

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DAYANE MOREIRA BRAGA

**PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO POR *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs)
E APLICAÇÃO DE LACASES FÚNGICAS NA BIODEGRADAÇÃO DE
CIPROFLOXACINO**

CURITIBA

2021

DAYANE MOREIRA BRAGA

**PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO POR *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs)
E APLICAÇÃO DE LACASES FÚNGICAS NA BIODEGRADAÇÃO DE
CIPROFLOXACINO**

**Production, immobilization by *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs) and
application of fungi laccases in the biodegradation of Ciprofloxacin**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência em Tecnologia Ambiental
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Giselle Maria Maciel.
Coorientadora: Dr.^a Tatiane Brugnari.

CURITIBA

2021



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

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



DAYANE MOREIRA BRAGA

**PRODUÇÃO, IMOBILIZAÇÃO POR CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES (CLEAS) E
APLICAÇÃO DE
LACASES FÚNGICAS NA BIODEGRADAÇÃO DE CIPROFLOXACINO**

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

Data de aprovação: 15 de Outubro de 2021

Prof.a Cristina Giatti Marques De Souza, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Prof.a Rosane Marina Peralta, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Prof.a Tatiane Brugnari, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 15/10/2021.

*Dedico este trabalho aos meus pais **José**
e **Evanilde** pelo incentivo e apoio nos
meus estudos, pelos valiosos
ensinamentos e, sobretudo, pelo amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao maravilhoso *Deus* pela vida, pelas infinitas bênçãos e pela proteção.

Aos meus pais *José G. Braga e Evanilde M. Braga* pelo suporte, pelo cuidado, pelo imensurável amor, por quem sou e por tudo que alcancei até aqui.

À minha irmã *Franciele M. Braga* por todo o exemplo e amizade.

Ao meu sobrinho *Arthur Braga Oltramari* minha fonte inesgotável de amor e alegrias. Seria incapaz de descrever o que o *Arthur* representa. Ele tem em si todo o amor do mundo e eu a sorte de tê-lo em minha vida. *Arthur*, a Dida te ama tanto! Obrigada por existir, meu amor.

Ao meu amado *Moisés Borgo* agradeço por tudo que faz. Especialmente, por sempre me motivar, por acreditar em mim, por me fazer sorrir, por estar sempre comigo, pela paciência, companheirismo, amizade, amor e pelas palavras de conforto nos momentos mais difíceis. Você é incrível, meu amor.

À minha avó *Alzira de Souza Moreira* cujo amor, carinho, torcida e orações nunca faltam.

À minha orientadora *Professora Doutora Giselle Maria Maciel* pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelos valiosos ensinamentos, pelo direcionamento e pelo carinho de sempre. *Giselle*, o meu obrigada se estende por todos os anos em que você me orientou e me acompanhou ao longo da minha trajetória acadêmica. Das Iniciações Científicas ao Mestrado, foram tantos anos que você me incentivou. A você, meu mais profundo agradecimento.

À minha coorientadora maravilhosa *Doutora Tatiane Brugnari. Tati*, é difícil expressar em palavras o tamanho da gratidão que eu sinto em ter te conhecido e ter você tão presente. Serei eternamente grata por todo o conhecimento compartilhado, por toda a sua ajuda e também por sua amizade. Você é uma pessoa ímpar e uma pesquisadora brilhante. Minha inspiração. De coração, muito obrigada.

Às *Professoras Doutoras Cristina Giatti Marques de Souza, Rosane Marina Peralta e Marlene Soares* pela disponibilidade, interesse e pelas valiosas considerações neste projeto.

Aos *amigos e colegas* dos Laboratórios de Biotecnologia e Microbiologia do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da UTFPR pelos bons momentos compartilhados ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À *Isabela de Andrade* pela valiosa amizade e por compartilhar as histórias da doce *Catarina*.

À *Aline Bisinella Ianoski*, minha amiga da graduação e, hoje, companheira de trabalho, pelas conversas, risadas e amizade.

À *Avany Judith Ferraro Miorim* pela companhia e ajudas dadas no final do meu projeto.

Ao *Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA)* da *Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR)*, especialmente à *Rafaela Imoski* e à *Luana Mayumi*, pelo auxílio nas análises cromatográficas.

A todos os *professores* do *Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA)* por todo o conhecimento compartilhado ao longo da pós-graduação.

À *UTFPR* por disponibilizar os recursos necessários para a realização deste trabalho. E também à *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES (BRASIL)* pelo apoio financeiro - Código de Financiamento 001.

A todos, muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa

RESUMO

BRAGA, D. M. **Produção, imobilização por *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs) e aplicação de lacases fúngicas na biodegradação de ciprofloxacino.** 2021. 104 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2021.

A ocorrência e os impactos adversos à saúde e ao meio ambiente causados pelos contaminantes emergentes (CE) têm despertado considerável preocupação nos últimos anos. Especialmente para os antibióticos, a presença generalizada em compartimentos ambientais, em decorrência do descarte inadequado ou da alta porcentagem de excreção após a administração, pode desencadear o desenvolvimento e a disseminação da resistência bacteriana, um problema grave de saúde pública. Até o momento, várias abordagens foram investigadas para a remoção dos fármacos presentes em efluentes através de estratégias de tratamentos alternativos aos convencionais. Nesse contexto, a biodegradação enzimática, principalmente com o uso de lacases (EC 1.10.3.2), recebeu considerável atenção. Para melhorar a estabilidade enzimática e possibilitar o reuso das lacases em ciclos biocatalíticos, diferentes técnicas de imobilização são empregadas, incluindo a metodologia *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs). Neste trabalho, lacases foram produzidas em duas condições utilizando fungos da podridão branca: (i) por monocultivo do *Trametes villosa* e (ii) pelo cultivo em pares do *T. villosa* com *Pycnoporus* sp., reportado pela primeira vez na literatura. O extrato bruto de *T. villosa* e de *Pycnoporus* sp., expressaram como proteínas principais lacases com massas moleculares aparentes entre 55 e 45 kDa e ambas foram identificadas no co-cultivo. Os extratos brutos dos dois cultivos foram imobilizados por CLEAs, utilizando sulfato de amônio 75% como precipitante e glutaraldeído como agente reticulador nas concentrações de 200 mM para lacases de *T. villosa* (Lac-TvL) e 162,5 mM para lacases do co-cultivo (Lac-CO). Após otimização as recuperações enzimáticas corresponderam a $27,77 \pm 1,07\%$ para CLEAs de *T. villosa* (CLEAs-TvL) e $35,38 \pm 0,95\%$ para CLEAs do co-cultivo (CLEAs-CO), após 3h de reação a 22 °C, de modo estático. As Lac-CO em sua forma livre demonstraram maior estabilidade térmica e ao pH do que as Lac-TvL. Lacases livres e imobilizadas apresentaram temperatura ótima para atividade catalítica entre 50 a 60 °C e pH ótimo ácido (entre 2,4 a 3,0). A imobilização dos extratos aumentou a termoestabilidade a 40 °C, retendo 100% da atividade residual após 180 min de reação, enquanto as formas livres Lac-TvL e Lac-CO mantiveram $82,08 \pm 1,14\%$ e $89,98 \pm 1,90\%$ de atividade, respectivamente. Em 55 °C, CLEAs-TvL mantiveram $79,37 \pm 0,40\%$, valor 1,5 vezes maior do que foi obtido pela forma livre após 180 min; enquanto os CLEAs-CO apresentaram $88,59 \pm 0,52\%$ de atividade residual, 11% a mais do que Lac-CO livres. Lacases livres e CLEAs removeram com a mesma eficiência o fármaco ciprofloxacino ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), atingindo de 53 a 62% de biodegradação após 24h de reação (a 40 °C e 150 rpm) com o uso de ácido 4-hidroxibenzoico (HBA) como mediador, com redução da ação antimicrobiana sobre cepas de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: Co-cultivo. *Trametes villosa*. *Pycnoporus* sp. Fungos da Podridão Branca. Biorremediação.

ABSTRACT

BRAGA, D. M. **Production, immobilization by *Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs)* and application of fungi laccases in the biodegradation of Ciprofloxacin**. 2021. 104 p. Master Thesis (Graduate Program in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology. Curitiba, 2021.

The occurrence and adverse impacts on health and the environment caused by emerging contaminants (EC) have been of considerable concern in recent years. Especially for antibiotics, their widespread presence in the environmental compartments, due to inadequate disposal or high percentage of excretion after administration, can trigger the development and dissemination of bacterial resistance, a serious public health problem. Until now, several approaches have been investigated for the removal of drugs present in effluents through alternative to conventional treatment strategies. In this context, enzymatic biodegradation, mainly with the use of laccases (EC 1.10.3.2), has received considerable attention. To improve enzymatic stability and enable the reuse of laccases in biocatalytic cycles, different immobilization techniques are employed, including the Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) methodology. In this work, laccases were produced under two conditions using white rot fungi: (i) by monoculture of *Trametes villosa* and (ii) by co-culture of *T. villosa* with *Pycnoporus* sp., reported for the first time in the literature. The crude extract of *T. villosa* and *Pycnoporus* sp., expressed as main proteins laccases with apparent molecular masses between 55 and 45 kDa and both were identified in the co-culture. The crude extracts from the two cultures were immobilized by CLEAs, using 75% ammonium sulfate as a precipitant and glutaraldehyde as a crosslinking agent at concentrations of 200 mM for *T. villosa* laccases (Lac-TvL) and 162.5 mM for co-culture laccases (Lac-CO). After optimization, the enzymatic recoveries corresponded to $27.77 \pm 1.07\%$ for *T. villosa* CLEAs (CLEAs-TvL) and $35.38 \pm 0.95\%$ for co-culture CLEAs (CLEAs-CO), after 3h of reaction at 22 °C, statically. Lac-CO in its free form showed greater thermal and pH stability than Lac-TvL. Free and immobilized laccases showed optimal temperature for catalytic activity between 50 to 60 °C and optimal acidic pH (between 2.4 and 3.0). The immobilization of extracts increased the thermostability at 40 °C, retaining 100% of the residual activity after 180 min of reaction, while the free forms Lac-TvL and Lac-CO maintained $82.08 \pm 1.14\%$ and $89.98 \pm 1.90\%$ activity, respectively. At 55 °C, CLEAs-TvL maintained $79.37 \pm 0.40\%$, a value 1.5 times greater than that obtained for the free form after 180 min; while CLEAs-CO presented $88.59 \pm 0.52\%$ of residual activity, 11% more than free Lac-CO. Free laccases and CLEAs removed with the same efficiency the drug ciprofloxacin (2.5 mg L^{-1}), reaching 53 to 62% of biodegradation after 24h of reaction (40 °C and 150 rpm) with the use of 4-hydroxybenzoic acid (HBA) as a mediator, with reduced antimicrobial action on strains of *Escherichia coli*.

Keywords: Co-culture. *Trametes villosa*. *Pycnoporus* sp. White-Rot Fungi. Bioremediation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Estrutura molecular do fármaco ciprofloxacino (C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃), um antibiótico pertencente à classe das fluoroquinolonas	26
Figura 2 — Representação do branqueamento de materiais ligninocelulósicos pela ação de Fungos da Podridão Branca. Em destaque o aspecto esbranquiçado da madeira pela ação do <i>Pycnoporus sanguineus</i>	28
Figura 3 — Representação dos fungos da podridão branca utilizados para a investigação da produção de lacases ^a	31
Figura 4 — Representação da estrutura tridimensional (A) e do sítio catalítico (B) de lacases de <i>Trametes versicolor</i> obtidas pelo banco de dados de proteínas (RCBS PDB) pelo código 1GYC ^a	34
Figura 5 — Representação do mecanismo de ação das lacases ^a	35
Figura 6 — Representação da imobilização enzimática pela metodologia CLEAs indicando as etapas de precipitação e reticulação da enzima dissolvida	38
Figura 7 — Fluxograma indicando o resumo das etapas desenvolvidas neste trabalho	43
Figura 8 — Esquema para avaliação dos precipitantes (1) na atividade enzimática das lacases ressuspendidas em tampão acetato (50 mM, pH 5,0) e (2) na atividade resultante após o processo de imobilização sob interferência de cada precipitante avaliado.....	48
Figura 9 — Interações miceliais em placas de ágar batata dextrose dos cultivos isolados e das associações entre <i>Trametes villosa</i> e <i>Pycnoporus</i> sp., <i>Lentinus crinitus</i> e <i>Agaricus bisporus</i> , após 14 dias a 28 °C.....	57
Figura 10 — Evidências do processo de pigmentação após contato micelial de <i>Trametes villosa</i> e <i>Lentinus crinitus</i> registradas nos períodos de 4, 7 dias ^a e 10 dias	58
Figura 11 — Cinética da produção de lacases dos cultivos isolados de <i>Trametes villosa</i> (●), de <i>Pycnoporus</i> sp. (○) e do co-cultivo (●) de ambos nos períodos de 3, 5, 7, 10 e 14 dias a 28 °C, em cultura semissólida estacionária ^a	59
Figura 12 — Co-cultivo dos fungos <i>Trametes villosa</i> e <i>Pycnoporus</i> sp. após 10 dias de incubação em meio semissólido estacionário ^a	61

Figura 13 — Caracterização das isoenzimas de lacase por SDS-PAGE (A) e zimograma pela reação com ABTS (B) das monoculturas de <i>T. villosa</i> e <i>Pycnoporus</i> sp. (P) e do co-cultivo ^a	62
Figura 14 — Efeito de precipitantes na formação dos CLEAs de lacases de <i>T. villosa</i> (A) e do co-cultivo de <i>T. villosa</i> com <i>Pycnoporus</i> sp (B). Glutaraldeído foi adicionado como agente reticulador totalizando uma concentração de 100 mM ^a	63
Figura 15 — Efeito do tempo de reticulação em diferentes condições operacionais na formação dos CLEAs de <i>Trametes villosa</i> (A) e de co-cultivo de <i>T. villosa</i> com <i>Pycnoporus</i> sp. (B). A concentração enzimática foi mantida em 2 U mL ⁻¹ . Sulfato de amônio (75%, m/v) e glutaraldeído (concentração final de 100 mM) foram utilizados para a imobilização ^a	65
Figura 16 — Diagrama de Pareto indicando a significância da concentração de lacases e de glutaraldeído (p < 0,05) do planejamento experimental fatorial completo 3 ⁽²⁻⁰⁾ na recuperação de atividade dos CLEAs de lacases de <i>T. villosa</i>	68
Figura 17 — Valores desejáveis estatisticamente para concentração de lacases de <i>Trametes villosa</i> e glutaraldeído na imobilização por CLEAs ^a	69
Figura 18 — Gráfico de superfície indicando a tendência de aumento de recuperação de atividade nos pontos ótimos determinados estatisticamente ^a	69
Figura 19 — Diagrama de Pareto indicando a significância da concentração de lacases e de glutaraldeído (p < 0,05) do planejamento experimental fatorial completo ⁽²⁻⁰⁾ na recuperação de atividade dos CLEAs de lacases do co-cultivo	70
Figura 20 — Valores desejáveis estatisticamente para concentração de lacases do co-cultivo e glutaraldeído na imobilização por CLEAs ^a	71
Figura 21 — Interações entre concentração de lacases de co-cultivo e glutaraldeído para os pontos desejáveis obtidos estatisticamente	71
Figura 22 — Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade de lacases livres (●) e CLEAs (□) de <i>Trametes villosa</i> e de lacases livres (●) e CLEAs (□) do co-cultivo de <i>T. villosa</i> com <i>Pycnoporus</i> sp. ^a	74
Figura 23 — Estabilidade térmica das lacases livres (●) e CLEAs (□) de <i>Trametes villosa</i> e de lacases livres (●) e CLEAs (□) do co-cultivo com <i>Pycnoporus</i> sp. determinadas a 40 e 55 °C até 180 min ^a	76
Figura 24 — Estudo dos parâmetros cinéticos aparentes obtidos pela representação gráfica da equação de Michaelis-Menten (1), Eadie-Hofstee (2) e Lineweaver-Burk (3). As velocidades iniciais das reações foram determinadas utilizando ABTS como	

substrato da reação cujas concentrações variaram de 500 até 25000 μM , a 40 °C ^a	78
Figura 25 — Comparação da degradação consecutiva de ABTS pelos CLEAs de lacases de <i>Trametes villosa</i> (□) e do co-cultivo de <i>T. villosa</i> e <i>Pycnoporus</i> sp. (□) ^a	80
Figura 26 — Degradação de ciprofloxacino (5 mg L ⁻¹ , a 40 °C e 150 rpm) em diferentes períodos sob a ação de lacases livres de <i>Trametes villosa</i> (●) e do co-cultivo (●) e dos CLEAs de <i>Trametes villosa</i> (□) do co-cultivo com <i>Pycnoporus</i> sp. (□) (500 U L ⁻¹ cada) ^a	82
Figura 27 — Degradação de ciprofloxacino (5 mg L ⁻¹) após 24h (40 °C, 150 rpm) sob a ação de lacases livres e CLEAs de <i>Trametes villosa</i> e do co-cultivo com <i>Pycnoporus</i> sp. (500 U L ⁻¹ cada) avaliando a presença de HBA como mediador da reação ^a	83
Figura 28 — Degradação de ciprofloxacino (2,5 mg L ⁻¹) após 24h (40 °C, 150 rpm) sob a ação de lacases livres e CLEAs de <i>Trametes villosa</i> e do co-cultivo com <i>Pycnoporus</i> sp. (500 U L ⁻¹ cada) avaliando a presença de HBA como mediador da reação ^a	85
Figura 29 — Análise da interferência do processo de fervura para inativação enzimática na decomposição térmica de ciprofloxacino	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Concentrações de ciprofloxacino detectadas em algumas regiões do mundo em matrizes líquidas (ng L ⁻¹) e biossólidos (ng g ⁻¹ , em peso seco) ^a	27
Tabela 2 — Variações na formação de CLEAs de lacase em termos da natureza da enzima, tipos de agentes de precipitação e reticulação e condições operacionais empregadas. A recuperação da atividade é dada pela atividade final dos CLEAs dividida pela atividade inicial do extrato enzimático aplicado	40
Tabela 3 — Produção de lacases após 7 dias a 28 °C pelo cultivo isolado dos fungos <i>Trametes villosa</i> , <i>Pycnoporus</i> sp., <i>Lentinus crinitus</i> e <i>Agaricus bisporus</i> e pelo co-cultivo de <i>T. villosa</i> com <i>Pycnoporus</i> sp., <i>L. crinitus</i> e <i>A. bisporus</i> . Todos em meio semissólido estacionário composto por: glicose 10 g L ⁻¹ ; KH ₂ PO ₄ 3 g L ⁻¹ ; peptona 0,5%; casca de arroz 1%; bagaço de uva 0,5%; bagaço de cana 2% e MnSO ₄ , CuSO ₄ , FeSO ₄ , ZnSO ₄ e de MgSO ₄ 1 mM.....	55
Tabela 4 — Atividade Recuperada (AR, %) e Rendimento de Imobilização (RI, %) para CLEAs de lacases de <i>Trametes villosa</i> e do co-cultivo de <i>T. villosa</i> com <i>Pycnoporus</i> sp., seguindo o planejamento experimental fatorial completo 3 ⁽²⁻⁰⁾ ^a	67
Tabela 5 — Constantes cinéticas aparentes das lacases livres e imobilizadas por CLEAs de <i>Trametes villosa</i> e do co-cultivo com <i>Pycnoporus</i> sp. ^a	79
Tabela 6 — Valores de concentração mínima inibitória para <i>E. coli</i> após diferentes tratamentos enzimáticos com lacases livres e imobilizadas, na ausência e presença de HBA como mediador	86
Tabela 7 — Parâmetros para validação do método cromatográfico para detecção e quantificação de Ciprofloxacino.....	102
Tabela 8 — ANOVA da recuperação da atividade enzimática de CLEAs de <i>Trametes villosa</i> em função da concentração de lacases e glutaraldeído (p < 0,05)	103
Tabela 9 — ANOVA da recuperação da atividade enzimática de CLEAs do co-cultivo em função da concentração de lacases e glutaraldeído (p < 0,05)	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 — Matriz experimental do planejamento fatorial completo $3^{(2-0)a}$	49
Quadro 2 — Condições cromatográficas para detecção e quantificação do Ciprofloxacino.....	53

LISTA DE ABREVIações

CEs: Contaminantes Emergentes

LME: *Lignin Modifying Enzymes*

CLEAs: *Cross-Linked Enzyme Aggregates*

ETE: Estações de Tratamento de Efluentes

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

BDA: Ágar Batata Dextrose

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

HBA: ácido 4-hidroxibenzoico

HBT: 1-hidroxibenzotriazole

LiP: Lignina Peroxidase

MnP: Manganês Peroxidase

VP: Versátil Peroxidase

PEG: Polietilenoglicol

FPB: Fungos da Podridão Branca

GA: Glutaraldeído

EDAC: Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida

OMS: Organização Mundial da Saúde

CIPX: Ciprofloxacino

FQs: Fluoroquinolonas

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD: Detector de Arranjo de Diodos

ACN: Acetonitrila

RI: Rendimento de Imobilização

AR: Atividade Recuperada

LQ: Limite de Quantificação

LD: Limite de Detecção

MIC: Concentração Mínima Inibitória

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES	21
3.1.1 Legislação vigente para o descarte de contaminantes emergentes	22
3.1.2 Tratamentos consolidados e alternativos dos contaminantes emergentes	23
3.2 ANTIBIÓTICOS	24
3.2.1 Antibiótico ciprofloxacino	25
3.3 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA	28
3.4 LACASES.....	30
3.4.1 Características gerais e aplicações biotecnológicas	30
3.4.2 Lacases fúngicas e condições de cultivo	31
3.4.3 Estrutura molecular das lacases fúngicas	33
3.4.4 Mecanismo de ação	35
3.5 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	36
3.5.1 Imobilização por <i>Cross-Linked Enzyme Aggregates</i>	37
3.5.1.1 Precipitação enzimática.....	41
3.5.1.2 Agregação de enzimas precipitadas.....	41
4 METODOLOGIA	43
4.1 CULTIVO DE BASIDIOMICETOS E PREPARO DO INÓCULO.....	43
4.2 PRODUÇÃO DE LACASES E OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO	

4.3 INTERAÇÕES MICELIAIS DOS FUNGOS BASIDIOMICETOS EM CO-CULTIVO	
45	
4.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE POR SDS-PAGE E ZIMOGRAMA.....	45
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	46
4.5.1 Determinação da atividade de lacase	46
4.5.2 Determinação da atividade de lignina peroxidase	47
4.5.3 Determinação da atividade de manganês peroxidase	47
4.6 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE LACASE POR <i>CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES</i>	47
4.6.1 Seleção do agente precipitante na formação de CLEAs.....	47
4.6.2 Investigação das condições operacionais para imobilização	49
4.6.3 Variação da concentração enzimática e de glutaraldeído na formação dos CLEAs de lacases	49
4.6.4 Avaliação dos parâmetros de imobilização	50
4.7 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LACASES LIVRES E IMOBILIZADAS	50
4.7.1 Determinação de temperatura e pH ótimos	50
4.7.2 Estudo de estabilidade térmica.....	51
4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes	51
4.7.4 Reusabilidade dos CLEAs de lacase.....	51
4.8 BIODEGRADAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO CIPROFLOXACINO .	52
4.8.1 Biodegradação <i>in vitro</i> do fármaco ciprofloxacino	52
4.8.2 Condições cromatográficas e validação do método analítico para a quantificação de Ciprofloxacino	52
4.8.3 Ensaio de inibição de crescimento bacteriano.....	53
5 RESULTADOS.....	55
5.1 PRODUÇÃO DE LACASES POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SEMISSÓLIDO ESTACIONÁRIO	55

5.2 INTERAÇÕES MICELIAIS DOS CULTIVOS BINÁRIOS.....	56
5.3 CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	58
5.3.1 Caracterização do extrato bruto por SDS-PAGE e zimograma	61
5.4 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	63
5.4.1 Seleção do agente precipitante para a formação do imobilizado	63
5.4.2 Variação das condições reacionais para obtenção do imobilizado.....	64
5.4.3 Variação da concentração enzimática e de glutaraldeído na formação dos CLEAs de lacases	66
5.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA.....	73
5.5.1 Determinação de temperatura e pH ótimos	73
5.5.2 Estabilidade térmica.....	76
5.5.3 Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes	77
5.5.4 Reusabilidade dos CLEAs de lacases	80
5.6 BIODEGRADAÇÃO <i>in vitro</i> DE CIPROFLOXACINO	81
5.6.1 Ensaio de inibição de crescimento bacteriano.....	86
6 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE A — VERIFICAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO PROCESSO DE FERVURA NA DEGRADAÇÃO DE CIPROFLOXACINO.....	100
APÊNDICE B — CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO DO CIPROFLOXACINO	101
APÊNDICE C — DADOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	102
APÊNDICE D — DADOS DA ANOVA DOS DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS	103

1 INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes (CEs) compreendem uma classe de substâncias comumente utilizadas diariamente para diversas finalidades, incluindo produtos de cuidados pessoais, hormônios sintéticos e produtos farmacêuticos (BILAL et al., 2019; RIZZO et al., 2019). O uso extensivo desses produtos resultou na presença generalizada deles no meio ambiente, seja pelo descarte inadequado, por atividades industriais e agropecuárias ou pela ineficiência dos processos convencionais de tratamento de efluentes (BILAL et al., 2019; RIVA et al., 2019). A exposição contínua aos CEs pode causar efeitos indesejáveis sobre o ecossistema e, conseqüentemente, sobre a saúde humana. Particularmente os antibióticos, que são CEs de base farmacêutica, podem contribuir para a formação e disseminação da resistência bacteriana (NAVADA; KULAL, 2019).

O ciprofloxacino (CIPX) é um antibiótico pertencente à classe das fluoroquinolonas (FQs) com amplo espectro de ação (FENG et al., 2019). Segundo os dados divulgados pelo relatório de 2018 da Organização Mundial da Saúde (OMS) essa classe é a terceira mais prescrita no Brasil e o CIPX é um dos medicamentos mais consumidos em diferentes regiões do mundo (OMS, 2018). Após ser administrado, cerca de 70% das FQs é excretada pelo organismo na forma inalterada (VAN DOORSLAER et al., 2014). Assim, o CIPX pode ficar prontamente disponível no meio ambiente e potencializar a resistência bacteriana mesmo em baixas concentrações do fármaco (HARRIS et al., 2013). Em diferentes regiões do mundo o CIPX é detectado em quantidades significativas (GUERRA et al., 2014; RIVA et al., 2019; TRAN et al., 2016), mesmo após técnicas de tratamentos convencionais.

Essas considerações indicam a real necessidade de estratégias efetivas para a remoção dos CEs e, por isso, nos últimos anos tem havido grandes esforços voltados para tratamentos alternativos aos convencionais. O tratamento biológico por biocatálise enzimática vem demonstrado resultados promissores e apresenta várias vantagens sobre o uso de tecnologias físico-químicas (NAGHDI et al., 2018). Das enzimas conhecidas, as lacases (EC.1.10.3.2), são possivelmente as mais adequadas para essa aplicação, tendo demonstrado resultados satisfatórios em vários processos biotecnológicos, incluindo a remoção de CEs (SPINA et al., 2020). Lacases são enzimas multi-cobre oxidases que atuam sobre uma diversidade de substratos, com a concomitante redução de oxigênio molecular para água (BRUGNARI et al., 2018;

YANG et al., 2017a). São eficientemente produzidas por fungos e suas características bioquímicas e fisiológicas podem diferir de acordo com as condições de cultivo. O cultivo binário de espécies produtoras de lacase tem sido relatado por seus efeitos promissores, incluindo a indução ou formação de novas isoenzimas (SINGH et al., 2018; YANG et al., 2017b), características que podem ser favoráveis nas aplicações biocatalíticas.

As lacases possuem propriedades únicas de alta eficiência e sustentabilidade e, especialmente na última década, as reações biocatalíticas com o uso de lacase têm demonstrado um grande potencial no tratamento de águas residuais, biorremediação e desintoxicação (FATHALI et al., 2019), graças à sua capacidade de degradar compostos persistentes. Apesar das inúmeras vantagens, o uso da enzima em sua forma solúvel apresenta algumas limitações, como a instabilidade em condições operacionais distintas e a dificuldade de recuperação e reutilização (YANG et al., 2017a). Para contornar essas desvantagens, lacases têm sido imobilizadas para aumentar a estabilidade, permitir o reuso e reduzir o custo dos tratamentos enzimáticos (YANG et al., 2017a), expandindo as aplicações, sobretudo, em grandes escalas. Das técnicas para a imobilização enzimática, a auto-imobilização, conhecida por CLEAs (do inglês, *Cross-Linked Enzyme Aggregates*), é um método relativamente simples que compreende as etapas de precipitação e agregação das enzimas (YANG et al., 2017a), sem a necessidade de nenhum suporte adicional.

Os CLEAs de lacase têm sido amplamente estudados em uma variedade de aplicações, incluindo descoloração de corantes sintéticos (VRŠANSKÁ et al., 2018; YANG et al., 2017a), eliminação de disruptores endócrinos (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007) e remoção de compostos fenólicos (ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020), porém, até a presente data, não há estudos que reportem os CLEAs de lacase como biocatalisadores para a biodegradação do ciprofloxacino.

Assim, este trabalho engloba os seguintes objetivos: inicialmente as melhores condições de co-cultivo para a produção de lacases foram determinadas. Então, as lacases produzidas pelo monocultivo de *Trametes villosa* e pelo seu co-cultivo com o *Pycnoporus* sp. foram imobilizadas por CLEAs. A imobilização, caracterização parcial e aplicação das lacases produzidas pelo cultivo em pares indicado também configura um resultado inédito. As lacases livres e imobilizadas dos cultivos foram parcialmente caracterizadas (pH e temperatura ótimos, termoestabilidade, parâmetros cinéticos e reusabilidade) e, posteriormente, aplicadas da biodegradação do CIPX.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir, imobilizar por *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs) e caracterizar as lacases de fungos basidiomicetos com posterior aplicação na biodegradação *in vitro* do fármaco ciprofloxacino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a produção enzimática pelos fungos basidiomicetos isolados *Trametes villosa*, *Pycnoporus* sp., *Agaricus bisporus* e *Lentinus crinitus*;
- Avaliar o cultivo em pares de *T. villosa* com *Pycnoporus* sp., *A. bisporus* e *L. crinitus*;
- Produzir a enzima lacase pelo monocultivo de *T. villosa* e seu co-cultivo com *Pycnoporus* sp. em cultivo semissólido com a utilização de resíduos agroindustriais;
- Caracterizar as lacases de *T. villosa* e do co-cultivo por eletroforese utilizando SDS-PAGE seguido de zimograma;
- Imobilizar por *Cross-Linked Enzyme Aggregates* (CLEAs) as lacases produzidas nos dois cultivos, otimizando as condições para a obtenção do imobilizado;
- Caracterizar as lacases livres e CLEAs de lacases pelo estudo de pH e temperatura ótimos, termoestabilidade e parâmetros cinéticos aparentes;
- Verificar a reusabilidade dos CLEAs;
- Avaliar a biodegradação enzimática *in vitro* do fármaco ciprofloxacino quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD);
- Determinar a atividade antimicrobiana do ciprofloxacino após o tratamento biológico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Os contaminantes emergentes (CEs) são uma classe de substâncias biologicamente ativas tipicamente detectadas nos ecossistemas aquáticos e águas residuais em baixas concentrações (ng L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$) (RIZZO et al., 2019). Fazem parte dessa classe os fármacos, produtos de cuidados pessoais, pesticidas, hormônios sintéticos e naturais e outros produtos químicos, como plastificantes, retardadores de chama e aditivos alimentares (KRZEMINSKI et al., 2019; RIVA et al., 2019; RIZZO et al., 2019).

O rápido e extenso uso e o contínuo descarte sem pré-tratamento desses compostos os tornaram prontamente disponíveis no ambiente. Isso gera uma grande preocupação, uma vez que os CEs podem provocar efeitos adversos na saúde humana e no ecossistema (BILAL et al., 2019). Particularmente, os CEs de base farmacêutica recebem grande atenção pelos eventuais riscos inerentes à sua exposição, especialmente pela formação de resistência bacteriana relacionada aos antibióticos (KRZEMINSKI et al., 2019), que será discutida na sessão 3.2.

Os tratamentos convencionais das Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) não são eficazes para a remoção da maioria dos contaminantes emergentes (BILAL et al., 2019; KRZEMINSKI et al., 2019) e, por isso, as ETEs estão entre as principais fontes para o lançamento dessas substâncias nos corpos hídricos (KRZEMINSKI et al., 2019). Além desta, os CEs podem atingir os compartimentos ambientais por meio de instalações industriais, atividades agropecuárias ou disposição e descarte inadequado de produtos vencidos ou inutilizados (RIVA et al., 2019).

Após o lançamento em corpos hídricos, o destino e a difusão dos CEs não são certamente compreendidos, uma vez que há uma variabilidade muito extensa desses compostos e uma grande complexidade de monitoramento. Inclusive, a detecção de muitas substâncias só foi possível com os avanços tecnológicos recentes, mas a liberação de CEs no ambiente ocorre há muito tempo (KRZEMINSKI et al., 2019). Ainda que atualmente sejam detectadas, para muitas substâncias faltam informações precisas que indiquem os riscos reais aos quais os seres vivos e o ambiente estão expostos. Outra questão preocupante é que os CEs podem se

transformar no ambiente, formando produtos até mais perigosos do que as moléculas originais (SPINA et al., 2020).

Os aspectos acima mencionados indicam a complexidade da presença de CEs no ambiente e reforçam a real necessidade de tratamentos eficazes para a remoção desses compostos. Ainda mais numa era de escassez de água, onde garantir a qualidade desse recurso essencial é imprescindível.

3.1.1 Legislação vigente para o descarte de contaminantes emergentes

O maior progresso até o momento sobre o monitoramento dos contaminantes emergentes ocorre na Suíça (RIZZO et al., 2019). Com exceção desse país, a liberação desses compostos nas ETEs ainda não foi regulamentada (BARBOSA et al., 2016). Alguns avanços são dados por diretrizes europeias as quais estabelecem listas de substâncias prioritárias que devem ser controladas de forma a atender os desafios de proteção do meio ambiente e da saúde humana (BARBOSA et al., 2016; KRZEMINSKI et al., 2019; RIZZO et al., 2019). O monitoramento dos efluentes das ETEs para o reuso agrícola é uma importante questão debatida por cientistas e partes interessadas na Europa (RIZZO et al., 2018).

No Brasil, a legislação que regulamenta os padrões de lançamento de efluentes é a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº 430 de 13 de maio de 2011 (CONAMA, 2011). Nela, não há qualquer orientação sobre o monitoramento de contaminantes emergentes.

Recentemente, um novo decreto foi aprovado e configura uma importante iniciativa brasileira para minimizar o descarte incorreto de medicamentos e a disponibilidade dessa importante classe de CEs no ambiente. O Decreto nº 10.388 de 5 de junho de 2020 tem o objetivo de regulamentar e instituir o sistema de logística reversa (inserido na Lei Federal nº 12.305 de 02 de agosto de 2010) de medicamentos de uso humano vencidos ou em desuso e de suas embalagens (BRASIL, 2020). Na prática, esse decreto determina que sejam definidos pontos fixos de coleta onde os consumidores poderão descartar os medicamentos e embalagens inutilizados, os quais serão destinados corretamente pelos distribuidores para o descarte adequado (incineração, coprocessamento ou aterro classe I, em ordem decrescente de prioridade).

3.1.2 Tratamentos consolidados e alternativos dos contaminantes emergentes

Métodos de tratamentos físico-químicos incluindo adsorção em carvão ativado, ozonização ou filtração em membrana podem efetivamente remover os contaminantes emergentes (RIZZO et al., 2019), porém, alguns efeitos indesejáveis estão relacionados a esses tratamentos. A ozonização, por exemplo, pode formar subprodutos tóxicos, necessitando de um tratamento adicional com filtro de areia biologicamente ativo; o tratamento com carvão ativado requer o preparo do material adsorvente, um processo altamente energético, e não é eficaz na remoção de bactérias o que exige um passo adicional de desinfecção; a filtração em membrana requer alta demanda de energia e um passo adicional para o descarte dos materiais filtrantes, que ocorre também no tratamento com carvão ativado (RIZZO et al., 2019).

Além dos métodos citados, nos últimos anos os Processos Oxidativos Avançados (POAs) estão entre os mais investigados para o tratamento de águas residuais urbanas. No entanto, apesar de serem eficazes na degradação de CEs, os POAs apresentam alguns inconvenientes dependendo do tipo de processo aplicado, como maior consumo de energia (UV/H₂O₂), necessidades de condições ácidas (Foto-Fenton), cinética baixa e necessidade de remoção do catalisador (UV/TiO₂) (RIZZO et al., 2019).

Como uma alternativa aos processos físico-químicos, o tratamento biológico por biodegradação enzimática é uma tecnologia promissora para a remoção dos contaminantes emergentes (BECKER et al., 2016; BILAL et al., 2019; SPINA et al., 2020). As enzimas, de um modo geral, são catalisadores naturais e sustentáveis por serem biocompatíveis, biodegradáveis e obtidas de recursos renováveis (SHELDON; VAN PELT, 2013). A biodegradação por enzimas é uma técnica eficiente e econômica realizada em condições amenas e sem o uso de equipamentos avançados ou produtos tóxicos para o tratamento dos CEs (BILAL et al., 2019), além de permitir a reintrodução de nutrientes na natureza (NIEBISCH et al., 2010). Esse processo, chamado de biocatálise, emergiu nas últimas décadas especialmente com os avanços da biotecnologia e tem atendido aos desafios da sustentabilidade, evitando ou minimizando a geração de resíduos tóxicos ou perigosos (SHELDON, 2019).

Vários estudos estão voltados à técnica de biocatálise. Recentemente, Spina et al. (2020) relataram a eficiência do tratamento enzimático contra quinze micro poluentes de diferentes classificações contidos em águas residuais municipais. Bilal

et al. (2017) reportaram a eficiência do uso de enzimas na remoção de desreguladores endócrinos e corantes. Becker et al. (2016), por sua vez, reportaram a eficiência enzimática na remoção acima de 50% de 32 antibióticos dos 38 avaliados com a assistência de mediador. Esses são exemplos de estudos, dentre tantos outros na literatura, que corroboram com as aplicações da técnica em questão na remoção de micropoluentes.

3.2 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos representam uma classe particular de contaminantes emergentes farmacêuticos (BILAL et al., 2019). Eles estão entre uma das classes de medicamentos mais prescritas no mundo e são amplamente utilizados na medicina humana e animal para prevenir e tratar infecções bacterianas (BECKER et al., 2016; NAVADA; KULAL, 2019; TRAN et al., 2016). Os mais importantes grupos prescritos são os beta-lactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas e fluoroquinolonas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2014).

O consumo de antibióticos varia conforme o país e, por isso, os dados internacionalmente comparáveis são escassos e heterogêneos (KÜMMERER, 2009). Todavia, sabe-se que o uso excessivo desses fármacos e as altas porcentagens excretadas pelo organismo ou descartadas pelas diferentes formas, resultaram em presença generalizada dessas substâncias no ambiente (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2014).

Os antibióticos são considerados um dos CEs mais perigosos porque, primeiramente, podem apresentar efeitos adversos diretos no ecossistema. Considerando que a maior via de inserção de antibióticos no ambiente é o despejo de águas residuais, os efeitos são maiores em sistemas aquáticos receptores. Essa classe de medicamento foi relatada pelo potencial de prejudicar a decomposição da matéria orgânica em corpos hídricos e interferir negativamente na nutrição de macroinvertebrados, afetando toda a estrutura ecossistêmica (BROOKS; MAUL; BELDEN, 2008).

Outra questão é que, indiretamente, esses fármacos apresentam riscos à saúde humana uma vez que a contínua exposição a doses subletais de antibióticos desencadeia o desenvolvimento de resistência bacteriana em microrganismos susceptíveis (BECKER et al., 2016; NAVADA; KULAL, 2019).

Antibióticos, assim como a maioria dos CEs, não são eficientemente removidos em processos convencionais de tratamento de águas residuais. Além disso, estudos sugerem que as ETEs contribuem para o aumento de bactérias resistentes aos antibióticos resultando na ocorrência de organismos multirresistentes em compartimentos aquáticos (ZHANG et al., 2009).

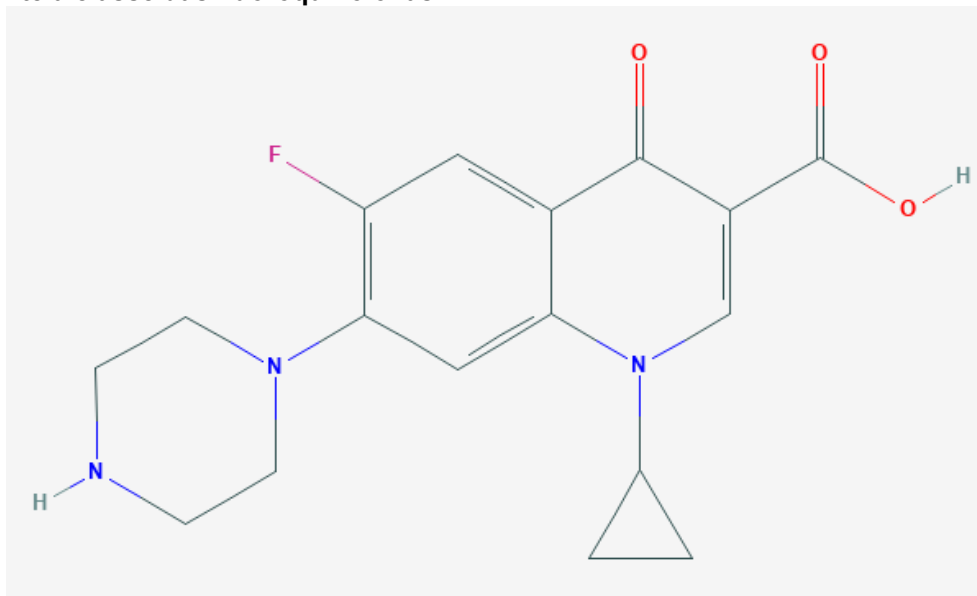
A resistência aos antibióticos é um problema de saúde pública uma vez que limita as opções de tratamentos das infecções e aumenta o risco de complicações e morbidade (ZHANG et al., 2009). O mecanismo de resistência é disseminado pela transferência horizontal do material genético de espécies resistentes para espécies sensíveis (HARRIS; CORMICAN; CUMMINS, 2013).

3.2.1 Antibiótico ciprofloxacino

O ciprofloxacino (CIPX, $C_{17}H_{18}FN_3O_3$, MM 331,34 g mol⁻¹) apresentado na Figura 1 é um antibiótico sintético pertencente à classe das fluoroquinolonas (FQs) (FENG et al., 2019; PRIETO et al., 2011). É um medicamento com amplo espectro de ação, comumente prescrito para tratar doenças infecciosas causadas por diversos tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2014). Particularmente, as FQs são eficazes no combate a diferentes bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella entérica*, *Klebsiella* spp., *Campylobacter* spp. e *Neisseria gonorrhoeae* (HARRIS et al., 2013) atuando na inibição da replicação celular (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2014). Comumente, CIPX é recomendado no tratamento de faringite, sinusite, dor de ouvido, bronquite e pneumonia (COUTU et al., 2013). No Brasil, o CIPX é um dos mais recomendados para o tratamento de infecções do trato urinário (MOREIRA DA SILVA et al., 2017).

Dados recentes divulgados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) indicaram que no Brasil a classe das FQs representa 12,4% do consumo de antibióticos, ficando atrás somente de beta-lactâmicos e penicilinas (53,4%) e macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (16,2%) (OMS, 2018). O mesmo relatório aponta o CIPX como um dos os antibióticos mais consumidos em diferentes regiões mundiais no período de 2016 a 2018.

Figura 1 — Estrutura molecular do fármaco ciprofloxacino ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$), um antibiótico pertencente à classe das fluoroquinolonas



Fonte: AMA, (s.d.)

Após a administração as fluoroquinolonas, como o CIPX, são parcialmente metabolizadas e até 70% são excretadas na sua forma inalterada pelas fezes e urina, e quando liberadas no meio ambiente podem promover e disseminar a resistência bacteriana (VAN DOORSLAER et al., 2014). O monitoramento de FQs em amostras aquosas foi recomendado anteriormente (HARRIS; CORMICAN; CUMMINS, 2013), pelos potenciais riscos da exposição a essa classe de fármaco. Harris et al. (2013) indicaram que mesmo as baixas concentrações de FQs, nas quais os efeitos tóxicos não são preocupantes, podem ser propícias para a formação da resistência antimicrobiana.

Recentemente, De Souza da-Silva et al. (2020) relataram que cepas de *Escherichia coli* uropatogênica, isoladas de casos de infecção urinária no Rio de Janeiro, demonstraram resistência ao CIPX. Os autores reforçaram que as cepas resistentes aos medicamentos de amplo espectro, como o CIPX, dificultam o tratamento das infecções do trato urinário e, por isso, a incidência dessas complicações está aumentando em muitas regiões do mundo. Resultados similares de resistência ao CIPX em pacientes com infecções urinárias foram reportados em Brasília (MOREIRA DA SILVA et al., 2017), sugerindo que essa ocorrência pode estar de maneira generalizada no Brasil.

A presença de CIPX é frequentemente quantificada em águas superficiais, residuais e biossólidos. Em alguns estudos, ainda, esse antibiótico recebe destaque

por apresentar altos níveis de detecção (GUERRA et al., 2014; TRAN et al., 2016). A Tabela 1 lista algumas ocorrências de CIPX em diferentes regiões do mundo. Nela é possível observar que o CIPX é liberado para o ambiente aquático mesmo após os tratamentos convencionais. Em sistemas de lodo ativado, por exemplo, a biodegradação demonstrou ser insignificante (LI; ZHANG, 2010). Outro aspecto a ser considerado é que a presença desse antibiótico pode ainda reduzir o processo de nitrificação parcial e impactar seriamente a comunidade microbiana, dificultando o processo de tratamento de águas residuais na remoção de nitrogênio e aumentando a quantidade de espécies bacterianas resistentes (GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2014).

Tabela 1 — Concentrações de ciprofloxacino detectadas em algumas regiões do mundo em matrizes líquidas (ng L^{-1}) e bio sólidos (ng g^{-1} , em peso seco) ^a

Matriz analisada	Local	Ponto de coleta	Amostra	Faixa de concentração	Referência
Águas superficiais (rios)	Milão, Itália	Antes de Milão	Bruta	38,0 ± 20,0 ^a	Riva et al. (2019)
		Depois de Milão	Bruta	30,8 ± 21,4 ^a	
Águas residuais	Singapura	ETE local	Bruta	2241 – 6453	Tran et al. (2016)
			Após Tratamento A	321,3 – 524,1	
			Após Tratamento B	5 – 421	
Águas residuais	Canadá	Seis ETEs	Bruta	17 – 2500	Guerra et al. (2014)
			Após Tratamento	22 – 620	
			Bio sólido	1780 – 16000	
Águas superficiais (rios)	Porto Alegre (RS), Brasil	Rio Dilúvio	Bruta	< LQ ^b – 329	Arsand et al. (2020)
Águas superficiais (rios)	Província Shannxi, China	Rio Ba	Bruta	2,66 – 28,6	Jia et al. (2018)
			Sedimento	2,4 – 62,5	
Águas superficiais	Regiões costeiras na China	32 locais da região costeira	Bruta	243 – 1230	Lu et al. (2018)

^a Dados retirados do material suplementar dos autores representando a média das regiões avaliadas. ^b Valores menores do que o limite de quantificação (LQ). Os valores destacados em negrito indicam a detecção em 100% das amostras analisadas.

Estudos anteriores demonstraram que a remoção parcial do CIPX em água residuais ocorre predominantemente pelo mecanismo de sorção (GOLET et al., 2003; LI; ZHANG, 2010; TRAN et al., 2016). De fato, Guerra et al. (2014) identificaram que a quantidade de CIPX presente em bio sólidos é substancialmente maior do que outros 46 antibióticos analisados. Deste modo, os materiais adsorventes acabam se

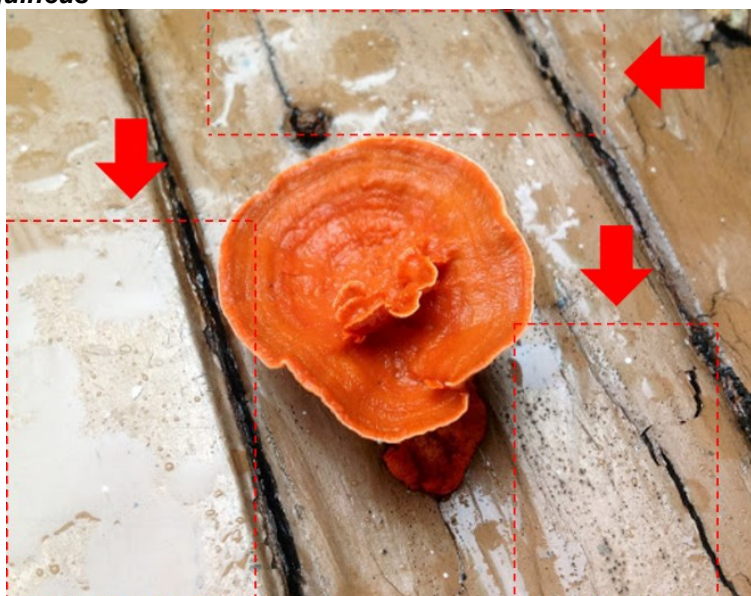
tornando reservas desses antimicrobianos, necessitando, portanto, de estratégias efetivas de gerenciamento para que esses resíduos não entrem em contato com o meio ambiente (GOLET et al., 2003).

Como alternativa ambientalmente favorável, a degradação do CIPX pode ser alcançada por meio de biodegradação enzimática (PARRA GUARDADO et al., 2019; PRIETO et al., 2011), especialmente pela utilização de enzimas lacases. Organismos eficientemente produtores de lacases bem como de outras enzimas para reações biocatalíticas são os fungos da podridão branca (FPB), os quais serão abordados a seguir.

3.3 FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA

Na natureza, os fungos da podridão branca, pertencentes à classe *Basidiomycetes*, são os únicos organismos capazes de degradar eficientemente a lignina, um material recalcitrante de estrutura complexa que resiste ao ataque da maioria dos outros microrganismos (BILAL et al., 2017b; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2014; WONG, 2009). Eles recebem esse nome porque sua ação resulta no branqueamento oxidativo e na perda de lignina da madeira degradada, deixando-a pálida e com estrutura fibrosa (WONG, 2009), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 — Representação do branqueamento de materiais ligninocelulósicos pela ação de Fungos da Podridão Branca. Em destaque o aspecto esbranquiçado da madeira pela ação do *Pycnoporus sanguineus*



Fonte: Modificado de Project Noah, 2012

A degradação de biopolímeros persistentes como a lignina ocorre em função do sistema extracelular enzimático não específico sintetizado pelos FPB, que é composto essencialmente por quatro enzimas ligninolíticas: lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), peroxidase versátil (VP, EC 1.11.1.16) e lacase (EC 1.10.3.2) (WONG, 2009). Uma única espécie de fungo não é capaz de produzir todas as quatro enzimas simultaneamente e a secreção das enzimas extracelulares varia conforme as espécies e as condições de cultura (NAGHDI et al., 2018).

Em linhas gerais, as enzimas LiP catalisam a clivagem oxidativa de ligações carbono-carbono (C-C) e de éter (C-O-C) resultando em substratos fenólicos com alto potencial redox. As MnP oxidam o manganês de sua estrutura de Mn^{2+} a Mn^{3+} que desencadeia a degradação de compostos fenólicos ou que oxida um segundo mediador para a clivagem das ligações de compostos não fenólicos. As VP, por sua vez, são enzimas híbridas de LiP e MnP com características bifuncionais (WONG, 2009). Essas três enzimas são dependentes de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para despolimerizarem a lignina (WONG, 2009). As lacases, por sua vez, são enzimas que não dependem de H_2O_2 para atuarem e, por serem o foco deste trabalho, serão detalhadas separadamente na sessão 3.4.

O mesmo mecanismo enzimático que faz com que os FPB degradem eficientemente a lignina também os torna capazes de degradar uma ampla variedade de compostos recalcitrantes (HOU et al., 2004); e, por essa razão, são espécies frequentemente exploradas em pesquisas de biorremediação (ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020). A reação de biodegradação enzimática pode ocorrer com a utilização de culturas vivas de fungos ou com a utilização de enzimas extracelulares. Essas últimas apresentam importantes vantagens sobre o uso de culturas vivas como, por exemplo: não necessitam de adição contínua de nutrientes para a manutenção do fungo, consomem menos energia e produtos químicos e produzem menos resíduos em comparação com outros bioprocessos (NAGHDI et al., 2018).

3.4 LACASES

3.4.1 Características gerais e aplicações biotecnológicas

Lacases (EC 1.10.3.2, benzenodiol:oxigênio oxido redutases) são uma classe de enzimas modificadoras da lignina (LME, do inglês *lignin modifying enzymes*) que pertencem ao grupo das polifenoloxidasas (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; TOUAHAR et al., 2014) e à superfamília das cupredoxinas (ARREGUI et al., 2019). Os primeiros relatos de lacases datam de 1883 quando essa enzima foi descoberta em látex da árvore *Rhus vernicifera* (YOSHIDA, 1883) e, desde então, essa enzima têm sido estudada para diversas finalidades.

Tipicamente encontradas em fungos, bactérias, insetos e plantas (ZERVA et al., 2019), as lacases são capazes de catalisar a oxidação de uma diversidade de compostos como orto e para-difenóis, ácidos fenólicos, fenóis substituídos com metóxi, aminas aromáticas e alguns compostos inorgânicos (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; DAS; SINGH; YOGALAKSHMI, 2017), com concomitante redução de oxigênio molecular para água (BERTHET et al., 2012; BRUGNARI et al., 2018).

Além da baixa especificidade de substrato, essas enzimas não necessitam da adição de cofatores caros para as reações biocatalíticas carecendo apenas de oxigênio molecular para atuarem, o que as torna economicamente viáveis em relação às outras peroxidases produzidas pelos basidiomicetos da podridão branca (BALDRIAN, 2006; BILAL et al., 2019; GASSER et al., 2014).

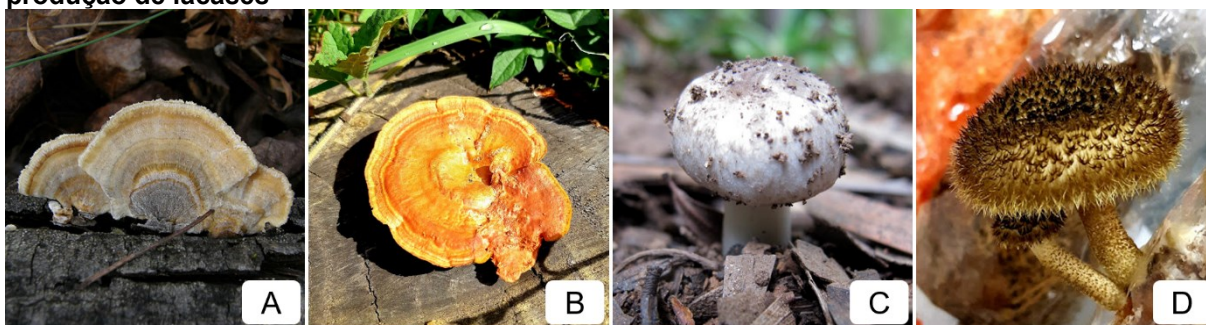
Pela diversidade de reações catalisadas por lacases, elas apresentam grande potencial para várias aplicações biotecnológicas, estando presente, por exemplo, nos setores farmacêutico, têxtil, alimentício e de combustível (BILAL et al., 2019; MATE; ALCALDE, 2017). Particularmente em reações de biorremediação, nos últimos anos as lacases fúngicas foram exploradas na degradação de uma variedade de compostos, incluindo corantes (DHILLON; KAUR; BRAR, 2012; MOTA et al., 2015; WANG et al., 2010), antibióticos (BECKER et al., 2016; NAVADA; KULAL, 2019), anti-inflamatórios (LLORET et al., 2010; LONAPPAN et al., 2017) e disruptores endócrinos (DE FREITAS et al., 2017; ELDRIDGE et al., 2017). Para os fins propostos neste trabalho, estudos anteriores demonstraram que as lacases podem ser eficientes, também, na remoção de CIPX (PRIETO et al., 2011).

3.4.2 Lacases fúngicas e condições de cultivo

Atualmente, a base de dados *BRENDA – The Comprehensive Enzyme Information System* indica que mais de 370 lacases foram documentadas, dentre as quais a maioria é de origem fúngica (BRENDA, [s.d.]). As lacases fúngicas são comumente extracelulares, mas a forma intracelular também pode ser expressa em alguns casos (ARREGUI et al., 2019). Em muitos fungos, as lacases extracelulares são secretadas durante o metabolismo secundário quando as fontes de carbono e nitrogênio se esgotam (YANG et al., 2017b).

Os fungos da podridão branca são os organismos mais reconhecidos para a produção de lacase (ARREGUI et al., 2019). Pertencentes à essa classe, os fungos explorados neste trabalho, representados na Figura 3, já foram relatados anteriormente pela produção e utilização de lacases com potenciais biotecnológicos. Por exemplo, lacases de *Trametes villosa* (Figura 3A) foram empregadas com efeito em estudos de sacarificação de biomassa (MATEI et al., 2020); *Pycnoporus* sp. (Figura 3B) produziu lacases termoestáveis capazes de degradar com eficiência diferentes corantes (WANG et al., 2010); lacases de *Agaricus bisporus* (Figura 3C) foram empregadas para descoloração de corantes (OTHMAN et al., 2018a); e lacases de *Lentinus crinitus* (Figura 3D) apresentaram potencial de descoloração e biodegradação de corante têxtil (NIEBISCH et al., 2010).

Figura 3 — Representação dos fungos da podridão branca utilizados para a investigação da produção de lacases ^a



^a A = *Trametes villosa*, B = *Pycnoporus* sp., C = *Agaricus bisporus* e D = *Lentinus crinitus*
 Fontes: A – Project Noah (2017); B – Imagem da autora; C – Project Noah (2011); D – imagem da autora (frutificação realizada em laboratório)

Estudos anteriores demonstram que há uma multiplicidade de genes e isoenzimas de lacases fúngicas (PISCITELLI et al., 2011; RIVERA-HOYOS et al., 2013), que resulta em propriedades distintas para cada enzima em particular, com

variações, por exemplo, no tamanho da enzima e nos valores de temperatura e pH ótimos para a atividade catalítica. Geralmente, lacases fúngicas apresentam massa molecular na faixa de 38 a 150 kDa, temperatura ótima entre 30 a 70 °C (MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2014) e expressam melhor atividade catalítica em pH ácido (BERTHET et al., 2012).

A produção e a secreção de lacases são fortemente influenciadas pela condição de cultura (estática ou agitada, por exemplo), níveis de nutrientes e adição de indutores e a diversidade de enzimas produzidas pode se dar entre diferentes espécies ou, até mesmo, nas diferentes isoformas sintetizadas em uma única cepa fúngica (PISCITELLI et al., 2011). A maioria dos FPB geralmente expressam mais que uma isoenzima (BALDRIAN, 2006).

Os parâmetros de cultivos para a produção de lacases fúngicas extracelulares em pesquisas básicas e avançadas são bastante diversos. Por exemplo, diferentes fontes de carbono e nitrogênio ou diferentes indutores de lacases são comumente explorados para aumentar a eficiência da produção dessa enzima (MATEI et al., 2020; OTHMAN et al., 2018b). Outra variação interessante é que as espécies podem ser cultivadas de forma isolada ou combinadas com outras cepas produtoras de lacase. Este último, conhecido por co-cultivo ou cultivo em pares, representa um caminho natural para induzir a produção dessa enzima, aumentando o rendimento ou sintetizando novas isoenzimas, podendo ser mais eficaz do que a adição de outros indutores químicos (COPETE-PERTUZ et al., 2019; YANG et al., 2017b). Além disso, muitos indutores sintéticos são caros e/ou tóxicos (FLORES et al., 2010), o que torna o cultivo em pares uma estratégia inovadora, segura, ambientalmente favorável e econômica para a produção de lacases.

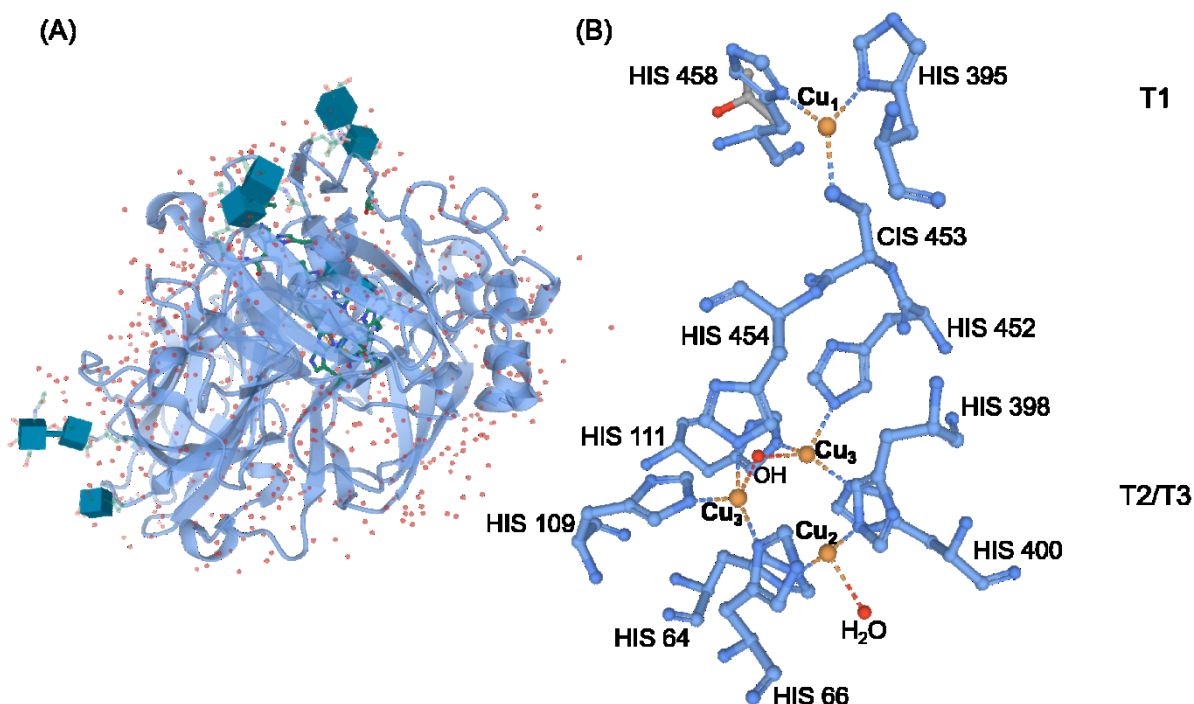
Na literatura, vários estudos reportam vantagens no uso do co-cultivo. Por exemplo, os pares *Coprinopsis cinerea* e *Gongronella* sp. w5 (HU et al., 2019), *Pleurotus ostreatus* e *Trichoderma viride* (SINGH et al., 2018), *Ganoderma lucidum* e *Trametes versicolor* (KUHAR; CASTIGLIA; LEVIN, 2015), *Leptosphaerulina* sp. e *Trichoderma viride* ou *Aspergillus terreus* (COPETE-PERTUZ et al., 2019), foram todos relatados pelo potencial de elevar a produção de lacases.

3.4.3 Estrutura molecular das lacases fúngicas

As lacases são glicoproteínas diméricas ou tetraméricas (DWIVEDI et al., 2011; REDA; HASSAN; EL-MOGHAZY, 2018), cuja fração de carboidratos (geralmente constituída de manose, N-acetil glucosamina e galactose) varia de 10 a 25% em lacases fúngicas (DWIVEDI et al., 2011). O sítio ativo das lacases típicas é composto por quatro átomos de cobre (Cu) que mediam o processo de oxirredução da catálise enzimática. Os átomos de cobre são categorizados em três grupos de acordo com as propriedades espectroscópicas e magnéticas (ARREGUI et al., 2019; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014; DWIVEDI et al., 2011; WONG, 2009): tipo 1 (T1 com um átomo de Cu, tipo 2 (T2 com um átomo de Cu) e tipo 3 (T3 com dois átomos de Cu) por molécula (Figura 4).

O cobre T1 é paramagnético e está coordenado com uma molécula de cisteína e duas histidinas como ligantes conservados (Figura 4B), e um ligante variável de acordo com a natureza de enzima, geralmente leucina ou fenilalanina em lacases fúngicas (ARREGUI et al., 2019); T1 é o responsável pelo potencial redox da enzima, pelo início da oxidação do substrato e, ainda, contribui para a coloração azul da lacase porque apresenta uma banda de absorção intensa na região próxima de 600 nm, correspondendo ao sítio de cobre azul (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014; DWIVEDI et al., 2011; WONG, 2009). O cobre T2 é paramagnético e coordenado com duas moléculas de histidinas e uma de água e não apresenta bandas de absorção (YANG et al., 2017b). O T3 apresenta absorção a 330 nm e cada átomo está ligado a três moléculas de histidina e são unidos por um grupo hidroxila (DWIVEDI et al., 2011). T2 e T3 formam um cluster tri-nuclear (T2/T3) de cobre onde ocorre a fixação e redução de O₂ para água, finalizando um ciclo catalítico enzimático (ARREGUI et al., 2019; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014; WONG, 2009).

Figura 4 — Representação da estrutura tridimensional (A) e do sítio catalítico (B) de lacases de *Trametes versicolor* obtidas pelo banco de dados de proteínas (RCBS PDB) pelo código 1GYC ^a



^a Em (A) os quadrados azuis representam as moléculas de carboidratos. Na representação do sítio ativo (B) são indicados os aminoácidos ligantes conservados: HIS (histidina) e CIS (cisteína). As esferas alaranjadas representam os átomos de cobre
 Fonte: Adaptado de Sehnal et al. (2018)

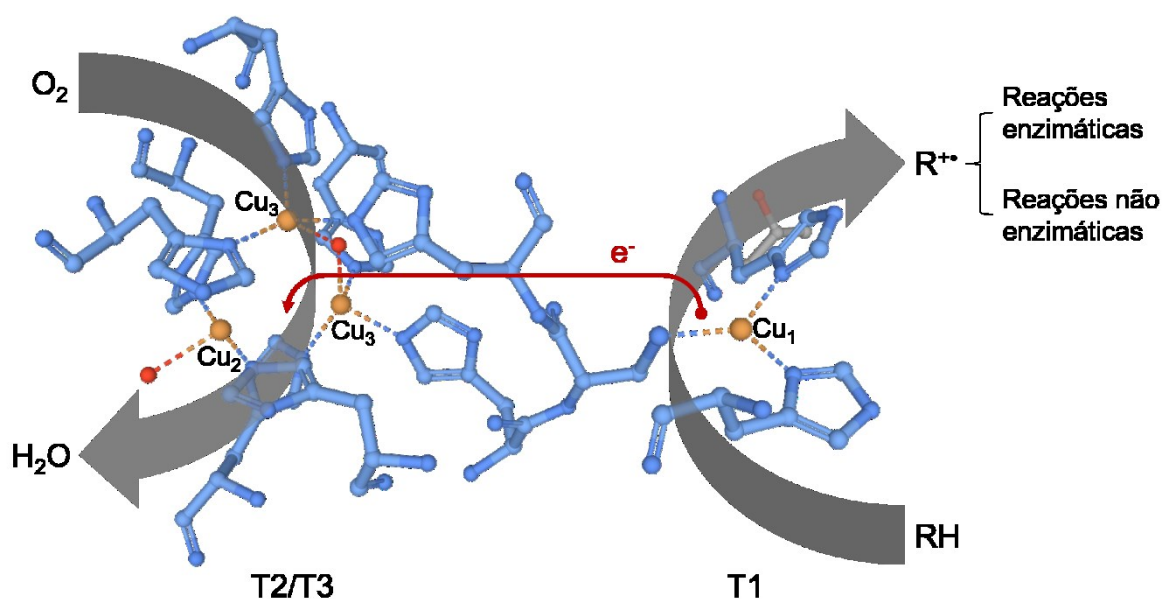
Um parâmetro fundamental para a ação das lacases é o potencial redox (E^0) do cobre T1, que corresponde à energia necessária para retirar um elétron do substrato redutor (RIVERA-HOYOS et al., 2013). Em função de E^0 as lacases podem ser classificadas em baixo, médio ou alto potencial. Os basidiomicetos da podridão branca são produtores de lacases com alto potencial redox (E^0 variando entre +730 e +790 mV) e recebem destaque do ponto de vista biotecnológico porque são capazes de oxidar uma variedade maior de substratos (MATE; ALCALDE, 2017). Ainda assim, o escopo de ação das lacases pode ser ampliado pela utilização de portadores de elétrons, chamados de mediadores, que frequentemente são usados para substratos com potenciais de oxirredução maiores do que aqueles apresentados pela enzima (MOROZOVA et al., 2007; YANG et al., 2017b). Existem uma variedade de substâncias utilizadas para essa finalidade incluindo os compostos naturais como o 3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzaldeído (siringaldeído) e ácido 4-hidroxibenzóico (HBA), ou os sintéticos como o 1-hidroxibenzotriazol (HBT) ou ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000; YANG et al., 2017b). Os compostos sintéticos geralmente apresentam desvantagens

associadas ao custo elevado e alta toxicidade (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000) e, por isso, os mediadores naturais são mais interessantes para ampliar a aplicabilidade do sistema lacases + mediador.

3.4.4 Mecanismo de ação

Um ciclo catalítico das lacases envolve a oxidação de um elétron do substrato redutor, portanto, são necessárias quatro moléculas de substratos que ofertarão quatro elétrons para redução de O_2 para H_2O (ZERVA et al., 2019). A representação genérica da catálise enzimática pode ser dada pela equação: $4RH + O_2 \rightarrow 4R + 2H_2O$, onde RH representa o substrato (WONG, 2009). O mecanismo geral de ação das lacases pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5 — Representação do mecanismo de ação das lacases ^a



^a O sítio ativo corresponde à lacase de *Trametes versicolor* cuja imagem foi obtida no banco de dados de proteínas (RCBS PDB) com o código 1GYC
 Fonte: Adaptado de Sehnal et al. (2018)

Na enzima em repouso os átomos de cobre estão no estado de oxidação $2+$ (YANG et al., 2017b). A primeira etapa da catálise enzimática é a oxidação do substrato pelo cobre T1, que atua como acceptor de elétrons, passando do estado de oxidação Cu^{2+} a Cu^+ . Para que essa oxidação ocorra há que se considerar a diferença de potencial redox (ΔE^0) entre o Cu T1 e o substrato redutor. Quando o E^0 do Cu T1

for menor que o do substrato, geralmente adiciona-se mediadores de reação para aumentar o potencial catalítico da lacase, favorecendo a oxidação do substrato (YANG et al., 2017b). Quando o substrato tem um elétron removido, ele se transforma em um radical catiônico instável (R^+) (Figura 5) que pode ser oxidado em uma segunda reação enzimática ou sofrer reações não-enzimáticas como a polimerização (DWIVEDI et al., 2011; PATEL et al., 2018).

Após a oxidação do substrato em T1, os elétrons extraídos são transferidos para o centro tri-nuclear T2/T3, onde ocorre a redução de O_2 a H_2O (WONG, 2009). O deslocamento de $4e^-$ de quatro moléculas de substrato iniciada no cobre T1 até o centro tri-nuclear T2/T3, onde o O_2 atua como acceptor final de elétrons, reflete um ciclo catalítico da enzima (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014).

A oxidação de compostos fenólicos se dá pela subtração de um elétron dos grupos hidroxilas, formando radicais fenoxi que geralmente sofrem polimerização. A degradação de compostos não fenólicos geralmente ocorre na presença de um mediador (WONG, 2009). O mecanismo de ação do sistema lacases + mediador depende do composto utilizado (BAIOCCO et al., 2003). Utilizando ABTS, por exemplo, a enzima inicialmente oxida o mediador formando um radical reativo ($ABTS^{2+}$) que atuará sobre o substrato (YANG et al., 2017b).

3.5 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A aplicação da enzima livre na biodegradação de xenobióticos apresenta algumas desvantagens que limitam a utilização desses biocatalisadores em processos enzimáticos industriais. Por exemplo, a solubilidade das enzimas em fase aquosa dificulta sua recuperação e reutilização em biorreatores (SHELDON; VAN PELT, 2013; TOUAHAR et al., 2014). Além disso, a estabilidade limitada dessas enzimas em condições operacionais variadas reduz o seu potencial para o desenvolvimento de bioprocessos (MATIJOŠYTE et al., 2010; TOUAHAR et al., 2014). Tais aspectos afetam, sobretudo, o custo do tratamento enzimático tornando-o economicamente inviável (BRUGNARI et al., 2018).

Para contornar essas desvantagens muitos estudos são voltados em métodos para estabilizar a enzima, incluindo a imobilização enzimática. A imobilização geralmente resulta em enzimas mais estáveis contra a desnaturação térmica e química, além de modificações favoráveis em seu comportamento cinético (BILAL et

al., 2017a; CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013). As enzimas imobilizadas apresentam, ainda, maior estabilidade de estocagem e a possibilidade de reutilização. A maior estabilidade da enzima imobilizada provém da diminuição da sua flexibilidade, o que reduz a sua propensão a se desdobrar e se desnaturar (SHELDON, 2019).

Muitos fatores afetam a imobilização: o tipo de suporte (quando é utilizado), as condições de imobilização (pH, temperatura, reagentes utilizados) e o tipo de enzima utilizada (fonte, natureza da proteína, pureza) e, por isso, não existe um método universal de imobilização enzimática (MATIJOŠYTE et al., 2010). Conceitualmente, os métodos de imobilização são divididos em três categorias: adsorção em suporte, encapsulamento e reticulação (MATIJOŠYTE et al., 2010; SHELDON, 2019; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Apesar de se obter biocatalisadores geralmente mais estáveis, algumas técnicas apresentam desvantagens operacionais as quais inviabilizam as aplicações, sobretudo em escala industrial. A adsorção em suporte e o encapsulamento estão associados à falta de estabilidade para lixiviação em meio aquoso (MATIJOŠYTE et al., 2010). Além disso, é necessária uma alta carga enzimática nos bioprocessos (MATIJOŠYTE et al., 2010), uma vez que ocorre a diluição da atividade catalítica resultante da introdução de uma grande proporção de massa não catalítica do suporte, que geralmente varia de 90 a 99% da massa total (SCHOEVAART et al., 2004; SHELDON, 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013). Adiciona-se também o custo proveniente da utilização de alguns suportes os quais podem ser demasiadamente caros (SHELDON, 2011; SHELDON; VAN PELT, 2013).

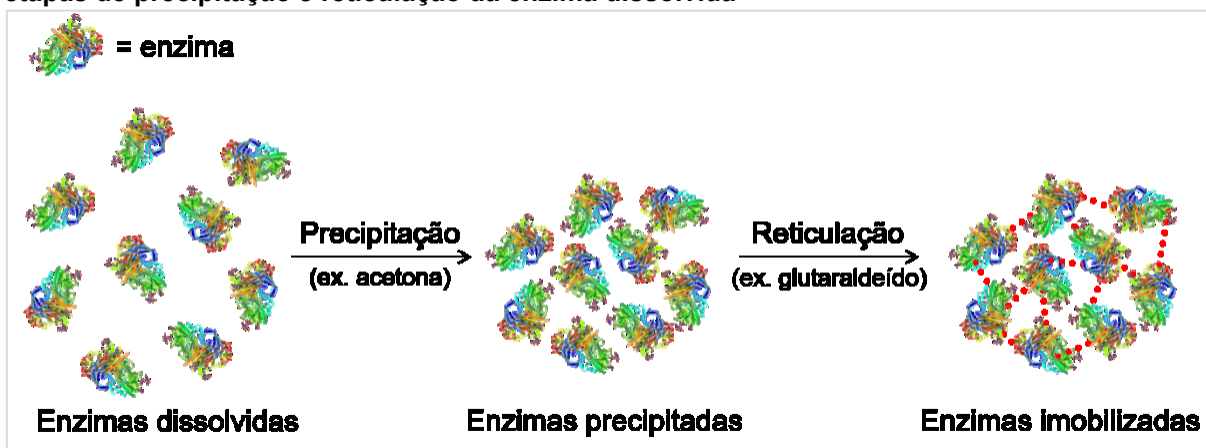
Em contrapartida, a formação de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs, do inglês *Cross-Linked Enzyme Aggregates*) (sessão 3.5.1) é uma alternativa que não requer a utilização de encapsuladores ou suportes para a imobilização (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; SHELDON, 2007; ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020), e apresenta importantes vantagens com relação aos outros métodos acima descritos.

3.5.1 Imobilização por *Cross-Linked Enzyme Aggregates*

A imobilização por CLEAs (Figura 6) é uma técnica relativamente simples que compreende as etapas de precipitação seguida da ligação cruzada das moléculas enzimáticas com agentes bifuncionais de reticulação. O método foi desenvolvido por

Cao, Van Rantwijk e Sheldon (2000) e deriva de modificações de técnicas de imobilizações anteriormente desenvolvidas nas quais já se utilizava a reticulação da enzima sem a necessidade de um suporte, que eram, no entanto, operacionalmente exigentes e custosas pela necessidade da cristalização da enzima (SHELDON, 2011; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Figura 6 — Representação da imobilização enzimática pela metodologia CLEAs indicando as etapas de precipitação e reticulação da enzima dissolvida



Fonte: Autoria própria

Os agregados enzimáticos resultantes da etapa de precipitação são unidos por ligações não covalentes e podem ser facilmente redissolvidos em soluções aquosas (MATIJOŠYTE et al., 2010; SCHOEVAART et al., 2004). A etapa seguinte de reticulação evita a solubilização e possíveis perdas dos agregados enzimáticos após a remoção do agente precipitante (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Comparado com o peso da enzima, o peso molecular do agente reticulante é insignificante, portanto, o biocatalisador resultante compreende 100% em peso de enzima ativa e isso se traduz em maiores rendimentos volumétricos (SCHOEVAART et al., 2004; SHELDON, 2007), representando uma das grandes vantagens desse método. Além desta, esse processo de imobilização geralmente resulta sólidos heterogêneos estáveis, nos quais são mantidas as propriedades estruturais e atividades catalíticas das enzimas (KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014; MATIJOŠYTE et al., 2010; SCHOEVAART et al., 2004). Esses sólidos podem ser filtrados ou centrifugados, permitindo a recuperação e a reutilização dos biocatalisadores e contribui com o uso mais rentável em operações contínuas (SHELDON, 2019; SHELDON; VAN PELT, 2013).

Um parâmetro determinante para a efetiva aplicação de CLEAs é a recuperação de atividade após a imobilização, que idealmente deve estar perto de 100%. No entanto, geralmente o que ocorre é alguma perda de atividade após a imobilização (SHELDON, 2019) e, portanto, também é importante considerar outros parâmetros comerciais, como estabilidade e frequência com que os CLEAs podem ser reciclados (SHELDON, 2011).

A metodologia CLEA é versátil e pode ser aplicada na imobilização de uma variedade de enzimas, incluindo as hidrolases, liases e oxidoredutases, as quais incluem as lacases, sem a necessidade prévia de purificação (SHELDON, 2007). Porém, para cada enzima específica, mesmo que pertencente à mesma classe, torna-se necessário a otimização das condições para formação dos CLEAs, uma vez que o êxito desse processo depende das propriedades da enzima e isso configura uma possível desvantagem do método (ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020). As variáveis mais importantes para a síntese de CLEAs compreendem a escolha do agente precipitante e o tipo e concentração do agente reticulador (SHELDON, 2011). A Tabela 2 apresenta algumas das diversas variações encontradas na literatura somente para a formação de CLEAs de lacases fúngicas.

Tabela 2 — Variações na formação de CLEAs de lacase em termos da natureza da enzima, tipos de agentes de precipitação e reticulação e condições operacionais empregadas. A recuperação da atividade é dada pela atividade final dos CLEAs dividida pela atividade inicial do extrato enzimático aplicado

Fungo produtor de lacases	Precipitante	Reticulante	Condições para a formação dos CLEAs	Recuperação de atividade de lacase (%)	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	Dimetilsulfóxido (DME)	GA ^a 5 mM	pH 5,0; 20 °C; 19h sob agitação de 200 rpm	47	Matijošyte et al. (2010)
<i>Trametes villosa</i>	Dioxano	GA 20 mM	pH 7,0; 20 °C; 3h sob agitação de 200 rpm	148	
<i>Agaricus bisporus</i>	Dioxano	GA 20 mM	pH 7,0; 20 °C; 27h sob agitação de 200 rpm	70	
<i>Coriolorpsis polyzona</i>	Polietilenoglicol (PEG)	GA 200 µM	24h a 4 °C em modo estático	60	Cabana, Jones e Agathos (2007)
<i>Fomes fomentarius</i>	Sulfato de amônio 75% (m/v)	GA 50 mM	pH 8,0; 60 min a 4 °C sob agitação lenta	113	Vršanská et al. (2018)
<i>Trametes versicolor</i>			pH 6,0; 60 min a 4 °C sob agitação lenta	126	
<i>Trametes versicolor</i>	Propanol	GA 5 mM	pH 3,0; 24h a 20 °C sob agitação; com clara de ovo (5 mg mL ⁻¹)	60	Kumar, Sivanesan e Cabana (2014)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>t</i> -butanol	GA 20 mM	3h a 4 °C sob agitação; com BSA ^c (2 mg mL ⁻¹)	71	Vinoth Kumar et al. (2012)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Sulfato de amônio 60%	GA 20 mM	12h a 20 °C e 200 rpm	Não mencionado	Sinirlioglu, Sinirlioglu e Akbas (2013)
<i>Trametes versicolor</i>	Sulfato de amônio 55%	Quitosana + EDAC ^b	48h a 4 °C em modo estático	Não mencionado	Hassani, Ba e Cabana (2013)
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	Sulfato de amônio	GA 100 mM	3h a temperatura ambiente e 1200 rpm	72	Zerva; Pentari e Topakas (2020)
<i>Cerrena</i> sp. HYB07	Sulfato de amônio	GA 30 mM	3h a 25 °C	68	Yang et al. (2017a)
<i>Oudemansiella canarii</i>	Sulfato de amônio	GA 150 mM	24h a 4 °C	78	(UBER et al., 2020)

^a GA = glutaraldeído; ^b EDAC = cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida; ^c BSA = albumina de soro bovino

3.5.1.1 *Precipitação enzimática*

A adição de sais, solventes orgânicos miscíveis ou polímeros não-aniônicos a uma solução enzimática pode induzir a agregação física e a precipitação das proteínas (CUI; JIA, 2013; MATIJOŠYTE et al., 2010). Isso ocorre porque esses agentes podem mudar o estado de hidratação das moléculas enzimáticas ou mudar a constante dielétrica da solução, fazendo com que as proteínas precipitem (XU et al., 2018). Os agregados moleculares formados são unidos por ligações não covalentes, sem que ocorra perturbações na estrutura enzimática (SHELDON, 2011; XU et al., 2018).

A seleção do precipitante é uma etapa crucial para a efetiva formação dos CLEAs. Cada precipitante pode induzir um tipo de conformação dos agregados enzimáticos, que afeta diretamente as propriedades catalíticas dos CLEAs formados na etapa seguinte (XU et al., 2018). Ademais, como cada enzima apresenta propriedades particulares, as condições de precipitação podem ser diferentes entre uma enzima e outra. Nas investigações do melhor agente precipitante, os agregados formados são redissolvidos em uma solução tampão adequada e suas atividades medidas (SHELDON, 2011). O que deve ser considerado é que além de indicar os melhores precipitantes para a enzima, a medição da atividade dos agregados redissolvidos serve para verificar se a etapa de precipitação deixa a lacase em um estado ativo antes de proceder a reticulação para a formação dos CLEAs (SCHOEVAART et al., 2004).

Para lacases, os precipitantes relatados com eficiência em estudos anteriores incluem sulfato de amônio, acetona e polietilenoglicol (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020), 2-propanol, dioxano e dimetoxietano (MATIJOŠYTE et al., 2010).

3.5.1.2 *Agregação de enzimas precipitadas*

Usualmente o glutaraldeído é utilizado como agente de reticulação, pois é barato e comercialmente disponível (SHELDON, 2007; SHELDON; VAN PELT, 2013). A formação dos agregados reticulados ocorre através da interligação de grupos amino (NH_2) de resíduos de lisina nas superfícies das enzimas com oligômeros ou polímeros de glutaraldeído, resultando em biocatalisadores estáveis com altas atividades volumétricas (MATIJOŠYTE et al., 2010; SHELDON, 2011).

Um fator importante a ser considerado é a razão molar do agente reticulador, a qual influencia a atividade, estabilidade e tamanho de partículas dos CLEAs resultantes. Se a relação for baixa, a reticulação pode ser insuficiente e resultar em agregados muito flexíveis e instáveis. Por outro lado, o excesso de agente reticulante pode ocasionar uma perda completa da flexibilidade da enzima e, conseqüentemente, de sua atividade (SHELDON, 2011). A variabilidade da concentração de glutaraldeído pode ser observada na Tabela 2.

Além do glutaraldeído outros agentes reticuladores foram estudados com sucesso na imobilização de lacases por CLEAs, dentre os quais está a quitosana modificada (ARSENAULT; CABANA; JONES, 2011; HASSANI; BA; CABANA, 2013) e o polialdeído dextrano (ZHEN et al., 2013).

4 METODOLOGIA

As etapas que compreendem este trabalho estão resumidas no fluxograma da Figura 7. Os procedimentos são descritos em detalhes nos itens de 4.1 a 4.8.

Figura 7 — Fluxograma indicando o resumo das etapas desenvolvidas neste trabalho



Fonte: Autoria própria

4.1 CULTIVO DE BASIDIOMICETOS E PREPARO DO INÓCULO

Os fungos da podridão branca *Trametes villosa*, *Pycnoporus* sp., *Lentinus crinitus* e *Agaricus bisporus* foram obtidos no laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, na sede Ecoville do campus Curitiba. As cepas foram repicadas em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) e incubadas em estufa a 28 °C por sete dias. O estoque de placas contendo os fungos isolados foi mantido sob refrigeração a 4 °C.

Os inóculos foram preparados por meio da transferência de um disco (de aproximadamente 12 mm, recortado com tubo de ensaio esterilizado) do meio sólido contendo os basidiomicetos isolados para outra placa de Petri com meio BDA. As placas foram colocadas em estufa a 28 °C por um período de sete dias. No sétimo dia, os micélios jovens crescidos na borda da placa foram utilizados como inóculo para as investigações de produção enzimática em meio semissólido (Sessão 4.2) e interações miceliais (Sessão 4.3).

4.2 PRODUÇÃO DE LACASES E OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

Inicialmente a produção de lacase foi avaliada pelo cultivo em fermentação semissólido dos fungos *Trametes villosa*, *Pycnoporus* sp., *Lentinus crinitus* e *Agaricus bisporus* cultivados de forma isolada. Posteriormente, avaliou-se o co-cultivo de *T. villosa* com os fungos *Pycnoporus* sp., *L. crinitus* e *A. bisporus*. Os cultivos foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio nutritivo composto por: glicose 10 g L⁻¹, KH₂PO₄ 3 g L⁻¹, peptona 0,5%, casca de arroz 1%, bagaço de uva 0,5%, bagaço de cana 2% e soluções de MnSO₄, CuSO₄, FeSO₄, ZnSO₄ e MgSO₄ a 1 mM cada (RIEDI, 2019).

Os meios foram autoclavados (121 °C por 15 min) e, após o resfriamento, os discos com os inóculos (preparados de acordo com a sessão 4.1) foram transferidos para o meio semissólido. Para o cultivo dos fungos isolados foram inseridos quatro discos de 12 mm em cada Erlenmeyer contendo o meio nutritivo; para os co-cultivos foram inseridos dois discos do *T. villosa* em combinação com dois discos dos fungos *Pycnoporus* sp., *L. crinitus* e *A. bisporus*, cultivados separadamente. Em todos os cultivos, os discos foram colocados com o micélio fúngico voltado para cima. A etapa de inoculação foi realizada em câmara de fluxo laminar e para a transferência do fungo da placa para o meio semissólido, utilizou-se palitos de madeira previamente esterilizados. Os Erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e gaze e mantidos por sete dias em estufa a 28 °C. Subsequentemente, os cultivos foram filtrados com gaze e depois centrifugados a 10000 rpm a 4 °C por 10 min para a retirada dos debrís miceliais, obtendo por fim o extrato enzimático bruto. Os extratos foram avaliados de acordo com a produção da enzima lacase, quantificada de acordo com o método descrito na sessão 4.5.1.

4.3 INTERAÇÕES MICELIAIS DOS FUNGOS BASIDIOMICETOS EM CO-CULTIVO

Para investigar a interação micelial dos pares testados, três combinações foram feitas: (a) *T. villosa* + *Pycnoporus* sp., (b) *T. villosa* + *A. bisporus* e (c) *T. villosa* + *L. crinitus*, de acordo com a metodologia de Iakovlev e Stenlid (2000), com modificações. Os fungos foram dispostos em pares em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo meio BDA. Os inóculos (plugs miceliais de cerca de 1 cm) foram colocados no centro da metade da placa, com cerca de 5 cm de distância entre eles. Paralelamente, foram feitas amostras controles constituídas de dois plugs do mesmo basidiomiceto, efetuadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Os procedimentos foram realizados em duplicata e as placas foram incubadas em estufa a 28 °C por 14 dias, com acompanhamento periódico do crescimento micelial.

4.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE POR SDS-PAGE E ZIMOGRAMA

A cinética de produção enzimática foi avaliada em duplicata pelas monoculturas de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. e pelo co-cultivo de ambos nas mesmas condições de cultivo semissólido descritas na sessão 4.2. Os frascos contendo os inóculos em meio nutritivo foram incubados em estufa a 28 °C por 3, 5, 7, 10 e 14 dias. Nos extratos enzimáticos brutos avaliou-se a síntese das enzimas lacase, MnP e LiP pelos métodos descritos na sessão 4.5.

Os extratos produzidos no décimo dia de cultivo foram caracterizados por eletroforese usando a técnica SDS-PAGE de acordo com Laemmli (1970) com modificações propostas por De Freitas et al. (2017). O tampão da amostra foi preparado sem a adição de β -mercaptoetanol e as amostras não foram aquecidas antes da corrida. Foram adicionados 5 μ L do padrão e de cada amostra nos poços do gel de poliacrilamida a 11,5%. As amostras foram previamente concentradas com acetona 1:3 (v/v) e ressuspensas em tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) de modo a totalizarem 30 U mL⁻¹ de atividade de lacase cada. A corrida eletroforética foi realizada a 80 V e 40 A por aproximadamente 4 h.

Para identificar a lacase no gel de poliacrilamida após a corrida eletroforética por meio do zimograma, o gel foi lavado por 30 minutos com uma mistura de partes iguais de tampão isopropanol-acetato (50 mM, pH 5,0) e em seguida com tampão

acetato por mais 30 minutos, com o objetivo de remover o SDS, fixar as proteínas no gel e reduzir o pH para 5,0. O gel foi transferido para uma placa de vidro contendo ABTS-ágar previamente preparado pela mistura de 0,02 g de ABTS dissolvidos em 10 mL de tampão acetato (50 mM, pH 5,0) adicionados ao gel de ágar (0,4 g de ágar dissolvidos em 40 mL de tampão acetato aquecido) (DE FREITAS et al., 2017). Após a sobreposição do gel de corrida no ABTS-ágar, o aparecimento de bandas verdes possibilitou a identificação de lacase, pela reação com o ABTS como substrato.

As massas moleculares aparentes das lacases foram identificadas pela comparação da mobilidade eletroforética das amostras com aquela obtida pelo padrão de proteínas Sigma Marker™ (S8445-1VL), composto por: miosina (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), desidrogenase glutâmica (55 kDa), ovoalbumina (45 kDa), desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (36 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). As bandas das proteínas foram coradas com prata.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

4.5.1 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase livre e imobilizada foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis Bel Photonics (UV-M51) pelo monitoramento da oxidação do ABTS como substrato ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (HOU et al., 2004). Para isso, adicionou-se 200 μL de solução de ABTS 10 mM e 1,7 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 em tubos de ensaio, os quais foram colocados em banho termoestabilizado a 40 °C. Depois de aclimatada a solução reacional, foram adicionados 100 μL de solução de lacase (livre ou imobilizada) com diluição adequada, deixando reagir por 5 min, com posterior leitura da absorbância a 420 nm.

Para a quantificação de atividade nos CLEAs em maior escala, os agregados ressuspensos em tampão foram homogeneizados e prontamente pipetados utilizando uma ponteira com ponta larga. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de produto por minuto de reação nas condições propostas (KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014).

4.5.2 Determinação da atividade de lignina peroxidase

A atividade de LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico como substrato. A mistura reacional continha 0,4 mM de álcool veratrílico, 0,1 M de tampão tartarato (pH 3,0) e H₂O₂ 0,2 mM. A cinética da reação foi monitorada por 5 minutos pela leitura da absorbância a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por 5 min (TIEN; KIRK, 1984).

4.5.3 Determinação da atividade de manganês peroxidase

A atividade de MnP foi avaliada pela oxidação de 1 mM de MnSO₄ em 0,05 M de tampão malonato de sódio pH 4,5, na presença de 0,1 mM de H₂O₂. A cinética de reação foi monitorada por 5 minutos a 270 nm ($\epsilon_{270} = 11,59 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (WARIISHI; VALLI; GOLD, 1992).

4.6 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE LACASE POR *CROSS-LINKED ENZYME AGGREGATES*

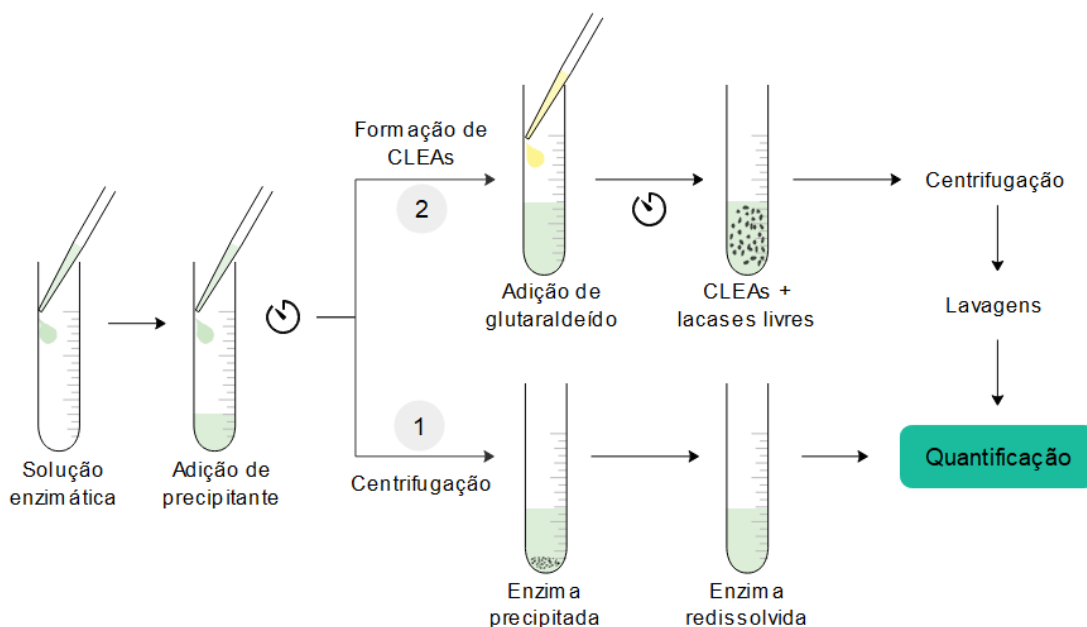
As investigações para a formação dos CLEAs ativos foram realizadas em três etapas: (a) seleção do melhor agente precipitante na formação do imobilizado para os extratos brutos de lacases de *T. villosa* e do co-cultivo (sessão 4.6.1); (b) avaliação das condições operacionais de tempo, temperatura e agitação (sessão 4.6.2); e (c) apuração das concentrações mais adequadas de lacases e do agente reticulador (sessão 4.6.3).

4.6.1 Seleção do agente precipitante na formação de CLEAs

A investigação do precipitante mais adequado para a formação dos CLEAs foi realizado conforme metodologias previamente descritas (SCHOEVAART et al., 2004; ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020). Os teste iniciais foram conduzidos em duplicata dentro de tubos de ensaio onde foram adicionados 900 μL de precipitante sobre 100 μL de solução de lacases (2 U mL^{-1}) de *T. villosa* e do co-cultivo deste com *Pycnoporus* sp., seguido por 15 min de incubação a 22 °C e 150 rpm. Os precipitantes testados foram sulfato de amônio (75%, m/v), acetona, isopropanol, etanol e polietileno glicol

(PEG 4000 100%, m/v) (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; MATIJOŠYTE et al., 2010). Então, as amostras foram avaliadas conforme mostra o esquema da Figura 8: parte foi ressuspensa em tampão acetato (50 mM, pH 5,0) para verificar a ação do precipitado sobre a atividade de lacases (quantificadas de acordo com a sessão 4.5.1) e parte foi avaliada na formação do imobilizado sob a ação de cada precipitante. Para essa última, uma solução de glutaraldeído 2M foi adicionada na mistura de modo a totalizar 100 mM e a reticulação foi prosseguida por 3h (22 °C, 150 rpm).

Figura 8 — Esquema para avaliação dos precipitantes (1) na atividade enzimática das lacases ressuspensas em tampão acetato (50 mM, pH 5,0) e (2) na atividade resultante após o processo de imobilização sob interferência de cada precipitante avaliado



Fonte: Autoria própria

Após o tempo de reticulação as amostras foram lavadas três vezes com tampão acetato (50 mM, pH 5,0) sendo centrifugadas a cada lavagem. Em seguida, os agregados foram ressuspensos em 1,8 mL de tampão acetato (50 mM, pH 5,0) para serem quantificados em função da atividade de lacases no próprio tubo reacional. Para isso os tubos com as amostras foram ambientados a 40 °C e adicionados de 200 µL de ABTS como substrato da reação, realizando a leitura da absorbância a 420 nm conforme descreve a sessão 4.5.1. Para cada condição, os CLEAs ressuspensos em tampão foram mensurados antes da reação com ABTS, a fim de descontar a leitura da absorbância promovida pela turbidez das amostras. O sobrenadante e as lavagens também foram avaliados.

4.6.2 Investigação das condições operacionais para imobilização

Para avaliar o efeito de diferentes condições operacionais de formação de CLEAs de lacases de *T. villosa* (CLEAs-TvL) e do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. (CLEAs-CO) os experimentos foram conduzidos em três situações: (a) a 4 °C e estático; (b) a 22 °C sob agitação de 150 rpm e (c) a 22 °C e estático em diferentes tempos de reticulação (3, 6, 16, 24 e 36h). Os imobilizados foram obtidos e quantificados de acordo com as condições descritas na sessão 4.6.1, tendo o sulfato de amônio (75%, m/v) como precipitante, solução de lacases (2 U mL⁻¹) e 100 mM de glutaraldeído como agente reticulador.

4.6.3 Variação da concentração enzimática e de glutaraldeído na formação dos CLEAs de lacases

A concentração de enzimas e de glutaraldeído demonstra ser um dos parâmetros mais importantes na obtenção de CLEAs de lacase (FRAZÃO et al., 2014; YU et al., 2006). Por isso eles foram investigados em conjunto com base no planejamento experimental fatorial completo 3⁽²⁻⁰⁾, obtido pelo Software Statistica 7.0. A concentração enzimática foi variada em 1000, 2000 e 4000 U L⁻¹ e glutaraldeído em 50, 100 e 200 mM. A matriz do planejamento experimental é mostrada no quadro 1.

Quadro 1 — Matriz experimental do planejamento fatorial completo 3⁽²⁻⁰⁾ ^a

Amostra	Lacase (U L ⁻¹)	Glutaraldeído (mM)
1	1000	50
5	2000	100
8	4000	100
7	4000	50
4	2000	50
10	2000	100
6	2000	200
9	4000	200
12	2000	100
3	1000	200
11	2000	100
2	1000	100

^a Os níveis correspondem a: -1 = 1000 U L⁻¹ de lacase e 50 mM de glutaraldeído, 0 = 2000 U L⁻¹ de lacase e 100 mM de glutaraldeído e 1 = 4000 U L⁻¹ de lacase e 200 mM de glutaraldeído

Os CLEAs foram obtidos pela adição de sulfato de amônio (75%, m/v) como precipitante e diferentes concentrações de glutaraldeído, por um período de 3h de reticulação a 22 °C de forma estática. Após o tempo de reação os CLEAs foram

lavados, centrifugados e quantificados de acordo com o método descrito na sessão 4.6.1.

Em maior escala, os CLEAs-TvL e CLEAs-CO foram obtidos com 1 mL de solução enzimática, corrigindo as proporções de precipitante e glutaraldeído conforme as condições ideais após a otimização.

4.6.4 Avaliação dos parâmetros de imobilização

A imobilização das lacases foi avaliada em função do rendimento de imobilização (RI) e da atividade recuperada (RA), utilizando as equações (1) e (2) (BRUGNARI et al., 2018; UBER et al., 2020):

$$RI (\%) = \frac{U_A - U_E}{U_A} \times 100 \quad (1)$$

$$AR (\%) = \frac{U_H}{U_A - U_E} \times 100 \quad (2)$$

Nas equações U_A representa a quantidade de unidades de lacases oferecidas para a imobilização; U_E indica a quantidade de unidades liberadas após o processo de imobilização (quantificadas nas lavagens); U_H representa as unidades enzimáticas imobilizadas.

4.7 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LACASES LIVRES E IMOBILIZADAS

4.7.1 Determinação de temperatura e pH ótimos

O efeito da temperatura e do pH na atividade de lacases livres de *T. villosa* (Lac-TvL livre) e do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. (Lac-CO livre), bem como dos CLEAs-TvL e CLEAs-CO foi determinado em triplicata empregando-se o ABTS como substrato da reação (BRUGNARI et al., 2018). A temperatura foi avaliada entre 20 a 80 °C com auxílio de um banho-maria termoestável. O pH foi avaliado na faixa de 2,2 a 7,0 utilizando tampões McIlvaine (MCILVAINE, 1921) a 40 °C. Os resultados foram apresentados em função da atividade relativa, considerando como 100 % a fração de maior atividade enzimática observada.

4.7.2 Estudo de estabilidade térmica

A estabilidade térmica das lacases livres e imobilizadas foi determinada pela quantificação da atividade enzimática após a incubação das amostras nas temperaturas de 40 e 55 °C e pH 5,0 por um período total de 3h, com avaliações a cada 15 min (BRUGNARI et al., 2018). A atividade enzimática foi determinada em triplicata utilizando-se ABTS como substrato da reação (sessão 4.5.1). Os resultados foram expressos como atividade residual, considerando a atividade inicial como 100% de atividade.

4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes

As constantes cinéticas K_M e V_{max} aparentes de Lac-TvL livre, Lac-CO livre, CLEAs-TvL e CLEAs-CO foram determinadas a 40 °C em tampão acetato (50 mM, pH 5,0) utilizando ABTS como substrato da reação (BRUGNARI et al., 2020) cujas concentrações variaram entre 500 até 25000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os parâmetros cinéticos foram obtidos por ajuste na equação de Michaelis-Menten aos dados experimentais utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA). A equação é representada por $v_0 = V_{max} [S] / (K_M + [S])$, onde v_0 é a velocidade inicial de reação a uma determinada concentração de substrato indicada por $[S]$ (BRUGNARI et al., 2020; CABANA; JONES; AGATHOS, 2007).

Além dos valores obtidos pelo ajuste na equação de Michaelis-Menten os parâmetros cinéticos também foram determinados de forma linearizada por meio das representações gráficas de Eadie-Hofstee ($v_0 = V_{max} - (K_M \times v_0 / [S])$) (EADIE, 1942; HOFSTEE, 1952) e de Lineweaver-Burk ($1/v_0 = (K_M / V_{max} \times [S]) + (1 / V_{max})$) (LINEWEAVER; BURK, 1934).

4.7.4 Reusabilidade dos CLEAs de lacase

O reuso dos CLEAs-TvL e CLEAs-CO foi avaliado por reações consecutivas utilizando ABTS como substrato da reação (BRUGNARI et al., 2020; VRŠANSKÁ et al., 2018), nas condições descritas na sessão 4.5.1. Após cada ciclo os CLEAs foram lavados duas vezes com tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) e centrifugados a 4000 rpm.

4.8 BIODEGRADAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO FÁRMACO CIPROFLOXACINO

4.8.1 Biodegradação *in vitro* do fármaco ciprofloxacino

Para avaliar a capacidade de biodegradação do fármaco pelas lacases livres e imobilizadas de *T. villosa* e do co-cultivo com *Pycnoporus* sp., cada enzima foi incubada com 5 ou 2,5 mg L⁻¹ do fármaco CIPX em tampão acetato (pH 5,0, 50 mM), por um período de até 24h a 40 °C sob agitação de 120 rpm, seguindo a metodologia de Lloret et al. (2010), com modificações. As atividades enzimáticas de lacases foram previamente quantificadas conforme descrito na sessão 4.5.1. Nos meios reacionais com volume final de 4 mL os extratos enzimáticos totalizaram 500 U L⁻¹ de lacase livre ou imobilizada e foram avaliados com e sem a adição do mediador HBA a 1 mM (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000).

Em todos os ensaios foram avaliados duas amostras controles as quais foram tratadas nas mesmas condições operacionais descritas anteriormente: (i) controle do fármaco em solução tampão e (ii) controle do fármaco com as enzimas livres ou imobilizadas previamente inativadas por fervura (100 °C, 10 min). Ao final do tempo de reação, a biodegradação enzimática foi interrompida por aquecimento e as amostras foram filtradas em Filtro de Seringa (0,45 µm de poro) e congeladas até o momento da quantificação (sessão 4.9.2). O CIPX (solução de 5 mg L⁻¹ em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0) foi quantificado nas mesmas condições das amostras (sessão 4.8.2) antes e depois da fervura (100 °C, 10 min), não sendo observada diferença de concentração do fármaco (APÊNDICE A). Isso porque a decomposição térmica do CIPX ocorre entre 225 e 257 °C (AMA, [s.d.] apud O'NEIL, 2006) e, portanto, o processo utilizado na interrupção da reação enzimática não causou nenhum efeito de degradação sobre o analito.

4.8.2 Condições cromatográficas e validação do método analítico para a quantificação de Ciprofloxacino

As concentrações residuais de CIPX foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD, Agilent 1260 series). A curva analítica de calibração (APÊNDICE B) com concentrações do padrão de CIPX variando de 0,5 a 12 mg L⁻¹ foi preparada a partir de uma solução

estoque do fármaco a 110 mg L⁻¹ dissolvido em acetonitrila (ACN) 20%. A concentração de CIPX foi determinada com base na equação da reta (equação 3) resultante do ajuste linear dos valores de áreas dos picos obtidos para cada amostra, em triplicata.

$$y = 1,57606 + 30,35339 x \quad (3)$$

Onde y é a área do pico cromatográfico e x a concentração do fármaco CIPX a ser determinada.

A partir da curva analítica as condições cromatográficas foram definidas e os parâmetros de mérito (limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade e faixa de trabalho foram determinados conforme a Resolução RDC n° 166 de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017).

As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com as condições descritas no Quadro 2 baseadas nos estudos de Sirisha, Gurupadayya e Sridhar (2014).

Quadro 2 — Condições cromatográficas para detecção e quantificação do Ciprofloxacino

Coluna cromatográfica	Acclaim C18 120A 4,6x250mm 5 µm
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Temperatura	35 °C
Detecção (DAD)	316 nm
Tempo de corrida	40 min
Fase móvel	ACN:H ₃ PO ₄ 0,1%
Eluição gradiente	0 - 15 min 15:85 16 min 95:5 26 min 95:5 27 min 15:85 40 min 15:85

Fonte: Modificado de Sirisha, Gurupadayya e Sridhar (2014)

4.8.3 Ensaio de inibição de crescimento bacteriano

A atividade antibiótica das amostras após o processo de biodegradação foi avaliada pela determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) em função da inibição do crescimento de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922. O procedimento foi baseado nos protocolos de NCCLS, [s.d.] e Wiegand, Hilpert e Hancock (2008). *E. coli* foi previamente cultivada a 37 °C, por 24h em ágar Mueller-Hinton para a obtenção das colônias isoladas. A cultura bacteriana foi suspensa em solução salina e ajustada

ao padrão McFarland 0,5 (1×10^8 UFC mL⁻¹). Então, 200 µL da suspensão bacteriana foi adicionado em 19,8 mL de caldo Mueller-Hinton para, em seguida, serem distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços. Nesse processo, cada poço inicial das placas recebeu 50 µL de amostra e 50 µL do inóculo bacteriano, de modo que a concentração da solução de *E. coli* totalizou 5×10^5 UFC mL⁻¹, aproximadamente.

Além das amostras, os controles positivos (trimetoprina, MIC 625 µg L⁻¹), de crescimento (*E. coli* em caldo Mueller-Hinton) e de esterilidade foram avaliados (caldo Mueller-Hinton). A inibição de crescimento foi avaliada por densidade óptica após 24h, utilizando leitor de microplaca (Fluostar Omega, BMG Labtech Plate Reader).

5 RESULTADOS

5.1 PRODUÇÃO DE LACASES POR FERMENTAÇÃO EM MEIO SEMISSÓLIDO ESTACIONÁRIO

Após o período de 7 dias a 28 °C em meio semissólido estacionário, os monocultivos dos fungos *T. villosa*, *Pycnoporus* sp., *L. crinitus* e *A. bisporus* e as associações dos três últimos com *T. villosa* resultaram nas atividades de lacases indicadas na Tabela 3. Para os cultivos isolados os resultados sugerem que a produção da enzima foi mais significativa pelo *T. villosa*, totalizando $10014,42 \pm 426,53$ U L⁻¹, enquanto nos demais foi menos pronunciada ou inexistente no caso do cultivo do *A. bisporus*.

Tabela 3 — Produção de lacases após 7 dias a 28 °C pelo cultivo isolado dos fungos *Trametes villosa*, *Pycnoporus* sp., *Lentinus crinitus* e *Agaricus bisporus* e pelo co-cultivo de *T. villosa* com *Pycnoporus* sp., *L. crinitus* e *A. bisporus*. Todos em meio semissólido estacionário composto por: glicose 10 g L⁻¹; KH₂PO₄ 3 g L⁻¹; peptona 0,5%; casca de arroz 1%; bagaço de uva 0,5%; bagaço de cana 2% e MnSO₄, CuSO₄, FeSO₄, ZnSO₄ e de MgSO₄ 1 mM

Tipo do cultivo	Fungo(s) produtor(es) de lacase	Atividade enzimática de lacase (U L ⁻¹) ^a
Monocultivos	<i>Trametes villosa</i>	10014,42 ± 426,53
	<i>Pycnoporus</i> sp.	4589,85 ± 519,60
	<i>Lentinus crinitus</i>	2278,28 ± 63,58
	<i>Agaricus bisporus</i>	n.d. ^b
Cultivos em pares com <i>T. villosa</i>	<i>T. villosa</i> + <i>Pycnoporus</i> sp.	9884,00 ± 879,66
	<i>T. villosa</i> + <i>L. crinitus</i>	6284,08 ± 791,97
	<i>T. villosa</i> + <i>A. bisporus</i>	4966,14 ± 734,20

^a Os valores representam a média dos experimentos em triplicata ± desvio padrão; ^b n.d. = valores não detectados

Avaliando os cultivos em pares com *T. villosa* a associação com *Pycnoporus* sp. resultou em melhor atividade enzimática ($9884,00 \pm 879,66$ U L⁻¹), não apresentando diferença estatística pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) entre os valores resultantes do cultivo isolado de *T. villosa* descrito anteriormente. As outras combinações avaliadas demonstraram menor produção de lacase.

Na natureza, as interações entre fungos são bastante comuns e podem afetar diretamente o processo de decomposição da madeira, principalmente pela mudança do perfil enzimático excretado pelas espécies (BODDY, 2000; IAKOVLEV; STENLID, 2000). O aumento da atividade enzimática no cultivo em pares está associado a interações benéficas como cooperação ou sinergismo, enquanto a diminuição ocorre

por meio de interações antagônicas ou de competição (BODDY, 2000). O mecanismo das interações ainda é desconhecido, mas demonstra depender da combinação específica de fungos, cuja compatibilidade entre as espécies é um dos fatores mais importantes para o sucesso da co-cultura (SINGH et al., 2018).

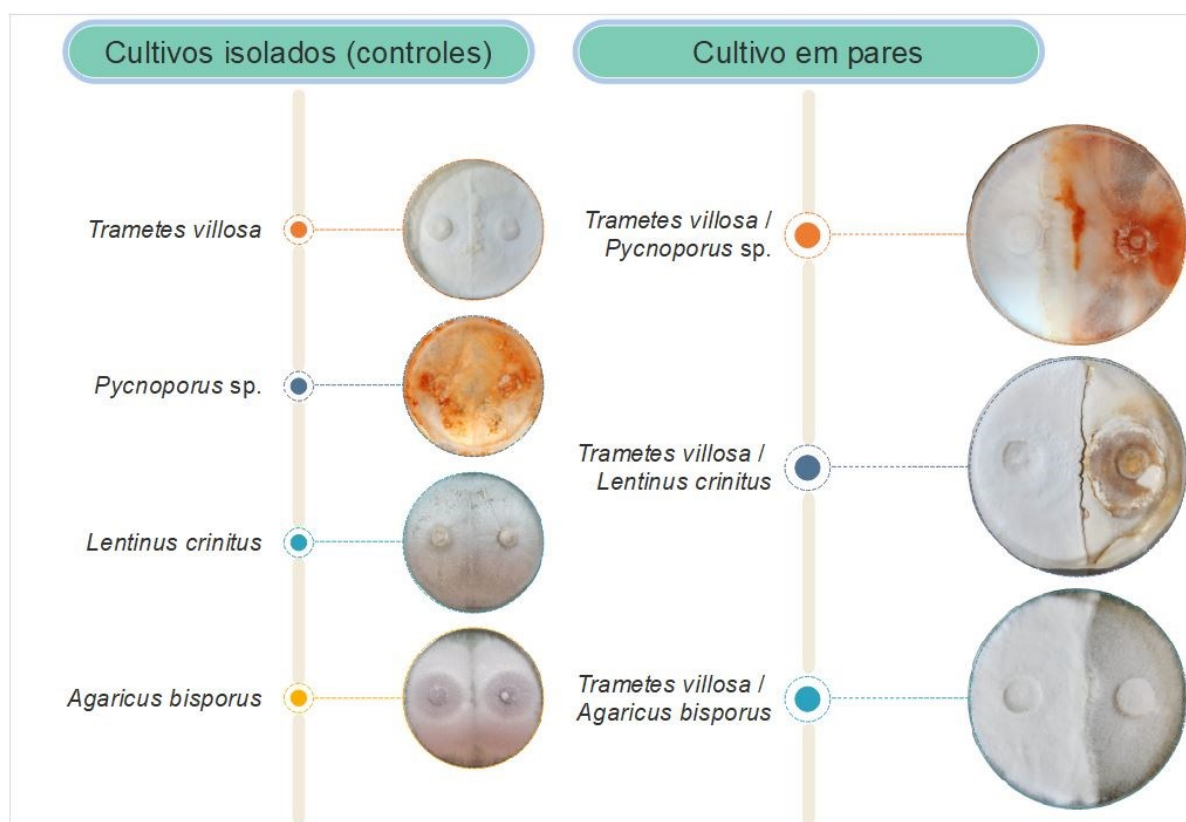
Neste trabalho, a associação do *T. villosa* com *Pycnoporus* sp. demonstrou ser a mais adequada em termos quantitativos para a produção de lacase nos co-cultivos avaliados, enquanto as outras combinações foram menos favoráveis. Testes de cultivos em placas avaliando mudanças morfológicas após o contato micelial foram utilizados em estudos anteriores (BODDY, 2000; IAKOVLEV; STENLID, 2000), demonstrando algumas correlações importantes entre o tipo de espécies associadas e a produção enzimática. Desta forma, na sessão 5.2 a seguir, buscou-se elucidar os resultados obtidos de atividade de lacase com as interações miceliais dos cultivos em pares.

5.2 INTERAÇÕES MICELIAIS DOS CULTIVOS BINÁRIOS

O cultivo em pares realizado de acordo com o que foi descrito na sessão 4.3 resultou nas interações observadas na Figura 9. Os micélios de todos os cultivos se encontraram entre o terceiro e o quarto dia e o crescimento foi avaliado periodicamente até o 14º dia. Os controles dos cultivos isolados de *T. villosa*, *Pycnoporus* sp., *L. crinitus* e *A. bisporus* demonstraram crescimento uniforme nos dois discos inseridos, sem qualquer mudança morfológica aparente.

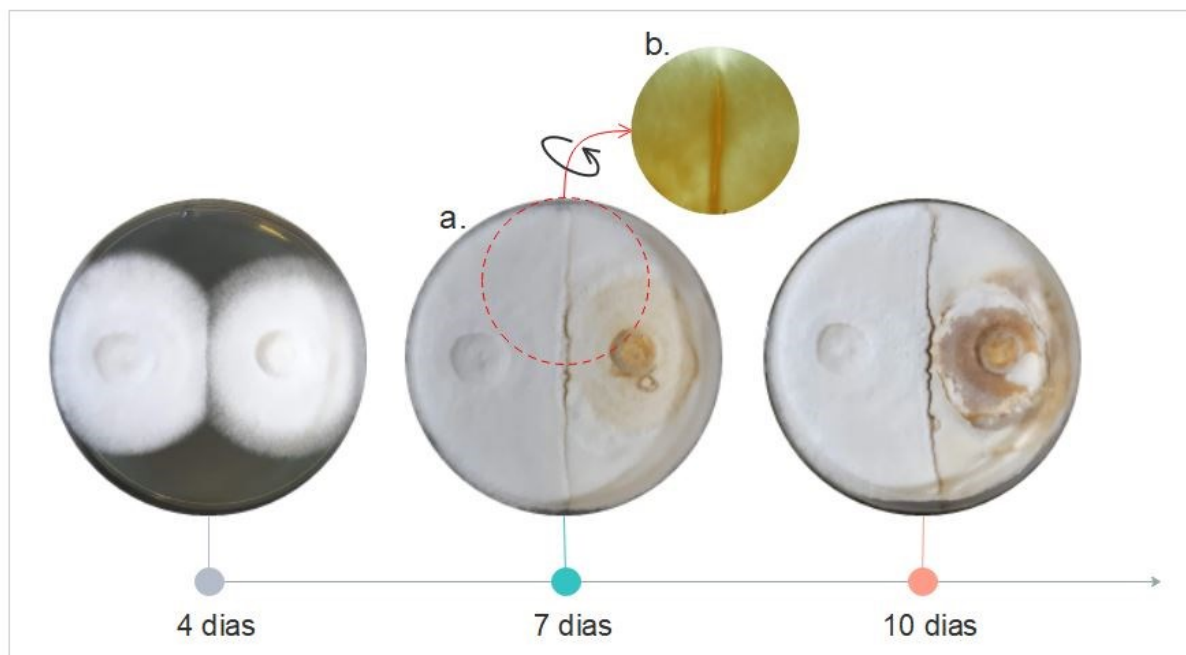
Na associação de *T. villosa* com *Pycnoporus* sp. (Figura 9) observou-se que o segundo teve um crescimento dominante no final do período avaliado. No entanto, no sétimo dia de contato, período no qual fez-se as investigações iniciais de produção de lacases (sessão 5.1), os micélios estavam equiparados em termos de crescimento. Apesar de essa observação não ser conclusiva a respeito de possíveis interações na produção de lacases, na sessão a seguir (5.3) será mostrado que o par em questão favoreceu a produção enzimática a partir do sétimo dia de cultivo. Portanto, o tempo de incubação é um fator importante que deve ser considerado para o sucesso da co-cultura, condizendo com trabalhos anteriores (BALDRIAN, 2004; FLORES et al., 2010; ZHANG; KE; CHEN, 2019).

Figura 9 — Interações miceliais em placas de ágar batata dextrose dos cultivos isolados e das associações entre *Trametes villosa* e *Pycnoporus* sp., *Lentinus crinitus* e *Agaricus bisporus*, após 14 dias a 28 °C



Na interação de *T. villosa* com *L. crinitus* foi observada a formação de pigmentação marrom a partir do quarto dia de cultivo (Figura 10). A pigmentação formada se espalhou por toda a colônia de *L. crinitus* e se estendeu pela zona de contato. Essa coloração marrom não foi observada nos respectivos controles indicando ser uma resposta da interação entre os pares. Ela pode ter uma interpretação contraditória de acordo com os dados literais. Se por um lado a pigmentação pode indicar estresse de uma ou ambas as colônias resultando na secreção de metabólitos com efeitos antagonistas na produção de lacases (SINGH et al., 2018), por outro, pode indicar metabólitos produzidos por um dos pares que favorece a secreção de lacases pelo outro (YAO et al., 2016). Acredita-se que neste trabalho a primeira opção seja a mais plausível para explicar o efeito que desfavoreceu a produção de lacases pelo co-cultivo em questão, indicando uma possível incompatibilidade entre as espécies.

Figura 10 — Evidências do processo de pigmentação após contato micelial de *Trametes villosa* e *Lentinus crinitus* registradas nos períodos de 4, 7 dias ^a e 10 dias



^a as letras a. e b. indicam, respectivamente, a frente e o verso da placa de Petri

Nos pares *T. villosa* + *A. bisporus* (Figura 9) é possível observar um avanço do *T. villosa* demonstrando uma hierarquia dominante sobre o *A. bisporus*, onde o primeiro avança por meio de interações competitivas para alcançar recursos ou espaço (BODDY, 2000). Esse resultado mostrou ser desfavorável para ambas as espécies, uma vez que a produção de lacase nesse cultivo foi a menor obtida (Tabela 3). Efeitos de inibição mútua ou interferência hifal em espécies não compatíveis também foram documentados por Copete-Pertuz et al. (2019).

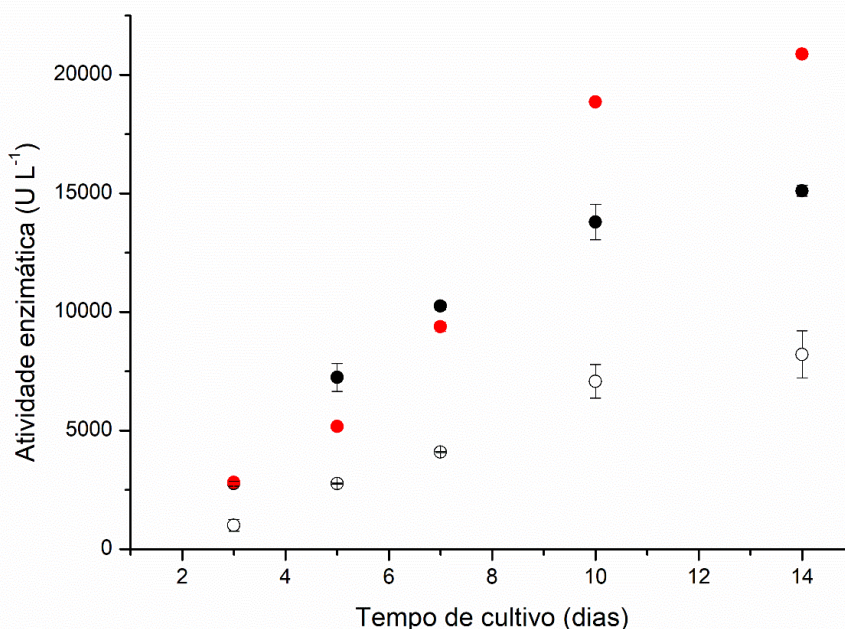
Com base nos resultados de atividade de lacase e interações miceliais do co-cultivo, e levando em consideração que não houve qualquer evidência de incompatibilidade entre os fungos, estabeleceu-se avaliar a cinética de produção enzimática das enzimas LiP, MnP e lacases produzidas pelos fungos *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. isolados, bem como do co-cultivo (sessão 5.3).

5.3 CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A produção de lacases, MnP e LiP das monoculturas de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. e do co-cultivo foi avaliada nos tempos de 3, 5, 7, 10 e 14 dias. Em todos os extratos as enzimas MnP e LiP não foram produzidas em quantidades detectáveis.

A síntese de lacases nos tempos avaliados é mostrada na Figura 11. Primeiramente, é interessante observar que os resultados obtidos no sétimo dia de cultivo são equivalentes aos reportados nas investigações iniciais dos cultivos isolados e em pares (Tabela 3), indicando uma reprodutibilidade satisfatória na produção de lacases nas condições estudadas. A partir do sétimo dia houve estimulação da produção de lacases pelo cultivo em pares. No décimo dia o valor de atividade de lacase expresso pelo co-cultivo correspondeu a $18858,90 \pm 91,05 \text{ U L}^{-1}$ e representa uma produção cerca de duas vezes maior com relação ao período anterior (7 dias, $9382,27 \pm 193,08 \text{ U L}^{-1}$). No 14º dia a atividade de lacase do co-cultivo ($20887,43 \pm 27,47 \text{ U L}^{-1}$) representa 10% de aumento, não indicando, portanto, uma variação expressiva com relação ao 10º dia de cultivo. Para a monocultura de *T. villosa* não houve diferença significativa ($p > 0.05$) entre o 10º e o 14º dias de cultivo. Assim, como a redução do tempo de cultivo representa uma importante vantagem na produção de lacases em maiores escalas, os cultivos obtidos no décimo dia demonstraram ser mais atraentes nas condições estudadas.

Figura 11 — Cinética da produção de lacases dos cultivos isolados de *Trametes villosa* (●), de *Pycnoporus* sp. (○) e do co-cultivo (●) de ambos nos períodos de 3, 5, 7, 10 e 14 dias a 28 °C, em cultura semissólida estacionária ^a



^a Os símbolos representam a média dos experimentos \pm desvio padrão (n = 3)

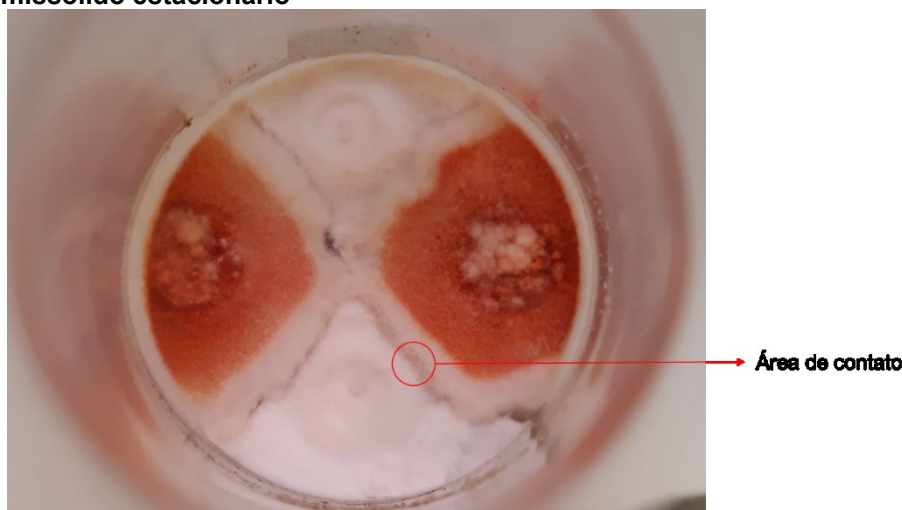
Avaliando o 10º dia de cultivo, as monoculturas de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. expressaram atividades de lacase de $13795,08 \pm 747,21$ e $7078,47 \pm 707,97 \text{ U L}^{-1}$,

respectivamente. Comparadas com o co-cultivo no mesmo período, as atividades foram cerca de 1,4 vezes menor para o primeiro e 2,7 vezes menor para o segundo monocultivo, reforçando a estimulação da produção de lacase pelo cultivo em pares.

O co-cultivo de espécies distintas pode resultar em uma maior produção enzimática por meio de interações sinérgicas. O que ocorre é que a interação de determinados fungos pode provocar estresse oxidativo e acelerar o metabolismo secundário estimulando, assim, a produção de enzimas (CHI; HATAKKA; MAIJALA, 2007). Outro fator que pode estar associado é que determinadas espécies podem sintetizar metabólitos secundários (compostos fenólicos, por exemplo) os quais estimulam a expressão da enzima nos seus pares como um mecanismo de defesa (PISCITELLI et al., 2011; ZHANG et al., 2020).

Interessantemente, na cultura semissólida suplementada com nutrientes pode-se observar que a co-cultura *T. villosa* + *Pycnoporus* sp. apresentou uma linha escura no contato entre os micélios (Figura 12), inexistente nas avaliações preliminares das interações miceliais (sessão 5.2). A coloração marrom pode estar associada aos metabólitos secundários sintetizados em prol do aumento da atividade pelos pares. Yao et al. (2016) atribuíram a coloração marrom na zona de contato como sendo metabólitos xilosídeos, gerados pela interação de determinadas espécies. Tal fato poderia justificar o aumento da atividade obtido pelo co-cultivo neste trabalho, mas outras investigações deveriam ser realizadas para confirmar essa hipótese.

Figura 12 — Co-cultivo dos fungos *Trametes villosa* e *Pycnoporus* sp. após 10 dias de incubação em meio semissólido estacionário ^a



^a Destaque para área de contato entre os fungos com formação de pigmentação escura

O que fica evidente é que o co-cultivo de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. explorado neste trabalho mostrou resultados satisfatórios na produção de lacase. A indução da produção de lacases em interações interespecíficas entre fungos também foi documentada em trabalhos anteriores (BALDRIAN, 2004; CHI; HATAKKA; MAIJALA, 2007; COPETE-PERTUZ et al., 2019; KUHAR; CASTIGLIA; LEVIN, 2015; SINGH et al., 2018), o que corrobora com os resultados deste trabalho.

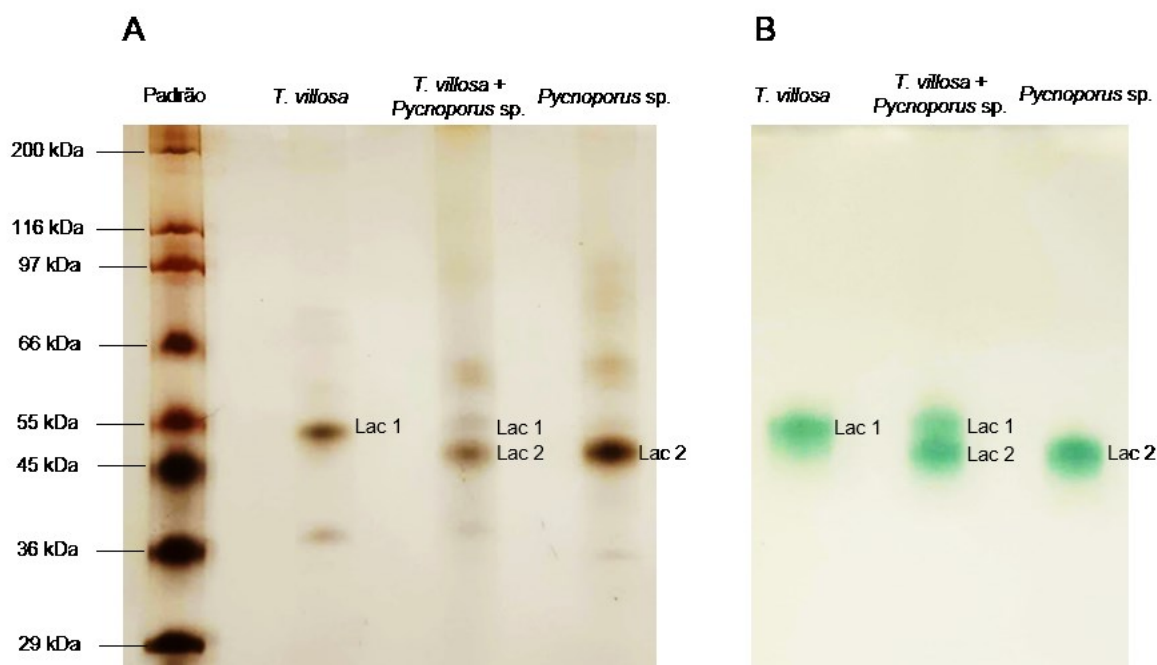
Então, de acordo com os resultados obtidos e tendo em vista a maior viabilidade de produção enzimática, considerou-se trabalhar com lacases produzidas pelo co-cultivo de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. após o período de 10 dias de cultivo. Em todos os ensaios subsequentes, lacases do co-cultivo foram comparadas com aquelas obtidas pelo monocultivo de *T. villosa* produzidas nas mesmas condições.

5.3.1 Caracterização do extrato bruto por SDS-PAGE e zimograma

O SDS-PAGE seguido da identificação de lacase pela reação com ABTS indica que os extratos das espécies isoladas expressaram como proteína principal uma lacase com peso molecular aparente compreendido entre 55 e 45 kDa, para os dois gêneros avaliados (Figura 13). Para o *T. villosa* este valor é equivalente aos que foram documentados em estudos de caracterização de lacases de *Trametes* spp. (DHAKAR; PANDEY, 2013; ZHENG et al., 2017); para o *Pycnoporus* sp., os valores reportados para este gênero variam entre 50 a 68 kDa (NAIDU; SIDDIQUI; IDRIS,

2020; RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014; SALAZAR-LÓPEZ et al., 2017; WANG et al., 2017), condizendo com o que foi identificado neste trabalho.

Figura 13 — Caracterização das isoenzimas de lacase por SDS-PAGE (A) e zimograma pela reação com ABTS (B) das monoculturas de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. (P) e do co-cultivo ^a



^a A: mobilidade eletroforética das proteínas comparados com o padrão; B identificação das bandas de lacases pela reação do gel de poliacrilamida com ABTS após 5 min

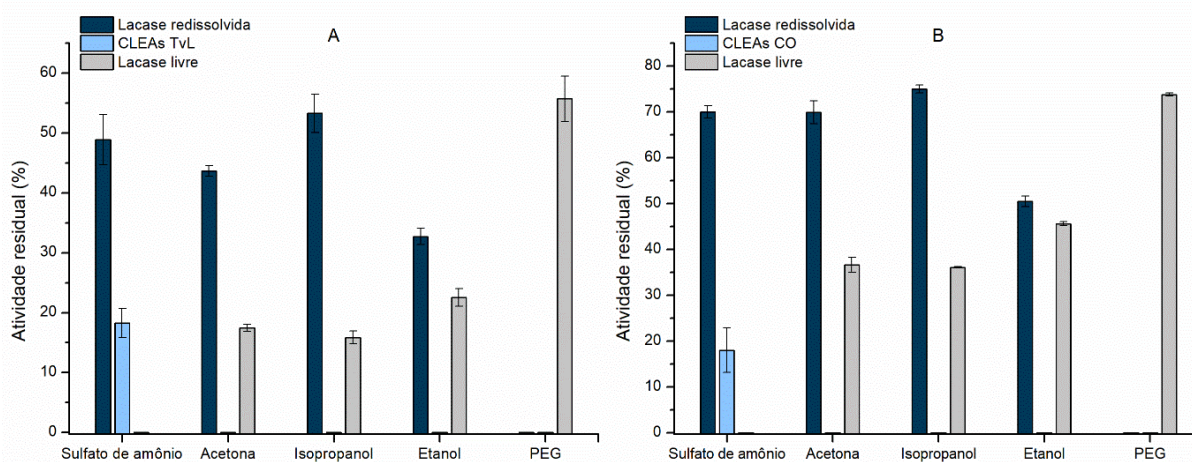
Para o cultivo em pares é interessante observar que as duas isoformas de lacases reveladas pelos cultivos isolados estão presentes no extrato bruto. Apesar de não sintetizar nenhuma isoforma de lacase como já fora relatado em condições de co-cultivo anteriores (KUHAR; CASTIGLIA; LEVIN, 2015), o fato de diferentes enzimas estarem presentes em um único extrato pode ser vantajoso nas aplicações subsequentes, considerando que diferentes isoformas de lacases podem apresentar propriedades catalíticas distintas (PISCITELLI et al., 2011; SHLEEV et al., 2004). Outros efeitos indicados para o co-cultivo é o aumento de um dos genes de lacases sintetizadas (ZHANG; KE; CHEN, 2019), fato que não foi observado nas condições avaliadas.

5.4 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

5.4.1 Seleção do agente precipitante para a formação do imobilizado

A etapa inicial de formação de CLEAs é a precipitação enzimática, portanto, a escolha do precipitante adequado é uma importante chave para o sucesso da imobilização. A precipitação pode ser alcançada alterando-se o estado de hidratação das moléculas enzimáticas pela adição de sais ou solventes orgânicos (MATIJOŠYTE et al., 2010). Como cada agente pode apresentar diferentes efeitos sobre a precipitação da enzima, é essencial rastrear o mais adequado no processo. Neste trabalho, para determinar o melhor precipitante na formação de CLEAs foram testados sulfato de amônio, acetona, isopropanol, etanol e PEG 4000, sobre extratos brutos de *T. villosa* e do co-cultivo (a 2 U mL⁻¹ cada) e os resultados obtidos são mostrados na Figura 14.

Figura 14 — Efeito de precipitantes na formação dos CLEAs de lacases de *T. villosa* (A) e do co-cultivo de *T. villosa* com *Pycnoporus* sp (B). Glutaraldeído foi adicionado como agente reticulador totalizando uma concentração de 100 mM^a



^a Barras azuis escuras: atividade residual de lacases após 15 min de precipitação com posterior reconstituição (sem a adição de glutaraldeído); Barras azuis claras: CLEAs de lacases; Barras cinzas claras: enzimas livres residuais quantificadas no sobrenadante na formação dos CLEAs. As barras representam a média \pm desvio padrão (n = 2).

Para a síntese dos CLEAs é de se esperar que os precipitantes que exibam maiores recuperações de atividade de lacases sejam os mais adequados para prosseguir com a reticulação dos agregados enzimáticos. No entanto, nas condições avaliadas nos dois extratos observou-se que os solventes orgânicos acetona,

isopropanol e etanol, apesar de terem induzido a precipitação, impossibilitaram a formação dos imobilizados. Esse efeito pode estar relacionado às possíveis modificações conformacionais da enzima após a precipitação por esses agentes, o que dificultaria a interligação do glutaraldeído com os grupos amino na superfície das enzimas, inviabilizando a imobilização. Esses resultados estão em consonância com os reportados por Zerva, Pentari e Topakas (2020) que também observaram efeitos negativos de metanol, acetona e etanol na formação de CLEAs de lacases de *Pleurotus citrinopileatus*.

Utilizando PEG não houve a formação de precipitado nas duas condições de cultivo avaliadas. Matijošyte et al. (2010) também relataram a ineficiência do PEG de massa molecular 3400 para a precipitação de lacases de *T. villosa* a 20 °C; em contraste, diferentes autores indicam que a utilização desse polímero possibilitou os melhores resultados de recuperação enzimática (BILAL et al., 2021; CABANA; JONES; AGATHOS, 2007). Esses resultados reforçam que não há um método universal na etapa de precipitação e que o melhor precipitante na formação dos CLEAs pode variar entre lacases produzidas por diferentes espécies ou diferentes cepas da mesma e que, por isso, deve ser investigado.

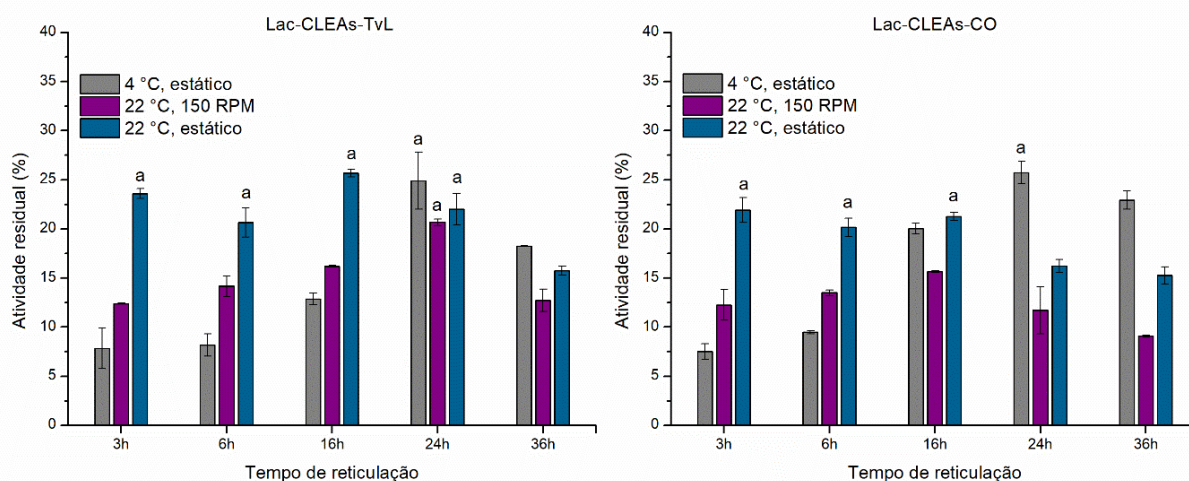
Sendo assim, o sulfato de amônio foi escolhido como precipitante para as futuras investigações de imobilização enzimática. Esse precipitante é comumente relatado para a formação dos CLEAs de lacase de diferentes fontes (SINIRLIOGLU; SINIRLIOGLU; AKBAS, 2013; UBER et al., 2020; VRŠANSKÁ et al., 2018; ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020). Porém, as recuperações enzimáticas dos CLEAs formados pela interação de sulfato de amônio e glutaraldeído são geralmente maiores do que as obtidas neste trabalho, sendo relatados valores acima de 60% (Tabela 2). Com base nisso, novas investigações com variações de tempo e condições operacionais de imobilização foram realizadas com o objetivo de melhorar a recuperação enzimática (sessão 5.4.2).

5.4.2 Variação das condições reacionais para obtenção do imobilizado

Diversos parâmetros podem afetar a formação dos CLEAs e na literatura há múltiplas variações do processo para cada tipo de enzima (Tabela 2). Por isso, a próxima etapa para otimização da formação de CLEAs-TvL e CLEAs-CO consistiu na variação de condições operacionais. Os experimentos foram, então, conduzidos em

três situações: (a) a 4 °C e estático; (b) a 22 °C sob agitação de 150 rpm e (c) a 22 °C e estático e os resultados de atividade residual de lacase são mostrados na Figura 15.

Figura 15 — Efeito do tempo de reticulação em diferentes condições operacionais na formação dos CLEAs de *Trametes villosa* (A) e de co-cultivo de *T. villosa* com *Pycnoporus* sp. (B). A concentração enzimática foi mantida em 2 U mL⁻¹. Sulfato de amônio (75%, m/v) e glutaraldeído (concentração final de 100 mM) foram utilizados para a imobilização ^a



^a As barras representam a média dos experimentos \pm desvio padrão (n = 2). Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p > 0,05)

Para CLEAs-TvL nos períodos avaliados até 16h a condição que melhor favoreceu a recuperação enzimática foi à 22 °C sem agitação. Nessa condição, nos tempos de 3, 6 e 16h não houve variação significativa nos valores de recuperação de atividade de lacase após o processo de imobilização (Tukey, p > 0,05). Em 24h, as três condições avaliadas demonstraram valores de AR% sem diferença significativa entre si (p > 0,05) sendo $24,90 \pm 2,90$, $20,69 \pm 0,33$ e $22,01 \pm 1,61\%$, para 4 °C e estático, 22 °C e 150 rpm e 22 °C e estático, respectivamente. Quaisquer dessas condições a 24h não demonstrou melhora significativa na recuperação enzimática com relação aos CLEAs-TvL obtidos a 3h, 22 °C e estático (correspondendo à $23,60 \pm 0,50\%$).

De forma semelhante a recuperação de atividade dos CLEAs-CO foi favorecida à 22 °C estático até o período de 16h, sem variação significativa com relação aos períodos anteriores nessa mesma condição (p > 0,05). Em 24h a condição de 4 °C e estático expressou maior atividade recuperada ($25,72 \pm 1,15\%$) a qual, no entanto, não diferiu significativamente dos valores obtidos em 3h a 22 °C sem agitação ($21,91 \pm 1,28\%$).

A formação dos CLEAs depende da acessibilidade do glutaraldeído com os resíduos de lisina presentes na enzima e essa reação é influenciada pela temperatura. Geralmente em temperaturas mais baixas a reticulação requer um tempo maior (XU et al., 2018) e vários relatos indicam o preparo de CLEAs de lacase a 4 °C em períodos iguais ou maiores do que 24h (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; HASSANI; BA; CABANA, 2013; UBER et al., 2020). Neste trabalho, a formação dos CLEAs na temperatura de 4 °C foi beneficiada em 24h nos dois extratos avaliados, corroborando com os dados documentados em trabalhos anteriores.

Em temperaturas mais altas o tempo de reticulação é menor (XU et al., 2018). Schoevaart et al. (2004) reportaram que acima de 3h não há aumento no processo de *cross-linking* à temperatura ambiente e outros autores reportaram a obtenção de CLEAs de lacase em temperaturas iguais ou acima de 20 °C em períodos de 3h de reação (YANG et al., 2017a; ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020). Neste trabalho nas condições de 22 °C para os dois extratos não houve aumento considerável de recuperação enzimática após 3h de reticulação, confirmando os resultados publicados anteriormente.

Em relação às condições de agitação, apesar desse parâmetro ter demonstrado efeito positivo nos resultados de Zerva, Pentari e Topakas (2020), neste trabalho não foi observado melhora relevante na AR% quando os CLEAs dos dois extratos foram formados sob agitação de 150 rpm a 22 °C. Nessa condição, os CLEAs-TvL obtiveram maior atividade recuperada após 24h de reação ($20,69 \pm 0,33\%$), não diferindo significativamente dos valores obtidos nas outras duas condições operacionais no mesmo período ($p > 0,05$). Para os CLEAs-CO a melhor AR% sob agitação foi obtida após 16h de reação, ainda assim esse resultado é cerca de 6% menor do que aquele obtido sem agitação na mesma temperatura.

Com todas essas ponderações com relação à agitação, temperatura e tempo de reticulação, a condição estática a 22 °C pelo período de 3h foi escolhida para as futuras investigações.

5.4.3 Variação da concentração enzimática e de glutaraldeído na formação dos CLEAs de lacases

A interferência da concentração de lacases e de glutaraldeído na recuperação de atividade enzimática após a imobilização foi avaliada em conjunto por intermédio

do planejamento experimental fatorial completo $3^{(2-0)}$. Para tanto, a concentração enzimática foi variada em 1000, 2000 e 4000 U L⁻¹ e glutaraldeído em 50, 100 e 200 mM. Os resultados de AR% e de RI% dos CLEAs-TvL e CLEAs-CO são mostrados na Tabela 4. Para todas as amostras os valores de RI% foram satisfatórios, apresentando ao menos 82%. Por isso, as análises estatísticas foram direcionadas para investigar as melhores condições em termos de aumento de recuperação de atividade enzimática após o processo de imobilização.

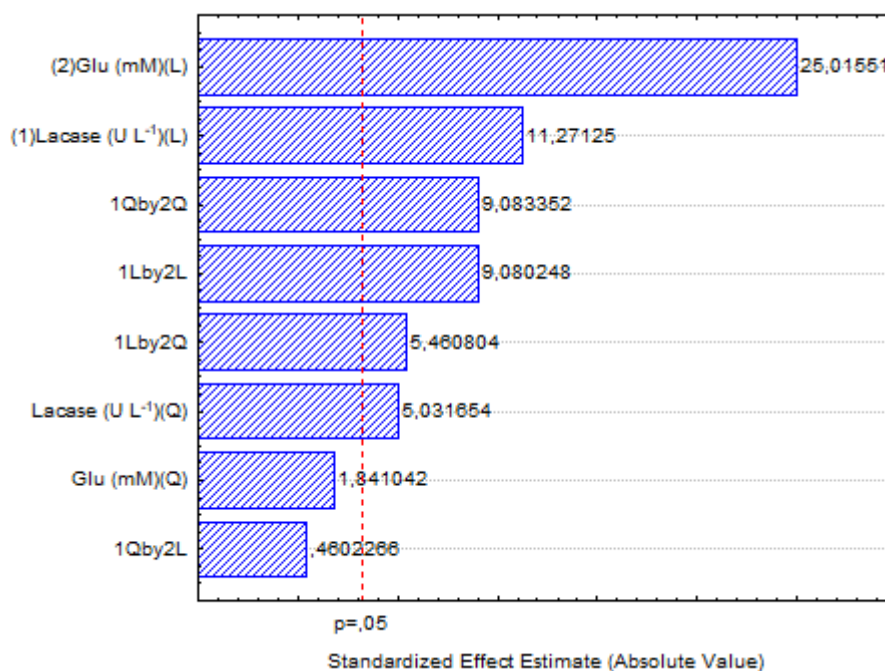
Tabela 4 — Atividade Recuperada (AR, %) e Rendimento de Imobilização (RI, %) para CLEAs de lacases de *Trametes villosa* e do co-cultivo de *T. villosa* com *Pycnoporus* sp., seguindo o planejamento experimental fatorial completo $3^{(2-0)}$ ^a

Amostra	Lacase (U L ⁻¹)	Glutaraldeído (mM)	CLEAs-TvL		CLEAs-CO	
			AR (%)	RI (%)	AR (%)	RI (%)
1	1000	50	14,49	88,77	16,86	95,23
5	2000	100	20,96	97,31	23,04	96,81
8	4000	100	19,06	89,84	24,29	94,14
7	4000	50	12,96	82,26	15,00	88,39
4	2000	50	13,49	87,02	13,99	93,19
10	2000	100	20,17	92,24	23,77	97,91
6	2000	200	22,75	100,00	23,84	100,00
9	4000	200	27,98	97,77	29,30	99,76
12	2000	100	20,60	92,04	23,83	97,14
3	1000	200	20,24	100,00	26,21	98,82
11	2000	100	19,78	94,99	21,99	97,78
2	1000	100	12,58	96,90	17,38	99,23

^a A concentração da lacase foi variada em 1000, 2000 e 4000 U L⁻¹ e glutaraldeído em 50, 100 e 200 mM. Condições experimentais de imobilização: 3h, 22 °C e estático

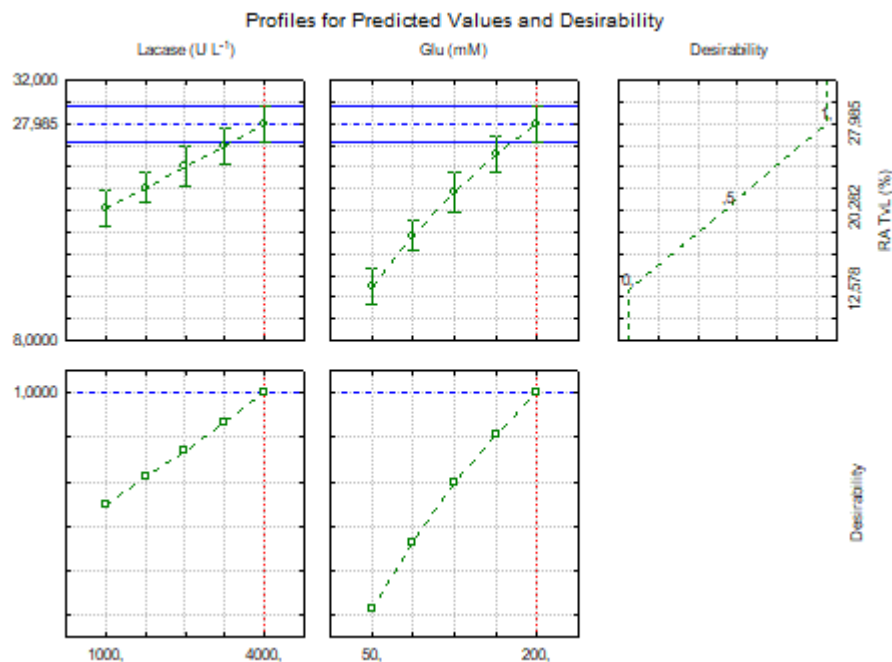
Para CLEAs-TvL, o diagrama de Pareto (Figura 16) indica que glutaraldeído foi significativo no fator linear ($p > 0,05$) com valor positivo que indica uma tendência de aumento na recuperação de atividade de lacase com o aumento da concentração do agente reticulador. A concentração enzimática foi significativa nos fatores lineares e quadráticos e os valores positivos indicam uma propensão de aumento na AR% com aumento na concentração de lacases. O coeficiente de determinação (R^2) correspondeu a 0,9966 e o coeficiente ajustado (R-adj) a 0,9877, adequando-se ao modelo de duas interações (linear, quadrático). Detalhes dos parâmetros estatísticos podem ser consultados na Tabela 8, do APÊNDICE D.

Figura 16 — Diagrama de Pareto indicando a significância da concentração de lacases e de glutaraldeído ($p < 0,05$) do planejamento experimental fatorial completo $3^{(2-0)}$ na recuperação de atividade dos CLEAs de lacases de *T. villosa*



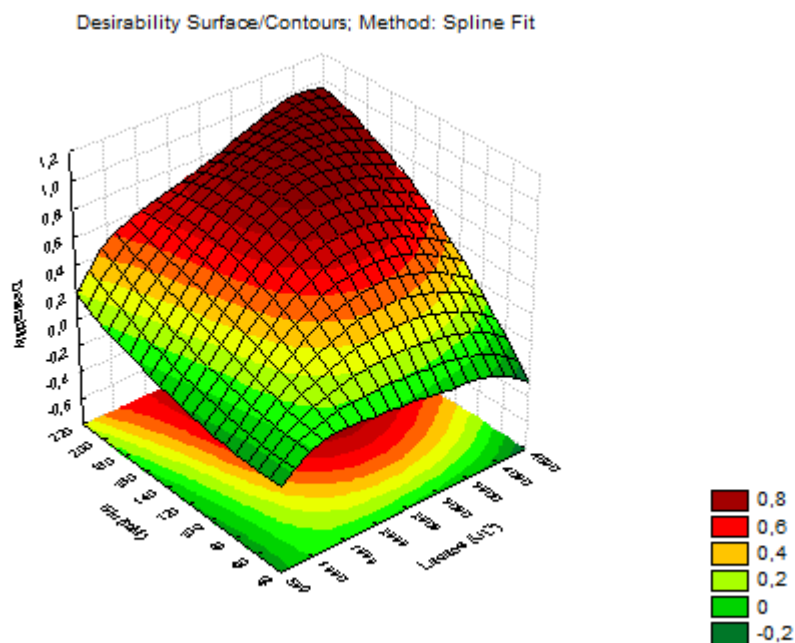
Pelas análises estatísticas os valores desejáveis de lacases e de glutaraldeído correspondem a 4000 U L⁻¹ e 200 mM, respectivamente (Figura 17), indicando cerca de 28% de recuperação enzimática para CLEAs-TvL nessa condição. No gráfico de superfície ilustrado na Figura 18 pode-se observar a tendência de aumento na recuperação enzimática na região dos pontos ótimos.

Figura 17 — Valores desejáveis estatisticamente para concentração de lacases de *Trametes villosa* e glutaraldeído na imobilização por CLEAs^a



^a As linhas tracejadas verticais de coloração vermelha indicam os valores desejáveis das concentrações de lacases e glutaraldeído no delineamento avaliado ($p < 0,05$)

Figura 18 — Gráfico de superfície indicando a tendência de aumento de recuperação de atividade nos pontos ótimos determinados estatisticamente^a



^a As regiões com coloração vermelho escuro indicam as maiores recuperações enzimáticas no delineamento avaliado

Para o CLEAs-CO o diagrama de Pareto (Figura 19) indica que a concentração de glutaraldeído foi significativa nos fatores lineares e quadráticos ($p > 0,05$). Os valores positivos nos dois fatores indicam que a recuperação de atividade de lacase do co-cultivo pode ser favorecida com o aumento da concentração do agente reticulador. A concentração enzimática por sua vez foi significativa no fator linear indicando um aumento na AR% com o aumento da concentração de lacases. O coeficiente de determinação (R^2) correspondeu a 0,9910 e o coeficiente ajustado (R -adj) a 0,9671, adequando-se ao modelo de duas interações (linear, quadrático). Detalhes dos parâmetros estatísticos podem ser consultados na Tabela 9, do APÊNDICE D.

Estatisticamente, os valores ótimos de lacases e de glutaraldeído correspondem a 4000 U L^{-1} e $162,5 \text{ mM}$, respectivamente, (Figura 20) apontando cerca de 30% de AR% nessa condição. Na figura 21 é possível, ainda, verificar o gráfico de superfície das interações entre concentração de lacases e glutaraldeído para os pontos desejáveis.

Figura 19 — Diagrama de Pareto indicando a significância da concentração de lacases e de glutaraldeído ($p < 0,05$) do planejamento experimental fatorial completo⁽²⁻⁰⁾ na recuperação de atividade dos CLEAs de lacases do co-cultivo

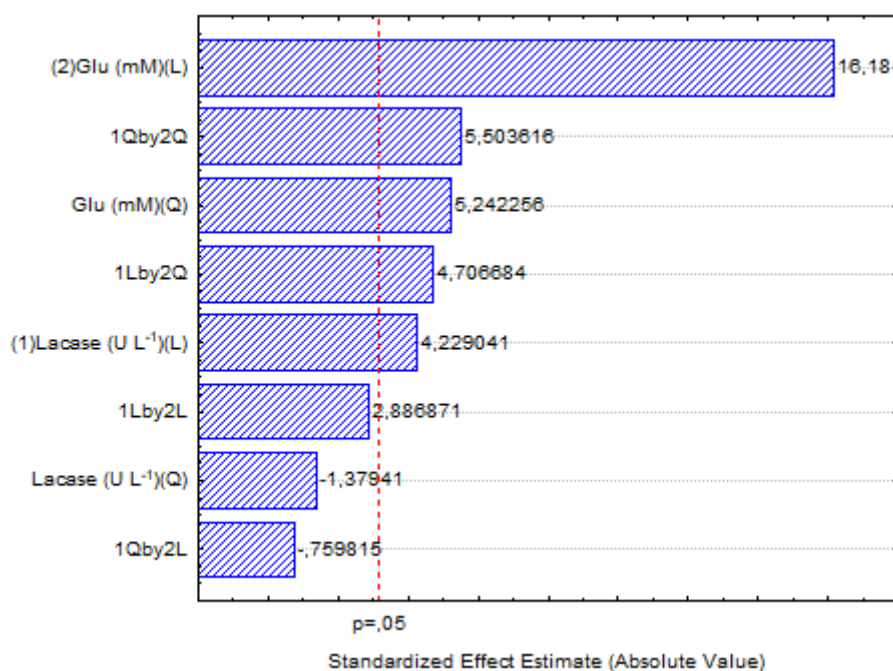
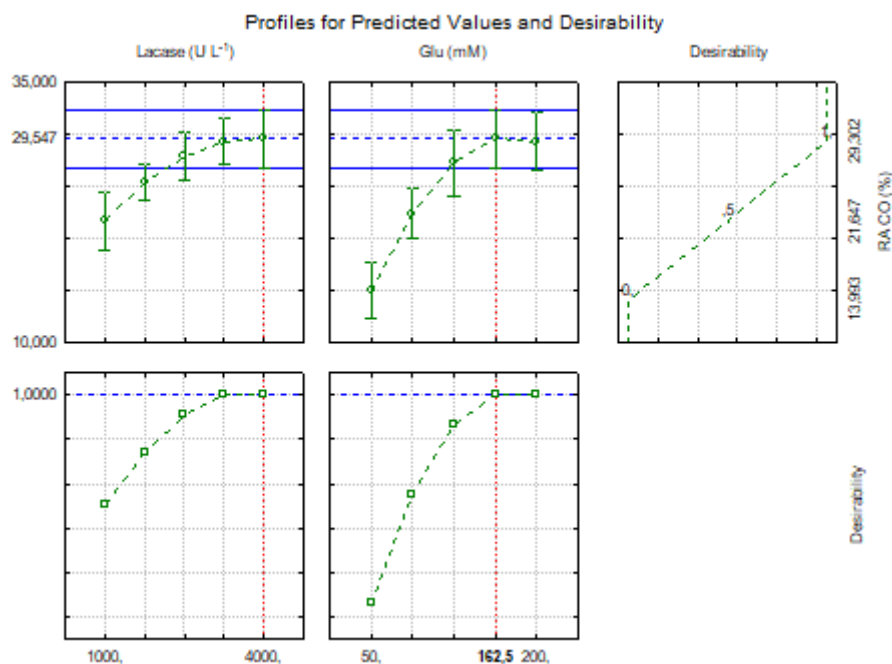
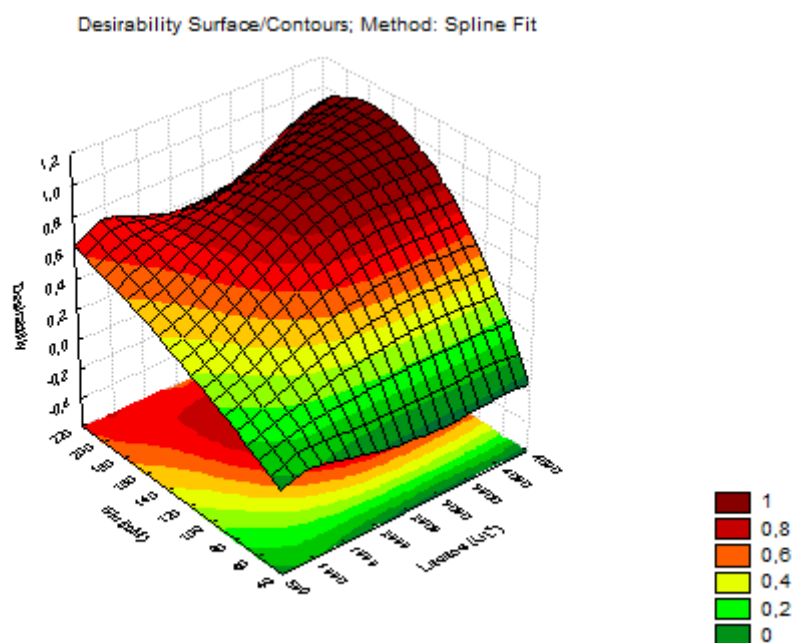


Figura 20 — Valores desejáveis estatisticamente para concentração de lacases do co-cultivo e glutaraldeído na imobilização por CLEAs ^a



^a As linhas tracejadas verticais de coloração vermelha indicam os valores desejáveis das concentrações de lacases e glutaraldeído no delineamento avaliado ($p < 0,05$)

Figura 21 — Interações entre concentração de lacases de co-cultivo e glutaraldeído para os pontos desejáveis obtidos estatisticamente



^a As regiões com coloração vermelho escuro indicam as maiores recuperações enzimáticas no delineamento avaliado

Os pontos desejáveis indicados para os dois extratos foram avaliados em triplicata nas mesmas condições operacionais dos planejamentos experimentais. Os resultados de AR% foram $29,56 \pm 0,57$ e $30,08 \pm 1,94\%$ para CLEAs-TvL e CLEAs-CO, respectivamente, validando o delineamento experimental realizado.

Em maior escala, mantendo as proporções reacionais de lacases e glutaraldeído, os resultados de AR% para CLEAs-TvL e CLEAs-CO foram $27,77 \pm 1,07$ e $35,38 \pm 0,95\%$, nesta ordem. Com relação ao RI% os valores encontrados correspondem a $98,42 \pm 0,35$ e $97,93 \pm 0,14\%$ para CLEAs-TvL e CLEAs-CO, respectivamente. Os valores são próximos daqueles alcançados em escala menor nos testes de otimização. Esse efeito é interessante quando comparado com os resultados de Zerva, Pentari e Topakas (2020) que obtiveram queda de aproximadamente 50% nos valores de recuperação de atividade de lacase em maior escala. Esses autores associaram a menor recuperação em função da agitação ineficiente em maior volume reacional, uma vez que a agitação foi importante na formação dos CLEAs avaliados. Como neste trabalho a agitação não foi um fator que favoreceu a formação dos CLEAs, o aumento da escala na formação do imobilizado não causou nenhuma interferência negativa na recuperação enzimática.

Geralmente os CLEAs relatados na literatura exibem AR% maior do que as alcançadas neste trabalho, como pode ser observado nos valores mostrados na Tabela 2. Porém, a maioria dos trabalhos anteriores trazem a formação de CLEAs com extratos comerciais ou purificados (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014; MATIJOŠYTE et al., 2010), apesar de muitos autores discutirem que este método de imobilização é eficaz quando aplicados em extratos brutos.

Como neste trabalho foram utilizados os extratos brutos, a recuperação de atividade de aproximadamente 30% para as duas condições investigadas, não representou um contratempo na formação do imobilizado; pelo contrário, configurou uma estratégia vantajosa para a formação de CLEAs ativos de lacases cujo extratos não passaram por processos de purificação, os quais geralmente resultam em custos adicionais.

Além do mais, alguns autores expõem valores de recuperação de atividade de enzimas imobilizadas próximos daqueles que foram obtidos neste trabalho. São o caso de Tandjaoui et al. (2015) que reportaram 28% para peroxidase-CLEAs de *Brassica rapa*; Sellami et al. (2021) que indicaram 29% para peroxidase-CLEAs de

Raphanus sativus var. *niger*; Sadeghzadeh et al. (2020) que relataram 27% para CLEAs magnéticos de *Trametes hirsuta* e Kumar, Sivanesan e Cabana (2014) que atribuíram 32% de recuperação para CLEAs magnéticos de lacases de *Trametes versicolor*. Todos esses autores, apesar de não apresentarem altas porcentagens de recuperação enzimática após o processo de imobilização, tiveram resultados satisfatórios. Em todos os casos, foram relatados melhorias na estabilidade operacional; naqueles que os CLEAs ou seus derivados foram aplicados em algum processo de biodegradação, os imobilizados demonstraram-se eficazes. Portanto, é sempre importante considerar outros parâmetros relevantes após qualquer processo de imobilização, além da recuperação enzimática resultante.

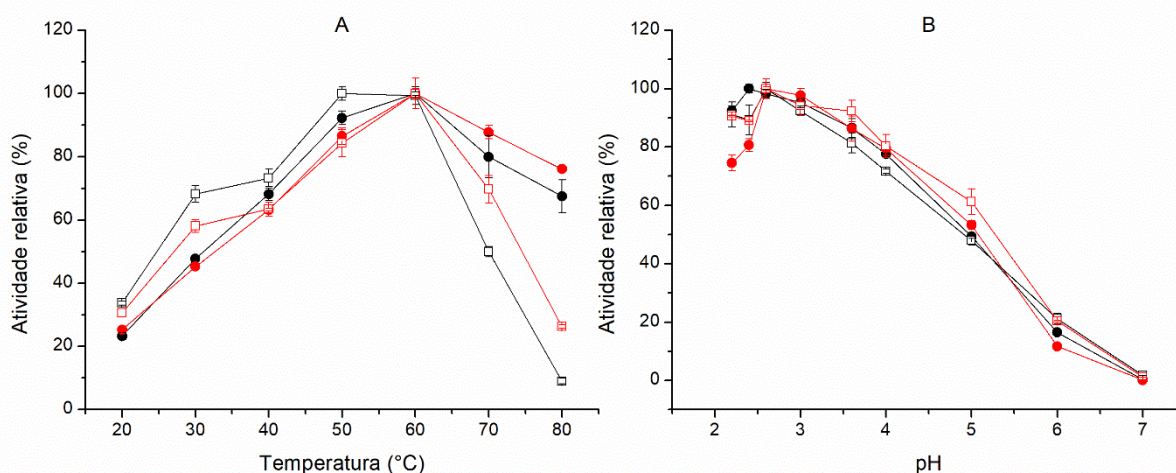
Testes secundários foram realizados para investigar se os componentes do extrato bruto poderiam interferir no processo de imobilização e, assim, afetar a AR%. Para tanto, os extratos foram avaliados também após serem pré-purificados por precipitação (utilizando sulfato de amônio 75%) e por precipitação seguida de diálise (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007). Em quaisquer condições não foi observado nenhum aumento de AR%, não justificando, portanto, a inserção de mais uma etapa no processo. Sendo assim, deve ser mencionado que as lacases utilizadas neste trabalho talvez não possam ser eficientemente imobilizadas pela metodologia de CLEAs, o que se opõe à versatilidade mencionada sobre a técnica. Isso pode ser devido à ausência de grupos lisinas na superfície das lacases estudadas, que resultam numa interligação ineficiente com o glutaraldeído. Situação semelhante fora documentada em trabalhos anteriores (LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005; SADEGHZADEH et al., 2020).

5.5 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA

5.5.1 Determinação de temperatura e pH ótimos

As condições ótimas relacionadas ao pH e temperatura variam conforme o substrato utilizado (ARREGUI et al., 2019). Utilizando ABTS como substrato da reação o efeito dos dois parâmetros sobre a atividade de lacases livres e imobilizadas de *T. villosa* e do co-cultivo são mostrados na Figura 22.

Figura 22 — Efeito da temperatura (A) e pH (B) na atividade de lacases livres (●) e CLEAs (□) de *Trametes villosa* e de lacases livres (●) e CLEAs (□) do co-cultivo de *T. villosa* com *Pycnoporus* sp.^a



^a Os resultados representam a média dos experimentos em triplicata e a barra indica o desvio padrão

A temperatura foi avaliada na faixa de 20 a 80 °C e os resultados mostrados na Figura 22 A indicam que Lac-TvL livre apresenta melhor atividade catalítica entre 50 e 60 °C, sem diferença estatística significativa entre os valores pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). Para Lac-CO livre a temperatura ótima correspondeu a 60 °C. Estes resultados estão em consonância com os valores compreendidos entre 40 a 70 °C reportados na literatura para lacases dos dois gêneros avaliados (KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014; RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014; WANG et al., 2017).

O processo de imobilização não causou nenhuma variação na temperatura ótima para atividade catalítica dos dois extratos avaliados. Os CLEAs-TvL mantiveram a melhor atividade catalítica entre 50 e 60 °C ($p > 0,05$), enquanto para os CLEAs-CO o valor de temperatura ótima permaneceu 60 °C. Os imobilizados mostraram melhor estabilidade nas temperaturas de 20 e 30 °C. Por exemplo, a 30 °C os CLEAs-TvL e CLEAs-CO apresentaram, respectivamente, 20,4 e 12,8% a mais de atividade residual quando comparado às suas formas livres. Acima de 60 °C, no entanto, os CLEAs foram menos estáveis do que as lacases livres. Esse efeito não era esperado, uma vez que muitos CLEAs relatados na literatura exibem melhora significativa na estabilidade em temperaturas elevadas (BILAL et al., 2021; SANGEETHA; EMILIA ABRAHAM, 2008; SELLAMI et al., 2021; SHELDON, 2011).

A temperatura é um parâmetro que pode resultar em efeitos contrastantes na atividade enzimática. Se por um lado, pode aumentar a velocidade das reações pelo

aumento da colisão das partículas enzimáticas com o substrato, por outro, pode causar a desnaturação do biocatalisador (SELLAMI et al., 2021). Outro fator a ser considerado é que o efeito da temperatura nos CLEAs pode variar conforme as condições de formação do imobilizado, especialmente, quanto ao tipo de agente precipitante utilizado, que resulta em diferentes mudanças conformacionais na estrutura enzimática (BILAL et al., 2021). Assim, a imobilização enzimática nas condições otimizadas neste trabalho pode ter resultado em modificações no microambiente enzimático, de modo a deixá-lo mais exposto ao meio reacional, fazendo com que o aumento da temperatura acima de 60 °C provocasse a desnaturação parcial das lacases imobilizadas. A queda de atividade residual dos CLEAs também pode estar associada à conformação mais rígida da estrutura enzimática após a imobilização. O mesmo efeito foi observado por Zerva, Pentari e Topakas (2020) que relataram queda abrupta da atividade residual de CLEAs de *P. citrinopileatus* acima da temperatura ótima, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

O pH (Figura 22 B) foi estudado na faixa de 2,2 a 7,0 e o valor ótimo de atividade enzimática foi alcançado entre 2,4 e 2,6 para Lac-TvL livre sem diferença significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Lac-Co livre demonstrou melhor atividade catalítica entre pH de 2,6 a 3,0 ($p > 0,05$). Esses resultados concordam com os relatos literais que indicam que para lacases fúngicas típicas o pH ótimo é ácido variando até 5 (ARREGUI et al., 2019). Particularmente para os gêneros avaliados a alta atividade catalítica das lacases tem sido documentada na faixa ácida de 2,7 a 4,5 para *Trametes* spp. (KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014; SHLEEV et al., 2004; YAVER et al., 1996) e entre 2,0 a 4,0 para *Pycnoporus* spp. (RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014; WANG et al., 2017), apoiando os dados obtidos neste trabalho. Para as duas condições à medida que o pH aumentou a atividade foi reduzida, o que é um efeito comum reportado para lacases fúngicas (BILAL et al., 2021; BRUGNARI et al., 2018; ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020).

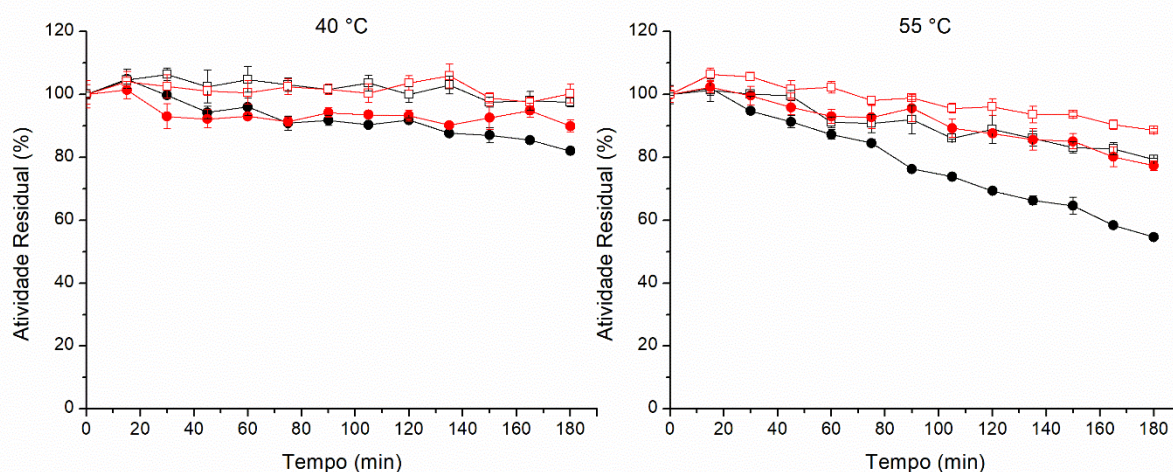
Após a imobilização das lacases, não houveram alterações evidentes nos valores de pH ótimo para CLEAs-TvL e CLEAs-CO. Ambos mantiveram melhor atividade catalítica em pH 2,6 que compreende o intervalo apresentado pelas respectivas formas livres. Os CLEAs também apresentaram queda de atividade enzimática com o aumento de pH, assim como fora relatado anteriormente para as lacases livres. Zerva, Pentari e topakas (2020), também reportaram esse

comportamento para CLEAs de *P. citrinopileatus* os quais foram praticamente inativados no pH 7,0, sendo até mais susceptíveis às variações do que as lacases livres avaliadas pelo autores.

5.5.2 Estabilidade térmica

A termoestabilidade das lacases livre e immobilizadas de *Trametes villosa* e do cultivo em pares com *Pycnoporus* sp. foi determinada em intervalos de tempo entre 0 a 180 min, em temperaturas de 40 e 55 °C e os resultados são mostrados na Figura 23.

Figura 23 — Estabilidade térmica das lacases livres (●) e CLEAs (□) de *Trametes villosa* e de lacases livres (●) e CLEAs (□) do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. determinadas a 40 e 55 °C até 180 min^a



^a Os resultados representam a média dos experimentos em triplicata e a barra indica o desvio padrão

A 40 °C após 180 min as Lac-TvL livres apresentaram atividade residual de $82,08 \pm 1,14\%$, cerca de 10% a menos do que as Lac-CO livres ($89,98 \pm 1,90\%$) nas mesmas condições. Nessa temperatura, as duas formas do immobilizado foram capazes de reter integralmente a atividade inicial, demonstrando maior estabilidade dos CLEAs de lacases nas circunstâncias avaliadas.

A 55 °C a diferença na estabilidade térmica fica mais evidente entre amostras avaliadas. Considerando inicialmente as lacases livres, Lac-TvL apresentaram atividade residual de $54,67 \pm 0,96\%$, enquanto as Lac-CO mantiveram $77,35 \pm 1,54\%$ de atividade inicial. A maior retenção de atividade do extrato obtido pela interação

entre *T.villosa* e *Pycnoporus* sp. pode ser decorrência das diferentes propriedades catalíticas e mecanismos de ação das lacases resultantes do cultivo em pares (KUHAR; CASTIGLIA; LEVIN, 2015). Flores et al. (2010) também observaram que a interação entre *Pleurotus ostreatus* e *Trichoderma viride* aumentou a estabilidade volumétrica de lacases se comparadas aos cultivos isolados, concordando com os resultados deste trabalho. Outro fator que pode ter contribuído para o aumento da estabilidade térmica das lacases livres do co-cultivo pode estar associado especialmente às lacases de *Pycnoporus* sp. que demonstraram resistência à variações de temperatura em estudos anteriores que utilizaram esse gênero (RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014; WANG et al., 2017).

Avaliando os CLEAs à 55 °C, observou-se que ambos foram mais estáveis que suas contrapartes livres. Ao final do período avaliado, os CLEAs-TvL retiveram $79,37 \pm 0,40\%$ de atividade enzimática, cerca de 25% a mais do que Lac-TvL livre ($54,67 \pm 0,96\%$). Os CLEAs-CO, por sua vez, foram capazes de manter $88,59 \pm 0,52\%$ da atividade inicial, aproximadamente 11% a mais do que Lac-CO livre ($77,35 \pm 1,54\%$).

Esses resultados demonstram uma importante vantagem do processo de imobilização, uma vez que os CLEAs apresentaram alta estabilidade térmica nas duas condições avaliadas. Enzimas que são estáveis termicamente são atraentes para aplicações comerciais (BRUGNARI et al., 2020) e uma das principais razões para imobilizar uma enzima é a melhoria significativa da estabilidade operacional (SHELDON, 2011), que foi alcançada. Esse ganho pode ser resultado da diminuição da flexibilidade após a imobilização que evita que a enzima se desdobre e perca sua estrutura terciária necessária para a atividade catalítica (SANGEETHA; EMILIA ABRAHAM, 2008; SHELDON, 2019).

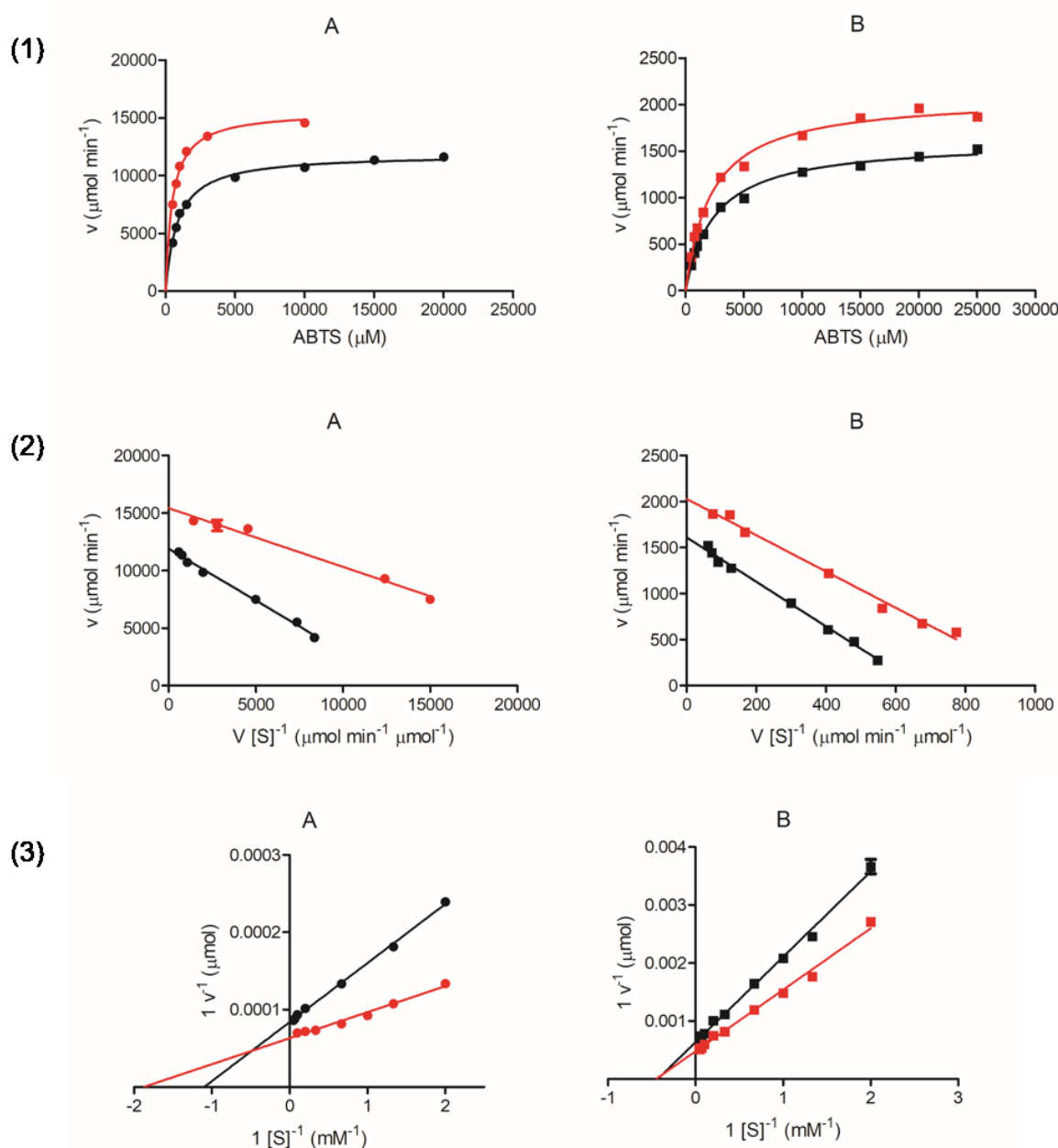
Comparando as duas formas imobilizadas a 55 °C, constatou-se que CLEAs-CO mantiveram 9% a mais de atividade residual do que os CLEAs-TvL, demonstrando mais uma vez que o co-cultivo favoreceu a conservação da ação enzimática, tornando-os mais atraentes para aplicações diversas.

5.5.3 Determinação dos parâmetros cinéticos aparentes

As representações gráficas de Michaelis-Menten, Eadie-Hofstee e Lineweaver-Burk são mostradas na Figura 24. Através delas obtiveram-se os valores

dos parâmetros cinéticos de K_M e V_{max} das lacases livres e imobilizadas por CLEAs (Tabela 5).

Figura 24 — Estudo dos parâmetros cinéticos aparentes obtidos pela representação gráfica da equação de Michaelis-Menten (1), Eadie-Hofstee (2) e Lineweaver-Burk (3). As velocidades iniciais das reações foram determinadas utilizando ABTS como substrato da reação cujas concentrações variaram de 500 até 25000 μM , a 40 °C ^a



^a Em (A) estão representadas as formas livres das lacases de *Trametes villosa* (●) e do co-cultivo (●). Em (B), os CLEAs de *Trametes villosa* (■) do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. (■). Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 3$)

Tabela 5 — Constantes cinéticas aparentes das lacases livres e imobilizadas por CLEAs de *Trametes villosa* e do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. ^a

		Parâmetros cinéticos			R ²
		K _M (μM)	V _{max} (μmol min ⁻¹)	Razão V _{max} /K _M	
<i>Michaelis-Menten</i>	Lac-TvL livre	860,6 ± 30,6	11858,0 ± 101,4	13,8	0,9908
	Lac-CO livre	491,0 ± 29,1	15574,0 ± 260,5	31,7	0,9779
	CLEAs-TvL	2507,0 ± 112,3	1609,0 ± 20,2	0,6	0,9910
	CLEAs-CO	2222,0 ± 100,9	2083,0 ± 26,8	0,9	0,9900
<i>Eadie-Hofstee</i>	Lac-TvL livre	898,6 ± 19,0	11890,0 ± 89,3	13,2	0,9916
	Lac-CO livre	510,2 ± 27,2	15420,0 ± 245,6	30,2	0,9645
	CLEAs-TvL	2420,0 ± 44,5	1610,0 ± 14,2	0,7	0,9926
	CLEAs-CO	1972,0 ± 50,2	2027,0 ± 23,9	1,0	0,9878
<i>Lineweaver-Burk</i>	Lac-TvL livre	911,3	11934,6	13,1	0,9958
	Lac-CO livre	533,8	15868,0	29,7	0,9684
	CLEAs-TvL	2325,1	1579,5	0,7	0,9920
	CLEAs-CO	2226,2	2098,2	0,9	0,9920

^a Os valores representam a média ± desvio padrão (n = 3)

A imobilização das lacases de *T. villosa* e do co-cultivo provocou aumento nos valores de K_M (Tabela 5), indicando uma diminuição de afinidade da enzima ao substrato após o processo. Para CLEAs-TvL e CLEAs-CO, as afinidades ao substrato tiveram quedas de 3 e 4,5 vezes, respectivamente, comparando-se com as contrapartes livres. Ao contrário de K_M, uma diminuição dos valores de V_{max} foi observado após o processo de imobilização. O V_{max} para CLEAs-TvL e CLEAs-CO em comparação com suas formas livre foi reduzido em aproximadamente 7 vezes. Essa queda expressiva nos valores de V_{max} indica que as interações entre CLEAs e ABTS foram mais lentas em comparação com as formas livres e o mesmo substrato.

Esses resultados podem ser decorrentes das mudanças conformacionais após o processo de imobilização que alteram a orientação do sítio ativo enzimático e/ou induzem um impedimento estérico, dificultando a interação com o substrato; tais efeitos também foram relatados por outros autores (NICOLUCCI et al., 2011; SANGEETHA; EMILIA ABRAHAM, 2008) e corroboram com os dados obtidos neste trabalho.

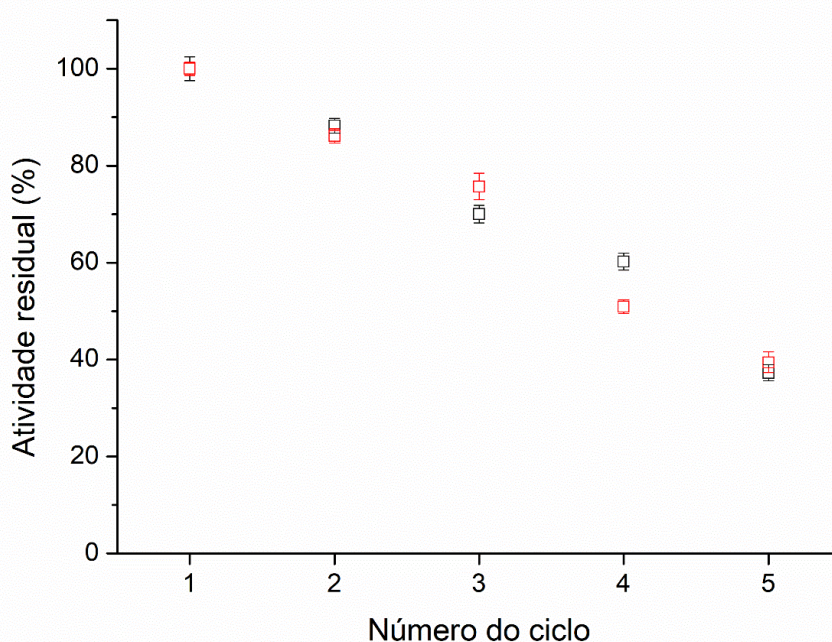
Os parâmetros cinéticos após o processo de imobilização por CLEAs resultam em efeitos controversos na literatura. Enquanto alguns autores exibem igual ou maior eficiência catalítica do imobilizado em comparação com a forma livre da enzima (BILAL et al., 2021; CABANA; JONES; AGATHOS, 2007), outros, no entanto, relatam maior dificuldade da interação após a estabilização enzimática, como fora evidenciado nesse trabalho. Essas variações podem ocorrer por causa das diferentes características das enzimas utilizadas em cada caso particular. Além disso, Bilal et al.

(2021) investigaram os parâmetros cinéticos de CLEAs de *T. versicolor* sintetizados com diferentes precipitantes e indicaram valores desiguais em cada situação. Tais aspectos reforçam a necessidade de investigar todo caso, visto que há grandes variações no processo de formação dos CLEAs.

5.5.4 Reusabilidade dos CLEAs de lacases

A habilidade dos CLEAs-TvL e CLEAs-CO na degradação do ABTS em ciclos consecutivos é mostrada na Figura 25. A possibilidade de reuso do imobilizado é um parâmetro importante para ampliar a aplicabilidade desses biocatalisadores. Os CLEAs de ambos extratos foram eficientes durante 5 ciclos consecutivos, com perda gradual de atividade enzimática.

Figura 25 — Comparação da degradação consecutiva de ABTS pelos CLEAs de lacases de *Trametes villosa* (□) e do co-cultivo de *T. villosa* e *Pycnoporus* sp. (◻)^a



^a Os símbolos representam a média ± desvio padrão (n = 3)

Após o quinto ciclo, os CLEAs de lacases de *T. villosa* e do co-cultivo mantiveram $37,27 \pm 1,70$ e $39,44 \pm 2,14\%$ de atividade inicial, respectivamente. Esses resultados se aproximam dos que foram reportados por Zerva, Pentari e Topakas (2020) ao avaliarem a ação consecutiva dos CLEAs de lacases de *Pleurotus*

citrinopileatus na degradação de águas residuais de indústria produtora de azeite de oliva. Os autores obtiveram valores de atividade residual entre aproximadamente 32 e 48%, após cinco ciclos consecutivos. Efeitos similares também foram reportados com a utilização de CLEAs magnéticos de lacases de *Trametes hirsuta* (SADEGHZADEH et al., 2020), os quais mantiveram quase 40% de atividade no quinto ciclo de oxidação de guaiacol como substrato.

A queda de atividade enzimática ao longo dos ciclos de biodegradação pode estar associada a diferentes fatores, dentre os quais estão: saturação dos sítios ativos enzimáticos, que resulta em perda de atividade catalítica dos biocatalisadores; desprendimento de lacases nas lavagens entre os ciclos (ZERVA; PENTARI; TOPAKAS, 2020); e inativação enzimática em decorrência das múltiplas lavagens (MATIJOŠYTE et al., 2010).

5.6 BIODEGRADAÇÃO *in vitro* DE CIPROFLOXACINO

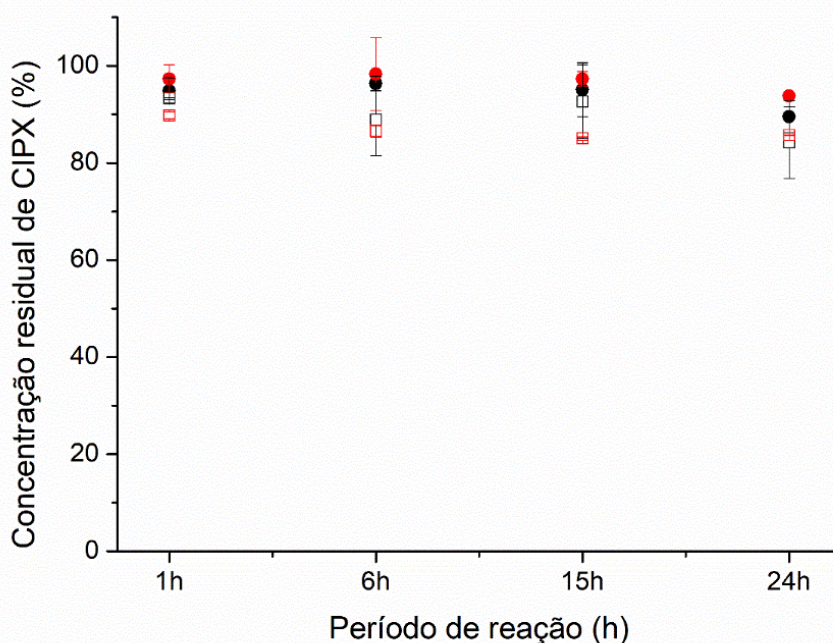
O método cromatográfico para quantificação de CIPX foi validado e os parâmetros de mérito calculados podem ser consultados na Tabela 7, do APÊNDICE C. O tempo de retenção do composto foi de 12 min, obtendo uma pureza de pico de 99%, indicando uma alta seletividade para o composto de interesse.

Nos testes iniciais para a biodegradação do fármaco, avaliou-se a ação das lacases livres ou imobilizadas a 500 U L^{-1} sem mediador sobre 5 mg L^{-1} de CIPX nos tempos de 1, 6, 15 e 24h e os resultados são mostrados na Figura 26. A remoção do fármaco foi considerada majoritariamente pela ação das lacases, uma vez que não foram observados alterações nos controles utilizando as enzimas livres e imobilizadas inativadas. De uma forma geral, dentre os diferentes tempos avaliados, o período de 24h de reação resultou nas melhores remoções do fármaco, correspondendo 10,5 e 6,2% para Lac-TvL e Lac-CO livres e 15,8 e 14,3% para CLEAs-TvL e CLEAs-CO, respectivamente. Pode-se observar que os CLEAs dos dois extratos apresentaram maior eficiência na remoção de CIPX, configurando uma vantagem adicional no processo de imobilização.

Os resultados de remoção do fármaco resultante da ação dos CLEAs de lacases se equiparam aos que foram reportados por Prieto et al. (2011) que alcançaram 16% de remoção do CIPX (10 mg L^{-1}) após 20h de reação utilizando 1000 U L^{-1} de lacases livres purificadas de *T. versicolor*. Com efeito, uma vez que os CLEAs

foram obtidos de extratos brutos e podem ser recuperados e reutilizados em mais de um ciclo catalítico, este trabalho representa um potencial ganho com relação ao reportado anteriormente.

Figura 26 — Degradação de ciprofloxacino (5 mg L^{-1} , a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm) em diferentes períodos sob a ação de lacases livres de *Trametes villosa* (●) e do co-cultivo (●) e dos CLEAs de *Trametes villosa* (□) do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. (□) (500 U L^{-1} cada) ^a



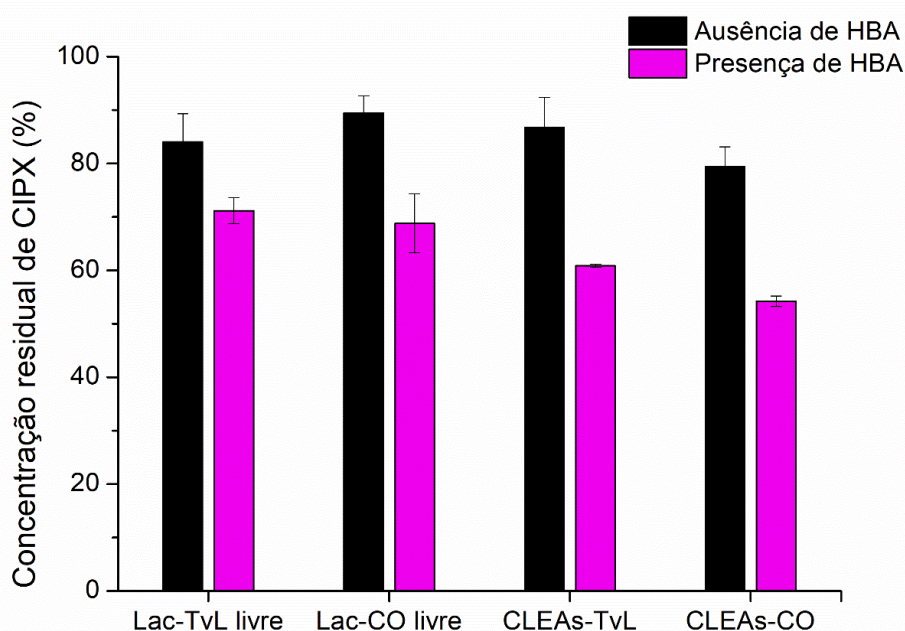
^a Os valores representam a média \pm desvio padrão (n = 2)

Outros estudos reportaram que a biodegradação de CIPX foi insatisfatória pela ação de lacases livres de *T. versicolor*, *P. sanguineus* CS43 e *M. thermophila* (PARRA GUARDADO et al., 2019) e imobilizadas de *T. versicolor* (BECKER et al., 2016) sem o uso de mediadores. Tais relatos indicam o quanto o fármaco pode ser resistente ao tratamento biológico. E, ainda assim, os resultados obtidos neste trabalho demonstraram uma remoção parcial de CIPX nas condições iniciais testadas, fato que impulsionou novas averiguações. Como não se observou variação significativa nos períodos anteriores, convencionou-se o tempo de reação de 24h para as investigações futuras.

As lacases são eficazes especialmente nas reações envolvendo substratos fenólicos. Naqueles não fenólicos como o CIPX, geralmente mediadores enzimáticos são requeridos (PRIETO et al., 2011). Neste trabalho foi utilizado o modelo de sistema lacases + HBA inicialmente sobre 5 mg L^{-1} de CIPX e os resultados são mostrados na

Figura 28. Observa-se que o mediador favoreceu a biodegradação do fármaco em quaisquer condições avaliadas. Comparados às suas contrapartes sem o mediador, a presença de HBA nas reações promovidas com Lac-TvL livre e Lac-CO livre, degradou cerca de 13 e 20% a mais de CIPX, respectivamente. Para os CLEAs de lacase, a remoção do fármaco foi ainda mais beneficiada com a adição de HBA. CLEAs-TvL e CLEAs-CO na presença de HBA removeram cerca de 25% a mais do que os imobilizados sem o mediador.

Figura 27 — Degradação de ciprofloxacino (5 mg L^{-1}) após 24h ($40 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm) sob a ação de lacases livres e CLEAs de *Trametes villosa* e do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. (500 U L^{-1} cada) avaliando a presença de HBA como mediador da reação ^a



^a As barras representam a média \pm desvio padrão ($n = 2$)

Os resultados reportados com a adição de HBA são atraentes quando comparados com os estudos de Parra Guardado et al. (2019) que não obtiveram remoção de CIPX mesmo com a adição de ABTS como mediador após 72h de reação. Becker et al. (2016) também relatam a resistência do fármaco que não foi degradado mesmo com a adição de siringaldeído como mediador após 24h. Em contrapartida, os resultados aqui obtidos contrastam com aqueles apresentados por Prieto et al. (2011) que reportaram 97% de degradação do fármaco pelo sistema *T. versicolor* + ABTS após 30h de reação. Os últimos autores, no entanto, fizeram uso de um mediador sintético que é geralmente associado ao alto custo ou a níveis elevados de toxicidade

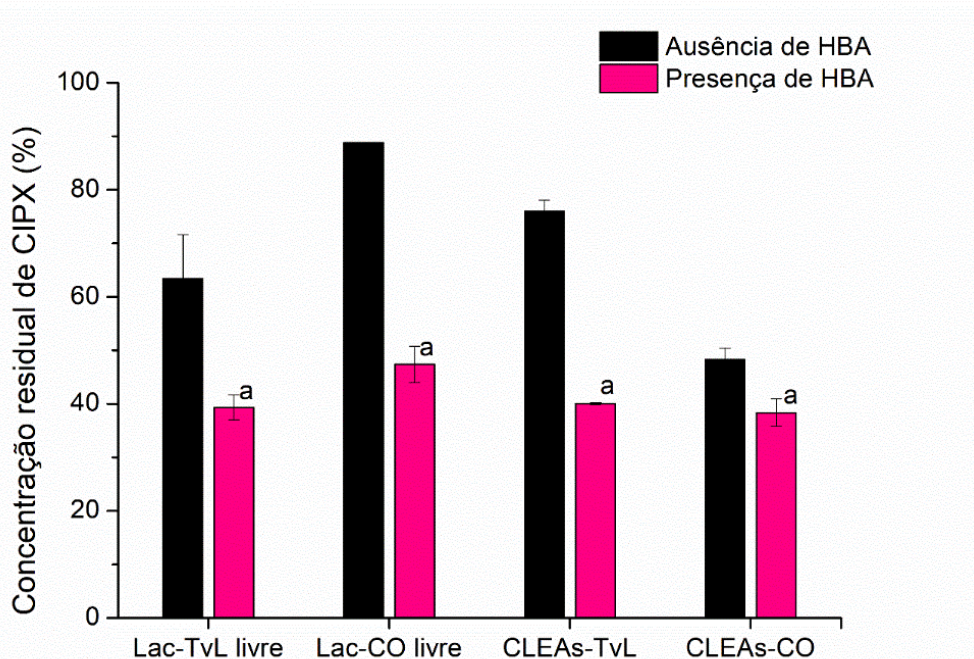
(JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000), o que configura uma desvantagem no processo de remoção do fármaco.

Além da diferença entre o período e condições operacionais de reação, a degradação de CIPX com mediador pode estar relacionada às diferentes fontes produtoras da lacases (PARRA GUARDADO et al., 2019), cujas propriedades distintas impactam diretamente na ação do mediador e, conseqüentemente, na oxidação do fármaco. Ademais, Baiocco et al. (2003) propuseram diferentes rotas de oxidação de um único substrato utilizando lacases de *T. villosa* sob a ação de diferentes mediadores; os autores concluíram que determinados mediadores aumentam eficiência da biocatálise por seguir uma rota mais favorável de oxidação.

Com isso, os experimentos conduzidos com a adição de mediador neste trabalho evidenciam que o HBA favoreceu a degradação do fármaco nas condições propostas, demonstrando uma promessa atrativa para a remoção de fármacos resistentes como o CIPX.

A ação do mediador HBA também foi testada mantendo as concentrações enzimáticas e reduzindo pela metade a concentração do fármaco ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e os resultados são mostrados na Figura 29. Nessas condições a degradação do CIPX sem o uso de mediadores foi favorecida especialmente com o uso de Lac-TvL livre e CLEAs-CO, resultando em concentrações residuais do fármaco de $63,43 \pm 8,20$ e $48,24 \pm 2,18\%$, nessa ordem. Mais uma vez o HBA favoreceu a degradação de CIPX em todas as condições avaliadas e as concentrações residuais das amostras após o ensaio não diferem significativamente entre si (Tukey, $p > 0,05$). Os resultados neste caso correspondem a $39,32 \pm 2,35$, $47,38 \pm 3,40$, $40,06 \pm 0,16$ e $38,35 \pm 2,59\%$ de concentração residual de CIPX após a ação de Lac-TvL livre, Lac-CO livre, CLEAs-TvL e CLEAs-CO, em respectivo.

Figura 28 — Degradação de ciprofloxacino ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) após 24h ($40 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 rpm) sob a ação de lacases livres e CLEAs de *Trametes villosa* e do co-cultivo com *Pycnoporus* sp. (500 U L^{-1} cada) avaliando a presença de HBA como mediador da reação ^a



^a As barras representam a média \pm desvio padrão ($n = 2$). Barras com letras iguais não diferem entre si pelo Teste de Tukey, $p < 0,05$

Curiosamente em qualquer das condições avaliadas a ação das lacases obtidas pelo co-cultivo na forma livre não favoreceu a degradação de CIPX, comparado com àquelas obtidas pelo monocultivo de *T. villosa*. Essa observação se opõe ao fato de que o sinergismo entre duas ou mais espécies pode ser favorável para a degradação do mesmo substrato, conforme evidenciado por outros autores (BALDRIAN, 2004; BODDY, 2000; COPETE-PERTUZ et al., 2019; KUHAR; CASTIGLIA; LEVIN, 2015). Tal contraste pode estar associado ao fato de que no co-cultivo avaliado neste trabalho não houve mudança no perfil enzimático causado pela interação entre os pares, motivo pelo qual foi relacionado maior eficiência de degradação do substrato nos estudos de Kuhar, Castiglia, Levin (2015).

Em contrapartida, na forma imobilizada sem a adição de HBA, o co-cultivo favoreceu a degradação do fármaco especialmente na concentração de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, removendo cerca de 28% a mais do que os CLEAs-TvL nessa condição. A melhor remoção de CIPX por CLEAs-CO pode estar associada à maior robustez operacional desse imobilizado, que deve ter contribuído para a retenção de atividade enzimática ao longo do tempo reacional. Além disso, as mudanças conformacionais prováveis após o processo de imobilização podem ter alterado a orientação do sítio ativo

enzimático, favorecendo a interação da enzima com o substrato. Isso configura uma vantagem adicional na imobilização das lacases obtidas pelo cultivo em pares.

5.6.1 Ensaio de inibição de crescimento bacteriano

As amostras submetidas ao ensaio de MIC foram aquelas que apresentaram maior percentual de biodegradação, correspondendo a 2,5 mg L⁻¹ de CIPX reagidos com 500 U L⁻¹ de lacases livres e imobilizadas, com a presença e ausência de HBA como mediador. O controle de crescimento bacteriano, realizado conforme as condições descritas na sessão 4.9.3, resultou nos valores indicados na Tabela 6.

Tabela 6 — Valores de concentração mínima inibitória para *E. coli* após diferentes tratamentos enzimáticos com lacases livres e imobilizadas, na ausência e presença de HBA como mediador

Amostra após biodegradação	MIC (µg L ⁻¹)
Controle CIPX 2,5 mg L ⁻¹	1,4
Lac-TvL livre	2,9
Lac-CO livre	2,9
CLEAs-TvL	2,9
CLEAs-CO	2,9
Lac-TvL livre + HBA	5,8
Lac-CO livre + HBA	2,9
CLEAs-TvL + HBA	5,8
CLEAs-CO + HBA	5,8

A amostra controle resultou em 1,4 µg L⁻¹ contra *E. coli* sendo equivalente aos valores reportados por Harris et al. (2013). Em qualquer amostra nas quais as lacases foram adicionadas, seja na forma livre ou imobilizada, com ou sem a adição de HBA, observou-se um leve declínio na atividade de CIPX. Resultados similares foram observados por Becker et al. (2016) após a ação de lacases de *T. versicolor*.

Os resultados sugerem que Lac-TvL livre, CLEAs-TvL e CLEAs-CO adicionados de HBA obtiveram os melhores efeitos para minimizar a ação do fármaco com relação ao controle avaliado. Esses dados indicam que o CIPX foi parcialmente biodegradado e apontam a necessidade de novas pesquisas para potencializar a ação das lacases no substrato em questão. Trabalhos futuros podem ser conduzidos, por exemplo, com o aumento da concentração enzimática ou com o uso de diferentes mediadores. Neste trabalho, utilizou-se um modelo lacase + mediador natural para

estender a capacidade catalítica da enzima, mas outros compostos também podem ser utilizados, expandindo ainda mais as pesquisas sobre o tema.

6 CONCLUSÃO

Pela primeira vez CLEAs de lacase de co-cultivo de *Trametes villosa* e *Pycnoporus* sp. foram sintetizados, parcialmente caracterizados e aplicados na biodegradação do fármaco ciprofloxacino. A combinação dos fungos da podridão branca demonstrou efeitos positivos na indução da produção de lacases e no aumento da estabilidade térmica.

No geral, os resultados mostraram que a imobilização das lacases de *T. villosa* e do co-cultivo através da formação de CLEAs pode ser uma ferramenta para aumentar a aplicabilidade e a reutilização dos biocatalisadores, uma vez que os imobilizados resultaram em maior estabilidade térmica em comparação com suas formas livres e puderam ser reutilizados em cinco ciclos consecutivos, mantendo mais de 37% de atividade residual.

Lacases livres e imobilizadas tiveram habilidade de degradar de 53 a 62% de CIPX com auxílio de mediador natural HBA, resultando em redução da ação do fármaco sobre cepas de *E. coli*.

Acredita-se que investigações futuras devam ser conduzidas para ampliar a remoção do fármaco, mas os resultados aqui obtidos demonstraram um caminho para enfrentar os desafios atuais para remoção de CIPX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMA. **National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 2764, Ciprofloxacin.** Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ciprofloxacin>>. Acesso em: 3 out. 2020.

ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.** Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412>.

ARREGUI, L. et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 1–33, 2019.

ARSAND, J. B. et al. Presence of antibiotic resistance genes and its association with antibiotic occurrence in Dilúvio River in southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 738, p. 139781, 2020.

ARSENAULT, A.; CABANA, H.; JONES, J. P. Laccase-based CLEAs: Chitosan as a novel cross-linking agent. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

BAIOCCO, P. et al. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: A mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 191–197, 2003.

BALDRIAN, P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. v. 50, p. 245–253, 2004.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BARBOSA, M. O. et al. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. **Water Research**, v. 94, p. 257–279, 2016.

BECKER, D. et al. Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase – Degradation of compounds does not always eliminate toxicity. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 500–509, 2016.

BERTHET, S. et al. **Role of Plant Laccases in Lignin Polymerization.** 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2012. v. 61

BILAL, M. et al. Bio-based degradation of emerging endocrine-disrupting and dye-based pollutants using cross-linked enzyme aggregates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7035–7041, 2017a.

BILAL, M. et al. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 646–659, 2017b.

BILAL, M. et al. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. **Environment International**, v. 124, n. October 2018, p. 336–353, 2019.

BILAL, M. et al. Development and characterization of cross-linked laccase aggregates (Lac-CLEAs) from *Trametes versicolor* IBL-04 as ecofriendly biocatalyst for degradation of dye-based environmental pollutants. **Environmental Technology and Innovation**, v. 21, p. 101364, 2021.

BODDY, L. Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. v. 31, p. 185–194, 2000.

BRASIL. **Decreto nº 10.399, de 5 de junho de 2020**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/D10388.htm>. Acesso em: 27 jan. 2021.

BRENDA. **BRENDA - Enzyme Database**. Disponível em: <<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.10.3.2#ORGANISM>>. Acesso em: 19 mar. 2021.

BROOKS, B. W.; MAUL, J. D.; BELDEN, J. B. Antibiotics in Aquatic and Terrestrial Ecosystems. **Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set**, n. 2002, p. 210–217, 2008.

BRUGNARI, T. et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1346–1351, 2018.

BRUGNARI, T. et al. Characterisation of free and immobilised laccases from *Ganoderma lucidum*: application on bisphenol a degradation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.

CABANA, H.; JONES, J. P.; AGATHOS, S. N. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 1, p. 23–31, 2007.

CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. **Organic Letters**, v. 2, n. 10, p. 1361–1364, 2000.

CHI, Y.; HATAKKA, A.; MAIJALA, P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 1, p. 32–39, 2007.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, n. MAR, p. 1–13, 2014.

CONAMA. **Resolução Nº 430, De 13 De Maio De 2011**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 27 jan. 2021.

COPETE-PERTUZ, L. S. et al. Enhancement of ligninolytic enzymes production and decolourising activity in *Leptosphaerulina* sp. by co-cultivation with *Trichoderma viride* and *Aspergillus terreus*. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 1536–1545, 2019.

COUTU, S. et al. Temporal dynamics of antibiotics in wastewater treatment plant influent. **Science of the Total Environment**, v. 458–460, p. 20–26, 2013.

CUI, J. D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: Current development and future challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 15–28, 2013.

DAS, A.; SINGH, J.; YOGALAKSHMI, K. N. Laccase immobilized magnetic iron nanoparticles: Fabrication and its performance evaluation in chlorpyrifos degradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 117, p. 183–189, 2017.

DE FREITAS, E. N. et al. Removal of bisphenol A by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and evaluation of ecotoxicity of degradation products. **Chemical Engineering Journal**, v. 330, n. August, p. 1361–1369, 2017.

DE SOUZA DA-SILVA, A. P. et al. Prevalence of fluoroquinolone-resistant and broad-spectrum cephalosporin-resistant community-acquired urinary tract infections in Rio de Janeiro: Impact of *Escherichia coli* genotypes ST69 and ST131. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 85, n. June, p. 104452, 2020.

DHAKAR, K.; PANDEY, A. Laccase production from a temperature and pH tolerant fungal strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). **Enzyme Research**, v. 2013, 2013.

DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K. In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 72, p. 67–75, 2012.

DWIVEDI, U. N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

EADIE, G. S. the Inhibition of Cholinesterase By Physostigmine and Prostigmine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 146, n. 1, p. 85–93, 1942.

ELDRIDGE, H. C. et al. Efficient remediation of 17 α -ethinylestradiol by *Lentinula edodes* (shiitake) laccase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, n. February, p. 64–68, 2017.

FATHALI, Z. et al. Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 359–366, 2019.

FENG, N. X. et al. Co-metabolic degradation of the antibiotic ciprofloxacin by the enriched bacterial consortium XG and its bacterial community composition. **Science of the Total Environment**, v. 665, p. 41–51, 2019.

FLORES, C. et al. Production of laccases by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation in co-culture with *Trichoderma viride*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 810–817, 2010.

FRAZÃO, C. J. R. et al. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 500–508, 2014.

GASSER, C. A. et al. Laccases to take on the challenge of emerging organic contaminants in wastewater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9931–9952, 2014.

GOLET, E. M. et al. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 15, p. 3243–3249, 2003.

GONZALEZ-MARTINEZ, A. et al. Effect of ciprofloxacin antibiotic on the partial-nitrification process and bacterial community structure of a submerged biofilter. **Science of the Total Environment**, v. 476–477, p. 276–287, 2014.

GUERRA, P. et al. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 235–243, 2014.

HARRIS, S. et al. Simulation model to predict the fate of ciprofloxacin in the environment after wastewater treatment. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 48, n. 7, p. 675–685, 2013.

HARRIS, S.; CORMICAN, M.; CUMMINS, E. Risk Ranking of Antimicrobials in the Aquatic Environment from Human Consumption: An Irish Case Study. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 19, n. 5, p. 1264–1284, 2013.

HASSANI, T.; BA, S.; CABANA, H. Formation of enzyme polymer engineered structure for laccase and cross-linked laccase aggregates stabilization. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 640–645, 2013.

HOFSTEE, B. H. J. On the evaluation of the constants V_m and K_M in enzyme reactions. **Science**, v. 116, n. 3013, p. 329–331, 1952.

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004.

HU, J. et al. *Gongronella* sp. w5 elevates *Coprinopsis cinerea* laccase production by carbon source syntrophism and secondary metabolite induction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 411–425, 2019.

IAKOVLEV, A.; STENLID, J. Spatiotemporal patterns of laccase activity in interacting mycelia of wood-decaying basidiomycete fungi. **Microbial Ecology**, v. 39, n. 3, p. 236–245, 2000.

JIA, J. et al. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 1136–1144, 2018.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. v. 66, n. 2, p. 524–528, 2000.

KRZEMINSKI, P. et al. Performance of secondary wastewater treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern implicated in crop uptake and antibiotic resistance spread: A review. **Science of the Total Environment**, v. 648, p. 1052–1081, 2019.

KUHAR, F.; CASTIGLIA, V.; LEVIN, L. Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 238–243, 2015.

KUMAR, V. V.; SIVANESAN, S.; CABANA, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates - Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. **Science of the Total Environment**, v. 487, n. 1, p. 830–839, 2014.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970.

LI, B.; ZHANG, T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process. **Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 3468–3473, 2010.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658–666, 1934.

LLORET, L. et al. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 3, p. 124–131, 2010.

LONAPPAN, L. et al. Agro-industrial-Produced Laccase for Degradation of Diclofenac and Identification of Transformation Products. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 7, p. 5772–5781, 2017.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Co-aggregation of enzymes and polyethyleneimine: A simple method to prepare stable and immobilized derivatives of glutaryl acylase. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 1839–1842, 2005.

LU, J. et al. Occurrence, distribution, and ecological-health risks of selected antibiotics in coastal waters along the coastline of China. **Science of the Total Environment**, v. 644, p. 1469–1476, 2018.

MANAVALAN, T.; MANAVALAN, A.; HEESE, K. Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. **Current Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 485–498, 2014.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology** John Wiley and Sons Ltd, , 1 nov. 2017.

MATEI, J. C. et al. Enzymatic delignification of sugar cane bagasse and rice husks and its effect in saccharification. **Renewable Energy**, v. 157, p. 987–997, 2020.

MATIJOŠYTE, I. et al. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2010.

MCILVAINE, T. C. a Buffer Solution for Colorimetric Comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183–186, 1921.

MOREIRA DA SILVA, R. C. R. et al. Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p. 61–67, 2017.

MOROZOVA, O. V et al. Laccase – Mediator Systems and Their Applications : A Review. v. 43, n. 5, p. 523–535, 2007.

MOTA, T. R. et al. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: Evaluation of Degradation Products and Toxicity. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 10, 2015.

NAGHDI, M. et al. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes *. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 190–213, 2018.

NAIDU, Y.; SIDDIQUI, Y.; IDRIS, A. S. Comprehensive studies on optimization of ligno-hemicellulolytic enzymes by indigenous white rot hymenomycetes under solid-state cultivation using agro-industrial wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 259, n. December 2019, p. 110056, 2020.

NAVADA, K. K.; KULAL, A. Enzymatic degradation of chloramphenicol by laccase from *Trametes hirsuta* and comparison among mediators. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2019.

NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada - Sexta Edição**. [s.l: s.n.]. v. 23

NICOLUCCI, C. et al. Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. **Biodegradation**, v. 22, n. 3, p. 673–683, 2011.

NIEBISCH, C. H. et al. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, n. 1–3, p. 316–322, 2010.

O'NEIL, M. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. [s.l.] Whitehouse Station, N. J. : Merck, 2006.

OMS. **WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption** Who. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277359/9789241514880-eng.pdf>>.

OTHMAN, A. M. et al. Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus bisporus* CU13 and their potency in dye decolorization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 1142–1148, 2018a.

OTHMAN, A. M. et al. Application of Central Composite Design as a Strategy to Maximize the Productivity of *Agaricus bisporus* CU13 Laccase and Its Application in Dye Decolorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. October 2017, p. 72–79, 2018b.

PARRA GUARDADO, A. L. et al. Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. **Process Biochemistry**, v. 78, n. October 2018, p. 123–131, 2019.

PATEL, N. et al. Mode of Action, Properties, Production, and Application of Laccase: A Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 19–32, 2018.

PISCITELLI, A. et al. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. **Current Genomics**, v. 12, n. 2, p. 104–112, 2011.

PRIETO, A. et al. Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by a white-rot fungus and identification of degradation products. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 23, p. 10987–10995, 2011.

PROJECT NOAH. **Agaricus bisporus | Project Noah**. Disponível em: <<https://www.projectnoah.org/spottings/7848044>>. Acesso em: 4 out. 2020.

PROJECT NOAH. **Bracket Fungi | Project Noah**. Disponível em: <<https://www.projectnoah.org/spottings/16503057>>. Acesso em: 4 out. 2020.

PROJECT NOAH. **Trametes villosa | Project Noah**. Disponível em: <<https://www.projectnoah.org/spottings/1393869299>>. Acesso em: 4 out. 2020.

RAMÍREZ-CAVAZOS, L. I. et al. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 32–42, 2014.

REDA, F. M.; HASSAN, N. S.; EL-MOGHAZY, A. N. Decolorization of synthetic dyes by free and immobilized laccases from newly isolated strain *Brevibacterium halotolerans* N11 (KY883983). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, n. October 2017, p. 138–145, 2018.

RIEDI, H. DE P. **PURIFICAÇÃO , CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LACASES DE BASIDIOMICETOS E SEU USO NA DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**. Curitiba: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

RIVA, F. et al. Risk assessment of a mixture of emerging contaminants in surface water in a highly urbanized area in Italy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 361, n. July 2018, p. 103–110, 2019.

RIVERA-HOYOS, C. M. et al. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3–4, p. 67–82, 2013.

RIZZO, L. et al. Proposed EU minimum quality requirements for water reuse in agricultural irrigation and aquifer recharge: SCHEER scientific advice. **Current Opinion in Environmental Science and Health**, v. 2, p. 7–11, 2018.

RIZZO, L. et al. Consolidated vs new advanced treatment methods for the removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 655, n. October 2018, p. 986–1008, 2019.

SADEGHZADEH, S. et al. Removal of bisphenol A in aqueous solution using magnetic cross-linked laccase aggregates from *Trametes hirsuta*. **Bioresource Technology**, v. 306, n. March, p. 123169, 2020.

SALAZAR-LÓPEZ, M. et al. Induced Degradation of Anthraquinone-Based Dye by Laccase Produced from *Pycnoporus sanguineus* (CS43). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 228, n. 12, 2017.

SANGEETHA, K.; EMILIA ABRAHAM, T. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of *Subtilisin* for controlled release applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 3, p. 314–319, 2008.

SCHOEVAART, R. et al. Preparation, optimization, and structures, of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 6, p. 754–762, 2004.

SEHNAL, D. et al. Workshop on Molecular Graphics and Visual Analysis of Molecular Data. 2018.

SELLAMI, K. et al. Bio-based and cost effective method for phenolic compounds removal using cross-linked enzyme aggregates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, n. September 2020, p. 124021, 2021.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): Stable and recyclable biocatalysts. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1583–1587, 2007.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 467–477, 2011.

SHELDON, R. A. Cleas, combi-cleas and 'smart' magnetic cleas: Biocatalysis in a bio-based economy. **Catalysts**, v. 9, n. 3, 2019.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SHLEEV, S. V. et al. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. **Biochimie**, v. 86, n. 9–10, p. 693–703, 2004.

SINGH, N. et al. An Ecofriendly and Efficient Strategy for Cost Effective Production of Lignocellulotic Enzymes. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 6, p. 891–898, 2018.

SINIRLIOGLU, Z. A.; SINIRLIOGLU, D.; AKBAS, F. Preparation and characterization of stable cross-linked enzyme aggregates of novel laccase enzyme from *Shewanella putrefaciens* and using malachite green decolorization. **Bioresource Technology**, v. 146, n. August, p. 807–811, 2013.

SIRISHA, T.; GURUPADAYYA, B. M.; SRIDHAR, S. Simultaneous determination of ciprofloxacin and tinidazole in tablet dosage form by reverse phase high performance liquid chromatography. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 6, p. 981–987, 2014.

SPINA, F. et al. Ecofriendly laccases treatment to challenge micropollutants issue in. v. 257, 2020.

TANDJAOUI, N. et al. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Brassica rapa* peroxidase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 208–213, 2015.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 8, p. 2280–2284, 1984.

TOUAHAR, I. E. et al. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. **Science of the Total Environment**, v. 481, n. 1, p. 90–99, 2014.

TRAN, N. H. et al. Occurrence and removal of multiple classes of antibiotics and antimicrobial agents in biological wastewater treatment processes. **Water Research**, v. 104, p. 461–472, 2016.

UBER, T. M. et al. Comparative detoxification of Remazol Brilliant Blue R by free and immobilized laccase of *Oudemansiella canarii*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2020.

VAN DOORSLAER, X. et al. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. **Science of the Total Environment**, v. 500–501, p. 250–269, 2014.

VINOTH KUMAR, V. et al. Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 28–34, 2012.

VRŠANSKÁ, M. et al. Preparation and optimisation of cross-linked enzyme aggregates using native isolate white rot fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the decolourisation of synthetic dyes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2018.

WANG, Z. et al. Production and characterization of a novel laccase with cold adaptation and high thermal stability from an isolated fungus. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 280–294, 2010.

WANG, Z. et al. Eichhornia crassipes: Agro-waster for a novel thermostable laccase production by *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 2, p. 163–169, 2017.

WARIISHI, H.; VALLI, K.; GOLD, M. H. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. **Journal of Biological Chemistry**, 1992.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, 2008.

WONG, D. W. S. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174–209, 2009.

XU, M. Q. et al. Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, p. 1–20, 2018.

YANG, J. et al. Immobilized *Cerrena* sp. laccase: Preparation, thermal inactivation, and operational stability in malachite green decolorization. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017a.

YANG, J. et al. Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, 16 maio 2017b.

YAO, L. et al. Discovery of novel xylosides in co-culture of basidiomycetes *Trametes versicolor* and *Ganoderma applanatum* by integrated metabolomics and bioinformatics. **Nature Publishing Group**, n. September, p. 1–13, 2016.

YAVER, D. S. et al. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, 1996.

YOSHIDA, H. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. **Journal of the Chemical Society**, v. 43, p. 472–486, 1883.

YU, H. W. et al. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1–4, p. 124–127, 2006.

ZERVA, A. et al. Applications of microbial laccases: Patent review of the past decade (2009–2019). **Catalysts**, v. 9, n. 12, p. 1–26, 2019.

ZERVA, A.; PENTARI, C.; TOPAKAS, E. Crosslinked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases from *Pleurotus citrinopileatus* induced in olive oil mill wastewater (OOMW). **Molecules**, v. 25, n. 9, p. 7–9, 2020.

ZHANG, J.; KE, W.; CHEN, H. Enhancing laccase production by white-rot fungus *Trametes hirsuta* SSM-3 in co-culture with yeast *Sporidiobolus pararoseus* SSM-8. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2019.

ZHANG, Q. et al. Comparative transcriptomics and transcriptional regulation analysis of enhanced laccase production induced by co-culture of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* with *Rhodotorula mucilaginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 241–255, 2020.

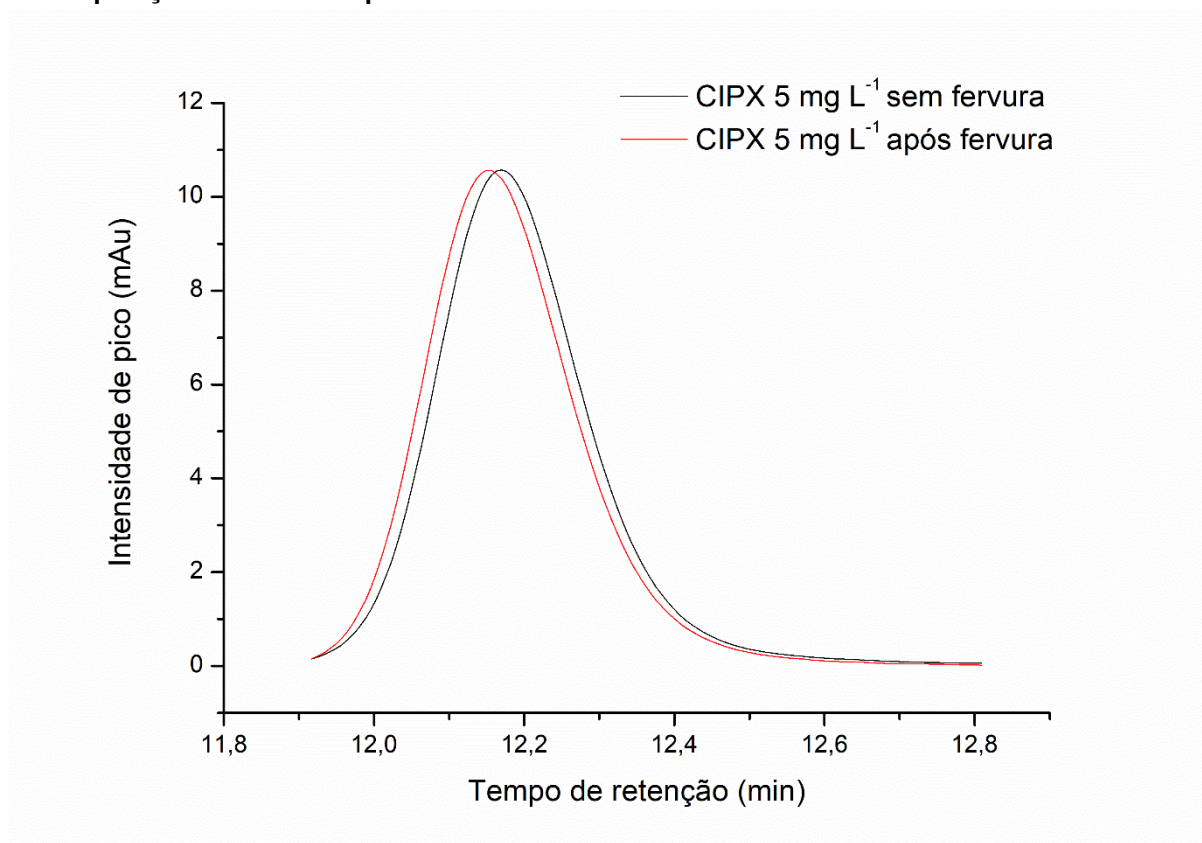
ZHANG, Y. et al. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 12, p. 3702–3706, 2009.

ZHEN, Q. et al. Preparation of β -mannanase CLEAs using macromolecular cross-linkers. **Catalysis Science and Technology**, v. 3, n. 8, p. 1937–1941, 2013.

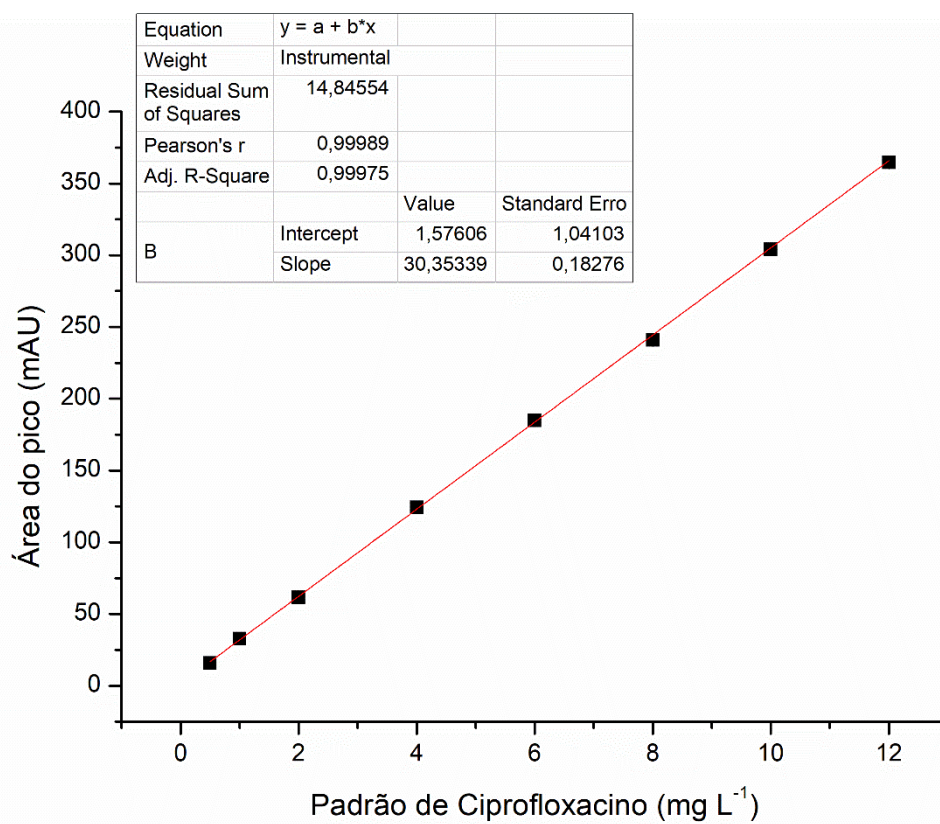
ZHENG, F. et al. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 758–770, 2017.

APÊNDICE A — VERIFICAÇÃO DA INTERFERÊNCIA DO PROCESSO DE FERVURA NA DEGRADAÇÃO DE CIPROFLOXACINO

Figura 29 — Análise da interferência do processo de fervura para inativação enzimática na decomposição térmica de ciprofloxacino



APÊNDICE B — CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO DO CIPROFLOXACINO



APÊNDICE C — DADOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO**Tabela 7 — Parâmetros para validação do método cromatográfico para detecção e quantificação de Ciprofloxacino**

Equação da reta	$y = a + b \cdot x$
a	1,57606 ± 1,04103
b	30,35339 ± 0,18276
R² (ajustado)	0,99975
LQ (mg L⁻¹)	0,342969929
LD (mg L⁻¹)	0,102890979
Faixa de trabalho	0,5 - 12 mg L ⁻¹

APÊNDICE D — DADOS DA ANOVA DOS DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS

Tabela 8 — ANOVA da recuperação da atividade enzimática de CLEAs de *Trametes villosa* em função da concentração de lacases e glutaraldeído ($p < 0,05$)

Fator	SS	df	MS	F	p
(1)Lacase ($U L^{-1}$)(L)	33,1373	1	33,1373	127,0412	0,001498
Lacase ($U L^{-1}$)(Q)	6,6038	1	6,6038	25,3175	0,015128
(2)Glu (mM)(L)	163,2265	1	163,2265	625,7757	0,000140
Glu (mM)(Q)	0,8841	1	0,8841	3,3894	0,162869
1L by 2L	21,5064	1	21,5064	82,4509	0,002822
1L by 2Q	7,7783	1	7,7783	29,8204	0,012067
1Q by 2L	0,0552	1	0,0552	0,2118	0,676661
1Q by 2Q	21,5211	1	21,5211	82,5073	0,002819
Pure Error	0,7825	3	0,2608		
Total SS	232,4268	11			

Tabela 9 — ANOVA da recuperação da atividade enzimática de CLEAs do co-cultivo em função da concentração de lacases e glutaraldeído ($p < 0,05$)

Fator	SS	df	MS	F	p
(1)Lacase ($U L^{-1}$)(L)	13,1674	1	13,1674	17,8848	0,024186
Lacase ($U L^{-1}$)(Q)	1,4009	1	1,4009	1,9028	0,261611
(2)Glu (mM)(L)	192,7819	1	192,7819	261,8484	0,000513
Glu (mM)(Q)	20,2326	1	20,2326	27,4812	0,013513
1L by 2L	6,1358	1	6,1358	8,3340	0,063174
1L by 2Q	16,3097	1	16,3097	22,1529	0,018151
1Q by 2L	0,4250	1	0,4250	0,5773	0,502619
1Q by 2Q	22,3004	1	22,3004	30,2898	0,011808
Pure Error	2,2087	3	0,7362		
Total SS	246,4144	11			