

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

HALANNA DE PAULA RIEDI

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LACASES
DE BASIDIOMICETOS E SEU USO NA DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA
DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**

DISSERTAÇÃO

**CURITIBA
2019**

HALANNA DE PAULA RIEDI

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LACASES
DE BASIDIOMICETOS E SEU USO NA DEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA
DE RIFAMPICINA E ISONIAZIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel
Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz

**CURITIBA
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Riedi, Halanna de Paula

Purificação, caracterização e imobilização de duas lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida / Halanna de Paula Riedi.-- 2019.

1 arquivo de texto : PDF ; 1,00 MB

Disponível via World Wide Web

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental

Bibliografia: p. 69-85

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Antibióticos. 3. Pleurotus ostreatus. 4. Tuberculose - Tratamento. 5. Enzimas. 6. Trametes versicolor. I. Maciel, Giselle Maria, orient. II. Liz, Marcus Vinícius de, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, inst. IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba
Lucia Ferreira Littiere - CRB 9/1271



Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 115

A Dissertação de Mestrado intitulada: Purificação, caracterização e imobilização de duas lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida, defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Halanna de Paula Riedi**, no dia 25 de fevereiro de 2019, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra Giselle Maria Maciel - Presidente - UTFPR

Dra. Tatiane Brugnari - UTFPR

Dra. Cristiane Vieira Helm - Embrapa

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e ao meu irmão, que me carregaram tão longe sempre me apoiando em minhas decisões.

Ao meu namorado pela paciência, dedicação, carinho e por me dar muito lanche e chocolate ao longo de toda essa jornada de dois anos.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Giselle Maria Maciel e ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz que se dispuseram a oferecer seus ensinamentos e compartilhar conhecimentos independente da hora, do dia, da teimosia e da cabeça dura da orientada.

A todos os colegas de mestrado e laboratório, especialmente Aline, Tamara e Nigella, pelas longas horas compartilhadas na frente das bancadas, rindo e se desesperando.

RESUMO

RIEDI, Halanna de Paula. **Purificação, caracterização e imobilização de lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida.** 88 f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.

A rifampicina e a isoniazida são antibióticos utilizados para o tratamento da tuberculose. Cerca de 30% dos fármacos são expelidos do corpo em sua forma inalterada e quando não tratados adequadamente em estações de tratamento de água e esgoto, podem ser responsáveis pela proliferação de cepas bacterianas resistentes. Diferentes técnicas têm sido propostas para o tratamento de fármacos no ambiente, incluindo métodos biológicos com o uso de enzimas fúngicas. Dentre elas a aplicação de lacases imobilizadas pela técnica de *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) para a biodegradação de micropoluentes é uma alternativa promissora. Nesse trabalho foram avaliadas a purificação, caracterização e a imobilização de lacases de basidiomicetos pelo método de CLEAs para posterior aplicação das enzimas como agentes biodegradadores da rifampicina e isoniazida. O trabalho foi dividido em seis etapas, sendo essas: (1) produção de lacases por basidiomicetos, resultando em atividades máximas para *Trametes* sp. de 9413,91 U/L e para *Pleurotus ostreatus* de 12296,03 U/L; (2) imobilização das enzimas em CLEAs no qual obteve-se taxa de 16,42% de imobilização; (3) purificação das lacases obtidas por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, diálise e cromatografia em gel gerando atividade específica de 7,77 U/mg para *Trametes* sp. e 6,3 U/mg para *P. ostreatus*; (4) caracterização das enzimas com relação aos efeitos do pH, temperatura e determinação das constantes cinéticas, na qual foi possível observar que para as duas lacases o pH ótimo foi 4,0, com estabilidade na faixa de 3,0 a 5,0 e temperatura ótima de 60°C e termoestabilidade entre 20 a 50°C por 1 hora. Já para as enzimas imobilizadas notou-se aumento na estabilidade em relação a todos os pHs e na temperatura de 20 a 60°C. Para as lacases livres de *Trametes* sp. o K_m foi de 1 mM e V_{\max} de 454 $\mu\text{mol}/\text{min}$ e para os CLEAs foi 3,94 e 140,84 respectivamente. Para a enzima livre de *P. ostreatus* o K_m foi de 2,1 mM e V_{\max} de 1000 $\mu\text{mol}/\text{min}$ enquanto que a imobilizada apresentou K_m de 2,57 mM e V_{\max} de 70,42 $\mu\text{mol}/\text{min}$; (5) a biodegradação simultânea dos fármacos resultou em melhor desempenho no tratamento da isoniazida utilizando as enzimas imobilizadas com 71% de remoção para *Trametes* sp., enquanto a aplicação da lacase livre resultou em 32%. Para o fungo *P. ostreatus* os resultados foram similares, com 68,8% de remoção utilizando CLEAs e 26,4% com enzimas livres. Para a rifampicina não houve diferença significativa entre os dois tratamentos, sendo que ambos apresentaram mais de 93% de remoção total; (6) as análises antimicrobianas das soluções após os tratamentos enzimáticos demonstraram que a rifampicina ainda conservava suas propriedades, inibindo crescimento em baixas concentrações de 0,22 mg/L.

Palavras-chave: Antibiótico. Drogas antituberculose. *Cross-linked enzyme aggregates*. *Pleurotus ostreatus*. *Trametes* sp.

ABSTRACT

RIEDI, Halanna de Paula. **Purification, characterization and immobilization of basidiomycetes laccases and its use in the simultaneous degradation of rifampicin and isoniazid.** 88 p. Masters dissertation. Post-graduation Program in Environmental Science and Technology. Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2019.

Rifampicin and isoniazid are antibiotics used for the treatment of tuberculosis. Around 30% of pharmaceuticals are expelled from the body in its unchanged form and when are not properly treated in the sewage treatment plants can be responsible for the proliferation of resistant bacteria. Different techniques have been proposed for the treatment of pharmaceuticals in the environment, including biological methods with the use of fungal enzymes. Between them the application of immobilized laccases by cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for the biodegradation of micropollutants is a promising alternative. In this study were evaluated the purification, characterization and immobilization of laccases from basidiomycetes by CLEAs technique for subsequent application of the enzymes as biodegradant agents of rifampicin and isoniazid. The paper was divided into six steps, being these: (1) laccase production by basidiomycetes, resulting at maximum activity for *Trametes* sp of 9412,91 U/L and for *Pleurotus ostreatus* 12296,03 U/L; (2) enzyme immobilization by CLEAs obtaining 16,42% of enzymatic immobilization; (3) purification of laccases obtained by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysis and gel chromatography with specific activity of 7,77 U/mg for *Trametes* sp. and 6,3 U/mg for *P. ostreatus*; (4) characterization of the enzymes with respect to the effects of pH, temperature and determination of the kinetic constants, where it was possible to observe that for both laccases the optimum pH was 4,0 and stability between 3,0 and 5,0 and optimum temperature of 60 °C and thermostability between 20°C to 50 °C for 1 hour. For the immobilized enzyme were observed stability increase for all pHs and in temperature between 20 to 60°C. Free lacases of *Trametes* sp. obtained K_m of 1 mM and V_{max} of 454 $\mu\text{mol}/\text{min}$, while CLEAs obtained 3,94 and 140,84, respectively. For *P. ostreatus* free enzyme the K_m was 2,1 mM and V_{max} 1000 $\mu\text{mol}/\text{min}$, while immobilized obtained K_m of 2,57 mM and V_{max} of 70,42 $\mu\text{mol}/\text{min}$; (5) pharmaceuticals simultaneous biodegradation resulted in higher treatment performance of isoniazid using immobilized enzymes with 71% removal for *Trametes* sp. while free laccase displayed 32%. *P. ostreatus* had similar results, with 68,8% for CLEAs and 26,4% with free enzymes. Rifampicin didn't have significant difference between treatments, with both removing more than 93%; (6) antimicrobial analysis after enzymatic treatment revealed that rifampicin still had antimicrobial properties, inhibiting growth in low concentrations of 0,22 mg/L.

Keywords: Antibiotics. Anti-tuberculosis drugs. *Cross-linked enzyme aggregates. Pleurotus ostreatus. Trametes* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da rifampicina.....	16
Figura 2 – Estrutura molecular da isoniazida.....	17
Figura 3 – Centro catalítico da lacase.....	21
Figura 4 – Mecanismos de reação da lacase com substrato e mediador. A reação diretamente com o substrato passa por outras reações não enzimáticas.....	23
Figura 5 – Os dois passos para a formação dos agregados enzimáticos.....	27
Figura 6 – Fluxograma das etapas metodológicas.....	29
Figura 7 – Lacase imobilizada por CLEAs.....	42
Figura 8 – Avaliação da atividade relativa de duas lacases livres purificadas em diferentes pHs.....	46
Figura 9 – Avaliação da atividade relativa de duas lacases imobilizadas em diferentes pHs.....	47
Figura 10 – Avaliação da atividade relativa das duas lacases livres purificadas em diferentes temperaturas.....	50
Figura 11 – Avaliação da atividade relativa das duas lacases imobilizadas em diferentes temperaturas.....	51
Figura 12 – Estabilidade da lacase purificada livre de <i>Trametes</i> sp. em diferentes pHs.....	53
Figura 13 – Estabilidade da lacase imobilizada de <i>Trametes</i> sp. em diferentes pHs.....	54
Figura 14 – Estabilidade da lacase purificada livre de <i>Pleurotus ostreatus</i> em diferentes pHs.....	54
Figura 15 – Estabilidade da lacase imobilizada de <i>Pleurotus ostreatus</i> em diferentes pHs.....	55
Figura 16 – Termoestabilidade da lacase purificada livre de <i>Trametes</i> sp. em diferentes temperaturas.....	56
Figura 17 – Termoestabilidade da lacase imobilizada de <i>Trametes</i> sp. em diferentes temperaturas.....	57
Figura 18 – Termoestabilidade da lacase purificada livre de <i>Pleurotus ostreatus</i> em diferentes temperaturas.....	58
Figura 19 – Termoestabilidade da lacase imobilizada de <i>Pleurotus ostreatus</i> em diferentes temperaturas.....	59
Figura 20 – Curvas de concentração da rifampicina (A) isoniazida (B).....	62
Figura 21 – Degradação simultânea de rifampicina e isoniazida pelo fungo <i>Trametes</i> sp.....	63
Figura 22 – Degradação simultânea de rifampicina e isoniazida pelo fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituição gradiente da fase móvel.....	34
Tabela 2 – Produção de lacases por fungos da podridão branca em cultivo semi-sólido estático após 7 dias de incubação.....	38
Tabela 3 – Atividade da lacase de <i>Pleurotus ostreatus</i> observada após imobilização de 500 U/L.....	42
Tabela 4 – Etapas da purificação do extrato de <i>Trametes</i> sp.....	43
Tabela 5 – Etapas da purificação do extrato de <i>Pleurotus ostreatus</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
3.1	Rifampicina e isoniazida	16
3.2	Fungos da podridão branca	18
3.2.1	ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	19
3.2.1.1	Lacases	20
3.2.1.1.1	<i>Propriedades Estruturais</i>	20
3.2.1.1.2	<i>Mecanismo de Ação</i>	22
3.2.1.1.3	<i>Condições ótimas em relação ao pH e temperatura</i>	24
3.3	Imobilização Enzimática	24
3.3.1	TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO	25
3.3.1.1	<i>Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)</i>	26
3.3.1.1.1	<i>Precipitantes</i>	27
3.3.1.1.2	<i>Agentes aglutinadores</i>	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Cultivo dos basidiomicetos produtores de enzimas em meio sólido	29
4.2	Produção das enzimas ligninolíticas em meio semi-sólido	30
4.3	Imobilização	30
4.4	Determinação da atividade enzimática livre e imobilizada	31
4.5	Purificação da lacase	31
4.6	Determinação da concentração de proteínas totais	32
4.7	Caracterização das enzimas purificadas e dos CLEAs	32
4.7.1	TEMPERATURA E pH ÓTIMOS	32
4.7.2	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS E pH ..	33
4.7.3	DETERMINAÇÃO CINÉTICA DOS EXTRATOS PURIFICADOS E CLEAs ...	33
4.8	Biodegradação da rifampicina e isoniazida	34
4.8.1	CONDIÇÕES DE DETECÇÃO POR HPLC-DAD	34
4.8.2	BIODEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA IN VITRO DA RIFAMPICINA E ISONIAZIDA	35
4.9	Atividade antimicrobiana	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Produção de enzimas ligninolíticas	37
5.2	Imobilização	41
5.3	Purificação do extrato bruto	42
5.4	Propriedades das enzimas purificadas e CLEAs	46
5.4.1	ANÁLISE DE MELHOR pH	46
5.4.2	TEMPERATURA ÓTIMA	49
5.4.3	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES pHs	52
5.4.4	ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS	56
5.4.5	PARÂMETROS CINÉTICOS	60
5.5	Biodegradação simultânea in vitro da rifampicina e isoniazida	61
5.6	Atividade antimicrobiana	66
6	CONCLUSÕES	68

REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE A – Curva padrão de Albumina de Soro Bovino	86
APÊNDICE B – Curva padrão de Rifampicina e Isoniazida.....	87

1 INTRODUÇÃO

Devido aos avanços na sensibilidade das técnicas analíticas, foi possível observar nas últimas décadas, o aumento contínuo de uma nova classe de poluentes denominada de contaminantes emergentes. A presença desses micropoluentes, normalmente encontrados em ambientes aquáticos em concentrações de ng/L até µg/L vêm aumentando de forma constante, principalmente devido ao aumento do consumo pela população e à ineficiência das estações de tratamento de água e esgoto em removê-los através de seus tratamentos antes do despejo dos efluentes nos corpos de água. A lista desses compostos incluem produtos de higiene pessoal, hormônios esteroides, pesticidas e fármacos, entre eles os antibióticos (BAALBAKI et al., 2017; BRAUSCH et al., 2012; JONES; VOULVOULIS; LESTER, 2001; LUO et al., 2014).

No mundo a venda de antibióticos aumentou entre os anos de 2000 e 2015 em 65%, sendo estimado um consumo que varia de 100.000 a 200.000 toneladas por ano (HENDRICKS; POOL, 2012; KLEIN et al., 2018). No Brasil o número de doses diárias consumidas desses fármacos é maior do que a média dos países da Europa, do Canadá e do Japão, ocupando 5,8% das vendas totais nacionais, com média de 22,7 doses diárias por mil habitantes, enquanto que em 2004 esse número era de 4,8 (ANVISA, 2018; NNADOZIE; KUMARI; BUX, 2017; OMS, 2018).

Apenas 30% da dose da maioria dos antibióticos consumidos são metabolizados pelo corpo, enquanto a maior parte é liberada no ambiente através de fezes e urina na forma inalterada ou de conjugados e metabólitos (BUTKOVSKYI et al., 2015; MARSHALL; LEVY, 2011; VENTOLA, 2015). Em áreas urbanas o esgoto proveniente de casas e hospitais é coletado e tratado em conjunto nas estações de tratamento de esgoto, onde a presença de antibióticos juntamente com alta densidade bacteriana e condições favoráveis levam ao desenvolvimento de micro-organismos resistentes, criando *hotspots* para a disseminação de seus genes no ambiente (RIZZO et al., 2013), especialmente quando as condições operacionais são inadequadas (capacidade excessiva, design e desinfecção inapropriada, etc), levando à liberação desses patógenos e poluentes nos rios (GOPO, 2013; WANG et al., 2014).

Uma estimativa sugere que em 2016 ocorreram ao menos 700 mil mortes relacionadas a infecções resistentes a medicamentos, com previsão de até 10 milhões de casualidades em 2050 (O'NEILL, 2016). O aumento do uso de antibióticos em tratamentos vem sendo associado ao surgimento de cepas resistentes às suas formulações. Por exemplo, o uso incorreto de drogas antituberculose, seja por sua baixa qualidade, erros de prescrição ou mau uso pelos pacientes levou à dispersão de cepas emergentes de *Mycobacterium tuberculosis* com alto espectro de resistência (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014).

Novas técnicas biotecnológicas estão sendo desenvolvidas para mitigar e eliminar fármacos e outros componentes do ambiente e evitar a disseminação de micro-organismos resistentes. Tratamentos biológicos utilizando enzimas vêm sendo desenvolvidos ao longo de vários anos, demonstrando eficiência na remoção de poluentes quando comparados com tratamentos físicos e químicos (MARGOT et al., 2013; PACHECO; SOARES, 2014; PEZZELLA et al., 2014; VISWANATH et al., 2014; YU et al., 2007; ZHENG et al., 2016). Dessa forma, a utilização de enzimas como agentes essenciais na descontaminação vem ganhando cada vez mais atenção devido ao seu potencial de remover poluentes da água e solo, sem a eventualidade de gerar resíduos secundários tóxicos, comuns na utilização de outros métodos. Uma das grandes vantagens na utilização de tratamentos enzimáticos é a habilidade de descontaminar poluentes em baixas concentrações de forma específica e a capacidade de lidar com grandes volumes de efluentes apenas com pouca quantidade dessas proteínas.

A aplicação das enzimas ligninolíticas produzidas pelos fungos da podridão branca, como *Trametes* sp. e *Pleurotus ostreatus*, tem se mostrado uma excelente opção no tratamento de diversos bioativos (D'ACUNZO; GALLI; MASCI, 2002; HUSAIN; JAN, 2000; KARAS et al., 2011; MACIEL et al., 2012; RODRÍGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006; SPINA et al., 2015). Entretanto as aplicações enzimáticas podem apresentar algumas limitações, tratando-se de sistemas muito sensíveis e por vezes custosos quando é preciso aumentar a escala do tratamento.

Para tal, uma das alternativas para melhorar a eficiência no uso de tratamentos enzimáticos em aplicações industriais é o emprego de técnicas de imobilização através de protocolos simples e baratos, permitindo o melhoramento de propriedades como a estabilidade térmica, capacidade catalítica, seletividade e tempo de vida para posterior reuso (BEZERRA et al., 2014; SANLIER; GIDER;

KOPRULU, 2013; XU et al., 2015). Entre essas técnicas, a *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs), diferente das técnicas dependentes do uso de um suporte físico, não necessita destes para sua imobilização, evitando gastos desnecessários enquanto mantém elevada produtividade graças à alta concentração de enzimas e alta estabilidade (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; SHELDON, 2007), permitindo o uso de enzimas semi-purificadas e a oportunidade de imobilizar diferentes proteínas em um mesmo agregado, potencializando sua efetividade (MATEO et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir, caracterizar e imobilizar lacases de basidiomicetos utilizando a técnica de *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) para a degradação simultânea dos fármacos rifampicina e isoniazida.

2.2 Objetivos específicos

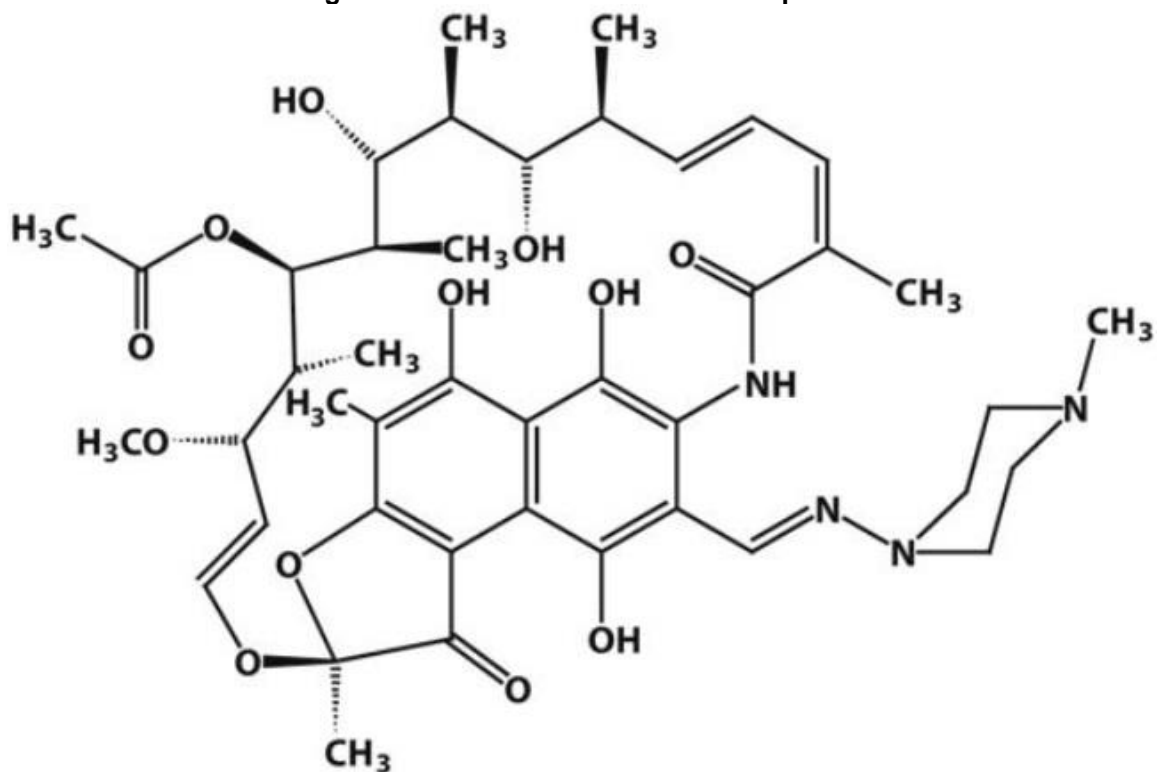
- Produzir lacases a partir do cultivo de cepas de *Trametes* sp. e *Pleurotus ostreatus* em meio semi-sólido com resíduos lignocelulósicos e diferentes metais;
- Purificar as lacases por métodos de concentração e cromatografia em gel de Sephadex G-100;
- Imobilizar as enzimas por técnica de agregados enzimáticos de ligações cruzadas (CLEAs);
- Caracterizar as enzimas purificadas e CLEAs quanto aos efeitos do pH e temperatura;
- Realizar análise cinética das enzimas purificadas e CLEAs;
- Avaliar a eficiência das enzimas imobilizadas e livres na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Determinar a atividade antimicrobiana dos antibióticos após o tratamento enzimático.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Rifampicina e isoniazida

A rifampicina (RIF) (Figura 1) é um antibiótico derivado da rifamicina B que atua sobre micobactérias e bactérias gram-positivas e negativas ao inibir a biossíntese do RNA e o início da sua transcrição, sendo usada para o tratamento da hanseníase e da tuberculose. É absorvida principalmente pelo trato gastrointestinal, sendo ativa dentro de 1 a 4 horas. Cerca de 6 a 30% do fármaco é excretado na urina, 30 a 60% sob a forma desacetilada e aproximadamente 50% inalterada (BULA ISONIAZIDA + RIFAMPICINA ®, 2013).

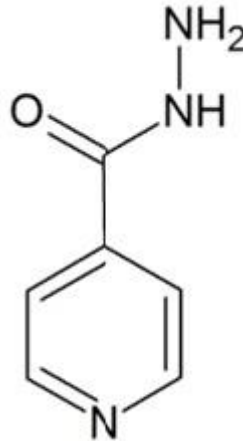
Figura 1. Estrutura molecular da rifampicina.



Fonte: Adaptado de Brunton; Chabner; Knollmann (2012).

A isoniazida (INH) (Figura 2) é um derivado sintético do ácido isonicotínico e inibe a síntese do ácido micólico da parede celular de micobactérias não atuando contra outros tipos de micro-organismos. É considerado um fármaco primário utilizado no tratamento de todas as formas de tuberculose causadas por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis à isoniazida. É absorvida pelo sistema digestivo proporcionando pico sanguíneos dentro de 1 a 2 horas. Cerca de 50 a 70% da dose é excretada de forma inalterada e metabólitos como acetilisoniazida e ácido isonicotínico dentro de 24 horas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; BULA ISONIAZIDA + RIFAMPICINA ®, 2013).

Figura 2. Estrutura molecular da isoniazida.



Fonte: Adaptado de Brunton; Chabner; Knollmann (2012).

Quando liberados em corpos de água, muitos resíduos farmacêuticos se dispersam em diferentes compartimentos ambientais, como águas superficiais e profundas, solo, sedimento e para dentro de organismos nativos de acordo com suas estruturas químicas e físicas e sua capacidade de persistir contra a degradação (BOTTONI; CAROLI; CARACCILO, 2010). A maioria dos fármacos são sintetizados para ter sua ação no corpo humano em baixas concentrações, mas podem ter efeito negativo em organismos não prioritários mesmo quando estão em baixas concentrações ambientais (POMATI et al., 2006).

3.2 Fungos da podridão branca

Os fungos da podridão branca (do inglês *White-rot fungi*), pertencentes à classe dos basidiomicetos, são organismos que se desenvolvem sobre material lenhoso e são capazes de degradar a madeira. Essa degradação extensiva se dá graças às suas habilidades de retirar lignina, xilose e manose pela redução desses polímeros nas células e também pelo espalhamento do micélio sobre a madeira, causando-lhe aspecto de podridão, o que confere a cor esbranquiçada ao material, sendo responsável pela origem de seu nome (BAJPAI; ANAND; BAJPAI, 2006; MACIEL et al., 2012; POINTING, 2001).

Embora os fungos da podridão branca sejam em sua maioria basidiomicetos, existem alguns ascomicetos que também são capazes de degradar lignina, entretanto não tão eficientemente, mas que também conferem uma aparência esbranquiçada à madeira (MACIEL et al., 2012). Os basidiomicetos estão entre os mais eficientes em degradar lignina, celulose e hemicelulose, sendo os únicos a quebrar a lignina até água e dióxido de carbono graças ao seu poderoso sistema enzimático extracelular (HAVE; TEUNISSEN, 2001; MACIEL et al., 2012). Essas enzimas são responsáveis pelos processos de degradação realizados por esses fungos, que atuam em parte da reciclagem de nutrientes na natureza. Graças a esse sistema enzimático, esses fungos são capazes de degradar um espectro diverso de poluentes xenobióticos, tornando-os organismos atrativos para os processos de biorremediação de poluentes (MACIEL et al., 2012; POINTING, 2001; SPINA et al., 2015).

Desse sistema enzimático extracelular, as enzimas ligninolíticas mais importantes são a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, capazes de degradar compostos fenólicos complexos que normalmente seriam tóxicos e/ou recalcitrantes no ambiente (STRONG; CLAUS, 2011). Graças às semelhanças desses compostos com a lignina, essas enzimas estão sendo constantemente estudadas por sua capacidade de degradação de materiais complexos.

3.2.1 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Os fungos da podridão branca secretam naturalmente enzimas extracelulares para a degradação da lignina, sendo as mais comuns a Lignina peroxidase (ou ligninase - LiP), Manganês peroxidase (MnP) e Lacase. Essas enzimas apresentam baixa especificidade quanto aos substratos orgânicos que podem ser oxidados, tornando-as interessantes no ponto de vista biotecnológico (BAJPAI; ANAND; BAJPAI, 2006; HAVE; TEUNISSEN, 2001; MACIEL et al., 2012; POINTING, 2001; RABINOVICH; BOLOBOVA; VASIL'CHENKO, 2004). Cada espécie de fungo produz uma combinação diferente de enzimas, o que faz com que possam ser separados em grupos distintos, de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1. Exemplos de fungos da podridão branca de acordo com suas produções enzimáticas.

Fungos da podridão branca		Referências
Produtores de Lacase, MnP e LiP	<i>Phlebia radiata</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Trametes versicolor</i>	Hatakka (1994) Hermann (2015) Widiastuti et al. (2008)
Produtores de Lacase e ao menos uma peroxidase	<i>Lentinula edodes</i> <i>Panus tigrinus</i> <i>Oudemansiella radicata</i>	Hatakka (1994)
Produtores apenas de Lacase	<i>Daedaleopsis confragosa</i> <i>Phellinus weirii</i> <i>Schizophyllum commune</i>	Esposito; Azevedo (2010) Hatakka (1994)
Produtores apenas de peroxidases	<i>Coriolus pruinosum</i> <i>Geoderma applanatum</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Esposito; Azevedo (2010) Hatakka (1994)

3.2.1.1 Lacases

Lacases (E.C. 1.10.3.2) são enzimas pertencentes à família das enzimas multicobre, em cujas estruturas físicas existem mais de um átomo desse elemento. Essas proteínas utilizam oxigênio molecular como aceptor final de elétrons para oxidar diversos compostos aromáticos e não aromáticos por mecanismos de reação de catálise por radical que resultam na redução a moléculas de água. As lacases e seus similares (oxidases) estão espalhados por diversos grupos biológicos e possuem diferentes papéis desde lignificação e deslignificação, detoxificação, patogenicidade, morfogênese, esporulação e outros. Essas enzimas têm sido amplamente estudadas em processos biotecnológicos devido ao seu amplo espectro de substratos, uso de oxigênio como aceptor final de elétrons e o fato de não necessitar utilizar cofatores e peróxidos em suas reações (HAVE; TEUNISSEN, 2001; MARGOT et al., 2013; RIVA, 2006; RODRÍGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006; SPINA et al., 2015; STRONG; CLAUS, 2011; VISWANATH et al., 2014).

3.2.1.1.1 Propriedades Estruturais

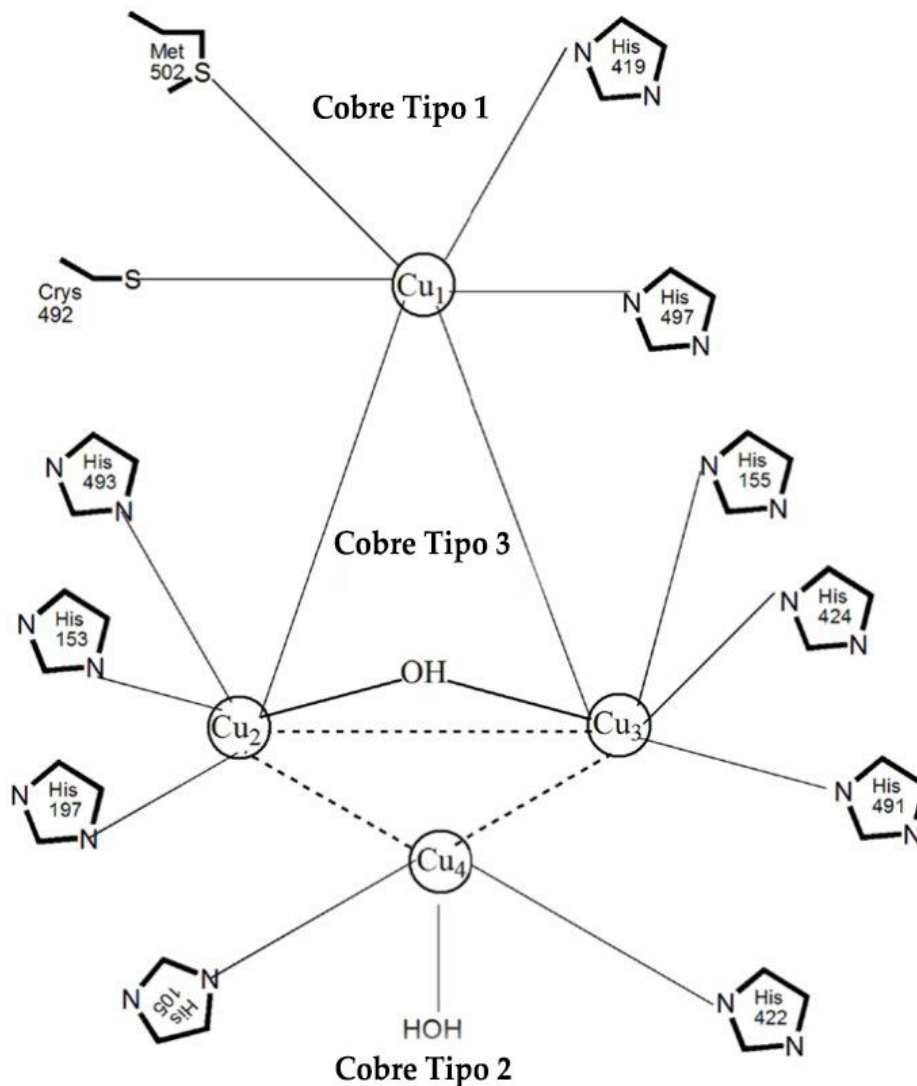
A maioria das lacases produzidas por fungos são monoméricas, entretanto é possível encontrar várias com estrutura homodimérica onde a enzima é composta por duas unidades idênticas, embora possua peso molecular semelhante às monoméricas (BALDRIAN, 2006).

A estrutura dessa proteína necessita de quatro átomos de cobre para que sua atividade catalítica ocorra de forma eficiente (Figura 2). Esses átomos são divididos em três tipos, sendo que cada tipo é responsável por um sítio ativo dentro da enzima com diferentes funções que podem ser identificadas de acordo com sua função magnética e espectroscópica (BALDRIAN, 2006; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014; STRONG; CLAUS, 2011). Além disso, esses quatro átomos estão completamente oxidados (Cu^{2+}) na forma nativa da enzima lacase (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014).

O Cobre tipo 1 é rodeado por uma molécula de cisteína e duas histidinas como ligantes conservados, sendo que sua quarta posição pode ser variável,

havendo algumas vezes uma metionina. Essa conformação é responsável pela intensa cor azul da enzima com forte absorção de banda a 600 nm graças à ligação covalente do cobre com a cisteína, sendo esse o sítio responsável pela oxidação de substrato e seu potencial redox (BALDRIAN, 2006; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014; STRONG; CLAUS, 2011). O potencial redox do sítio pode aumentar ou diminuir dependendo do aminoácido a se ligar ao cobre tipo 1, sendo geralmente maior quando uma fenilalanina é o ligante axial (SHLEEV et al., 2004) o que influencia diretamente na capacidade da enzima de degradar seus substratos. Após a oxidação, os elétrons disponíveis são enviados para os sítios T2 e T3, onde o oxigênio molecular é reduzido à água (BALDRIAN, 2006).

Figura 3. Centro catalítico da lacase.



Fonte: Adaptado de Christopher; Yao; Ji (2014).

O cobre tipo 2 é caracterizado por sua fraca absorção no espectro visível, além de possuir propriedades paramagnéticas, sendo um sítio ativo em ressonâncias de elétrons paramagnéticos. O cobre T2 é coordenado por duas histidinas e uma molécula de água, e juntamente com o cobre T3, formam um sítio trinuclear onde ocorre a redução do oxigênio molecular à água (BALDRIAN, 2006; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014; STRONG; CLAUS, 2011).

Os cobres do tipo 3 fazem parte do centro binuclear da enzima com absorção de banda UV a 330 nm. Diferente do cobre T2, não existe ressonância magnética devido à junção antiferromagnética dos dois íons de cobres presentes, mediada por uma ponte hidroxila. Cada átomo de cobre T3 é ligado a três histidinas que mantêm a conformação da molécula, e juntamente com o cobre T2 o sítio trinuclear é capaz de catalisar a fixação e redução de oxigênio para água (BALDRIAN, 2006; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014; STRONG; CLAUS, 2011).

Algumas lacases possuem formações variantes, sem o sítio ativo do cobre T1 e são muitas vezes chamadas de lacases amarelas, pois não possuem absorção de banda ao redor dos 600 nm (IKE et al., 2015; LEONTIEVSKY et al., 1997; RABINOVICH; BOLOBOVA; VASIL'CHENKO, 2004). Entretanto, alguns autores argumentam que devido à conformação dessas enzimas, elas não deveriam ser chamadas de lacases (MAYER; STAPLES, 2002).

A enzima lacase se mantém estável graças a um conjunto de diversos fatores estruturais, como a existência dos quatro íons de cobre, ligações iônicas (pontes de sal) e uma densa rede de ligações de hidrogênio (HILDE; HAKALA; TAINA, 2009).

3.2.1.1.2 Mecanismo de Ação

As enzimas agem sobre o substrato de potencial redox inferior quando esse se acopla ao seu sítio catalítico, próximo ao cobre T1, onde ocorre sua oxidação e posterior transformação em radical. Essa oxidação é uma reação de um elétron e, por isso, demanda ao menos quatro substratos para que seja feita a transformação do oxigênio molecular em água em quatro distintas oxidações de um único elétron. Esse conjunto de reações é considerado um único ciclo catalítico de redução de

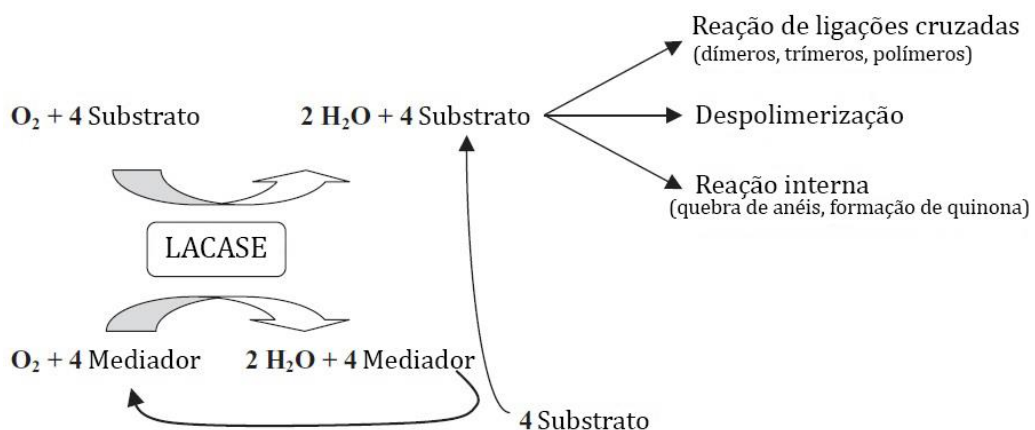
substratos e oxidação de oxigênio molecular onde este é o aceptor final de elétrons (CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014).

Os elétrons são transferidos do cobre T1 até o sítio trinuclear (T2 e T3) pelo tripeptídeo formado de duas histidinas e uma cisteína, onde ocorre a redução do oxigênio molecular em água (BALDRIAN, 2006; POGNI et al., 2015). Essa redução só é possível, pois o substrato age como doador de hidrogênio (THURSTON, 1994).

As lacases são divididas em enzimas de alto e baixo potencial redox, sendo que as excretadas pelos fungos da podridão branca estão entre as de maior potencial redox, variando de 0,6 a 0,8 V (MACELLARO et al., 2014; REBRIKOV et al., 2006; XU et al., 1996), embora em comparação com outras enzimas, seu potencial redox seja considerado baixo. A eficiência catalítica da enzima está intimamente ligada ao potencial redox que provém das propriedades do cobre T1 (SHLEEV et al., 2005; XU et al., 1996, 2000).

O primeiro radical liberado no início da reação é normalmente instável e pode ser convertido a uma quinona em uma segunda catálise enzimática ou por desproporção espontânea (STRONG; CLAUS, 2011; THURSTON, 1994). Quando ocorre oxidação de polímeros formados por fenóis esses compostos podem passar por posterior reação de radicais não enzimáticos que resultam na degradação parcial devido à quebra das ligações covalentes entre os monômeros. Entretanto, esses radicais monoméricos podem ser submetidos a ligações-cruzadas covalentes para formar dímeros, oligômeros e polímeros (Figura 3) (STRONG; CLAUS, 2011).

Figura 4. Mecanismos de reação da lacase com substrato e mediador. A reação diretamente com o substrato passa por outras reações não enzimáticas.



Fonte: Modificado de Strong; Claus (2011).

3.2.1.1.3 Condições ótimas em relação ao pH e temperatura

As lacases produzidas por fungos geralmente exibem suas melhores atividades catalíticas em meio ácido e tendem a perder atividade conforme o pH aumenta devido à junção de ânions hidróxidos aos cobre T2 e T3 o que faz com que haja uma interrupção na transferência de elétrons do cobre T1 aos sítios T2 e T3 (MARGOT et al., 2013; XU, 1997).

Para a oxidação do 2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) o melhor pH para algumas lacases fica abaixo de 4,0, enquanto para a oxidação de compostos fenólicos como o siringaldazina o pH pode variar entre 3,0 e 7,0 (BALDRIAN, 2006; CAMARERO et al., 2005; CHRISTOPHER; YAO; JI, 2014). Uma das limitações da aplicação da enzima em processos industriais é o fato de obter melhor desempenho catalítico em meio ácido ao invés de básico.

As lacases, assim como muitas enzimas lignocelulíticas extracelulares, tende a ter intervalos de atividade e reação ótimos entre 50°C e 70°C (BALDRIAN, 2006), mas podem variar de 25°C a 80°C, dependendo do fungo a produzi-las (STRONG; CLAUS, 2011). No caso da degradação do composto ABTS 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), a enzima demonstrou maior atividade oxidativa na temperatura de 85°C (KOSCHORRECK et al., 2008).

A termoestabilidade das lacases também é altamente variável e são poucos os fungos capazes de produzir enzimas cuja atividade ótima fica a baixo de 35°C, como a lacase de *Ganoderma lucidum* que é ativa aos 25°C (KO; LEEM; CHOI, 2001).

3.3 Imobilização Enzimática

Reações enzimáticas têm a capacidade de agir com grande seletividade de substrato e sem a necessidade de ativação de grupos funcionais normalmente necessários em sínteses tradicionais. Isso implica que esses processos enzimáticos são capazes de gerar menos resíduos que as rotas sintéticas convencionais, são mais eficientes energeticamente e capazes de prover produtos com alto grau de pureza (SHELDON, 2011). Apesar disso, ainda possuem a desvantagem de não

dispor de constância operacional, sendo moléculas altamente sensíveis que ao serem expostas a certas condições revelam sua instabilidade termal, possível inibição de sítios ativos e falta de resistência a ataques de proteases que conseqüentemente podem levar à sua desnaturação e perda de atividade (HUSAIN; JAN, 2000; SHELDON, 2011). Além disso, essas proteínas são utilizadas em soluções aquosas, o que impossibilita sua reutilização e pode levar à sua contaminação.

Além da busca de enzimas produzidas por organismos mais tolerantes a altas temperaturas, pH, salinidade e maior alcance na catálise de diferentes substratos, a imobilização enzimática se mostrou promissora ao possibilitar o reuso desses biocatalisadores, aumentar sua resistência as variações físico-químicas das soluções e propiciar meios de separação dessas enzimas do meio aquoso (ASGHER et al., 2014; ASGHER; IQBAL; IRSHAD, 2012; ASGHER; IQBAL, 2013; BA et al., 2012; SHELDON, 2007; ZHENG et al., 2016).

3.3.1 TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO

A aplicabilidade industrial de diferentes enzimas depende do desenvolvimento de sistemas efetivos de imobilização, visto que essa técnica aumenta a estabilidade enzimática e reduz o custo ao possibilitar seu reuso, proporcionando a habilidade de realizar reações em diferentes condições ambientais (ASGHER et al., 2014), o que não seria possível com o uso de enzimas livres.

Os métodos empregados e também a natureza dos suportes enzimáticos são importantes na avaliação da produtividade, pois a estabilidade e o reuso dessas proteínas são dependentes do mecanismo utilizado (ASGHER et al., 2014).

A imobilização das enzimas pode ser realizada por diferentes técnicas. Normalmente estas envolvem a ligação da proteína em um suporte através de trocas iônicas, adsorção, uso de resinas, encapsulamento em um polímero inerte ou ligações covalentes, o que possibilitam biocatálises com desempenho operacional superior aos de enzimas livres (ASGHER et al., 2014; SHELDON, 2011). Uma das desvantagens do uso de suportes nos processos de imobilização é a diminuição da atividade enzimática devido à existência de áreas de ação não catalíticas

pertencentes aos suportes, que possuem massa superior a 90% do total (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003). Além disso, a imobilização em suportes pode levar a perda de atividade nativa, especialmente com altas cargas enzimáticas (JANSSEN et al., 2002). O próprio uso de suporte pode ainda ser considerado inviável pelo preço, dependendo do material utilizado.

Diferente de imobilização dependente de suporte, as ligações cruzadas de moléculas catalíticas não necessitam de suportes para sua imobilização, evitando gastos desnecessários enquanto mantém alta produtividade graças a alta concentração de enzimas e alta estabilidade (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; SHELDON, 2007).

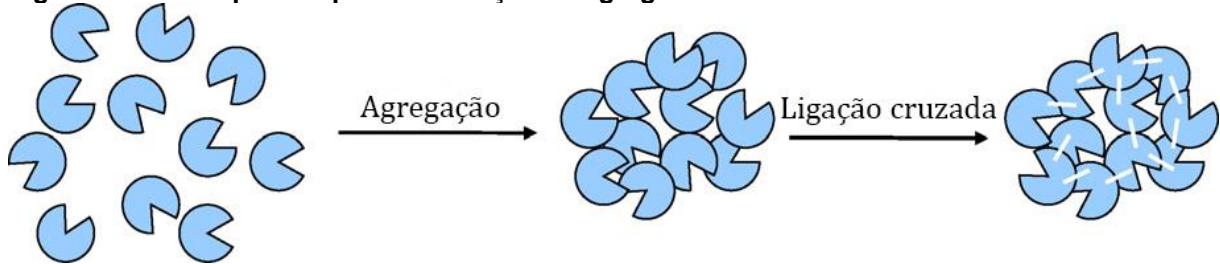
3.3.1.1 *Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs)*

Agregados enzimáticos por ligações cruzadas (CLEAs) (do inglês *Cross-linked enzyme aggregates – CLEAs*) foram propostos como alternativa para os métodos de imobilização enzimática dependentes de suporte físico, pois a técnica não está sujeita a essa relação, além de ser estável, reciclável e com maior capacidade de recuperação após o uso (CAO, 2005; CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000; MATEO et al., 2004; SCHOEVAART et al., 2004, 2008). Além disso, esse método de imobilização possibilita o uso de enzimas semipurificadas e a oportunidade de imobilizar diferentes enzimas em um mesmo agregado sem que ocorram grandes modificações na sua conformação molecular e perda de atividade (BA et al., 2012; MATEO et al., 2004).

Nesse procedimento a enzima é precipitada de uma solução aquosa pela adição de um sal, solvente orgânico hidrofóbico ou um polímero como polietilenoglicol. Em sequência, ocorre a formação das ligações cruzadas pela adição de um agente aglutinador, levando a mudanças nas propriedades que afetam a proximidade das moléculas solúveis da enzima até formar os agregados enzimáticos (Figura 5) (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003; SHELDON, 2011). Os agregados são formados pela mudança do estado hidratado da enzima, ou alterando a constante eletroestática da solução ao adicionar agentes precipitantes, permitindo que as moléculas, antes solvatadas, se tornem imiscíveis e

posteriormente se associem como agregados insolúveis (CAO; VAN LANGEN; SHELDON, 2003). A técnica ainda previne a solubilização e possível perda dos agregados enzimáticos depois da remoção do agente precipitante da solução (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007).

Figura 5. Os dois passos para a formação de agregados enzimáticos.



Fonte: Modificado de Matijosyte et al. (2010).

As ligações cruzadas ocorrem através da reação de grupos amino dos aminoácidos lisina (presente na superfície enzimática) com polímeros do agente agregador (normalmente glutaraldeído) resultante da condensação aldol inter e intramolecular (SHELDON, 2011). As condições favorecendo um caminho ou o outro variam entre os tipos enzimáticos (JANSEN; TOMIMATSU; OLSON, 1971).

Embora CLEAs possam eliminar o uso de suportes para sua imobilização e consequentemente a redução de áreas não catalíticas, uma das desvantagens da técnica acaba sendo a limitação de configuração do reator, devido ao menor tamanho dos agregados em comparação com enzimas imobilizadas em suportes (CAO, 2006).

3.3.1.1.1 *Precipitantes*

Cao, Van Langen, Sheldon (2003) observaram que na presença de diferentes precipitantes, quanto maior a imiscibilidade da enzima em relação à solução, maior sua atividade, enquanto e sua menor atividade foi constatada quando não havia precipitação nenhuma. Esses resultados podem indicar que a formação dos

agregados insolúveis é uma parte essencial para a retenção da atividade enzimática durante as ligações cruzadas.

Os CLEAs ainda tem a capacidade de diferir seu comportamento catalítico de acordo com as propriedades do precipitante utilizado na solução, como por exemplo, CLEAs de penicilina G acilase precipitada por sulfato de amônio possui comportamento sintético similar ao da enzima nativa durante a síntese de ampicilina, enquanto CLEAs preparados com *tert*-butanol como precipitante teve desempenho relativamente estável durante o curso da reação (CAO; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2000). Isso demonstra que os precipitantes provavelmente induzem conformações enzimáticas distintas que são consequentemente estabilizadas durante as ligações cruzadas (CAO, 2006).

3.3.1.1.2 Agentes aglutinadores

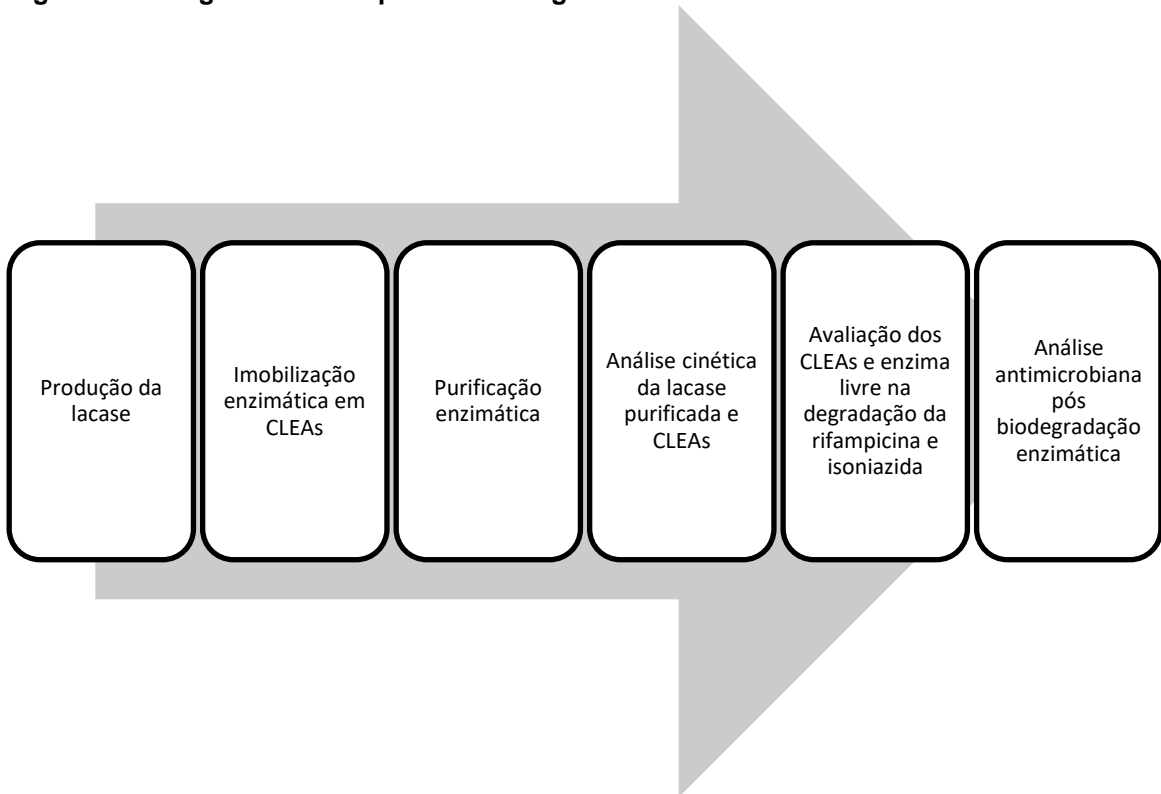
Normalmente o reagente mais eficiente usado para realizar as ligações cruzadas enzimáticas é o glutaraldeído, devido à sua disponibilidade comercial, baixo custo e alta reatividade. Ele reage com os grupos amina nas cadeias primárias das proteínas, tornando-o eficiente durante a agregação enzimática (BA et al., 2012; OKUDA et al., 1991). Ele também se encontra disponível em diversas formas baseadas nas condições da solução, como pH, temperatura e concentração (MIGNEAULT et al., 2004), sendo mais eficiente que outros aldeídos devido à sua habilidade em manter a estabilidade química e termal (NIMNI et al., 1987).

Além do glutaraldeído, foi observado que outros aldeídos podem ser usados como agentes ligantes. Um exemplo é o dextran polialdeído, que para a formação de CLEAs demonstrou melhor desempenho de recuperação enzimática que o glutaraldeído, desde que haja redução na formação de bases de Schiff através do uso de borohidreto de sódio, formando conexões irreversíveis (MATEO et al., 2004).

4 METODOLOGIA

Em linhas gerais, foram executadas seis etapas principais durante os processos metodológicos:

Figura 6. Fluxograma das etapas metodológicas.



4.1 Cultivo dos basidiomicetos produtores de enzimas em meio sólido

As enzimas ligninolíticas foram produzidas por fungos da podridão branca (*Trametes* sp. e *Pleurotus ostreatus*) disponíveis no laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Curitiba sede Ecoville.

Para o cultivo e ativação dos fungos foram transferidos discos miceliais, com aproximadamente 10 mm de diâmetro, de placas de Petri para outras contendo Ágar Batata Dextrose (PDA). As placas foram posteriormente incubadas por sete dias no escuro à 28°C. No sétimo dia os micélios foram utilizados para produção enzimática em meio semi-sólido.

4.2 Produção das enzimas ligninolíticas em meio semi-sólido

Três plugs miceliais do inóculo, preparado de acordo com o item 4.1, foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL em triplicata contendo 50 mL de solução de glicose 10 g/L; KH_2PO_4 3 g/L; peptona 0,5%; casca de arroz 1%; bagaço de uva Bordô 0,5%; diferentes quantidades de bagaço de cana (1, 2 e 3 g) , 2 mL de MnSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 e de MgSO_4 (25 mM) (concentração final no meio de cultivo de 1 mM). O meio de cultura foi autoclavado antes da adição dos inóculos e em seguida os frascos inoculados com os plugs foram incubados à 28°C por sete dias. Após o período de incubação, os meios foram submetidos à filtração em papel filtro e o filtrado foi utilizado para a determinação de atividade das enzimas (BONATO, 2018; MATEI, 2018)

4.3 Imobilização

A formação dos CLEAs de lacases se deu pela adição de sulfato de amônio como agente precipitante (55% p/v) e 200 µL de glutaraldeído a 25% como agente de agregação sobre 1,8 mL de extrato enzimático bruto. Posteriormente a solução foi armazenada à 4°C durante 24 h. Após o período de espera, a solução foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos e os CLEAs submetidos a 3 lavagens com tampão acetato de sódio (50 mM) pH 5,0 (CABANA; JONES; AGATHOS, 2007; MATIJOŠYTE et al., 2010). Para o teste de retenção de atividade, apenas lacases de *Pleurotus ostreatus* foram avaliadas.

4.4 Determinação da atividade enzimática livre e imobilizada

A reação para atividade da lacase foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm pela oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), de acordo com Hou et al (2004).

A atividade da enzima lignina peroxidase foi determinada pelo método de oxidação do álcool veratrílico. Além do tampão tartarato pH 3 (0,1 M), a mistura continha H₂O₂ e a mudança na absorbância foi monitorada a 310 nm em espectrofotômetro (ARORA; GILL, 2001).

Para a reação de análise da atividade de manganês peroxidase o sulfato de manganês foi utilizado como substrato e sua ativação foi feita com H₂O₂ e a oxidação foi medida a 270 nm em espectrofotômetro (WARIISHI; VALLI; GOLD, 1992).

A atividade da enzima imobilizada foi determinada da mesma forma que a da enzima livre, medindo também a atividade enzimática nas três lavagens realizadas com tampão (LI et al., 2015).

4.5 Purificação da lacase

Foram centrifugados 100 mL de cada extrato enzimático a 3.000 g por 5 minutos à 4°C. Posteriormente os pellets foram descartados e ao sobrenadante adicionou-se 5 mL de uma solução concentrada 10x de inibidor de proteases (SigmaFAST™ *Protease Inhibitor Tablet*) e 80% de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) p/v para a precipitação enzimática. O extrato foi então acondicionando na geladeira à 4°C durante a noite. No dia seguinte (24 h) foi feita nova centrifugação a 3.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 60 mL de tampão acetato de sódio (50 mM) pH 5,0. O pellet ressuspensionado foi então dialisado com água ultrapura utilizando o Pur-A-Lyzer™ Mega 3500 Dialysis kit por um período de 24 h a 4°C.

A amostra dialisada passou por posterior etapa de purificação através de uma coluna de gel Sephadex G-100 20 cm x 2 cm equilibrada com tampão acetato de

sódio 50 mM pH 5,0 e a enzima purificada foi coletada em alíquotas de 1 mL para ensaios de atividade, quantificação de proteína totais (ASGHER; KAMAL; IQBAL, 2012; ASLAM et al., 2012). Cada alíquota foi analisada individualmente no espectrofotômetro a 280 nm para detectar as frações com proteínas.

Após cada etapa de purificação uma tabela foi construída indicando a atividade enzimática, proteínas totais, atividade específica (atv spe) e o fator de purificação (ftr pur) onde:

$$Atv\ Spe = \frac{Atividade\ enzimática\ (U)}{Proteína\ total\ (mg)} \quad (1)$$

$$Ftr\ Pur = \frac{Atividade\ específica\ do\ extrato\ bruto\ (\frac{U}{mg})}{Atividade\ específica\ do\ extrato\ purificado\ (\frac{U}{mg})} \quad (2)$$

4.6 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração proteica dos extratos foi quantificada através do método de Bradford utilizando uma curva padrão (Apêndice A) de albumina de soro bovino pré-elaborada cuja concentração variou de 12,5 a 125,0 mg/mL (BRADFORD, 1976). Foram adicionados 100 µL da amostra a 1 mL do reagente de Bradford e após período de 5 minutos a absorbância da reação foi determinada a 595 nm.

4.7 Caracterização das enzimas purificadas e dos CLEAs

4.7.1 TEMPERATURA E pH ÓTIMOS

A temperatura e pH ótimos das lacases purificadas e CLEAs foram determinados pela análise da atividade enzimática em diferentes temperaturas (20°C

a 80°C) em banho-maria e diferentes valores de pH (3,0 a 7,0) com o uso dos tampões tartarato de sódio 50 mM pH 3,0, acetato de sódio 50 mM pH 4,0 e 5,0, fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 e 7,0 utilizando ABTS como substrato.

4.7.2 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS E pH

A estabilidade das enzimas purificadas e CLEAs em relação ao pH e à temperatura foi avaliada em cinco tempos diferentes (0, 15, 30, 45 e 60 minutos).

Para o pH os extratos enzimáticos purificados e CLEAs foram incubados entre 3,0 e 7,0 em tampão acetato de sódio 50 mM e sua atividade determinada na melhor temperatura após diferentes tempos de incubação. Para a análise da termoestabilidade os extratos purificados e CLEAs foram deixados em banho-maria variando de 20°C a 80°C no melhor pH.

4.7.3 DETERMINAÇÃO CINÉTICA DOS EXTRATOS PURIFICADOS E CLEAs

As constantes cinéticas K_m e V_{max} para as lacases purificadas e imobilizadas foram determinadas pela representação gráfica do duplo-recíproco de acordo com Lineweaver-Burk (1934) através das taxas de oxidação do ABTS em diferentes molaridades do substrato (3 mM, 5 mM, 7 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM e 25 mM) em pH 4,0 a 60°C pela equação (3), onde K_m = constante de Michaelis e V_{max} = velocidade máxima inicial.

$$y = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3)$$

4.8 Biodegradação da rifampicina e isoniazida

4.8.1 CONDIÇÕES DE DETECÇÃO POR HPLC-DAD

A biodegradação dos fármacos foi avaliada pela concentração dos mesmos nas amostras após tratamento enzimático em comparação com a curva analítica. A verificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Agilent (modelo 1260 Infinity), equipado com detector DAD (modelo 1260), injetor automático e coluna de sílica C₁₈, 4.6 mm x 250 mm, 5 µm (modelo Zorbax Eclipse Plus).

As condições de operação para a determinação da rifampicina e isoniazida foram realizadas conforme descrito na Farmacopéia Norte Americana (USP, 2007). A fase móvel consistiu de solução tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8 e acetonitrila grau HPLC. As análises foram realizadas em eluição gradiente e a fase móvel mantida a 0,8 mL/min nas proporções apresentadas na Tabela 1. Os comprimentos de onda avaliados foram 262 nm (INH) e 470 nm (RIF).

A concentração dos fármacos após tratamento enzimático foi quantificada utilizando curvas padrões feitas em triplicata preparadas em água ultra-pura (Apêndice B) de rifampicina e isoniazida cuja concentração variou de 5 a 0,15 mg/L para rifampicina e 5 a 0,05 mg/L para isoniazida.

Tabela 1. Constituição gradiente da fase móvel.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Tampão* (%)	Fluxo (mL/min)
0	4	96	0,8
5	4	96	0,8
6	55	45	0,8
15	55	45	0,8
16	4	96	0,8
25	4	96	0,8

*Tampão fosfato de sódio dibásico pH 6,8.

4.8.2 BIODEGRADAÇÃO SIMULTÂNEA IN VITRO DA RIFAMPICINA E ISONIAZIDA

A reação de biodegradação foi realizada em triplicata em tubos de ensaio tendo volume final de 10 mL. Ambos os fármacos preparados em água ultra-pura foram adicionados simultaneamente nas concentrações finais de 5 mg/L e em seguida 100 U/L de lacase livre e imobilizada em CLEAs foram inseridas na reação, sendo o restante do volume preenchido por tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Os tubos controle foram avaliados da mesma forma, sem a presença das enzimas. Em seguida os frascos foram levados ao shaker por 24 h no escuro a 40°C e a 120 rpm (INOUE et al., 2010; LLORET et al., 2010).

Ao final do período de tratamento a reação enzimática da lacase livre e imobilizada, além dos tubos controle, foi interrompida por inativação por calor (10 minutos a 100°C). Isoniazida possui ponto de fusão a 171.4 °C e rifampicina 183 °C (PUBCHEM, 2019 apud O'NEIL, 2001). Em seguida as amostras foram imediatamente filtradas em seringa de vidro e microfiltro de fibra de vidro GF-3 de 47 mm para a realização das análises cromatográficas no mesmo dia.

4.9 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de rifampicina na solução combinada de fármacos antes e após tratamento enzimático utilizando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) como cepa gram-positiva de referência (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008). A atividade antimicrobiana da isoniazida não pôde ser medida, pois se trata de um fármaco com ação específica para *Mycobacterium* e não apresenta ação inibitória contra *S. aureus* (HEIFETS, 1991). A concentração de rifampicina testada nos controles positivos em duplicata foi de 2,5 mg/L até 0,009 mg/L (n = 9).

As bactérias foram pré-cultivadas a 37°C durante 24 h em ágar Mueller-Hilton para a obtenção de colônias isoladas. Em seguida as colônias foram suspensas em solução salina 0,9% e ajustadas ao padrão McFarland 0,5 para então serem

adicionadas ao caldo Mueller-Hilton e inoculadas em placas de 96 poços. Triplicatas da solução combinada dos fármacos após o tratamento enzimático foram averiguadas por densidade óptica a 620 nm antes e depois de 24 h em estufa a 37°C, assim como o controle de esterilidade, controle de crescimento e controle positivo utilizando leitora de microplacas modelo Fluostar Omega, marca BMG Labtech Plate Reader (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de enzimas ligninolíticas

A produção das enzimas ligninolíticas dos fungos *Trametes* sp. e *Pleurotus ostreatus* foi avaliada usando um meio de cultivo base previamente testado e com resultados positivos para produção de lacases (HERMANN, 2015), adicionado de concentrações diferentes (1 g, 2 g, e 3 g/50 mL) de bagaço de cana-de-açúcar, além de três soluções distintas combinadas de FeSO_4 , ZnSO_4 e de MgSO_4 a 1mM.

Ambas as cepas produziram a enzima lacase, embora lignina peroxidase e manganês peroxidase não tenham sido detectadas (Tabela 2), mesmo tendo sido previamente encontradas com o meio padrão para *Trametes* sp. (HERMMAN, 2015). A maior produção de lacase foi observada quando houve a combinação das três diferentes soluções e 1 g/50 mL de bagaço de cana-de-açúcar para *Trametes* sp. e a combinação das três diferentes soluções e 2 g de bagaço de cana-de-açúcar para *Pleurotus ostreatus*. Notou-se ainda que quando comparado com o meio de cultura sem a adição dos sulfatos e a mesma quantidade de bagaço de cana, houve um aumento da produção de lacase, mostrando a influência dessas soluções de sais na capacidade de produção dessas enzimas pelos fungos.

Tabela 2. Produção de lacases por fungos da podridão branca em cultivo semi-sólido estático após 7 dias de incubação.

Cepa	Meio		Atividade enzimática (U/L)
	Bagaço de cana	Presença (+) ou ausência (-) de metais	Lacase
<i>Trametes sp.</i>	1 g	+	8964,36 ± 635,75
	2 g	+	7984,23 ± 401,86
	3 g	+	7193,91 ± 200,46
	3 g	-	4126,47 ± 278,7
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1 g	+	10910,75 ± 91,83
	2 g	+	12296,03 ± 37,67
	3 g	+	8285,04 ± 28,25
	3 g	-	5709,84 ± 167,96

Lignina peroxidase e manganês peroxidase não foram detectadas em nenhuma condição avaliada.

Observou-se um aumento de 32% na produção de lacases em *Pleurotus ostreatus* quando comparado com o mesmo meio de cultivo sem a presença das soluções adicionais. Já para *Trametes sp.*, o aumento foi de 43%.

Íons Fe^{2+} foram identificados como reguladores da expressão de lacases em nível de transcrição, assim Akpınar, Urek (2017), observaram que a adição de 18 μM de $FeSO_4$ em meio de cultura de *Pleurotus eryngii* resultou no aumento significativo na produção dessas enzimas, embora um aumento superior a essa concentração tenha inibido a produção da mesma. Já em *Trametes gibbosa* foi constatado aumento de aproximadamente 55% quando o meio de cultura foi suplementado com 10 mM de Fe^{2+} (KNEZEVIC et al., 2014).

Yang et al. (2013) encontraram resultados similares quanto ao aumento da produção de lacases por *Trametes velutina* (5930) quando adicionado ao meio de cultivo íons metálicos como Fe^{2+} . Isso se deve ao fato de que a presença de íons como Fe^{2+} e Cu^{2+} aumentam os níveis de transcrição gênica de *lac5930-1*, um gene identificado como responsável pela produção de lacases em *Trametes velutina*

(5930). Fungos expostos ao meio de cultivo com a presença de 0,02 mM Fe²⁺ obtiveram 4,5 vezes mais produção de lacase do que aqueles não expostos.

Metais pesados como Zn²⁺ também demonstraram ser capazes de aumentar a produção de lacases em *Trametes versicolor* em concentrações de 1mM (LORENZO; MOLDES; SANROMÁN, 2006). A adição desse íon no meio de cultura foi também capaz de melhorar a degradação de toxina aflatoxina B1 por duas cepas de *Pleurotus ostreatus* em comparação com o grupo controle sem a adição de sulfato de zinco. O mesmo se deu ao adicionar Mg²⁺ (DAS, et al., 2014). Em *Trametes gibbosa* certas concentrações de Zn²⁺ demonstraram efeito estimulatório na produção de lacases (KNEZEVIC et al., 2014). Entretanto para uma cepa de *Pleurotus sp.* a adição de Zn²⁺ ao meio de cultivo inibiu significativamente a produção enzimática (MANAVALAN et al., 2015).

Para um fungo do gênero *Pleurotus sp.*, o acréscimo de Mg²⁺ à cultura líquida estimulou grandemente a produção de lacases (MANAVALAN et al., 2015). Ding et al. (2014) estudaram a influência de diversos íons metálicos na produção de lacase em *Pleurotus ferulae* e observaram que a adição de 0,1 mM e 1 mM de MgSO₄ foi capaz de aumentar a síntese dessas enzimas, embora concentrações maiores de 5 mM tenham causado sua diminuição para valores inferiores à da primeira concentração. O mesmo ocorreu para ZnSO₄, cuja maior produção foi na concentração de 0,1 mM, declinando em 1 mM e inibindo completamente quando 5 mM foram adicionados. Já para FeSO₄ a maior produção ocorreu na concentração de 1 mM, diminuindo ao se adicionar mais.

O aumento da produção de lacases na presença desses metais mostra a habilidade desses íons em estimular sua formação, provavelmente devido a uma resposta de defesa a estresses ambientais em que ocorre a síntese de pigmentos para evitar a absorção desses metais como xenobióticos (GALHAUP; HALTRICH, 2001). Entretanto, pode-se notar que cepas distintas mesmo que dentro do mesmo gênero, são capazes de gerar respostas diferentes quanto à presença de metais no meio de cultivo, onde alguns fungos têm sua produção ampliada enquanto outros sofrem com a diminuição ou completa inibição.

Lacases têm sido estudadas para o tratamento de efluentes industriais, normalmente ricos em íons metálicos e para tal se faz necessário encontrar cepas capazes de agregar esses poluentes para otimizar a produção enzimática (DING et al., 2014). No presente trabalho, ambas as cepas estudadas foram capazes de

resistir e produzir maiores quantidades de lacases quando comparadas com fungos cultivados em meio semi-sólido sem a presença desses íons, revelando seu potencial para tratamentos biotecnológicos.

Resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana têm se mostrado excelentes indutores na produção de enzimas ligninolíticas como as lacases, principalmente devido à lignina, rica em carbono (LIU et al., 2017, RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005; SÁNCHEZ, 2009), além do fato de que esses resíduos são ricos em açúcares e facilmente metabolizados pelos fungos (RODRÍGUEZ COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

Para *Pleurotus ostreatus* foi observado que uma quantidade de 2 g de bagaço de cana, em comparação com 1 g e 3 g, se mostrou mais propícia para a produção de lacases, enquanto que para *Trametes* sp. a presença de 1 g foi a melhor condição para a produção enzimática, tendo a atividade diminuída conforme o aumento do resíduo no meio de cultivo. Matei (2018) também observou aumento na produção de lacase para *Trametes* sp. em meios de cultivo com a presença de cana. É possível que o aumento na concentração de bagaço de cana-de-açúcar cause depleção no oxigênio dissolvido no meio levando à diminuição da produção enzimática, afetando mais intensamente *Trametes* sp. do que *Pleurotus ostreatus* (RODRÍGUEZ COUTO; DOMÍNGUEZ; SANROMÁN, 2002).

Só no Brasil foram gerados cerca de 161 milhões de toneladas de bagaço de cana provenientes da indústria de álcool e açúcar entre a safra de 2014 e 2015, onde parte desses resíduos foram aproveitados para a produção de etanol de segunda geração e eletricidade dentro das próprias unidades de produção de cana. Entretanto, o constante aumento agroindustrial vem criando uma quantidade cada vez maior desses resíduos (CONAB, 2017; SÁNCHEZ, 2009). Assim, encontrar meios alternativos para o uso do bagaço-de-cana, como meio de cultivo (substrato e suporte) para a produção de enzimas fúngicas em grande escala pode apresentar uma alternativa ecologicamente adequada para lidar com esses subprodutos secundários.

5.2 Imobilização

A formação de *cross-linked enzyme aggregates* inclui dois passos distintos. O primeiro envolve a agregação física da enzima por um precipitante e então a criação de ligações químicas entre as enzimas através de ligações cruzadas. Geralmente a precipitação de proteínas das soluções pode ser feita utilizando solventes orgânicos, sais inorgânicos ou polímeros não iônicos que ao serem adicionados nas soluções induzem a agregação das moléculas enzimáticas através da mudança do estado hidratado das moléculas ou pela alteração da constante eletrostática da solução (CUI; JIA, 2013).

No presente trabalho sulfato de amônio foi utilizado como representante de sais inorgânicos visto que é mais comumente utilizado na precipitação de lacases em CLEAs e glutaraldeído foi utilizado como agente aglutinador (CABANA, et al., 2009; HASSANI; BA; CABANA, 2013; MATIJOSYTÈ et al., 2010; VRSANSKÁ et al., 2018; YANG et al., 2017).

A necessidade de se imobilizar enzimas fúngicas para tratamentos biotecnológicos vêm das desvantagens em utilizar enzimas livres em processos industriais e nas vantagens das proteínas imobilizadas possuírem baixo custo de reaproveitamento, aumento da estabilidade e fácil separação dos imobilizados do produto, diminuindo a contaminação proteica (CAO, 2005; SHELDON, 2007). Assim, lacases de *Pleurotus ostreatus* foram imobilizadas por *cross-linked enzyme aggregates* para avaliar a porcentagem de retenção de atividade nos CLEAs. O extrato bruto foi diluído em tampão acetato de sódio (50mM) pH 5,0 até a concentração de 500 U/L e posteriormente as enzimas foram imobilizadas pela adição de 55% p/v de sulfato de amônio e glutaraldeído a 25% e a solução foi deixada à 4°C durante a noite. Subsequentemente os CLEAs foram centrifugados e lavados até que não houvesse atividade no sobrenadante. Em seguida a atividade foi medida pela oxidação de ABTS (Figura 7).

Figura 7. Lacase imobilizada por CLEAs.



***Seta indica oxidação do ABTS onde se encontram os CLEAs sólidos.**

Após imobilização notou-se retenção de 16,42% de atividade nos CLEAs, enquanto 10,47% de atividade foi perdida durante as lavagens, indicando que 73,11% da atividade enzimática foi provavelmente desnaturada, não imobilizada durante o processo ou houve mudança conformacional das enzimas (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade da lacase de *Pleurotus ostreatus* observada após imobilização de 500 U/L.

Lacase presente em:	Atividade (U/L)
CLEAs	82,31 ± 7,84
Lavagens	52,38 ± 6,37

5.3 Purificação do extrato bruto

O extrato enzimático de ambos os fungos foi centrifugado a 3.000 g por 5 minutos a 4°C para sua clarificação. Em seguida uma solução de inibidores de

proteases foi adicionada ao extrato e a concentração de proteínas totais e atividade enzimática foi medida, sucedendo-se posteriores etapas de purificação de acordo com as tabelas 3 e 4.

Para *Trametes* sp. foi observado acréscimo no fator de purificação enzimática em todas as etapas, sendo que o maior aumento foi constatado entre as etapas de diálise e de passagem do extrato pela coluna Sephadex G-100, resultando num fator de purificação final de 7,77 (Tabela 4).

Tabela 4. Etapas da purificação do extrato de *Trametes* sp.

N°	Etapas da purificação	Volume total (mL)	Atividade enzimática (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
1	Extrato Bruto	100	5354,63	85,33	62,75	1
2	Precipitação por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	60	12539,11	197,13	63,6	1,01
3	Diálise	16	13278,37	127,54	104,11	1,66
4	Sephadex G-100	5	1844,26	3,78	487,9	7,77

As lacases de *Pleurotus ostreatus* também obtiveram aumento no fator de purificação entre todas as etapas, principalmente entre a diálise e coluna Sephadex G-100 em comparação com o extrato bruto, chegando a 6,3 vezes mais (Tabela 5).

Tabela 5. Etapas da purificação do extrato de *Pleurotus ostreatus*.

Nº	Etapas da purificação	Volume total (mL)	Atividade enzimática (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
1	Extrato Bruto	100	9563,76	113,92	83,95	1
2	Precipitação por (NH ₄) ₂ SO ₄	60	28429,87	331,86	85,66	1,02
3	Diálise	16	26458,51	243,04	108,86	1,3
4	Sephadex G-100	5	3906,64	7,37	530,07	6,3

A remoção completa de contaminantes foi o objetivo primário da purificação, através de uma variedade de técnicas, incluindo precipitação por sulfato de amônio e filtração em gel. Essas técnicas servem para a remoção de pigmentos e outras proteínas contidas na amostra, pois esses contaminantes podem interferir com as etapas subsequentes de purificação e com os ensaios de atividade e análise cinética das enzimas. A pureza de uma extração enzimática pode então ser confirmada através da presença de uma banda única em um gel de eletroforese (DAKO et al., 2012).

Para a remoção desses contaminantes foi realizado centrifugação do extrato bruto para sua clarificação, seguindo para a etapa de concentração enzimática através da precipitação por sulfato de amônio, um dos métodos mais comumente utilizados para purificação de lacases e outras enzimas por preservar sua atividade biológica (ASGHER, IQBAL; ASAD, 2012; OTHMAN et al., 2014; WARD; SWIATEK, 2009). As enzimas são completamente precipitadas pela adição do sal através da remoção da água das áreas hidrofóbicas da superfície da proteína, tornando-as insolúveis (DAKO et al., 2012).

A razão para as altas taxas de retenção de atividade em grandes concentrações de precipitante se deve ao aumento da agregação ao invés de desnaturação devido às forças exercidas na estrutura terciária da enzima durante a precipitação (SCHOEVAART et al., 2004). Quando o processo de precipitação é

lento a enzima tende a desnaturar, enquanto que com o aumento da velocidade de precipitação as moléculas enzimáticas são capazes de se unir a moléculas vizinhas em tempo e as chances da proteína manter sua estrutura terciária são grandes. Assim altas concentrações de precipitantes resultam em agregação rápida em que o intervalo de tempo é pequeno e as chances de desnaturação são menores (TALEKAR et al., 2013). As lacases são então recuperadas pela centrifugação e ressuspensão em quantidade mínima de tampão, estando então concentradas.

O sal residual da etapa de precipitação foi removido através da diálise, visto que pode interferir com os ensaios posteriores de atividade e etapas de purificação. Um dos problemas encontrados no uso da diálise é que a proteína pode precipitar nas paredes do tubo de diálise, impedindo a passagem de partículas através da membrana (DAKO et al., 2012). O tubo usado em questão possuía poros com tamanho de 3,5 kDa, enquanto as lacases de *Pleurotus ostreatus* variam de 43,7 kDa até 67 kDa (ASGHER; KAMAL; IQBAL, 2012; PAKHADNIA; MALINOUSKI; LAPKO, 2009; SANNIA et al., 1986; TLECUITL-BERISTAIN et al., 2008) e as de *Trametes* sp. variam de 57 kDa a 74 kDa (DAASSI et al., 2013; XIAO et al., 2003; XIAO et al., 2004). Isso garantiu que não houvesse perda de atividade enzimática nesse processo devido à passagem de moléculas pela membrana.

Após a etapa de dessalinização através da diálise, as amostras foram passadas em coluna Sephadex G-100 que também atua na remoção de sais, além de estabilizar o pH da amostra. Em seguida, ambas as amostras foram coletadas com alta atividade específica.

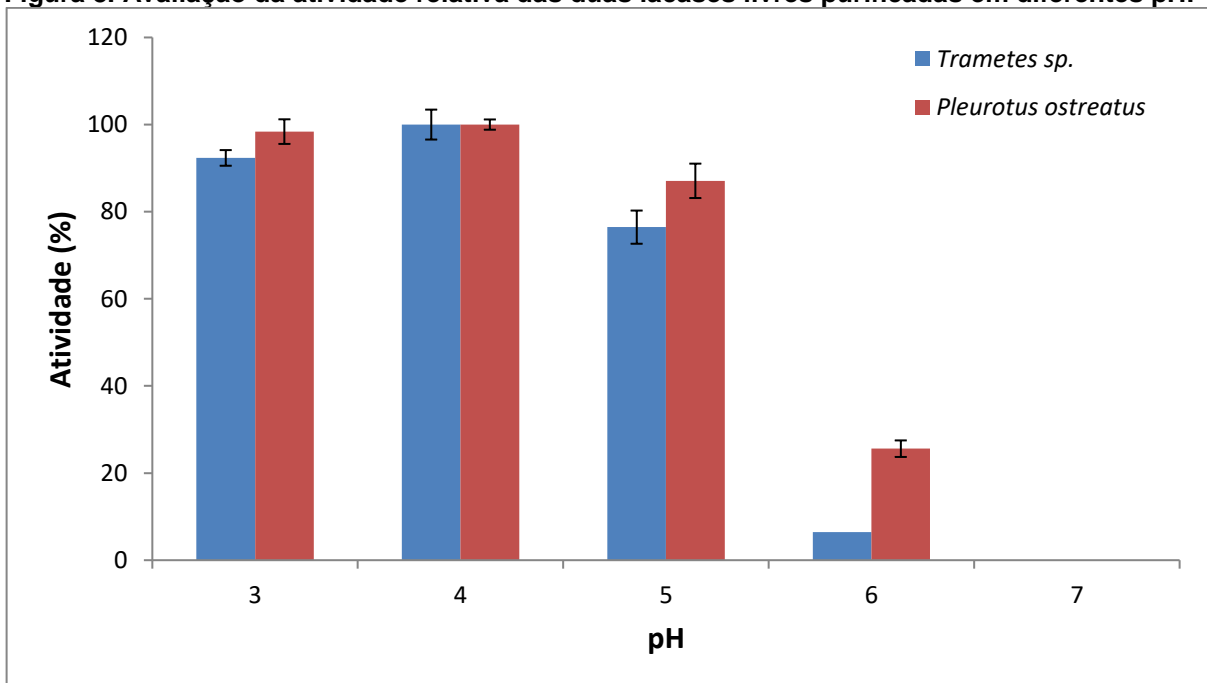
Asgher, Iqbal, Irshad (2012) utilizaram técnica similar e obtiveram um fator de purificação para uma cepa de *Trametes versicolor* de 2,17 utilizando 50% de saturação de sulfato de amônio. Para o fungo *Pleurotus ostreatus*, foi observado um fator de purificação de 4,2 após precipitação por sulfato de amônio (50-80%) e passagem por coluna de Sephadex G-100 (ASGHER; KAMAL; IQBAL, 2012). Já para outra cepa de *P. ostreatus* o fator de purificação foi ainda maior, chegando a 11,8 após passagem por uma coluna de DEAE (MANSUR et al., 2003).

5.4 Propriedades das enzimas purificadas e CLEAs

5.4.1 ANÁLISE DE MELHOR pH

A avaliação da influência dos valores de pH na atividade enzimática das lacases purificadas e imobilizadas de *Trametes sp.* e *Pleurotus ostreatus* foi verificada em tampão, na faixa de 3,0 a 7,0 utilizando como substrato ABTS. Foi observado que o pH possui grande influência na taxa de oxidação e consequente atividade enzimática das lacases. Ambas lacases livres mostraram ter maior atividade em pH ácido e queda abrupta de atividade em faixas mais básicas, sendo finalmente inativada ao atingir pH 7,0 (Figura 8). A diminuição da atividade em pH mais alto pode ser devido a mudança na forma iônica do sítio ativo da enzima e também às variações da conformação da estrutura tridimensional da proteína (MOHIDEM; MAT, 2009).

Figura 8. Avaliação da atividade relativa das duas lacases livres purificadas em diferentes pH.

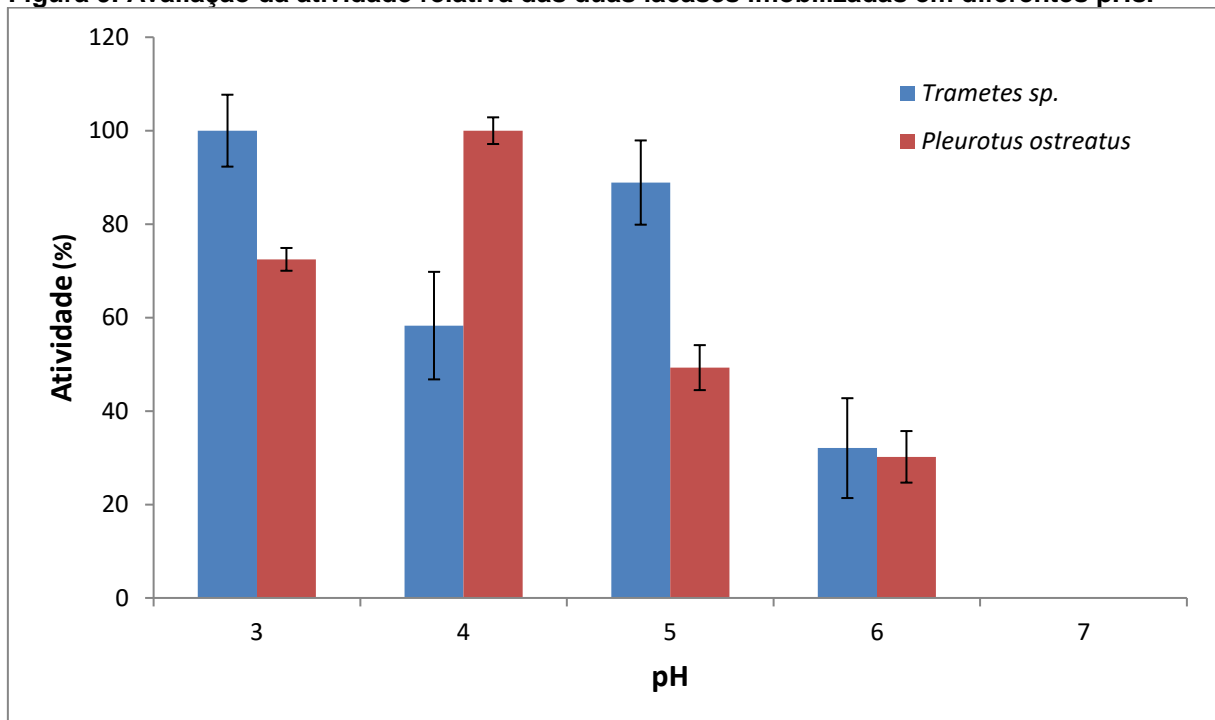


Enquanto *Pleurotus ostreatus* teve uma queda de apenas 13% de atividade enzimática de seu pH ótimo (4,0) para o pH 5,0, esse número aumentou para 70%

quando passou do pH 5,0 para o 6,0, sendo cerca de 75% menos atividade se comparado à atividade em seu pH ótimo. Para a lacase de *Trametes* sp. a mudança foi ainda mais notável. Do pH considerado ideal para o pH 5,0, a atividade diminuiu em 24%, enquanto que do pH 5,0 para o 6,0 a redução foi de 92%, sendo 94% menos atividade quando comparado com aquela em seu pH ótimo, demonstrando a fragilidade dessas enzimas à pH mais básicos.

Para as enzimas imobilizadas em CLEAs houve maior diferenciação da faixa de melhor pH. A lacase de *P. ostreatus* demonstrou atividade catalítica maior em pH 4,0, enquanto que a de *Trametes* sp. teve preferência pelos pHs 3,0 e 5,0. Embora a tendência das duas enzimas tenha sido diminuir sua atividade em pH 6,0, ela ainda foi cerca de 25% maior para a lacase de *Trametes* sp. imobilizada em comparação com a livre e 5% para a de *P. ostreatus* (Figura 9).

Figura 9. Avaliação da atividade relativa das duas lacases imobilizadas em diferentes pHs.



O pH ótimo para a atividade de lacases varia dependendo do substrato utilizado, com algumas lacases fúngicas apresentando desempenho superior em meio ácido com a utilização de ABTS como substrato (LIU et al., 2019; HALABURGI et al., 2011). Durante a oxidação de substratos doadores de elétrons como o ABTS, a

atividade da lacase tende a diminuir conforme o pH aumenta. Isso ocorre porque os prótons não estão envolvidos na oxidação deste substrato e a influência do pH no potencial redox destes compostos é mínima. Nesse caso, a diminuição da atividade enzimática está associada à ligação do íon hidróxido com os sítios T2/T3 da enzima (MOROZOVA et al., 2007).

More et al. (2011) encontraram faixas similares de pH ótimo para as lacases livre de *Pleurotus sp.* utilizando ABTS, cuja atividade se mostrou mais proeminente entre os pH 3,0 e 5,0, sendo seu pico em 4,5. Para *Pleurotus ferulae* a atividade enzimática foi maior em meio ácido, com seu auge em pH 3,0 (DING et al., 2014). Atalla et al. (2013) observaram que para *Trematosphaeria mangrovei*, um fungo marinho, o pH ótimo para a atividade enzimática foi a mesma encontrada para ambas as lacases livres estudadas (4,0), tendo sua diminuição conforme o aumento do pH, tornando-se também inativa ao atingir pH 7,0.

Para *Trametes versicolor* a atividade enzimática livre aumentou conforme a elevação do pH, tendo seu pico em 5,0 e ainda estando funcional em pH 8,0, embora em valores superiores a enzima tenha sido desativada (ASGHER, IQBAL; ASAD, 2012). Minussi et al. (2007) também reportaram duas isoenzimas (L1 e L2) de *Trametes versicolor* CCT 4521 com atividades em pH ácido, uma tendo seu pico de atividade em pH 4,0 e a outra em pH 5,0, respectivamente. Othman et al. (2014) reportaram divergentes picos de atividades enzimática para *Pleurotus ostreatus* ARC280 em diferentes pH para uma mesma lacase utilizando três substratos distintos. Para ABTS o pH ótimo foi 3,0, enquanto que para 2,6-dimetoxifenol (DMP) e siringaldazina os melhores resultados foram observados em pH 4,5 e 6,0, respectivamente.

Geralmente o crescimento fúngico é maior em pH ácidos, entretanto para *Pleurotus ostreatus* IBL-06 foi observado que o melhor faixa para a oxidação do ABTS foi em pH 6,0, considerado um intervalo mais básico (ASGHER; KAMAL; IQBAL, 2012), mas segundo Fukushima; Kirk, (1995), é frequente ocorrer diferenças no pH ótimo entre isoenzimas de lacases produzidas pelo mesmo organismo.

Enquanto a lacase de *P. ostreatus* estudada teve maior atividade em pH em 4,0 tanto para livre quando para a imobilizada, seu perfil geral foi significativamente diferente e sua atividade em pH 6,0 foi maior para os CLEAs do que para a enzima livre. Já a enzima de *Trametes sp.* imobilizada não desempenhou a mesma

atividade em pH 4,0 quando comparada com a livre, havendo mudança em seu perfil geral.

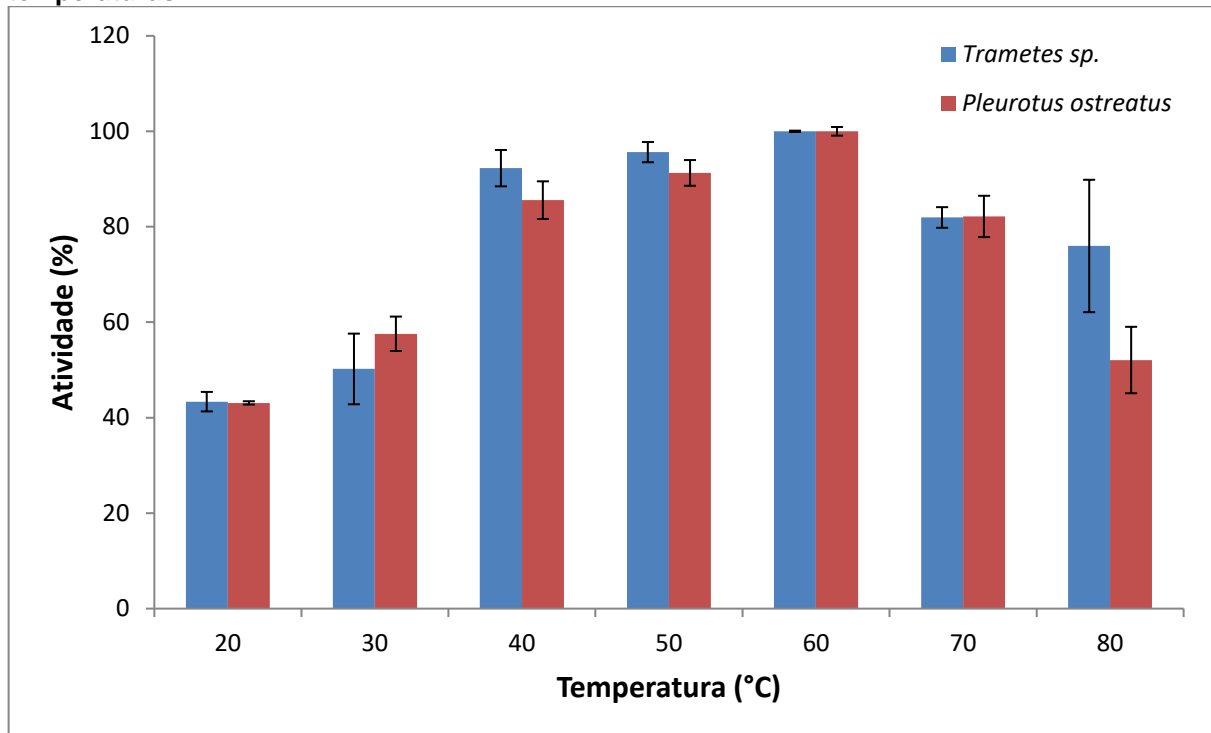
Ngueyn, Seow, Yang (2017) observaram que lacases de *T. versicolor* livres e imobilizadas em CLEAs ocas obtiveram o mesmo pH ótimo (4,0), entretanto o perfil das duas enzimas foi diferente, sendo que a imobilizada obteve maior resistência à desnaturação em pHs mais básicos em comparação com a livre, similar aos resultados encontrado nesse estudo. É provável que essa estabilidade se deva ao cross-linking covalente interno entre os agregados enzimáticos (ZHAO et al., 2008).

Dogan et al. (2015) também observou que a lacase imobilizada e livre de *Trametes versicolor* obteve o mesmo pH ótimo (5,0), embora a enzima imobilizada tenha tido maior plasticidade durante as mudanças de pH. A lacase livre de *Komagataeibacter xylinus* demonstrou maior atividade em pH 3,5, enquanto as imobilizadas em diferentes suportes tiveram melhor desempenho em pH 3,0 e 2,5. Essa mudança de melhor pH provavelmente se deve a maior densidade de carga dos suportes que pode mudar o microambiente da enzima (LI et al., 2017). Assim, o método de imobilização parece ter grande influência no desempenho da atividade das proteínas.

5.4.2 TEMPERATURA ÓTIMA

A influência da temperatura na atividade das duas lacases livres purificadas foi avaliada utilizando um intervalo de 20°C a 80°C em banho-maria, pela oxidação do ABTS. Observou-se um aumento constante da atividade na faixa de 20°C a 60°C, sendo que ambas as enzimas expressaram atividade máxima a 60°C quando então começam a perder a capacidade catalítica acima dessa temperatura (Figura 10).

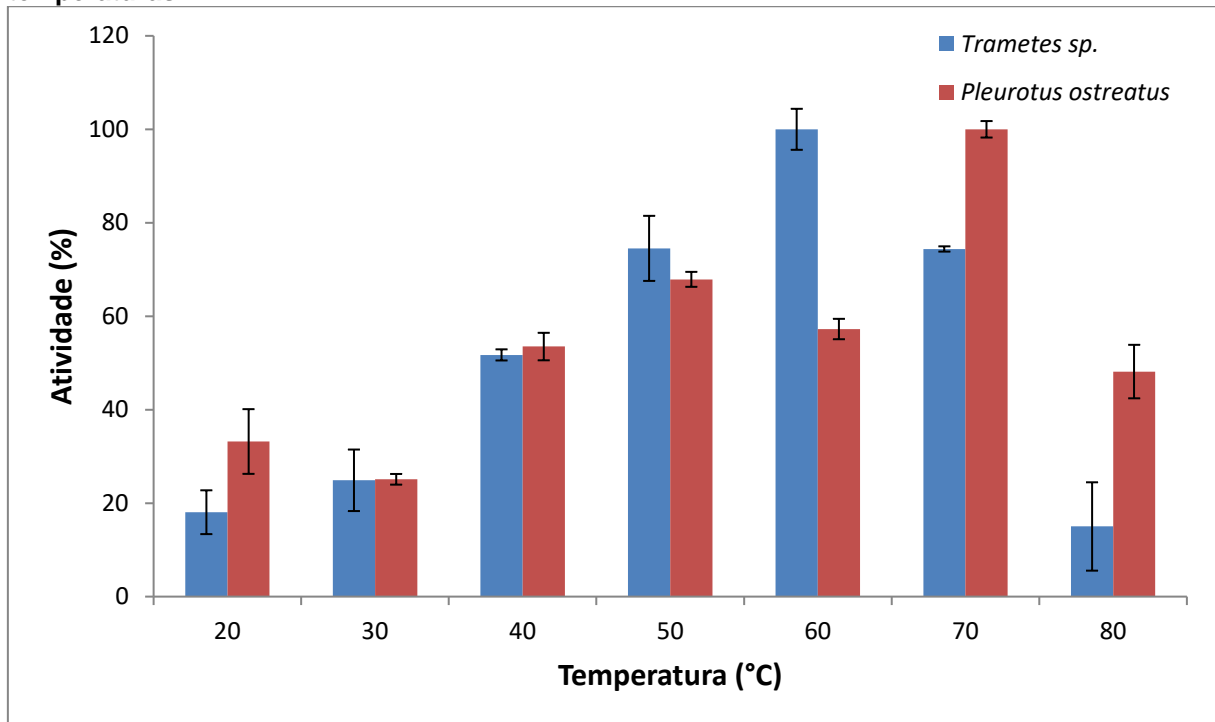
Figura 10. Avaliação da atividade relativa das duas lacases livres purificadas em diferentes temperaturas.



À temperatura de 40°C as lacases livres de *P. ostreatus* e de *Trametes sp.* mantiveram cerca de 86% e 92% de sua atividade, respectivamente, quando comparadas a sua temperatura ótima a 60°C. Para 50°C a diferença diminuiu, com 91% de atividade mantida para a lacase de *P. ostreatus* e 96% para a de *Trametes sp.* Em baixas temperaturas houve perda de mais da metade do potencial catalítico de ambas as lacases estudadas, demonstrando que temperaturas mais elevadas propiciam uma melhor condição para essas enzimas.

Para as enzimas imobilizadas em CLEAs houve diferenciação da faixa de melhor temperatura. A lacase de *P. ostreatus* demonstrou atividade catalítica maior em 70°C, enquanto que a de *Trametes sp.* manteve a preferência por 60°C. Notou-se aumento constante da atividade até a temperatura ideal e posterior queda á partir desse ponto. A diferença de atividade dos CLEAs de *P. ostreatus* da sua melhor temperatura para 60°C e 80°C foi de 43% e 52%, respectivamente. Já para *Trametes sp.* foi de apenas 26% para 50°C e 70°C (Figura 11).

Figura 11. Avaliação da atividade relativa das duas lacases imobilizadas em diferentes temperaturas.



As lacases tendem a ter intervalos de atividade e reação ótimos entre 50°C e 70°C (BALDRIAN, 2006), mas podem variar de 25°C a 80°C, dependendo do fungo a produzi-las (STRONG; CLAUS, 2011). Para a degradação de ABTS a enzima livre de *Bacillus licheniformis* desempenhou maior atividade oxidativa na temperatura de 85°C (KOSCHORRECK et al., 2008). Tinoco, Pickard, Vazquez-Duhalt (2001) encontraram temperaturas ideais para a obtenção de máxima atividade para seis cepas estudadas de *Pleurotus ostreatus* (enzima livre), entre 30°C e 40°C e observaram que suas atividades caíram drasticamente quando as temperaturas subiram até 60°C. Outras duas cepas de *P. ostreatus* demonstraram melhores resultados em maiores temperaturas, tendo seu auge de atividade a 45°C e 50°C (ASGHER; KAMAL; IQBAL, 2012; OTHMAN et al., 2014), enquanto que para outra espécie do mesmo gênero, *Pleurotus sp.*, a temperatura ótima foi de 65°C (MORE et al., 2011), similar ao ótimo das duas lacases estudadas.

Manavalan et al. (2013) observaram que para o fungo da podridão branca, *Ganoderma lucidum* a melhor temperatura para a atividade catalítica livre foi de 55°C, enquanto que para duas cepas de *Trametes versicolor* a temperatura ideal foi

de 40°C e 45°C (ASGHER, IQBAL; ASAD, 2012; STOILOVA; KRASTANOV; STANCHEV, 2010).

Kumar, Cabana (2016) observaram que a lacase imobilizada de *Trametes versicolor* em MAC-CLEAs teve mudança na temperatura ideal de 40°C para 50°C quando comparada com a livre, semelhante à enzima de *P. ostreatus* estudada. Enquanto a melhor temperatura para a lacase livre de *T. versicolor* era de 20°C e 30°C, quando imobilizada em CLEAs ociosas a enzima, além de manter 100% de atividade a 20 e 30°C, também o fez a 40°C (NGUEYN; SEOW; YANG, 2017).

Li et al. (2017) observaram diminuição de 5°C na temperatura ideal depois que as lacases foram imobilizadas em suporte, de 55°C para 50°C, enquanto o oposto aconteceu para Dogan et al. (2015) em que após a imobilização a temperatura na qual houve maior atividade catalítica passou de 50°C na livre para 55°C na imobilizada. Asgher, Kamal, Iqbal (2012) observaram aumento de 10°C na preferência de temperatura das lacases imobilizadas em comparação com a livre, de 45°C para 55°C.

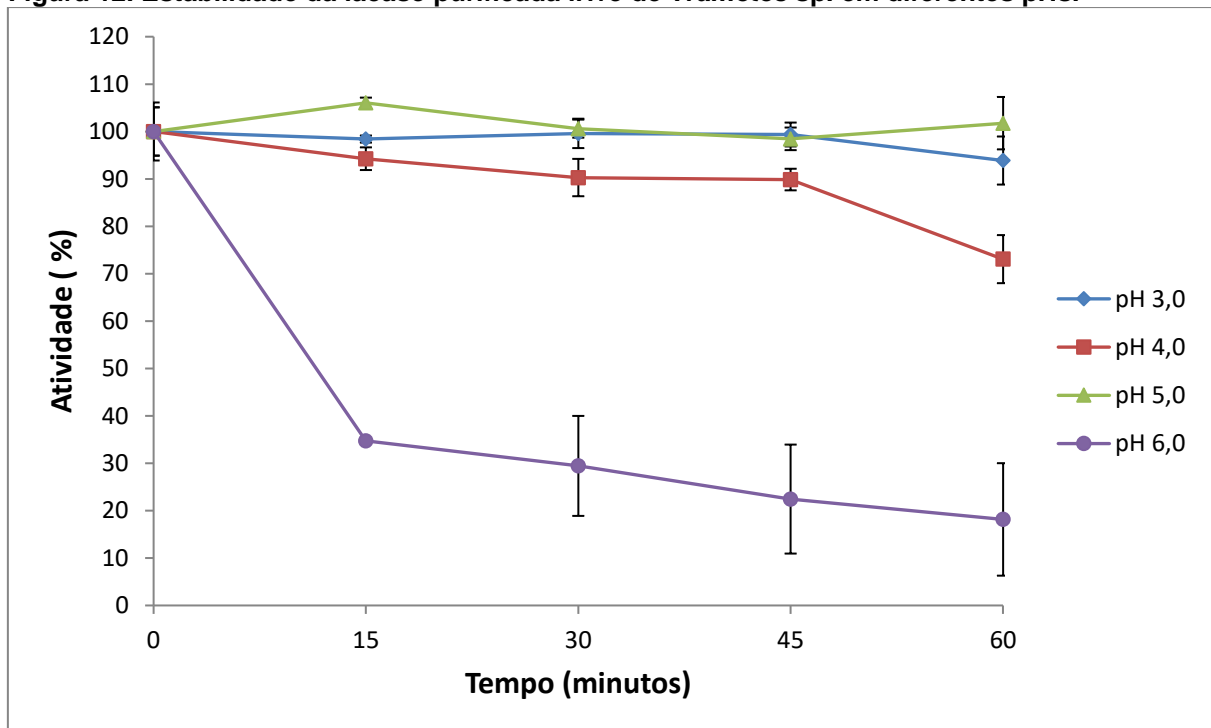
A capacidade de apresentar atividade em altas temperaturas torna essas duas enzimas interessantes no contexto biotecnológico, pois a maioria dos efluentes industriais se encontra em altas temperaturas, onde ocorre supressão da atividade enzimática provavelmente devido à perda de íons de cobre na estrutura da lacase (PALONEN et al., 2003). O aumento da atividade em temperaturas maiores para os CLEAs de *P. ostreatus* está provavelmente relacionado com interações quelantes de multipontos que reduzem a desnaturação da enzima e aumentam a atividade catalítica através da conformação ótima para se ligar ao seu substrato (KUMAR; CABANA, 2016; KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014).

5.4.3 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES pHs

A avaliação da influência do pH na estabilidade enzimática das lacases purificadas livres e CLEAs de *Trametes* sp e *Pleurotus ostreatus* foi verificada em tampão acetato de sódio (50 mM), na faixa de 3,0 a 6,0 em intervalos de 15 minutos durante uma hora. As enzimas foram incubadas durante o tempo necessário e depois sua atividade foi medida na temperatura ideal. Observou-se que ambas as

lacases livres se mostraram relativamente estáveis em pH 3,0, 4,0 e 5,0 durante uma hora, enquanto que para o pH 6,0 ambas as enzimas sofreram com queda abrupta de atividade no intervalo de 0 a 15 minutos (Figuras 12 e 14). Já as enzimas imobilizadas em CLEAs demonstraram desempenho superior com menor variação e estabilidade por 1 hora mesmo em pH 6,0 (Figuras 13 e 15).

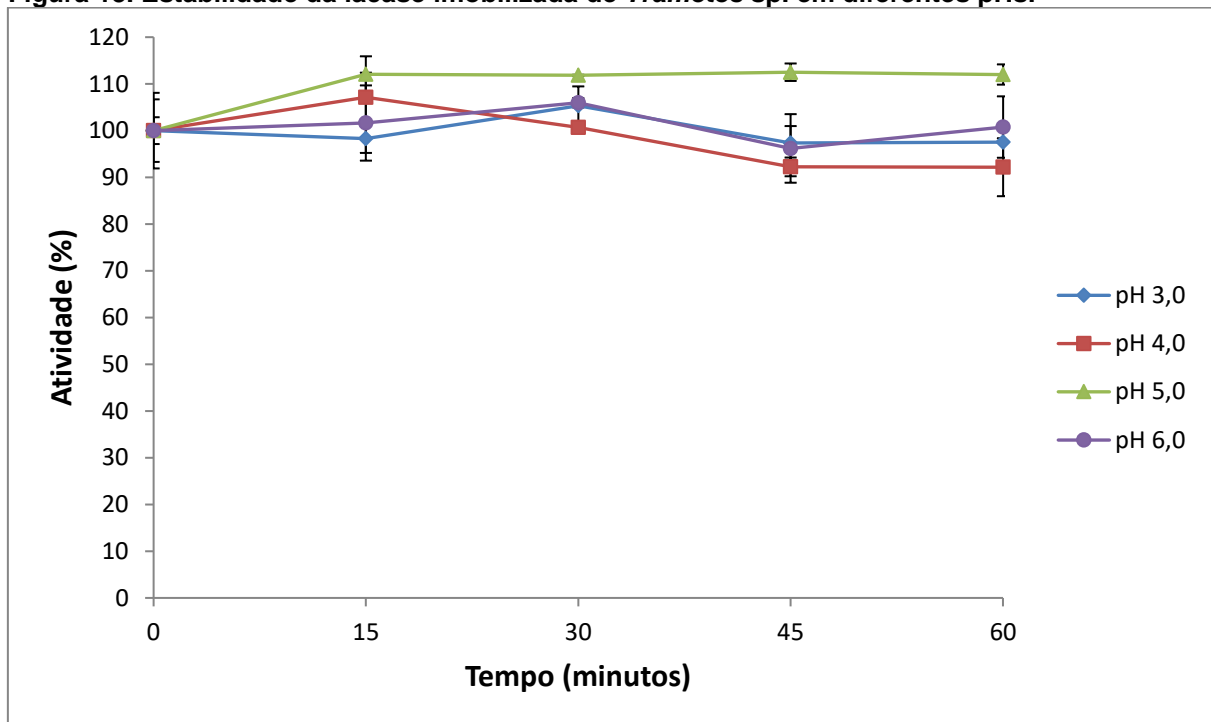
Figura 12. Estabilidade da lacase purificada livre de *Trametes* sp. em diferentes pHs.



Para a enzima livre de *Trametes* sp. a atividade residual sofreu variação de 0,4% a 6,2% em pH 3,0, enquanto que para pH 4,0 a atividade diminuiu 5,8% do tempo 0 para o tempo 15, 4% do tempo 15 para o 30, 0,5% do tempo 30 ao 45 e quase 17% do tempo 45 ao 60, sendo uma diminuição de 27% de atividade no intervalo de uma hora. Em pH 5,0 a lacase se mostrou mais estável ao longo do tempo, enquanto que em pH 6,0 a enzima perdeu quase 82% de sua atividade inicial do final de uma hora, reiterando sua fragilidade em pH mais básico.

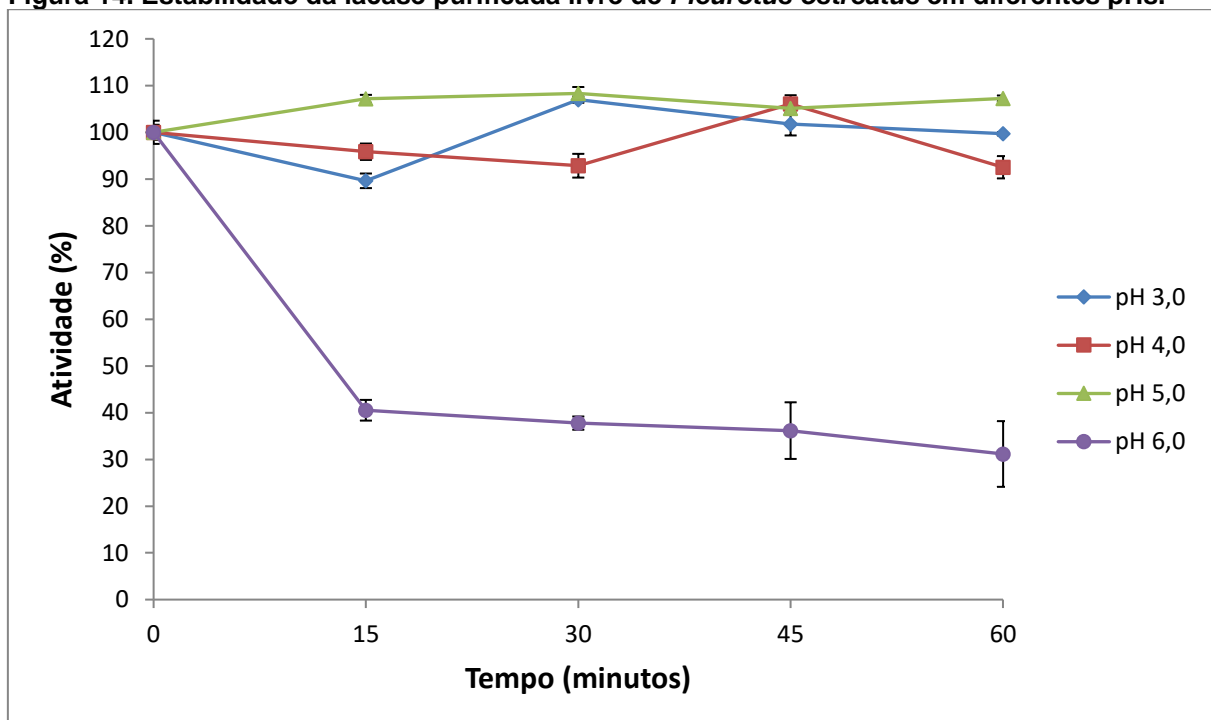
Para os CLEAs de *Trametes* sp. a variação de atividade ao longo de uma hora nos diferentes pHs foi inferior a 8%, mostrando grande estabilidade mesmo em pH 6,0.

Figura 13. Estabilidade da lacase imobilizada de *Trametes sp.* em diferentes pHs.



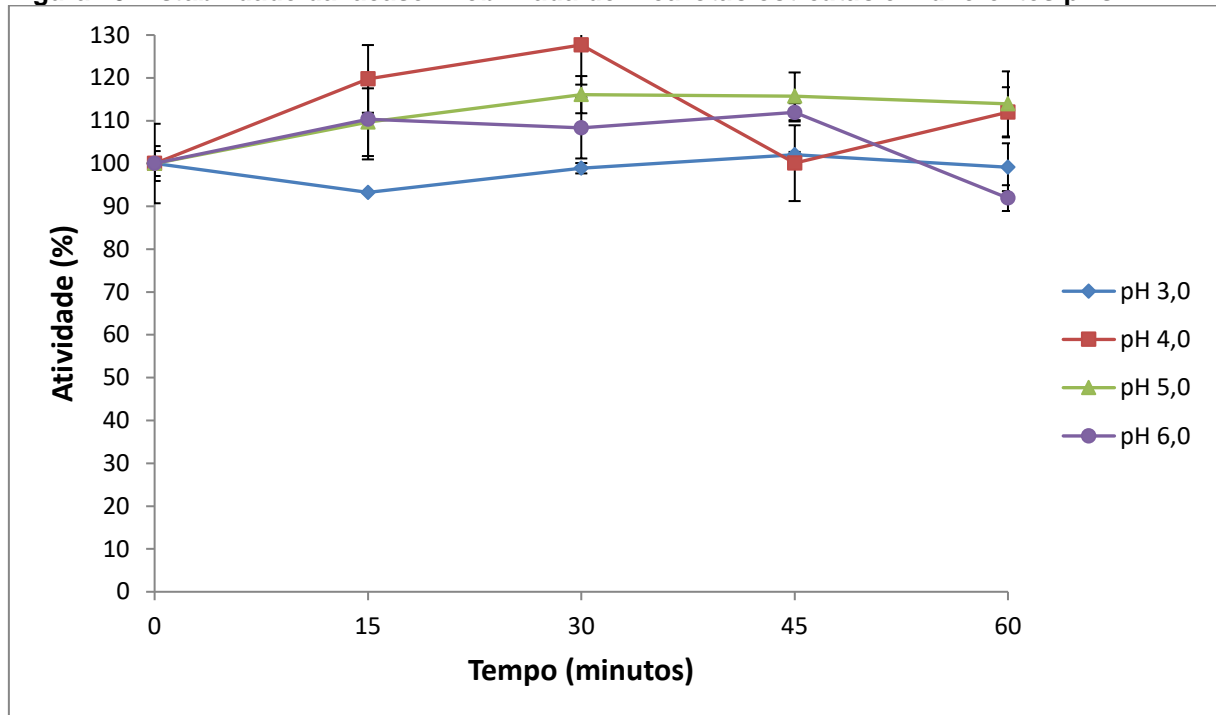
A lacase livre de *P. ostreatus* também se mostrou mais estável em pH 5,0 e com perda de 69% de atividade no intervalo de uma hora para pH 6,0. Tanto para pH 3,0 e 4,0 a variação da atividade residual não ultrapassou 10% da inicial.

Figura 14. Estabilidade da lacase purificada livre de *Pleurotus ostreatus* em diferentes pHs.



Já a enzima imobilizada em CLEAs possui perfil semelhante à de *Trametes* sp., mantendo-se estável ao longo de uma hora mesmo em pH menos ácido.

Figura 15. Estabilidade da lacase imobilizada de *Pleurotus ostreatus* em diferentes pHs.



Lacases fúngicas são normalmente estáveis em pH ácido, embora sua estabilidade varie consideravelmente dependendo da fonte da enzima (BALDRIAN, 2006). Kumar et al. (2016) observaram lacases livres similares às estudadas em *Aspergillus flavus*, com estabilidade em pH 4,0 e máximo equilíbrio em pH 5,0 embora também retivesse bom desempenho ao longo de uma hora em pH 6,0. Para a lacase de *P. ferulae* a estabilidade foi em pH 4,0, retendo cerca de 80% de sua atividade na primeira hora (DING et al., 2014) e para *Trametes hirsuta* MTCC-1171 o maior equilíbrio foi encontrado em pH 4,5 (CHAURASIA; YADAV; YADAVA, 2014). Em contrapartida, Othman et al. (2014) reportaram que a lacase de *P. ostreatus* ARC280 é mais estável em pH alcalino, com aumento crescente na manutenção de sua atividade conforme o aumento do pH, chegando a manter 100% de atividade em pH 10,0 mesmo após cinco horas de incubação, enquanto que em pH 3,0 apenas 37,42% da atividade foi retida nesse intervalo de tempo.

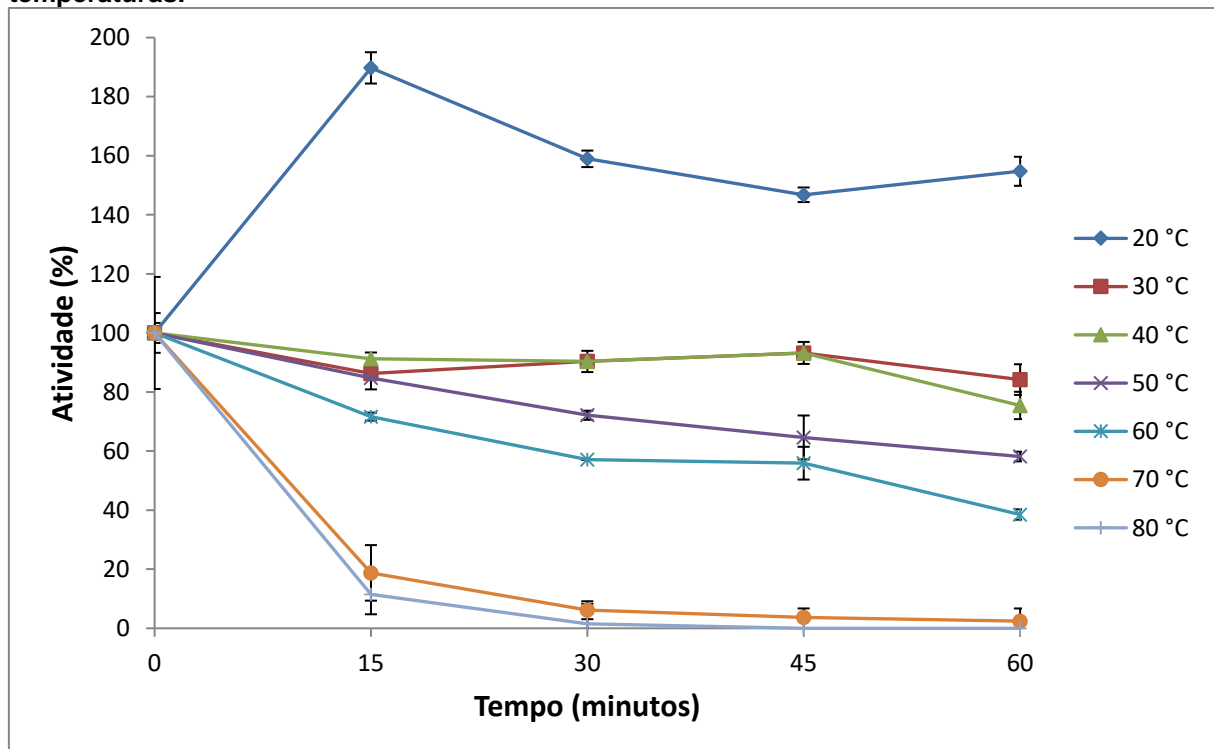
A diferença de estabilidade entre as lacases livres e imobilizadas demonstram que a enzima tornou-se menos sensível à desnaturação por longa exposição a diferentes pHs devido ao processo de imobilização, provavelmente por conta da diminuição da interferência no grupo amino em resultado a conformação adotada na formação dos CLEAs (DOGAN et al., 2015).

5.4.4 ESTABILIDADE ENZIMÁTICA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

A avaliação da influência da temperatura na variação da atividade enzimática das lacases purificadas livres e imobilizadas de *Trametes sp.* e *Pleurotus ostreatus* foi avaliada entre 20°C e 80°C em intervalos de 15 minutos durante uma hora no melhor pH. As enzimas foram incubadas em banho-maria durante o tempo necessário e depois sua atividade medida pela oxidação de ABTS.

As lacases livres de *Trametes sp.* mostraram ser relativamente estáveis na temperatura de 20 °C a 50°C, assim como a de *P. ostreatus* e ambas as enzimas desnaturaram rapidamente em temperaturas superiores (Figuras 16 e 18).

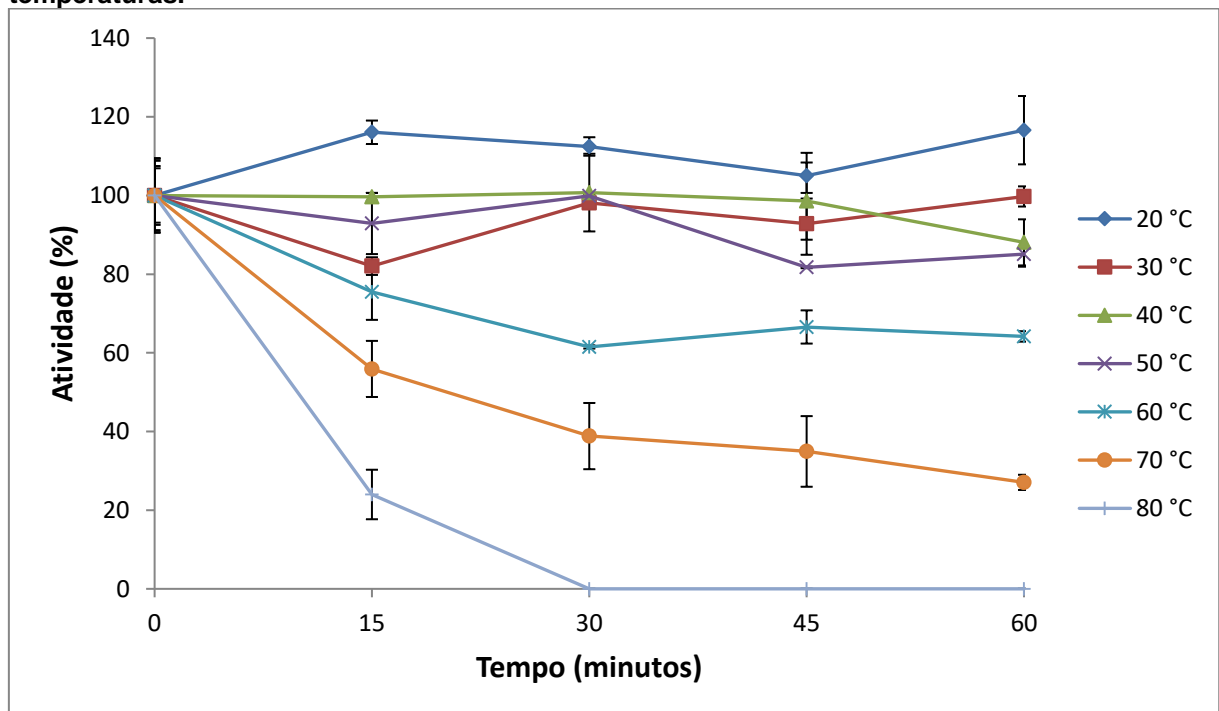
Figura 16. Termoestabilidade da lacase purificada livre de *Trametes sp.* em diferentes temperaturas.



Já as enzimas imobilizadas em CLEAs de *Trametes* sp. e *P. ostreatus* demonstraram desempenho superior com menor variação e relativa estabilidade por 1 hora até 60°C (Figuras 17 e 19).

A lacase livre de *Trametes* sp. se mostrou estável a 30°C e 40°C após uma hora, retendo 84,2% e 75,4%, respectivamente, de sua atividade. Após uma hora de incubação a 50°C a enzima demonstrou 58,1% de atividade remanescente, diminuindo para 38,5% a 60°C e apenas 2,4% a 70°C, desnaturando com rapidez em altas temperaturas. A 20°C houve um aumento na atividade nos 15 primeiros minutos e posterior manutenção no período seguinte. Quando imobilizada em CLEAs a variação da estabilidade manteve-se menor que 20% até 50°C, com 85% de atividade remanescente depois de uma hora a 50°C. A 60°C a enzima ainda desempenhava 64% da sua atividade catalítica, 25,5% a mais do que quando comparada com a livre ao final de 1 hora.

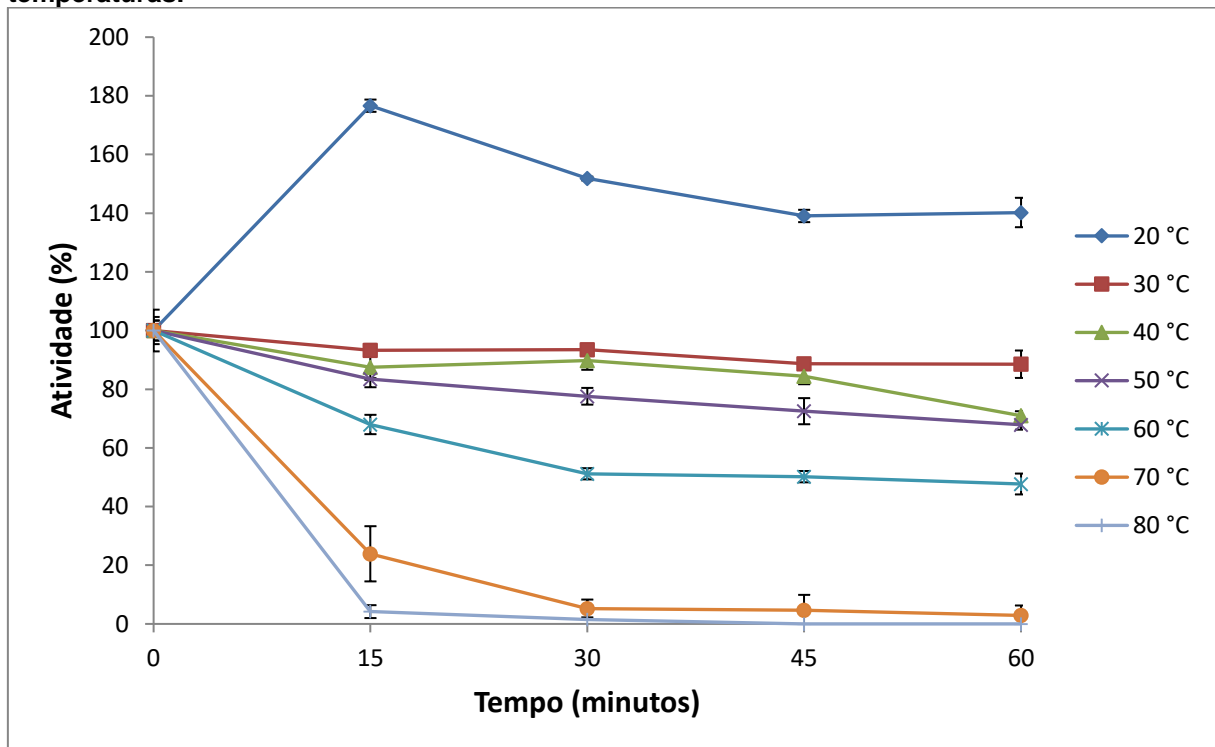
Figura 17. Termoestabilidade da lacase imobilizada de *Trametes* sp. em diferentes temperaturas.



Para *P. ostreatus* a lacase livre reteve 88,5%, 70,9%, 67,8% de atividade no final de uma hora em 30°C, 40°C e 50°C, respectivamente. A 60°C e 70°C a enzima

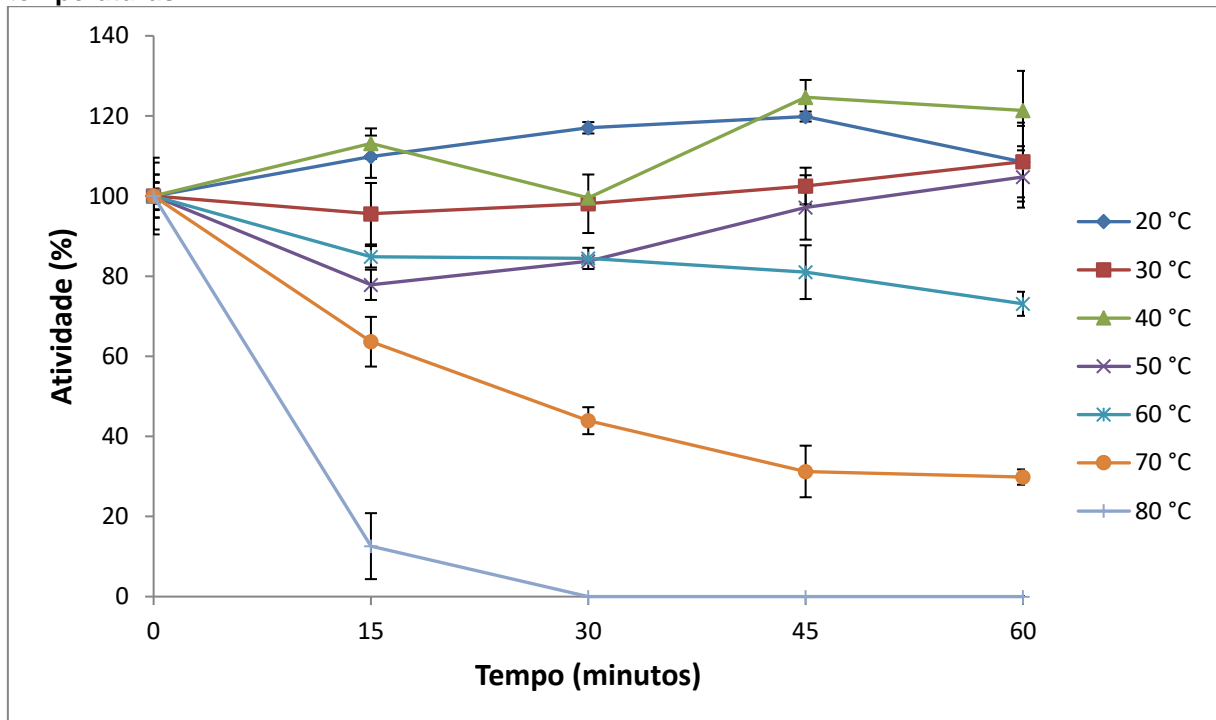
preservou 47,6% e 2,8%, respectivamente, de atividade. A 80°C nenhuma atividade foi observada a partir de 30 minutos. Assim como a lacase de *Trametes* sp., a de *P. ostreatus* exibiu um aumento de atividade a 20°C, seguida de uma pequena queda e depois sua manutenção até o final do período observado.

Figura 18. Termoestabilidade da lacase purificada livre de *Pleurotus ostreatus* em diferentes temperaturas.



Após a imobilização em CLEAs a enzima reteve cerca de 100% de atividade ao final de uma hora de 20°C a 50°C, e 73,1% a 60°C. Comparativamente, a enzima imobilizada teve 32,2% a mais de atividade do que a livre a 50°C, 23,5% e 27% a mais em 60°C e 70°C, respectivamente.

Figura 19. Termoestabilidade da lacase imobilizada de *Pleurotus ostreatus* em diferentes temperaturas.



A termoestabilidade não é uma característica muito comum para lacases fúngicas (KIISKINEN; VIIKARI; KRUIUS, 2002), mas o presente estudo demonstrou que ambas as enzimas livres podem sofrer aquecimento por até uma hora em temperaturas que chegam a 50°C sem sofrer perda significativa de atividade. O mesmo foi observado para a enzima de *P. ferulae* que reteve cerca de 90% de sua atividade na mesma faixa de temperatura e perdeu mais de 50% de atividade nos primeiros 30 minutos em temperaturas superiores (DING et al., 2014).

Aslam et al. (2012) observaram que a lacase livre de *Cladosporium cladosporioides* reteve 100% de atividade após a primeira hora a 40°C e 80% e 75% a 50°C e 60°C respectivamente. Enquanto que a lacase de *Trametes polyzona* se mostrou estável em temperaturas de até 40°C sem sofrer perda nenhuma de atividade catalítica (CHAIRIN et al., 2014). Em contrapartida LI et al. (2016) observaram que a lacase livre de *Trametes* sp., LS-10C foi considerada mais estável a 20°C, sofrendo inativação quando as temperaturas eram superiores a 60°C, assim como a lacase do fungo da podridão branca *Pleurotus sajor-caju*, cuja estabilidade termal foi máxima a 30°C, sofrendo queda drástica de atividade em temperaturas superiores a 50°C (MURUGESAN et al., 2006).

A lacase solúvel de *Pleurotus ostreatus* IBL-02 demonstrou meia vida de 40 minutos a 60°C, enquanto a mesma enzima imobilizada por encapsulamento apresentou meia vida superior a 3 horas (ASGHER; KAMAL; IQBAL, 2012). Com resultados similares, uma lacase bacteriana foi capaz de manter-se mais estável quando imobilizada do que quando livre ao longo de 10 horas nas temperaturas de 35°C e 55°C (LI et al., 2017). CLEAs de lipase perderam 49% menos atividade em testes de termoestabilidade a 60°C quando comparadas com as enzimas livres ao longo de 24 horas (ZHAO et al., 2008). É provável que o *cross-linking* entre moléculas de CLEAs proteja a configuração enzimática contra a variação de temperatura (NGUEYN; SEOW; YANG, 2017).

Enzimas que geralmente apresentam boa termoestabilidade possuem grande potencial de aplicação em tratamentos de efluentes aquecidos, como os gerados pela indústria têxtil e papelreira e também aqueles que requerem constante agitação mecânica com conseqüente aumento de temperatura (DIAS et al., 2003), assim ambas as lacases estudadas podem ser consideradas boas candidatas para esse tipo de tratamento biotecnológico especialmente quando imobilizadas.

5.4.5 PARÂMETROS CINÉTICOS

A transformação da equação de Michaelis-Menten no duplo-recíproco de Lineweaver-Burk foi empregado para determinar os parâmetros cinéticos para lacases purificadas livres e imobilizadas em CLEAs de ambas as cepas, utilizando ABTS como substrato e os valores de K_m e V_{max} foram calculados pela interceptação da linha no eixo X e eixo Y.

A relação entre taxa de reação enzimática e concentração de substrato depende da afinidade da enzima pelo substrato utilizado, expresso como K_m da enzima. Um baixo valor de K_m reflete alta afinidade pelo substrato utilizado enquanto baixos valores de V_{max} indicam que uma pequena quantidade de enzima pode converter o substrato em produto.

A lacase livre de *Trametes* sp. estudada apresentou K_m de 1 mM e V_{max} de 454,54 $\mu\text{mol}/\text{min}$ enquanto que para a enzima imobilizada o K_m foi de 3,94 mM e a V_{max} de 140,84. Para *Pleurotus ostreatus* o K_m observado foi de 2,1 mM e V_{max} foi de

1000 $\mu\text{mol}/\text{min}$, já para os CLEAs o K_m foi de 2,57 e V_{max} de 70,42. Esses valores mostram que as enzimas livres possuem maior afinidade pelo substrato utilizado (ABTS) em comparação com as imobilizadas. Em contrapartida, nota-se que os CLEAs precisam de pequena quantidade enzimática para converter substrato em produto, quando comparadas com as livres, especialmente a de *P. ostreatus*.

Similar aos resultados encontrados, CLEAs ociosas de lacase obtiveram K_m maior do que as enzimas livres com $190 \pm 2,9 \mu\text{M}$ e $90 \pm 3,5 \mu\text{M}$, respectivamente, enquanto a V_{max} da enzima imobilizada foi $0,046 \mu\text{M}/\text{min}$ e da livre $0,024 \mu\text{M}/\text{min}$ (NGUEYN; SEOW; YANG, 2017). Para lacases livres e imobilizadas em membrana oxidada de celulose bacteriana e dióxido de titânio, o K_m encontrado foi de 0,119 e 0,91, respectivamente. Já a V_{max} foi de 59,52 e 4,29, indicando a menor afinidade pelo substrato utilizado, mas necessidade de menor quantidade enzimática para sua conversão em produto (LI et al., 2017). Kumar, Cabana (2016) observaram apenas pequena variação do K_m da lacase livre de *Trametes versicolor* em comparação com os CLEAs, com 0,37 e 0,39 mM respectivamente, sugerindo que durante o processo de imobilização não houve mudança na conformação do sítio ativo da enzima.

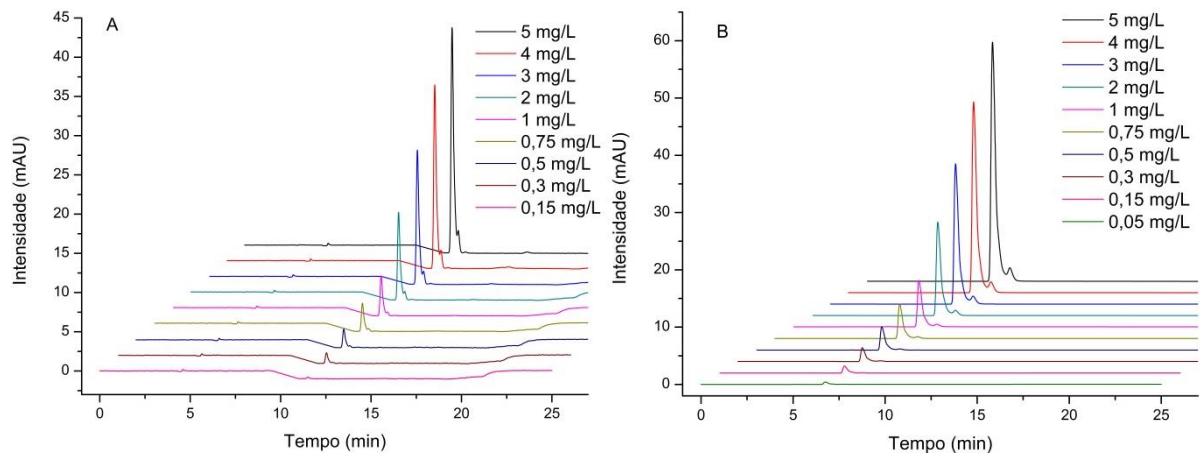
Esses diferentes valores de K_m observados entre lacases fúngicas livres podem confirmar as sugestões de Banerjee, Vohra (1991) de que essa diferença é provavelmente oriunda da alteração nas condições de cultura para o crescimento e no pH utilizado. Já a variação do K_m entre enzimas livres e imobilizadas pode ser atribuída ao tamanho das partículas de CLEAs que se formam levando à menor afinidade ao substrato, mobilidade conformacional restrita após a imobilização ou variações no microambiente enzimático (LI et al., 2017; WANG et al., 2013).

5.5 Biodegradação simultânea in vitro da rifampicina e isoniazida

As determinações das concentrações residuais dos fármacos RIF e INH foram realizadas com base nas curvas analíticas através da porcentagem de degradação simultânea dos fármacos após tratamento enzimático de 24 h a 40°C e 120 rpm no escuro com 100 U/L de lacases livres e imobilizadas em CLEAs. Os cálculos para a

degradação foram feitos a partir das curvas utilizando os padrões (Apêndice B) e os cromatogramas de ambos os fármacos são apresentados na Figura 20.

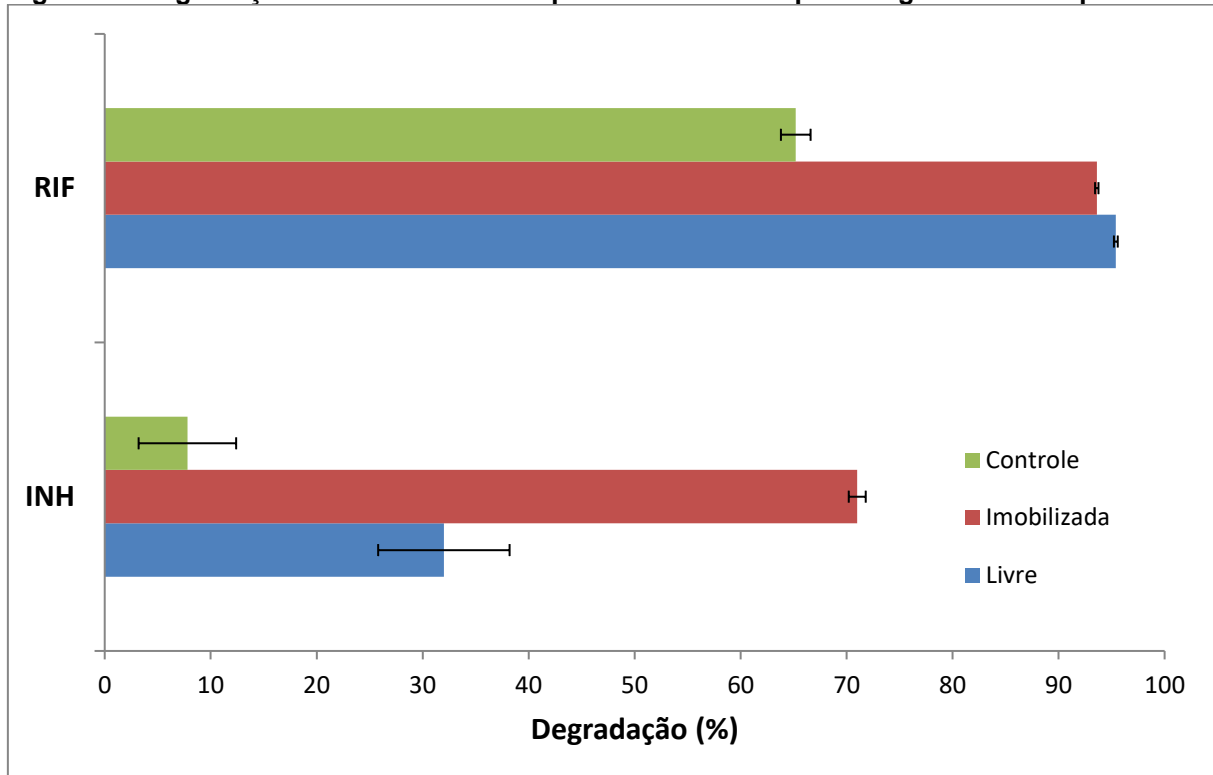
Figura 20. Curvas de concentração da rifampicina (A) isoniazida (B).



Os limites de quantificação de ambos os fármacos (LQ) foram determinados pela equação da regressão linear, sendo considerado como 10 vezes a razão entre a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva analítica de regressão. O LQ da rifampicina (RIF) foi de 0,11 mg/L, sendo o menor ponto da curva 0,15 mg/L e o LQ de isoniazida (INH) foi de 0,03 mg/L, com o menor ponto da curva sendo 0,05 mg/L. O limite de detecção (LD) foi estimado através do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva de regressão multiplicado por 3,3, assim o valor do LD para RIF foi de 0,03 mg/L e para INH foi de 0,01 mg/L.

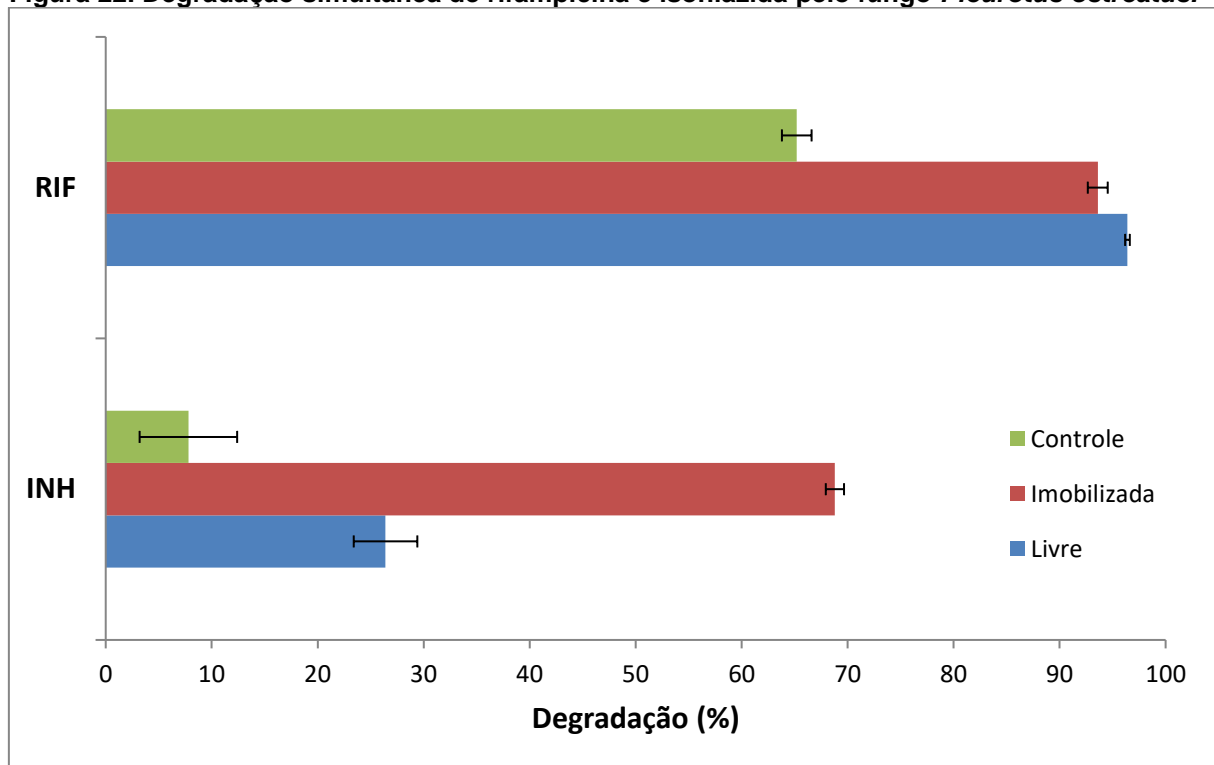
Para a lacase de *Trametes* sp. a degradação da enzima livre para rifampicina (RIF) foi de 95,4%, enquanto que para a imobilizada foi de 93,6%, muito próximas para serem consideradas distintas. Já para isoniazida (INH) a diferença foi maior, com a enzima livre degradou cerca de 32% e a imobilizada mais que o dobro, 71%. O controle, que contava apenas com os fármacos e tampão acetato de sódio pH 5,0 demonstrou degradação de 65,2% para rifampicina e 7,8% para isoniazida ao final de 24 h (Figura 21).

Figura 21. Degradação simultânea de rifampicina e isoniazida pelo fungo *Trametes sp.*



O tratamento realizado com as enzimas do fungo *Pleurotus ostreatus* teve resultados similares. Para rifampicina, a enzima livre degradou cerca de 96,4% enquanto que para a imobilizada a degradação foi de 93,6%. Para isoniazida a enzima livre degradou apenas 26,4%, já os CLEAs obtiveram 68,8% de eficiência, quase duas vezes e meia a mais. O controle, nas mesmas condições, mas sem enzimas, foi responsável por apresentar degradação de 65,2% para rifampicina e 7,8% para isoniazida (mesmo controle para ambos os fungos) (Figura 22).

Figura 22. Degradação simultânea de rifampicina e isoniazida pelo fungo *Pleurotus ostreatus*.



O alto valor de degradação da rifampicina no controle pode ser explicado pelo fato do fármaco ser relativamente instável em soluções aquosas, além de instável ao ser exposto ao ar, luz, calor e umidade (PUBCHEM, 2019 apud O'NEIL, 2001; OSOL; HOOVER, 1975). O tratamento foi realizado no escuro e os tubos de ensaio estavam fechados para impedir a entrada da luz e a evaporação da solução, o que diminui seu risco de degradação por esses meios. Sankar, Sharda, Singh (2003) observaram que em pH ácido, na faixa de 1 a 3, a rifampicina tende a se decompor na presença da isoniazida e embora o pH da solução do experimento tenha sido mantido próximo de 5,0, não foi possível averiguar se houve interferência dessa condição, visto que o tratamento era simultâneo.

Lacases normalmente atacam compostos fenólicos, anéis aromáticos e aminas alifáticas, o que pode indicar onde a enzima atuou sobre a rifampicina, quebrando as ligações de aminas e seus anéis para a formação de quinonas (ARCA-RAMOS et al., 2016; FAVILA; GALLO; GLOSSMAN-MITNIK, 2007; STETS et al., 2018; STRONG; CLAUS, 2011). Já a isoniazida, por ser uma estrutura não fenólica pode ter sofrido ataque enzimático na ligação C-N da piridina (CHEN et al., 2013). Radicais resultantes de tratamentos de fármacos fenólicos por lacases, como

a rifampicina, podem interagir com grupos doadores de elétrons presentes em compostos não fenólicos como a isoniazida, melhorando seu processo de transformação (TOUAHAR et al., 2014).

Similar aos resultados obtidos na degradação de isoniazida do presente trabalho, lacases imobilizadas em CLEAs magnéticos demonstraram maior eficiência do que as livres na remoção de outros fármacos como o ácido metafetâmico e fenofibrato (concentração de 10 a 50 µg/L) , com mais do dobro de sucesso após o tratamento de 6 h utilizando 1000 U/L. Enzimas imobilizadas obtiveram cerca de 40% e 50% de degradação para os respectivos fármacos, enquanto a livre teve apenas 15% e 20% de sucesso (ARCA-RAMOS et al., 2016). No mesmo trabalho o anti-inflamatório indometacina teve degradação similar entre os tratamentos com enzimas imobilizadas e livres, assim como a rifampicina, já o paracetamol teve remoção maior quando utilizando lacase livre (80%) ao invés do CLEAs (35%). Nota-se que embora o tempo de tratamento tenha sido menor que o do presente trabalho, a utilização de enzimas foi 10 vezes maior e a concentração dos fármacos estava na casa de µg/L.

Lacases de *Cerreia unicolor* foram imobilizadas em CLEAs magnéticos para o tratamento dos antibióticos oxitetraciclina e tetraciclina (100 mg/L), obtendo 60% e 65% de degradação, respectivamente ao final de 48 h de tratamento utilizando 20000 U/L em pH 7,0. Quando as condições foram modificadas para o dobro de enzimas imobilizadas e a diminuição no pH para 6,0, tetraciclina obteve quase 80% de remoção nas 12 primeiras horas, demonstrando a importância de se encontrar a melhor condição para as enzimas de trabalho (YANG et al., 2017). Kumar, Cabana (2016) trabalhando com lacases imobilizadas como CLEAs em nanopartículas magnéticas obtiveram remoção acima de 90% em tratamentos de 12 h com 1000 U/L para os fármacos diclofenaco, ácido metafetâmico, carbamazepina-E, atenolol e acetaminofeno (100 µg/L). Touahar et al. (2014) também observaram melhora no tratamento de diversos fármacos, entre eles os antibióticos trimetoprima e ciprofloxacina ao utilizarem enzimas imobilizadas em COMBI-CLEAs (lacase, versatil peroxidase e glucose oxidase) quando comparado à utilização apenas das enzimas livres.

O aumento da taxa de degradação da isoniazida pelas lacases imobilizadas em CLEAs em comparação com as enzimas livres pode ser devido a mudanças conformacionais e/ou mudanças químicas nas enzimas após o processo de

imobilização. Quando isso acontece é possível observar mudanças na atividade enzimática em relação ao seu substrato natural como o ABTS. Tanto nos CLEAs de *Trametes* sp. quando nos CLEAs de *Pleurotus ostreatus* observou-se diminuição de afinidade pelo ABTS após o processo de imobilização (seção 5.4.5), demonstrando que houve mudança conformacional no centro ativo das enzimas. Essa “hiperativação” produzida pelo método enzimático em relação a um substrato específico (como a isoniazida) pode ser resultado da geração de uma forma mais ativa da enzima, ocorrendo mais facilmente em proteínas com sítios ativos flexíveis (ARCA-RAMOS et al., 2016). Assim o aumento da degradação pelos CLEAs em comparação com a enzima livre para o fármaco isoniazida pode ser explicada por essa “hiperativação” da lacase após o processo de imobilização.

5.6 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de rifampicina na solução combinada com isoniazida antes e após tratamento enzimático utilizando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As colônias foram ajustadas ao padrão McFarland 0,5 e inoculadas em placas de 96 poços e sua concentração averiguada por densidade óptica a 620 nm antes e depois de 24 h em estufa a 37°C (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

Após 24 h de crescimento em placa, foi verificado aumento da densidade óptica apenas no controle de crescimento (caldo Mueller-Hilton e inóculo bacteriano). Isso indica que as concentrações de rifampicina nas soluções após tratamentos enzimático (0,26 mg/L e 0,34 mg/L para lacases livres e imobilizadas de *Trametes* sp., respectivamente e 0,22 mg/L e 0,34 mg/L para lacases livres e imobilizadas de *Pleurotus ostreatus*) foram o suficiente para inibir completamente o crescimento bacteriano, sem ter alteração no controle de esterilidade, demonstrando que o fármaco ainda atuava de forma eficiente. Nos controles positivos de rifampicina (2,5 mg/L até 0,009 mg/L) também não foi observado crescimento bacteriano após 24 h em estufa.

Andrews (2001) e Grif et al. (2001) determinaram que a concentração inibitória mínima (MIC) para o antibiótico rifampicina utilizando distintas cepas de *S. aureus*

variou de 0,004 mg/L até 0,015 mg/L, o que pode justificar a inibição observada, além de poder estar presente algum metabólito ativo após a oxidação enzimática. Já para diversas cepas de *M. tuberculosis* a concentração variou de 0,06 mg/L até 0,25 mg/L (HEIFETS, 1991).

A atividade antimicrobiana da isoniazida não pôde ser determinada utilizando a cepa em questão, pois se trata de um fármaco com ação específica para *Mycobacterium* e não apresenta ação inibitória contra *S. aureus* (HEIFETS, 1991). Entretanto, em cada país ocorre variação da concentração inibitória mínima dependendo das cepas de *Mycobacterium* utilizadas para os testes. Nos Estados Unidos os MICs variam de 0,025 a 0,05 mg/L (HEIFETS, 1991).

6 CONCLUSÕES

Os fungos *Trametes* sp. e *Pleurotus ostreatus* mostraram serem bons produtores de lacases quando bagaço-de-cana foi adicionado ao meio de cultivo, além de também terem sua produção enzimática aumentada após o acréscimo das soluções de metais.

As lacases de ambos os fungos foram imobilizadas com sucesso pela técnica de *cross-linked enzyme aggregates* e a purificação enzimática dos extratos foi obtida para ambas as cepas estudadas. Os testes de estabilidade térmica e em diferentes valores de pH mostraram que as enzimas imobilizadas em CLEAs possuem maior estabilidade que as livres e a análise cinética determinou que houve mudanças conformacionais resultantes do processo de imobilização.

As análises de biodegradação simultânea dos fármacos pelas enzimas livres e imobilizadas resultaram em maior degradação para a isoniazida nos tratamentos utilizando CLEAs, já para a rifampicina não houve diferença estatística, embora o fármaco tenha sido quase 100% degradado ao longo de 24 h.

Os testes antimicrobianos realizados nas soluções após o tratamento enzimático determinaram que embora houvesse degradação quase total da rifampicina, o fármaco continuou atuando, inibindo o crescimento de *S. aureus*.

REFERÊNCIAS

AKPINAR, M.; UREK, R. O. Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. **3 Biotech**, v. 7, n. 98, p 1-10, 2017.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. S1, p. 5-16, 2001.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico, 2017 Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/374947/3413536/Anu%C3%A1rio+Estat%C3%ADstico+do+Mercado+Farmac%C3%AAutico+--+2017/3179a522-1af4-4b4c-8014-cc25a90fb5a7>> Acesso em: 26 dez. 2018.

ARCA-RAMOS, A. Recyclable cross-linked laccase aggregates coupled to magnetic silica microbeads for elimination of pharmaceuticals from municipal wastewater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 8929-8939, 2016.

ARORA, D. S.; GILL, P. K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7–8, p. 602–605, 2001.

ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, 2014.

ASGHER, M.; IQBAL, H. M.; ASAD, M. J. Kinetic characterization of purified laccase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 in solid state bio-processing of corncobs. **BioResources**, v. 7, n. 1, p. 1171-1188, 2012.

ASGHER, M.; IQBAL, H. M.; IRSHAD, M. Characterization of purified and Xerogel immobilized Novel Lignin Peroxidase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 using solid state medium of Corncobs. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 46, 2012.

ASGHER, M.; IQBAL, H. M. N. Enhanced catalytic features of sol-gel immobilized MnP isolated from solid state culture of *Pleurotus ostreatus* IBL-02. **Chinese Chemical Letters**, v. 24, n. 4, p. 344–346, 2013.

ASGHER, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Improvement of Catalytic Efficiency, Thermo-stability and Dye Decolorization Capability of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 laccase by Hydrophobic Sol Gel Entrapment. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 110, p. 1-10, 2012.

ASLAM, M. S. et al. Identification, Purification and Characterization of a Novel Extracellular Laccase from *Cladosporium cladosporioides*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 26, n. 6, p. 3345-3350, 2012.

ATALLA, M. M. et al. Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 373-381, 2013.

BA, S. et al. Laccase insolubilized as combination of crosslinked enzyme aggregates: characterization and potential application in wastewater treatment. **Enzyme research**, v. 3, n. 1, p. 23–28, 2012.

BAALBAKI, Z. et al. Predicting the fate of micropollutants during wastewater treatment: Calibration and sensitivity analysis. **Science of the Total Environment**, v. 601–602, p. 874–885, 2017.

BAJPAI, P.; ANAND, A.; BAJPAI, P. K. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. **Biotechnology Annual Review**, v. 12, n. 06, p. 349–378, 2006.

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

BANERJEE; U. C.; VOHRA, R. M. Production of laccase by *Curvularia sp.* **Folia Microbiologica**, v. 36, n. 4, pp. 343-346, 1991.

BEZERRA, T. M. D. S. et al. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 3, p. 378–387, 2014.

BONATO, A. C. H. **Avaliação da degradação de sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas ligninolíticas e fotólise**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018

BOTTONI, P.; CAROLI, S.; CARACCILOLO, A. B. Pharmaceuticals as priority water contaminants. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 549–565, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAUSCH, J. M. et al. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A review of recent toxicological studies and considerations for toxicity testing. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 218, p 1-99, 2012.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12° ed. Porto Alegre: Editora AMGH, 2012

BUTKOVSKYI, A. et al. Fate of pharmaceuticals in full-scale source separated sanitation system. **Water Research**, v. 85, p. 384-392, 2015.

CABANA, H. et al. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. **Bioresour Technol**, v. 100, pp. 3447-3458, 2009.

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.

CAMARERO, S. et al. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1775–1784, 2005.

CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2005.

CAO, L. **Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design**. 1. ed. Alemanha: Wiley-Vch, 2006.

CAO, L.; VAN LANGEN, L.; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387–394, 2003.

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.

CHAIRIN, T. et al. Purification and characterization of the extracellular laccase produced by *Trametes polyzona* WR710-1 under solid-state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 35-43, 2014.

CHAURASIA, P. K.; YADAV, R. S. S.; YADAVA, S. Purification and characterization of yellow laccase from *Trametes hirsuta* MTCC-1171 and its application in synthesis of aromatic aldehyde. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1647-1655, 2014.

CHEN, Y. et al. Degradation of N-heterocyclic indole by a novel endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 568-574, 2013.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. **Frontiers in energy research**, v. 2, n. 12, p. 1–13, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perfil do setor sucroalcooleiro**, 2014/15. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/cana/perfil-do-setor-sucroalcooleiro> > Acesso em: 27 dez. 2018.

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, pp. 15-28, 2013.

D'ACUNZO, F.; GALLI, C.; MASCI, B. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Solubility and steric issues. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 21, p. 5330–5335, 2002.

DAASSI, D. et al. Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes sp.* isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mil waste water treatment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, pp. 2145-2155, 2013.

DAKO, E. et al. The problems Associated with Enzyme Purification. In: EKINCI, D. (Ed.). **Chemical Biology**. IntechOpen, 2012. p. 19-40.

DAS, A. et al. Biodegradation of aflatoxin B1 in contaminated rice straw by *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 and *Pleurotus ostreatus* GHBBF10 in the presence of metal

salts and surfactants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p 2315-2324, 2014.

DIAS, A. A. et al, In vivo and laccase-catalysed decolourization of xenobiotic azo dyes by a basidiomycetous fungus: characterization of its ligninolytic system. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 19, p. 969-975, 2003.

DING, Z. et al. Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 64, p 121-129, 2014.

DOGAN, T. et al. *Trametes versicolor* laccase immobilized poly(glycidyl metracrylate) based cryogels for phenol degradation from aqueous media. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 1-9, 2015.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2° ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010.

FAVILA, A.; GALLO, M.; GLOSSMAN-MITNIK, D. CHIH-DFT determination of the molecular structure infrared spectra, UV spectra and chemical reactivity of three antitubercular compounds: Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 4, p. 505-518, 2007.

FUKUSHIMA, Y.; KIRK. T. K. Laccase componet of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 872-876, 1995.

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot-fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 225-232, 2001.

ISONIAZIDA + RIFAMPICINA® - ISONIAZIDA + RIFAMPICINA 100 MG e 150 MG: Cápsula. Farmacêutico Responsável: Adivar Aparecido Cristina. Guarulhos: Fundação para o Remédio Popular - FURP. 2013. Disponível em: < http://www.furp.sp.gov.br/arquivos/produtos/bulas/profissional/63/FURP-ISONIAZIDA_RIFAMPICINA_BPROF_REV02.pdf >. Acesso em: 26 dez. 2018.

GODBOLE, S. S.; KUBAL, B. S.; D'SOUZA, S. F. Hydrolysis of concentrated sucrose syrups by invertase immobilized on anion exchanger waste cotton thread. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, pp. 214-217, 1990.

GOPO, Q. **Regulation of wastewater treatment plants in the Ba-Phalaborwa municipality.** North-West University, Evanston, 2013.

GRIF, K. et al. *In vitro* activity of fosfomycin in combination with various antistaphylococcal substances. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 209-217, 2001.

HALABURGI, V. M. et al. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1146-1152, 2011.

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

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi : production and role in lignin degradation. **Microbiology Reviews**, v. 13, p. 125–135, 1994.

HAVE, R. TEN; TEUNISSEN, P. J. M. Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 11, p. 3397–3414, 2001.

HEIFETS, L. B. Antituberculosis drugs: antimicrobial activity *in vitro*. In: HEIFETS, L. B. **Drugs Susceptibility in the Chemotherapy of Mycobacterial Infections**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. cap. 1, p. 13-57.

HENDRICKS, R.; POOL, E. J. The effectiveness of sewage treatment processes to remove faecal pathogens and antibiotic residues. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 47, p. 289-297, 2012.

HERMANN, A. C. **Biodegradação dos antimicrobianos sulfametoxazol e trimetoprima por enzimas ligninolíticas de basidiomicetos.** Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

HILDE, K.; HAKALA, T. K.; TAINA, L. Thermotolerant and thermostable laccases. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1117–1128, 2009.

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.

HUSAIN, Q.; JAN, U. Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenol oxidases. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 59, n. 4, p. 286–293, 2000.

IKE, P. T. L. et al. Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 654, 2015.

INOUE, Y. et al. Elimination and detoxification of triclosan by manganese peroxidase from white rot fungus. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, p. 764-767, 2010.

JANSEN, E. F.; TOMIMATSU, Y.; OLSON, A. C. Cross-linking of alfa-chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 144, n. 1, p. 394–400, 1971.

JANSSEN, M. H. A. et al. Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 4, p. 425–432, 2002.

JONES, O. A. H.; VOULVOULIS, N.; LESTER, J. N. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment a Review. **Environmental Technology**, v. 22, n. 12, p. 1383–1394, 2001.

KARAS, P. A. et al. Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. **Biodegradation**, v. 22, n. 1, p. 215–228, 2011.

KIISKINEN, L. L.; VIKARI, L.; KRUIIS, K. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 59, p. 198-204, 2002.

KIM, C. K. et al. Simple and Sensitive HPLC Method for Determination of Gemfibrozil in Human Plasma with Fluorescence Detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, n. 3, p. 403–414, 2006.

KLEIN, E. Y. et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **PNAS**, v. 115, n. 15, p. 3463-3470, 2018

KNEZEVIC, A. et al. The effect of trace elements on wheat straw degradation by *Trametes gibbosa*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 152-156, 2014.

KO, E. M.; LEEM, Y. E.; CHOI, H. T. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 98–102, 2001.

KOSCHORRECK, K. et al. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 217–224, 2008.

KUMAR, R. et al., Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by desing of experiment technique: partial purification and characterization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 125-131, 2016.

KUMAR, V. V.; CABANA, H. Towards high potential magnetic biocatalysts for on-demand elimination of pharmaceuticals. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 81-89, 2016.

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.

LEONTIEVSKY, A. A. et al. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, p. 9–14, 1997.

LI, G. et al. Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. **Journal of Membrane Science**, v. 525, p. 89-98, 2017.

LI, S. et al. High-level production and characterization of laccase from a newly isolated fungus *Trametes sp.* LS-10C. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 278-285, 2016

LI, Y. et al. A Ca-alginate particle co-immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* cells and the combined cross-linked enzyme aggregates from *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 464–469, 2015.

LINWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants.

Journal of the American Chemical Society, v. 56, pp. 658-666, 1934.

LIU, L. et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 426-433, 2009.

LIU, X.; HILIGSMANN, S.; GOURDON, R.; BAYARD, R. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomasses pretreated with *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p 154-162, 2017.

LLORET, L. et al. Lacase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, v. 51, pp. 124-131, 2010.

LORENZO, M.; MOLDES, D.; SANROMÁN, M. A. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. **Chemosphere**, v. 63, p 912-917, 2006.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MACELLARO, G. et al. Effective mutations in a high redox potential laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4949–4961, 2014.

MACIEL, G. M. et al. Fundamentals, Diversity and Application of White-Rot Fungi. In: SILVA, A. P.; SOL, M. **Fungi: Types, environmental impact and role in disease**. Primeira ed. Nova Yorque: Nova Science, 2012. p. 409–458.

MANAVALAN, A. et al. Characterization of a solvent, surfactant and temperature-tolerant laccase from *Pleurotus sp.* MAK-II and its dye decolorizing property. **Biotechnology Letters**, v. 37, p 2403-2409, 2015.

MANAVALAN, A. et al. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 106-114, 2013.

MANSUR, M. et al. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. **Mycologia**, v. 95 n. 6, p. 1013-1020, 2003.

MARGOT, J. et al. Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 63, 2013.

MARSHALL, B. M. LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 718-733, 2011.

MATEI, J. C. **Pré-tratamento biológico de resíduos agroindustriais por enzimas ligninolíticas para produção de bioetanol**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

MATEO, C. et al. A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 273–276, 2004.

MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A. C. C. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 111-118, 2014.

MATIJOŠYTE, I. et al. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 2, p. 142–148, 2010.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–565, 2002.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, 2004.

MINUSSI, R. C. et al. Purification, characterization and application of laccase from *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill waste water in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *African Journal of Biotechnology*, v. 6, n. 10, p. 1248-1254, 2007.

MOHIDEM, N. A.; MAT, H. The catalytic activity of laccase immobilized in sol-gel silica. **Journal of Applied Sciences**, v. 9, p. 3141-3145, 2009.

MOILANEN, U. et al. Mechanisms of laccase-mediator treatments improving the enzymatic hydrolysis of pre-treated spruce. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, p. 1–13, 2014.

MORE, S. S. et al. Isolation, purification and characterization of fungal laccase from *Pleurotus sp.* **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

MOROZOVA, O. V. et al. "Blue" laccases. **Biokhimiya**, v. 72, n. 10, p. 1396-1412, 2007.

MURUGESAN, K. et al. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 5, p. 939-946, 2006.

NGUYEN, L. T.; SEOW, N.; YANG, K-L. Hollow cross-linked enzyme aggregates (h-CLEA) of laccase with high uniformity and activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 151, p. 88-94, 2017.

NIMNI, M. E. et al. Chemically modified collagen: A natural biomaterial for tissue replacement. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 21, n. 6, p. 741–771, 1987.

NNADOZIE, C. F.; KUMARI, S.; BUX, F. Status of pathogens, antibiotic resistance genes and antibiotic residues in wastewater treatment systems. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 16, pp. 491-515, 2017.

OKUDA, K. et al. Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 71, n. 2, p. 100–105, 1991.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Review on antimicrobial resistance, 2016**. Disponível em: < https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf > Acesso em: 26 dez. 2018.

Organização Mundial de Saúde (OMS). **WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016-2018**. World Health Organization (WHO). Disponível em: < https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/who-amr-amc-report-20181109.pdf?ua=1 > Acesso em: 26 dez. 2018.

OTHMAN, A. M. et al. Purification, biochemical characterization and applications of *Pleurotus ostreatus* ARC280 laccase. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 12, p. 1418-1439, 2014.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209–214, 2014.

PAKHADNIA, Y. G.; MALINOUSKI N. I.; LAPKO, A. G. Purification and characterization of na enzyme with both bilirubin oxidase and laccase activities from mycelium of the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 74, n. 9, pp. 1027-1034, 2009.

PALONEN, H. et al. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 854-862, 2003.

PEZZELLA, C. et al. Immobilization of a *Pleurotus ostreatus* laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 11, 2014.

POGNI, R. et al. Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 885–896, 2015.

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20–33, 2001.

POMATI, F. et al. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 7, p. 2442–2447, 2006.

PUBCHEM. **Rifampicin**. Disponível em: < <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6913622#section=Stability> > Acesso em: 14 de jan. 2019.

RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V.; VASIL'CHENKO, L. G. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–17, 2004.

RAO, K. N. et al. Development and Validation of Sensitive RP-HPLC Method for Determination of Gemfibrozil in Human plasma. **Der Pharma Chemica**, v. 4, n. 3, p. 882-888, 2012.

REBRIKOV, D. N. et al. Laccase of the Lignolytic Fungus *Trametes hirsuta*: Purification and Characterization of the Enzyme, and Cloning and Primary Structure of the Gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 645–653, 2006.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219–226, 2006.

RIZZO, L. et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 345-360, 2013.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; DOMÍNGUEZ, A.; SANROMÁN, M. A. Production of manganese-dependent peroxidase in a new solid-state bioreactor by *Phanerochaete chrysosporium* grown on wood shavings: application to the decolorization of synthetic dyes. **Folia Microbiology**, v. 47, p. 417-421, 2002.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; TOCA-HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500–513, 2006.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 558-569, 2007.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SANKAR, R.; SHARDA, N.; SINGH, S. Behavior of decomposition of rifampicin in the presence of isoniazid in the pH range 1-3. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, n. 7, p. 733-738, 2003.

SANLIER, S. H.; GIDER, S.; KOPRULU, A. Immobilization of laccase for

biotechnology applications. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 259–263, 2013.

SANNIA, G. et al. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 8, pp. 797-800, 1986.

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.

SCHOEVAART, R. et al. **Methods for the preparation of cross-linked enzyme aggregates with improved properties**. United States, 2008.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 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.

SHLEEV, S. et al. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. **The Biochemical journal**, v. 385, n. Pt 3, p. 745–54, 2005.

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

SOCCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspective in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SPINA, F. et al. Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater : evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity. **Journal of Cleaner Production**, v. 100, p. 185–194, 2015.

STETS, S. et al. Antituberculosis drugs degradation by UV-based advanced oxidation process. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 353, p. 26-33, 2018.

STOILOVA, I.; KRASTANOV, A.; STANCHEV, V. Properties of crude laccase from

Trametes versicolor produced by solid-substrate fermentation. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v 1, p. 208-215, 2010.

STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373–434, 2011.

TALEKAR, S. et al. Parameters in preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **RSC Advances**, v. 3, n. 31, p. 12485-12511, 2013.

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

TINOCO, R.; PICKARD, M. A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 331-335, 2001.

TLECUITL-BERISTAIN, S. et al. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. **Mycological Research**, v. 112, n. 9, pp. 1080-1084, 2008.

TOUAHAR, I. 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, p. 90-99, 2014.

USP: **The United States Pharmacopoeia**, 36. National Formulary 31. U.S. Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, 2007.

VAN PELT, S. et al. Nitrile hydratase CLEAs: The immobilization and stabilization of an industrially important enzyme. **Green Chemistry**, v. 10, n. 4, pp. 395-400, 2008.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, p. 277-283, 2015.

VISWANATH, B. et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme Research**, v. 2014, 2014.

VRSANSKÁ, 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. **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 23, pp. 1-15, 2018.

WANG, H. et al. Water and wastewater treatment in Africa: Current practices and challenges. **Clean**, v. 42, p. 1029-1035, 2014.

WANG, Q. et al. Activity of laccase immobilized on TiO₂-montmorillonite complexes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12520-12532, 2013.

WARD, W. W.; SWIATEK, G. Protein purification. **Current Analytical Chemistry**, v. 5, pp. 85-105, 2009.

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**, v. 267, n. 33, p. 23688–23695, 1992.

WIDIASTUTI, H. et al. Activity of Ligninolytic Enzymes during Growth and Fruiting Body Development of White Rot Fungi *Omphalina sp.* and *Pleurotus ostreatus*. **Hayati Journal of Biosciences**, v. 15, n. 4, p. 140–144, 2008.

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.

XIAO, Y. L. et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, pp. 700-707, 2003.

XIAO, Y. L. et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes sp.* AH28-2. **Mycologia**, v. 96, n. 1, pp. 26-35, 2004.

XU, F. et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1292, n. 2, p. 303–311, 1996.

XU, F. Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 924–928,

1997.

XU, F. et al. Redox chemistry in laccase-catalysed oxidation of N-hydroxy compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66 (5), n. 5, p. 2052–2056, 2000.

XU, R. et al. Enhancement of catalytic activity of immobilized laccase for diclofenac biodegradation by carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 88–95, 2015.

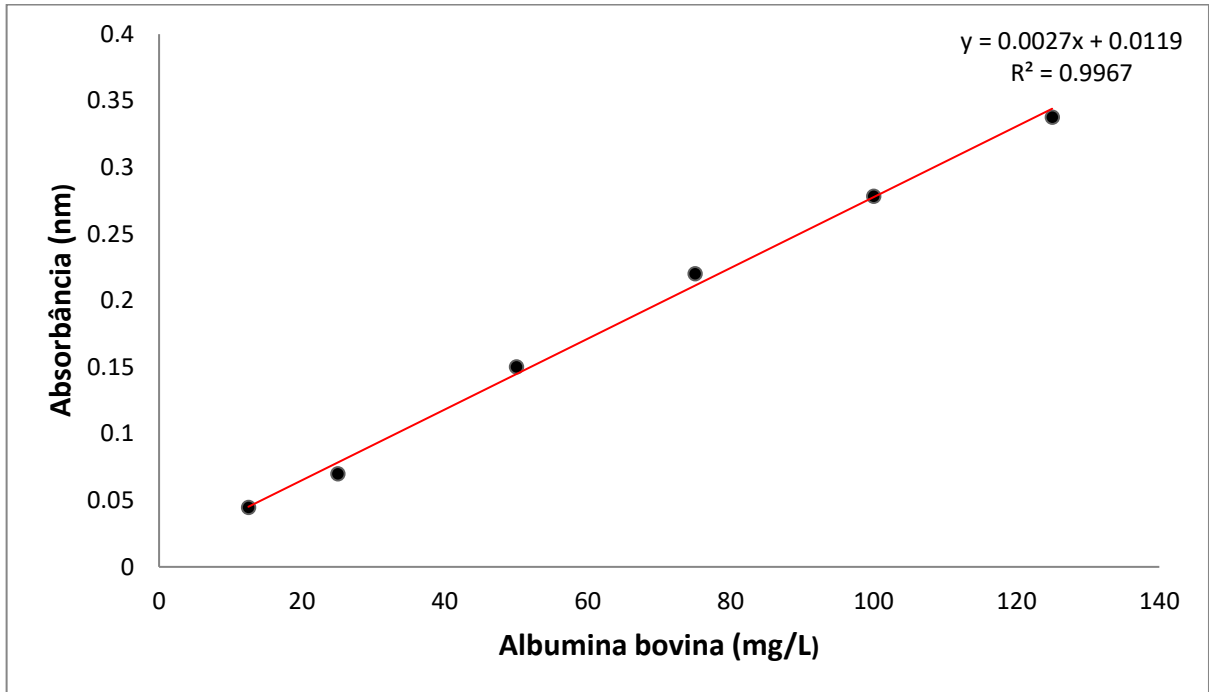
YANG, J. et al. Degradation of tetracycline by immobilized laccase and the proposed transformation pathway. **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, pp. 525-531, 2017.

YANG, Y. et al. Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot-fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological application by different metal ions and aromatic compounds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p 1-9, 2013.

YU, D. et al. Resolution of 2-octanol by SBA-15 immobilized *Pseudomonas sp.* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 48, n. 3–4, p. 64–69, 2007.

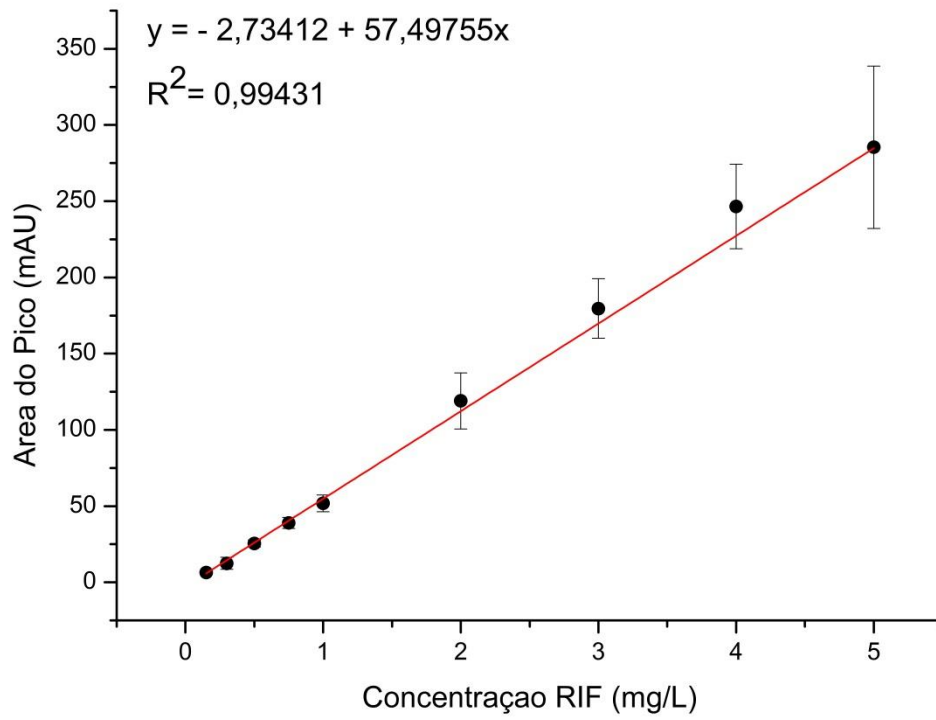
ZHAO, L. et al. Resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine via cross-linked aggregates of *Pseudomonas sp.* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 1-2, p. 7-12, 2008.

ZHENG, F. et al. Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 110, n. 4, p. 69–78, 2016.

APÊNDICE A – Curva padrão de Albumina de Soro Bovino

APÊNDICE B – Curva padrão de Rifampicina e Isoniazida

Curva padrão de rifampicina.



Curva padrão de isoniazida.