analisados. No entanto, o teor proteico encontrado também pode estar relacionado ao resíduo e não apenas à excreção da enzima, pois, estes resíduos apresentam teor de proteínas, como foi observado por Golveia (2016), que encontrou 0,7dag/kg de resíduo de palha de guariroba, 2,90dag/kg de resíduo de cupuaçu, 2,57dag/kg de resíduo de cacau e 0,69dag/kg de resíduo de açaí. Santos (2016), observou um teor de nitrogênio de 5,66% em bagaço de cana e Satiro (2012), encontrou um teor de 2,38g/kg de casca de coco verde.

O resíduo que apresentou maior capacidade de indução enzimática foi o de açaí, atingindo 3184,62 U.mL⁻¹ de atividade enzimática no 7° dia de cultivo, valor 14 vezes superior ao controle positivo (224,6154 U.mL⁻¹) e 103 vezes superior ao controle negativo (30,7692U.mL⁻¹). O resíduo de cacau foi o segundo melhor indutor, apresentando atividade de 1615,39 U.mL⁻¹ no 7° dia de cultivo, seguido pelo resíduo de guariroba com 1440 U.mL⁻¹ no 7° dia de cultivo, coco com 1369,23 U.mL⁻¹ no 6° dia de cultivo, milho com 1012,31 U.mL⁻¹ no 8° dia de cultivo, bagaço de cana com atividade de 700 U.mL⁻¹ no 5° dia de cultivo, cupuaçu com 630,77 U.mL⁻¹ no 5° dia de cultivo e acerola com 476,92 U.mL⁻¹ no 6° dia de cultivo. Os níveis de atividade

de lacase alcançados demonstram a capacidade de indução de alguns materiais vegetais, uma vez que o meio de cultura não foi enriquecido com nutrientes ou indutores sintéticos. A Figura 20 mostra os valores de atividade para todos os resíduos testados em comparação com os controles positivo e negativo.

Figura 20: Atividade enzimática no dia de pico de produção, para os extratos brutos induzidos com açaí (Aça), cacau (Cac), palha de guariroba (Gua), coco (Coc), milho (Mil), bagaço de cana (Can), cupuaçu (Cup), acerola (Ace), controle positivo (CP) e controle negativo (CN). As barras que apresentam as mesmas letras, não apresentam diferenças significativas na produção enzimática.



Fonte: Autora (2017)

Aplicando-se o teste estatístico ANOVA nos dados de atividade foi possível perceber que existe diferença significativa ($p < 0,05$) na produção enzimática dependendo do tipo de resíduo utilizado. Então, aplicou-se o teste Tukey ($p < 0,05$) para verificar quais os resíduos apresentavam diferença e quais eram iguais entre si. Assim, a análise estatística demonstrou que os resíduos de acerola e cupuaçu e cana e cupuaçu, são iguais entre si e diferentes dos demais, assim como coco e guariroba, que também não apresentaram diferença significativa na indução da enzima lacase, quando comparados no dia de pico de produção. Todos os outros resíduos apresentaram diferença entre as variâncias das atividades.

4.2 Determinação da temperatura e pH ótimos

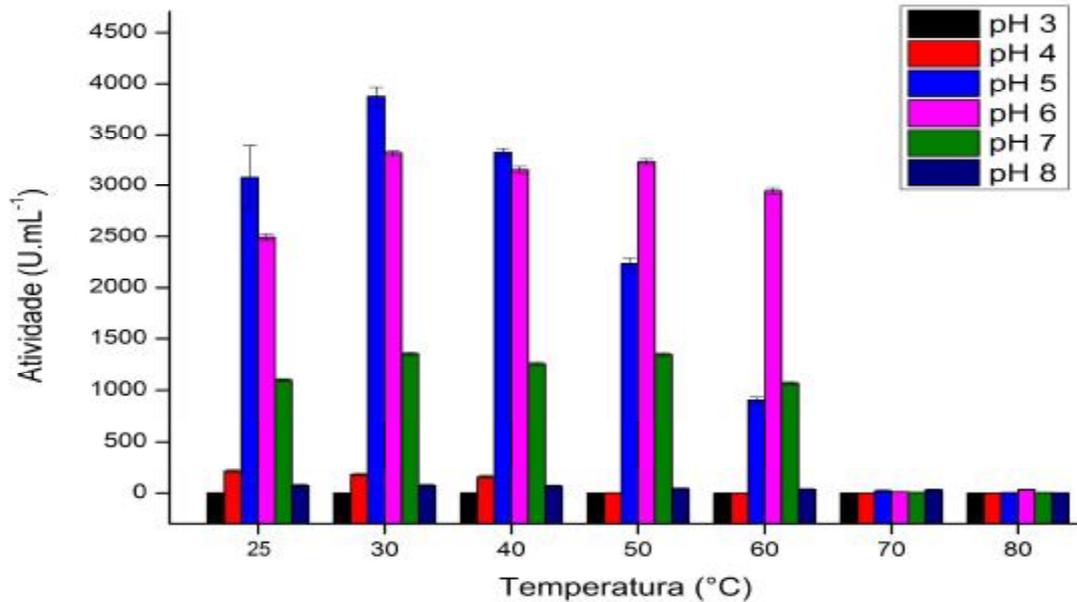
Após a análise de produção da enzima, o extrato enzimático bruto induzido com resíduo de açaí, devido aos valores de atividade enzimática obtidos, foi selecionado para prosseguir com os testes de caracterização da enzima.

A determinação da temperatura e pH ótimos de uma enzima são etapas indispensáveis na sua caracterização, pois, a atividade enzimática está diretamente relacionada com as condições do meio, principalmente do pH e da temperatura. Assim, para aplicações biotecnológicas, torna-se imprescindível o conhecimento das características bioquímicas da enzima. Segundo Faria (2010), enzimas que mantêm atividade em temperaturas elevadas e ampla faixa de pH são ideais para aplicação em processos industriais dos mais variados ramos.

Torres (2001) afirma que a temperatura pode influenciar na cinética enzimática através do aumento da taxa de reação, em decorrência do aumento de energia cinética das moléculas ou pode interferir nas interações que mantêm a estrutura terciária (pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas) podendo levar à desnaturação proteica. O mesmo autor relata que o pH também influencia na atividade das enzimas, pois aumentar ou diminuir a concentração de íons de hidrogênio em uma solução em torno da mesma pode alterar sua estrutura, causando modificações no sítio ativo da enzima. Valores de pH elevados ou baixos geralmente resultam em grande perda de atividade ou desnaturação para a maioria das enzimas (GOMES et al., 2007).

Para verificação do pH e temperatura ótimos para a enzima produzida pelo fungo *Pleurotus ostretus* induzida com resíduos de açaí, determinou-se a atividade enzimática do extrato bruto variando-se a temperatura entre 25 e 80°C e o pH entre 3 e 8. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 21.

Figura 21: Atividade enzimática para o extrato bruto induzido com resíduo de açaí, em seu sétimo dia de cultivo, variando-se pH e temperatura



Fonte: Autora (2017)

A análise do gráfico mostra que os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos à 30°C em pH 5 (3869,7 U.mL⁻¹) e, portanto, essas condições são ótimas para atuação da enzima. Também se observa que à medida que a temperatura vai aumentando, a atividade vai diminuindo significativamente, uma vez que, em pH 5, todas temperaturas apresentaram diferenças estatísticas com a temperatura de 30°, segundo teste Tukey ($p < 0,05$).

Apesar de o pH 6 apresentar pico de atividade (3315,86 U.mL⁻¹ a 30°C) menor e significativamente diferente do pH 5, nota-se que a enzima em pH 6 mantém sua atividade elevada em temperaturas maiores, como acontece em 50 e 60°C superando os valores encontrados em pH 5. Os pH's 3, 4 e 8 apresentaram baixa atividade em todas as temperaturas analisadas, ao mesmo tempo que as temperaturas 70 e 80°C diminuíram a ação da enzima em todos os pH's testados. Isso demonstra que pH's e temperaturas extremas ocasionam perda de atividade enzimática.

El-Batal et al. (2015), caracterizaram lacase do *Pleurotus ostreatus* produzida em meio extrato de malte com adição de farelo de trigo, e encontraram maior atividade enzimática a 40°C e pH 5, resultados próximos aos que foram encontrados nesta pesquisa. Os autores ainda verificaram que o pH 6 manteve 90% da atividade encontrada para o pH 5 e que, antes e além desses valores de pH, ocorreram diminuições significativas. Resultado semelhante foi encontrado por Hublik e Schinner (2000), em que as maiores taxas de oxidação para lacase deste mesmo

fungo foram a 50°C e pH 5,8. Santos et al. (2015) encontraram valores otimizados de atividade em pH 5,5 à temperatura de 55°C, para lacase induzida com casca de arroz.

Freixo, Karmali e Arteiro (2012) testaram substratos diferentes para determinação de atividade da lacase do *Pleurotus ostreatus*, e obtiveram valores de pH e temperatura ótimos na faixa de 4,5 e 45°C, respectivamente. A lacase deste fungo caracterizada por Tlecuitl-Beristain (2008) mostrou atividade ideal também a pH 4,5 e temperatura entre 45 e 55°C. Ao mesmo tempo que Palmiere et al (1997) encontraram pH ótimo de 6,5 e temperatura variando entre 25 e 35°C. Tinoco et al. (2001) descobriram que várias estirpes de *P. ostreatus* apresentam maior atividade de lacase entre 30 e 40°C com pH em torno de 5, semelhante aos valores encontrados neste trabalho.

Segundo Giardina et al. (1999) as lacases são segregadas em muitas isoformas, dependendo das espécies do fungo, estágios de desenvolvimento e condições de cultivo. Corroborando com essa afirmação, Baldrian (2006) relatou que lacases de fungos de podridão branca apresentam uma gama de pesos moleculares, evidenciando a existência de diversas isoformas dessa enzima. Isso explica o fato de enzimas produzidas pela mesma espécie de fungo, apresentarem características diferentes, tais como o pH e temperatura ótimos. Autores com uma vasta pesquisa sobre isoformas de lacase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* descrevem uma faixa de pH ótimo variando entre 4,5 a 6,5, e temperatura entre 25 a 60°C (BALDRIAN, 2006; GIARDINA et al., 1999; PALMIERE et al., 1993, 1997, 2003; SANNIA et al., 1986). Os valores obtidos neste trabalho estão dentro dos parâmetros encontrados para isoformas de lacase desse fungo.

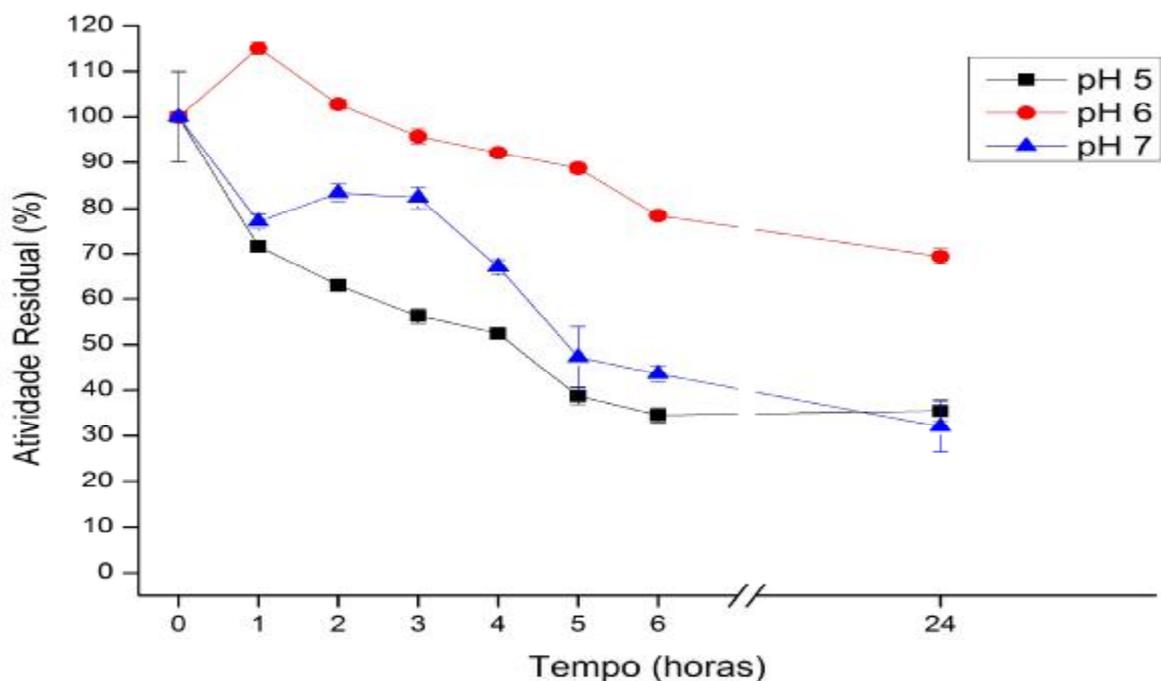
4.3 Estabilidade da enzima em diferentes pH's e temperaturas

A partir dos resultados obtidos ao se analisar pH e temperatura ótimos, verificou-se que a isoforma de lacase produzida pelo *Pleurotus ostreatus* induzido com resíduos de açaí, apresentou boa atividade nos pH's 5, 6 e 7 e nas temperaturas entre 25 e 60°C. Dessa forma, testou-se a estabilidade da enzima em cada um destes pH's e temperatura durante 24 horas. As Figuras entre 22 e 26 mostram a atividade residual para a enzima em cada uma das situações supracitadas.

A análise da Figura 22, mostra que a enzima se manteve mais estável a 25°C quando o tampão utilizado tinha pH 6 e, após 24h, ainda manteve 69% da atividade

inicial enquanto o pH 5 manteve 35% e o pH 7 31%. Apesar da enzima em pH 5 apresentar a maior atividade enzimática absoluta no tempo zero, este pH não foi capaz de manter a atividade no decorrer do tempo, fazendo com que a enzima perdesse 30% de sua capacidade de oxidar o substrato já na primeira hora da análise. A enzima em pH 7 apresentava a menor atividade enzimática absoluta entre os 3 pH's testados e, similarmente ao pH 5, já havia perdido quase 30% de sua capacidade na primeira hora

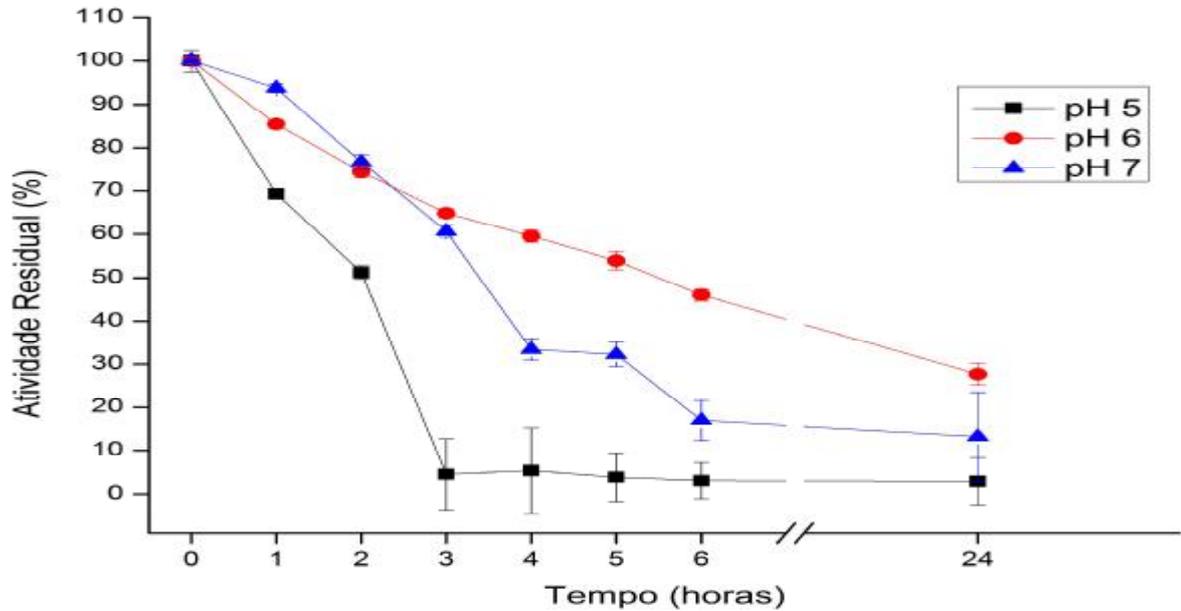
Figura 22: Atividade residual do extrato bruto à 25°C e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação.



Fonte: Autora (2017)

Ao verificar a estabilidade da enzima à 30°C (Figura 23) observa-se que em pH 5 houve perda de atividade mais rápida e acentuada do que à 25°C, pois na terceira hora a atividade residual era de apenas 4%. Apesar disso, neste pH e temperatura foi onde se encontrou os maiores valores de atividade enzimática absoluta no tempo zero. Em pH 6 a atividade residual após 24h era de 27%, enquanto que em pH 7 era de 10%. Vale ressaltar que os valores de atividade absoluta em pH 6 superaram os valores em pH 5 após decorrer a primeira hora do experimento.

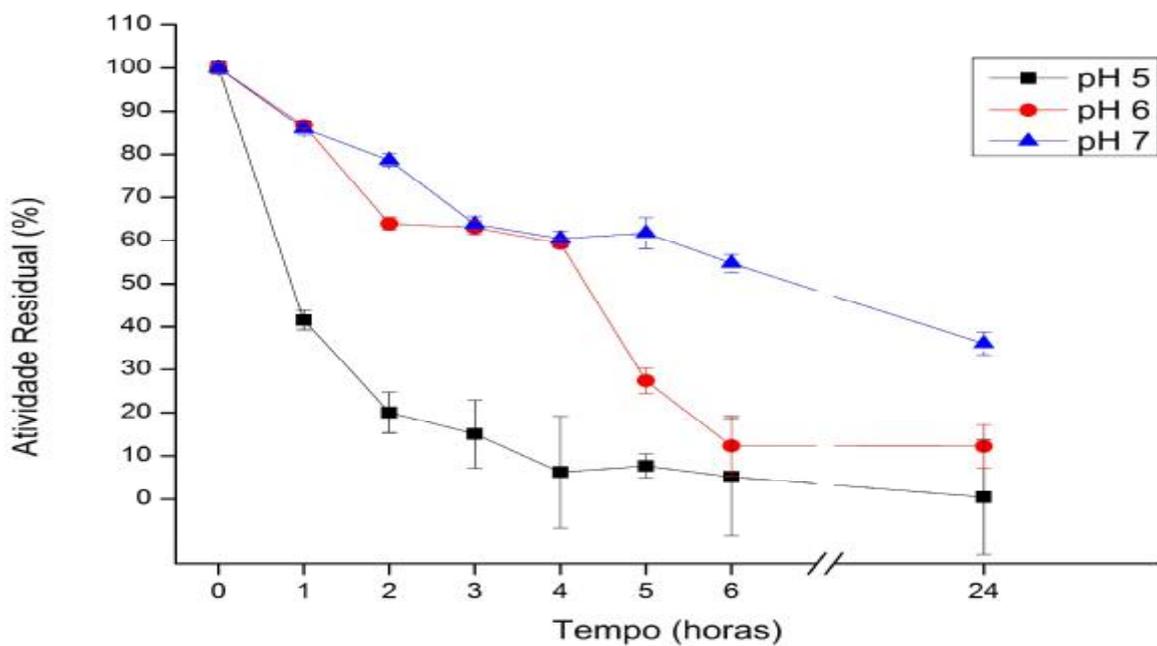
Figura 23: Atividade residual do extrato bruto a 30° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação.



Fonte: Autora (2017)

O gráfico da Figura 24, evidencia que o pH 7 foi o que manteve maior atividade residual, 36% após 25 e 30°C. O pH 6 manteve a enzima mais estável que o pH 5 durante as 6 primeiras horas e, além disso, os valores de atividade absoluta foram maiores para este pH a partir da primeira hora.

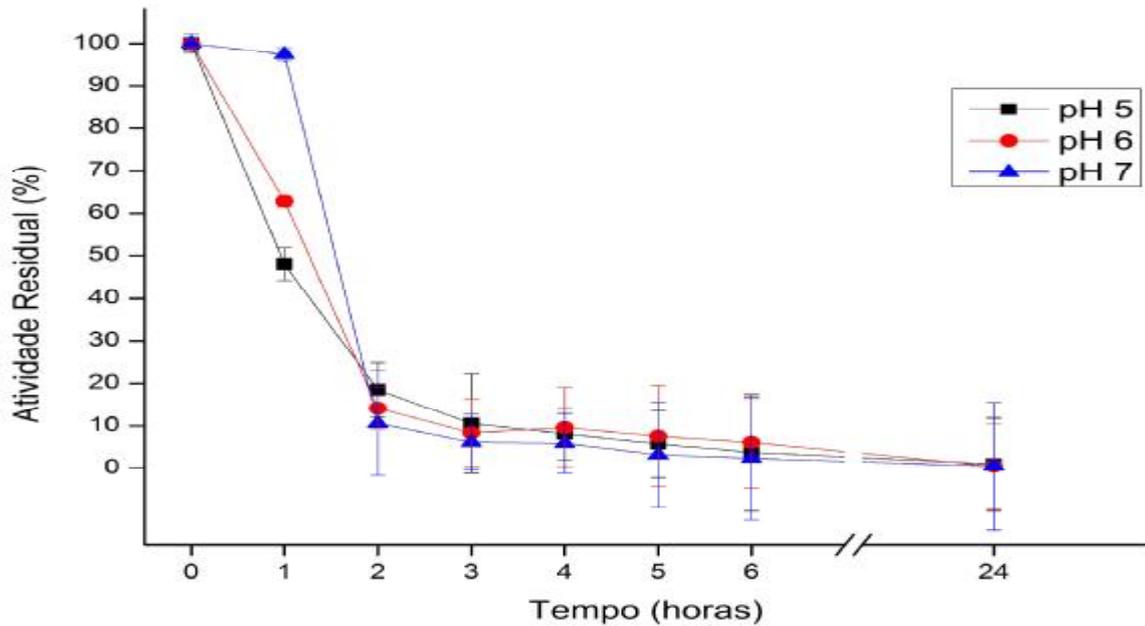
Figura 24: Atividade residual do extrato bruto a 40° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação.



Fonte: Autora (2017)

À 50°C (Figura 25) pH 7 manteve atividade residual de 97% na primeira hora, enquanto que em pH 6 manteve 62% e em pH 5 41%. A partir da segunda hora a atividade nos 3 pH's ficou entre 10 e 20%, sendo que em 24h a atividade residual era praticamente zero.

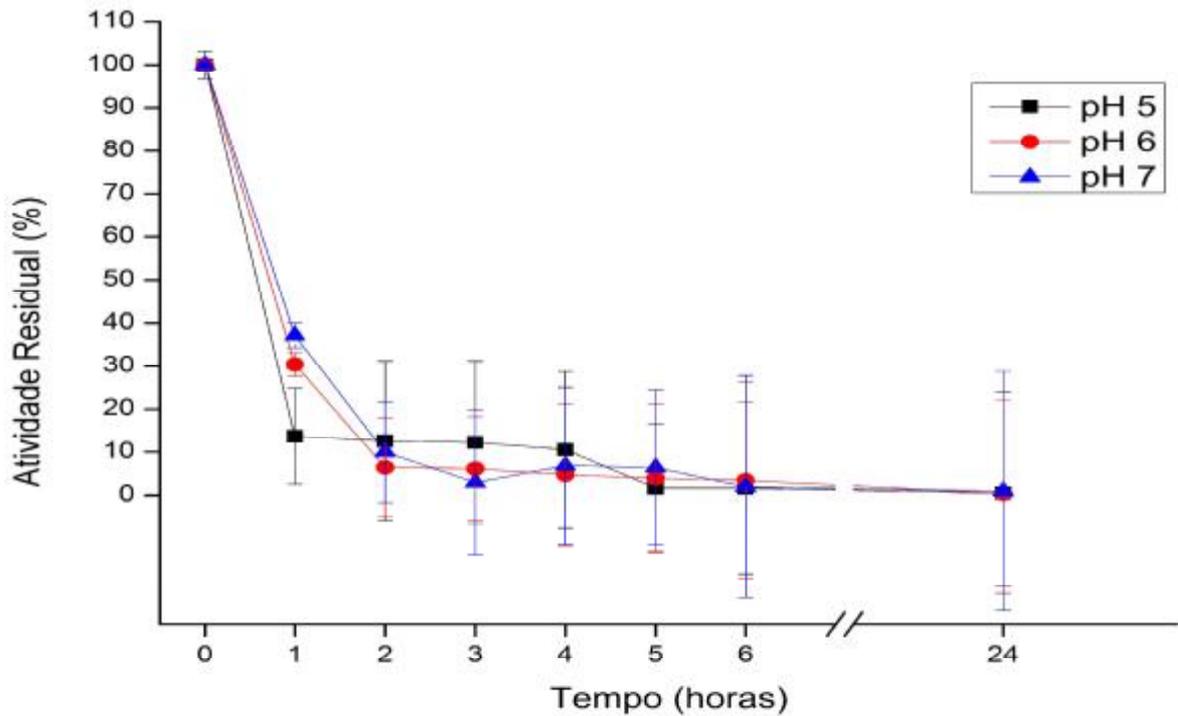
Figura 25: Atividade residual do extrato bruto a 50° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação.



Fonte: Autora (2017)

Na Figura 26 nota-se que os resultados obtidos a 60°C foram semelhantes aos encontrados para a temperatura de 50°C, uma vez que já na primeira hora, a atividade residual estava abaixo de 40% para todos os pH's e, em 24h, bem próxima de zero.

Figura 26: Atividade residual do extrato bruto a 60° e nos pH's 5, 6 e 7, durante 24 horas de incubação.



Fonte: Autora (2017)

Ao se analisar os gráficos e os dados (apêndice A) de atividade residual das temperaturas nos 3 pH's, nota-se que, a temperatura na qual os extratos brutos conseguiram manter maior atividade residual foi a 25°C. Ainda é possível observar que, em pH 5, a enzima obteve melhores resultados de atividade absoluta quando o tempo de contato do extrato bruto com o tampão era mínimo (tempo zero). O pH 6 foi capaz de manter a atividade da enzima acima de 50% após 24h à 25°C e os valores de atividade absoluta a partir da primeira hora foram superiores aos encontrados para o pH 5. O pH 7 foi capaz de manter atividade residual maior do que o pH 5, porém, com valores de atividade absoluta inferior.

Palmieri et al. (1997) encontraram uma isoforma de lacase desse fungo denominada de POXA2, na qual a temperatura de atuação está entre 25 e 35°C. A estabilidade desta enzima foi investigada a 60°C e pH 7, e os autores determinaram meia vida de atividade enzimática em apenas 10 minutos, resultados bastante semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde, nas mesmas condições, após 1h, a atividade residual estava em torno de 40%. Similarmente, lacase produzida pela subespécie *Pleurotus sajor-caju*, também apresentou características próximas às encontradas para o *Pleurotus ostreatus*, em que a maior estabilidade se deu à temperatura aproximada de 20°C e em pH 5 (RASERA, 2006). Já a lacase purificada

de *P. ostreatus* encontrada por El-Batal et al. (2015) exibiu maior estabilidade a 40°C e pH 5, sendo que a 60°C a atividade diminuiu acentuadamente.

O fato de algumas enzimas, entre elas a do *P. ostreatus*, não manterem sua atividade em temperaturas mais elevadas, pode ser explicada devido a necessidade de que a estrutura terciária seja mantida, principalmente, por várias ligações não covalentes (pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas). A estrutura de uma proteína é alterada quando sua molécula absorve muita energia, fazendo com que a conformação terciária se rompa e inicie o processo de desnaturação da enzima (GOMES et al., 2006). Contudo, algumas lacases produzidas por outras espécies de fungos, conseguem manter a atividade em temperaturas mais elevadas, como por exemplo do *Picnoporus sanguineus* que apresentou estabilidade a 50°C e pH 5, e *Trametes versicolor* com estabilidade a 50°C e pH 4,5 por mais de 200h (GOLVEIA, 2016; RANCAÑO et al., 2003). Ramirez-Cavazos et al. (2014) sugerem que esta termoestabilidade pode ser devida a configuração 3D de algumas dessas proteínas ou que algumas impurezas presentes no sobrenadante possam proteger os sítios ativos, já que estas enzimas não foram purificadas.

4.4 Atividade utilizando diferentes substratos

Foi avaliada a capacidade da lacase, produzida pelo *P. ostreatus* e induzida com resíduos de açaí, de oxidar os substratos siringaldazina, ABTS, guaiacol e catecol. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e em pH 5, os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Atividade enzimática do extrato bruto frente a diferentes substratos

Análise	ABTS	Catecol	Guaiacol	Siringaldazina
1	946,15	0	26,15	3184,51
2	1089,23	0	15,38	2738,46
3	1195,38	0	20,00	3323,07
Média	1076,92	0	20,51	3082,01
Desvio-Padrão	125,07	0	5,40	305,49

Fonte: Autora (2017)

O substrato que sofreu oxidação em maior extensão foi a siringaldazina, seguida de ABTS, guaiacol e catecol. A avaliação da atividade enzimática frente a diferentes substratos é pertinente, uma vez que, as lacases fúngicas são conhecidas

por sua capacidade de atuar em uma gama de substratos, indo de encontro às características de outras enzimas que possuem grande especificidade a um certo tipo de substrato (THURSTON, 1994). Neste sentido, a lacase produzida neste trabalho foi capaz de oxidar três dos quatro substratos testados, uma vez que para o catecol não foi detectado atividade.

Um fator importante que pode influenciar diretamente no aumento ou diminuição da capacidade da enzima em oxidar um certo tipo de substrato é o pH, isso porque a diferença de potencial redox entre o substrato de redução e o cobre tipo 1 da lacase influencia na taxa de transferência de elétrons e, além disso, a concentração de ânion hidróxido que se liga com os cobres tipo 2 e 3 pode inibir a atividade da lacase, sendo assim, certas faixas de pH podem favorecer a atuação da enzima frente a um substrato específico (XU, 1997). Isso explica o fato de alguns autores encontrarem valores menores ou maiores para os mesmos substratos e para enzimas do mesmo fungo.

Giardina et al. (1999) purificaram uma isoforma de lacase produzida pelo *P. ostreatus* e testaram sua capacidade de oxidação dos substratos ABTS, siringaldazina e DMP (Dimetoxifenol). Os autores encontraram que esta isoforma possuía maior especificidade ao ABTS em pH 3, seguido da siringaldazina em pH 6 e, depois, DMP em pH 4 e 5. A enzima, desta mesma espécie de fungo, purificada por Okamoto et al. (2000), foi capaz de oxidar substratos típicos de lacase, sendo que, em pH 6,5, a siringaldazina apresentou maior oxidação, seguida de ABTS e guaiacol. Pozdnyakova et al. (2004) encontraram maior especificidade da lacase para o substrato siringaldazina em pH 7, seguida de ABTS em pH 4,5, DMP em pH 5,5 e catecol em pH 6,5. Os resultados encontrados neste trabalho ficaram próximos aos encontrados por autores citados, uma vez que siringaldazina e ABTS também foram os substratos que melhor sofreram oxidação nas pesquisas analisadas. No entanto, cabe destacar que a oxidação de um substrato específico é diretamente influenciada pela variação do pH e a isoforma da lacase produzida pelo fungo, ou seja, é possível que a alteração dessas duas variáveis impacte de formas diferentes nos resultados.

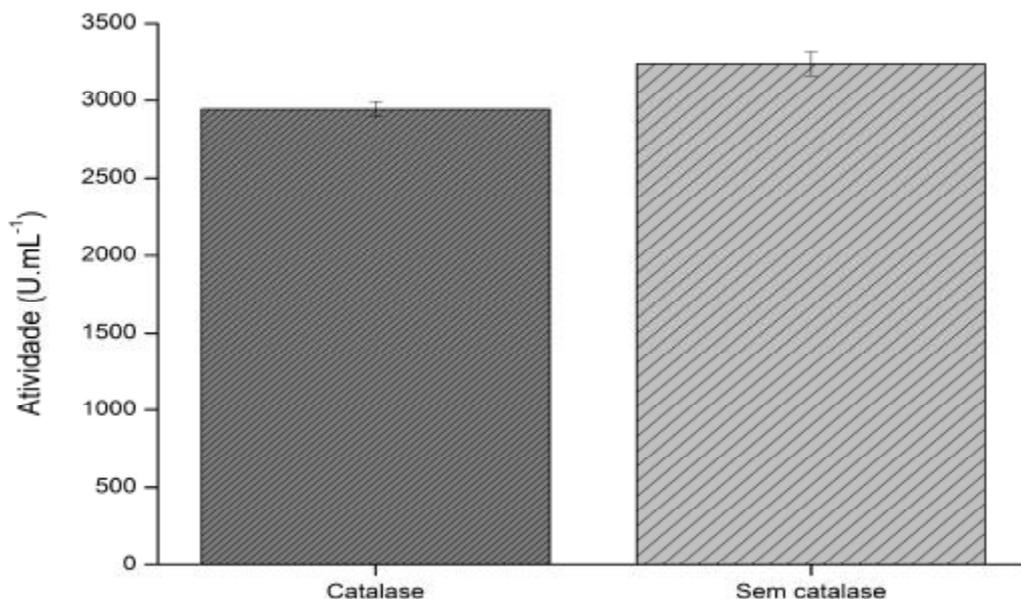
4.5 Ensaio com catalase

As fenoloxidasas (lacase) e peroxidases (lignina e manganês) são classes de enzimas lignolíticas mais frequentemente produzidas por diversos tipos de cepas de fungos (THURSTON, 1994; LEONOWICZ et al., 2001). O mecanismo de ação

catalítica da lacase se dá através da oxidação do substrato ao mesmo tempo em que há redução de oxigênio molecular a água (RIVA, 2006). Já o mecanismo de atuação das peroxidases envolve uma etapa de oxidação de Fe (III) a Fe (IV), através da formação de um composto intermediário, pela ação de H_2O_2 , que é um acceptor natural de elétrons e age como substrato da reação, de modo que, a ausência de peróxido de hidrogênio no meio impossibilita a atuação das enzimas peroxidases (WONG, 2009).

A catalase é uma peroxidase que é encontrada na maioria dos organismos vivos e, assim como as outras enzimas da sua classe, seu mecanismo de atuação envolve a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 (JIA et al., 2017). Dessa forma, com o intuito de eliminar qualquer interferência de peroxidases lignolíticas, incubou-se o extrato bruto com catalase por 30 minutos, de modo a promover a retirada de H_2O_2 do meio reacional. Assim, toda a atividade detectada no extrato após a incubação, seria devida a oxidação do substrato siringaldazina pela enzima lacase. Os resultados de atividade na presença e na ausência de catalase podem ser observados na Figura 27.

Figura 27: Atividade do extrato bruto induzido com açaí na presença e na ausência de catalase



Fonte: Autora (2017)

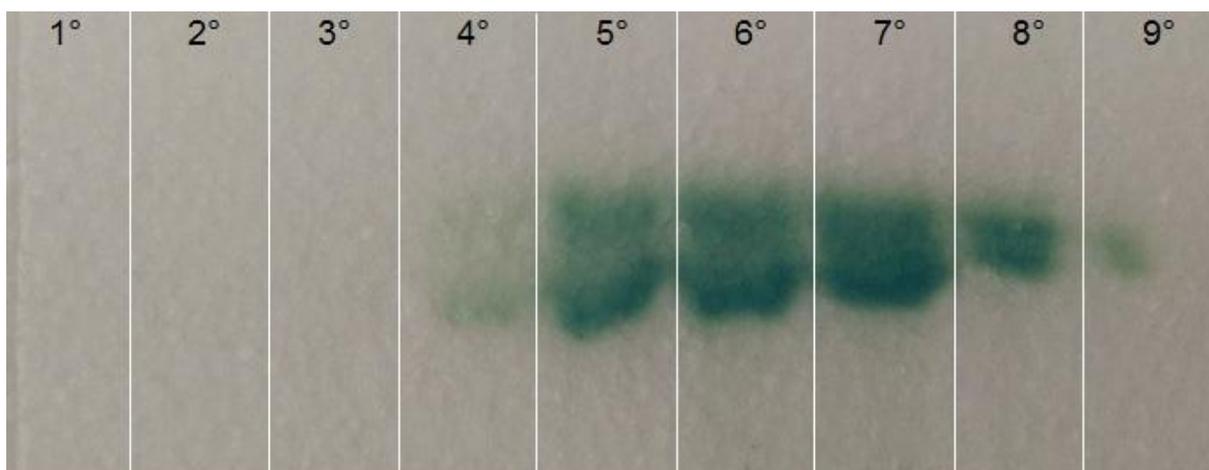
A análise do gráfico mostra que a atividade detectada no extrato bruto com adição de catalase foi menor do que a atividade detectada no extrato bruto sem catalase e, segundo o teste Tukey ($p < 0,01$), essa diferença é significativa. Assim, pode-se influir que além de lacase, o fungo *P. ostreatus* produziu outras enzimas

lignolíticas, uma vez que ao retirar o peróxido de hidrogênio do meio, a atividade enzimática reduziu em torno de 10%. Embora existam peroxidases no caldo e a redução tenha sido significativa, a quantidade de lacase é majoritária e os valores encontrados para atividade enzimática absoluta do extrato bruto viabiliza a utilização desta enzima sem a necessidade do processo oneroso de purificação.

4.6 Eletroforese

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada para que as bandas de atividade de lacase *in situ* fossem visualizadas. Na Figura 28 é possível observar a cinética de produção enzimática através da intensidade das bandas formadas em cada um dos dias de produção de lacase.

Figura 28: Gel de eletroforese em condições não-desnaturantes do extrato enzimático bruto, do 1° ao 9° de cultivo, induzido com resíduo de açáí.

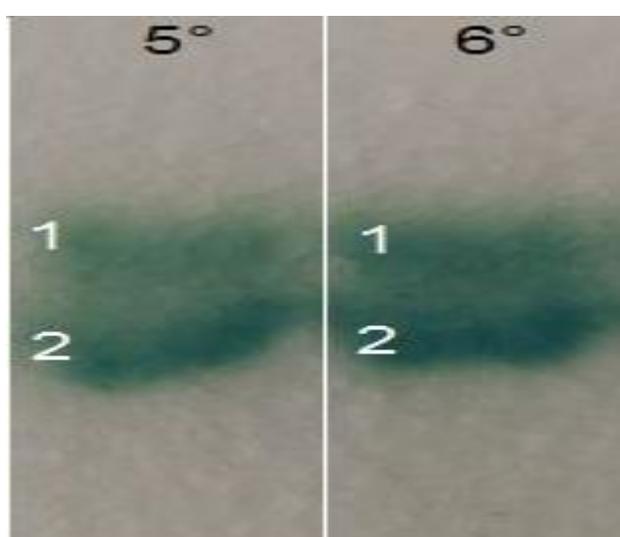


Fonte: Autora (2017)

A coloração adquirida pelas bandas de atividade da enzima é devido a oxidação do substrato utilizado para revelação do gel, o ABTS. Nota-se que nos poços referentes ao 1°, 2° e 3° dia de cultivo não houve formação de bandas de atividade, isso porque, no início do cultivo, a produção enzimática foi baixa. No 4° dia aparece uma banda de baixa intensidade e no 5° dia ela começa a se intensificar, indicativo de que a produção começa a aumentar. No 6° e, principalmente, no 7° dia de cultivo a banda assume uma coloração forte, corroborando com o resultado de pico de produção enzimática mostrado no gráfico apresentado na Figura 13. No 8° dia a banda ainda é intensa, porém menos que no 7° dia e, no 9° dia, a coloração se enfraquece indicando diminuição na concentração de lacase no meio de cultivo.

Nos poços do 5° e 6° dia é possível observar (Figura 29) uma leve separação nas bandas de atividade, essa separação pode ser devido a formação de uma banda secundária, indicativo da existência de isoformas de lacase. Como já citado anteriormente, o fungo *P. ostreatus* produz variações da enzima lacase, que diferem quanto a pH ótimo, temperatura ótima, especificidade por um certo tipo de substrato e massa molecular. Isoformas que possuem maior massa molecular ficam retidas mais facilmente no gel de poliacrilamida e as com menor massa molecular descem com mais facilidade pelo gel. Assim, quando há mais de uma isoforma da enzima na amostra, tende a surgir mais de uma banda de atividade. Entretanto, vale ressaltar que a enzima submetida à eletroforese não estava purificada e que a formação destas bandas também pode ser devido a interferências de outras enzimas, como por exemplo, alguma peroxidase. Dessa forma, estudos complementares mais específicos devem ser realizados para confirmação deste dado.

Figura 29: Gel de eletroforese em condições não-desnaturantes do extrato enzimático bruto no 5° e 6° dia de cultivo. Os números 1 e 2 indicam possível formação de bandas



Fonte: Autora (2017)

4.7 Rendimento e estabilidade do extrato bruto induzido com resíduo de açaí no processo de secagem em *spray dryer*

A secagem pode simplesmente ser definida como a perda de solvente, que geralmente é água. No caso de secagem por pulverização, *spray drying*, as gotículas se transformam em pós sob controle de parâmetros de secagem, entre eles temperatura do ar de entrada, volume de injeção, concentração de sólidos totais e outros. As enzimas são frágeis moléculas e podem ser facilmente desnaturadas

devido à exposição a altas temperaturas de secagem. Assim, para que estes compostos mantenham sua estrutura nativa, é preciso controlar estes parâmetros, que variam conforme as características das enzimas, e proteger suas moléculas através da adição de adjuvantes (NAMALDI; ÇALIC; ULUDAG, 2006).

4.7.1 Rendimento

No processo de secagem, a análise de sólidos totais presentes nas amostras é uma variável de suma importância. Uma vez que a quantidade de adjuvantes de secagem a ser adicionada nas amostras, vai depender do teor de sólidos totais já presentes no material e, conseqüentemente, a quantidade de pó a ser gerada após a secagem, também depende da quantidade de sólidos que estão presentes nas formulações.

Assim, os sólidos totais contidos no extrato enzimático bruto foram determinados, em triplicata, e o teor médio presente na amostra foi de 2,06%. As amostras para secagem foram de 50g, sendo que, 10% (5g) da massa total da formulação era referente a sólidos presente no extrato bruto mais adjuvantes. Uma amostra contendo apenas o extrato bruto também passou pelo processo de secagem, para que pudesse ser estabelecido um comparativo sem e com a adição de adjuvantes.

Os resultados em termos de rendimento podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7: Rendimento percentual do processo de secagem do extrato bruto sem adição de adjuvantes e com os adjuvantes Aerosil®, Maltodextrina e Goma Arábica, calculado para cada uma das secagens, com respectiva média e desvio-padrão.

Secagem	Sem adjuvante	Aerosil®	Maltodextrina	Goma Arábica
1	14,22%	76,02%	96,14%	65,09%
2	-	89,64%	79,98%	69,42%
3	-	73,76%	76,36%	65,42%
4	-	73,34%	75,52%	69,14%
Média	-	78,19%	82,00%	67,27%
Desvio-Padrão	-	7,72	9,62	2,33

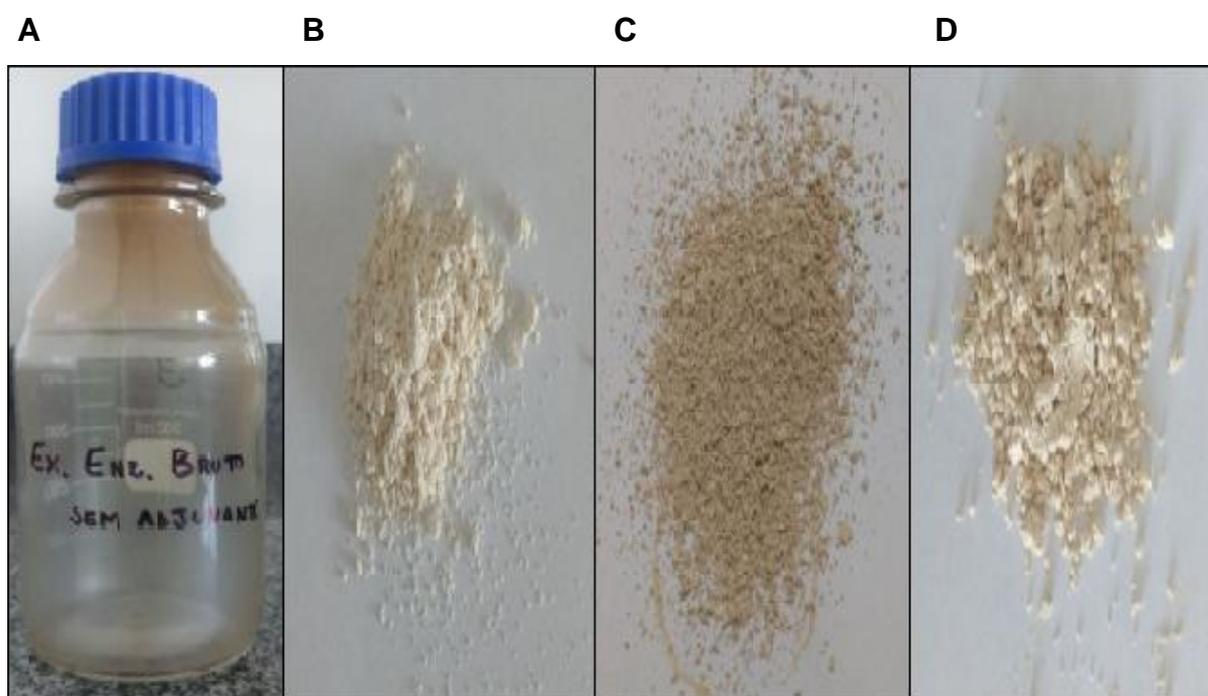
Fonte: Autora (2017)

O maior rendimento foi o obtido utilizando-se maltodextrina como adjuvante, uma vez que das 5g de sólidos totais presentes nestas formulações, obteve-se 4,1g, em média, de pó após a secagem. O rendimento do extrato seco com Aerosil® não

diferiu significativamente nem da maltodextrina e nem da goma arábica, ao mesmo tempo que estas diferiram significativamente entre si, segundo análise do teste Tukey.

A Figura 30 apresenta ilustrações dos extratos enzimáticos após secagem.

Figura 30: Extrato enzimático bruto após secagem em *spray dryer*. **A)** Extrato sem adição de adjuvante, **B)** Extrato seco com Aerosil®, **C)** Extrato seco com Goma Arábica, **D)** Extrato seco com Maltodextrina.

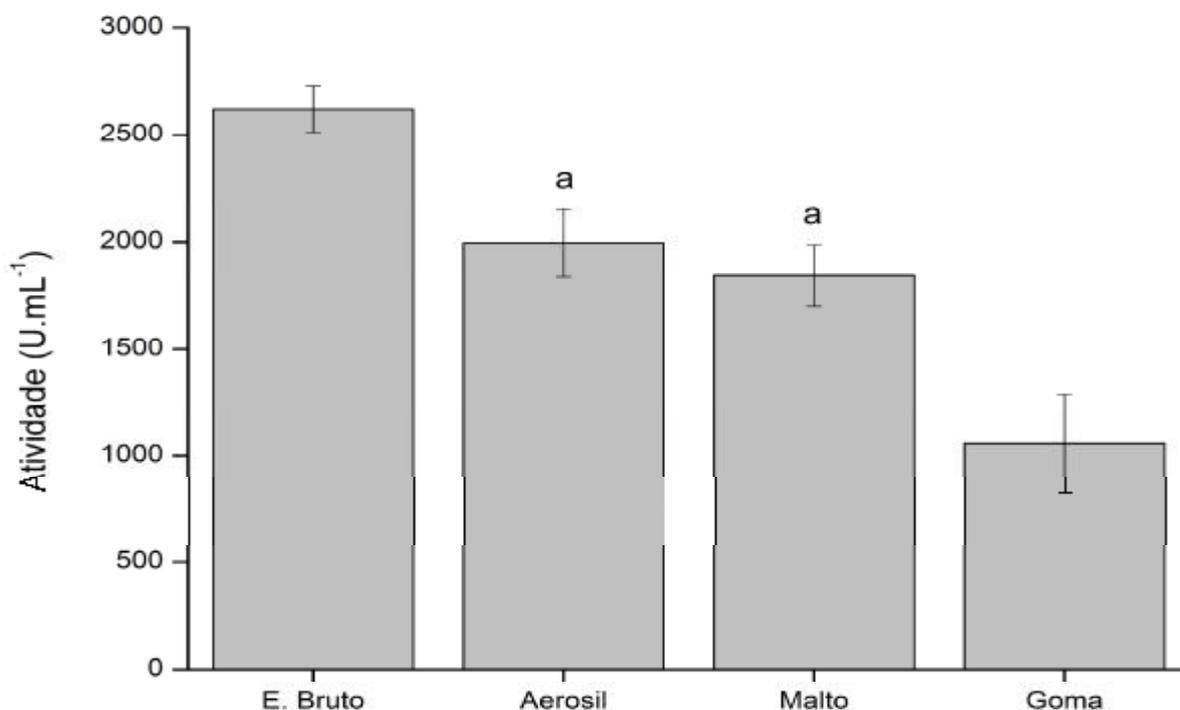


Fonte: Autora (2017)

4.7.2 Análise da atividade enzimática das formulações pré e imediatamente após secagem

Para estabelecer parâmetro e verificar possível interferência dos adjuvantes na capacidade de oxidação da enzima, foi realizada a leitura da atividade enzimática de cada uma das formulações antes do processo de secagem. Os resultados estão plotados no gráfico da Figura 31.

Figura 31: Atividade enzimática do extrato bruto antes da secagem, sem adição de adjuvantes (E. Bruto) e após 30 minutos de incorporação dos adjuvantes Aerosil, Maltodextrina (Malto) e Goma Arábica (Goma). As barras com as mesmas letras, correspondem a grupos estatisticamente iguais no teste Tukey ($p < 0,05$).



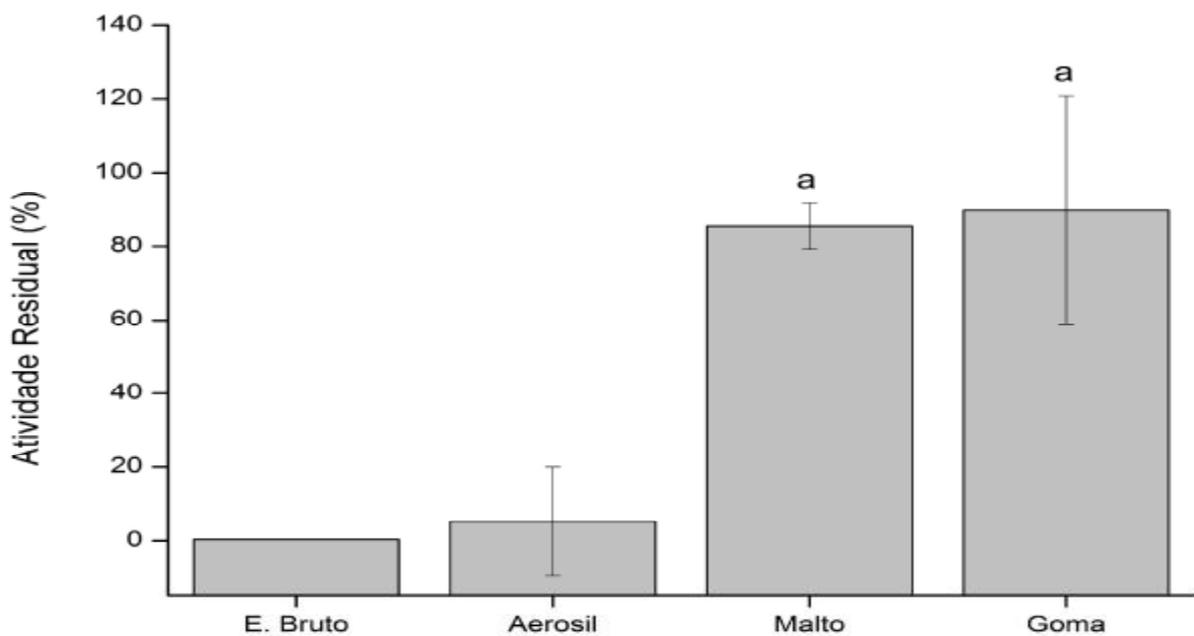
Fonte: Autora (2017)

É possível verificar que adição de adjuvantes, mesmo antes da secagem, interfere na capacidade oxidativa da enzima. Ao se comparar a atividade da enzima sem adjuvante com a atividade das outras formulações, percebe-se que o Aerosil® foi o que menos comprometeu a atuação da enzima na oxidação do substrato, ocasionando uma perda de 23%. A maltodextrina ocasionou perda de 29% na atividade da enzima, porém o teste Tukey ($p < 0,05$) concluiu que não existe diferença significativa entre as atividades encontradas para esses dois adjuvantes. A goma arábica provocou a maior perda de atividade, em torno de 59%.

Após a secagem, a atividade residual dos extratos foi avaliada imediatamente, tendo como referência os valores de atividade obtidos antes da secagem quando da incorporação dos adjuvantes. Conforme mostrado na Figura 32, o processo de secagem do extrato bruto sem a adição de adjuvantes praticamente inativou enzima, resultado semelhante ao encontrado por Silva (2010) durante secagem de lipases. Este resultado era esperado uma vez que a enzima foi submetida a uma temperatura de 100°C e, como não estava protegida, ocorreu a desnaturação proteica (NAMALDI; ÇALIC; ULUDAG, 2006). O Aerosil® também não foi eficiente na proteção da enzima, levando a uma perda de 95% de atividade quando

comparado com a atividade obtida para esta mesma formulação antes da secagem. O processo de secagem do extrato com a maltodextrina, promoveu uma perda de 15% de atividade e com a goma de 11%. Em termos de atividade residual as duas não diferiram significativamente uma da outra.

Figura 32: Atividade enzimática residual do extrato bruto imediatamente após a secagem, das formulações sem adição de adjuvantes (E. Bruto) e com os adjuvantes Aerosil®, Maltodextrina (Malto) e Goma Arábica (Goma). As barras com as mesmas letras, correspondem a grupos estatisticamente iguais no teste Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: Autora (2017)

Belghith, Chaabouni e Gargouri (2001) secaram celulase usando 1% de maltodextrina e perceberam perda de atividade em torno de 30% logo após o processo de secagem. Shiota (2014) avaliou a secagem de endoglucanase e xilanase utilizando maltodextrina, goma arábica e celulose microcristalina. Os resultados obtidos pela autora revelaram que as maiores atividades residuais foram detectadas com maiores concentrações de adjuvante (5%), sendo que a maltodextrina manteve a maior atividade residual para endoglucanase (116,97%) e a goma arábica para a xilanase (117,67%). Silva (2010) testou vários adjuvantes para secagem de lipases e obteve 100% de atividade residual quando 10% de lactose + 0,1% de Tween foram utilizados como adjuvantes. O autor ainda relatou que ao usar apenas 10% de maltodextrina a atividade residual foi de 50%, ao passo que a mistura de 10% de maltodextrina e 0,1% de Tween elevou a atividade residual para

91%. Já para a mistura 10% goma arábica e 0,1% de tween, a atividade residual foi de 87%.

A literatura é unânime quanto à importância do uso de adjuvantes na secagem de materiais bioativos, pois mudanças na estrutura das proteínas relatadas em processos de secagem são atribuídas à remoção de moléculas de água de hidratação, que formam ligações de hidrogênio necessárias para estabilização da estrutura proteica. Dessa forma, o tipo e a quantidade de adjuvante utilizado no processo interfere diretamente na capacidade de proteção dos sítios específicos das enzimas (CHANG; PIKAL, 2009).

4.7.3 Estabilidade do extrato enzimático bruto seco

A estabilidade da enzima seca foi testada quanto ao tempo de armazenamento e a umidade, durante 30 dias. Após a secagem, a enzima foi condicionada em frascos plásticos e mantida à temperatura ambiente.

Os valores obtidos para atividade enzimática e umidade dos pós podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8: Atividade enzimática, atividade residual e umidade para os extratos secos com aerosil®, maltodextrina (Malto) e goma arábica (Goma), tendo como parâmetro a atividade enzimática obtida antes da secagem com os adjuvantes já incorporados.

Condições	Atividade Enzimática (U.mL ⁻¹)			Atividade Residual (%)			Umidade (%)		
	Aerosil	Malto	Goma	Aerosil	Malto	Goma	Aerosil	Malto	Goma
Antes da secagem	1994,29	1842,62	1056,37	100	100	100	-	-	-
Pós secagem	105,64	1575,38	948,71	5,3	85,5	89,8	6,61	5,12	4,98
Após 15 dias	31,79	551,79	467,69	1,6	29,9	44,3	7,17	5,62	5,21
Após 30 dias	11,28	318,97	343,59	0,6	17,3	32,5	9,32	6,53	6,48

Fonte: Autora (2017)

Através da análise dos dados, verifica-se que apesar de o extrato seco em Aerosil® ter mantido maior atividade após incorporação do adjuvante (1994,29 U.mL⁻¹), ele não foi capaz de manter a enzima estável após a secagem e, ao final de

30 dias, apresentava apenas 0,6% de atividade.

A análise estatística dos dados, através do teste Tukey ($p < 0,05$), evidenciou que, embora a maltodextrina tenha mantido maior atividade absoluta em comparação com a goma arábica imediatamente após a secagem, em termos de atividade residual, as duas não diferiram significativamente. Após 15 e 30 dias, os valores de atividade absoluta para maltodextrina e goma arábica não diferiram entre si, porém, em termos de atividade residual, esta diferença foi significativa. Isso porque a atividade obtida para o extrato com maltodextrina pós incorporação do adjuvante foi maior do que a obtida para a goma. E, apesar de ter atividade absoluta menor, o extrato seco com goma manteve maior atividade relativa ao longo de 30 dias.

Mesmo com a queda na atividade enzimática apresentada pelos extratos secos, o processo de secagem ainda se torna uma alternativa viável, haja vista que o extrato enzimático bruto líquido, quando mantido à temperatura ambiente, não foi capaz de conservar a enzima ativa e, além disso, houve proliferação de colônias de fungos após o 4º dia.

Namaldi, Çalic e Uludag (2006) secaram proteases utilizando maltodextrina e glicose variando a concentração de adjuvante entre 0,5 e 2% (p/v) e a temperatura entre 70 e 130°. Os autores observaram que utilizando os adjuvantes na concentração de 1% e procedendo a secagem a 90°C, a perda de atividade ao longo de 6 meses foi de 6% para extratos secos com glicose e de 8% para os secos com maltodextrina. Após 8 meses de armazenamento a 5°C, Silva (2010) relatou atividade residual de lipases em torno de 70% quando β -ciclodextrina foi usada como adjuvante, 67,1% para goma arábica, 65,8% para trealose, 60% para lactose e 53,2% para maltodextrina. Belghith, Chaabouni e Gargouri (2001) relataram que ao utilizar maltodextrina como adjuvante, a atividade residual caiu 30% logo após a secagem, porém, a enzima não apresentou perda significativa de atividade durante 8 meses de estocagem, à temperatura de 4°C.

Todos os adjuvantes foram capazes de manter a umidade do pó obtido após a secagem abaixo de 10%. Ameri e Maa (2006), ressaltaram a importância de se controlar o teor de umidade dos pós, que é fator determinante para a manutenção da estabilidade da substância seca. Os autores ainda salientam que as condições adotadas para secagem, são responsáveis pela taxa de evaporação do solvente, o que, juntamente com a quantidade de adjuvante, interfere na umidade e morfologia das partículas. Em condições de secagem semelhante a utilizada neste trabalho, Silva (2010) obteve umidade de 5,12% em secagem de lipases usando

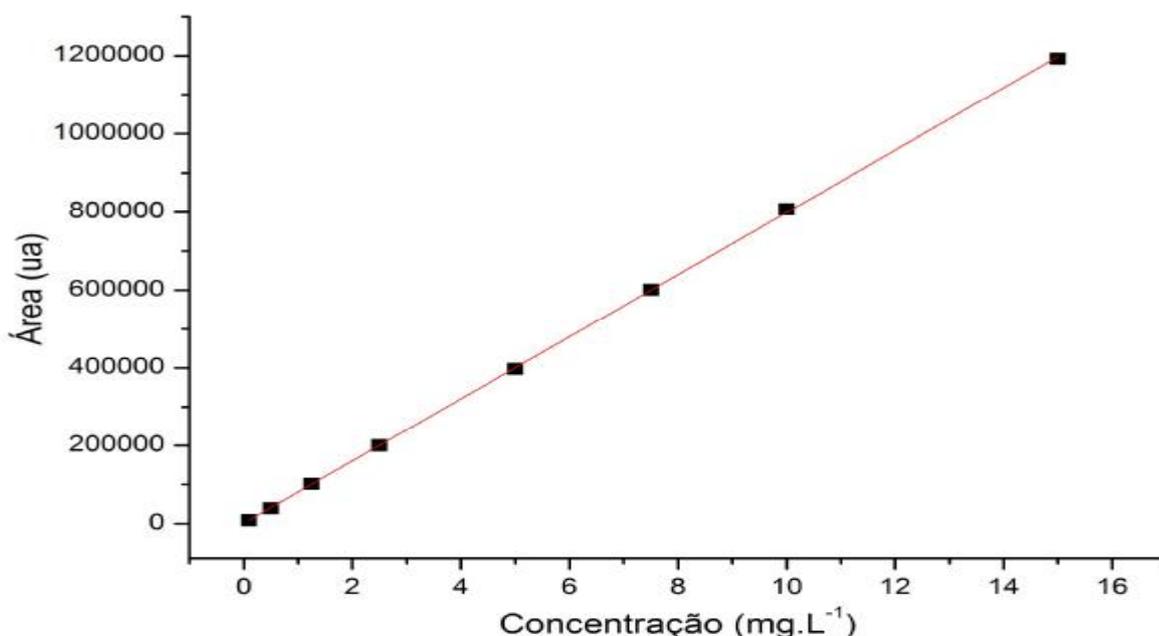
maltodextrina como adjuvante, 6% usando lactose e 4,92% usando β -ciclodextrina. Santos (2012), determinou umidade em torno de 3,5% para peptidases e lipases quando uma mistura de Aerosil® e dextrina foi usada no processo de secagem.

Assim, pode-se inferir que, a temperatura de secagem e a concentração de adjuvantes, são variáveis críticas em um processo de secagem, podendo interferir não só na perda de atividade imediata, mas também, durante o tempo de armazenamento. Dessa forma, estudos complementares com variações dos parâmetros de secagem são sugeridos para verificação de melhores condições de secagem para a enzima lacase.

4.8 Biorremediação do antibiótico oxitetraciclina

Foram inseridas 8 amostras com concentrações diferentes de solução de oxitetraciclina no CLAE e, juntamente com os dados de tamanho da área do pico formado em cada uma das concentrações, foi construída uma curva de calibração (Figura 33). A equação da reta obtida foi $y = (79752,4)x + (1388,73)$ e o coeficiente de correlação (R^2) foi igual a 0,99996. O valor do coeficiente de correlação indica que existe forte correlação e linearidade entre as concentrações das soluções analisadas e as medidas das áreas dos picos obtidos para cada amostra no cromatógrafo. Os testes de precisão e exatidão também demonstraram que a metodologia utilizada para quantificação do antibiótico oxitetraciclina foi eficiente. Os dados das análises de validação do método podem ser observados no Apêndice B.

Figura 33: Curva de calibração da solução de oxitetraciclina



Fonte: Autora

A biorremediação do antibiótico oxitetraciclina foi realizada com o extrato enzimático bruto líquido e seco com maltodextrina. Apesar de o extrato seco com maltodextrina apresentar atividade residual menor do que o extrato seco com goma, ele foi escolhido para prosseguir com os testes de biorremediação devido ao fato de ter apresentado maior atividade absoluta.

Através da equação da reta obtida na curva de calibração e as análises em CLAE das alíquotas coletadas periodicamente durante o processo de biorremediação, observou-se que, após 24 horas, não houve redução na quantidade de oxitetraciclina nos controles contendo enzima inativa bem como nos controles que continham apenas oxitetraciclina e tampão. Dessa forma, pode-se concluir que não houve degradação espontânea ou oxidação do antibiótico pela luz ou por componentes não-enzimáticos do extrato bruto.

A Tabela 9 apresenta a evolução da remoção do antibiótico oxitetraciclina no decorrer do processo de biorremediação com o extrato bruto líquido. É possível observar uma remoção de 28,13% do antibiótico já na primeira hora de contato com o extrato bruto. Após 6 horas, mais da metade do antibiótico já havia sido removida e depois de 24 horas a remoção havia sido superior a 99%.

Tabela 9: Média das áreas dos picos, média das concentrações e porcentagem de remoção do antibiótico oxitetraciclina durante a biorremediação com o extrato enzimático bruto líquido.

Análise	Área (AU)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Remoção (%)
Controle com enzima	852205	10,667	-
Controle sem enzima	853162	10,678	-
T0	845502	10,584	0,77
T1	612766	7,666	28,13
T2	609230	7,622	28,17
T4	546767	6,838	35,89
T6	352942	4,408	58,67
T8	351463	4,390	58,84
T10	229153	2,856	73,22
T12	225242	2,807	73,68
T24	2895	0,036	99,66

Fonte: Autora

A remoção de quase 100% da oxitetraciclina após 24 horas de tratamento enzimático, demonstra o poder de oxidação da enzima lacase. Migliore et al. (2012)

avaliaram a capacidade de remoção da oxitetraciclina utilizando lacase purificada do fungo *Pleurotus ostreatus*. Os autores adicionaram um volume de enzima correspondente a $0,1\text{U.mL}^{-1}$ de atividade enzimática em uma solução de oxitetraciclina a $50\mu\text{g.mL}^{-1}$ e observaram remoção de 50% do fármaco após 96 horas de tratamento.

Esse potencial de remoção da oxitetraciclina pela enzima lacase pode ser explicado pelo fato destas enzimas catalisarem reações de oxidação de compostos fenólicos. O mecanismo de catálise desta enzima envolve a remoção de um elétron da molécula do substrato, associada a redução do Cu^{2+} em Cu^{+} presente em seu centro catalítico. Assim, quando a enzima retorna ao seu estado nativo (Cu^{2+}), ela promove a redução de O_2 à H_2O (FARIA, 2010). Como a oxitetraciclina possui em sua molécula quatro estruturas fenólicas, pode-se supor que o mecanismo pelo qual a lacase remove este composto seja por oxidação de seus anéis aromáticos, tal qual acontece com substratos naturais desta enzima.

Apesar da quantidade de lacase purificada utilizada na pesquisa de Migiore et al. (2012) ser muitas vezes inferior do que a utilizada neste trabalho, verifica-se que o extrato bruto foi efetivo na remoção do antibiótico tanto quanto a enzima purificada. Além disso, a utilização do extrato bruto não necessita de etapas dispendiosas de separação e purificação da enzima e ainda dispensa a adição de mediadores ao meio reacional, uma vez que extrato bruto contém mediadores naturais produzidos pelo fungo (NGUYEN et al., 2016).

Na Tabela 10, tem-se os valores de remoção do antibiótico oxitetraciclina através da biorremediação com o extrato bruto seco com maltodextrina. Observa-se que na primeira hora houve remoção de 18,49% do antibiótico e que ao final de 24 horas a remoção havia sido de 70,61%. Apesar do extrato seco proporcionar menor remoção do que o extrato líquido, quando avaliado o mesmo tempo de reação, a secagem do extrato bruto ainda é uma alternativa viável, tendo em vista que a secagem facilita o transporte, armazenamento e manuseio, viabilizando, dessa forma, a aplicação do extrato bruto em processos de biorremediação em escalas superiores às de bancada.

Tabela 10: Média das áreas dos picos, média das concentrações e porcentagem de remoção do antibiótico oxitetraciclina durante a biorremediação com o extrato enzimático bruto seco com maltodextrina.

Análise	Área (AU)	Concentração (mg.L ⁻¹)	Remoção (%)
Controle com enzima	659968	8,254	-
Controle sem enzima	661022	8,267	-
T0	656901	8,219	0,42
T1	537978	6,728	18,49
T2	514435	6,433	22,06
T4	503025	6,290	23,79
T6	493973	6,176	25,17
T8	471052	5,889	28,65
T10	464276	5,804	29,68
T12	442697	5,533	32,96
T24	194890	2,426	70,61

Fonte: Autora

Ao se analisar o gráfico da Figura 34 e os cromatogramas da Figura 35, nota-se que a remoção da oxitetraciclina com o extrato bruto seco foi menor do que quando se utilizou o extrato bruto líquido. Isso pode ser explicado pelo fato de os adjuvantes adicionados durante a secagem protegerem a enzima, o que pode dificultar o contato do sítio ativo das enzimas com as moléculas do antibiótico. Pode ser que com um tempo maior de contato entre extrato e antibiótico na biorremediação com extrato seco, seja alcançado níveis de remoção semelhante aos encontrados para o extrato líquido. Um outro fator que também deve ser considerado é a possível interferência dos adjuvantes no mecanismo de atuação da enzima. Sugere-se que estudos mais específicos sejam realizados de modo a verificar as causas da diminuição na remoção da oxitetraciclina quando se utilizou o extrato seco.

Figura 34: Concentração do antibiótico oxitetraciclina nos meios reacionais após 0,1,2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas de reação com extrato enzimático bruto líquido e seco.

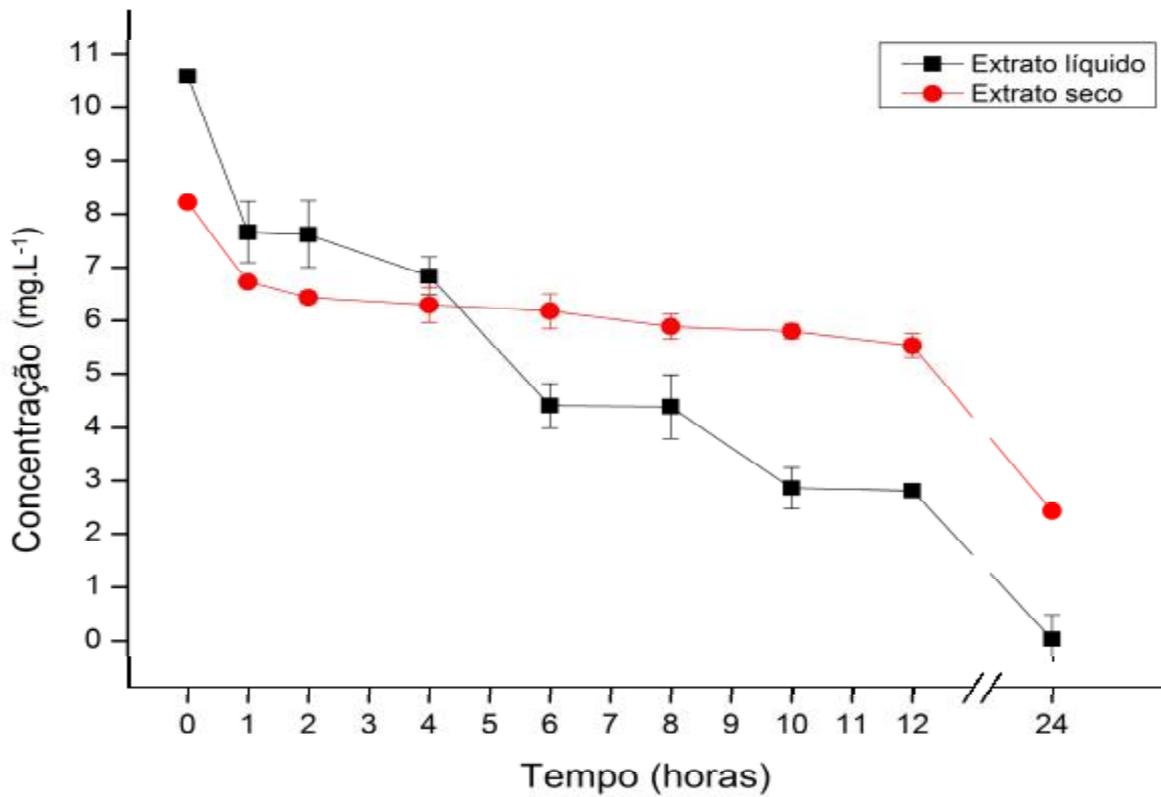
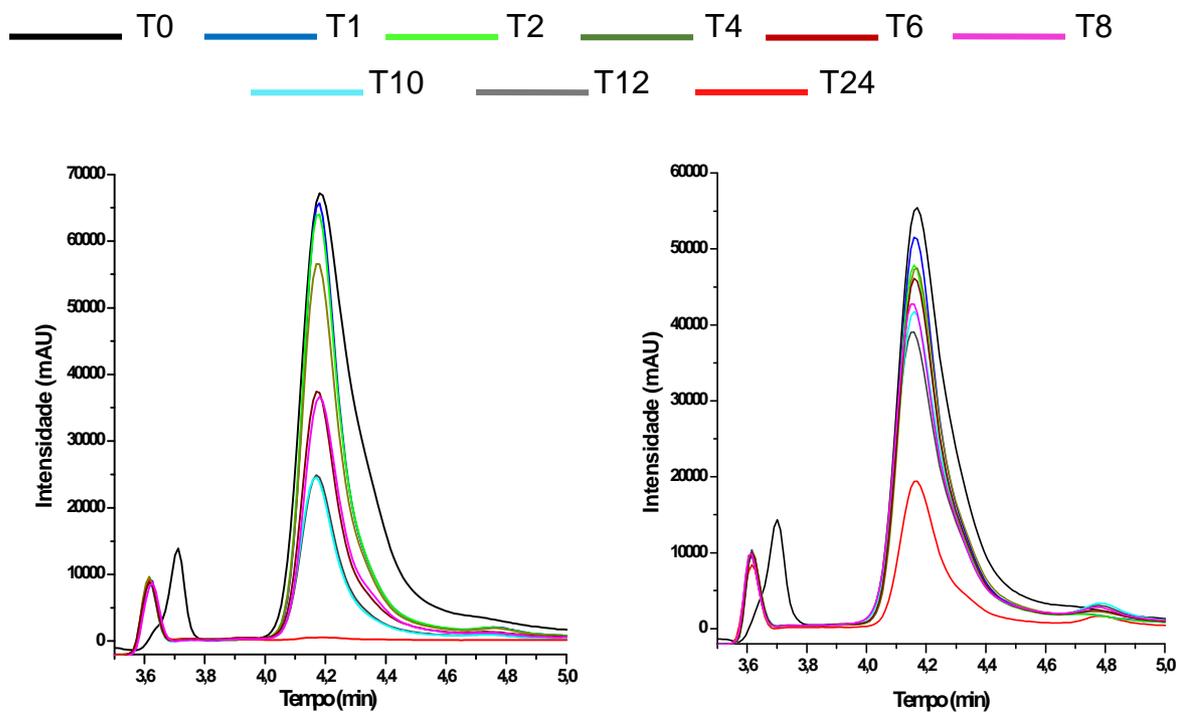


Figura 35: Cromatogramas da oxitetraciclina em cada tempo de tratamento, primeiro com o extrato líquido e segundo com extrato seco



Fonte: Autora

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1 Conclusões

O estudo sobre utilização de resíduos agroindustriais para a produção de lacase do fungo *Pleurotus ostreatus*, demonstrou que todos os resíduos testados foram capazes de induzir produção enzimática superior aos controles positivo (xilidina e cobre) e negativo. Sendo que houve maior produção da enzima quando se utilizou o resíduo de açaí como indutor. O pico de atividade se deu no 7º dia de cultivo com valores de 3184,62 U.mL⁻¹, evidenciando que a utilização de resíduos é uma abordagem promissora na produção de enzimas lignolíticas.

A caracterização da enzima revelou que a maior atividade enzimática se deu em pH 5 a 30°C e que, apesar disso, este pH foi o que menos estabilizou a enzima em todas as temperaturas testadas, durante 24 horas. Em pH 6, a enzima se manteve mais estável à temperatura ambiente e a 30°C. Já a 40°C, o pH 7 foi o que proporcionou maior estabilidade para enzima. Nas temperaturas de 50 e 60° C, todos os pH's apresentaram atividade residual próximas a zero na segunda hora de análise. Foi observado que, em temperaturas mais altas, pH's mais elevados mantiveram a enzima mais estável.

Através do teste de catalase, verificou-se que a maior quantidade de enzima excretada pelo fungo no extrato bruto, referia-se à lacase. Os valores de atividade enzimática observados para o extrato bruto, possibilitam sua utilização em processos de biorremediação, dispensando-se o processo oneroso de purificação da enzima.

A secagem da enzima proporcionou a manutenção de 32,5% de atividade enzimática após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, quando o adjuvante utilizado foi a goma arábica. A Maltodextrina foi capaz de manter 17,5% de atividade após o mesmo tempo, enquanto a enzima seca com Aerosil® apresentou atividade inferior a 1%.

Tanto o extrato bruto líquido quanto o extrato bruto seco com maltodextrina foram capazes de reduzir significativamente a concentração do antibiótico oxitetraciclina no meio reacional. Sendo que com extrato bruto líquido houve remoção de 99,66% do antibiótico enquanto que com extrato seco houve remoção de 70,61% após 24 horas de reação.

5.2 Sugestões

Para complementação dos resultados e continuidade da pesquisa, recomenda-se:

- Determinação da massa molecular da enzima produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* induzido com resíduos de açai, de modo a verificar o tipo de lacase e possíveis produção de isoformas;
- Otimizar o processo de secagem da enzima lacase variando concentração e tipos de adjuvantes, temperatura de entrada de ar, vazão de secagem, entre outros parâmetros.
- Avaliar a estabilidade da enzima seca por um período mais longo do que o analisado neste trabalho, além de verificar melhores condições de armazenamento;
- Verificar a interferência dos diferentes adjuvantes de secagem na biorremediação do antibiótico oxitetraciclina;
- Analisar a biorremediação utilizando o extrato seco por tempo superior a 24 horas;
- Verificar os compostos formados após biorremediação do antibiótico pela enzima lacase.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. M. L. Processos de tratamento não convencionais para degradação do antibiótico sulfadiazina em meio aquoso. 113 f. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, 2007.
- ALEXANDRINO, D. A. M., MUCHA, A. P., ALMEIDA, C. M. R., GAO, W., JIA, Z., CARVALHO, M. F. Biodegradation of the veterinary antibiotics enrofloxacin and ceftiofur and associated microbial community dynamics. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 359–368, 2017.
- ALLOUE, W.A.M.; DESTAIN, J.; AMIGHI, K.; THONART. Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after *spray-drying* in the presence of additives. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1357–1361, 2007.
- ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 818 – 824, 2004.
- AMERI, M.; MAA, Y-F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v. 24, p. 763–768, 2006.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde**. Brasília, 2004.
Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0306_07_12_2004.pdf/95eac678-d441-4033-a5ab-f0276d56aaa6>. Acesso em: 17/01/2017.
- ANVISA. III. Antimicrobianos - principais grupos disponíveis para uso clínico. In: **Antimicrobianos - Bases Teóricas e Uso Clínico**. 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/conteudo/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/antimicrobianos.htm> Acesso em: 26/04/2017.
- ARAKAWA, T.; PRESTRELSKI, S.J.; KENNY, W.C.; CARPENTER, J. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 10, p. 1 – 28, 1993.
- ARAÚJO, S.; SILVA, I. A. T.; TACÃO, M.; PATINHA, C.; ALVES, A.; HENRIQUES, I. Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 192-200, setembro, 2017.
- ASSIS, T. R. Obtenção de enzima lignolíticas visando à hidrólise enzimática da fração lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2015.
- ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; ROTHCHILD, Z. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. v. 4. São Paulo: EdUSP, 2003.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, p. 89-97, 2005.

AZZAM, M. I.; EZZAT, S. M.; OTHMAN, B. A.; EL-DOUGDOUG, K. A. Antibiotics Resistance phenomenon and virulence ability in bacteria from water environment. **Water Science**, novembro, 2017.

BAI, C. X.; SHEN, F.; QI, X. H. Preparation of porous carbon directly from hydrothermal carbonization of fructose and phloroglucinol for adsorption of tetracycline. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, p. 960 – 962, 2017.

BAL, A.M.; GOULD, I. M. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and its relevance in therapy. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 6, p. 2257–2269, 2005.

BALDRIAN, P. Fungal laccases occurrence and properties. **FEMS Microbiology Rev**, v. 30, p. 215–242, 2006.

BELGHITH, H.; CHAABOUNI, S. E.; GARGOURI, A. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 253–258, 2001.

BEMILLER, J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. **Fenemma Food Chemistry**, ed. 3, p. 157-224, 1996.

BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; DILLON, A. J. P. Production of laccase in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 36, p. 1-9, 2009.

BHANDARI, B. R.; HARTEL, R. W. Phase transitions during food powder production and powder stability. In: ONWULATA, C. (Ed.). **Encapsulated and powdered foods**. New York: Taylor & Francis, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26. n. 04, p. 523 – 530, 2003.

BOLLAG, J. M.; LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 48, p. 849-854, 1984.

BONUGLI-SANTOS, R. C., DURRANT, L. R., SILVA, M., SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 46, p. 32–37, 2010.

BOXALL, A.B.A., FOGG, L., BLACKWELL, P.A., KAY, P., PEMBERTON, E. **Review of veterinary medicines in the environment**. Bristol: Environment Agency, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal lacases: Production function, and applications in food processing. **Enzyme Research**, v. 1, p. 1-10, 2010.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 575 – 586, 2010.

CAMPAGNOLO, E. R.; JOHNSON, K. R.; KARPATI, A.; RUBIN, C. S.; KOLPIN, D. W.; MEYER, M. T.; ESTEBAN, J. E.; CURRIER, R. W.; SMITH, K.; TH, K. M. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. **Science of The Total Environment**, v. 299, p. 89 – 95, 2002.

CAPLETON, A.C.; COURAGE, C.; RUMSBY, P.; HOLMES, P.; STUTT, E.; BOXALL, A.B.A. & LEVY, L.S. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. **Toxicology Letters Journal**, v. 163, p. 213-223, 2006.

CARS, O.; MÖLSTADT, S.; MELANDER, A. Variation in antibiotic use in the European Union. **The Lancet**, v. 357, p. 1851–1853, 2001.

CARUNCHIO, F.; CRESCENZI, C.; GIRELLI, A. M.; MESSINA, A.; TAROLA, A. M. Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. **Talanta**, v. 55, p. 189–200, 2001.

CARVALHO, I. T.; SANTOS, L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. **Environment International**, v. 94, p. 736 – 757, 2016.

CHANG, L.; PIKAL, M.J. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 2886 – 2908, 2009.

CHAPARRO, D. F., ROSAS, D. C., VARELA, A. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, p. 238–243, 2009.

COLLINS, P. J.; KOTTERMAN, M. J. J.; FIELD, J. A.; DOBSON, A. D. W. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4563–4567, 1996.

COMPANHIA DE DISTRITOS INDUSTRIAIS DE GOIÁS. **Regulamento para Lançamento de Águas Residuárias em Rede de Esgoto Fornecida pela Companhia de Distritos Industriais de Goiás – Goiasindustrial**. Goiânia, 2009. Disponível em: <http://www.goiasindustrial.com.br/w4_temp/images/downloads/regulamento_para_lancamento_de_aguas_resuduarias.pdf>. Acesso em 12/01/2017.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências**. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=462>>. Acesso em: 17/01/2017.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**. Brasília, 2005. Disponível em:

<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 17/01/2017.

CORDI, L., MINUSSI, R.C., FREIRE, R. S., DURÁN, N. Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 1255-1259, 2007.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and Biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**. v. 24, p. 500 – 513, 2006.

COUTO, S. R.; LOPEZ, E.; SANROMAN, M. A. Utilization of grape seeds for laccase production in solid-state fermenters. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 263 – 267, 2006.

CULLEN D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**. v. 53, p. 273–289, 1994.

DE PAZ, A. R. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 765-774, 2002.

DEEGAN, A. M.; SHAIK, B; NOLAN, K.; URELL, K.; OELGEMÖLLER, M.; TOBIN, J.; MORRISSEY, A. Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies. **International Journal of Environment Science and Technology**, v. 8, n. 3, p. 649-666, 2011.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. **Environment Science Technology**, v. 32, p. 1549 - 1558, 1998.

DING, H., WU, Y., ZOU, B., LOU, Q., ZHANG, W., ZHONG, J., LU, L., DAI, G. Simultaneous removal and degradation characteristics of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics by laccase-mediated oxidation coupled with soil adsorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 307, p. 350–358, 2016.

DONG, J.L.; ZHANG, Y. Q.; ZHANG, R. H.; HUANG, W. Z.; ZHANG, Y. Z. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. **Journal Basic Microbiology**, v. 45, p. 190 – 198, 2005.

EDAE, T. Production and partial characterization of laccase from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) collected from the bark of eucalyptus tree. 102 f. **Dissertação de Mestrado** – Departamento de Biologia, Haramaya University, Haramaya – Ethiopian, 2016.

EGGEN, T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of creosote contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation Journal**, v. 44, p. 117–126, 1999.

EGGERT, C.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D.; ERIKSSON, K. E. L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. **FEBS Lett.**, v. 391, p. 144-148, 1996.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1151 – 1158, 1996.

EL-BATAL, A. I.; ELKENAWY, N. M.; YASSIN, A. S.; AMIN, M. A. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its application in synthesis of gold nanoparticles. **Biotechnology Reports**. v.5, p. 31-39, 2015.

FARIA, R. A. Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por *Coriophoropsis subvermispora*. 2010. 102 p. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FERREIRA, M.P. Enfermidades podais em rebanho leiteiro confinado. 79 f. **Tese (Doutorado)** – Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

FONSECA-MALDONADO, R. et al. Synergistic action of co-expressed. **Biochemistry**. 2014.

FREIXO, M. R.; KARMALI, A.; ARTEIRO, J. M. Production, purification and characterization of laccase from *Pleurotus ostreatus* grown on tomato pomace. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 245-254, 2012.

GARCIA, L. F. Remediação bio-eletroquímica do hormônio sexual sintético 17- α -etinilestradiol. 68 f. **Dissertação de Mestrado** - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Estadual de Goiás. Goiânia, 2016.

GARCIA, T. A. Purificação e Caracterização das Lacases de *Pycnoporus sanguineus*. 110 f. **Tese de Doutorado** - Biologia Molecular, Universidade de Brasília, 2006.

GASTALHO, S.; SILVA, G. J.; RAMOS, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: Impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p 29 – 45, 2014.

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

GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SCALONI, A.; FONTANELLA, B.; FARACO, V.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, v. 341, p. 655 – 663, 1999.

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

GOCHEV, V. K., KRASTANOV, A. I. Isolation of laccase producing *Trichoderma* Spp. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 171-176, 2007.

GOLVEIA, J. C. S. Produção e Caracterização de Lacase de *Pycnoporus sanguineus* CCT 4518 Induzida por Resíduos Agroindustriais e Aplicação na Biorremediação de 17- α -Etinilestradiol. 82 f. **Dissertação de Mestrado** - Programa

de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás – UFG, Goiânia, 2016.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R.. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**. Sociedade Brasileira de Química, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOMES, F.M.; PAULA, A.V.; SILVA, G.S.; CASTRO, H.F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol, **Química Nova**, v. 29, p. 710- 718, 2006.

GONÇALVEZ, M.L.F.C; STEINER, W. Detection of laccases activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing condition. **Biotechnology Techniques**, v. 10, p. 667-668, 1996.

GREGORI, A.; SVAGELJ, M.; PAHOR, B.; BEROVIC, M.; POHLEVEN, F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. **New Biotechnology**. v. 25, p. 157 – 161, 2008.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T.; Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 2010.

GUIMARÃES, R. L. C.; WOICIECHOWSKI, A. L.; KARP, S. G.; CORAL, J. D.; ZANDONA FILHO, A.; SOCCOL, C. R. **Laccases: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Elsevier, 2017.

HIRSCH, R.; TERNES, T. A.; HABERER, K.; MEHLICH, A.; BALLWANZ, F.; KRATZ, K. L. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal Chromatograph**, v. 815, p. 213 – 223, 1998.

HIRSCH, R.; TERNES, T.; HABERER, K.; KRATZ, K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 109 – 118, 1999.

HUBLIC, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 330-336, 2000.

ITABAIANA JUNIOR, I.; SOUZA, R. O. M. A. **Biocatálise e biotransformação - fundamentos e aplicações**: Quarta Série de Textos do Workshop de Biocatálise e Biotransformação. Rio de Janeiro: Simplíssimo Livros LTDA. 2017.

JIA, X.; LIN, X.; LIN, C.; LIN, L.; CHEN, J. Enhanced alkaline catalase production by *Serratia marcescens* FZSF01: enzyme purification, characterization, and recombinant expression. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 30, p. 110-117, 2017.

JOUANI, A.; GUILLEN, F.; PENNINGCKX, M. J.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, M. J. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in

olive oil mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 566-572, 2002.

JUAN DU, H. Z.; SISI LIU, H. X.; YAN WANG, J. C. Antibiotics in the coastal water of the South Yellow Sea in China: occurrence, distribution and ecological risks. **Science of the Total Environment**, v. 595, 5521 – 5527, 2017.

JUNG, H.; XU, F.; LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 161-168, 2002.

KANG, K. H.; DEC, J.; PARK, H.; BOLLAG, J. M. Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid. **Water Research**, v. 36, p. 4907–4915, 2002.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KOIKE, S.; KRAPAC, I. G.; OLIVER, H. D.; YANNARELL, A. C.; CHEE-SANFORD, J. C.; AMINOV, R. I.; MACKIE, R. I. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. **Environmental Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4813-4823, 2007.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams 1999–2000: a national reconnaissance. **Environment Science Technology**, v. 36, p. 1202–1211, 2002.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**. v.4, p. 417-434, abril, 2009a.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. **Chemosphere**. v.4, p. 435-441, abril, 2009b.

KUNAMNENI, A.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J.; ALCALDE, M. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.) **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. 2007.

LANTE, A.; CRAPISI, A.; KRASTANOV, A.; SPETTOLI, P. Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 51–58, 2000.

LARSSON, J. D.G.; PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journals of Hazardous Materials**. v. 148, p. 751 – 755. 2007.

LEONOWICZ, A.; GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme Microbial Technology**, v. 3, p. 55-58, 1981.

LI, D.; YANG, M.; HU, J.; REN, L.; ZHANG, Y.; CHANG, H.; LI, K. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxyteracycline production

wastewater and the receiving river. **Environment Toxicology Chemistry**. v. 27, p. 80–86, 2008.

LIAO, Y.H.; BROWN, M.B.; ABDUL, Q.; MARTIN, G.P. Investigation of the physical properties of spray-dried stabilized lysozyme particles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, p. 1213-1223, 2003.

LIEBERMAN, J. M. Appropriate antibiotic use and why it is important: the challenges of bacterial resistance. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 22, p. 1143-1151, 2003.

LIMA, A. P. C. S.; GALLANI, N. R.; TOLEDO, M. I.; LOPES, L. C. Utilização de um sistema de gerenciamento de benefícios farmacêuticos (PBM) para a caracterização do perfil de prescrição e aquisição de antibióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, p. 215 – 223, 2008.

LIMA, A. S. B.; SIMÃO, C. J. B.; SILVA, F. J. S.; RODRIGUES, J. R. F.; ARAUJO, T. C. A biorremediação como técnica de tratamento de efluentes contaminados por petróleo. **Blucher Chemistry Proceedings**. v. 3, n. 1, 2015.

LLORET, L., EIBBES G.; LÚ CHAO T.A., MOREIRA, M.T, FEIJO, G., LEMA, J.M. Laccase catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens, **Biochemistry Engineering**. v. 51, p. 124–131, 2010.

LORENZO, M.; MOLDES, D.; COUTO, S. R.; SANROMAN, A. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 109 -113, 2002.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1265–1273, 2003.

MACKIE, R. I.; KOIKE, S.; KRAPAC, I.; CHEE-SANFORD, J.; MAXWELL, S.; AMINOV, R. I. Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities. **Animal biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 157-176, 2006.

MAIA, E. C. P.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. D.; SANTOS, H. F.; MARCIAL, B. L.; RUGGIERO, R.; GUERRA, W. Tetraciclina e Gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**. v. 33, n. 3, 2010.

MAJEAU J.A.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331–2350, 2010.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; CASTRO, M. A. S.; PESKE, S. T. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2007.

MANSUR, M.; ARIAS, M. E.; COPA-PATIÑO, J. L.; FLÄRDH, M.; GONZALEZ, A. E. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia**. v. 95, p. 1013 – 1020, 2003.

MARCO, J.C.I. Produção e caracterização de mananases de *Aspergillus foetidus* cultivado em casca do grão de soja. 90 f. **Dissertação de Mestrado em Biologia Microbiana**, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**. v. 11, p. 33-39, 2014.

MARTINS, I. S.; FERREIRA, M. M. G.; ROSA, B. R. T.; BENEDETTE, M. F.; FILADELPHO, A. L. *Laminite Bovina*. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 6, n.10, jan. 2008.

MASTERS, K. **Spray drying Handbook**. 3^o ed. New York: Halsted Press, 1979.

MAYER A. M.; STAPLES R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

McNAMEE, B. F.; O'RIORDAN, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4551-4555, 1998.

MIAO, L.; ZHANG, G.; WANG, H., NG, T. Purification and characterization of a laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 20, p. 1069–1076, 2010.

MIGLIORE, L.; FIORI, M.; SPADONI, A.; GALLI, E. Biodegradation of oxytetracycline by *Pleurotus ostreatus* mycelium: a mycoremediation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. 215–216, p. 227–232, 2012

MIKOLASCH, A.; SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 605-624, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, p. 426, 1959.

MILLQVIST-FUREBY, A.; MALMSTEN, M.; BERGENSTÅHL, B. Spray-drying of trypsin - surface characterisation and activity preservation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, p. 243 – 253, 1999.

MITCHELL, S. M.; ULLMAN, J. L.; TEEL, A. L.; WATTS, R. J. pH and temperature effects on the hydrolysis of three β -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. **Science of the Total Environment**, v. 466 - 467, p. 547 - 555, 2014.

MÖLSTAD, S.; LUNDBORG, C. S.; KARLSSON, A. K.; CARL, O. Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v. 34, p. 366–371, 2002.

MORAIS, H.; FORGACS, E.; CSERHATI, T. Enzyme production of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in shaken cultures completed with agro-industrial wastes. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, p. 152 – 157, 2002.

MOROZOVA O. V.; SHUMAKOVICH G.P.; GORBACHEVA M.A.; SHLEEV S. V.; YAROPOV Y. I. "Blue" Laccases. **Biochemistry**, v. 72, p. 1136-1150, 2007.

MULROY, A. Monitoring and Analysis of Water and Wastes. **Water Environment Technology**, v. 13, p. 32-36, 2001.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, v. 4, p. 1495–1500, 2006.

NEVES, L. T. B. C.; CAMPOS, D. C. S.; MENDES, J. K. S.; URNHANI, C. O.; ARAÚJO, K. G. M. Qualidade de frutos processados artesanalmente de açaí (*Euterpe oleracea* MART.) E BACABA (*Oenocarpus bacaba* MART.). **Revista Brasileira de Floricultura**, v. 37, n. 3, 2015.

NIKU-PAAVOLA, M. L.; VIIKARI, L. Enzymatic oxidation of alkenes. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 10, p. 435 – 444, 2000.

NOVARETTI, M. C. Z.; AQUINO, S.; PISCOPO, M. R. Controle de vendas de antibióticos no Brasil: Análise do efeito dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. **Revista Acadêmica São Marcos**. v. 4, n. 2, p. 25 – 39, 2014.

NGUYEN, L. N.; HAI, F. I.; PRICE, W. E.; KANG, J.; LEUSCH, F. D. L.; RODDICK, F.; VAN DE MERWE, J. P.; MAGRAM, S. F.; NGHIEM, L. D. Laccase syringaldehyde - mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor: Removal efficiency and effluent toxicity. **Bioresource Technology**, v. 200, p.477-484, 2016.

OKAMOTO, K.; YANAGI, S.O.; SAKAI, T. Purification and characterization of extracellular laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Mycosci**. v. 41, p. 7-13, 2000.

OKAZAKI, S, Y.; MICHIZOE, J.; GOTO, M.; FURUSAKI, S.; WARIISHI, H.; TANAKA, H. Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, p. 227–232, 2002.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, agosto/setembro, 2010.

OULTON, R. L.; KOHN, T; CWIERTNY, D. M. Pharmaceuticals and personal care products in effluent matrices: A survey of transformation and removal during wastewater treatment and implications for wastewater management. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 12, p. 1956–1978, 2010.

PALMIERE, G.; CENNAMO, G.; FARACO, V.; AMORESANO, A.; SANNIA, G.; GIARDINA, P. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33, p. 220 – 230, 2003.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; SCALONI, A.; CAPASSO, A.; SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 31301-31307, 1997.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; MARZULLO, L.; DESIDERIO, B.; NITTI, G.; CANNIO, R.; SANNIA, G. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p. 632-636, 1993.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, ASHOK. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. In: BRAHMACHARI, G. (Ed). **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. p. 13 – 39. Elsevier, 2017;

PEIGHAMBARDOUST, S.H., TAFTI, A.G., HESARI, J. Application a of spray-drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Tecnology**, v. 22, p. 215 – 224, 2011.

PERRONE, I. T.; SIMEÃO, M.; JÚNIOR, PH. H. R.; STEPHANI, R.; CARVALHO, A. F. Influência das condições de operação em *spray dryer* piloto sobre a umidade e a atividade de água do leite em pó integral. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.68, n. 393, p. 5-9, julho/agosto, 2013.

PEZZELLA, C., AUTORE, F., GIARDINA, P., PISCITELLI, A., SANNIA, G., FARACO, V. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. **Current Genetics**, v. 55, p. 45 – 57, 2009.

POTIN, O.; VEIGNIE, E.; RAFIN, C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 71–78, 2004.

POZDNYAKOVA, N.N.; RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; TURKOVSKAYA, O.V.; HABER, J. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators. **Enzyme Microb. Technol.** v. 39, 2006.

PUTRINO, F. M. Estudo da obtenção de açúcares redutores a partir de fibra de coco verde utilizando CO₂ supercrítico. 71 f. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2016.

RAJARATHANAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus Mushrooms*. Part III: biotransformations of natural lignocelulosic wastes; commercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 28, p. 31-113, 1989.

RANCAÑO, G.; LORENZO, M.; MORALES, N.; COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Production of laccase by *Trametes versicolor* in a airlift fermentor. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 467-473, 2003.

RASERA, K. Desenvolvimento de membranas com lacase por imobilização do extrato enzimático de *Pleurotus sajor-caju*. 130 f. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Caxias do Sul, 2006.

RECORD, E; PUNT, P. J.; CHAMKHA, M.; LABAT, M.; VAN DEN HONDEL, C. A. M.J.J. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. **European Journal Biochemistry**, v. 269, p. 602-609, 2002.

REDDY C.A, D'SOUZA TM. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, p.137–152, 1994.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e Impacto Ambiental de Antibióticos Usados na Produção Animal Brasileira, **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 219 – 226, 2006.

ROSA, E. D; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. **Secagem por atomização na indústria alimentícia**: fundamentos e aplicações. Ribeirão Preto, 2006. Disponível em:

<<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/Linkanexos/secagem%20de%20materiais.pdf>>. Acesso em 13/07/2011.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, Siân C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5.ed London: PhP, 2006. Disponível em: <<http://www.gmpua.com/RD/RD/HandbookPharmaceutical%20Excipients.pdf>>. Acesso em 07/12/2017.

SABESP - COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Tipos de Tratamento**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaold=61>>. Acesso em: 17/01/2017.

SAMBORSKA, K.; WITROWA-RAJCHERT, D.; GONÇALVES, A. Spraydrying of amylase—The effect of process variables on the enzyme inactivation. **Drying Technology**, v. 23, p. 941 – 953, 2005.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Useful Microbial Enzymes - An Introduction. In: BRAHMACHARI, G. (Ed). **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. p. 1 – 9, Elsevier, 2017.

SANNIA, G.; GIARDINA, P.; LUNA, M.; ROSSI, M.; BUONOCORE, V. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 797-800, 1986.

SANTOS, E. C. S; JUNIOR, L. D. Caracterização química de resíduos agroindustriais e de extrativismo na Amazônia. **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia**, Foz do Iguaçu, setembro, 2016.

SANTOS, E.C.; FERREIRA, M.A. A Indústria Farmacêutica e a Introdução de Medicamentos Genéricos no Mercado Brasileiro. **Nexus Econômicos**, Bahia, v. 6, n. 2, 2012.

SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; SOUSA, P.H. M.; COSTA, J. M. C.; FIGUEIREDO, R.W.; PRADO, G. M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (*Euterpe oleracea* Mart). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 2, p. 187-192, 2008.

SANTOS, L. G. B; GASPARIN, F. G. M.; REZENDE, M. I.; RIBEIRO, M. L. L. Produção e caracterização de lacase de *Pleurotus ostreatus* cultivado em casa de arroz. **V Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**, Londrina, 2015.

SANTOS, M. S. R.; PIMENTEL, W. R. O.; SILVA, M. C. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; CRUZ, A. J. G. Avaliação do pré-tratamento ácido do sabugo de milho visando a

produção de etanol 2G. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis/SC, 2014.

SANTOS, T. A. O. Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por *spray drying*. 82 f. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

SATIRO, J. R.; BARROS, P. H. S.; BRANDAO, M. C. et al. Estudo potencial da casca de coco verde para obtenção de etanol lignocelulósico. **Anais do Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**, Palmas, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHI, L., MA, F., HAN, Y., ZHANG, X., YU, H. Removal of sulfonamide antibiotics by oriented immobilized laccase on Fe₃O₄ nanoparticles with natural mediators. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 203–211, 2014.

SHIOTA, V. M. Secagem de celulases de origem fúngica por *spray-drying*. 116 f. **Dissertação de Mestrado** – Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2014.

SILVA, J. J.; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H.; SOUZA, S. G. H.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. v. 15, n. 2, supl. 1, p. 191-196, jul./dez. 2012.

SILVA, T. A. C. Caracterização bioquímica e secagem em *spray dryer* de lipases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*. 106 f. **Dissertação de Mestrado** – Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

SIMÕES, M. G. Desenvolvimento e crescimento da espécie de cogumelo *Pleurotus ostreatus* em garrafas de plástico reutilizável. 114f. **Dissertação (Tecnologia e Segurança Alimentar)** – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2015.

SNVS. SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. PORTARIA Nº 10/SNVS DE 08 DE MARÇO DE 1.985. **Atribui à DINAL a compilação da relação de substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas, cujo registro pode ser autorizado no brasil, em atividades agropecuárias e em produtos domissanitários e determina outras providências**. 1985. Disponível em: <<http://www.abccexpurgo.com.br/principal/legislacoes.asp?id=311>>. Acesso em 28/04/2017.

SOUZA, C. R. F. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bahinia forficata* Link pelos processos de *spray dryer* leito de jorro. 208 f. **Dissertação de Mestrado** - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão preto, 2003.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135 - 141, 1999.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. E. Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. **Mycology**, v. 81, p. 234-240, 1989.

TALENS-PERALES, D.; MARIN-NAVARRO, J.; POLAINA, J. Enzymes: Functions and Characteristics. **Encyclopedia of Food and Health**. p. 532 – 538, 2016.

TAMMINEN, M.; KARKMAN, A.; LÖHMUS, A.; MUZIASARI, W. I.; TAKASU, H.; WADA, S.; SUZUKI, S.; VIRTA, M. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 386-391, 2011.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81 – 90, 1999.

THOMAS, K.V. The relevance of different point sources. **Lecture given at the “First International Conference on Sustainable Pharmacy”**, 24–25. April 2008, Osnabrück, Germany <http://www.dbu.de/550artikel27307_135.html>.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v. 140, p. 19-26, 1994.

TINOCO, R.; PICKARD, A. M.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Kinetic differences of purified laccases of six strains *Pleurotus ostreatus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 331 – 335, 2001.

TLECUITL-BERISTAIN, S.; SÁNCHEZ, C.; LOERA, O.; ROBSON, G. D.; DÍASGODÍNEZ, G. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. **Mycological Research**, v. 112, p. 1080-1084, 2008.

TORRES, B.B. Elementos de enzimologia. In: BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, v. 1. São Paulo: Blucher, 2001. p. 151-176.

TRAN, N.H.; URASE, T.; KUSAKABE, O. Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase. **Journal of Water Environment Technology**, v. 8, p.125–140, 2010.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. v. 72, p.169-183, 2000.

VACCHERI, A.; BJERRUM, L.; RESI, D.; BERGMAN, U.; MONTANARO, N. Antibiotic prescribing in general practice: striking differences between Italy (Ravenna) and Denmark (Funen). **Journal Antimicrob. Chemoth.**, v. 50, p. 989–997, 2002.

VALASKOLÁ, V.; BALDRIAN, P. Estimulation of bound and free fractions of lignocellulose degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**, v. 157, p.

119-124, 2005.

VASCONCELOS, O. M. S. R. Degradação do Antibiótico Amoxicilina em Efluente de Indústria Farmacêutica. 136 f. **Dissertação de Mestrado** - Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2011.

VAZ JÚNIOR, S. Estudo da sorção do antibiótico Oxitetraciclina a solos e ácidos Húmicos e avaliação dos mecanismos de interação envolvidos. 184 f. **Tese de Doutorado**. Instituto de Química de São Paulo. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 4, p. 761-778, julho, 2014.

WINKLER, H.; LAWRENCE, J. R.; NEU, T. R. Selective degradation of ibuprofen and clofibrac acid in two model river biofilm systems. **Water Research**, v. 35, p. 3197 - 3205, 2001.

WONG, DWS. Structure and action mechanism of lignolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 157, p. 157-209, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva, 2015.

WU, N.; QIAO, M.; ZHANG, B.; CHENG, W. D.; ZHU, Y. G. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 18, p. 6933-6939, 2010.

XIMENES, M.T.; ALVES, W. A.; OLIVEIRA JUNIOR, V. X.; FIORITO, P.A.; HONÓRIO, K. M.; HOMEM-DE-MELLO, P.; **Estudo Teórico de Enzimas Multinucleares de Cobre para Proposta de Materiais Biomiméticos**. Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, SP, Brasil, 2009.

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 924-928, 1997.

YANG, S.; CARLSON, K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes. **Water Research**, v. 37, p. 4645–4656, 2003.

ZAVARZINA, A. G.; LEONTIEVSKY, A. A.; GOLOVLEVA, L. A.; TROFIMOV, S. Y. Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study. **Soil Biology Biochemistry**, v. 36, p. 359–369, 2004.

ZHANG, R.; ZHANG, R.; YU, K.; WANG, Y.; HUANG, X.; PEI, J.; WEI, C.; PAN, Z.; QIN, Z.; ZHANG, G. Occurrence, sources and transport of antibiotics in the surface water of coral reef regions in the South China Sea: potential risk to coral growth. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 450-457, janeiro, 2018.

ZHU, C.; BAO, G.; HUANG, S. Optimization of laccase production in the White-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC52857) induced through yeast extract and copper. **Agriculture and Environmental Biotechnology**, v. 30, p. 270-276, 2016.

APÊNDICE A – ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO-SE PH E TEMPERATURA

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO pH E TEMPERTAURA NO TEMPO 0								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	Ambiente	3184,62	6	Ambiente	2492,31	7	Ambiente	1096,92
		2738,46			2461,53			1083,07
		3323,07			2523,07			1107,69
	Média	3082,05		Média	2492,30		Média	1095,89
	Desvio-padrão	305,50		Desvio-padrão	30,77		Desvio-padrão	12,34
	30	3787,69		30	3313,64		30	1358,46
		3978,46			3338,46			1340
		3843,07			3295,48			1372,3
	Média	3869,74		Média	3315,86		Média	1356,92
	Desvio-padrão	98,14		Desvio-padrão	21,57		Desvio-padrão	16,20
	40	3329,23		40	3164,52		40	1261,54
		3283,07			3123,07			1238,46
3356,92		3184,62	1273,84					
Média	3323,07	Média	3157,40	Média	1257,94			
Desvio-padrão	37,31	Desvio-padrão	31,38	Desvio-padrão	17,96			
50	2240	50	3233,85	50	1344,62			
	2289,23		3206,15		1332,3			
	2190,76		3258,46		1370,76			
Média	2239,90	Média	3232,82	Média	1349,23			
Desvio-padrão	49,23	Desvio-padrão	26,17	Desvio-padrão	19,64			
60	913,85	60	2950,77	60	1064,62			
	873,84		2907,69		1049,23			
	932,3		2969,23		1081,53			
Média	906,66	Média	2942,56	Média	1065,13			
Desvio-padrão	29,88	Desvio-padrão	31,58	Desvio-padrão	16,15			

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO pH E TEMPERTAURA NO TEMPO 1h								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	25	2190,77	6	25	2858,46	7	25	841,54
		2227,69			2910,8			860
		2203,07			2830,8			832,31
	Média	2207,17		Média	2866,68		Média	844,61
	Desvio-padrão	18,79		Desvio-padrão	40,63		Desvio-padrão	14,09
	30	2680		30	2830,77		30	1283,01
		2652,3			2812,3			1258,05
		2710,76			2861,53			1276,92
	Média	2681,02		Média	2834,86		Média	1272,66
	Desvio-padrão	29,24		Desvio-padrão	24,86		Desvio-padrão	13,01
	40	1384,62		40	2658,46		40	1084,62
		1347,7			2636,92			1063,1
1409,2		2670,76	1095,4					
Média	1380,50	Média	2655,38	Média	1081,04			
Desvio-padrão	30,95	Desvio-padrão	17,12	Desvio-padrão	16,44			
50	1080	50	2033,85	50	1315,38			
	1033,8		2003,07		1333,15			
	1113,84		2058,46		1293,08			
Média	1075,88	Média	2031,79	Média	1313,87			
Desvio-padrão	40,17	Desvio padrão	27,75	Desvio-padrão	20,07			
60	227,69	60	883,08	60	400			
	196,92		876,92		404,62			
	246,15		923,08		383,03			
Média	223,58	Média	894,36	Média	395,88			
Desvio-padrão	24,87	Desvio-padrão	25,06	Desvio-padrão	11,36			

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO PH E TEMPERATURA NO TEMPO 2h								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	25	1944,62	6	25	2563,08	7	25	910,77
		1913,84			2535,38			896,92
		1966,07			2590,76			932,31
	Média	1941,51		Média	2563,07		Média	913,33
	Desvio Padrão	26,2		Desvio-Padrão	27,69		Desvio-Padrão	17,83
	30	1987,69		30	2473,85		30	1043,08
		1953,84			2430,8			1021,5
		2012,3			2501,5			1058,5
	Média	1984,61		Média	2468,71		Média	1041,02
	Desvio Padrão	29,35		Desvio-Padrão	35,62		Desvio-Padrão	18,58
	40	667,69		40	1960		40	989,23
		683,08			1929,23			1004,06
		646,15			1987,69			975,38
	Média	665,64		Média	1958,97		Média	989,55
	Desvio Padrão	18,55		Desvio-Padrão	29,24		Desvio-Padrão	14,34
	50	415,38		50	458,46		50	146,15
		387,69			436,92			124,62
		440			483,08			160
	Média	414,35		Média	459,48		Média	143,59
	Desvio Padrão	26,17		Desvio-Padrão	23,09		Desvio-Padrão	17,82
60	123,08	60	193,85	60	106,15			
	101,54		166,15		93,84			
	147,69		209,23		118,46			
Média	124,10	Média	189,74	Média	106,15			
Desvio-Padrão	23,09	Desvio-Padrão	21,83	Desvio-Padrão	12,31			

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO PH E TEMPERATURA NO TEMPO 3h								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	25	1726,15 1707,69 1763,07	6	25	2381,54 2347,7 2427,7	7	25	900 883,08 924,62
	Média	1732,30		Média	2385,64		Média	902,56
	Desvio-Padrão	28,19		Desvio-Padrão	40,15		Desvio-Padrão	20,88
	30	147,69 166,15 209,23		30	2150,32 2126,2 2172,3		30	821,54 812,31 835,38
	Média	174,35		Média	2149,60		Média	823,07
	Desvio-Padrão	31,58		Desvio-Padrão	23,05		Desvio-Padrão	11,61
	40	504,62 520 473,85		40	1929,23 1963,07 1901,53		40	804,62 787,69 816,92
	Média	499,49		Média	1931,27		Média	803,07
	Desvio-Padrão	23,49		Desvio-Padrão	30,82		Desvio-Padrão	14,67
	50	233,85 212,3 264,61		50	267,69 292,3 249,23		50	83,08 69,23 96,92
	Média	236,92		Média	269,74		Média	83,07
	Desvio-Padrão	26,28		Desvio-Padrão	21,60		Desvio-Padrão	13,84
	60	113,85 135,38 92,3		60	184,62 156,92 200		60	30,77 16,92 46,15
	Média	113,84		Média	180,51		Média	31,28
	Desvio-Padrão	21,54		Desvio-Padrão	21,83		Desvio-Padrão	14,62

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO PH E TEMPERATURA NO TEMPO 4h								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	25	1612,31	6	25	2292,31	7	25	735,38
		1590,76			2273,8			718,46
		1640			2320			750,77
	Média	1614,35		Média	2295,37		Média	734,87
	Desvio-Padrão	24,68		Desvio-Padrão	23,25		Desvio-Padrão	16,16
	30	212,31		30	1981,53		30	452,31
		224,62			1996,92			466,15
		184,62			1944,61			443,08
	Média	207,18		Média	1974,35		Média	453,84
	Desvio-Padrão	20,48		Desvio-Padrão	26,88		Desvio-Padrão	11,61
	40	187,69		40	1821,54		40	761,54
		203,08			1800			746,15
		156,92			1836,92			773,85
	Média	182,56		Média	1819,48		Média	760,51
	Desvio-Padrão	23,50		Desvio-Padrão	18,54		Desvio-Padrão	13,87
	50	150,77		50	307,69		50	75,38
		132,31			283,08			69,23
		181,54			341,54			95,38
	Média	154,87		Média	310,77		Média	79,99
	Desvio-Padrão	24,87		Desvio-Padrão	29,35		Desvio-Padrão	13,67
60	113,85	60	138,46	60	75,38			
	89,23		163,08		84,61			
	129,23		116,92		58,46			
Média	110,77	Média	139,48	Média	72,81			
Desvio-Padrão	20,17	Desvio-Padrão	23,09	Desvio-Padrão	13,26			

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO PH E TEMPERATURA NO TEMPO 5h								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	25	1196,92	6	25	2215,38	7	25	589,23
		1166,15			2178,5			467,69
		1218,46			2240			496,92
	Média	1193,83		Média	2211,29		Média	517,94
	Desvio-Padrão	26,29		Desvio-Padrão	30,95		Desvio-Padrão	63,43
	30	147,69		30	1787,69		30	440
		172,31			1827,69			449,23
		126,15			1753,84			424,62
	Média	148,71		Média	1789,74		Média	437,95
	Desvio-Padrão	23,09		Desvio-Padrão	36,96765		Desvio-Padrão	12,43
	40	255,38		40	833,85		40	775,38
		233,84			815,38			793,85
		273,84			864,61			761,54
	Média	254,35		Média	837,94		Média	776,92
	Desvio-Padrão	20,01		Desvio-Padrão	24,86		Desvio-Padrão	16,21
	50	126,15		50	246,15		50	46,15
		153,85			273,84			32,3
		107,69			215,38			50,76
	Média	129,23		Média	245,12		Média	43,07
	Desvio-Padrão	23,23		Desvio-Padrão	29,24		Desvio-Padrão	9,60
60	92,31	60	116,92	60	69,23			
	110,77		135,38		80			
	83,07		95,38		55,38			
Média	95,38	Média	115,89	Média	68,20			
Desvio-Padrão	14,10	Desvio-Padrão	20,01	Desvio-Padrão	12,34			

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO PH E TEMPERATURA NO TEMPO 6h								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	25	1064,61	6	25	1950,76	7	25	483,07
		1040			1975,38			495,38
	Média	1083,07		Média	1935,38		Média	455,38
		1062,56			1953,84			477,94
	Desvio-Padrão			Desvio-Padrão			Desvio-Padrão	20,48
		21,60			20,17			
	30	132,3		30	1507,69		30	229,23
		126,15			1532,31			241,54
	Média	98,46		Média	1547,69		Média	220
		118,97			1529,23			230,25
	Desvio-Padrão			Desvio-Padrão			Desvio-Padrão	10,80
		18,02			20,17			
	40	169,23		40	378,46		40	689,23
		193,85			403,08			707,69
	Média	147,69		Média	350,77		Média	670,77
		170,25			377,43			689,23
	Desvio-Padrão			Desvio-Padrão	26,17001		Desvio-Padrão	18,46
		23,09						
	50	76,92		50	200		50	27,69
		98,46			175,38			36,92
Média	80	Média	218,46	Média	32,3			
	85,12		197,94		32,30			
Desvio-Padrão		Desvio-Padrão	21,61	Desvio-Padrão	4,61			
	11,64							
60	12,31	60	98,46	60	20			
	15,38		126,15		32,3			
Média	18,46	Média	80	Média	10,76			
	15,38		101,53		21,02			
Desvio-Padrão		Desvio-Padrão	23,22	Desvio-Padrão	10,80			
	3,07							

ATIVIDADE ENZIMÁTICA VARIANDO PH E TEMPERATURA NO TEMPO 24h								
pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Atividade (U.mL ⁻¹)
5	25	1098,46	6	25	1720	7	25	353,85
		1061,53			1763,07			326,77
		1116,92			1704,61			370,06
	Média	1092,30		Média	1729,22		Média	350,22
	Desvio-Padrão	28,20		Desvio-Padrão	30,30		Desvio-Padrão	21,87
	30	107,69		30	916,92		30	180
		132,1			895,38			160
		98,46			941,53			196,92
	Média	112,75		Média	917,94		Média	178,97
	Desvio-Padrão	17,38		Desvio-Padrão	23,09		Desvio-Padrão	18,48
	40	12,31		40	378,46		40	452,31
		15,38			353,85			470,77
		12,31			390,77			438,46
	Média	13,33		Média	374,36		Média	453,84
	Desvio-Padrão	1,77		Desvio-Padrão	18,79		Desvio-Padrão	16,20
	50	21,53		50	12,31		50	6,15
18,46		18,46	4,61					
27,69		15,38	7,69					
Média	22,56	Média	15,38	Média	6,15			
Desvio-Padrão	4,70	Desvio-Padrão	3,07	Desvio-Padrão	1,54			
60	3,08	60	12,31	60	10,77			
	6,15		6,15		6,15			
	3,08		15,38		13,84			
Média	4,10	Média	11,28	Média	10,25			
Desvio-Padrão	1,77	Desvio-Padrão	4,70	Desvio-Padrão	3,87			

**APÊNDICE B – RESULTADOS DOS TESTES DE LINEARIDADE, PRECISÃO E
EXATIDÃO**

TESTE DE LINEARIDADE

Concentração teórica (mg.L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)	Área do pico (ua)	Concentração real (mg.L ⁻¹)
0,1	4,072	8773	0,100
0,5	4,064	39339	0,500
1,3	4,069	102064	1,255
2,5	4,066	200566	2,495
5,0	4,059	397645	4,992
7,5	4,055	600703	7,515
10,0	4,058	807313	10,042
15,0	4,067	1192343	14,933

TESTE DE PRECISÃO

Análise	Concentração teórica (mg.L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)	Área do pico (ua)	Concentração real (mg.L ⁻¹)
1	10,0	4,100	785538	9,832
2	10,0	4,099	809483	10,133
3	10,0	4,101	805168	10,078
4	10,0	4,093	804383	10,069
5	10,0	4,095	799091	10,002
6	10,0	4,101	760497	9,518

TESTE DE EXATIDÃO

Análise	Concentração teórica (mg.L ⁻¹)	Tempo de retenção (min)	Área do pico (ua)	Concentração real (mg.L ⁻¹)
CQA - 1	12,0	4,108	865728	10,838
CQA - 2	12,0	4,104	922460	11,549
CQA - 3	12,0	4,100	973495	12,189
CQM - 1	5,0	4,091	381782	4,770
CQM - 2	5,0	4,088	391078	4,886
CQM - 3	5,0	4,097	387882	4,846
CQB - 1	0,3	4,098	25264	0,299
CQB - 2	0,3	4,101	25086	0,297
CQB - 3	0,3	4,096	25499	0,302