

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE

MONIKE FABIANE ALVES RIBEIRO LACERDA

**DEGRADAÇÃO DE HORMÔNIO SINTÉTICO POR MEIO DE LACASES
FÚNGICAS IMOBILIZADAS EM FIBRAS DE *Luffa cylindrica***

GOIÂNIA - GO
2015

MONIKE FABIANE ALVES RIBEIRO LACERDA

**DEGRADAÇÃO DE HORMÔNIO SINTÉTICO POR MEIO DE LACASES
FÚNGICAS IMOBILIZADAS EM FIBRAS DE *Luffa cylindrica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Escola de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

Área de Concentração: Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof. Dra. Mariângela Fontes Santiago.

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Marques Lopes

GOIÂNIA - GO
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Alves Ribeiro Lacerda, Monike Fabiane

Degradação de hormônio sintético por meio de lacases fúngicas
imobilizadas em fibras de *Luffa cylindrica* [manuscrito] / Monike
Fabiane Alves Ribeiro Lacerda. - 2015.

83 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago; co-orientador Dr.
Flávio Marques Lopes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Engenharia Civil (EEC) , Programa de Pós-Graduação em Engenharia
do Meio Ambiente, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras,
lista de tabelas.

1. Etinilestradiol. 2. Enzima Lignolítica. 3. *Pleurotus ostreatus*. 4.
Bucha vegetal. 5. Fibras lignocelulósicas. I. Fontes Santiago,
Mariângela, orient. II. Marques Lopes, Flávio, co-orient. III. Título.

*“De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um paço de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!”*

Fernando Sabino

Aos meus avós (*in memoriam*)...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado, por despertar minha mente para novos conhecimentos e, pela fé, me fazer alcançar meus sonhos e objetivos.

Ao meu esposo, pelo incentivo em trilhar esse novo caminho, pela compreensão e por me fazer acreditar que no fim tudo daria certo.

Aos meus pais e irmãos, por acreditarem no meu potencial e pela força nos momentos difíceis.

À minha família, pela paciência e por compreender a ausência em certas ocasiões.

À professora Mariângela Fontes Santiago, que possibilitou essa conquista em minha vida, pela oportunidade, pelos ensinamentos acadêmicos e pela amizade.

Ao professor Flávio Marques Lopes, pelo acompanhamento da pesquisa, pela ajuda e por compartilhar seus conhecimentos.

Às minhas companheiras do Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental da Faculdade de Farmácia, Jhébica e a Luane, pela troca de conhecimento, pela ajuda em momentos difíceis e pela amizade.

Ao Paulo por ter me mostrado o caminho para ingressar no mestrado e pelo apoio em todas as etapas da pesquisa

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Federal de Campinas (UNICAMP) pelo auxílio no Cromatógrafo; em especial ao Adilson por ter disponibilizado seu tempo a nos ajudar.

Ao professor Luiz Carlos e ao Jerônimo do Núcleo de Estudos Tóxico-Farmacológicas da UFG (NEPET) pela assistência no Cromatógrafo.

Ao Laboratório de Análise Farmacêutica e Ambiental da Faculdade de Farmácia (LAFAM) pelo apoio.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

O 17 α -etinilestradiol (EE2) é um estrogênio sintético utilizado na contracepção e em terapias de reposição hormonal; é um potencial contaminante ambiental, pois não é completamente removido nas estações de tratamento de esgotos, podendo alcançar o ambiente aquático, tendo o agravante de interferir no sistema endócrino de seres humanos e de outros animais. Por esse motivo existe um grande interesse na remoção do EE2 presente em águas residuárias, superficiais e subterrâneas. Assim, o uso de lacase para esse fim pode ser promissor, devido à baixa especificidade desta enzima ao substrato. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia da lacase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* imobilizada em fibras de *Luffa cylindrica* (bucha vegetal) na degradação do EE2. Para tanto foram selecionados meios de cultivo para produção da lacase, bem como as melhores condições de pH e temperatura. Após a realização do processo de imobilização, a remoção do EE2 foi atingida em ensaios em erlenmeyers e em um reator em batelada. Assim, os melhores meios para a produção de lacase foram o Batata Dextrose e o Batata Dextrose Modificada com palha de guariroba. As leituras realizadas com 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothializone-6-sulfonic acid) - ABTS revelaram melhores pH entre 3,6 e 4,6 e faixas de temperaturas ótimas entre 30 e 50 °C para as enzimas livre e imobilizada. A lacase produzida em ambos os meios apresentou massa molecular de 40 kDA. As melhores condições encontradas para o processo de imobilização foram concentração de glutaraldeído de 2% e reação com o suporte em 1 hora sob agitação (120 rpm); secagem da bucha vegetal antes da reação com glutaraldeído; tempo imobilização de 24 horas. A enzima imobilizada apresentou melhores atividades enzimáticas em pH alcalinos e em temperaturas mais elevadas, comparadas com a enzima livre. A estabilidade operacional, a de armazenamento e termoestabilidade não foram significativas. As melhores remoções do EE2 para os ensaios nos erlenmeyers foram de 79,22% e 75,0% para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente. Enquanto os ensaios realizados no reator mostraram remoções de 99,23% por adsorção na *Luffa cylindrica* e 73,14%, por degradação pela enzima imobilizada. Contudo, se faz necessário otimizar o processo de imobilização, bem como o ensaio no reator para que haja aumento da degradação do EE2.

Palavras-chave: etinilestradiol, enzima lignolítica, *Pleurotus ostreatus*, fibras lignocelulósicas, bucha vegetal.

ABSTRACT

The 17 α -ethinylestradiol (EE2) is a synthetic estrogen used in contraceptive and hormone replacement therapies; is an environmental contaminant potential, it is not completely removed in sewage treatment plants, reaching the aquatic environment, with the aggravating factor interfere the endocrine system of humans and other animals. For this reason there is great interest in the removal of EE2 present in wastewater, surface water and groundwater. Thus the use of laccase for this purpose may be promising because of low specificity of this enzyme to the substrate. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of laccase produced by the fungus *Pleurotus ostreatus* immobilized in *Luffa cylindrica* (loofah) fibers in EE2 degradation. Therefore the best means for production of laccase and the best conditions of pH and temperature were investigated. The immobilization process was realized and removal of the EE2 assay was conducted in flasks and in a batch reactor. Thus, the best means for producing laccase were Potato Dextrose and Potato Dextrose Modified with guariroba straw. Readings taken with 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid) - ABTS revealed best pH between 3.6 and 4.6 and optimal band temperature between 30 and 50 °C for free and immobilized enzymes. The laccase produced in both media had an apparent molecular mass of 40 kDa. The best conditions found for the immobilization process were glutaraldehyde concentration of 2% and reaction with the support 1 hour under stirring (120 rpm); drying the loofah prior to the reaction with glutaraldehyde; time of 24 hours of immobilization. The immobilized enzyme showed best enzymatic activity in alkaline pH, and at higher temperatures, compared to the free enzyme. The operational stability, storage and thermostability were not significant. Best removals for tests in flasks were 79.22% and 75.0% for free and immobilized enzyme, respectively. As the tests carried out in the reactor showed removal by adsorption of 99.3% and 73.14% in the *Luffa cylindrica*, the immobilized enzyme. However, it is necessary to optimize the immobilization process, as well as the test in the reactor to increase the degradation EE2.

Keywords: ethinylestradiol, lignolytic enzyme, *Pleurotus ostreatus*, lignocellulosic fibers, loofah.



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Monike Fabiane Alves Ribeiro Lacerda				
CPF:	032.853.071-96	E-mail:	monikefabiane@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo Empregatício do autor	Estudante				
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior			Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	GO	CNPJ:	
Título:	Degradação de hormônio sintético por meio de lacases fúngicas imobilizadas em fibras de <i>Luffa cylindrica</i>				
Palavras-chave:	Ethinilestradiol, enzima lignolítica, <i>Pleurotus ostreatus</i> , fibras lignocelulósicas, bucha vegetal.				
Título em outra língua:	Degradation of synthetic hormone by fungal laccases immobilized on <i>Luffa cylindrica</i> fibers				
Palavras-chave em outra língua:	Ethinylestradiol, lignolytic enzyme, <i>Pleurotus ostreatus</i> , lignocellulosic fibers, loofah				
Área de concentração:	Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental				
Data defesa:	24/09/2015				
Programa de Pós-Graduação:	Engenharia do Meio Ambiente				
Orientador(a):	Mariângela Fontes Santiago				
CPF:		E-mail:	mariangela.f.s@gmail.com		
Co-orientador(a):	Flávio Marques Lopes				
CPF:		E-mail:	Flaviomarques.ufg@gmail.com		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 30 / 11 / 2015

Assinatura do(a) autor(a)

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Pico de atividade enzimática.....	44
Gráfico 2 - Variação do pH de reação para a lacase nas formas livre e imobilizada utilizando o ABTS como substrato. Tempo de reação de 5 minutos.....	48
Gráfico 3 - Variação do pH de reação para a lacase nas formas livre e imobilizada utilizando o guaiacol como substrato. Tempo de reação de 5 minutos.....	48
Gráfico 4 - Variação do pH de reação para a lacase nas formas livre e imobilizada utilizando a seringaldazina como substrato. Tempo de reação de 5 minutos.....	49
Gráfico 5 - Variação da temperatura de reação e efeito sobre a atividade enzimática da lacase nas formas livre e imobilizada. Tempo de reação de 5 minutos.....	51
Gráfico 6 - Tratamentos do suporte com glutaraldeído para o processo de imobilização.....	54
Gráfico 7 - Variação da concentração do glutaraldeído no processo de imobilização.....	55
Gráfico 8 - Rendimento de imobilização antes e após a secagem do suporte por 24 horas a 60 °C.....	56
Gráfico 9 - Variação do tempo de imobilização de lacase em <i>Luffa cylindrica</i>	57
Gráfico 10 - Análise da estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada.....	58
Gráficos 11 - Análise da estabilidade térmica da lacase livre e imobilizada. A - produzida no meio BD. B - produzida no meio BDM.....	59
Gráfico 12 - Análise da porcentagem de remoção de EE2 após ciclos de reuso.....	61
Gráfico 13 - Curva de calibração - etinilestradiol.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do 17a-Etinilestradiol.....	21
Figura 2 - Esquema da oxidação do substrato pela lacase transformando O ₂ em H ₂ O.....	25
Figura 3 - Ciclo catalítico da oxidação do substrato pela lacase.....	25
Figura 4 - Métodos de imobilização de enzimas.....	28
Figura 5 - Biorreator (Fermenteste MS Tecnopon).....	42
Figura 6 - Massa molecular lacase produzida nos meios BD e BDM.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tecnologias e processos aplicados na remoção e/ou degradação do etinilestradiol.	23
Quadro 2 - Aplicações da <i>Luffa cylindrica</i> com células imobilizadas.	30
Quadro 3 - Suportes utilizados para imobilização de lacase.	31
Quadro 4 - Meios de cultura utilizados no cultivo do <i>Pleurotus ostreatus</i> e na obtenção de lacase.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituintes do gel de corrida, gel concentrador e tampão de amostra.	37
Tabela 2 - Atividade Enzimática meio BD com e sem o acréscimo da enzima catalase.	46
Tabela 3 - Porcentagem de proteína do extrato bruto retida no suporte.	47
Tabela 4 - Média das áreas e das concentrações de EE2 obtidas nas determinações em CLAE.	62
Tabela 5 - Porcentagem de remoção do EE2 pela lacase livre e imobilizada do meio BD em diferentes pH.	63
Tabela 6 - Média das áreas e das concentrações de EE2 obtidas nas determinações em CLAE.	64
Tabela 7 - Porcentagem de remoção do EE2 pela lacase livre e imobilizada dos meios BD e BDM pH 5.	64
Tabela 8 - Análise da porcentagem de remoção do EE2 pela lacase livre e imobilizada empregadas em reator de leito fluidizado.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
ABTS	2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothializone-6-sulfonic acid)
ANOVA	Análise de Variância
BC	Biorreator Convencional
BM	Biorreator de Membrana
BioMnOx	Biogênio de Óxido de Manganês
BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Ágar
BDM	Batata Dextrose Modificado
Cd	Cádmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
Cu	Cobre
CuSO₄	Sulfato de Cobre
DRM	Divisão de Recursos Microbianos
EE2	17 α -Ethinilestradiol
EM	Extrato de Malte
EMM	Extrato de Malte Modificado
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ETI	Estação de Tratamento de Esgoto Industrial
F	Fotocatálise
F_c	Valor de F crítico
FEA	Fotocatálise Eletroquimicamente Assistida
H⁺	Hídron

H₂O	Molécula da Água
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
kDA	kilodalton
LC/DAD	Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos
NaOH	Hidróxido de Sódio
(NH₄)₂S₂O₈	Persulfato de Amônio
O₂	Oxigênio Molecular
Pb	Chumbo
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA	Lacase-poli (ácido láctico-co-glicólico)
POE	Poluente Orgânico Emergente
R	Rendimento de Imobilização
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TiO₂	Dióxido de Titânio
U.min⁻¹	Unidade de Enzima
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/ Visível
V	Volts
WO₃	Trióxido de Tungstênio
Zn	Zinco

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE GRÁFICOS	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	10
LISTA DE QUADROS	11
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
4.1. Hormônio - 17 α -Ethinilestradiol.....	21
4.2. Enzimas – <i>Lacase</i>	24
4.3. Imobilização de enzimas.....	27
4.4. Suportes – <i>Luffa cylindrica</i>	29
4.5. Biorreatores com enzimas imobilizadas	32
5. METODOLOGIA	34
5.1. Meios de Cultura.....	34
5.2. Origem e manutenção do fungo.....	34
5.3. Obtenção do extrato bruto.....	35
5.4. Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada.....	35
5.5. Determinação da proteína no extrato bruto.....	36
5.6. Determinação da massa molecular - eletroforese	36
5.7. Análise dos parâmetros de reação sobre a atividade da lacase livre e imobilizada (pH e temperatura)	37
5.8. Preparo da <i>Luffa Cylindrica</i>	38
5.9. Imobilização do extrato bruto em <i>Luffa Cylindrica</i>	38
5.10. Condições de imobilização.....	38

5.10.1.	Efeito do tratamento com glutaraldeído	38
5.10.2.	Efeito da concentração do glutaraldeído	39
5.10.3.	Efeito da secagem da bucha.....	39
5.10.4.	Efeito do tempo de imobilização	39
5.11.	Determinação do rendimento da imobilização.....	39
5.12.	Análise da estabilidade da enzima imobilizada: armazenamento e termoestabilidade	40
5.13.	Preparo da solução de etinilestradiol.....	40
5.14.	Análise do uso repetido da enzima imobilizada.....	40
5.15.	Remediação	41
5.16.	Teste em biorreator.....	41
5.17.	Detecção e quantificação do etinilestradiol.....	43
5.18.	Análise estatística.....	43
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
6.1.	Seleção do meio de cultura	44
6.2.	Atividade da enzima livre	45
6.3.	Determinação de proteína totais	46
6.4.	Influencia do pH e da temperatura na atividade da lacase livre e imobilizada.....	47
6.4.1.	Variação do pH de reação sob diferentes substratos	47
6.4.2.	Variação da temperatura de reação.....	51
6.5.	Determinação da massa molecular	53
6.6.	Parâmetros de imobilização	53
6.6.1.	Tratamento com glutaraldeído.....	53
6.6.2.	Concentração do glutaraldeído	54
6.6.3.	Secagem da bucha	55
6.6.4.	Tempo de imobilização	56
6.7.	Análise da estabilidade do sistema	57
6.7.1.	Estabilidade de armazenamento	57
6.7.2.	Estabilidade térmica	59
6.8.	Ensaio de uso repetido	60
6.9.	Remediação.....	61
6.10.	Teste em biorreator.....	65
7.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	68
7.1.	Conclusões	68

7.2. Sugestões	69
8. REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	82

1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a poluição e escassez da água na atualidade é fundamentada pela importância deste recurso para a sobrevivência do homem e para o equilíbrio de todos os ecossistemas. Portanto, o lançamento contínuo de contaminantes nos corpos hídricos e a remoção incompleta dos mesmos pelas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) podem causar efeitos adversos à saúde humana e animal (FERNANDES et al., 2011).

Dentre estes contaminantes, existem os micropoluentes orgânicos, substâncias que mesmo em pequenas concentrações são capazes de causar efeitos sobre os sistemas em que são introduzidos. O estudo destas se tornou um dos campos de destaque da química ambiental. Dentro deste grupo, que compreende milhares de compostos, os interferentes endócrinos vêm se destacando em importância, pois são substâncias capazes de interferir na síntese, secreção, transporte, recepção, ação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo (REIS FILHO, 2006; USEPA, 1998).

O 17α -etinilestradiol (EE2) é classificado como um interferente endócrino e constitui um dos compostos que representam ameaças quando presentes nos corpos hídricos. O EE2 é um hormônio sexual sintético, criado para ser utilizado na contracepção e em terapias de reposição hormonal (MELO et al., 2009).

Este hormônio chega ao ambiente aquático por meio dos efluentes domésticos e industriais e, comparado a outros compostos orgânicos, como alguns pesticidas, possuem meia-vida relativamente curta. No entanto, a constante introdução deste composto no meio ambiente lhe concede um caráter de persistência, causando contaminação do ambiente aquático (REIS FILHO, 2006).

Devido a esta persistência, o EE2 já foi encontrado em rios da Alemanha, Canadá, Brasil, China, Portugal e Argentina (HINTEMANN et al., 2006; RAO et al., 2013; ROCHA et al., 2013; DIAS et al., 2015; VALDÉS et al., 2015) e estudos mostram a responsabilidade deste composto na feminilização e interferências no sistema reprodutor de peixes, dentre outras alterações (DOYLE et al., 2013; COLLI-DULA et al., 2014; BACTRUP; HENRIKSEN, 2015).

O EE2 não confere cor e cheiro a água e a tarefa de modelar o comportamento deste no ambiente aquático é bastante complexa, pois cada meio receptor possui particularidade em suas propriedades físicas e químicas, tais como turbidez, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido, radiação, matéria orgânica e concentração de diversas outras substâncias. Assim, a necessidade em remover este contaminante do sistema aquático encoraja a busca de

novas tecnologias e processos de tratamento, que possam promover a remoção do EE2 antes do efluente ser direcionado aos recursos hídricos (MELO et al., 2009).

O uso de enzimas nos processos de tratamento de efluentes pode ser vantajoso, pois as enzimas proporcionam menor consumo de energia nestes processos, por serem catalisadores versáteis. A lacase, uma enzima oxidoreductase, se mostra promissora para este fim, devido sua baixa especificidade e sua eficácia na degradação de compostos recalcitrantes (DEMARCHE et al., 2012).

Para que a lacase possa ser usada em processos de tratamento contínuos, é interessante que se promova a viabilidade de reuso e que lhe conceda maior estabilidade. Assim, esses objetivos podem ser alcançados por meio da imobilização, onde a lacase é fixada em um suporte. Este processo permite ainda, menor perda de enzima para o meio durante o tratamento.

Devido a estes fatores, o enfoque deste trabalho foi promover a remoção do hormônio sexual sintético EE2, por degradação utilizando a enzima lacase imobilizada em um suporte orgânico.

2. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a comercialização de pílulas anticoncepcionais se iniciou na década de 60. A divulgação das pílulas como método contraceptivo moderno fez parte de políticas internacionais voltadas para a redução da população (PEDRO, 2003). Na formulação destas pílulas o estrogênio bioativo EE2 é bastante utilizado combinado com outros hormônios sintéticos.

Desde então, o EE2 chega às ETE após a excreção metabólica na forma de efluente bruto, onde passam por processos convencionais de tratamento. No entanto, a detecção deste composto em esgoto doméstico, águas superficiais e subterrâneas em concentrações na faixa de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$ mostram que não há completa remoção deste nas ETEs (MELO et al., 2009).

Portanto, a importância deste trabalho está relacionada ao fato da ocorrência do EE2 em recursos hídricos ser uma questão de relevância ambiental, pois este composto apresenta elevado potencial estrogênico e está presente na maioria das formulações de contraceptivos orais. Assim, ele é introduzido de forma constante no meio hídrico e não é removido eficientemente pelos tratamentos convencionais de esgoto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia da lacase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* immobilizada em fibras de *Luffa cylindrica* (bucha vegetal) para a degradação do hormônio sintético etinilestradiol.

3.2. Objetivos específicos

- Selecionar o meio de cultivo para o fungo *Pleurotus ostreatus* que proporcione a máxima produção de lacase;
- Determinar os efeitos do pH, da temperatura e do substrato para a atividade enzimática de lacase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* e para a lacase immobilizada em fibras de *Luffa cylindrica*;
- Realizar o processo de imobilização da lacase em fibras de *Luffa cylindrica* e avaliar a ação da lacase, tanto livre quanto immobilizada, na degradação do etinilestradiol;
- Avaliar o potencial da lacase immobilizada em *Luffa cylindrica* na degradação do etinilestradiol em um reator em batelada.

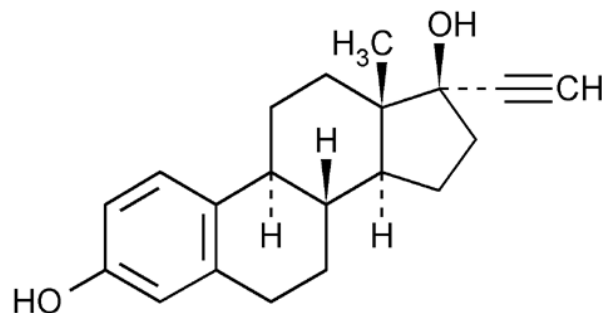
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Hormônio - 17 α -Ethinilestradiol

O hormônio é uma substância que percorre um tecido, de onde é liberado para a corrente sanguínea para alcançar as células alvos, lugar em que exercerá seus efeitos específicos. Dentre as classes dos hormônios existem os esteroides, que são derivados do colesterol e são divididos em cinco classes: progestagênicos, estrogênicos, glicocorticoides, mineralocorticoides e androgênios (DURAN; AMARAL FILHO; AMARAL, 2010).

Os estrogênios são responsáveis pelas características secundárias femininas; sendo produzidos em grande parte pelos ovários, que produzem a estrona, o estriol e o estradiol. Dentre estes hormônios, o estradiol é o de maior relevância no período fértil e de ovulação da mulher (DURAN et al., 2010). O 17 α -Ethinilestradiol (EE2) é um estrogênio sintético utilizado na contracepção e em terapias de reposição hormonal, cuja estrutura química está representada na Figura 1 (LLORET et al., 2010).

Figura 1 - Estrutura química do 17 α -Ethinilestradiol



Fonte: Lloret et al. (2010)

Os estrogênios tanto naturais quanto sintéticos são metabolizados pelo fígado e eliminados na urina e quando não removidos nas Estações de Tratamento de Efluentes (ETE) são lançados no ambiente aquático, tornando-se potenciais contaminantes ambientais. O EE2 está presente também nos efluentes de indústrias farmacêuticas necessitando ser removido na Estação de Tratamento de Efluentes Industriais (ETI) da indústria antes do lançamento nos corpos receptores, pois este mesmo em pequenas concentrações pode interferir no sistema endócrino de seres humanos e de outros animais (MELO et al., 2009).

Os interferentes endócrinos, como EE2, são capazes de perturbar o sistema endócrino dos seres vivos por se ligarem aos receptores específicos dos hormônios

naturalmente presentes no organismo. O sistema endócrino é responsável pelo controle dos processos fisiológicos do corpo humano e animal, portanto, quando moléculas orgânicas presente na corrente sanguínea se ligam a estes receptores específicos poderá ocorrer interferência nos processos reprodutivos, no desenvolvimento e na manutenção da homeostase das células (SODRÉ et al., 2007).

Como já dito, o EE2 deve ser eliminado nas ETE, no entanto ETE convencionais não removem completamente este hormônio. No século passado, Ternes et al. (1999) já identificavam a presença deste composto em ETE da Alemanha, do Canadá e do Brasil. O EE2 foi encontrado em altas concentrações ($483 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) no lodo de quatro distintos tratamentos de estabilização de lodo: digestão anaeróbia, digestão aeróbia, compostagem e tratamento em lagoas. Este lodo oferece potencial risco toxicológico e há necessidade de monitoramento antes de serem aplicados na agricultura (MARTÍN et al., 2015).

O fato dos efluentes serem insuficientemente tratados ou não tratados é um fator a ser analisado, pois o EE2 poderá ser levado às águas superficiais por meio destes efluentes. Para enfatizar, o EE2 foi localizado em rios da Alemanha (HINTEMANN et al., 2006), China (RAO et al., 2013), Portugal (ROCHA et al., 2013); Brasil (DIAS et al., 2015) e Argentina (VALDÉS et al., 2015).

Exemplos da ação do EE2 como interferente endócrino podem ser observados nos trabalhos de diversos autores. Colli-Dulla et al. (2014) verificaram que a exposição de fêmeas do peixe *Micropterus salmoides* ao EE2 provocaram mudanças reprodutivas no corpo e no ovário destes seres aquáticos, além de diminuir o potencial reprodutivo devido a redução da vitelogenina; e Säfholm et al. (2015) constataram que a mistura do EE2 ao hormônio progestagênico levorgenestrel causou a indução da vitelogenina em peixes machos da espécie *Xenopus tropicalis*.

A vitelogenina é uma fosfolipoproteína sintetizada por fêmeas de ovíparos durante o ciclo reprodutivo. Esta proteína é produzida no fígado e secretada na corrente sanguínea, que a transporta para os ovários onde será acumulada nos ovócitos em crescimento, para ser utilizada como reserva nutricional no desenvolvimento de embriões. A codificação do gene desta proteína não existe ou é muito fracamente expressada em indivíduos imaturos e machos, portanto a presença desta no sangue destes organismos é um biomarcador de exposição, pois sua síntese depende da presença de xenoestrógenos (REIS FILHO, 2006).

Outras alterações podem ser destacadas. O peixe *Fundulus heteroclitus* quando exposto ao EE2 apresentou decréscimo de testosterona e intervenção nos processos celulares

associados com lipídeos ocorridos no fígado (DOYLE et al., 2013). O mesmo hormônio quando misturado com a amônia resultou na mortalidade significativa (28,6%) do peixe *Pimephalis promelas* durante uma exposição de 21 dias (ARMSTRONG et al., 2015). Diferenciação na morfologia dos machos do peixe-zebra (*Danio rerio*) expostos ao EE2 também foram constatadas; acontecimento que interveio na reprodução desta espécie devido a rejeição da fêmea aos peixes machos afetados.

Devido às alterações causadas nos seres vivos, existe interesse em promover a remoção do EE2 presente em águas residuárias, superficiais e subterrâneas. O Quadro 1 discrimina métodos desenvolvidos para o tratamento deste composto.

Quadro 1 - Tecnologias e processos aplicados na remoção e/ou degradação do etinilestradiol.

Autor/Ano	Tecnologia e processo utilizado	Resultados
Lloret et al. (2010)	Degradação por lacase comercial de <i>Myceliophthora thermophila</i>	EE2 foi completamente degradado após 15 min de incubação.
Yi et al. (2011)	Biorreatores de Fluxo Contínuo de membrana (BM) convencional (BC)	O BM removeu mais EE2 do que o BC quando as concentrações iniciais foram superiores a 50 mg/L.
Nair; Demarche; Agathos (2013)	Lacase imobilizada em esferas de sílica	Porcentagem de degradação do EE2 de 85 a 95%.
Larcher; Yargeau (2013)	Biodegradação por bactérias heterotróficas	61% do EE2 foi removido pela espécie <i>Rhodococcus</i> . Quando os grupos de bactérias foram misturados a maior remoção foi de 43%.
Zhang; Li (2014)	Oxidação por UV, H ₂ O ₂ e a combinação de UV/H ₂ O ₂	Remoção de 95% de EE2 do resíduo de lodo ativado
Grzybowski; Szydlowski (2014)	Simulador de luz solar	Verificaram que o tempo de meia vida ambiental do EE2 foi de 1 e 2 dias nas camadas superiores das águas de rio e mar, respectivamente
Furgal; Meyer; Bester (2014)	Nanopartículas biogênicas de óxido de manganês (BioMnOx) produzidas por <i>Pseudomonas putida</i>	Remoção completa do EE2 cuja concentração inicial era de 10 µg.L ⁻¹

Quadro 1 - Tecnologias e processos aplicados na remoção e/ou degradação do etinilestradiol (continuação).

Oliveira et al. (2015)	Fotocatálise (F) e Fotocatálise Eletroquimicamente Assistida (FEA) usando eletrodos de TiO ₂ e TiO ₂ /WO ₃ irradiados por um simulador solar	Após 4 horas utilizando a F houve remoção de 35% com TiO ₂ e 45% com TiO ₂ /WO ₃ . Utilizando a FEA a remoção foi de 48 e 54% por TiO ₂ e TiO ₂ /WO ₃ , respectivamente.
-------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Fonte: Autora

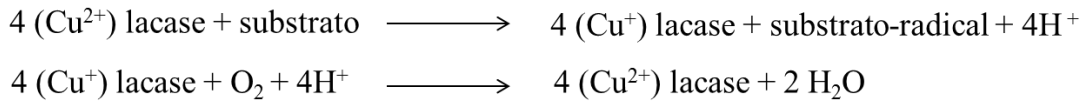
A cromatografia é uma técnica de detecção aceita para o EE2 e outros poluentes orgânicos emergentes (POE) em amostras aquosas. Silva e Collins (2011) em seus estudos sobre Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) destacam que esta é uma técnica chave no monitoramento dos processos de degradação dos POE tanto em ambientes artificiais como nos naturais.

4.2. Enzimas – *Lacase*

As enzimas são catalisadores versáteis com um número crescente de aplicações em biotecnologia. Suas propriedades as tornaram possíveis de serem usadas em processos de tratamento de resíduos e poluentes, e podem ser vantajosas em relação aos tratamentos convencionais já que proporcionam menor consumo de energia. As enzimas oxidoreduzantes são importantes nos métodos de tratamento de água e esgoto, pois catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxirredução. Essas reações são essenciais nos processos de tratamento porque ao promover a redução de uma molécula, gera a oxidação da molécula de interesse (DEMARCHE et al., 2012).

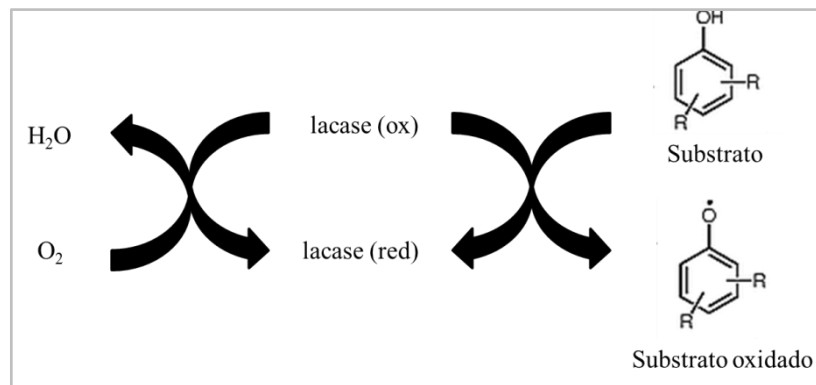
A lacase (p-difenol: dioxigênio oxidoreduzase, EC 1.10.3.2) pertence ao grupo de enzimas chamadas de proteínas de cobre azul ou oxidases de cobre azul. Ela é capaz de oxidar fenóis e aminas aromáticas através da redução de oxigênio molecular a água por um sistema multicobre, resultando na oxidação do hidrogênio do substrato (Figuras 2 e 3). O centro catalítico consiste em três tipos de cobre com diferentes funções: tipo 1 (cobre azul) catalisa a transferência de elétrons, tipo 2 ativa o oxigênio molecular e tipo 3, um dímero de cobre, é responsável pela captação de oxigênio. (THURSTON, 1994; MAYER; STAPLES, 2002).

Figura 2 - Esquema da oxidação do substrato pela lacase transformando O₂ em H₂O.



Fonte: MENALE et al. (2012) - modificado

Figura 3 - Ciclo catalítico da oxidação do substrato pela lacase.



Fonte: MIKOLASCH; SCHAUER (2009) – modificado

Lacases possuem diversas aplicações biotecnológicas. Jadhav e Singhal (2013) utilizaram a lacase conjugada com polissacarídeos para promover a degradação de corantes da indústria têxtil, alcançando 53% de degradação. Lloret et al. (2010) promoveu a degradação de fármacos, tais como anti-inflamatórios e hormônios estrogênicos, com lacase do fungo *Myceliophthora thermophila*, obtendo remoções entre 80 e 100%. Outros autores (TOUAHAR et al., 2014; UEDA et al., 2012) alcançaram eficiente degradação de fármacos utilizando lacase. Esta enzima também foi utilizada na oxidação de fenóis (RANGELOV; NICELL, 2015).

O primeiro relato sobre a lacase foi feito por Yoshida (1883) que descobriu essa nova enzima em seus estudos sobre as propriedades químicas do exsudado da árvore de laca japonesa *Rhus vernicifera*. Hoje se sabe que esta enzima é amplamente distribuída em fungos de decomposição da madeira. A lacase é também encontrada em uma variedade de fungos e insetos, bem como algumas plantas e bactérias (MIKOLASCH; SCHAUER, 2009).

Fungos basidiomicetos, incluindo os fungos de decomposição branca, são as principais fontes de lacase; estas são particularmente atrativas para a remoção de micropoluentes como o plastificante bisfenol A, o anti-inflamatório diclofenaco e o hormônio esteroide EE2. Estes contaminantes de traço orgânico são suspeitos de causar efeitos adversos à saúde de humanos e outros animais. Estudos têm aplicado com êxito tanto células inteiras

como as enzimas extracelulares destes fungos para remover os contaminantes em fase aquosa (NAIR; DEMARCHE; AGATHOS, 2013; YANG et al., 2013).

Dentre os fungos de decomposição branca encontra-se o *Pleurotus ostreatus*, um importante cogumelo comestível e um organismo modelo na degradação da lignina, cujo genoma contém nove genes de peroxidases ligninolíticas, característica de fungos de decomposição branca. Com capacidade de produzir enzimas, é um potencial agente da digestão de compostos recalcitrantes, e ainda se adapta aos diversos tipos de resíduos ou subprodutos agrícolas e agroindustriais, podendo ser cultivado com sucesso em diferentes substratos ligninolíticos (FERNÁNDEZ-FUEYO et al., 2014; MANTOVANI et al., 2012).

Para aumentar a produção de lacase são utilizadas substâncias denominadas indutores, tais como os compostos aromáticos ou fenólicos relacionados à lignina ou derivados da lignina. Fungos de decomposição branca são conhecidos por darem diferentes respostas aos indutores de lacase, refletindo possivelmente vários papéis fisiológicos desta enzima entre os fungos; um mesmo indutor pode aumentar a produção de lacase em uma determinada espécie de fungo, porém pode não causar nenhum efeito em outra espécie. No entanto, não existe um ótimo indutor de lacase comum a todos os fungos, isto dependerá do fungo estudado (MANN et al., 2015; GARCIA; SANTIAGO; ULHOA, 2006).

Algumas das substâncias utilizadas como indutores são a 2,5-xilidina (MOLDES et al., 2012; GARCIA; SANTIAGO; ULHOA, 2006), sulfato de cobre (SILVA et al., 2012a) e ácido ferúlico (ZUCCA et al., 2011), porém estes indutores são tóxicos; e por isso, com uma visão voltada à sustentabilidade, diversos resíduos agrícolas têm sido avaliados como potenciais indutores de enzimas lignocelulósicas, com destaque a indução de lacase, tais como: palha de trigo (PARENTI et al., 2013), bagaço de cana de açúcar (KARP et al., 2012), palha de arroz, palha de gergelim, serragem, farelo de milho (KURT; BUYUKALACA, 2010), talos de uva e sementes de uva (MOLDES et al., 2012).

A linhagem dos fungos *Pleurotus* responde eficazmente quando cultivado em meios contendo resíduos agroindustriais. Em relação ao crescimento micelial, Sales Campos et al. (2011) observaram acréscimo de 33,33 mm a 81,00 mm, quando o fungo foi cultivado em meios contendo resíduos de marupá, cajuí e banana. Mantovani et al. (2012) verificaram que a presença de resíduos agrícolas promove o aumento da produção enzimática de lacase; quanto menor a granulometria da resíduo, maior a produção de lacase.

4.3. Imobilização de enzimas

A imobilização de uma enzima é a interação de duas espécies, a enzima e o suporte. É realizada com o objetivo de ampliar a sua aplicabilidade laboratorial e industrial e garantir o seu (re) uso em processos produtivos. A imobilização pode ajudar a resolver o problema de instabilidade enzimática e auxilia no emprego de enzimas em diferentes solventes, em condições extremas de pH e temperatura e a altas concentrações de substrato (HANEFELD, GARDOSI; MAGNER, 2009).

A utilização de enzimas tem como vantagens o menor risco de contaminação, não necessitando ter o custo adicional do suporte e não tendo perda de atividade enzimática devido ao processo de imobilização. No entanto, as vantagens imediatas da técnica de imobilização de enzimas são a possibilidade de reaproveitamento da enzima, o uso de processos contínuos e o aumento da estabilidade da enzima (VITOLLO, 2001).







Desde a década de 1960 as enzimas imobilizadas têm sido empregadas em diversos segmentos, incluindo a síntese de compostos bioativos e de novos biopolímeros, construção de biossensores, terapia enzimática e processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, papel e celulose, têxtil e cosméticos (MENDES et al., 2011a).

Segundo Hanefeld, Gardossi e Magner (2009) não existe um método geral de imobilização que possa ser aplicado a qualquer enzima, portanto se faz necessária a realização de diversas tentativas até se encontrar um sistema satisfatório. Os métodos de imobilização mais empregados são:

- Adsorção não covalente e deposição;
- Adsorção via interações iônicas;
- Ligação covalente;
- Ligação cruzada; e
- Aprisionamento em gel ou cápsula polimérica.

Os vários métodos de imobilização empregados baseiam-se nas ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. A Figura 4 ilustra os principais métodos de imobilização de enzimas (CARDOSO; MORAES; CASS, 2009).

Figura 4 - Métodos de imobilização de enzimas.

Métodos de Imobilização de Enzimas					
Enzimas Encapsuladas		Enzimas Ligadas			
Em Matriz Polimérica	Em Microcápsula	Ligação Covalente	Ligação Cruzada	Adsorção Física	Adsorção Iônica
					

Fonte: CARDOSO; MORAES; CASS (2009), modificado.

O método de ligação covalente será o utilizado neste trabalho, pois possui uma força de ligação elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima proporcionando uma rigidez na estrutura da mesma, que pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes. Este tipo de imobilização se inicia com a modificação do suporte por meio de reações de ativação, onde os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos. O glutaraldeído é um dos reagentes utilizado na ativação do suporte e/ou como braço espaçador (MATEO et al., 2007; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

A ligação covalente pode ser aplicada em várias situações, pois existem diversos suportes com grupos funcionais capazes de promovê-la ou suscetíveis a ativá-la. Esse método tem como vantagem promover ao biocatalisador maior resistência quanto à variação de pH, temperatura e frente a solventes orgânicos; e também promover o emprego em diversos tipos de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, batelada e leito fluidizado. (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011, MATEO et al., 2007; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

Como a lacase possui baixo grau de especificidade em relação ao substrato redutor é capaz de degradar diversos micropoluentes, no entanto para a sua aplicação em processos contínuos de tratamento de água é indispensável promover a imobilização da mesma. A forma imobilizada da lacase pode ser de grande interesse, visto que o substrato se transforma na única fonte de oxigênio molecular no único acceptor de elétrons e isto é indispensável para a reação enzimática (HUBLIC; SCHINNER, 2000; NAIR; DEMARCHE; AGATHOS, 2013).

4.4. Suportes – *Luffa cylindrica*

As propriedades da superfície da enzima e do suporte são importantes para a imobilização e quando necessário é preciso preparar o suporte (HANEFELD, GARDOSI; MAGNER, 2009).

Há diversos materiais inertes relatados na literatura que podem ser usados para imobilizar enzimas (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). A natureza destes suportes pode variar de materiais geliformes a superfícies sólidas. Os suportes podem ser classificados quanto a composição (orgânicos, inorgânicos e híbridos) e quanto a porosidade (não poroso, microporoso, mesoporoso e macroporoso).

Os suportes orgânicos são os materiais mais utilizados, podendo ser naturais ou sintéticos. Os suportes sintéticos podem formar um suporte ideal ao combinar suas características que são as variedades de formas físicas e estruturas químicas, porém os naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos como baixo custo e facilidade de degradação, acarretando em menor dano ao meio ambiente (MENDES et al., 2011b).

Entre os suportes orgânicos, as fibras naturais lignocelulósicas possuem grande atrativo por serem biodegradáveis, renováveis, terem geralmente baixo custo e produzirem menor desgaste nos equipamentos de fabricação quando comparadas com as fibras sintéticas. Entretanto, estas têm o inconveniente da falta de adesão com matrizes poliméricas, necessitando de tratamento físico ou químico para melhorar esta característica (D'ALMEIDA et al., 2005).

A *Luffa cylindrica* pertence ao grupo das fibras naturais lignocelulósicas; cresce bem nos climas tropical e subtropical, como o clima do Brasil, e é produzida em grande quantidade na África e Ásia. Ela é leve, cilíndrica e apresenta naturalmente uma arquitetura entrelaçada e altamente porosa, com potencial de uso como suporte em imobilização (OGBONNA et al., 1997).

Ogbonna et al. (1994) foram pioneiros na utilização da *Luffa cylindrica* como suporte para imobilização. Para tal estudaram as variações na forma, estrutura e textura deste material frente às variações de pH e repetitividade de autoclavagens, não encontrando variações visíveis. Os autores concluíram que células imobilizadas em *Luffa cylindrica* podem ser usadas em diversos valores de pH e posteriormente podem ser lavadas, autoclavadas e usadas novamente por várias vezes.

Na literatura há poucos relatos sobre a utilização de fibras lignocelulósicas para a imobilização de enzimas; neste contexto pode-se citar os trabalhos de Morais et al. (2013) que imobilizaram a enzima α -Amylase em *Luffa operculata* com o objetivo de hidrolisar o amido, e de Poças et al. (2004) que imobilizaram a enzima invertase em *Luffa cylindrica* para produção de xarope de açúcar invertido.

Geralmente a *Luffa cylindrica* é utilizada como suporte para imobilização de células, visando diferentes aplicações, como está discriminado no Quadro 2. Em relação a lacase são utilizados diversos tipos de suportes para sua imobilização, como descrito no Quadro 3. Dentre estes, os materiais provenientes de resíduos agrícolas têm adquirido espaço, pois são constituídos de lignocelulose e podem reduzir custos no processo de imobilização (SONGULASHVILI et al., 2012; BEZERRA et al., 2015).

Quadro 2 - Aplicações da *Luffa cylindrica* com células imobilizadas.

Autor/Ano	Microrganismo utilizado	Aplicação
Ogbonna et al. (1994)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de etanol
Saratale et al. (2011)	<i>Proteus vulgaris</i>	Descoloração de corante
Pazzetto et al. (2011)	<i>Bacillus firmus</i>	Produção de dextrina
Meleigy; Khalaf (2009)	<i>Fusarium moniliforme</i>	Biossíntese de ácido giberélico
Fernández et al. (2009)	<i>Pleurotus ostreatus,</i> <i>Trametes versicolor,</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Remoção de corante
Urioste; Medeiros; Castro (2002)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Obtenção de xarope de açúcar invertido
Mazmanci; Unyayar (2005)	<i>Funalia troggi</i>	Descoloração de corante
Iqbal; Edyvean (2005)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Remoção de Cd(II) em solução aquosa
Saeed; Iqbal; Zafar (2009)	<i>Trichoderma viride</i>	Biosorção de metileno
Iqbal; Edyvean (2004)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Biosorção de metais pesados Pb(II), Cu(II) e Zn(II) em solução aquosa

Quadro 2 - Aplicações da *Luffa cylindrica* com células imobilizadas. (continuação).

Ganguly; Dwivedi; Singh (2007)	<i>Rhizopus oryzae</i>	Produção de ácido láctico
Chen et al. (2014)	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Biosorção de Cd
Amin; Mohamed (2012)	<i>Aspergillus terreus</i>	Produção de sapogenol de soja B
Ferrarezi et al. (2014)	<i>Thermomucor indicae</i>	Produção de lipases

Fonte: Autora

Quadro 3 - Suportes utilizados para imobilização de lacase.

Autor/Ano	Suporte	Técnica de imobilização	Aplicação
Karagoz et al. (2011)	Micropérolas de poli(vinilamina)	Ligação covalente	Degradação de corantes
Cabana, Ahamed, Leduc (2011)	Quitossana	Ligação Cruzada	Eliminação de triclosan
Silva et al. (2012a)	Bagaço de cevada	Adsorção e ligação covalente	—
Lloret et al. (2012)	Eupergit® C	Ligação covalente	Remoção de estrona, estradiol e etinilestradiol
Vinoth Kumar et al. (2012)	Enzimas agregadas por ligação cruzada	Ligação Cruzada	Descoloração de corantes
Sathishkumar et al. (2012)	Nanofibras de lacase-poli (ácido láctico-co-glicólico) - PLGA	Ligação covalente	Transformação de diclofenaco
Liu et al. (2012)	Compostos magnéticos mesoporosos à base de carbono	Adsorção	Remoção de fenol e clorofenol
Wang et al. (2012)	Nanopartículas de sílica mesoporosas magnéticas	Adsorção por afinidade de metal	Degradação de fenol
Songulashvili et al. (2012)	Beads de sílica	Ligação covalente	Eliminação de micropoluentes desreguladores endócrinos
Tavares et al. (2013)	Sílica modificada	Ligação Cruzada	
Xu et al. (2013)	Compósito quitossana / álcool polivinílico	Ligação Cruzada	Remoção de 2,4-diclorofenol

Quadro 3 - Suportes utilizados para imobilização de lacase. (continuação).

Xu et al. (2014)	Membranas nanofibrosas de vinil modificado	Ligação covalente	Remoção de triclosan
Daâssi et al. (2014)	Alginato de cálcio	Encapsulamento	Biodegradação de corantes têxteis
Zhang et al. (2014)	Poliestireno	Adsorção	Descolorização de corante
Skoronski et al. (2014)	Quitosana	Ligação Cruzada	Bioconversão de compostos fenólicos
Pacheco; Soares (2014)	Quitosana ativada com glutaraldeído	Ligação Cruzada	Biodegradação de efluente da indústria papelreira
Bezerra et al. (2015)	Fibra de coco verde	Ligação covalente	Clarificação de suco de maçã
Xu et al. (2015)	Membrana composta por nanotubos de carbono de paredes múltiplas/ quitosana/ álcool polivinílico	Ligação covalente	Degradação de diclofenaco
Rahmani et al. (2015)	Beads porosas de sílica	Ligação Cruzada	Remoção de sulfatiazol e sulfametoxazol

Fonte: Autora

4.5. Biorreatores com enzimas imobilizadas

Biorreatores são reatores químicos nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores (enzimas ou células vivas). Os biorreatores são classificados em dois grupos: reatores enzimáticos e reatores biológicos; no primeiro as reações ocorrem na ausência de células vivas, enquanto no segundo as reações ocorrem na presença destas (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A princípio, apenas os reatores em batelada eram utilizados com enzimas, pois estas se dispunham apenas na forma livre ou solúvel. Com o aparecimento das enzimas imobilizadas, surgiu a possibilidade de se utilizar outros tipos de reatores, sendo eles: reator de fluxo contínuo, reator de leito fixo e reator de leito fluidizado (VITOLLO, 2001).

Neste trabalho foi utilizado um reator em batelada (Fermenteste MS Tecnopon), cuja agitação da enzima imobilizada foi realizada com a injeção de ar. O reator em batelada não admite entrada e nem saída de reagentes ou produtos durante o processamento da reação, portanto os reagentes devem ser introduzidos no reator de uma só vez e em seguida devem ser

misturados para reagirem entre si. Após a reação, os produtos também serão descarregados de uma só vez (SCHMAL, 2010).

Na literatura estão descritas diversas aplicações de reatores utilizando enzimas ou células imobilizadas, com a produção de açúcar invertido e frutooligossacarídeos (LORENZONI et al., 2015); produção de hidrogênio (SHIDA et al., 2012; REIS; SILVA, 2011); síntese de butirato de geranilo (DAMNJANOVIC et al., 2012); formação de oligossacarídeos prebióticos (BERENSMEIER et al., 2004) e fermentação de etanol (LIU; WANG; OUR-YANG, 2009).

Os reatores também são utilizados no tratamento de efluentes. Gómez et al. (2007) imobilizou peroxidase em suporte de vidro para operar em um reator de leito fluidizado visando a remoção de fenol. Esse tipo de reator também foi empregado na remoção de Bisfenol A (MITA et al., 2015) e na remoção do corante reativo 5 (FERNÁNDEZ et al., 2009).

Pesquisas mostram a utilidade dos reatores com lacases imobilizadas. Lloret et al. (2012) imobilizou lacase em Eupergit[®] C e investigou a viabilidade de usá-las em reator para remoção de estrogênios. A lacase também foi imobilizada em poliacrilonitrila para remoção de clorofenóis em reator (MENALE et al., 2012). Pode-se citar ainda o uso de reatores com lacase imobilizada para remoção da atividade estrogênica de nonilfenol e octilfenol (CAPTANE et al., 2013) e na degradação de fenol de efluente de cozinha (WANG et al., 2012).

5. METODOLOGIA

5.1. Meios de Cultura

Para o cultivo do fungo *Pleurotus ostreatus* e obtenção de lacase foram utilizados os meios de cultura indicados no Quadro 4.

Quadro 4 - Meios de cultura utilizados no cultivo do *Pleurotus ostreatus* e na obtenção de lacase.

Meio de Cultura	Composição	Preparo
Ágar Batata Dextrose – BDA (Himedia M096)	<ul style="list-style-type: none"> Dextrose (2,0% - p/v) Ágar (1,5% - p/v) Infusão de Batata (20,0% - v/v) 	Diluir 39 g do meio BDA em 1000 mL de água destilada.
Batata Dextrose – BD	<ul style="list-style-type: none"> Dextrose (0,5% - p/v) Caldo de Batata Cozida (20,0% - v/v) 	Diluir a dextrose no caldo de batata cozida e completar o volume para 1000 mL com água destilada.
Batata Dextrose Modificado – BDM	<ul style="list-style-type: none"> Dextrose (0,3% - p/v) Caldo de Batata Cozida (20,0% - v/v) Palha de Guariroba (1,0% - p/v) 	Diluir a dextrose no caldo de batata cozida e completar o volume para 1000 mL com água destilada. Posteriormente, acrescentar a palha de guariroba.
Extrato de Malte – EM (Himedia RM004B)	<ul style="list-style-type: none"> Extrato de grãos germinados de malte 	Diluir 1,25 g de extrato de malte em 100 mL de água destilada.
Extrato de Malte Modificado – EMM	<ul style="list-style-type: none"> Extrato de grãos germinados de malte Sulfato de cobre CuSO₄ (0,0005% - p/v) 	Diluir 1,25 g de extrato de malte e 0,0005 g de CuSO ₄ em 100 mL de água destilada.

Fonte: Autora

Todos os meios foram autoclavados a 120 °C durante 20 minutos.

5.2. Origem e manutenção do fungo

A linhagem de *Pleurotus ostreatus* (sem registro), utilizada neste trabalho, pertence à coleção do Laboratório de Enzimologia e Biotecnologia Ambiental da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG), obtida junto a Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (DRM/CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O fungo foi mantido em placas de Petri contendo o meio BDA durante 10 dias, à 28 °C, para seu crescimento. Posteriormente, as placas com o fungo foram armazenadas a 4 °C e repicado bimestralmente para a manutenção das culturas.

5.3. Obtenção do extrato bruto

Quando utilizados os meios BD, EM e EMM, cinco discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram retirados da periferia da placa de Petri com o fungo em meio BDA, armazenadas conforme o item anterior, e foram adicionados à erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura. Os fungos, acondicionados nos erlenmeyers, foram cultivados a 28 °C, sob agitação constante de 120 rpm, por 5 dias (Incubadora Refrigerada com Agitação, Tecnal TE – 421). Para o meio BDM, o mesmo procedimento foi adotado, porém o volume de meio de cultura utilizado foi de 60 mL e o cultivo se estendeu por 7 dias. Terminados os dias de cultivo, o extrato bruto foi filtrado à vácuo (bomba TE-0581 – Tecnal) em papel de filtro e armazenado a – 4 °C.

5.4. Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação do substrato após 5 minutos de reação. Para a enzima livre o ensaio utilizando o 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolone-6-sulfonic acid) - ABTS 98% (Sigma A1888) como substrato, foi acrescentado 800-890 µL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 3,6 - 4,0; 10-100 µL do extrato bruto e 100 µL de ABTS 5 mmol.L⁻¹ para iniciar a reação; enquanto que para a enzima imobilizada a proporção dos reagentes foram: 4 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 3,6 - 4,0; 100 mg de *Luffa cylindrica* contendo extrato bruto imobilizado (enzima imobilizada) e 0,5 mL de ABTS 5 mmol.L⁻¹. A oxidação do substrato foi acompanhada espectrofotometricamente (Spectrum SP – 2000UV) a 420 nm.

Na determinação enzimática, utilizando o ABTS como substrato, foram realizados experimentos com o extrato bruto pré-incubado com a enzima catalase por 30 minutos, antes do ensaio da atividade enzimática, a fim de eliminar peróxidos de hidrogênio endógenos que pudessem estar presentes, para confirmar a presença de lacase no extrato bruto.

Nos ensaios utilizando Seringaldazina 1 mmol.L⁻¹ 99% (Sigma 177539) como substrato o tampão acetado de sódio empregado possuía pH 5,6. A oxidação foi acompanhada espectrofotometricamente a 525 nm.

Quando o Guaiacol (Sigma G5502) foi utilizado como substrato, o ensaio foi acompanhado espectrofotometricamente a 470 nm, obedecendo as mesmas condições utilizadas para a seringaldazina.

Uma unidade de enzima ($U.min^{-1}$) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de substrato por minuto.

Para o cálculo enzimático foi utilizada a Equação 1 (LEONOWICZ; GRZYWNOWICZ, 1981):

$$U.min^{-1} = \frac{10^6 \times E}{\varepsilon \times t} \quad \text{Eq. (4.1)}$$

Onde:

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

ε = Coeficiente de extinção molar para cada substrato ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$)

t = Tempo de reação (min)

O coeficiente de extinção molar do ABTS (ε_{420}) é $36.000 mol^{-1}.L.cm^{-1}$; enquanto o da seringaldazina (ε_{525}) e o do guaiacol (ε_{470}) são $65.000 mol^{-1}.L.cm^{-1}$ e $12.000 mol^{-1} L cm^{-1}$, respectivamente.

5.5. Determinação da proteína no extrato bruto

A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976) tendo uma curva de albumina bovina como padrão. Foram utilizados 100 μL do extrato bruto para cada 1 mL do reativo de Bradford. O tempo de reação foi de 15 minutos e após fez-se a leitura deste meio reacional a 595 nm em espectrofotômetro (Spectrum SP – 2000UV). O valor da absorbância obtida foi convertida em valor de concentração de proteína pela equação: $Y = 0,0043x + 0,0953$, onde x representa a concentração ($\mu g.mL^{-1}$) e Y representa o valor da absorbância. Foram realizados testes em branco com água em substituição ao extrato bruto.

5.6. Determinação da massa molecular - eletroforese

A fim de determinar a massa molecular da lacase produzida neste estudo, avaliou-se a atividade enzimática da referida enzima em gel de poliacrilamida (12%). Uma mistura contendo 2 μL de extrato bruto enzimático e 5 μL de tampão de amostra (Tabela 1) foram

aplicadas ao gel. A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente com voltagem inicial de 90 V durante a corrida no gel concentrador e de 120 V até o final da corrida cromatográfica. Ao término da corrida procedeu-se a renaturação da enzima; o gel foi incubado em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ nos pH 4, 5 e 6 por 15 minutos em cada pH, totalizando 45 minutos. O gel foi corado com solução de ABTS 0,5 mmol.L⁻¹ em tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 4,5 (GONÇALVES; STEINER, 1996, modificado). Os padrões de proteínas utilizados para estimar a massa molecular da lacase apresentavam as seguintes massas: 19, 26, 37, 50, 90 e 118 kDa.

Tabela 1 - Constituintes do gel de corrida, gel concentrador e tampão de amostra.

Gel de corrida	Volume (mL)	Gel concentrador	Volume (mL)	Tampão de amostra	Quantidade
Água MilliQ	0,95	Água MilliQ	1,8	Tris-HCl/SDS 4x	7 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5	1,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,75	Glicerol	3 mL
Acrilamida 30%	2,4	Acrilamida 30%	0,4	SDS	1 g
SDS 10%	0,1	SDS 10%	0,03	β-mercaptoetanol	0,6 mL
APS 10%	0,045	APS 10%	0,015	Azul de bromofenol	1,2 mg
TEMED	0,005	TEMED	0,003	Água MilliQ	Qsp 10 mL

Fonte: Autora

Os reagentes utilizados na eletroforese foram os seguintes: ABTS; SDS – Sodium dodecyl sulfate 98,5% (Sigma L3771); (NH₄)₂S₂O₈ – Ammonium persulfate 98% (Sigma A3678); Acrilamida 99% (Sigma-Aldrich 146072); Trizma® Base – Tris-Hydroxymehtyl-amminomethane 99% (Fluka 93352); Glicina 99% (Sigma G8898); Azul de bromofenol (Sigma-Aldrich B5525) e Marcador de Massa molecular – Stained Protein Molecular Weight (Fermentas #SM 0441).

5.7. Análise dos parâmetros de reação sobre a atividade da lacase livre e imobilizada (pH e temperatura)

Para a avaliação de desempenho da reação sobre a atividade da lacase foram utilizados os tampões: acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, para valores de pH situados na faixa de

3,6 a 5,6, e fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} para valores de pH situados na faixa de 6,0 a 8,0. A temperatura de reação foi variada em valores entre 20 e 80 °C, controlada por banho termostaticado (Quimis Q 304 264).

5.8. Preparo da *Luffa cylindrica*

O fruto maduro da *Luffa cylindrica* foi obtido no comércio local da cidade de Goiânia, estado de Goiás. Para o preparo do fruto foram retiradas as sementes e o miolo. As fibras restantes foram lavadas em água de torneira até se tornarem limpas, posteriormente foram lavadas com água destilada três vezes, autoclavadas a 120 °C por 20 min, secas em estufa (Tecnal TE - 393/I) a 60 °C por 24 horas e estocadas em sacos de polipropileno até serem usadas.

5.9. Imobilização do extrato bruto em *Luffa cylindrica*

Fibras de *Luffa cylindrica* pré-tratadas conforme o item anterior foram cortadas em forma quadricular em peças de aproximadamente 100 mg. Cada peça foi colocada em um Becker de 50 mL e hidratada com 10 mL de solução de ácido clorídrico – HCl (Dinâmica R.4821.00) 1 mol.L^{-1} sobre agitação por 2 horas (URIOESTE; MEDEIROS; CASTRO, 2002). Após este período, as peças foram lavadas três vezes em água destilada, e secas em estufa a temperatura de 60 °C por 24 horas.

Após a secagem, as peças foram ativadas em solução de glutaraldeído (Vetec V000383) tamponado (2-2,5% v/v) sob agitação por 1 hora e lavadas três vezes com tampão acetato de sódio. Posteriormente, cada peça foi submergida em 10 mL do extrato bruto contendo lacase por 24 horas. Terminado este período, as peças foram lavadas três vezes com solução tampão acetato de sódio. Foi medida a atividade enzimática da bucha imobilizada, do sobrenadante e das águas de lavagem conforme metodologia descrita no item 4.4.

5.10. Condições de imobilização

5.10.1. Efeito do tratamento com glutaraldeído

Foram realizados testes para verificar a melhor condição de tratamento com glutaraldeído. Nestes testes, a solução de glutaraldeído 2,5% reagiu com as fibras de *Luffa cylindrica* nas seguintes condições: 30 minutos com agitação de 120 rpm; 30 minutos estático a quente (80 °C); 1 hora com agitação de 120 rpm e 1 hora estático a quente (80 °C). Finalizadas as reações, cada pedaço de 100 mg de *Luffa cylindrica* foi lavado três vezes com

tampão acetado de sódio pH 4,0 e submerso em 10 mL de extrato bruto por 24 horas. Após a imobilização a atividade enzimática foi medida pela metodologia descrita no item 4.4. e calculados os rendimentos de imobilização para cada condição.

5.10.2. Efeito da concentração do glutaraldeído

Foi promovida a imobilização com soluções de glutaraldeído em diferentes concentrações. As concentrações das soluções variaram entre 1% e 5%. Cada solução reagiu com pedaços de aproximadamente 100 mg de *Luffa cylindrica* por 1 hora. Após foi realizada a imobilização como descrita no item 4.9. ; a atividade enzimática foi medida como descrito no item 4.4. e calculados os rendimentos de imobilização.

5.10.3. Efeito da secagem da bucha

Verificou-se o efeito da imobilização quando realizada a secagem da bucha após a hidratação destas com solução HCl 1 mol.L⁻¹. Terminada a hidratação das buchas e após três lavagens com água destilada estas foram secadas em estufa a temperatura de 60 °C por 24 horas. Após este período o processo de imobilização seguiu a metodologia descrita no item 4.9. A atividade enzimática foi medida como descrito no item 4.4. e foram calculados os rendimentos de imobilização.

5.10.4. Efeito do tempo de imobilização

O tempo de imobilização foi variado. A massa de *Luffa cylindrica* imobilizada manteve-se em 100 mg. O volume do extrato bruto utilizado foi de 10 mL para cada 100 mg de *Luffa cylindrica*. Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente. Os tempos de imobilização foram 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas. A atividade enzimática foi medida pela metodologia descrita no item 4.4., posteriormente foram calculados os rendimentos de imobilização.

5.11. Determinação do rendimento da imobilização

Para calcular o rendimento da imobilização (%) foi utilizada a equação 4.2, adotada por Poças et al (2004):

Eq. (4.2)

$$R (\%) = \left(\frac{A}{B \times C} \right) \times 100$$

Onde:

A = Atividade Enzimática da lacase imobilizada ($\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$);

B = Atividade enzimática da lacase livre ($\text{U}\cdot\text{min}^{-1}$);

C = Volume enzimático utilizado (mL).

5.12. Análise da estabilidade da enzima imobilizada: armazenamento e termoestabilidade

Armazenou-se em ambiente climatizado com temperatura de 4 °C pedaços de 100 mg de *Luffa cylindrica* com lacase imobilizada com extrato bruto produzido pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. As buchas vegetais imobilizadas com o extrato bruto do meio BD foram suspensas em 300 mL de solução tampão acetato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 4,0. Quando utilizado o extrato bruto do meio BDM, os pedaços de bucha vegetal foram suspensos em 300 mL de solução tampão acetato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 3,6. Foram realizados ensaios de atividade após armazenamento de 1 a 30 dias.

A estabilidade térmica para as formas livre e imobilizada da lacase foi determinada após a sua incubação por período de 10 a 60 minutos, com temperatura entre 30 e 50 °C. Após a incubação foram realizadas leituras de atividade enzimática para a enzima livre e imobilizada, conforme descrito no item 4.4.

5.13. Preparo da solução de etinilestradiol

Para o preparo da solução estoque de EE2 dilui-se 10 mg do hormônio etinilestradiol (Iffect Chempphar 0300383) em 50 mL de etanol 100% e completou-se o volume para 1000 mL com água destilada autoclavada. Assim, obteve-se uma solução estoque de EE2 com concentração de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. A escolha desta concentração foi baseada no trabalho de Lloret et al. (2010) e ainda, para que se pudesse quantificar a concentração do hormônio antes e após a remediação, visto que se fossem utilizadas concentrações similares as encontradas na natureza, o hormônio não poderia ser quantificado no cromatógrafo utilizado nesta pesquisa.

5.14. Análise do uso repetido da enzima imobilizada

Os ensaios de uso repetido para a enzima imobilizada foram conduzidos da seguinte forma: após a reação por 24 horas da *Luffa cylindrica* com lacase imobilizada com

solução do hormônio EE2 5 mg.L⁻¹ (10 mL de solução de EE2 10 mg.L⁻¹/ 10 mL de solução tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,0), a enzima imobilizada foi submetido à três lavagens com tampão acetato de sódio, pH 5,0. Após esta lavagem a enzima imobilizada reagiu novamente com uma solução de EE2 por 24 horas. Esse processo se repetiu por 7 dias.

5.15. Remediação

A remediação foi realizada com o extrato bruto dos meios BD e BDM, tanto para a enzima livre quanto para a enzima imobilizada em *Luffa cylindrica*. Os testes foram conduzidos em triplicata.

Nos testes com a enzima imobilizada, erlenmeyers de 150 mL foram utilizados acrescentando 10 mL de solução de EE2 10 mg.L⁻¹, 10 mL de solução tampão acetato 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e 100 mg de *Luffa cylindrica* imobilizada com extrato bruto. A proporção utilizada de reagentes visou obter uma solução de hormônio com concentração final de 5 mg.L⁻¹ (LLORET et al., 2010). Os ensaios tiveram duração de 8 e 24 horas.

Nos testes com a enzima livre também foram utilizados erlenmeyers de 150 mL; nestes foram adicionados 10 mL de solução de EE2 10 mg.L⁻¹, 8,4 mL de solução tampão acetato 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e 1,6 mL de extrato bruto do meio BD (atividade lacase 200 U); ou 10 mL de solução de EE2 10 mg.L⁻¹, 9,7 mL de solução tampão acetato 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e 0,3 mL de extrato bruto do meio BDM (atividade lacase 200 U), obedecendo o mesmo tempo de duração dos ensaios com a enzima imobilizada.

Quando finalizado este tempo a reação da enzima livre e da enzima imobilizada foram interrompidas pela adição de 100 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M.

Controles sem adição de enzimas foram preparados. O primeiro continha 10 mL de solução de EE2 10 mg.L⁻¹ e 10 mL de solução tampão acetato 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e teve por objetivo verificar a possível degradação do EE2 sem a presença da enzima; enquanto o segundo controle continha 10 mL de solução de EE2 10 mg.L⁻¹ e 10 mL de solução tampão acetato 50 mmol.L⁻¹ pH 5,0 e 100 mg de *Luffa cylindrica* sem extrato bruto imobilizado com o objetivo de avaliar a possível adsorção do EE2 nas fibras da *Luffa cylindrica*.

5.16. Teste em biorreator

O biorreator utilizado para a remoção de EE2 foi um Fermenteste (MS Tecnoyon) constituído de um cilindro de vidro (9 cm de diâmetro, 35 cm de altura) com regulador de pressão, vazão e temperatura (Figura 5).

Figura 5 - Biorreator (Fermenteste MS TecnoPON).



Fonte: Autora

O reator foi operado em batelada a uma pressão de 0,4 bar e vazão de 2,6 L.min⁻¹. Estes valores foram estabelecidos por permitirem maior contato das buchas vegetais com o meio reacional, devido a menor formação de espuma. Os ensaios ocorreram em temperatura de 30 °C, por ser a temperatura ótima da enzima imobilizada em estrato bruto do meio BDM, que foi o meio utilizado nos testes do biorreator.

No tubo cilíndrico do biorreator foram acrescentados 400 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,0; 400 mL de solução de EE2 10 mg.L⁻¹ e enzimas imobilizadas em *Luffa cylindrica*, obedecendo a proporção utilizada na remediação em erlermeyers, objetivando uma solução de EE2 final de 5 mg.L⁻¹ com pH 5,0 (pH ótimo da enzima quando o utilizado o EE2 como substrato). No reator não foram feitos testes com a enzima livre.

Para a reação com a enzima imobilizada foram feitos dois testes; o primeiro foram acrescentados 2,1 g de *Luffa cylindrica* (21 peças de 100 mg) e alíquotas foram coletadas nos tempos 0 hora; 0,5 hora; 1,0 hora; 1,5 hora; 2,0 horas; 4,0 horas; 8,0 horas e 24,0 horas. No segundo teste as alíquotas foram coletas nos mesmos instantes já descritos, porém foram adicionados ao reator 4,2 g de *Luffa cylindrica* (42 peças de 100 mg). Foram feitos controles com a *Luffa cylindrica* sem enzima imobilizada.

5.17. Detecção e quantificação do etinilestradiol

Para se utilizar as amostras nos aparelhos de cromatografia líquida, estas foram passadas em filtros de 0,45 μm de poro e 33 mm de diâmetro (MILLEX - HV (PVDF), Milipore).

Para identificar e quantificar a concentração de EE2 restante após a remediação foi utilizado o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência LC-DAD Alliance Waters, composto por bomba Waters 2695, Detector Waters 2996 e software Empower e coluna Prodigy ODS (3) (150 x 4,6 mm); a quantificação foi realizada no laboratório do CPQBA da UNICAMP. A fase móvel utilizada foi uma mistura de água e acetonitrila (50:50). A eluição das amostras foi realizada com fluxo de 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e com detecção UV de 280 nm. O volume de injeção foi de 20 μL e a temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$.

A determinação da concentração de EE2 das amostras da remediação realizada no biorreator ocorreu em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência LC-20AT (Shimadzu, Quioto, Japão), com detector Ultravioleta/Visível (UV/Vis), em fluorescência (230nm) e coluna ACE C₁₈ (100 x 4,6 mm x 5 μm), executado no laboratório do NEPET da UFG. A fase móvel consistiu na mistura de água e acetonitrila (50:50) e para a eluição das amostras foi utilizado o fluxo de 1,0 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram injetados 20 μL de amostra e a quantificação foi realizada a 30 $^{\circ}\text{C}$.

Santos et al. (2012) quantificaram o EE2 utilizando cromatografia LC-DAD com coluna C-18 e fase móvel constituída de uma mistura de água e acetonitrila (50:50). A detecção UV foi a 280 nm. Condições semelhantes às utilizadas neste trabalho.

A mudança de equipamento para a quantificação de EE2 da remediação em erlenmeyers para a remediação no biorreator se fez necessária devido a indisponibilidade do CLAE LC-DAD utilizado no primeiro ensaio.

5.18. Análise estatística

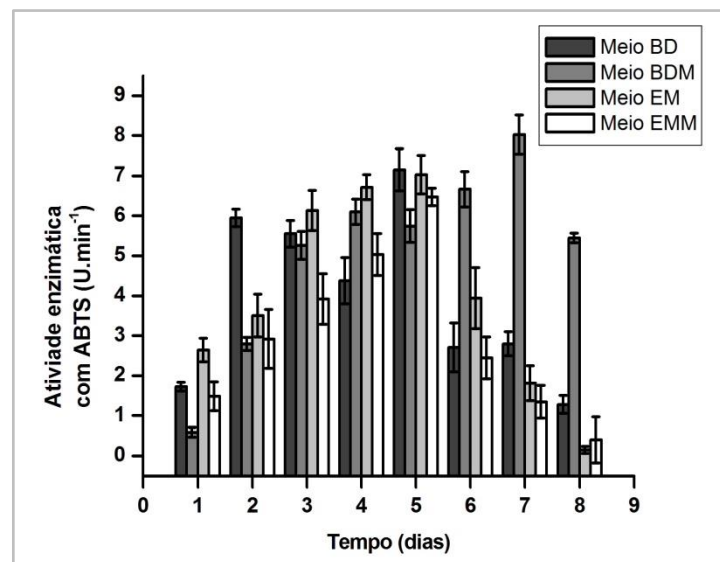
Todos os ensaios foram feitos, no mínimo, em triplicata para a obtenção das médias e dos desvios padrão. Os dados obtidos tiveram suas médias comparadas pela Análise de Variância (ANOVA) segundo um único critério, com nível de significância (α) igual a 0,05. O teste Tukey foi aplicado quando verificado pela ANOVA que as médias dos tratamentos apresentavam diferença significativa, a fim de investigar quais tratamentos diferiam um do outro. Foi utilizado o software SISVAR[®] 4.3 para análise dos dados estatísticos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. Seleção do meio de cultura

A demanda sempre crescente por lacase para a biodelignificação, processos oxidativos industriais e biorremediação ambiental, requer a produção em grande quantidade de enzimas e a baixo custo (LETTERA et al., 2011). Foram avaliados quatro meios de cultura na produção de enzimas pelo fungo *Pleurotus ostreatus* com o objetivo de selecionar um meio de cultura econômico e que proporcionasse grande produção enzimática. Os meios utilizados foram BD, BDM, EM e EMM. A produção de lacase acompanhada durante 8 dias e os picos de atividade enzimática para cada meio estão representados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Pico de atividade enzimática.



Fonte: Autora

Como pode ser visualizado no Gráfico 1 o pico de atividade enzimática para os meios BD, EM e EMM foi encontrado no 5º dia de cultivo, enquanto que para o meio BDM o pico se apresentou no 7º dia. O pico de atividade enzimática do meio BDM se diferenciou dos demais meios analisados devido ao enriquecimento do meio com palha de guariroba. O fungo libera enzimas para se alimentar e estas degradam os substratos em moléculas mais acessíveis que são depois absorvidas e assimiladas; a adição da palha de guariroba aumentou a quantidade de nutrientes no meio e consequentemente o fungo demandou por mais tempo para degradar este substrato e para produzir enzimas (GOLVEIA et al., 2014).

Algumas substâncias podem influenciar a lacase, inibindo ou induzindo sua atividade enzimática. A palha de guariroba foi adicionada ao meio BD (que passou a ser

denominado meio BDM) com o objetivo de aumentar a atividade enzimática da lacase baseado no trabalho de Golveia et al. (2014), que ao adicionarem a palha de guariroba no meio de cultivo do fungo *Pycnoporus sanguineus* conseguiram produção de lacase 100 vezes superior comparado ao meio sem a presença deste resíduo agroindustrial. Ao meio EM foi adicionado o sulfato de cobre, baseado no trabalho de Silva et al. (2012a), e este foi denominado meio EMM, porém a adição de sulfato de cobre ao meio EM não ocasionou a ativação da atividade enzimática da lacase.

Como visualizado no Gráfico 1, a melhor atividade enzimática foi encontrada para o meio BDM, este resultado foi confirmado pela análise estatística que mostrou que os meios BD, EM e EMM foram estatisticamente iguais, enquanto o meio BDM apresentou a maior média em relação a atividade enzimática e se mostrou estatisticamente diferente dos demais.

O meio BDM promoveu melhor desenvolvimento do *Pleurotus ostreatus*, e consequentemente maior produção de lacase. Estudos mostram que o fungo em questão se desenvolve melhor em substratos que contenham lignina, pois para o seu crescimento, este fungo necessita degradar a lignina e para isso produz enzimas extracelulares. (CARVALHO et al., 2013; PARENTI et al., 2013; KARP et al., 2012). Assim, nota-se que a secreção de enzimas específicas podem depender das condições de cultura, incluindo a composição do meio de crescimento (MARCO-URREA et al, 2010).

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram selecionados os meios BD e BDM, por serem produzidos a partir do caldo de batata produzido em laboratório com o próprio fruto, e no caso do meio BDM, com adição da palha de guariroba adquirida gratuitamente em feiras da cidade de Goiânia. Por estas razões, estes meios foram considerados viáveis economicamente.

6.2. Atividade da enzima livre

No presente trabalho, a lacase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* e utilizada nos processos de imobilização não passou por nenhum processo de purificação. Sendo assim, a atividade da lacase livre foi avaliada comparando a atividade enzimática do extrato bruto antes e após a reação com a enzima catalase. Essa reação elimina peróxidos de hidrogênio endógenos eventualmente presentes no extrato bruto, confirmando a presença apenas de lacase no meio.

Na Tabela 2, a atividade enzimática do extrato bruto com e sem catalase pode ser visualizada.

Tabela 2 - Atividade Enzimática meio BD com e sem o acréscimo da enzima catalase.

Meio de cultura	Atividade Enzimática (U.min ⁻¹) sem catalase	Atividade Enzimática (U.min ⁻¹) com catalase
BD	3,22	2,39
BDM	7,50	6,97

Fonte: Autora

Assim pode-se observar uma redução de 25,77% na atividade enzimática do meio BD e de 7,06% na atividade enzimática da lacase do meio BDM quando acrescentada a enzima catalase. Esses resultados mostram que provavelmente ao eliminar os peróxidos de hidrogênio endógenos do meio, possivelmente eliminou-se assim a enzima manganês peroxidase; visto que o *Pleurotus ostreatus* possui a habilidade para produzir apenas as enzimas extracelulares lacase e manganês peroxidase, e, portanto não são capazes de produzir lignina peroxidase (GIARDINA et al., 2000).

Com o intuito de confirmar a presença de manganês peroxidase no meio, foi realizada a determinação desta enzima pelo método de Kuwahara, Kimura e Asada (1984) que visa a oxidação do vermelho de fenol. Para o meio BD a maior atividade enzimática encontrada no extrato bruto foi de 1,84 U.min⁻¹; enquanto para o meio BDM o valor da atividade enzimática foi de 0,55 U.min⁻¹. A enzima manganês peroxidase é uma enzima lignolítica, e sua presença não constitui em um problema, visto que pode ajudar na remoção do EE2, pois enzimas lignolíticas são promissoras de serem aplicadas em processos biológicos (MOREIRA et al., 1998).

6.3. Determinação de proteína totais

Para avaliar o percentual de proteínas imobilizada no suporte, foram determinadas as concentrações de proteína no extrato bruto antes e após a imobilização, visto que as enzimas são proteínas e desta forma a concentração destas no suporte poderiam ser mensuradas. O extrato bruto após a imobilização foi denominado “sobrenadante”. (MORAIS et al., 2013).

No meio BD, o quinto dia de produção enzimática (pico de atividade meio BD) as concentrações de proteína variaram entre 26,2 e 60,4 µg.mL⁻¹, e no meio BDM no sétimo dia de cultivo (pico de atividade meio BDM) estiveram entre 32,2 e 83,2 µg.mL⁻¹. A superioridade na concentração de proteínas no meio BDM pode ser explicada pelo fato da palha de guariroba estar atuando como um indutor na síntese de lacase, que é uma proteína. Além disso, diferentes linhagens de uma mesma espécie podem apresentar um perfil de

proteínas diferenciado, mesmo quando crescidos sob as mesmas condições. Poderá haver essa diferenciação também quando crescidos em condições diferentes (GARCIA; SANTIAGO; ULHOA, 2006; VILELA, 2006).

O percentual de enzima imobilizada pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 - Percentagem de proteína do extrato bruto retida no suporte.

	BD		BDM	
	Extrato Bruto	Sobrenadante	Extrato Bruto	Sobrenadante
Concentração de proteína ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	28,53	15,28	33,88	14,58
Porcentagem de proteína (%)	100	53,55	100	43,03
Porcentagem de proteína retida no suporte (%)	46,45		56,97	

Fonte: Autora

De acordo com a Tabela 3, em média, são retidos no suporte de imobilização (*Luffa cylindrica*) 46,45% e 56,97% do total de proteína do extrato bruto considerando os meios BD e BDM, respectivamente.

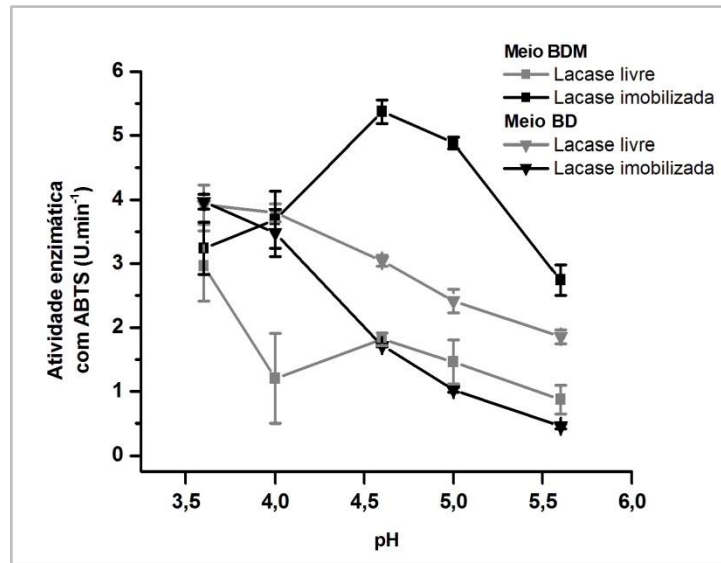
6.4. Influencia do pH e da temperatura na atividade da lacase livre e imobilizada

6.4.1. Variação do pH de reação sob diferentes substratos

O pH ótimo das lacases depende da diferença do potencial redox entre o substrato de redução e o cobre tipo 1 da lacase, este cobre se correlaciona com a taxa de transferência de elétrons sendo favorecido por um substrato fenólico com pH mais elevado. A dependência do pH está sujeito também da ligação de um ânion hidróxido com os cobres tipo 2 e 3, que inibe a atividade a pH mais elevados (XU, 1997).

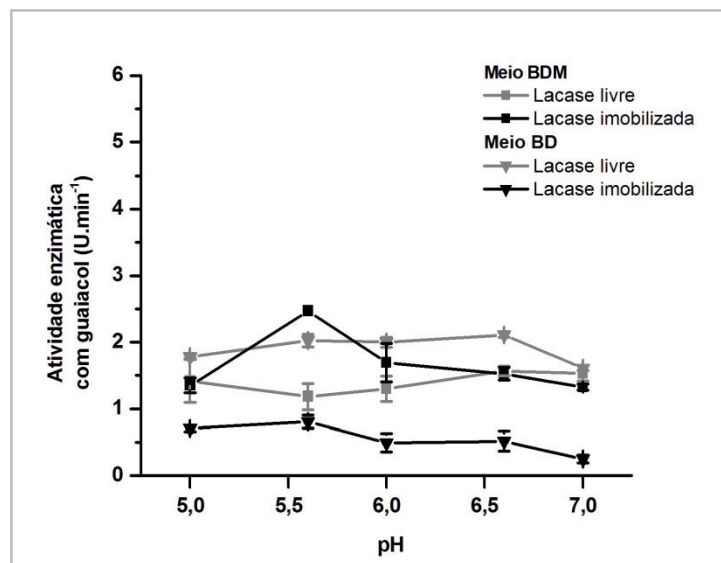
Nos Gráficos 2, 3 e 4, apresentam-se as atividades enzimáticas das formas livres e imobilizadas frente à variação do pH do meio reacional para os substratos 2,2-Azino-bis (3-ethylbenzothiazolizone-6-sulfonic acid) - ABTS, guaiacol e seringaldazina, respectivamente. As determinações foram realizadas em temperatura ambiente.

Gráfico 2 - Variação do pH de reação para a lacase nas formas livre e imobilizada utilizando o ABTS como substrato. Tempo de reação de 5 minutos.



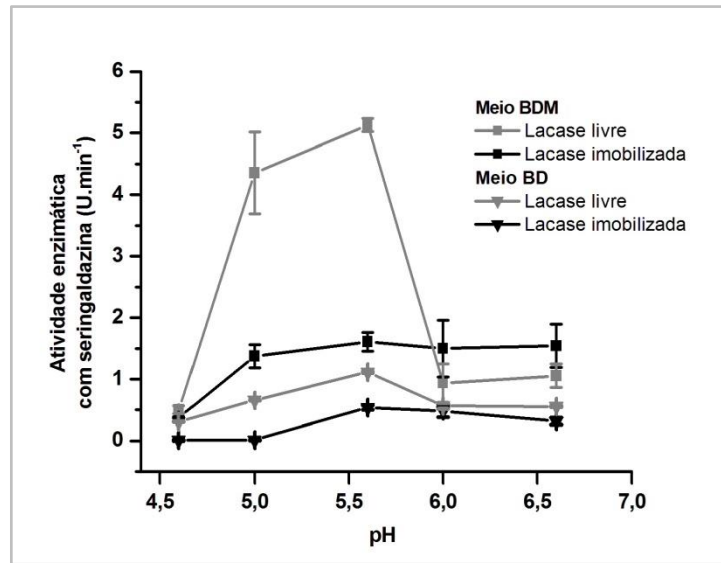
Fonte: Autora

Gráfico 3 - Variação do pH de reação para a lacase nas formas livre e imobilizada utilizando o guaiacol como substrato. Tempo de reação de 5 minutos.



Fonte: Autora

Gráfico 4 - Variação do pH de reação para a lacase nas formas livre e imobilizada utilizando a seringaldazina como substrato. Tempo de reação de 5 minutos.



Fonte: Autora

As lacases fúngicas possuem a característica de atuar sobre uma ampla gama de substratos (THURSTON, 1994); concordando com esta afirmação a lacase produzida pelo fungo *Pleurotus ostreatus* e utilizada neste estudo oxidou três diferentes compostos (ABTS, guaiacol e seringaldazina). Como pode ser observado nos Gráficos 2, 3 e 4, quando o substrato oxidado foi o ABTS os valores da atividade enzimática foram superiores comparados ao guaiacol e a seringaldazina, principalmente para a lacase imobilizada do meio BDM.

Utilizando o ABTS como substrato, o melhor pH observado para as formas livres e imobilizadas do meio BD foi de 3,6; porém a atividade enzimática neste pH não resultou em alteração na atividade enzimática estatisticamente significativa comparada a atividade enzimática apresentada no pH 4,0. A enzima imobilizada apresentou melhores médias de atividade enzimática em relação a enzima livre, no entanto não houve diferença significativa entre ambas.

Em relação ao meio BDM, o melhor pH observado na enzima livre foi de 3,6 e na enzima imobilizada foi de 4,6, que também apresentou as melhores médias estatísticas. A oxidação do ABTS tem como característica a ocorrência da redução da velocidade de reação com o aumento do pH (XU, 1996).

Em outras pesquisas foram encontrados valores de pH ótimo entre 3,0 e 4,5 quando o ABTS foi utilizado como substrato. Freixo, Karmali e Arteiro (2012) determinaram o pH ótimo em 3,0 para o *Pleurotus ostreatus* crescido em meio contendo polpa de tomate,

enquanto Linke et al. (2005) definiram o pH 3,5 como ótimo para o *Pleutorus sapidus* cultivado em cascas de amendoim. Após purificação da lacase, More et al. (2011) encontraram o pH ótimo em 4,5. O mesmo valor foi encontrado por Tlecuitl-Beristain et al. (2008).

Com o guaiacol como substrato as atividades enzimáticas apresentaram valores ótimos nos pH 6,6 para a enzima livre e 5,6 para a enzima imobilizada nos meios BD e BDM. As melhores médias foram encontradas para a enzima livre no meio BD e para a enzima imobilizada para o meio BDM.

Em ambos os meios (BD e BDM) e ambas as formas da enzima (livre e imobilizada) o pH ótimo foi de 5,6 quando a seringaldazina foi utilizada como substrato. Para o meio BD a melhor média foi encontrada para a enzima imobilizada, enquanto para o meio BDM a melhor média se apresentou na enzima livre.

A faixa de pH compreendida entre 4,0 e 7,0 é comum na oxidação de compostos fenólicos, como o guaiacol e a seringaldazina (BALDRIAN, 2006). Hublik e Schinner (2000) determinaram o pH ótimo em 5,8 para lacase produzida pelo *Pleurotus ostreatus*, utilizando a seringaldazina como substrato, resultado próximo ao valor encontrado neste trabalho.

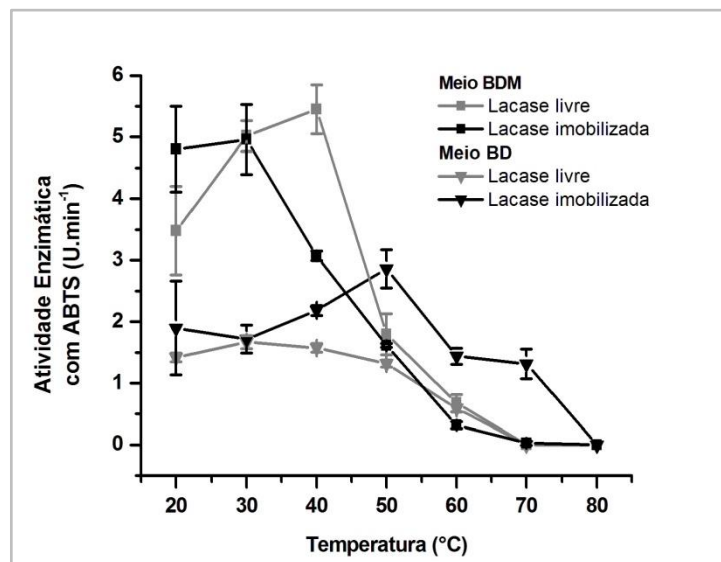
Para o ABTS no meio BD e para a seringaldazina nos meios BD e BDM não houve alteração do pH ótimo quando comparadas as enzimas livre e imobilizada. No entanto, quando utilizado o ABTS no meio BDM e o guaiacol em ambos os meios, o pH ótimo da enzima imobilizada foi alterado em relação a enzima livre. Este fenômeno pode ser explicado pelo estudo realizado por Goldstein, Levin e Katichalski (1964) que mostrou a existência de uma diferença na concentração de íons H^+ entre o suporte polieletrólito onde a enzima está imobilizada e a solução que envolve este suporte. Se o polieletrólito possui carga negativa, a concentração de íons H^+ em seu redor será maior que na solução, o contrário acontece quando o polieletrólito possui carga positiva. Assim, a curva de pH versus atividade de enzima imobilizada em suporte com carga elétrica pode deslocar-se para regiões mais alcalinas quando o suporte é carregado negativamente e regiões mais ácidas quando o suporte é carregado positivamente.

No entanto, a mudança de pH pode estar associada a outros fatores além da carga como a fonte de enzima, tipo de suporte, método de imobilização e interação enzima-suporte (FERNANDEZ-FERNANZEZ, 2013).

6.4.2. Variação da temperatura de reação

A temperatura pode influenciar na cinética da reação enzimática por meio do aumento da velocidade da reação ou da desnaturação da enzima. No primeiro caso o aumento da temperatura aumenta a energia cinética das moléculas componentes do sistema, aumentando a probabilidade de choques efetivos entre elas. No segundo caso a desnaturação ocorre quando a temperatura é elevada a valores acima da temperatura ótima da enzima, assim a enzima perde sua estrutura nativa, catalítica, devido a alteração das ligações químicas que mantem sua estrutura tridimensional. (TORRES, 2001). A resposta da lacase livre e imobilizada frente à variação da temperatura para os meios BD e BDM está representada no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Variação da temperatura de reação e efeito sobre a atividade enzimática da lacase nas formas livre e imobilizada. Tempo de reação de 5 minutos.



Fonte: Autora

A temperatura ótima para as enzimas livre e imobilizada apresentaram valores distintos, compreendidos entre 20 e 50 °C. Para o meio BD as melhores atividades enzimáticas foram encontradas a 30° C para a enzima livre e 50° C para a enzima imobilizada; enquanto para o meio BDM as melhores atividades se apresentaram a 40° C e 30° C, respectivamente.

Observa-se que o processo de imobilização da lacase em *Luffa cylindrica* alterou o valor da temperatura ótima em ambos os meios estudados. No meio BD a enzima imobilizada apresentou temperatura ótima superior a forma livre, conferindo a enzima maior estabilidade térmica, também nota-se a superioridade da atividade enzimática da enzima

imobilizada frente a enzima livre em temperaturas mais elevadas (60 – 70 °C). O inverso ocorreu no meio BDM; a enzima imobilizada apresentou temperatura ótima inferior a enzima livre e atividades enzimáticas menores com o aumento da temperatura, conferindo a esta enzima a possibilidade de uso à temperatura ambiente. Em ambos os meios as enzimas tanto livre quanto imobilizadas foram desnaturadas a 80 °C.

A 50 °C todas as formas livre e imobilizada apresentaram atividade enzimática, no entanto a enzima imobilizada com o extrato bruto do meio BD foi superior às demais. A menor atividade nesta temperatura foi da enzima livre do meio BD, evidenciando a superioridade da enzima imobilizada deste meio em relação à estabilidade térmica. As formas, livre e imobilizada, do meio BDM apresentaram atividades enzimáticas próximas, no entanto a atividade da enzima livre foi superior a enzima imobilizada.

Na literatura, a faixa de temperatura para as diferentes linhagens do *Pleurotus ostreatus* mostram variações entre 40 e 65 °C. Estas variações podem estar relacionadas aos diversos tratamentos proporcionados as enzimas, como por exemplo, a purificação.

Freixo, Karmali e Arteiro (2012) produziram e caracterizaram a lacase de *Pleurotus ostreatus* crescido em meio contendo polpa de tomate e, após a purificação da enzima, constataram que a temperatura ótima de reação foi de 45 °C. Este valor também foi encontrado por Tlecuítl-Beristain et al. (2008), ao produzirem lacase com o fungo *Pleurotus ostreatus* utilizando o mesmo procedimento adotado neste trabalho, porém com um meio de cultura mais nutritivo, com o objetivo de relacionar a atividade da lacase com o crescimento do fungo.

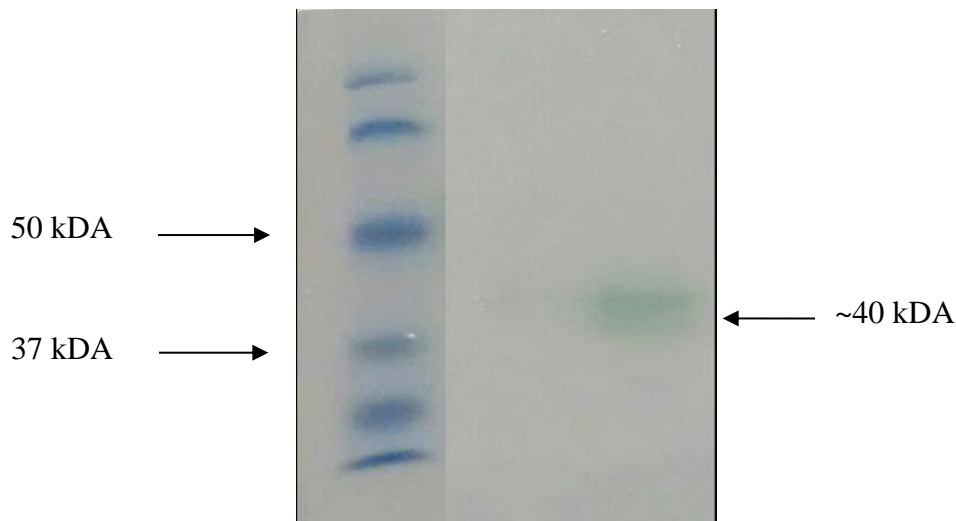
Liu et al. (2009) com o objetivo de otimizar o meio de fermentação e os parâmetros de crescimento da cepa 10969 do fungo *Pleurotus ostreatus*, para obtenção da máxima produção de lacase, encontrou a temperatura ótima de reação de 50 °C na caracterização da lacase produzida. Enquanto More et al. (2011) ao caracterizarem a lacase produzida pela cepa isolada de *Pleurotus sp*, avaliaram que a temperatura ótima de reação foi de 65 °C, utilizando o ABTS como substrato. As condições de cultivo foram semelhantes às utilizadas nesta pesquisa, porém os resultados, em alguns casos, não foram semelhantes, pois as cepas do fungo utilizadas não foram as mesmas.

Os valores encontrados na literatura são próximos aos descobertos neste trabalho, mesmo que o maior valor encontrado de temperatura ótima para a enzima livre tenha alcançado 40 °C. Ressalta-se que o extrato bruto utilizado neste trabalho não passou por processos de purificação.

6.5. Determinação da massa molecular

Ao avaliar a atividade da lacase em gel de poliacrilamida (12%), foi possível estimar a massa molecular das lacases produzidas no meio BD e BDM (Figura 6) por meio de um marcador. O valor encontrado foi de aproximadamente 40 kDA, concordando com os trabalhos de More et al. (2011) e Liu et al. (2009), que produziram e caracterizaram lacase produzida por meio da fermentação submersa, metodologia utilizada neste trabalho.

Figura 6 - Massa molecular lacase produzida nos meios BD e BDM.



Fonte: Autora

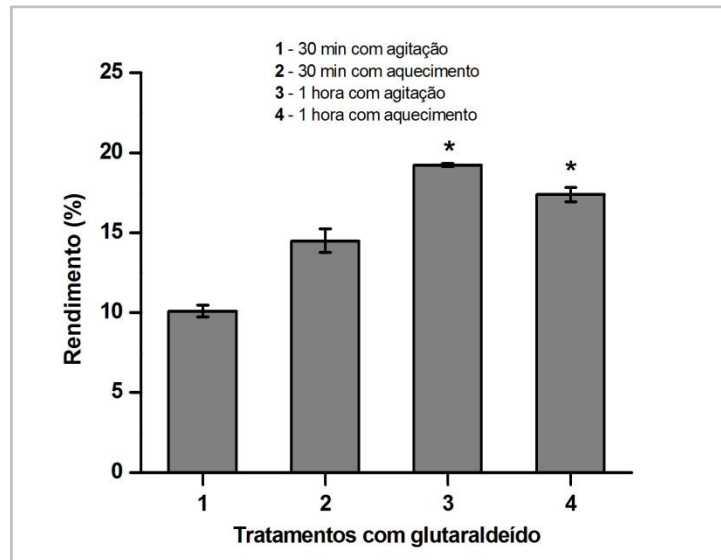
6.6. Parâmetros de imobilização

6.6.1. Tratamento com glutaraldeído

Dentre os reticulantes disponíveis no mercado, o glutaraldeído se destaca por apresentar disponibilidade comercial, baixo custo, elevada reatividade, boa solubilidade em solução aquosa e em solventes orgânicos (BARBOSA et al, 2012). No Gráfico 6 pode-se visualizar o rendimento da enzima imobilizada sob diferentes formas de tratamento do suporte com glutaraldeído.

Foi avaliado o rendimento de imobilização sob quatro diferentes tratamentos do suporte com glutaraldeído, variando o tempo (30 minutos e 1 hora) e a forma de contato (sob agitação a 120 rpm e sob aquecimento a 80° C). O melhor tempo para o tratamento foi reação por 1 hora, tanto para os tratamentos sob agitação quanto para os sob aquecimento. No entanto, o tratamento sob agitação apresentou melhor rendimento em relação aos demais tratamentos.

Gráfico 6 - Tratamentos do suporte com glutaraldeído para o processo de imobilização.



*Tratamentos estatisticamente semelhantes segundo Teste Tukey.
Fonte: Autora

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos 3 e 4, entretanto o tratamento 3 foi escolhido para o processo de imobilização pois além de apresentar maior rendimento, liberava menos gases durante a reação comparado ao aquecimento do glutaraldeído, fato a ser considerado já que o este composto é uma substância altamente tóxica.

Guidini et al. (2010) imobilizaram β -galactosidase em Duolite A568 e no processo de reticulação da enzima com glutaraldeído otimizaram o tempo de reação de reticulação em 1,5 hora, valor próximo ao encontrado neste trabalho.

Ao imobilizar lacase em fibras de coco verde, Bezerra et al. (2015) prepararam o suporte com solução de glutaraldeído em tampão fosfato 0,05 M (pH 7) após reação de 2 horas e posterior lavagem com tampão.

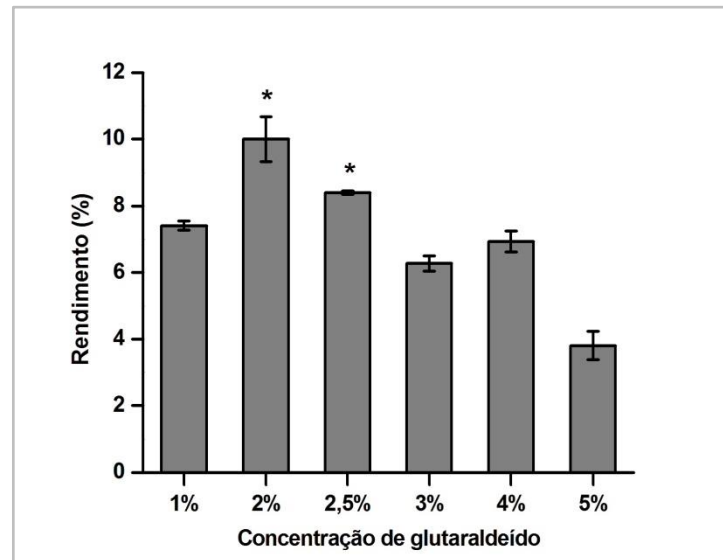
6.6.2. Concentração do glutaraldeído

A concentração de glutaraldeído utilizada em processos de imobilização dependerá do suporte empregado e da estrutura da proteína. Portanto, não há uma concentração única que possa ser aplicada em todos os suportes de imobilização e enzimas. No entanto, na literatura, as concentrações mais empregadas estão entre 1% e 2,5% (CAPTANE et al., 2013; XU et al., 2013; VILELA, 2006; POÇAS et al., 2004), provavelmente porque quanto maior a concentração de glutaraldeído utilizado, maior será a

concentração de enzimas imobilizadas, e isto poderá causar limitações na difusão do substrato e estereopimpimentos, acarretando baixa atividade catalítica (SILVA et al., 2012b).

Os rendimentos encontrados para os suportes tratados com diferentes concentrações de glutaraldeído estão discriminados no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Variação da concentração do glutaraldeído no processo de imobilização.



* Concentrações estatisticamente semelhantes segundo Teste Tukey.
Fonte: Autora

Após análise estatística dos resultados verificou-se que há um aumento significativo do rendimento de imobilização quando a concentração de glutaraldeído foi de 2%. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre as concentrações de 2% e 2,5%.

A enzima necessita conservar suas distâncias intermoleculares e o processo de imobilização torna a estrutura da enzima mais rígida e, conseqüentemente, a torna mais resistente à presença de agentes desnaturantes. No entanto, quando as concentrações de glutaraldeído são elevadas, há um acréscimo de ligações cruzadas, causando o aumento na rigidez da enzima ligada. Isto afeta negativamente a conformação da enzima e, como conseqüência, uma menor atividade enzimática e rendimentos são observados (SKORONSK et al., 2011).

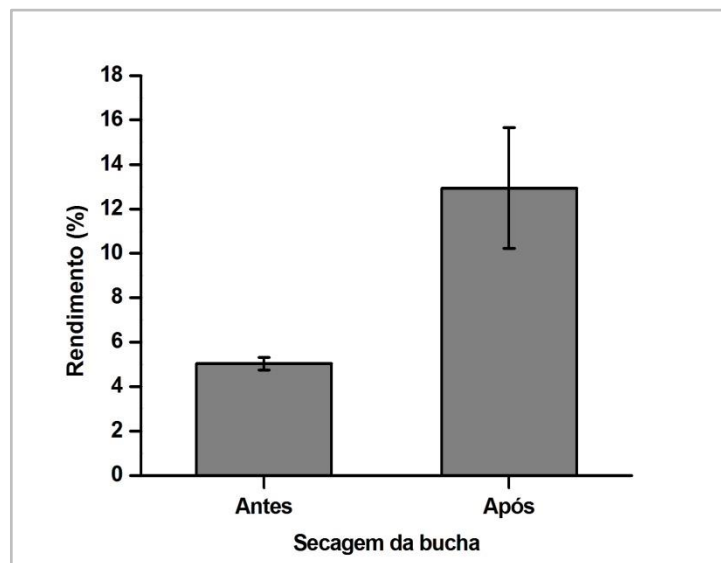
6.6.3. Secagem da bucha

O processo de imobilização implica na interação entre a enzima e o suporte, que fornecem diferentes propriedades cinéticas, mecânicas, químicas e bioquímicas à enzima, para

isso, conhecer as características da superfície de ambos são importantes para que o suporte possa ser preparado para combinar com as características da superfície da enzima (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

Diversos autores (SILVA et al., 2012a; BEZERRA et al., 2015), após a lavagem e o preparo do suporte, promovem a secagem do mesmo tanto para estocagem quanto para causar melhor interação com o agente reticulante e com a enzima. O Gráfico 8 mostra os rendimentos de imobilização antes e após a secagem da *Luffa cylindrica*.

Gráfico 8 - Rendimento de imobilização antes e após a secagem do suporte por 24 horas a 60 °C.



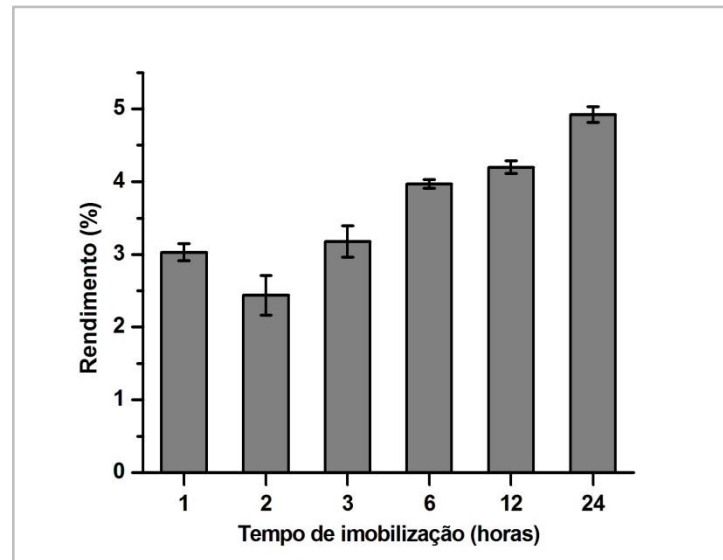
Fonte: Autora

Os resultados apresentados no Gráfico 8 mostraram que secar a bucha vegetal e posteriormente promover o tratamento com o glutaraldeído aumenta em aproximadamente 61% o rendimento de imobilização; pois a bucha seca permite maior retenção de enzimas comparada à bucha molhada. A remoção da água melhora a superfície de contato da bucha vegetal.

6.6.4. Tempo de imobilização

A influência do tempo no processo de imobilização de lacase nas fibras de *Luffa cylindrica* é representada no Gráfico 9, na qual se verifica um aumento significativo de atividade da enzima imobilizada até 24 horas.

Gráfico 9 - Variação do tempo de imobilização de lacase em *Luffa cylindrica*.



Fonte: Autora

A variação do tempo de imobilização em valores entre 1 hora e 24 horas, nas condições testadas, mostrou que quanto maior o tempo de contato entre a enzima e o suporte, maior é a quantidade de enzima retida. O tempo de 24 horas apresentou melhor rendimento que os demais tempos estudados. Com base nestes resultados, todos os experimentos de imobilização utilizaram um tempo de 24 horas.

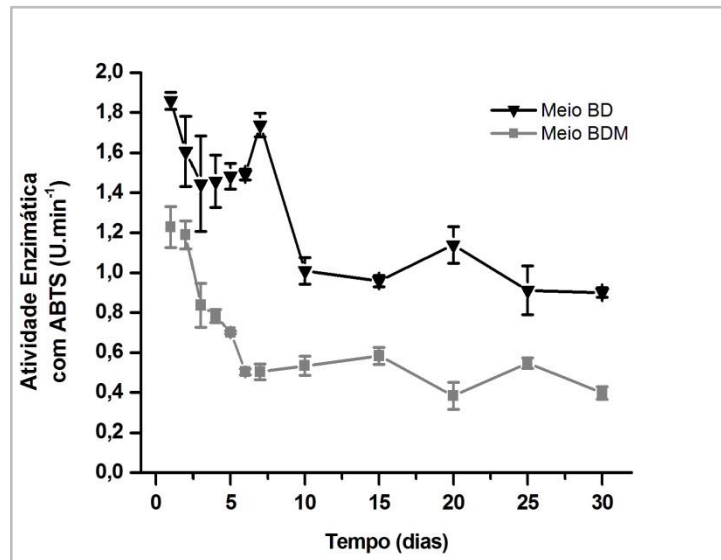
6.7. Análise da estabilidade do sistema

6.7.1. Estabilidade de armazenamento

A estabilidade de armazenamento é um dos parâmetros mais importantes da avaliação da atividade enzimática, porque a enzima imobilizada é suscetível à queda da atividade enzimática após armazenamento prolongado (RAMANI et al., 2015).

O Gráfico 10 apresenta a atividade enzimática para a enzima imobilizada em 30 dias de armazenamento para os meios BD e BDM.

Gráfico 10 - Análise da estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada.



Fonte: Autora

Em ambos os meios após o segundo dia de armazenamento a enzima imobilizada exibiu perdas em sua atividade enzimática; no meio BD esta perda foi de 30,7%, portanto a enzima imobilizada apresentava 69,3% da sua atividade inicial, enquanto o meio BDM apresentava 75,3% desta atividade. No décimo dia a porcentagem de retenção da atividade inicial foi semelhante para ambos os meios; 43,5% para o meio BD e 43,4% para o meio BDM.

Por fim, no trigésimo dia de armazenamento o meio BD reteve 39% da atividade inicial, enquanto o meio BDM reteve 32,35%. Em geral o meio BD se mostrou mais estável ao armazenamento do que o meio BDM, no entanto ambos os meios foram pouco satisfatórios em relação a retenção da atividade enzimática inicial, já que após trinta dias de armazenamento esse valor não alcançou 50%. A baixa estabilidade de armazenamento pode estar relacionada ao tipo de armazenamento escolhido e ao pH do tampão utilizado no ensaio; os pH 3,6 e 4,0 escolhidos para este teste por serem os pH ótimos da enzima podem ser demasiadamente ácido para armazenar as enzimas imobilizadas.

Outros autores conseguiram estabilidade de armazenamento melhores utilizando diferentes suportes. Vinoth Kumar et al. (2012) imobilizaram lacase pelo método de agregação de enzimas por ligação cruzada e após 14 dias a enzima imobilizada reteve 100% da atividade inicial. Depois de ser armazenada por dois meses esta enzima perdeu apenas 29% desta atividade.

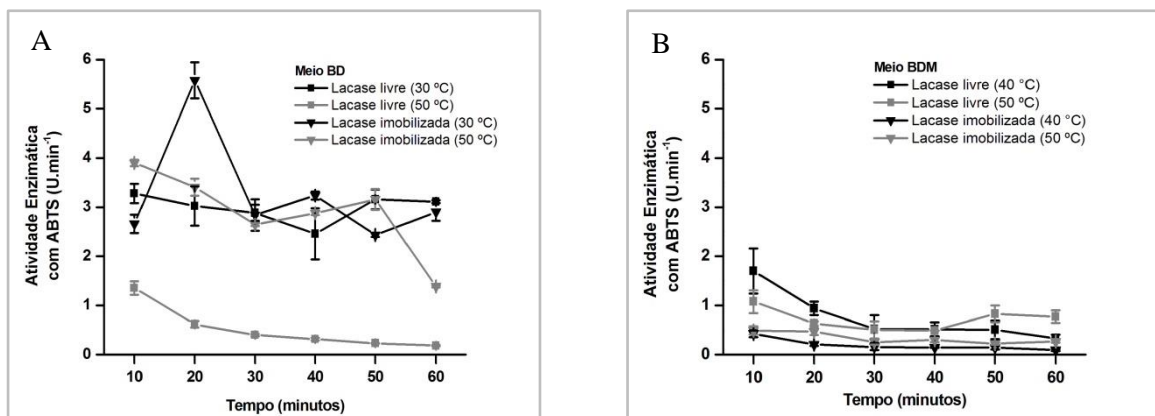
Karagoz et al. (2011) também conseguiram armazenar a lacase imobilizada em micropérolas de poli(vinilamina) por dois meses e reteve de 58 a 74% da atividade inicial. Xu et al. (2013) conseguiram reter 60% após 10 dias de armazenamento e Daâssi et al. (2014)

reteram 82,7% após 20 dias, com lacase immobilizada em membranas nanofibrosas de vinil modificado e em alginato de cálcio, respectivamente.

6.7.2. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica representa um fator importante para a aplicação de enzimas em reatores de escala industrial; a estabilidade do sistema dependerá do suporte escolhido, pois ele pode aumentar o tempo de meia vida da enzima immobilizada ou afetar adversamente não só a estabilidade térmica, mas o desempenho global do sistema caso a escolha não seja correta (MENDES et al., 2011b). Os Gráficos 11 mostram os perfis de estabilidade térmica para as enzimas livre e immobilizada, presente nos meios BD e BDM, respectivamente, depois de variados tempos de incubação.

Gráficos 11 - Análise da estabilidade térmica da lacase livre e immobilizada. A - produzida no meio BD. B - produzida no meio BDM.



Fonte: Autora

A avaliação da estabilidade térmica foi realizada nas temperaturas ótimas encontradas para a enzima livre e immobilizada de ambos os meios. No meio BD a enzima immobilizada se manteve estável na temperatura de 30 °C, apresentando um pico aos 20 minutos de incubação; já a 50 °C reteve apenas 35,5% da atividade inicial aos 60 minutos de contato. A enzima livre se manteve estável a 30 °C e desnaturou em 50 °C. Assim, a imobilização permitiu maior estabilidade da enzima à temperatura de 50 °C.

No meio BDM apresentou comportamento diferenciado; em 40 °C a enzima immobilizada manteve a atividade enzimática entre 0,5 e 1,0 U.min⁻¹, enquanto a 50 °C apresentou baixa atividade enzimática, porém se manteve estável; a enzima livre aos 40 °C perdeu 52,9% da atividade inicial nos primeiros 30 minutos de incubação e apresentou atividade inferior a 0,5 U.min⁻¹ em 50 °C.

No meio BD a enzima imobilizada e incubada a 50 °C se mostrou mais estável do que a enzima livre incubada nesta temperatura; isto indica que a atividade da enzima se tornou menos dependente da temperatura após o processo de imobilização.

O mesmo comportamento não ocorreu no meio BD a 30 °C e nas demais temperaturas no meio BDM; o processo de imobilização não aumentou significativamente a estabilidade da enzima.

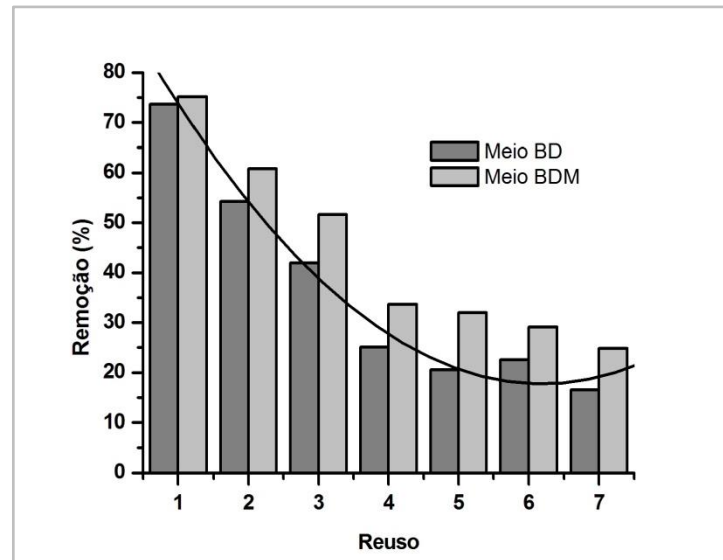
A ocorrência de melhor estabilidade térmica da lacase imobilizada pode ser atribuída a presença de ligação covalente entre a enzima e o suporte. Essa ligação previne a desnaturação conformacional da enzima em altas temperaturas (XU et al., 2013).

Lacase imobilizada em compostos magnéticos reteve 66,7% da atividade inicial após 4 horas de incubação a 60 °C (LIU et al., 2012). Quando imobilizada em sílica a atividade inicial foi mantida em 60% após 5 horas de incubação a 55 °C (TAVARES et al., 2013). Daâssi et al. (2014) imobilizaram lacase em alginato e conseguiram a retenção de 91,2% da atividade inicial após 90 minutos de incubação a 55 °C. A maior estabilidade presente na literatura em relação a este trabalho pode ser explicada pelos diferentes suportes utilizados, bem como as diferentes origens da lacase ou processo de purificação.

6.8. Ensaio de uso repetido

A capacidade em utilizar enzimas imobilizadas repetidas vezes representa uma grande vantagem comparada com as enzimas livres, pois permite seu uso em aplicações industriais rotineiras, além de diminuir o custo do processo (FERNANDEZ- FERNANDEZ, 2013; VINOTH KUMAR et al., 2012; DAÂSSI et al., 2014).

Após a imobilização nas condições ótimas para os meios BD e BDM o sistema foi testado frente a porcentagem de remoção de EE2 após ciclos de usos contendo lacase imobilizada em *Luffa cylindrica*. O Gráfico 12 apresenta as porcentagens de remoção em sete ciclos de reuso, mostrando que no primeiro ciclo a porcentagem de remoção foi de 73,71% para o meio BD e 75,14% para o meio BDM e no sétimo ciclo estes números caíram para 16,57% e 24,86%, respectivamente. No Gráfico 12 se pode notar ainda que depois do quarto ciclo de reuso as porcentagens de remoção mantiveram certa estabilidade; isto pode estar relacionada com a perda de enzimas que não foram imobilizadas covalentemente durante os primeiros ciclos de reuso. A estabilização ocorre quando restam no suporte apenas as enzimas imobilizadas por ligação covalente.

Gráfico 12 - Análise da porcentagem de remoção de EE2 após ciclos de reuso.

Fonte: Autora

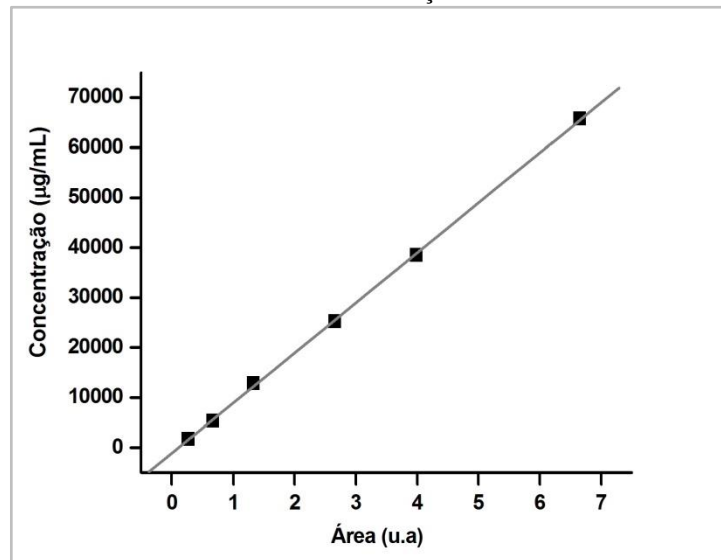
Visando a degradação de corantes, Daâssi et al. (2014) obtiveram valores superiores a 70% após 4 ciclos de uso da lacase imobilizada em beads de alginato de cálcio. Para a remoção de compostos fenólicos, Wang et al. (2012) imobilizaram lacase em nanopartículas de sílica magnética e as utilizaram em 10 reusos, alcançando 75% de remoção no sétimo ciclo e 70% no décimo ciclo.

Sathishkumar et al. (2012) visando a transformação do diclofenaco, imobilizaram a lacase produzida pelo fungo *Pleurotus florida* em PLGA e obtiveram remoção de 100% após seis ciclos de uso e 50% após 8 ciclos, utilizando a seringaldazina como mediador.

Nas pesquisas citadas acima o material utilizado para a imobilização são materiais inertes que causam melhor aderência da enzima e, portanto, menor perda desta para o meio reacional comparado ao suporte deste trabalho. E também, o processo de imobilização utilizado foi o encapsulamento, enquanto neste trabalho usou-se a ligação covalente. Pode-se inferir que estes fatores são os responsáveis pela melhor eficiência de reuso das lacases imobilizadas utilizadas nestas pesquisas em relação a este trabalho.

6.9. Remediação

Primeiramente se investigou o melhor pH para a remediação utilizando o meio BD. Foi construída uma curva de calibração com soluções contendo seis diferentes concentrações de EE2 (Gráfico 13). A equação da reta obtida foi $Y=10018x-1114$, cujo coeficiente de correlação linear foi de 0,9997.

Gráfico 13 - Curva de calibração - etinilestradiol.

Fonte: Autora

A Tabela 4 mostra as médias das áreas obtidas nas determinações em CLAE e as médias das concentrações de EE2 obtidas.

Tabela 4 - Média das áreas e das concentrações de EE2 obtidas nas determinações em CLAE.

pH	Amostra	Média das Áreas (u.a)	Média das concentrações (µg.mL ⁻¹)
4	Controle 1*	30970 ± 708,52	3,20 ± 0,07
	Controle 2**	13347 ± 1183,70	1,44 ± 0,12
	Enzima livre	25786 ± 2196,38	2,69 ± 0,22
	Enzima imobilizada	11721 ± 1034,12	1,28 ± 0,10
5	Controle 1	35361 ± 7030,76	3,64 ± 0,70
	Controle 2	13335 ± 270,11	1,44 ± 0,03
	Enzima livre	19219 ± 5256,38	2,03 ± 0,52
6	Enzima imobilizada	11907 ± 530,51	1,30 ± 0,05
	Controle 1	27232 ± 1716,86	2,83 ± 0,17
	Controle 2	13072 ± 2907,62	1,42 ± 0,29
	Enzima livre	23405 ± 896,34	2,45 ± 0,09
7	Enzima imobilizada	13361 ± 1390,09	1,44 ± 0,14
	Controle 1	46183 ± 1648,97	4,72 ± 0,16
	Controle 2	18038 ± 236,88	1,91 ± 0,02
	Enzima livre	42179 ± 1964,95	4,32 ± 0,19
	Enzima imobilizada	20297 ± 1831,40	2,14 ± 0,18

* Controle 1: solução de hormônio (10 mg.L⁻¹) + Tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹. ** Controle 2: solução de hormônio (10 mg.L⁻¹) + Tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ + 100 mg de *Luffa cylindrica* (bucha vegetal).

Fonte: Autora

A Tabela 5 mostra os valores das porcentagens de remoção do EE2 encontrados para os pH 4, 5, 6 e 7 em relação a enzima livre, enzima imobilizada e para o controle (*Luffa cylindrica* sem enzima).

Tabela 5 - Porcentagem de remoção do EE2 pela lacase livre e imobilizada do meio BD em diferentes pH.

pH	% de Remoção		
	Enzima Livre	Enzima Imobilizada	Controle ^{**}
4	15,93 ^{b*} ± 0,21	60 ^d ± 0,1	54,84 ^f ± 0,11
5	44,23 ^a ± 0,52	64,28 ^c ± 0,05	60,43 ^e ± 0,02
6	13,42 ^b ± 0,08	49,11 ^d ± 0,13	50 ^f ± 0,29
7	8,47 ^b ± 0,19	54,66 ^d ± 0,18	59,42 ^f ± 0,02

* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0.05$) pelo Teste de Tukey. **Controle: solução de hormônio (10 mg.L^{-1}) + Tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} + 100 mg de *Luffa cylindrica* (bucha vegetal).

Fonte: Autora

A remediação foi realizada por 24 horas. Análises estatísticas mostraram que a melhor remoção foi encontrada para o pH 5 para a enzima livre, enzima imobilizada e para o controle. Os demais pHs não apresentaram diferenças estatísticas entre si.

Utilizando-se do pH 5, foi realizada a remediação com os meios BD e BDM com duração de 8 horas e 24 horas. A Tabela 6 mostra as médias das áreas e das concentrações de EE2 encontradas neste ensaio, enquanto a Tabela 7 mostra as porcentagens de remoção encontradas para ambos os meios.

Tabela 6 - Média das áreas e das concentrações de EE2 obtidas nas determinações em CLAE.

Meio	Tempo	Amostra	Média das Áreas (u.a)	Média das concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
CB	8	Controle 1*	26699 \pm 9073,59	2,32 \pm 0,73
		Controle 2**	10344 \pm 2461,44	1,00 \pm 0,20
		Enzima livre	5702 \pm 1106,00	0,63 \pm 0,09
		Enzima imobilizada	10951 \pm 1865,23	1,05 \pm 0,15
	24	Controle 1	24895 \pm 5089,75	2,18 \pm 0,41
		Controle 2	11064 \pm 1832,82	1,06 \pm 0,15
		Enzima livre	9925 \pm 6366,55	0,97 \pm 0,51
		Enzima imobilizada	10337 \pm 879,87	1,00 \pm 0,07
CBM	8	Controle 1	26699 \pm 9073,59	2,32 \pm 0,73
		Controle 2	11939 \pm 1172,38	1,13 \pm 0,09
		Enzima livre	5239 \pm 2725,98	0,59 \pm 0,22
		Enzima imobilizada	6714 \pm 1046,47	0,71 \pm 0,08
	24	Controle 1	24895 \pm 5089,75	2,18 \pm 0,41
		Controle 2	8627 \pm 1571,90	0,86 \pm 0,13
		Enzima livre	12068 \pm 6056,73	1,14 \pm 0,49
		Enzima imobilizada	7629 \pm 1352,23	0,78 \pm 0,11

* Controle 1: solução de hormônio (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + Tampão acetato de sódio 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. ** Controle 2: solução de hormônio (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + Tampão acetato de sódio 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 100 mg de *Luffa cylindrica* (bucha vegetal).

Fonte: Autora

Tabela 7 - Porcentagem de remoção do EE2 pela lacase livre e imobilizada dos meios BD e BDM pH 5.

Meio	Tempo (horas)	% de Remoção		
		Enzima Livre	Enzima Imobilizada	Controle*
BD	8	77,81 \pm 0,08	63,02 \pm 0,15	59,85 \pm 0,19
	24	60,72 \pm 0,51	59,51 \pm 0,07	57,28 \pm 0,14
BDM	8	79,22 \pm 0,22	75 \pm 0,08	60,21 \pm 0,06
	24	53,84 \pm 0,48	68,42 \pm 0,10	61,53 \pm 0,12

*Controle: solução de hormônio (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + Tampão acetato de sódio 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 100 mg de *Luffa cylindrica* (bucha vegetal).

Fonte: Autora

A remediação com duração de oito horas apresentou melhor remoção de EE2 em ambos os meios, sendo que as melhores médias foram encontradas para a enzima livre. Em relação a remediação com duração de 24 horas as melhores médias foram encontradas para a enzima imobilizada, porém sem diferença estatística das médias apresentadas na enzima livre e no controle.

Comparando os dois meios, os melhores resultados foram encontrados para o meio BDM, no entanto as médias de remoção deste meio são estatisticamente iguais as do meio BD.

A enzima livre se mostrou mais eficaz na degradação do EE2 comparada a enzima imobilizada; exceto para o ensaio com duração de 24 horas com a enzima do extrato bruto do meio BDM. Ocorreu remoção de até 61,53% do EE2 por adsorção ao suporte quando este foi utilizado na remediação sem adição de enzima (controle). No entanto, ao utilizar a enzima imobilizada nos ensaios ocorreu a degradação do EE2, removendo até 75% do EE2 presente no meio reacional, pois a presença do glutaraldeído e de enzimas no suporte diminuiu a adsorção do hormônio (estereoimpedimento). A degradação do EE2 é mais conveniente que a adsorção, visto que esta não elimina o composto, apenas o transfere de fase, enquanto a degradação pode eliminá-lo ou formar compostos mais simples e, conseqüentemente menos tóxicos.

Nos ensaios com a enzima imobilizada provavelmente ocorreu a degradação do EE2, pois os cromatogramas não mostraram presença de outros compostos no comprimento de onda estudado.

Outros autores conseguiram a degradação do EE2. Lloret et al (2010) conseguiram a completa remoção de EE2 após 15 minutos de incubação do hormônio com a enzima comercial de *Myceliophthora thermophila*, enquanto Nair, Demarche e Agathos (2013) obtiveram de 85 a 95% de degradação do EE2 com lacase imobilizada em esferas de sílica. Esses resultados foram alcançados provavelmente pelo uso de enzimas purificadas e por utilizar métodos de imobilização consolidados na literatura.

6.10. Teste em biorreator

Para se investigar a remoção do EE2 em um reator de leito fluidizado contendo enzima imobilizada, foram realizados dois testes. A Tabela 8 mostra as porcentagens de remoção deste hormônio nos testes realizados. No teste 1 foram utilizados 2,1 g de *Luffa cylindrica*, enquanto no teste 2 utilizou-se o dobro (4,2 g). Os controles contem a mesma quantidade de *Luffa cylindrica* exigidas em cada teste, porém sem enzimas imobilizadas.

Tabela 8 - Análise da porcentagem de remoção do EE2 pela lacase livre e imobilizada empregadas em reator de leito fluidizado.

% Remoção				
Tempo (h)	Teste 1*		Teste 2**	
	Controle 1***	Enz. Imob. 1	Controle 2	Enz. Imob. 2
0,5	20,69	28,41	50,09	52,78
1,0	37,81	34,50	61,07	58,20
1,5	40,77	38,50	73,29	62,96
2,0	48,74	44,79	77,12	64,94
4,0	80,77	58,56	89,98	70,13
8,0	90,64	69,23	97,49	76,59
24,0	97,04	73,14	99,23	86,07

* Teste 1: teste com 2,1 g de *Luffa cylindrica*. ** Teste 2: teste com 2,1 g de *Luffa cylindrica*. ***Controle: solução de hormônio (10 mg.L⁻¹) + Tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹ + *Luffa cylindrica* (bucha vegetal).

Fonte: Autora

Como podem ser observados na Tabela 8, a porcentagem de adsorção foi maior do que a de degradação do EE2. Isto provavelmente ocorreu devido ao preparo da *Luffa cylindrica* antes do processo de remoção. A *Luffa cylindrica* foi preparada como descrito nos itens 4.8. e 4.9., até a reação com HCl. Após esta reação as fibras foram lavadas e secas e não passaram por nenhum processo adicional, portanto estas condições proporcionaram melhora da superfície de contato e eficiência na adsorção do EE2, atingindo até 99,23% de remoção.

A enzima imobilizada foi colocada no reator após reação da *Luffa cylindrica* com o glutaraldeído e com o extrato bruto, este tratamento dificultou a adsorção do EE2 por estereoismpedimento. Assim, os valores de remoção por degradação foram inferiores aos valores de remoção por adsorção, provavelmente pela quantidade de enzima retida no suporte.

Ressalta-se ainda que ao dobrar a quantidade de *Luffa cylindrica* (teste 2) houve significativa melhora no processo de remoção, tanto para os controles como para as enzimas imobilizadas. Em 24 horas de ensaio a adsorção pelo controle teve acréscimo de 2,20 %, enquanto para a enzima imobilizada este valor alcançou 15,02%.

Os testes no biorreator apresentaram dois inconvenientes; a formação de espuma e a flutuação das fibras de *Luffa cylindrica*, dificultando o contato destas com o meio reacional.

Wang et al (2012) ao utilizar um reator de leito fluidizado para degradar compostos fenólicos com lacase imobilizada em sílica, conseguiu 100% de remoção após 3 horas de operação. Lloret et al (2012) conseguiu 92% de remoção do EE2 após 10 dias de tratamento em um reator com lacase imobilizada em Eupergit® C. os resultados encontrados neste trabalho foram melhores do que os resultados obtidos por Lloret et al. (2012), pois apesar destes autores terem alcançado melhor porcentagem de degradação em relação a este

trabalho, ele demandaram por maior tempo (10 dias), fato não desejável em processo de tratamento de água e efluentes.

Portanto, o método de imobilização e o suporte escolhido podem influenciar na remoção do EE2 quando o processo for realizado em biorreatores. Quanto mais inerte for o suporte, menores serão as reações físicas ocorridas entre este e o meio reacional, e melhor será a atuação da enzima que foi imobilizada.

7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

7.1. Conclusões

As características apresentadas pela lacase produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus* utilizando os meios BD e BDM frente a variação de pH e temperatura, tanto na forma livre quanto na forma imobilizada, mostraram que estas podem ser utilizadas em processos cujo meio reacional seja ácido. No entanto, apresentam o inconveniente de não suportar temperaturas superiores a 50 °C.

O processo de imobilização possibilitou a retenção de 46,45% de proteínas do extrato bruto obtido com o meio BD e 56,97% do extrato bruto obtido pelo meio BDM, evidenciando que o processo de imobilização da lacase em fibras de *Luffa cylindrica* necessita ser melhor estudado e otimizado para se aumentar a concentração de proteínas retida no suporte.

As condições ótimas obtidas para o processo de imobilização foram: concentração de glutaraldeído de 2% e reação com o suporte de 1 hora sob agitação (120 rpm); secagem da bucha antes da reação com glutaraldeído; tempo de 24 horas de imobilização. O processo de imobilização reteve 46,45% de proteínas do extrato bruto do meio BD e 56,97% do meio BDM.

Apesar da lacase obtida no meio BD ter apresentado superioridade em atividade enzimática em relação a lacase obtida no meio BDM, quando analisada a estabilidade térmica em temperaturas próximas a 60 e 70 °C, os valores da atividade enzimática não foram satisfatórios. Portanto, se faz necessário melhorar a estabilidade térmica desta enzima para seu uso em processos contínuos devido a perda significativa de atividade em temperaturas elevadas.

A lacase do meio BD mostrou maior estabilidade de armazenamento em relação a enzima do meio BDM, porém esta estabilidade necessita ser melhorada, visto que não houve grande perda de atividade em 30 dias de armazenamento. Pode-se inferir que enzimas existiam não imobilizadas covalentemente e estas foram incorporadas à solução de armazenamento.

A remediação realizada nos erlenmeyers mostrou que a lacase, tanto livre quanto imobilizada, possui grande potencial de ser utilizada na remoção de EE2, pois em 8 horas de ensaio se alcançou remoção de 79,22% pela lacase livre e 75,00% pela lacase imobilizada do composto em questão.

Na remediação realizada no reator a adsorção se mostrou mais eficaz na remoção de EE2 comparada a degradação, no entanto é preferível optar pelo processo de degradação do composto, pois assim este será eliminado do meio e não transferido de ambiente. O processo de imobilização não foi otimizado necessitando de melhores estudos para o preparo do suporte e para a imobilização da enzima.

7.2. Sugestões

Promover melhor preparo do suporte para diminuição da hidrofiliabilidade da *Luffa cylindrica* e, conseqüentemente, aperfeiçoar o processo de imobilização da lacase. A diminuição da hidrofiliabilidade poderá ser realizada pela acetilação do suporte e a reação deste com aminoácidos. Estas ações poderão diminuir a adsorção para que ocorra maior índice de degradação do EE2.

Realizar testes com diferentes concentrações de extrato bruto para que se encontre a concentração ótima promovendo a incorporação de um quantitativo maior de enzimas ao glutaraldeído.

Otimizar o processo de degradação do EE2 no reator de leito fluidizado, visando solucionar os problemas de formação de espuma e flutuação da *Luffa cylindrica*; se estabelecendo a vazão ótima, pressão ótima, melhor temperatura, melhor concentração de EE2 e de enzimas imobilizadas.

Avaliar a toxicidade da solução de EE2 após o tratamento.

8. REFERÊNCIAS

- AMIN, H. A. S.; MOHAMED, S. S. Immobilization of *Aspergillus terreus* on loofa sponge for soyasapogenol B production from soybean saponin. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 85-90, 2012.
- ARMSTRONG, B. M.; LAZORCHAK, J. M.; MURPHY, C. A.; HARING, H. J.; JENSEN, K.; SMITH, M. E. Determining the effects of a mixture of an endocrine disrupting compound, 17 α -ethinylestradiol, and ammonia on fathead minnow (*Pimephales promelas*) reproduction. **Chemosphere**, v. 120, p. 108-114, 2015.
- BACTRUP, E.; HENRIKSEN, P. G. Disrupted reproductive behavior in unexposed female zebrafish (*Danio rerio*) paired with males exposed to low concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2). **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 197-204, 2015.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215 – 242, 2006.
- BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220-1227, 2012.
- BERENSMEIER, S.; ERGEZINGER, M.; BOHNET, M.; BUCHHOLZ, K. Design of immobilised dextransucrase for fluidized bed application. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p. 255-267, 2004.
- BEZERRA, T. M. S.; BASSAN, J. C.; SANTOS, V. T. O.; FERRAZ, A.; MONTI, R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 417-423, 2015.
- CABANA, H.; AHAMED, A.; LEDUC, R. Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1656-1662, 2011.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, ano IX, n. 36, p. 48-57, 2006.
- CAPTANE, M.; NICOLUCCI, C.; MENALE, C.; MITA, L.; ROSSI, S.; MITA, D. G.; DIANO, N. Enzymatic removal of estrogenic activity of nonylphenol and octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248, p. 337-346, 2013.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. M, CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.
- CARVALHO, C. S. M.; AGUIAR, L. V. B.; SALES-CAMPOS, C.; MINHONI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Cultivo *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em resíduos de bananeira. **Ambiência Guarapuava**, v. 9, n. 3, p. 651-660, 2013.

CHEN, B.; CHEN, C.; GUO, W.; CHANG, H.; CHEN, W.; LEE, D.; HUANG, C.; REN, N.; CHANG, J. Fixed-bed biosorption of cadmium using immobilized *Scenedesmus obliquus* CNW-N cells on loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 175-181, 2014.

COLLI-DULA, R.; MARTYNIUK, C. J.; KROLL, K. J.; PRUCHA, M. P.; KOZUCH, M.; BARBER, D. S.; DENSLOW, N. D. Dietary exposure of 17- α ethinylestradiol modulates physiological endpoints and gene signaling pathways in female largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 148-160, 2014.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326-346, 2011.

DAÂSSI, D.; RODRÍGUEZ-COUTO, S.; NASRI, M.; MECHICHI, T. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloopsis gallica* into Ca-alginate beads. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 90, p. 71-78, 2014.

DAMNJANOVIC, J. J.; ZUZA, M. G.; SAVANOVIC, J. K.; BEZBRADICA, D. I.; MIJIN, D. Z.; BOSKOVIC-VRAGOLOVIC, N.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. D. Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 50-59, 2012.

DEMARCHE, P.; JUNGHANNS, C.; NAIR, R. R.; AGATHOS, S. N. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 933-953, 2012.

DIAS, A. C. V.; GOMES, F. W.; BILA, D. M.; SANT'ANNA, G. L.; DEZOTTI, M. Analysis of estrogenic activity in environmental Waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 41-47, 2015.

DOYLE, M. A.; BOSKER, T.; MARTYNIUK, C. J.; MACLATCHY, D. L.; MUNKITTRICK, K. R. The effects of 17- α -ethinylestradiol (EE2) on molecular signaling cascades in mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Aquatic Toxicology**, v. 134-135, p. 34-46, 2013.

DURAN, F. G.; AMARAL FILHO, W. N.; AMARAL, W. N. Esteroidogênese. In: COUTINHO, E.; FERNANDES, C. E.; MELO, N. R.; AMARAL, W.N. **Tratado de reprodução humana: hormônios em ginecologia**. Goiânia: Contato Comunicação, 2010. p. 29-33.

DURAN, F. G.; MALTA, N. L.; RASSI-CRUZ, M.; AMARAL, W. N. Estrogênios. In: COUTINHO, E.; FERNANDES, C. E.; MELO, N. R.; AMARAL, W.N. **Tratado de reprodução humana: hormônios em ginecologia**. Goiânia: Contato Comunicação, 2010. p. 29-33.

FERNANDES, A. N.; GIOVANELA, M.; ALMEIDA, C. A. P.; ESTEVES, V. I.; SIERRA, M. M. D.; GRASSI, M. T. Remoção dos hormônios 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1526-1533, 2011.

FERNÁNDEZ, J. A.; HENAO, L. M.; PEDROZA-ROGRÍGUEZ, A. M.; QUEVEDO-HIDALGO, B. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. **Revista Colombiana de Biotecnología**, 11, n. 1, p. 59-72, 2009.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1808-1825, 2013.

FERNÁNDEZ-FUEYO, E.; CASTANERA, R.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; LÓPEZ-LUCENDO, M. F.; RAMÍREZ, L.; PISABARRO, A. G.; MARTÍNEZ, A. T. Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 150-161, 2014.

FERRAREZI, A. L.; OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BRITO, R. R.; SIQUEIRA, M. R.; VENDRAMINI, P. H.; QUILLES JR, J. C.; NUNES, C. C. C.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 107, p. 106-113, 2014.

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

FURGAL, K. M.; MEYER, R. L.; BESTER, K. Removing selected steroid hormones, biocides and pharmaceuticals from water by means of biogenic manganese oxide nanoparticles in situ at ppb levels. **Chemosphere**, 2014.

GANGULY, R.; DWIVEDI, P.; SINGH, R. P. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1246-1251, 2007.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F.; ULHOA, C. J. Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 633-636, 2006.

GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; FONTANELLA, B.; RIVIECCIO, V.; SANNIA, G. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 376, n. 1, p. 171-179, 2000.

GOLDSTEIN, L.; LEVIN, Y.; KATICHALSKI, E. A water-insoluble polyanionic derivative of trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetic behavior of the bound trypsin. **Biochemistry**, v. 3, n. 12, p. 1913-1919, 1964.

GOLVEIA, J. C. S.; GARCIA, L. F.; BARA, M. T. F.; SANTIAGO, M. F. Aproveitamento do resíduo de guariroba (*Syagrus oleracea* BECC. *Arecaceae*) para indução de lacase fúngica. In: Congresso de Engenharia e Tecnologia, 2014, Goiânia-GO: Universidade Federal de Goiás, 2014.

GONÇALVES, M. L. F. C.; STEINER, W. Detection of laccase activity in polyacrylamide gels after electrophoresis under denaturing conditions. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 9, p. 667-668, 1996.

GÓMEZ, J. L.; BÓDALO, A.; GÓMEZ, E.; HIDALGO, A. M.; GÓMEZ, M.; MURCIA, M. D. Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 127, p. 47-57, 2007.

GRZYBOWSKI, W.; SZYDŁOWSKI, J. The impact of chromophoric dissolved organic matter on the photodegradation of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in natural waters. **Chemosphere**, v. 111, p. 13-17, 2014.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* Beta-galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 137-143, 2010.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HINTEMANN, T.; SCHNEIDER, C.; SCHÖLER, H. F.; SCHNEIDER, R. J. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethylestradiol in the aquatic environment. **Water Research**, v. 40, n. 12, p. 2287-2294, 2006.

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

IQBAL, M.; EDYVEAN, R. G. J. Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Minerals Engineering**, v. 17, p. 217-223, 2004.

IQBAL, M.; EDYVEAN, R. G. J. Loofa sponge immobilized fungal biosorbent: A robust system for cadmium and other dissolved metal removal from aqueous solution. **Chemosphere**, v. 61, p. 510-518, 2005.

JADHAV, S. B.; SINGHAL, R. S. Polysaccharide conjugated laccase for the dye decolorization and reusability of effluent in textile industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 271-277, 2013.

KARAGOZ, B.; BAYRAMOGLU, G.; ALTINTAS, B.; BICAK, N.; ARICA, M. Y. Amine functional monodisperse microbeads via precipitation polymerization of *N-vinyl* formamide: Immobilized laccase for benzidine based dyes degradation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6783-6790, 2011.

KARP, S. G.; FARACO, V.; AMORE, A.; BIROLO, L.; GIANGRANDE, C.; SOCCOL, V. T.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresouce Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012.

KURT, S.; BUYUKALACA, S. Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus spp.* (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3164-3169, 2010.

KUWAHARA, M.; KIMURA, Y.; ASADA, Y. Screening of basidiomycetos for lignin peroxidase genes using a DNA probe. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, 1989.

LARCHER, S.; YARGEAU, V. Biodegradation of 17 α -ethinylestradiol by heterotrophic bacteria. **Environmental Pollution**, v. 173, p. 17-22, 2013.

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

LETTERA, V.; VECCHIO, C.; PISCITELLI, A.; SANNIA, G. Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, p. 781-788, 2011.

LINKE, D.; BOUWS, H.; PETERS, T.; NIMTZ, M.; BERGER, R. G.; ZORN, H. Laccases of *Pleurotus sapidus*: characterization and cloning. **Jounal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9498-9505, 2005.

LIU, L.; LIN, Z.; ZHENG, T.; LIN, L.; ZHENG, C.; LIN, Z.; WANG, S.; WANG, Z. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 426-433, 2009.

LIU, C.; WANG, F.; OUR-YANG, F. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 878-882, 2009.

LIU, Y.; ZENG, Z.; ZENG, G.; TANG, L.; PANG, Y.; LI, Z.; LIU, C.; LEI, X.; WU, M.; REN, P.; LIU, Z.; CHEN, M.; XIE, G. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 21-26, 2012.

LLORET, L.; EIBES, G.; LÚ-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 124-131, 2010.

LLORET, L.; EIBES, G.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. Continuous operation of a fluidized bed reactor for the removal of estrogens by immobilized laccase on Eupergit supports. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 404-406, 2012.

LLORET, L.; EIBES, G.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M.; MIYAZAKI, M. Improving the catalytic performance of laccase using a novel continuous-flow microreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 223, p. 497-506, 2013.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 111, p. 51-55, 2015.

MANN, J.; MARKHAM, J. L.; PEIRIS, P.; SPOONER-HART, R. N.; HOLFORD, P.; NAIR, N. G. Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by *Cerrena consors*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 138-145, 2015.

MANTOVANI, T. R. D.; MEIRELLES, L. D. P.; VALLE, J. S.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1681-1692, 2012.

MARCO-URREA, E., PEREZ-TRUJILLO, M., BLANQUEZ, P., VICENT, T., CAMINAL, G. Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2159-2166, 2010.

MARTÍN, J.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Pharmaceutically active compounds in sludge stabilization treatments: Anaerobic and aerobic digestion, wastewater stabilization ponds and composting. **Science of the Total Environment**, v. 503, p. 97-104, 2015.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

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

MAZMANCI, M. A.; UNYAYAR, A. Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 337-342, 2005.

MELEIGY, S. A.; KHALAF, M. A. Biosynthesis of gibberellic acid from milk permeate in repeated batch operation by a mutant *Fusarium moniliforme* cells immobilized on loofa sponge. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 374-379, 2009.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MENALE, C.; NICOLUCCI, C.; CATAPANE, M.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; MITA, D. G.; DIANO, N. Optimization of operational conditions for biodegradation of

chlorophenols by laccase-polyacrylonitrile beads system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 38-44, 2012.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. D. L. C.; DE CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109-115, 2011a.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011b.

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

MITA, L.; GRUMIRO, L.; ROSSI, S.; BIANCO, C.; DEFEZ, R.; GALLO, P.; MITA, D. G.; DIANO, N. Bisphenol A removal by a *Pseudomonas aeruginosa* immobilized on granular activated carbon and operating in a fluidized bed reactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 291, p. 129-135, 2015.

MOLDES, D.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á. Role of Laccase and Low Molecular Weight Metabolites from *Trametes versicolor* in Dye Decolorization. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

MORAIS, R. R.; PASCOAL, A. M.; CARAMORI, S. S.; LOPES, F. M.; FERNANDES, K. F. Immobilization of α -Amylase onto *Luffa operculata* Fibers. **Enzyme Research**, v. 2013, 2013.

MORE, S. S.; RENUKA, P. S.; PRUTHVI, K.; SWETHA, M.; MALINI, S.; VEENA, S. M. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.

MOREIRA, M. T.; PALMA, C.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 27-39, 1998.

NAIR, R. R.; DEMARCHE, P.; AGATHOS, S. N. Formulation and characterization of an immobilized laccase biocatalyst and its application to eliminate organic micropollutants in wastewater. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 814-823, 2013.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y.; LIU, Y.; TANAKA, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n. 6, p. 437-442, 1994.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; LIU, Y.; TANAKA, H. Efficient production of ethanol by cells immobilized in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 3, p. 271-274, 1997.

OLIVEIRA, H. G.; FERREIRA, L. H.; BERTAZZOLI, R.; LONGO, C. Remediation of 17- α -ethinyloestradiol aqueous solution by photocatalysis and electrochemically assisted

photocatalysis using TiO₂ and TiO₂/WO₃ electrodes irradiated by a solar simulator. **Water Research**, v. 72, p. 305-314, 2015.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PARENTI, A.; MUGUERZA, E.; IROZ, A. R.; OMARINI, A.; CONDE, E.; ALFARO, M.; CASTANERA, R.; SANTOYO, F.; RAMÍREZ, L.; PISABARRO, A. G. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 142-147, 2013.

PAZZETTO, R.; DELANI, T. C. O.; FENELON, V. C.; MATIOLI, G. Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 cells immobilized on loofa sponge. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 46-51, 2011.

PEDRO, J. M. A experiência com contraceptivos no Brasil: uma questão de geração. **Revista Brasileira de História**, v. 23, n. 45, p. 239-260, 2003.

POÇAS, E. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; NETO, D. C. Application of loofa sponge (*Luffa cylindrica*) as carrier for invertase immobilization for invert sugar syrup production. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 53-58, 2004.

RAHMANI, K.; FARAMARZI, M. A.; MAHVI, A. H.; GHOLAMI, M.; ESRAFILI, A.; FOROOTANFAR, H.; FARZADKIA, M. Elimination and detoxification of sulfathiazole and sulfamethoxazole assisted by laccase immobilized on porous silica beads. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 97, p. 107-114, 2015.

RANGELOV, S.; NICELL, J. A. A model of the transient kinetics of laccase-catalyzed oxidation of phenol at micromolar concentrations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 1-15, 2015.

RAO, K.; LEI, B.; LI, N.; MA, M.; WANG, Z. Determination of estrogens and estrogenic activities in water from three rivers in Tianjin, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 6, p. 1164-1171, 2013.

REIS, C. M.; SILVA, E. L. Effect of upflow velocity and hydraulic retention time in anaerobic fluidized-bed reactors used for hydrogen production. **Chemical Engineering Journal**, v. 172, p. 28-36, 2011.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RHODES, M. J. **Introduction to Particle Technology**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1998. 474 p.

ROCHA, S.; DOMINGUES, V.; PINHO, C.; FERNANDES, V.; DELERUE-MATOS, C.; GAMEIRO, P.; MANSILHA, C. Occurrence of Bisphenol A, Estrone, 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinylestradiol in Portuguese Rivers. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 73-78, 2013.

- SAEED, A.; IQBAL, M.; ZAFAR, S. I. Immobilization of *Trichoderma viride* for enhanced methylene blue biosorption: batch and column studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 406-415, 2009.
- SÄFHOLM, M.; JANSSON, E.; FICK, J.; BERG, C. Mixture effects of levonorgestrel and ethinylestradiol: Estrogenic biomarkers and hormone receptor mRNA expression during sexual programming. **Aquatic Toxicology**, v. 161, p. 146-153, 2015.
- SANTOS, I. J. S.; GROSSMAN, M. J.; SARTORATTO, A.; PONEZI, A. N.; DURRANT, L. R. Degradation of the recalcitrant pharmaceuticals carbamazepine and 17 α -ethinylestradiol by ligninolytic fungi. **Chemical Engineering Transactions**, v. 12, p. 169-174, 2012.
- SALES CAMPOS, C.; CARVALHO, C. S. M.; AGUIAR, L. V. B.; ANDRADE, M. C. N. Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 141-145, 2011.
- SATHISHKUMAR, P.; CHAE, J.; UNNITHAN, A. R.; PALVANNAN, T.; KIM, H. Y.; LEE, K.; CHO, M.; KAMALA-KANNAN, S.; OH, B. Laccase-poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofiber: Highly stable, reusable, and efficacious for the transformation of diclofenac. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 113-118, 2012.
- SARATALE, G. D.; SARATALE, R. G.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. Fixed bed decolorization of Reactive Blue 172 by *Proteus vulgaris* NCIM-2027 immobilized on *Luffa cylindrica* sponge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 494-503, 2011.
- SCHMAL, M. **Cinética e Reatores: aplicação na engenharia química**. São Paulo: Synergia, 2009. p. 269.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial** Volume 2. São Paulo: Blucher, 2001. P. 179-192.
- SHIDA, G. M.; SADER, L. T.; AMORIM, E. L. C.; SAKAMOTO, I. K.; MAINTINGUER, S. I.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B. A.; SILVA, E. L. Performance and composition of bacterial communities in anaerobic fluidized bed reactors for hydrogen production: Effects of organic loading rate and alkalinity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 16925-16934, 2012.
- SKORONSKI, E.; FERNANDES, M.; FURIGO JR, A.; SOARES, C. H. L.; JOÃO, J. J. Imobilização de lacase de *Aspergillus sp.* em quitosana e sua aplicação na bioconversão de fenóis em reatores de leito fixo. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 215-220, 2014.
- SILVA, C. G. A. S.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.
- SILVA, A. M.; TAVARES, A. P. M.; ROCHA, C. M. R.; CRISTÓVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1095-1101, 2012a.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, n. 0, p. 16-24, 2012b.

SODRÉ, F. F. et al. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Caderno Temático**, v. 6, 2007.

SONGULASHVILI, G.; JIMENÉZ-TOBÓN, G. A.; JASPERS, C.; PENNINGCKX, M. J. Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants. **Fungal Biology**, v. 116, p. 883-889, 2012.

TAVARES, A. P. M.; RODRÍGUEZ, O.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; DOMÍNGUEZ, A.; MOLDES, D.; SANROMÁN, M. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of laccase on modified sílica: Satabilization, termal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 405-412, 2013.

TEIXEIRA, J. B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 24, 2002.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225. n. 1., p. 81-90, 1999.

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

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

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

TOUAHAR, I. E.; HAROUNE, L.; BA, S.; BELLENGER, J.; CABANA, H. 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.

UEDA, M.; SHINTANI, K.; NAKANISHI-ANJYUIN, A.; NAKAZAWA, M.; KUSUDA, M.; NAKATANI, F.; KAWAGUCHI, T.; TSUJIYAMA, S.; KAWANISHI, M.; YAGI, T.; MIYATAKE, K. A protein from *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C.J. Mou with strong removal activity against the natural steroid hormone, estriol: Purification, characterization, and identification as a laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 402-407, 2012.

URIOSTE, D.; MEDEIROS, M. B.; CASTRO, H. F. Imobilização de células de leveduras do gênero *Saccharomyces* em matrizes alternativas para obtenção de xarope de açúcar

invertido. In: VI Reunião Regional da SBBq -Nordeste, 2002, Fortaleza-CE. Anais - VI Reunião Regional SBBq Nordeste. Fortaleza-CE: Universidade Federal do Ceará, 2002.

VALDÉS, M.; MARINO, D.; WUNDERLIN, D.; SOMOZA, G.; RONCO, A.; CARRIQUIRIBORDE, P. Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface water of the “pampas” region and the “Rio de la Plata” estuary (Argentina). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, n. 1, p. 29-33, 2015.

VILELA, S. M. Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleras. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

VINOTH KUMAR, V.V., PREM KUMAR, M.P., THIRUVENKADARAVI, K.V.; BASKARALINGAM, P.; SENTHIL KUMAR, P.; SIVANESAN, S. Preparation and characterization of porous cross linked laccase aggregates for the decolorization of triphenyl methane and reactive dyes. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 28-34, 2012.

VITOLO, M. Reatores com enzimas imobilizadas. In: SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial** Volume 2. São Paulo: Blucher, 2001. P. 373-396.

WANG, F.; HU, Y.; GUO, C.; HUANG, W.; LIU, C. Enhanced phenol degradation in coking wastewater by immobilized laccase on magnetic mesoporous silica nanoparticles in a magnetically stabilized fluidized bed. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 120-124, 2012.

XU, F. Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition. **Biochemistry**, v. 35, p. 7608-7614, 1996.

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

XU, R.; ZHOU, Q.; LI, F.; ZHANG, B. Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal. **Chemical Engineering Journal**, v. 222, p. 321-329, 2013.

XU, R.; SI, Y.; WU, X.; LI, F.; ZHANG, B. Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers: Strong adsorption and efficient degradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, n. 1, p. 63-70, 2014.

XU, R.; THANG, R.; ZHOU, Q.; LI, F.; ZHANG, B. Enhancement of catalytic activity of immobilized laccase for diclofenac biodegradation by carbon nanotubes. **Chemical Engineering Journal**, v. 262, p. 88-95, 2015.

YANG, S.; HAI, F. I.; NGHIEM, L. D.; PRICE, W. E.; RODDICK, F.; MOREIRA, M. T.; MAGRAM, S. F. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 141, p. 97-108, 2013.

YI, T.; MACKINTOSH, S.; AGA, D. S.; HARPER, W. F. Exploring 17 α -ethinylestradiol removal, mineralization, and bioincorporation in engineered bioreactors. **Water Research**, v. 45, p. 1369-1377, 2011.

YOSHIDA, H. Chemistry of lacquer (Urushi). **Journal of the Chemical Society**, v. 43, p. 472-486, 1883.

ZHANG, A.; LI, Y. Removal of phenolic endocrine disrupting compounds from waste activated sludge using UV, H₂O₂, and UV/H₂O₂ oxidation processes: Effects of reaction conditions and sludge matrix. **Science of the Total Environment**, v. 493, p. 307-323, 2014.

ZHANG, X.; PAN, B.; WU, B.; ZHANG, W.; LU, L. A new polymer-based laccase for decolorization of AO7: Long-term storage and mediator reuse. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 248-253, 2014.

ZUCCA, P.; RESCIGNO, A.; OLIANAS, A.; MACCIONI, S.; SOLLAI, F. A.; SANJUST, E. Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, p. 216-222, 2011.

ANEXOS

Anexo 1 - Valores estatísticos de Fc e p para a variação de pH nos ensaios realizados com os meios BD e BDM.

		Meio BD		Meio BDM	
Enzima Livre					
Variação do pH		Valor de Fc	Valor de p	Valor de Fc	Valor de p
ABTS		13,98	<0,0001	11,47	<0,0001
Guaiacol		20,08	<0,0001	22,62	<0,0001
Seringaldazina		6,87	<0,0001	6,14	0,0004
Enzima Imobilizada					
Variação do pH		Valor de Fc	Valor de p	Valor de Fc	Valor de p
ABTS		11,48	<0,0001	15,561	<0,0001
Guaiacol		3,68	<0,0001	3,21	0,0431
Seringaldazina		8,71	0,0008	13,07	<0,0001

Anexo 2 - Valores estatísticos de Fc e p para a variação da temperatura nos ensaios realizados com os meios BD e BDM.

		Meio BD		Meio BDM	
Variação da temperatura		Valor de Fc	Valor de p	Valor de Fc	Valor de p
Enzima Livre		40,22	<0,0001	78,48	<0,0001
Enzima Imobilizada		30,98	<0,0001	124,30	<0,0001

Anexo 3 - Valores estatísticos de Fc e p para as condições de imobilização.

Condições de imobilização		
	Valor de Fc	Valor de p
Tratamento com glutaraldeído	11,77	0,0007
Concentração do glutaraldeído	11,79	0,0003
Secagem da bucha	12,78	0,0030
Tempo de imobilização	50,117	<0,0001

Anexo 4 - Valores estatísticos de Fc e p para a variação do pH no processo de remediação.

Remediação		
Variação do pH	Valor de Fc	Valor de p
Enzima Livre	8,27	0,0078
Enzima imobilizada	7,82	0,0092

Anexo 5 - Valores estatísticos de Fc e p para a variação do tempo no processo de remediação.

Remediação				
Variação do tempo	Meio BD		Meio BDM	
	Valor de Fc	Valor de p	Valor de Fc	Valor de p
Enzima Livre	4,298	0,1068	3,795	0,1232
Enzima Imobilizada	3,045	0,1559	1,923	0,2378