



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde

Adilson Muniz de Araujo

**Biocatalisadores heterogêneos baseados em lacases imobilizadas em
polímeros para degradação disruptores endócrinos alquilfenóis**

Rio de Janeiro
2023

Adilson Muniz de Araujo

**Biocatalisadores heterogêneos baseados em lacases imobilizadas em polímeros
para degradação disruptores endócrinos alquilfenóis**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação de Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Luciana da Cunha Costa

Coorientadora: Prof.^a Dra. Mônica Regina da Costa Marques Calderari

Rio de Janeiro
2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CZO

A663 Araujo, Adilson Muniz de

Biocatalisadores heterogêneos baseados em lacases imobilizadas em polímeros para
degradação disruptores endócrinos alquilfenóis / Adilson Muniz de Araujo - 2023.
68 f.

Orientador: Luciana da Cunha Costa
Coorientadora: Mônica Regina da Costa Marques Calderari

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia Ambiental.

1. Ciência e Tecnologia Ambiental - Teses. 2. Imobilização de lacase - Teses. 3.
Copolímero Sty-DVB - Teses. 4. Disruptor endócrino – Teses. 4. Nonilfenol – Teses.
I. Costa, Luciana da Cunha. II. Calderari, Mônica Regina da Costa Marques. III.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde.
IV. Título.

CDU 502

Bibliotecária Joice Soltosky Cunha CRB7-5946

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde
que cite a fonte.

Assinatura

Data

Adilson Muniz de Araujo

**Biocatalisadores heterogêneos baseados em lacases imobilizadas em polímeros para
degradação de disruptores endócrinos alquilfenóis**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Saneamento Ambiental.

Aprovada em 25 de outubro de 2023.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Luciana da Cunha Costa
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Mônica Regina da Costa Marques Calderari
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UERJ

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alexander Machado Cardoso
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UERJ

Prof.^a Dra. Tereza Cristina Jesus Rocha
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e força na caminhada.

À minha prezada e querida orientadora Dra. Luciana da Cunha Costa pela dedicação e compreensão.

À Dra. Mônica Regina da Costa Marques Calderari.

À minha querida mãe.

À minha amada família e meus amores Vanessa Baihense, Gabriel, Grazielle e Gracinda.

Às minhas iniciadoras no meio científico e eternas para mim. Dra. Isabel Cristina Alves Dias, Dra. Maria da Graça Sophya, Dra. Catharina Alves de Souza do Museu Nacional (UFRJ).

Às colegas de laboratório Ezaine Torquato e Stephany, um obrigado mais que especial.

Às primas queridas, por todo apoio Jamile e Maria Braulina.

Aos colegas do Ciep 167 Jardim Paraíso, que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

A outros amigos.

RESUMO

ARAÚJO, Adilson Muniz de. *Biocatalisadores heterogêneos baseados em lacases imobilizadas em polímeros para degradação de disruptores endócrinos alquilfenóis*. 2023. 68 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Os poluentes emergentes apresentam interesse nas áreas médica e ambiental pela alta taxa de toxicidade e baixa biodegradabilidade, podendo atuar como desreguladores endócrinos em humanos e em animais e se acumularem nos diversos ambientes do planeta. Dentre as estratégias para degradação de poluentes emergentes, está o emprego de lacases, enzimas oxidases multicobre. Estas enzimas são excelentes catalisadores naturais pela grande capacidade em oxidar diversos tipos de substratos. Esses biocatalisadores, apresentam vantagens em relação aos catalisadores químicos convencionais, considerados de alta toxicidade. A utilização da enzima na forma livre, pode ser uma alternativa, no entanto, a forma imobilizada da lacase, apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de reutilização após vários ciclos de uso e maior resistência às condições do meio. O presente trabalho, tem por objetivo estudar a imobilização da enzima lacase, produzidas por fungos da espécie *Trametes versicolor* em suportes poliméricos hidrofóbicos a base de divinilbenzeno e analisar o comportamento químico do biocatalisador na degradação do agente contaminante nonilfenol, considerado um disruptor endócrino. A metodologia consistiu, em preparar um copolímero de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB), obtido através da reação de polimerização em suspensão aquosa. Dados de microscopia óptica das partículas, revelou pérolas de polímeros individualizadas, polidispersas, característica da polimerização por suspensão aquosa, opacas e porosas. O copolímero STY-DVB, foi submetido a reação de nitração, redução dos grupos nitro e reação de diazotação. Estas reações de modificações químicas, foram comprovadas por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR). A imobilização da lacase ao copolímero, foi acompanhada espectrofotometricamente pela oxidação do substrato ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazole- 6-sulfonato (ABTS). O rendimento de imobilização foi de 89,6%. A degradação do nonilfenol foi monitorada por meio de leitura no fluorímetro. Após análise, a lacase imobilizada apresentou um rendimento de degradação do nonilfenol superior ao da lacase livre, ficando em cerca de 74%, enquanto a lacase livre degradou apenas 42% do nonilfenol, sob as condições de pH 5 e a 5°C.

Palavras-chave: Imobilização de lacase; Copolímero STY-DVB; Disruptor endócrino; Nonilfenol.

ABSTRACT

ARAÚJO, Adilson Muniz de. *Heterogeneous biocatalysts based on laccases immobilized in polymers for degradation of endocrine disruptors alkylphenols*. 2023. 86 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Emerging pollutants are chemicals with high toxicity and low biodegradability which can bioaccumulate in several environments. They are of great interest in the medical and environmental sectors due to their potential effect in humans and animals. Among the strategies for degrading emerging pollutants, the laccases (multicopper oxidase enzymes) stand out as excellent natural catalysts due to their great ability to oxidize different types of substrates. These biocatalysts have advantages over other conventional, highly toxic chemical catalysts. While the use of laccases in its free form is feasible, their immobilized stage presents several advantages such as the possibility of their over several consecutive cycles. This study aims to 1) assess the immobilization of laccase enzyme produced by the fungal species *Trametes versicolor* in divinylbenzene hydrophobic polymeric supports and evaluate the chemical behavior of this immobilized biocatalyst in the degradation of the contaminating agent nonylphenol (an endocrine disruptor). The supports were obtained by preparing a styrene-divinylbenzene copolymer (STY-DVB), obtained through polymerization reaction in aqueous suspension. Optical microscopy inspection of the particles revealed individual, opaque and porous polydisperse polymer beads, which are characteristic of aqueous suspension polymerization. The STY-DVB copolymer was subjected to nitration reaction, reduction of nitro groups, and diazotation reaction. These chemical modification reactions were confirmed by infrared spectrometry (FT-IR). The laccase immobilization in the copolymer was monitored spectrophotometrically by the oxidation of the acidic substrate 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazole-6-sulfonate (ABTS). The immobilization yield was 89.6%, whereas the activity recovered from the immobilized laccase was only 3.62%. The analysis of the nonylphenol degradation using a fluorimeter indicated higher degradation obtained with immobilized laccase (74%), when compared to its free form (42%) under pH 5 and 5°C.

Keywords: Immobilization of the laccase; STY-DVB copolymer; Endocrine disruptor; Nonylphenol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura sistematizada da enzima lacase	15
Figura 2 – Ciclo catalítico da lacase	16
Figura 3 – Método de imobilização por ligação covalente.....	17
Figura 4 – Principais métodos de imobilização.....	18
Figura 5 – Diferentes formas de se abordar as enzimas livres de suporte.....	21
Quadro 1 – Estudo de imobilização da lacase em diversos suportes e aplicação dos biocatalisadores	25
Quadro 2 – Estudo da degradação do nonilfenol.....	27
Figura 6 – Processo de polimerização em suspensão aquosa (salínica).....	31
Figura 7 – Fase aquosa	31
Figura 8 – Gotejamento de fase orgânica na solução	32
Figura 9 – Reação de nitração dos copolímeros STY-DV	33
Figura 10 – Reação de nitração do copolímero STY-DVB – (Etapa 1).....	34
Figura 11 – Reação de nitração do copolímero STY-DVB – (Etapa 2).....	34
Figura 12 – Reação de nitração – (Etapa 3)	35
Figura 13 – Reação de nitração – (Etapa 4)	35
Figura 14 – Reação de nitração – (Etapa 4)	35
Figura 15 – Reação de nitração – (Etapa 5)	36
Figura 16 – Reação de nitração – (Etapa 6)	36
Figura 17 – Reação de nitração (Etapa 7)	37
Figura 18 – Reação de nitração (Etapa 8)	37
Figura 19 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 1).....	37
Figura 20 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 2).....	38
Figura 21 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 3).....	38
Figura 22 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 4).....	39
Figura 23 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 5).....	39
Figura 24 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 1).....	40
Figura 25 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 2).....	40
Figura 26 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 3).....	41
Figura 27 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 4).....	41
Figura 28 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 5).....	42
Figura 29 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 6).....	42

Figura 30 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 7).....	43
Figura 31 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 8).....	43
Figura 32 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 9).....	44
Figura 33 – Microscopia óptica do copolímero de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB), aumentos de 50x	48
Figura 34 – Curva de adsorção-dessorção do copolímero STY-DVB	49
Figura 35 – Fotos dos copolímeros STY-DVB não modificado, após reação de nitração, após reação de redução, após reação de diazotação e imobilização da lacase.....	50
Figura 36 – Espectro de FT-IR do copolímero STY-DVB não modificado	51
Figura 37– Espectro de FT-IR do copolímero STY-DVB nitrato	51
Figura 38 – Espectro de FTIR do copolímero STY-DVB Reduzido	52
Figura 39 – Espectro de FTIR do copolímero Diazotado e com a enzima lacase.....	53
Figura 40 – Espectros de FT-IR dos copolímeros sobrepostos	53
Figura 41 – Períodos de reação de imobilização em cada intervalo de tempo Abs x tempo ..	54
Figura 42 – Gráfico da Absorbância x Tempo da lacase livre em comparação com a alíquota coletada após 24 horas de reação de imobilização	55
Figura 43 – Atividade enzimática da lacase ao longo do tempo reacional de imobilização ...	56
Figura 44 – Rendimento comparativo de imobilização de lacases em diferentes suportes: copolímeros STY-DVB e STY-DVB contendo grupos nitro, amino e diazônio	58
Figura 45 – Porcentagem de degradação do nonilfenol pela lacase na forma livre, em relação ao tempo em minutos	59
Figura 46 – Porcentagem de degradação do nonilfenol com a lacase imobilizada em relação ao tempo em minutos	59
Figura 47 – Dados de degradação do nonilfenol com a lacase imobilizada, comparando com a lacase na forma livre, em relação ao tempo em minutos.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas na síntese do copolímero STY-DVB	32
Tabela 2 – Dados de tamanho médio de partículas de polímeros obtidas por diferentes técnicas de polimerização.....	48
Tabela 3 – Dados de Rendimento de polimerização, grau de inchamento em etanol, área, volume de poros e diâmetro dos poros do copolímero STY-DVB.....	49
Tabela 4 – Atividade da lacase livre do biocatalisador e atividade recuperada (AR).....	59

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	10
1	OBJETIVOS.....	13
1.1	Geral.....	13
1.2	Específicos.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Lacases.....	14
2.2	Imobilização de enzimas em suportes sólidos.....	17
2.3	Estudos de degradação do nonilfenol.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODO.....	28
3.1	Reagentes.....	28
3.2	Equipamentos.....	29
3.3	Etapas.....	30
3.3.1	<u>Preparo dos suportes.....</u>	30
3.3.2	<u>Reações de modificação química dos copolímeros de STY-DVB</u>	33
3.3.3	<u>Imobilização de lacase aos copolímeros STY-DVB contendo grupos diazônio.....</u>	44
3.3.4	<u>Estudo do tempo de degradação do nonilfenol empregando lacases imobilizadas.....</u>	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	Síntese, caracterização e modificação dos copolímeros de estireno divinilbenzeno (STY-DVB)	47
4.2	Preparação dos biocatalisadores.....	53
4.3	Estudo de degradação do nonilfenol.....	58
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO – Poluentes Ambientais.....	66

INTRODUÇÃO

Segundo Rosal et al. (2010) e Vogelsang et al. (2006) poluentes emergentes são novos compostos que se encontram nos ambientes aquáticos e em águas residuais, escoadas na produção industrial, na agricultura ou até mesmo no esgoto doméstico. Estes compostos não possuem status regulatório e seus efeitos sobre o ambiente e os seres humanos são parcialmente conhecidos (Deblonde et al. 2011).

Montagner et al. (2017) concorda com essa definição e complementa que além da origem antrópica, também é possível a ocorrência natural destes poluentes em diferentes tipos de plantas.

Segundo Deblonde et al. (2011) o termo poluente emergente ou contaminante é um dos mais utilizados para se referir a todos os tipos de compostos que foram introduzidos no meio ambiente, os quais têm efeitos prejudiciais e preocupam a humanidade. Estão entre eles substâncias de limpeza (surfactantes), resíduos de medicamentos (resíduos farmacêuticos) excretados pelo organismo ou liberados no ambiente, cujos efeitos ambientais ainda são parcialmente desconhecidos, e os ftalatos (substâncias plastificantes). Além destes poluentes mais usuais, temos também a presença de alquilfenóis etoxilados (APEs), microplásticos e nanoplásticos.

Ainda segundo Deblonde et al. (2011) quando disponíveis no meio ambiente, os micropoluentes podem interagir com os organismos promovendo a bioacumulação nos tecidos e órgãos. Os efeitos destes contaminantes nos organismos são os mais variados, dentre os quais podemos destacar o aumento de toxicidade, devido à permanência destes poluentes nestes organismos (quando persistentes). Isso ocorre, por exemplo, para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), éteres difenílicos polibromados e bifenilas policlorados (PCBs), entre outros. Alguns efeitos adversos incluem: desordens comportamentais e alimentares, inibição de crescimento, disfunção reprodutiva, viabilidade reprodutiva, mobilidade e até a morte, estando presentes de forma mais persistente em ambientes aquáticos, causando efeitos ecotoxicológicos e deletérios em organismos deste meio.

Muitos dos poluentes emergentes são também considerados disruptores endócrinos. De acordo com Locatelli et al. (2016) disruptores endócrinos são substâncias exógenas ou misturas que alteram a função do sistema endócrino, causando efeitos na saúde dos organismos ou de sua subpopulação.

Existem muitos problemas neste campo de pesquisa que podem variar de dificuldades de epidemiologia humana aos muitos milhares de produtos

químicos que podem atuar como desreguladores endócrinos. Muitos são naturais e outros agentes sintéticos (ou semissintéticos), caracterizados por diferentes estruturas químicas, estes, têm o potencial de destruir o funcionamento normal dos processos endócrinos que regulam crescimento celular, homeostase e desenvolvimento. Este composto de disruptor endócrino (EDCs) interfere com a síntese, armazenamento, liberação, metabolismo e transporte removendo ou ligando os receptores de hormônios endógenos. Os EDCs são um grupo de compostos persistentes e bioacumulativos contaminantes.

(LOCATELLI *et al.*, 2016 p. 2)

Como estes disruptores são prejudiciais aos ecossistemas aquáticos e também à fauna, é necessário destacar o potencial de bioacumulação destes contaminantes, devido a sua alta hidrofobicidade (Catapane *et al.*, 2013) e ao alto grau de risco à saúde humana. Dessa forma, esta contaminação caracteriza-se como um problema ambiental de primeira ordem.

Segundo Catapane *et al.* (2013), muitos surfactantes são poluentes ambientais pela sua toxicidade e baixa biodegradabilidade e seu potencial químico como desreguladores endócrinos (EDCs). Estes contaminantes interferem no sistema endócrino (hormonal), podendo agir tanto em organismos aquáticos como em seres humanos através da bioacumulação e do contato com o meio contaminado. É importante, ainda, falar sobre os efluentes de águas residuais, pois estes, conforme aponta Catapane *et al.* (2013), são um dos principais meios de contaminação por nonilfenol, tendo em vista as dimensões de contaminação, com maior responsabilidade neste processo, os residuais de indústrias.

Sobre a atuação dos interferentes endócrinos, ainda que possuam várias estruturas químicas e propriedades físicas, segundo Catapane *et al.* (2013), existem duas principais formas de atuar em mecanismos eucarióticos, conforme regra geral: a primeira diz respeito à similaridade de hormônios naturais e a segunda ao bloqueio de funções hormonais. Os contaminantes mais comuns no meio aquático são os alquilfenóis etoxilados (APEs) em particular o nonilfenol etoxilado¹ (NPE) e o octilfenol etoxilado (OPE). Suas ocorrências mais comuns estão em formulações de detergentes e agentes dispersantes, emulsificantes e de lubrificação, que são degradados no meio ambiente em octilfenol e nonilfenol. As enzimas lacases podem ser empregadas na degradação de compostos fenólicos e xenobióticos. Para Santos (2020) e Kato-Schwartz (2020), as lacases são enzimas da classe das oxidorreduções, encontradas em diversos organismos, e têm papel importante nos processos metabólicos. Estas enzimas podem alterar a estrutura de compostos fenólicos, gerando subprodutos naturais com baixa toxicidade. Além do potencial biotecnológico, tem sua aplicação ainda no tratamento de efluentes industriais, contaminado pelo nonilfenol.

A degradação do nonilfenol pela lacase imobilizada, constitui uma estratégia importante

e desafiadora, quando comparada com a lacase livre, pois a imobilizada pode ter, além dos diversos benefícios vistos ao longo deste trabalho, a capacidade de poder ser reutilizada diversas vezes, como mostrado nos trabalhos de Melo et al. (2017) e de Ramírez-Montoya et al. (2015). Para Júnior (2010), o uso da lacase provinda do *Trametes versicolor*, imobilizada em diferentes concentrações, foi satisfatório para degradação do nonilfenol. Uma estratégia foi comparar a solução mantida sob agitação à solução estática na qual, pôde-se obter dados diferentes, sendo possível inferir que o uso de agitação mostrou-se mais eficiente.

O copolímero reticulado de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB) se destaca como suporte para diversas aplicações, tais como imobilização de enzimas e em processos de cromatografia de exclusão por tamanho (Neves et al. 2010).

Desse modo, objetiva-se descrever, neste estudo, a imobilização da enzima lacase comercial de *Trametes versicolor*, em um polímero reticulado a base de STY-DVB e avaliara capacidade do biocatalisador imobilizado em degradar o contaminante nonilfenol de soluções aquosas simuladas.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Estudar a imobilização de lacases de *Trametes versicolor* em suportes poliméricos hidrofóbicos a base de divinilbenzeno e analisar o comportamento químico do biocatalisador na degradação do agente contaminante nonilfenol.

1.2 Específicos

- Desenvolver um biocatalisador heterogêneo, baseado na imobilização da enzima lacase de *Trametes versicolor* em copolímero estireno-divinilbenzeno contendo grupos diazônio;
- Avaliar a eficiência da lacase imobilizada comparada a lacase em sua forma livre na degradação do nonilfenol presente em soluções sintéticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

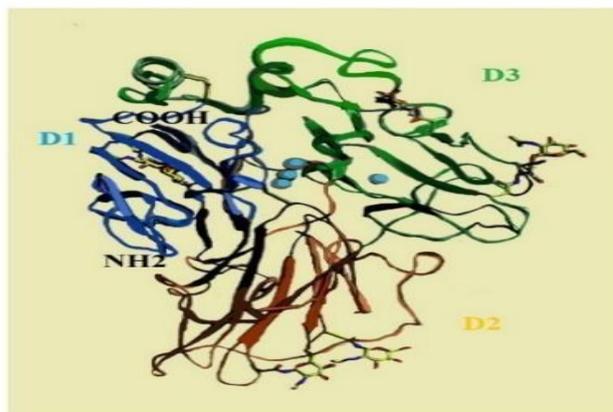
2.1 Lacases

Conforme aponta Fernández-Fernández et al. (2013) a lacase foi descoberta na árvore japonesa *Rhus vernicifera*. Desde então, esta enzima foi encontrada em diversas espécies de seres vivos (plantas, insetos e bactérias), no entanto, a maioria dos estudos se concentram nas lacases isoladas de fungos superiores. Os produtores de lacases mais comuns são quase todos os fungos que apodrecem a madeira (*Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus* e *Pleurotus eryngii*). Os principais papéis das lacases fúngicas são: formação de pigmentos, degradação de lignina e desintoxicação.

Ainda segundo Fernández-Fernández et al. (2013) lacases (benzenediol: oxidoreductase de oxigênio, EC 1.10.3.2) pertencem a um grupo de polifenol oxidases, contendo átomos de cobre em seu centro ativo. Essas enzimas catalisam reações de substratos fenólicos gerando radicais fenoxi. De forma geral, catalisam a redução de oxigênio em água e a oxidação de substratos, geralmente um p-dihidroxifenol ou outro composto fenólico. As lacases são tipicamente obtidas de fungos e plantas, mas também podem ser encontradas em bactérias e insetos, e já foram relatadas também em líquens e esponjas.

De acordo com Mainardi (2015) a composição química (estequiometria) desta enzima compreende quatro moléculas de um substrato redutor para cada oxigênio molecular, envolvendo a transferência de elétrons ($[4RH+O_2 \rightarrow 4R+2H_2O]$). A reação de redução de oxigênio a água é acompanhada da oxidação de substratos fenólicos, especificamente e seus derivados como: p-difenóis, o-difenóis, polifenóis, poliaminas, arildiaminas, aminofenóis, hidroquinonas, assim como íons inorgânicos, conforme Figura 1.

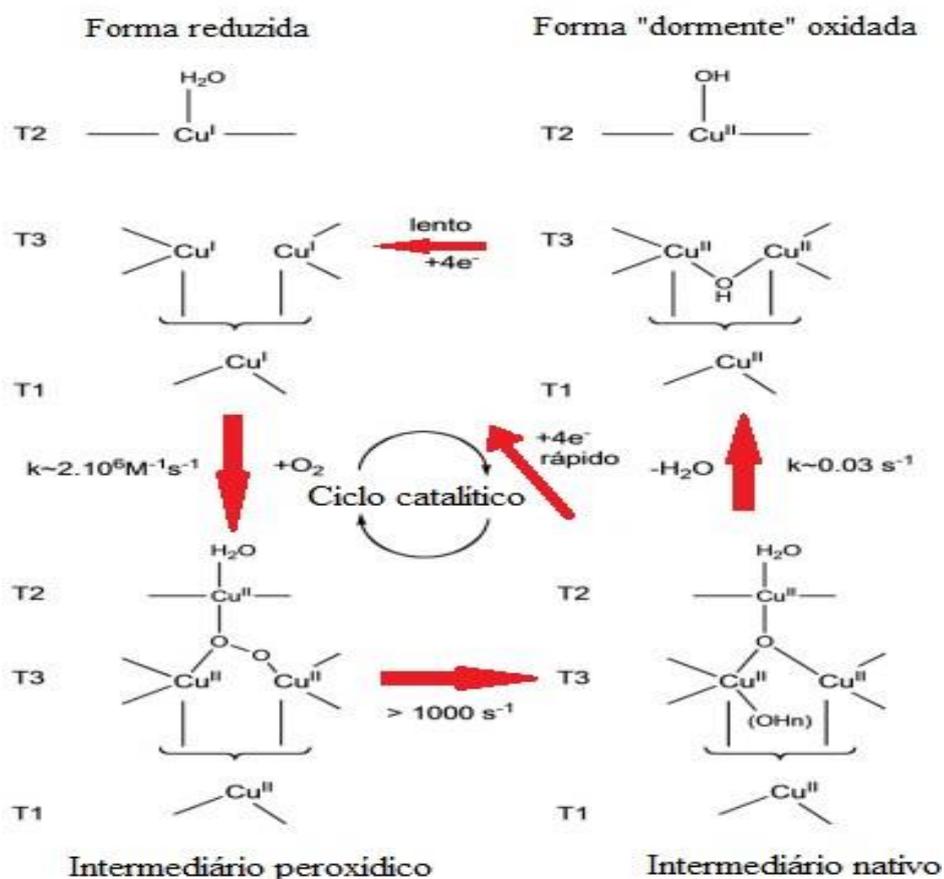
Figura 1 – Estrutura sistematizada da enzima lacase



Fonte: Adaptado de Mainardi (2015).

O processo catalítico da lacase pode ser observado da seguinte forma: para Fernández et al. (2013) o mecanismo de catálise da lacase começa com a doação de um elétron ao substrato (pelo sítio de cobre T1), seguido por uma transferência interna dos elétrons do T1 para sítio de cobre T2 e T3. O cobre T3 funciona como um aceptor de dois elétrons, no processo de oxidação aeróbica, que necessita da presença do cobre T2. Ainda sobre o processo catalítico, Baptistela (2011) aponta que este mecanismo envolve a produção de radicais livres reativos pela remoção de um elétron ou hidrogênio de grupos OH ou NH, conforme pode se ver na Figura 2. Os radicais podem reagir entre si ou com outras moléculas, em reações catalisadas pela enzima ou não, como a polimerização, hidratação ou abstração do hidrogênio. Já para os compostos fenólicos a oxidação da lacase resulta na formação de radicais aril, que é convertida em quinona.

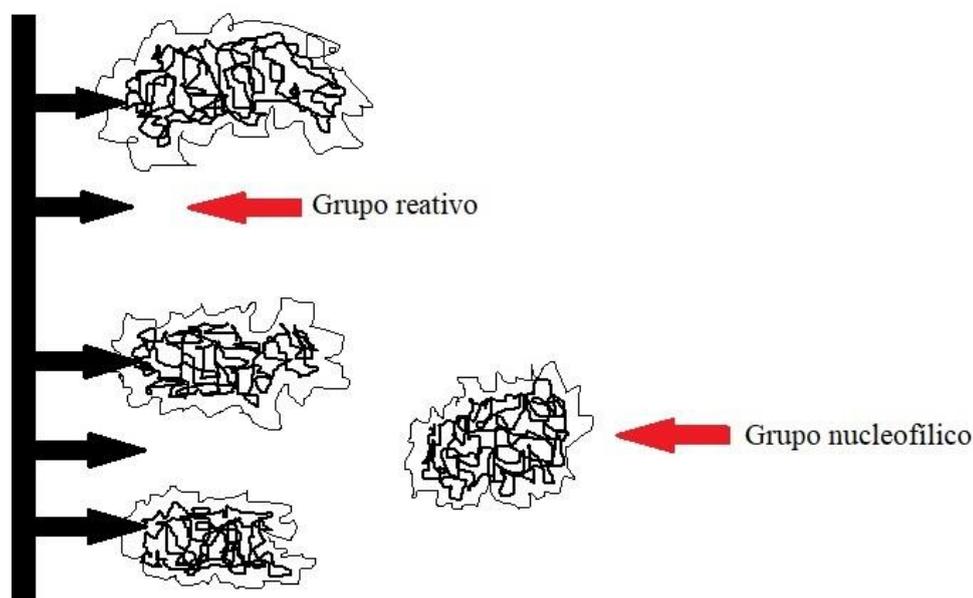
Figura 2 – Ciclo catalítico da lacase



Fonte: Adaptado de Baptistela (2011).

Segundo Souza et al. (2017), outra parte importante do processo de reação no biocatalisador é a imobilização enzimática, sendo escolhido este método pela possibilidade de reutilização da enzima e do barateamento do processo, dentre outras vantagens. O método utilizado nesta pesquisa é a imobilização por ligação covalente, desta forma, as enzimas reagem com os substratos (composto que irá se associar à enzima para realizar a reação) e geram um subproduto. A forma como cada enzima reage com cada substrato é específica. A Figura 3, mostra esquematicamente o método de imobilização por ligação covalente.

Figura 3 – Método de imobilização por ligação covalente
Ligação covalente



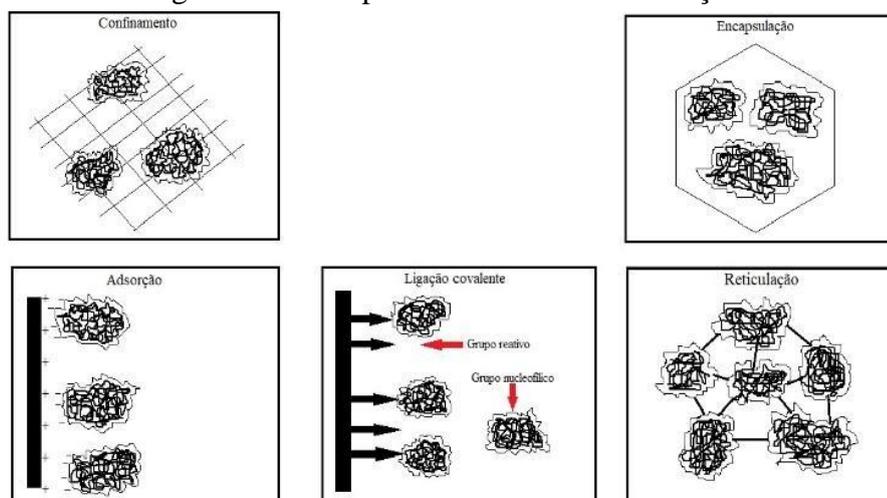
Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2017).

2.2 Imobilização de enzimas em suportes sólidos

Existem diversos processos que utilizam biocatalisadores e há uma enorme vantagem no seu uso, ao invés de catalisadores químicos convencionais. É importante destacar que muitos catalisadores químicos utilizados no mercado atualmente são considerados de alta toxicidade para o meio ambiente em comparação com os biocatalisadores. Estes catalisadores químicos geralmente têm como uma de suas características a liberação de toxinas como subproduto. (Fernández-Fernández *et al.*, 2013)

O desenvolvimento de biocatalisadores baseados em lacases imobilizadas em polímeros tem sido pouco investigado na literatura (Daronch *et al.* 2020). Conforme Souza *et al.* (2017), os métodos mais utilizados de imobilização de enzimas em suportes sólidos são: ligações covalentes, adsorção física, reticulação e encapsulação/aprisionamento, como está indicado na Figura 4.

Figura 4 – Principais métodos de imobilização



Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2017).

Traz -se também uma definição sobre a imobilização enzimática, conforme a seguir.

A Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte sólido insolúvel em meio aquoso e em solventes orgânicos, e pode ser usada isolada ou em combinação com outras técnicas de estabilização de proteínas, considerada uma das ferramentas mais eficientes para alterar a especificidade, seletividade, atividade e estabilidade das enzimas. (SOUZA *et al.*, 2017, p.532).

Após descrever a imobilização, destaca-se, de acordo com Daronch *et al.* (2020), que um desafio comum para este tipo de catálise enzimática é que as enzimas na forma livre são propensas a desnaturar e perder sua atividade sob condições ambientais, com aumento de temperatura, apresentar baixa estabilidade operacional, elevado custo e dificuldade na recuperação do produto final, o que torna este processo altamente dispendioso. Conforme Jiang (2017), comparando com a imobilização da lacase em um suporte sólido, mostra-se um caminho eficaz para superar tais limitações, possibilitando à lacase de maior estabilidade e facilidade de recuperação e reutilização.

Existem diversos fatores que apontam para a importância da imobilização de enzimas em suportes sólidos, quando comparada com a enzima na forma livre. De modo geral, estas enzimas podem ser reutilizadas diversas vezes, barateando o processo, sem perder suas características químicas originais, tais como a desnaturação, estabilidade das lacases em temperaturas mais elevadas, pH diferenciado e seu grau de reatividade. Conforme aponta Souza *et al.* (2017), não existe um método e suporte único para isso, o que temos são diferentes enzimas que apresentam diferentes comportamentos químicos, que variam também de acordo

com cada substrato. Assim, vale destacar que todos os métodos apresentam vantagens e limitações.

Ainda de acordo com Souza et al. (2017), a imobilização por ligação covalente consiste na ligação da enzima ao suporte por estes tipos de ligações. Dimensionando as vantagens e desvantagens deste método, Souza et al. (2017), nos mostra que as principais vantagens estão relacionadas a maior resistência do biocatalisador à variação de pH, temperatura e incubação dos solventes orgânicos. Outro apontamento diz respeito ao fato de a enzima não ser desorvida no suporte. Os inconvenientes na utilização estão associados a parcial inativação e/ou redução da atividade de catálise da enzima devido à alteração em sua formação nativa, derivada da sua ligação entre a enzima e o grupo reativo do suporte.

Normalmente, as interações através de ligações covalentes entre o suporte e a enzima têm como característica serem ligações fortes e com muitos resíduos (produtos) que geram consequente rigidez na estrutura. Esta rigidez pode manter a estrutura inalterada, diante de agentes desnaturantes: pH, calor e solventes orgânicos, por exemplo, e assim tem-se grande estabilização térmica e operacional destas enzimas. O processo se inicia com a modificação da superfície do suporte, através de reações de ativação, a seguir, os grupos funcionais do suporte são modificados e produzem intermediários reativos. (Souza et al., 2017).

Ainda segundo Souza et al. (2017) normalmente o glutaraldeído é um dos reagentes mais utilizados na ativação de suportes e/ou como espaçador, devido a sua atividade enzimática estável e a simplicidade de seu método de ativação. Exemplificando:

Nesse caso, a molécula de glutaraldeído reage com o suporte e a enzima, e estas são imobilizadas covalentemente no suporte por reação com seus grupos aminas (α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de amina química), que se ligam aos grupos aldeídos do suporte, formando as bases de Schiff. Outros grupos funcionais da enzima, como grupos carboxilatos de moléculas de aspartato e glutamato, grupo fenólico da tirosina, grupo sulfídrico da cisteína, grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina, grupo imidazol da histidina e grupo indol do triptofano, também podem se ligar covalentemente aos grupos reativos do suporte. (SOUZA et al., 2017, p. 539).

Sobre estas interações, Souza *et al.* (2017) mostra que o número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende da densidade dos compostos presentes por unidade de área do suporte, do estado de protonação destes e da especificidade de cada grupo ativo no suporte. São muitos os grupos de suportes capazes de promover ligações covalentes, o que torna esse método muito utilizado, dada a sua variabilidade de suportes. No entanto, a seleção das condições para a imobilização por esta ligação é mais difícil do que nos outros métodos que serão apresentados adiante.

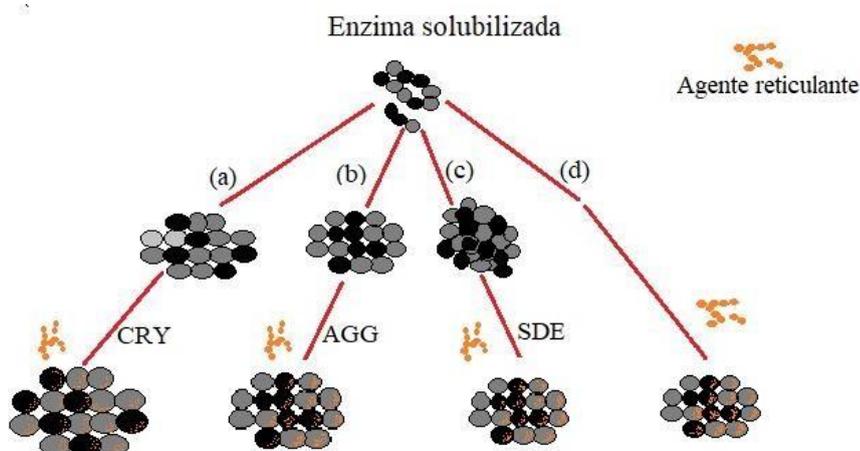
Outro método de imobilização citado por Souza et al. (2017) é o de adsorção física. Este método tem como uma de suas características a simplicidade em sua aplicação. Nele, as enzimas são imobilizadas por ligações de interação hidrofóbica, força de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas. A condução destas reações em meio iônico não requer fortes interações entre a enzima e o suporte. Dessa forma, a enzima é insolúvel em meio apolar e a adsorção pode ser um método bem aplicado.

Sobre as vantagens e desvantagens deste método, Souza et al. (2017) defende que as principais vantagens são a simplicidade da técnica, sua aplicabilidade e a não necessidade de ativação do suporte. Além disso, essa técnica gera pouca alteração na estrutura da enzima, uma vez que esta é imobilizada espontaneamente em sua preferência energética. Entre as desvantagens estão a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima associada a variações de temperatura, pH e força iônica.

Para Souza et al. (2017), a adsorção é utilizada tanto com enzimas como em outras biomoléculas, como anticorpos, com a possível reutilização do suporte após a perda da capacidade de reconhecimento. No entanto, a estratégia de dessorção não apresenta bom desempenho quando o complexo suporte-biomolécula é utilizado em soluções salinas (fluidos biológicos). Assim, a adsorção hidrofóbica é recomendada para se ter melhor estabilidade do complexo.

Outra estratégia empregada para imobilização de enzimas em suportes é a reticulação. Souza et al. (2017) aponta que este método foi descrito por Quioicho e Richards, em 1964, para estabilizar cristais de enzimas, estudando a difração de raios X. Os citados autores empregaram um agente bifuncional, como o glutaraldeído, e observaram a atividade catalítica (por volta de 30% a 70% maior, comparando a enzimas nativas) e a formação de cristais insolúveis. Segundo a literatura especializada, diversos estudos têm sido realizados visando a obtenção de enzimas imobilizadas em sua forma livre. Na maioria dessas abordagens, os derivados imobilizados são preparados a partir da reação de reticulação entre um agente reticulante e diversas preparações enzimáticas, tais como a enzima em solução, como se observa na Figura 5, algumas formas de abordagem da enzima.

Figura 5 – Diferentes formas de se abordar as enzimas livres de suporte



Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2017).

A imobilização através de reticulação oferece vantagens como atividade enzimática altamente concentrada no catalisador, baixos custos de produção (não utilização de suportes sólidos) e alta estabilidade. O agente da reticulação é uma molécula contendo, pelo menos, duas extremidades reativas que se ligam a grupos de aminoácidos na superfície enzimática. Os reagentes desse processo disponíveis comercialmente podem ser classificados quanto aos grupos reativos presentes em suas especificidades (homobifuncional e heterobifuncional), a especificidade de seus reativos, o comprimento do braço espaçador, solubilidade e reatividade (SOUZA *et al.*, 2017).

A técnica de imobilização por encapsulação/aprisionamento enzimático consiste na polimerização *in situ* da matriz porosa em torno de biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. À medida que este processo prossegue, a matriz polimérica forma-se em torno da enzima, confinando-a em torno de sua estrutura. Este método é baseado na inserção de proteínas em estruturas poliméricas, contendo poros que permitem a difusão de substratos e produtos, mas bloqueiam a passagem da proteína. Um dos fatores que a difere da ligação covalente é que não existe uma ligação entre a enzima e o suporte, de forma que não há perda de atividade devido à inativação ou distorção do sítio ativo, como é observado comumente na ligação covalente (SOUZA *et al.*, 2017).

Souza *et al.* (2017) aponta ainda que a vantagem deste método é que o aprisionamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, reduzindo os efeitos de inativação, como por exemplo em solventes orgânicos. Outro fator é que se trata de uma técnica mais fácil de ser executada e pode ser empregue para imobilizar um ou mais tipos de proteína com

qualquer grau de purificação. As desvantagens estão relacionadas ao controle do tamanho dos poros do suporte, a dessorção da enzima (relacionada aos diferentes tamanhos de poros), mecanismos de limitações de transferência de massa e a difusão dos substratos pelos poros da matriz. Outra desvantagem é que muitos precursores utilizados para a polimerização das matrizes podem tornar as enzimas inativas. Estas enzimas são imobilizadas dentro de microcápsulas, lipossomas, fibras e matrizes constituintes de diferentes materiais e principalmente pela técnica sol-gel.

Dentre as técnicas de imobilização complementares estão os cristais de enzimas reticulados e agregados de enzimas reticuladas. Nos cristais de enzima reticulados (cross-linked enzyme crystals – CLECs) tem-se a precipitação de enzimas em microcristais seguida pela reticulação, por meio dos agentes bifuncionais, com a formação de ligações covalentes entre os grupos de aminoácidos que estão livres na superfície cristalizada da enzima (SOUZA et al., 2017).

Após esse processo, Souza et al. (2017) aponta que os CLECs são insolúveis em solvente orgânico e solução tampão, permitindo sua aplicabilidade em diferentes meios reacionais sem perder sua atividade catalítica, e em seguida os CLECs podem ser reutilizados. Outra vantagem da reticulação é proporcionar maior estabilidade mecânica e térmica aos CLECs, pois neste tipo de imobilização os cristais de enzimas são estabilizados pelas ligações cruzadas (em estrutura tridimensional), enquanto nas imobilizações enzimáticas convencionais a ligação da enzima ao suporte ocorre em estrutura bidimensional.

Ainda sobre sua reutilização, Pacheco e Mendes (2021) mostram que estes CLECs possuem distintos tamanhos, podendo variar de 1 μm a 100 μm , uniformidade do volume de cristais, e, quando liofilizados, podem ser armazenados por longos períodos, podendo ser meses ou até anos.

Na literatura diversos protocolos para preparação de CLECs são relatados, a partir de diversas enzimas (termolisina, termolisina, ciclodextrina glicosiltransferase, lipase de pâncreas de porco, glicoamilase, lacase), que posteriormente são aplicadas na síntese de peptídeos, ciclodextrina, laurato de laurila, hidrólise do amido e no desenvolvimento de biosensores. Souza et al. (2017).

Ainda segundo Souza et al. (2017), a atividade catalítica desta técnica de imobilização, apresenta como desvantagem o requerimento de cristalização, antes da reticulação enzimática, contudo, estima-se que a enzima deva ser utilizada na sua forma pura, o que torna oneroso esse processo.

Outra técnica a ser abordada, conforme Souza et al. (2017), são os agregados de enzima

reticuladas (crosslinked enzyme aggregates – CLEAs), desenvolvidos inicialmente nos anos 2000 como uma alternativa aos CLEs e CLECs. Em síntese, as CLEAs envolvem a precipitação da enzima (sem precisarem estar em sua forma pura) seguida de sua reticulação química, por meio de um reagente bifuncional, normalmente a substância utilizada é o glutaraldeído, tendo como resultado agregados enzimáticos insolúveis.

A precipitação das enzimas é, em geral, induzida pela adição de agentes precipitantes, como sais, solventes orgânicos e polímeros não iônicos, na solução contendo a enzima (sem alteração de sua estrutura tridimensional ativa) Souza et al. (2017). De acordo com Souza et al. (2017), os agregados enzimáticos formados a partir dessa reação são estruturas supramoleculares, de 0,1 μm a 1 μm , unidas por ligações não covalentes. A eficiência da reticulação enzimática e a estabilidade da reação dependem, sobretudo, da concentração residual de lisina e amino terminal na superfície da enzima. Em geral, enzimas que possuem a concentração de grupos amino reativos em sua superfície apresentam reticulação inadequada. Conseqüentemente, a formação de CLEAs pode ser frágil, o que resulta na dessorção das moléculas da enzima após diversos ciclos.

A coprecipitação de enzimas com polímeros iônicos, antecedendo a reticulação, pode melhorar a formação de CLEAs. A polietilenoimina (PEI) é um polímero catiônico solúvel em água, que exibe em sua estrutura de alta densidade de grupos aminoterninais. A coprecipitação da enzima com PEI possibilita que extensões estreitas da cadeia polimérica (com grupos aminoterninais) se aproximem de outros grupos amino presentes na estrutura enzimática favorecendo a ligação enzimática entre eles (SOUZA et al., 2017).

A formação de CLEAs permite que um efeito estabilizante seja alcançado sobre a enzima por meio da alteração de seu microambiente. Diversos pesquisadores têm empregado esta técnica para a estabilização de enzimas multiméricas, pois neste processo de reticulação pode-se prevenir a dissociação de suas subunidades e conseqüente perda da atividade catalítica (SOUZA et al., 2017).

Souza et al. (2017) destaca ainda a preparação de CLEAs em diversas enzimas, dentre elas: papaína, L-aminoacilase, penicilina G acilas, lipases, β -galactosidase e lacase, incluindo as que dependem de um cofator, como oxidorreduases e lipases, tornando os catalisadores estáveis e com alta atividade catalítica. No entanto, apesar da preparação da reticulação em diferentes enzimas (para catálise de múltiplas reações ou processos em série), existe uma necessidade de estudos mais aprofundados em relação a sua morfologia, no que diz respeito ao formato e à porosidade e tamanho dos agregados e sua atividade catalítica. Uma vez que os CLEAs podem formar grandes conglomerados (clusters), podem também ocasionar limitações

difusionais do substrato e do produto no microambiente do biocatalisador. Assim, torna-se fundamental o conhecimento e o controle dos fatores que influenciam a morfologia dos CLEAs, a fim de produzir partículas catalíticas bem definidas e com atividade elevada.

Segundo Souza et al. (2017) para determinar a velocidade da reação catalisada por uma enzima e calcular sua atividade, a técnica experimental mais utilizada, dentro da cinética, é o método das velocidades iniciais, que assume a cinética de estado estacionário. Nesse sentido, a taxa de medida do consumo do substrato (ou formação do produto) deve ser constante em toda faixa de tempo do ensaio para se medir a taxa inicial. É necessário garantir que a formação do produto em função do tempo e a velocidade da reação em função da enzima sejam lineares e as medidas de velocidade inicial destas reações são primordiais para o entendimento do mecanismo de ação da enzima (Souza et al., 2017).

Souza et al. (2017) argumenta que a desativação de uma enzima está diretamente relacionada com a estabilidade e este é um dos aspectos a ser considerado para a aplicação no processo industrial. Diversos fatores como temperatura, pH e tempo de armazenamento, por exemplo, podem contribuir para que a enzima perca sua atividade. Essa desativação ocorre pelo efeito de mudanças conformacionais na estrutura (secundária ou terciária) sem que haja quebra de ligações covalentes. Este processo pode ser reversível ou irreversível.

A cinética de desativação corresponde à medida de velocidade e reação da atividade enzimática. Segundo Souza et al. (2017), a efetividade da ação enzimática é dada pela velocidade da reação que a enzima catalisa, que é relacionada à quantidade de produto gerado ou substrato consumido, por unidade de tempo, segundo a equação:

$$V = \frac{dp}{dt} = - \frac{ds}{dt}$$

A literatura reúne estudos de imobilização de lacases em diversos tipos de materiais (suportes) tais como: nanopartículas de caulinita, copolímero de butil acrilato e dimetacrilato de etileno glicol, biopolímeros, resíduos de embalagens de espuma de poliestireno, esferas de sílica, resina de troca macroporosa e fortemente básica D201, Resina aniônica fracamente básica D380 e Zeólita de sódio Y (NaY) e suas formas dessilicada modificada (DSY) e desaluminada (DAY), conforme Quadro 1 abaixo. Escolheu-se estes materiais por serem utilizados em técnicas de imobilização tratadas recentemente, entre os anos 2000 até 2021. É importante destacar que todos os suportes são materiais, ou fragmentos de materiais sólidos. Nas nanopartículas de caulinita, esferas de sílica e na resina macroporosa, o processo de imobilização é o de adsorção física. Não é necessária ativação do suporte, sendo realizado através de interações iônicas.

Quadro 1–Estudo de imobilização da lacase em diversos suportes e aplicação dos biocatalisadores

Suporte	Lacase	Técnicas de Imobilização	Aplicação	Referência
Nanopartículas de caulinita	<i>Trametes versicolor</i>	Imobilização por adsorção física ou ligação covalente	Degradação de Benzo[a]pireno (Hidrocarboneto Aromático Policíclico (HPA)).	HU <i>et al.</i> (2006)
Copolímero de acrilato de butila e dimetacrilato de etileno glicol contendo grupos divinilsulfona, glutaraldeído e carbodiimida	<i>Cerrena unicolor</i>	Imobilização pela formação de ligações covalentes	Os autores citam como possível aplicação dos biocatalisadores a degradação de compostos fenólicos, mais especificamente cloro e aminofenóis	BRYJAK <i>et al.</i> (2007)
Biopolímeros (ex.: ágar-ágar, poliacrilamida e gelatina)	<i>Trametes versicolor</i> IBL-04	Imobilização por encapsulamento	Os autores comentam que o biocatalisador é adequado para diversas aplicações industriais	ASGHER <i>et al.</i> (2016)
Resíduos de embalagens de espuma de poliestireno expandido (EPS) esmagados em esferas uniformes e facilmente revestidos com uma camada de polidopamina bioadesiva	<i>Trametes sp</i>	Imobilização por ligação covalente	Reutilização da espuma de poliestireno	MOHAMED <i>et al.</i> (2020)
Esferas de sílica portadora de porosidade controlada e avaliada	<i>Trametes versicolor</i>	Imobilização por adsorção.	Degradação do corante Reactive blue 19.	CHAMPANHE, P.-P; RAMSAY, JA (2006)
Resina macroporosa D380 reticulada com glutaraldeído e	<i>Denilite IIS da Novozymes</i>	Imobilização por ligação covalente	Os autores relatam que o biocatalisador pode ser aplicado para a descoloração contínua de efluentes têxteis	ZHANG <i>et al.</i> , 2010
Resina de troca macroporosa e fortemente básica D201	<i>Trametes versicolor</i>	Imobilização por encapsulamento	Degradação do corante malachite green	ZHANG <i>et al.</i> (2012)
Zeólita de sódio Y (NaY) e suas formas dessilicada modificada (DSY) e desaluminada (DAY)	<i>Trametes versicolor</i>	Imobilização por aprisionamento	Remoção do BPA, contendo materiais e outros compostos fenólicos.	TAGHIZADEHA, Tohid <i>et al.</i> (2020)
Zeólitas NAY e ZSM-5 nas suas formas hierarquizadas	<i>Trametes versicolor</i>	Imobilização por adsorção física	Degradação de compostos fenólicos	AMERI <i>et al.</i> (2021)
Polímeros de polimetacrilato de glicidil dimetacrilato de etileno glicol contendo grupos epoxido, dicitlohexilcarbodiimida e grupos diazônio	<i>Trametes versicolor</i>	Imobilização por ligação covalente	Degradação de Bisfenol-A	MELO <i>et al.</i> (2017)

Fonte: O autor (2023).

2.3 Estudos de degradação do nonilfenol

Conforme aponta Corvini e Schlosser (2006), em seu artigo de revisão bibliográfica, o estudo da degradação do nonilfenol não foi muito trabalhado nas pesquisas até então. Em relação ao estudo da lacase imobilizada para degradação de nonilfenol, as pesquisas apontam que, para o fungo *Trametes versicolor*, a agitação do contaminante ao invés do ensaio em meio estático parece ser mais eficiente no processo de degradação (JARDIM, 2017).

É importante ressaltar que o 4-Nf se mostrou tóxico para a maioria das cepas de fungos na condição de agitação, com exceção de *P. Sanguineus*. Em contato com essa substância, as células não se desenvolveram de forma satisfatória, algumas morreram nas primeiras horas de cultivo, na condição de agitação, principalmente (LIBARDI JÚNIOR, 2010 p.74).

A produção enzimática do fungo *P. Sanguineus* foi de 10,7 U. mL⁻¹ na condição estática e de 10,9 U. mL⁻¹ na condição de agitação, indicando que a cepa também foi pouco afetada pela condição do ensaio; seus respectivos grupos controle apresentaram valores de 14,3 e 10,3 U. mL⁻¹. Na condição estática, o destaque foi a cepa *Trametes versicolor* (13,4 U.mL⁻¹) (JARDIM, 2017). Para determinar as quantidades de solução contendo o contaminante (nonilfenol) e a solução com lacase imobilizada, utilizou-se como referência os trabalhos: LIBARDI JÚNIOR, (2010). e Melo, C. F (2017).

Estes experimentos foram realizados em frascos âmbar de 7 mL, em um volume final de reação de 3 mL. Os frascos continham o EDC dissolvido (nonilfenol) (30 µL) com concentração final de 250 µM, solução tampão McIlvaine pH 5,0 em um volume de 2595 µL e o caldo concentrado contendo lacase, em um volume 375 µL para o experimento com *Phoma sp.* Para o experimento com lacase proveniente de *Pleurotus ostreatus* foi utilizado o volume de tampão de 2782,5 µL e volume de caldo concentrado contendo lacase de 187,5 µL. Os volumes foram utilizados de forma que a concentração de lacase para ambos os casos ficassem na concentração de 0,5 U L⁻¹. Os volumes variaram devido à diferença de atividade de lacase obtida para cada fungo LIBARDI JÚNIOR, (2010).

Sabendo que os reagentes se comportam de diferentes formas e com diversas interações, teremos como referência estes valores de contaminante. No entanto, para determinar as quantidades do contaminante. É importante também ressaltar que as quantidades dos reagentes serão definidas posteriormente, através da experimentação laboratorial. O Quadro 2 indica, para o estudo da degradação do nonilfenol, as quantidades e concentrações do contaminante nonilfenol, a temperatura, o tipo de tampão utilizado e seu volume, o volume final da reação, o volume do caldo de lacase.

Quadro 2 –Estudo da degradação do nonilfenol

Quantidade de nonilfenol	Tipo de nonilfenol	Temperatura	Tampão	Volume final de reação	Volume da solução tampão	Volume do caldo de lacase	Autores
25 mM de nonilfenol	Nonilfenol	4° C	Citrato	250 µM	2595 µL	375 µL	JÚNIOR, Nelson Libardi (2010)
80 µL (50 µg Lµ1) de solução enzimática contendo: 1) 6,1g de D-glicose; 2) 3,3g tartarato de amônio; 3) 900 ml de água da torneira.	e NPEOs (4-nonilfenol-polietilenoglicol	-----	Tartarato de amônio	-----	-----	-----	STENHOLM, Ake <i>et al.</i> (2020)
(10 mg Lµ1) de nonilfenol(amostra sintética) e amostras de água	4-nonilfenol	-----	McIlvain	-----	-----	-----	MORALES, <i>et al.</i> (2015)
	nonilfenol etoxilados (NPE)	42-60 ° c	Citrato fosfato	-----	-----	-----	CATAPANE <i>et al.</i> (2013).
4,9 g nonil fenol degradado por dia	Nonilfenol	Dados heterogêneos, nos estudos analisados. No geral, os resultados dependem do tipo de bactéria e da capacidade dos extremófilos de realizar tais reações	-----	-----	-----	-----	CORVINI; SCHLOSSER (2006)

Fonte: O autor (2022).

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 Reagentes

- Acetona P. A. ACS, obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química Fina). Grau de pureza: comercial. Usado como recebido;
- Ácido Clorídrico P. A., obtido da Sigma Aldrich (Vetec– Química Fina). Grau de pureza: comercial. Usado como recebido;
- Ácido Metacrílico, cedido por cortesia pela Nitriflex Indústria e Comércio S.A. Grau de pureza: comercial. Usado após purificação com solução aquosa de NaOH 5% m/v seguida de neutralização;
- Álcool etílico absoluto P. A., obtido da Synth. Grau de pureza superior a 99,5%. Usado como recebido;
- Álcool polivinílico P. S., obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química Fina). Grau de pureza: comercial. Usado como recebido;
- Azobisisobutironitrila (AIBN), obtido da Migquímica S.A. Grau de pureza: Comercial. Usado após recristalização com Metanol;
- Ciclohexano P. A. ACS, obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química Fina). Grau de pureza: comercial. Usado como recebido;
- Cloreto de sódio P. A., obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química Fina). Grau de pureza: comercial. Usado como recebido;
- Divinilbenzeno, cedido por cortesia pela Nitriflex Indústria e Comércio S.A. Grau de pureza: comercial. Usado após purificação com solução aquosa de NaOH 5% m/v seguida de neutralização;
- Estireno, cedido por cortesia pela Nitriflex Indústria e Comércio S.A. Grau de pureza: comercial. Usado após purificação com solução aquosa de NaOH 5% m/v seguida de neutralização;
- Glutaraldeído P. S. (Sol. 25% em água), obtido da Sigma Aldrich (Vetec– Química Fina). Grau de pureza: 25% m/v em água. Usado como recebido;
- Hidróxido de sódio micropérolas P. A., obtido da Sigma Aldrich (Vetec – Química Fina). Grau de pureza: comercial. Usado como recebido;
- Metacrilato de glicidila P.A. A.C.S, obtido da Sigma Aldrich. Grau de pureza superior a 97%. Usado como recebido;
- Lacase

- ABTS
- Nonilfenol
- 1,2 dicloroetano
- Ácido nítrico
- Ácido sulfúrico
- Metanol
- Cloreto de estanho II (OSO)
- Dioxano
- Nitrito de sódio
- Iodeto de potássio
- Ácido cítrico
- Fosfato de sódio
- N-heptano

3.2. Equipamentos

Para a síntese, caracterização dos copolímeros e desenvolvimento dos biocatalisadores foram utilizados os equipamentos descritos a seguir:

- Agitador IKA® – RW20 DIGITAL, Mod. RW20 DS32^a;
- Analisador de área específica, volume e diâmetro de poros – ASAP, Micromeritics, Mod. ASAP 2020^b;
- Analisador termogravimétrico – TA Instruments, Mod. TGA Q50^c;
- Balança de precisão – Shimadzu, Mod. ATY 224^a;
- Banho-maria – Fisatom Brasil, Mod. 562S^a;
- Bomba a vácuo – KnF Lab Laboport, Mod. N810.3 – FT.18^a;
- Capela para exaustão de gases – Spencer Equipamentos, Mod.SP150N^a;
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier – Perkin Elmer, Mod. Spectrum One^c;
- Estufa de secagem – DeLeo – Mod. A3SE^a;
- Irradiador (fonte de radiação gama de cobalto – 60) – Nordion MDS (Canadá), Gammacel 220 Excel, atividade de 444 TBq (12.000 Ci) em dezembro de 1999d;
- Metalizador – BAL-TEC, Mod. SCD 005 Sputter Coater^e;

- Microscópio Eletrônico de Varredura – TM3030 Plus (HITACHI) com EDS Quantax 70 de Bruker;
- Microscópio Óptico Olympus, Mod., BX51M^f;
- Placa Aquecedora – IKA® C-MAG HS7, Mod. C-MAG HS7 S32^a;
- Espectrofotômetro;
- Espectrofluorímetro

3.3 Etapas

Para alcançar os objetivos deste trabalho, são propostas as seguintes etapas:

3.3.1 Preparo dos suportes

- Preparo dos copolímeros STY-DVB

O copolímero de poliestireno-divinilbenzeno foi obtido através da reação de polimerização em suspensão aquosa (salínica), num sistema composto por: balão tribulado, condensador de refluxo, agitador mecânico e banho termostaticado (Figura 6).

^a Laboratório de Síntese Orgânica – LASO, Universidade do estado do Rio de Janeiro (Campus Zona Oeste – RJ).

^b Laboratório de Engenharia de Polímeros – ENGEPOL, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ.

^c Laboratórios de Caracterização Instrumental I da Universidade do Estado do Rio de Janeiro –RJ.

^d Laboratório de Eletroquímica e Microscopia de Materiais – LABEMM, Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – RJ.

Figura 6 – Processo de polimerização em suspensão aquosa (salínica)



Fonte: O autor (2022).

Esta reação foi realizada na proporção de 1:3 de fase orgânica aquosa, que continha as seguintes substâncias: cloreto de sódio (NaCl), água destilada e álcool polivinílico (PVA), conforme Figura 7.

Figura 7 – Fase aquosa

1º passo:

Fase aquosa



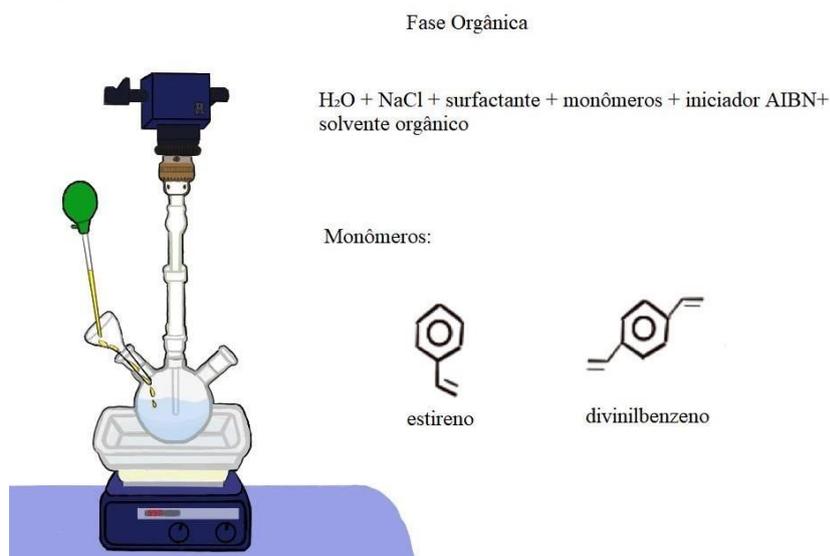
H₂O + NaCl + Surfactante (agente de suspensão)

Fonte: O autor (2022).

Enquanto a fase orgânica continha monômeros estireno e divinilbenzeno, o diluente n-heptano e o iniciador AIBN (Azobisisobutironitrila), essa reação foi obtida gotejando-se a fase orgânica sobre a fase aquosa mantida em agitação de 200 rpm, conforme Figura 8.

Figura 8 – Gotejamento de fase orgânica na solução

2º passo:



Fonte: O autor (2023).

Ao final da adição da fase orgânica, a mistura reacional foi submetida à temperatura de 80° C por 24 horas. Após esse período as partículas poliméricas obtidas foram purificadas sob vácuo com água destilada, etanol e acetona. A Tabela 1 apresenta as condições reacionais empregadas para a síntese do copolímero STY-DVB.

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas na síntese do copolímero STY-DVB

Fase orgânica				Fase aquosa		
DVB	STY	n-heptano	AIBN	PVA	NaCl	H ₂ O
25,5 mL	13,8 mL	58,95 mL	0,49 g	5,89 g	8,84g	295m L

DVB: Divinilbenzeno, STY: Estireno, AIBN: azobisisobutironitrila, PVA: poliálcool vinílico

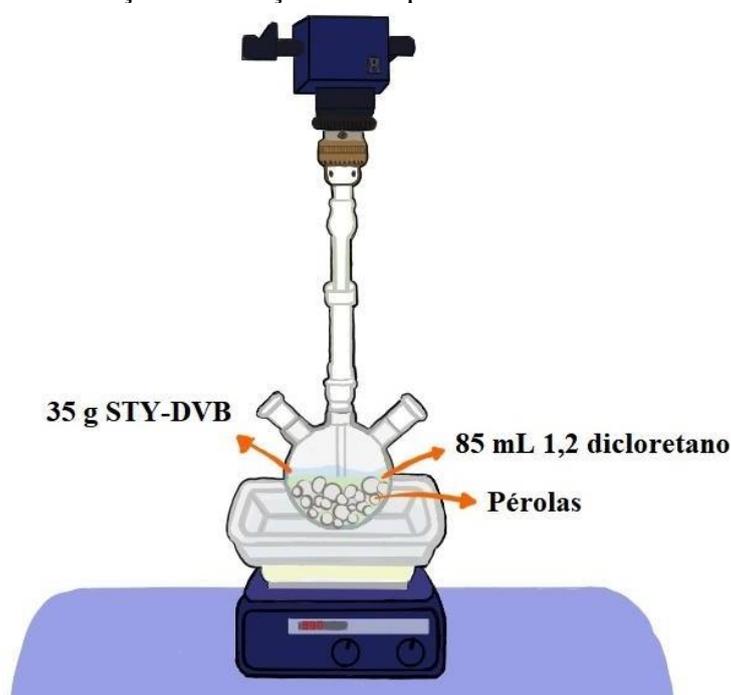
Fonte:O autor (2023).

3.3.2 Reações de modificação química dos copolímeros de STY-DVB

- Reação de nitração dos copolímeros de STY-DVB

A reação de nitração dos copolímeros foi realizada em um balão de três bocas, acoplados com condensador de bolas e agitador mecânico. Neste recipiente foram adicionados 35 g do copolímero STY-DVB e 85mL de 1,2 dicloroetano, quantidade suficiente para cobrir as micropérolas de hidróxido de sódio, conforme Figura 9.

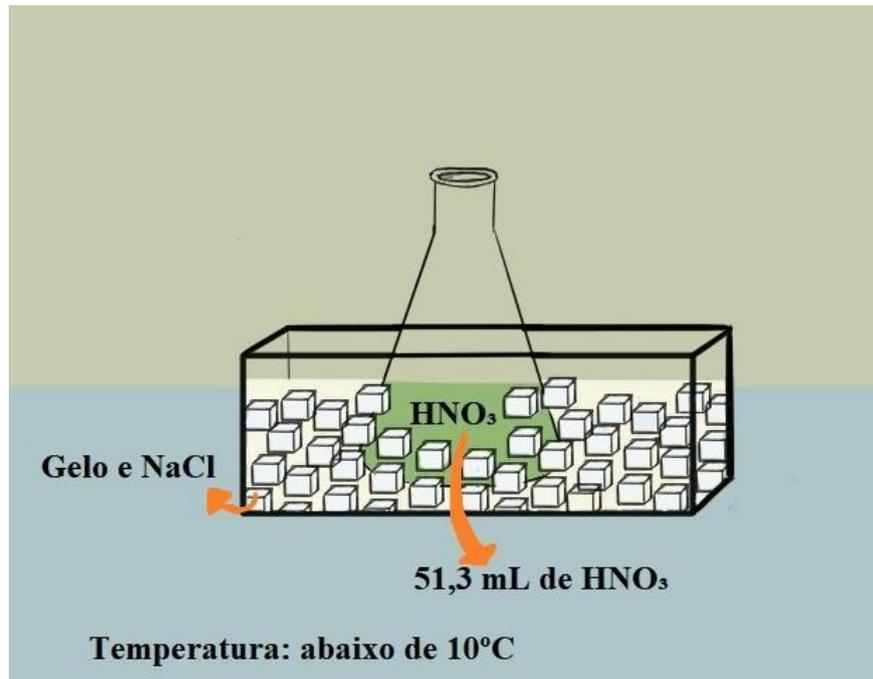
Figura 9 – Reação de nitração dos copolímeros STY-DVB



Fonte: O autor (2023).

Os copolímeros foram mantidos em contato com o solvente por 24 horas. Foi preparado um banho refrigerante de gelo e sal em um recipiente. Este banho refrigerante foi usado para controle da temperatura durante a reação de preparação de uma solução sulfonítrica, conforme Figura 10.

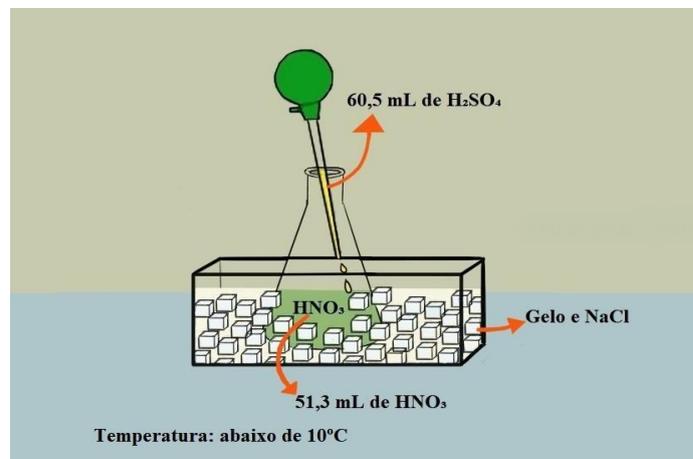
Figura 10 – Reação de nitração do copolímero STY-DVB – Etapa 1



Fonte: O autor (2023).

A solução sulfonítrica foi preparada através da adição de $51,3 \text{ mL}$ de ácido nítrico (HNO_3) a um Erlenmeyer. Este recipiente foi submetido a resfriamento empregando banho de gelo. Por gotejamento foram adicionados $60,5 \text{ mL}$ de ácido sulfúrico (H_2SO_4) ao erlenmeyer. A temperatura durante o processo foi controlada e mantida abaixo de 10°C , conforme Figura 11.

Figura 11 – Reação de nitração do copolímero STY-DVB- Etapa 2



Fonte: O autor (2023).

O balão com o copolímero inchado em dicloroetano foi então colocado sob refrigeração, conforme Figura 12.

Figura 12 – Reação de nitração – Etapa 3

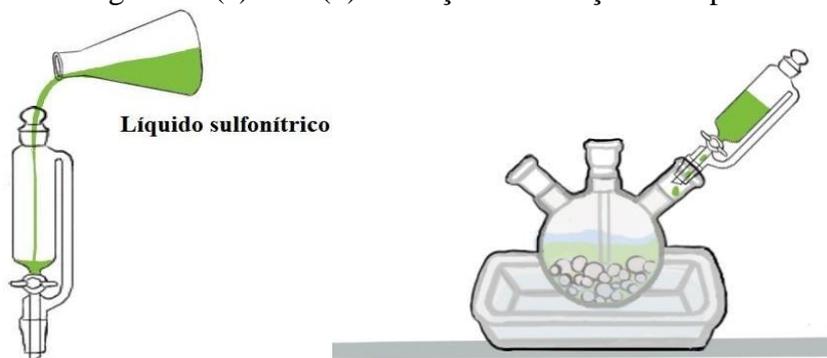


Ambiente refrigerado

Fonte: O autor (2023).

Em seguida, transferiu-se o líquido sulfonítrico para um funil de adição, adicionando, gota a gota, o copolímero que estava contido no outro balão, sendo monitorado o tempo todo para que a temperatura não aumentasse, conforme Figuras 13(a) e 14 (b).

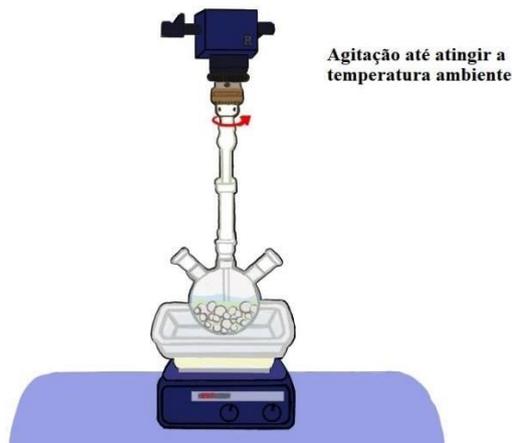
Figura 13 (a) e 14 (b) – Reação de nitração – Etapa 4



Fonte: O autor (2023).

Após o término do processo de adição da solução sulfonítrica ao copolímero, o banho refrigerante foi removido. O balão que continha a substância, foi então submetido à agitação até alcançar a temperatura ambiente, conforme Figura 15.

Figura 15 – Reação de nitração – Etapa 5



Fonte: O autor (2023).

Logo após foi colocado em banho de aquecimento e a reação foi conduzida por 4 horas a 60°C, sob agitação lenta, em torno de 100 a 150 rpm, (Figura 16). No final, as micropérolas foram lavadas com água (Figura 17a), etanol e metanol e, em seguida, foram secas a 50 °C em estufa (Figura 18 b).

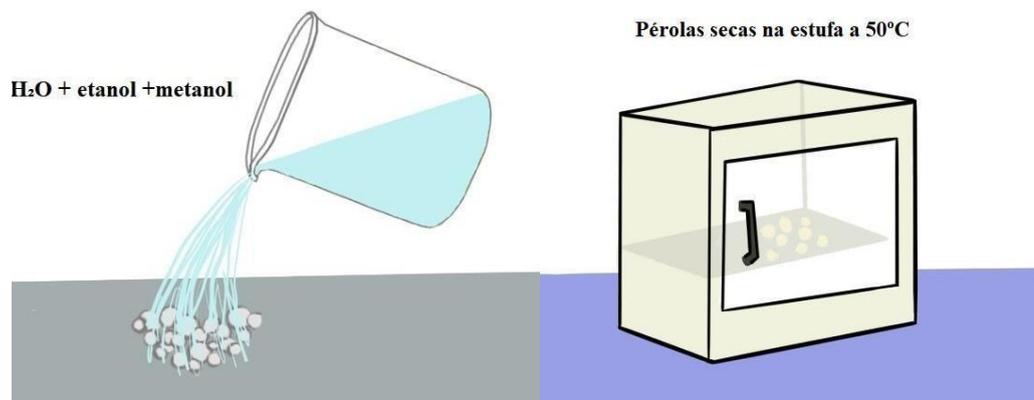
Figura 16 – Reação de nitração – Etapa 6

1.2 Reação de nitração dos copolímeros de Sty-DVB



Fonte: O autor (2023).

Figura 17 a – Reação de nitração (Etapa 7) Figura 18 b – Reação de nitração (Etapa 8)



Fonte: O autor (2023).

- Reação de redução dos grupos nitro

Para a reação de redução do copolímero foram empregues 7 g do copolímero nitrado, 17,5 ml de etanol absoluto, 172,536 g de SnCl₂ (cloreto de estanho), solubilizados em 196 mL de ácido clorídrico (HCl), conforme Figura 19.

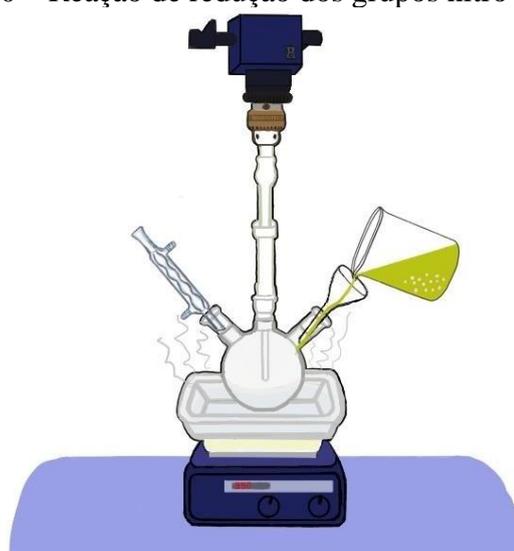
Figura 19 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 1)



Fonte: O autor (2023).

Esta reação foi conduzida em balão de 250 ml que estava alocado em um sistema que continha um condensador de refluxo e banho-maria, para aquecer a mistura, conforme Figura 20.

Figura 20 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 2)



Fonte: O autor (2023).

A reação foi conduzida na ausência de ar, através da purga de N_2 por 5 minutos, conforme Figura 21.

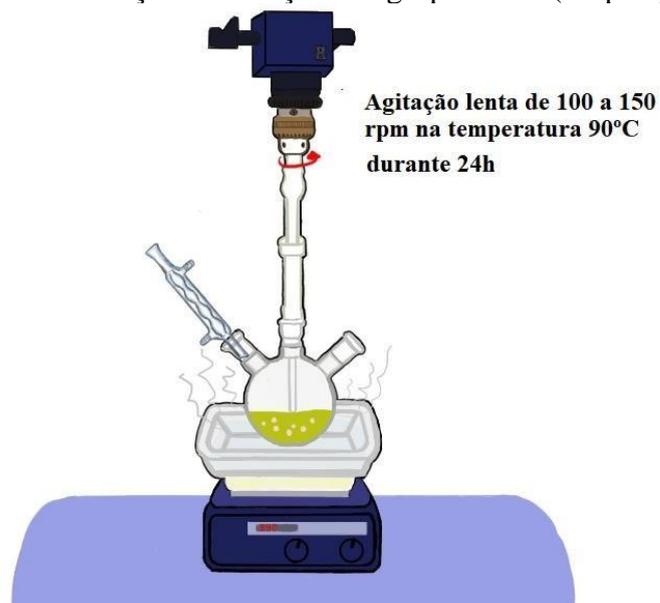
Figura 21 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 3)



Fonte: O autor (2023).

O sistema foi mantido sob agitação lenta (100 a 150 rpm) a $90^\circ C$ por 24 horas, conforme Figura 22.

Figura 22 – Reação de redução dos grupos nitro (Etapa 4)



Fonte: O autor(2023).

Ao fim dessa reação, as pérolas foram lavadas com solução de NaOH 2 mol/L, lavadas com água destilada, etanol e metanol, conforme Figura 23.

Figura 23 – Reação de redução dos grupos nitro 5
Lavagem das pérolas com a solução de NaOH 2 mol/L e com as substâncias citadas anteriormente.



Fonte: O autor (2023).

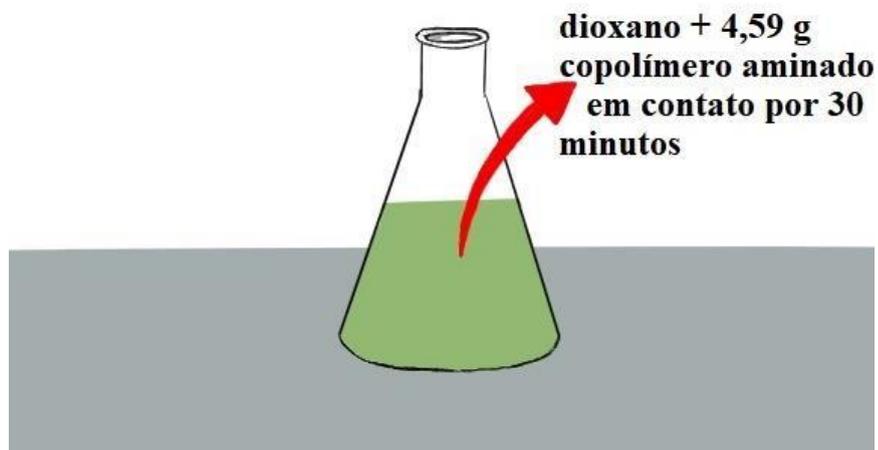
Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB reduzido

O copolímero STY-DVB nitrado foi submetido à reação de diazotação. Para isso, colocou-se

4,59g do copolímero aminado em contato com dioxano por 30 minutos, ambos dentro em Erlenmeyer limpo e seco, conforme Figura 24.

O copolímero STY-DVB nitrado foi submetido à reação de diazotação. Para isso, colocou-se 4,59g do copolímero aminado em contato com dioxano por 30 minutos, ambos dentro em Erlenmeyer limpo e seco, conforme Figura 24.

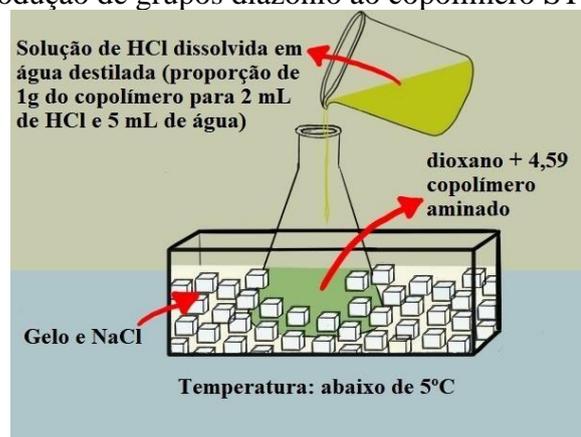
Figura 24 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 1)



Fonte: O autor (2023).

Logo após foi adicionado, lentamente, uma solução de HCl dissolvida em água destilada (proporção de 1g do copolímero para 2 mL de HCl e 5 mL de água). Durante a adição da solução aquosa (HCl) o sistema foi mantido em banho refrigerante controlando-se a temperatura, mantida abaixo de 5°C, conforme Figura 25.

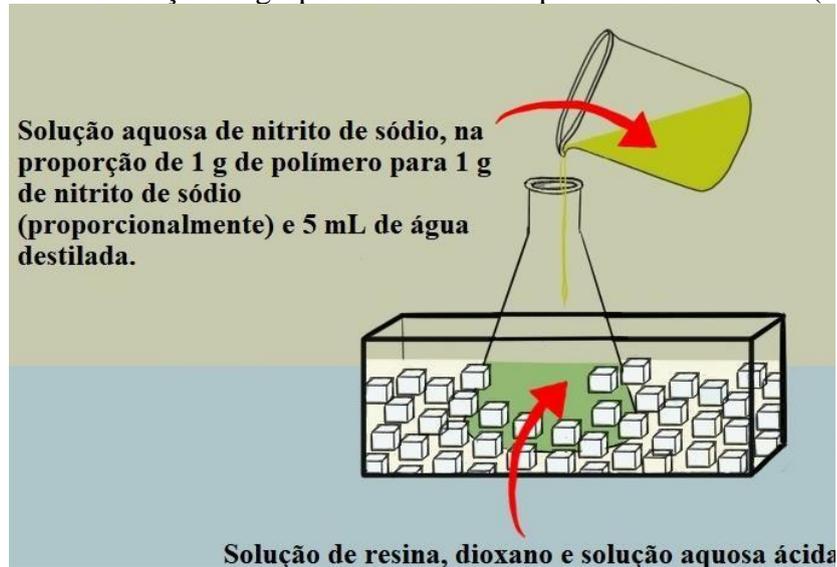
Figura 25 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 2)



Fonte: O autor (2023).

Em seguida, uma solução aquosa de nitrito de sódio, na proporção de 1 g de polímero para 1 g de nitrito de sódio e 5 mL de água destilada. Foi adicionado também ao Erlenmeyer uma solução contendo a resina, dioxano e solução aquosa ácida, conforme Figura 26.

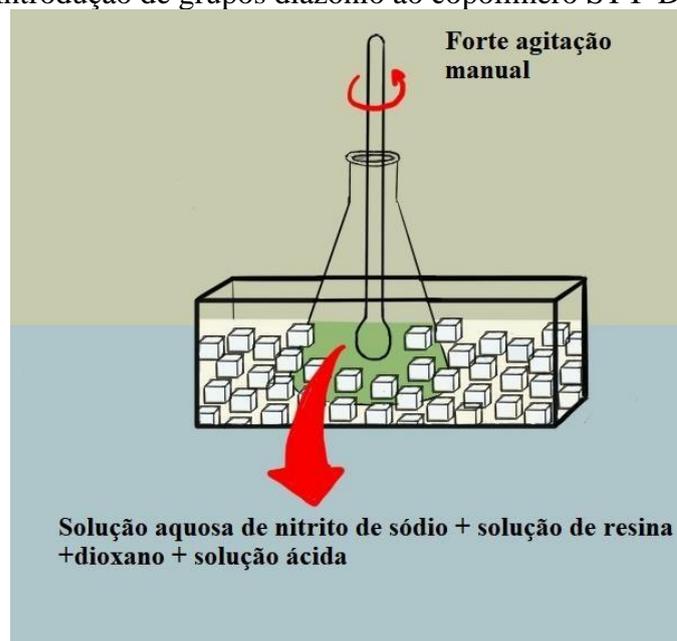
Figura 26 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 3)



Fonte: O autor (2023).

Durante todo esse processo de adição o meio foi mantido sob forte agitação manual, utilizando bastão de vidro, conforme Figura 27.

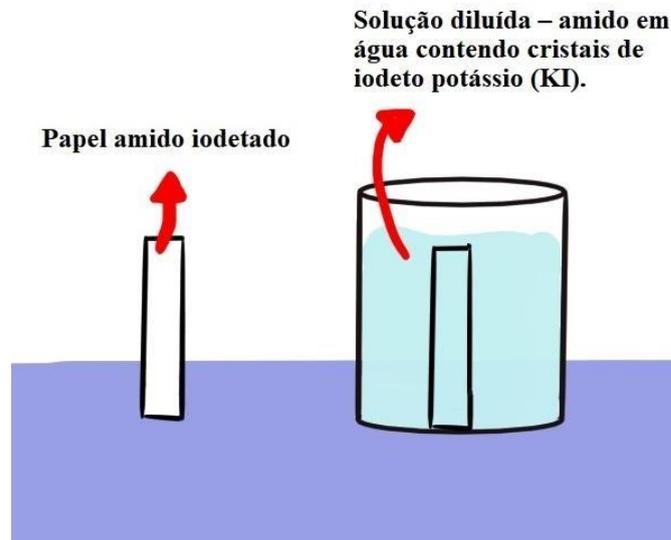
Figura 27 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 4)



Fonte: O autor (2023).

Para confirmar a reação de diazotação preparou-se um papel amido iodato, emergindo uma tira de papel de filtro em solução diluída – amido em água contendo cristais de iodeto potássio (KI), conforme Figura 28.

Figura 28 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 5)



Fonte: O autor (2023).

Após a adição com uma ponta de espátula do copolímero diazotado, sobre o papel amido iodetado, obteve-se coloração azul intensa, indicando o fim da reação de diazotação, conforme Figura 29.

Figura 179 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 6)



Fonte: O autor (2023).

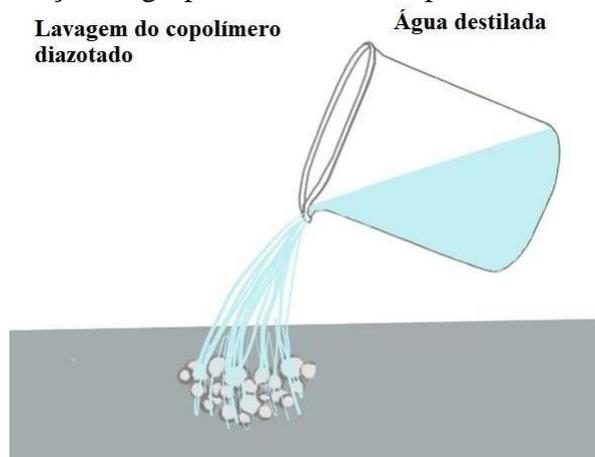
Por fim, o copolímero diazotado foi filtrado e lavado com uma pequena quantidade de água destilada e logo após mantida sob refrigeração conforme Figuras 30, 31 e 32.

Figura 30 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 7)
STY-DVB



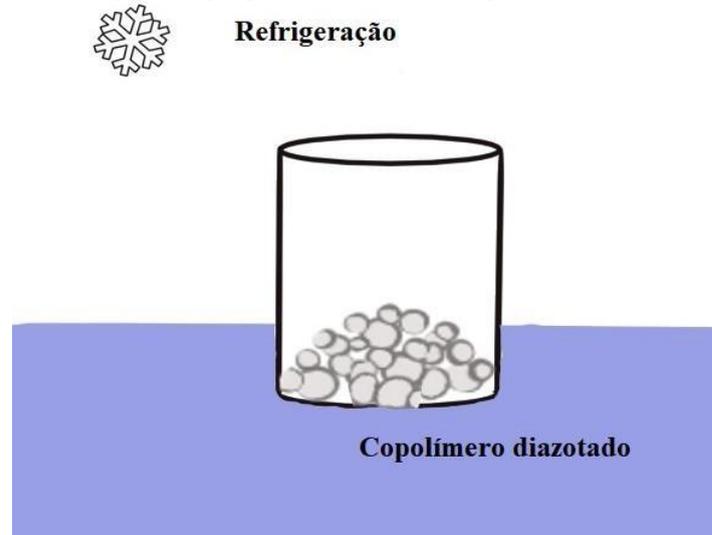
Fonte: O autor (2023).

Figura 31 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 8)



Fonte: O autor (2023).

Figura 32 – Introdução de grupos diazônio ao copolímero STY-DVB (Etapa 9)



Fonte: O autor (2023).

3.3.3 Imobilização de lacase aos copolímeros STY-DVB contendo grupos diazônio

- Pré-tratamento das partículas para a imobilização das lacases

Nesta etapa foram tratadas as partículas para facilitar o acesso da solução enzimática na estrutura porosa das partículas de polímero. Os polímeros em questão foram submetidos ao pré-tratamento com etanol 95%, água destilada, solução tampão (a mesma usada no processo de imobilização). No final do processo, as partículas foram filtradas e armazenadas na geladeira (Pinto, 2017).

- Estudo de imobilização da lacase nos copolímeros

Inicialmente foi feita a determinação da atividade da enzima lacase na sua forma livre. Foi feita a determinação da atividade da lacase livre, por meio da reação de oxidação do substrato de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) ABTS. Para isso, foram adicionados a uma cubeta 1440 µl de tampão citrato-fosfato 20 mM pH 5. Logo após a substância foi incubada em banho maria a 40 °C durante 5 minutos. Em seguida, foi feita a adição de 40 µl da solução enzimática (relação de 0,5 mg de lacase para cada mL de tampão).

A leitura foi realizada por 240 segundos a cada 20 segundos a 436 nm.

O cálculo de determinação de atividade da enzima foi realizado segundo descrito por Miller et al. (2020), conforme a Equação 1 a seguir.

Equação 1

$$U = \left(\left\{ \frac{Abs * V_t}{\epsilon * l * V_e * T} \right\} * 10^3 \right) * D$$

Onde U é a unidade de atividade enzimática é expressa em $\mu\text{moles L}^{-1} \text{min}^{-1}$; Abs, a absorvância da amostra em 436 nm; V_t , o volume total da reação (1,5 mL); V_e , o volume de solução enzimática (40 μL); ϵ , o coeficiente de extinção molar (29200 $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$); l , o caminho ótico (0,5 cm); T, o tempo de reação; 103 é o fator de correção das unidades; D, a diluição da amostra, se necessário.

A imobilização da enzima ao copolímero diazotado foi conduzida por 24 horas em shaker orbital a 5°C e 150 rpm. Para acompanhar esta reação de imobilização foram recolhidas alíquotas nos pontos T0 (antes da solução enzimática ser colocada em contato com o suporte), 15', 30', 45', 60' e 1440'. A leitura espectrofotométrica desses pontos se deu igualmente à realizada para a lacase livre. Adicionou-se a uma cubeta 1440 μl de tampão citrato-fosfato 20 mM pH 5. Manteve-se a cubeta aquecida em banho-maria a 40 °C durante 5 minutos e, em seguida, foi feita a adição de 40 μl da alíquota da solução enzimática coletadas nos tempos determinados (relação de 0,5 mg de lacase para cada mL de tampão). A leitura da reação de oxidação foi realizada em espectrofotômetro a 436 nm por 240 segundos com intervalos de 20 segundos.. Assim, a determinação da atividade enzimática nos pontos recolhidos foi feita tendo como base a Equação 1 descrita por Miller et al. (2020).

3.3.4 Estudo do tempo de degradação do nonilfenol empregando lacases imobilizadas

Nesta etapa utilizaremos o biocatalisador preparado a partir da lacase comercial imobilizada ao copolímero de estireno-divinilbenzeno diazotado, anteriormente realizada. Nesse momento foi necessário determinar a atividade da lacase imobilizada em STY-DVB e a concentração de nonilfenol empregada para proceder com o estudo da degradação do nonilfenol em função do tempo.

A solução estoque (meio), foi preparada numa concentração de 500mg/L, onde após um cálculo simples, chegou-se ao quantitativo de 0,005g de nonilfenol, o qual se apresenta como

um líquido viscoso, colocado em becker de 5mL e adicionado a este uma pequena quantidade de metanol P.A., para sua solubilização, fez-se a transferência quantitativa deste para um balão volumétrico, em seguida o balão foi submetido ao banho ultrassom durante 20 minutos para completa solubilização. O armazenamento da solução estoque foi feito em frasco âmbar no congelador (- 19°C).

Os parâmetros utilizados foram, o controle (meio), a enzima livre (meio +lacase livre) e a enzima imobilizada diazotada (+ o meio). O meio foi formado a partir da mistura de 1400 µl da solução estoque de nonilfenol + metanol, sabendo-se que o nonilfenol está a (500ppm) e que foram avolumados em 5 mL de solução tampão citrato-fosfato, pH5. A coleta dos pontos se deu a partir do tempo 0 (zero) até 1440 minutos, em cada ponto foram retirados 250 µl do sobrenadante. Todas as amostras sofreram centrifugação a 5 °C e 4000 rpm por 15 minutos. Após, foi realizada a transferência das alíquotas para balões volumétricos (10 mL), avolumou-se com água MILIQ.

A leitura das amostras se deu no espectrofluorímetro de 3 a 5 vezes cada amostra com o ajuste de excitação 280 nm e emissão de 305 nm.

Desta forma, com os trabalhos de LIBARDI JÚNIOR, (2010) e MELO et al. (2017), se obteve um norte para o quantitativo de reagentes e produtos a serem utilizados como suporte neste estudo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados e discussões das três principais etapas desta pesquisa:

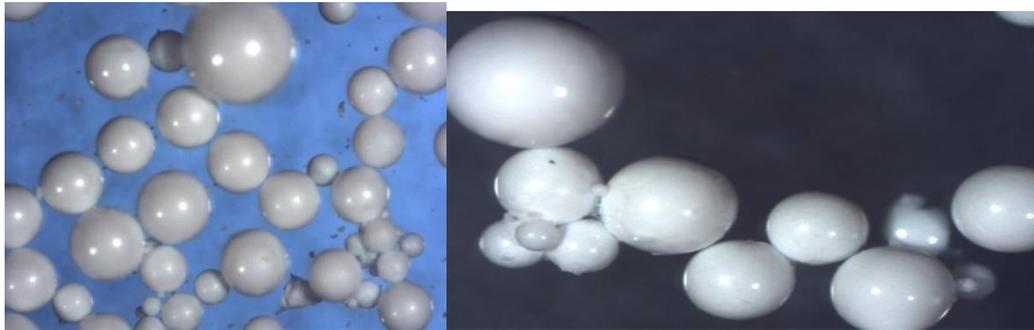
- 1) Síntese, caracterização e modificação dos copolímeros de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB);
- 2) Preparação dos biocatalisadores através da imobilização das lacases de *Trametes versicolor* aos copolímeros;
- 3) Ensaio preliminar de emprego dos biocatalisadores para a reação de degradação do nonilfenol.

4.1 Síntese, caracterização e modificação dos copolímeros de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB)

Será tratada nesta parte primeiramente, a síntese do copolímero a base de estireno e divinilbenzeno e, logo após, a caracterização deste copolímero. Para se obter o copolímero de estireno-divinilbenzeno, foi usada a técnica de polimerização por suspensão aquosa. A reação em questão (esquema da página 32), foi realizada na proporção de 1:3 de fase orgânica e aquosa. A fase orgânica continha os monômeros estireno e divinilbenzeno, o iniciador AIBN, o diluente n-heptano, considerado um mal solvente para o polímero, na proporção de 100% v/v em relação a soma do volume de monômeros. A Tabela 2 contém os dados do STY-DVB. Enquanto a fase aquosa foi constituída por PVA e NaCl, ambos solubilizados em água destilada.

A morfologia das partículas de polímero foi analisada, empregando microscopia ótica. Segundo Canevarolo (2003) as técnicas de microscopia buscam aumentar a resolução das partículas e com isso as características físicas e de arrumação das moléculas. A Figura 33 apresenta os dados de microscopia óptica obtidas para este material. De uma forma geral, todas as partículas apresentaram o mesmo perfil morfológico. Nota-se ainda que o tamanho das pérolas não são uniformes.

Figura 33 – Microscopia óptica do copolímero de estireno-divinilbenzeno (STY–DVB), aumentos de 50x



Fonte: O autor (2022).

Após analisar as imagens acima, pode-se inferir que as partículas se apresentam individualizadas, ou seja, partículas separadas individualmente. Observa-se também que as partículas são esféricas. As partículas também são polidispersas, a distribuição de tamanho entre as partículas é larga. Esta característica apresenta-se como uma das obtidas na polimerização por suspensão aquosa. Dentre as técnicas de polimerização heterogêneas a polimerização em suspensão aquosa apresenta partículas com maior diferença de tamanho. A Tabela 2 mostra dados de tamanho médio das partículas de polímero obtidas por diferentes técnicas de polimerização heterogênea. A polimerização em suspensão aquosa fornece partículas de polímeros com elevada polidispersividade, enquanto as técnicas de polimerização em emulsão e dispersão fornecem polímeros que não ultrapassam 15 μm , a polimerização em suspensão pode gerar polímeros que podem alcançar até 1000 μm .

Tabela 2 – Dados de tamanho médio de partículas de polímeros obtidas por diferentes técnicas de polimerização

Polimerização em suspensão	50 a 1000 μm
Polimerização em emulsão	0,06-0,7 μm
Polimerização por dispersão	0,1-15 μm

Fonte: O autor (2023).

Outro ponto interessante observado através da análise da microscopia óptica dos copolímeros é a opacidade das partículas, isto aponta para a porosidade das partículas uma vez que há pouca refração da luz. A Tabela 3, contém os dados de densidade aparente, grau de inchamento, área, volume de poros e diâmetro dos poros do copolímero STY-DVB.

Tabela 3 – Dados de Rendimento de polimerização, grau de inchamento em etanol, área, volume de poros e diâmetro dos poros do copolímero STY-DVB

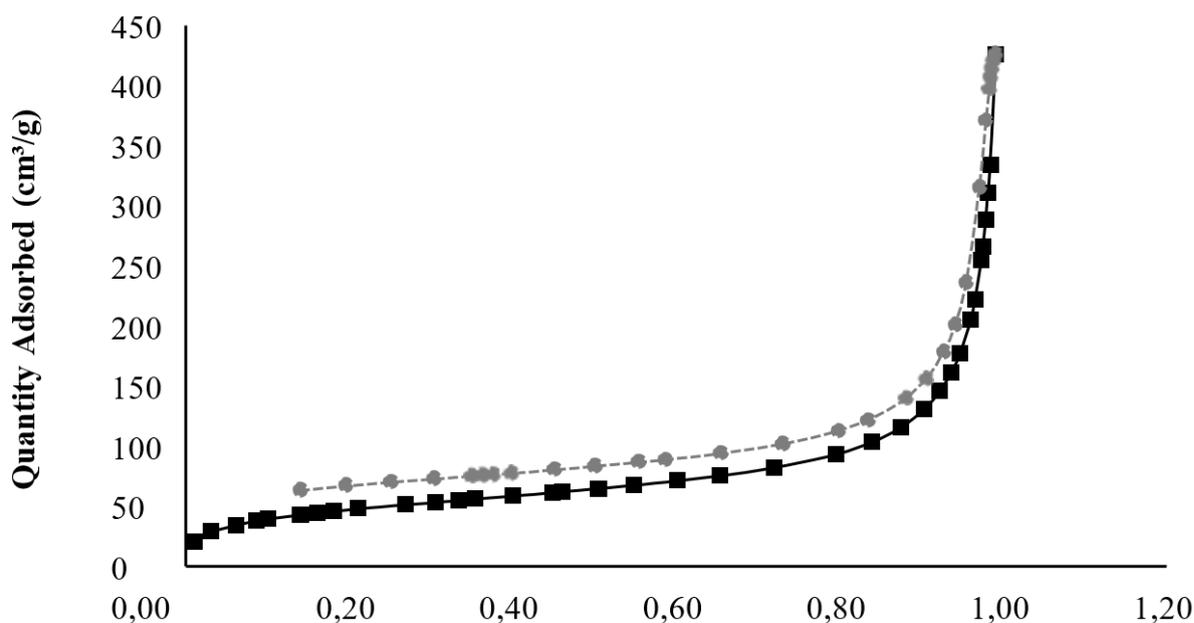
	R (%)	d_{ap}	I (%)	A (m ² /g)	Vp (cm ³ /g)	D (Å)
STY-DVB	71,6	0,22	14,3	175,2	0,62	174,1

R (%): rendimento da reação de polimerização, d_{ap} : densidade aparente, I (%): inchamento percentual em etanol, A: área superficial específica, Vp: volume de poros, D: diâmetro dos poros.

Fonte: O autor (2023).

O diâmetro de poros dos copolímeros foi de 174,1 Å, indicando que se trata de um copolímero mesoporoso. O perfil da isoterma de adsorção-dessorção de nitrogênio deste copolímero confirma este dado, mostrando histerese entre o processo de adsorção e dessorção, como se observa na Figura 34, onde é mostrada a curva de adsorção-dessorção do copolímero STY-DVB.

Figura 34 – Curva de adsorção-dessorção do copolímero STY-DVB



Fonte: O autor (2023).

Os copolímeros STY-DVB foram modificados através de reações de nitração, redução dos grupos nitro, diazotação para a introdução dos grupos diazônio na matriz polimérica. Após a reação de nitração com uma mistura sulfonítrica (ácido nítrico e ácido sulfúrico), o copolímero STY-DVB sofreu uma alteração de cor, passando de branco para coloração amarela, o que indica a ocorrência de uma reação química. A reação de redução foi feita com uma mistura de cloreto de estanho (II) (SnCl₂) e HCl. Após a reação de redução, o polímero sofreu uma nova mudança de cor, passando de amarelo para cinza-escuro. Após a reação de diazotação, as

partículas sofreram uma nova alteração de cor, passando de cinza para castanho-claro. Como pode ser observado com o experimento conduzido no laboratório de modo que aparecem os quatro tipos STY- DVB, utilizados e identificados nesses frascos (Erlenmeyer), são eles: (STY- DVB não modificado, o STY- DVB nitrato, reduzido e diazotado com a enzima), mostrando a diferença de coloração em cada fase, conforme se observa na Figura 35.

Figura 35 – Fotos dos copolímeros STY-DVB não modificado, após reação de nitração, após reação de redução, após reação de diazotação e imobilização da lacase

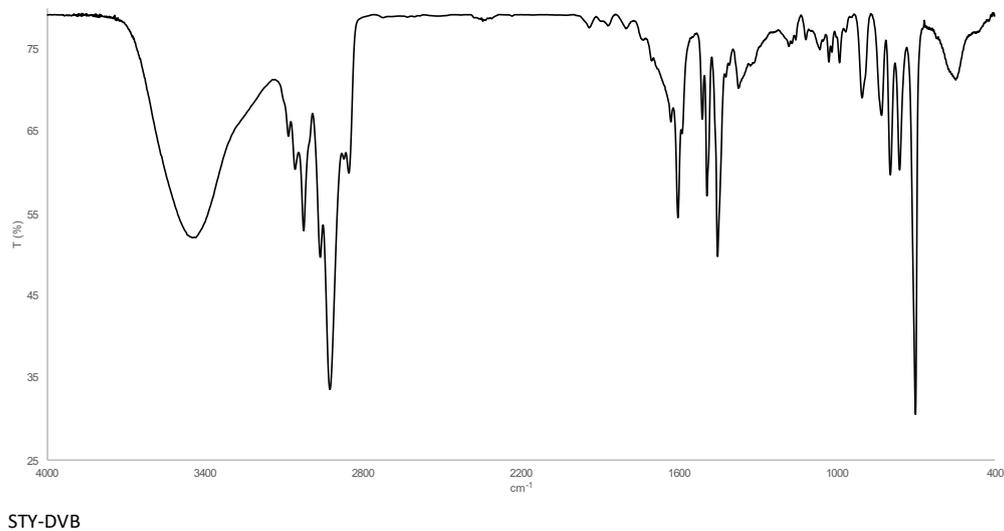


Fonte: O autor (2023).

As reações de modificação química do copolímero STY-DVB, foram acompanhadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Esta técnica permite realizar uma análise da estrutura química dos copolímeros.

A Figura 36, mostra o espectro de FT-IR do copolímero STY-DVB não modificado. Neste espectro observa-se bandas de 3010-3110 cm^{-1} de deformação axial de C-H aromático, deformação axial de C=C em torno de 1630 cm^{-1} .

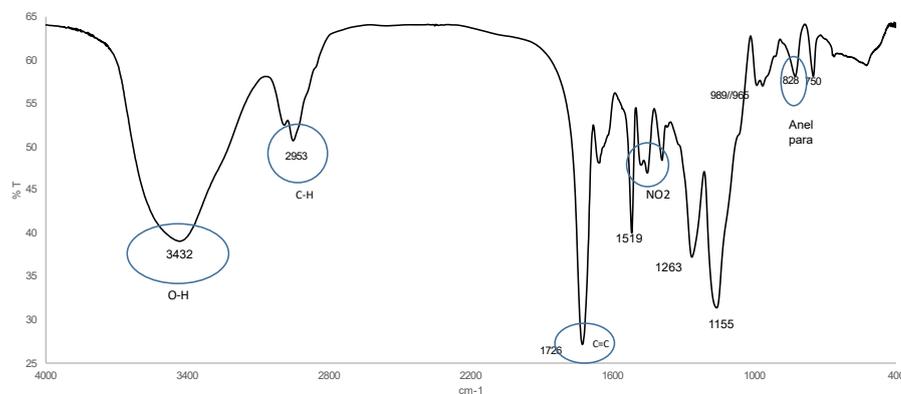
Figura 36 – Espectro de FT-IR do copolímero STY-DVB não modificado



Fonte: O autor (2023).

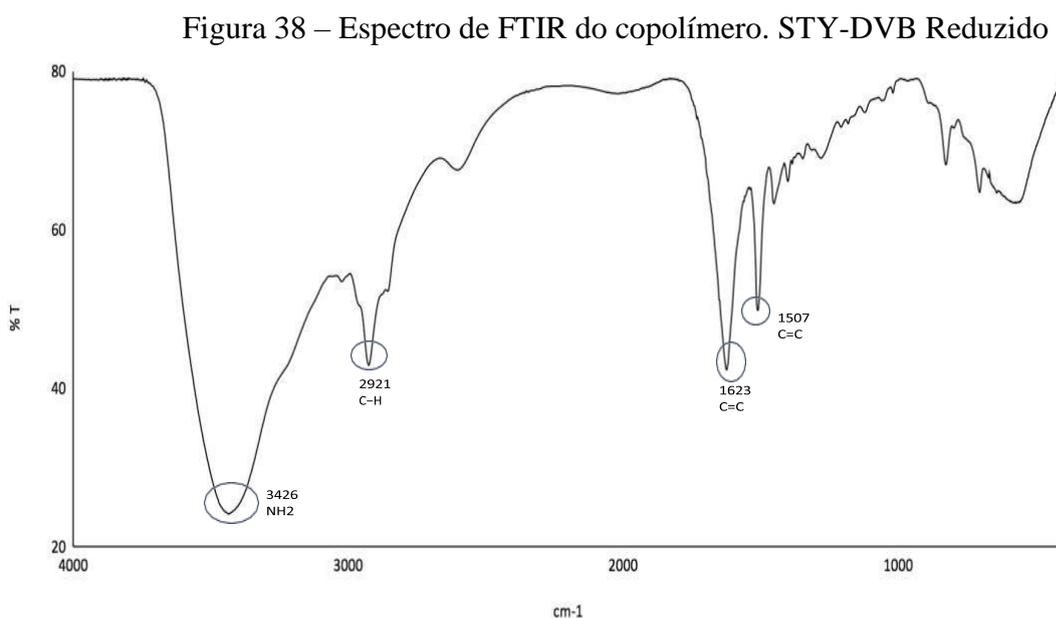
A Figura 37, mostra o espectro de FT-IR do copolímero STY-DVB nitrato. Os nitrocompostos aromáticos, apresentam estiramento assimétrico do grupo NO_2 entre $1550\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$ e estiramento simétrico entre $1355\text{ e }1315\text{ cm}^{-1}$ (Pavia *et al.*, 2001). O espectro de FTIR do copolímero nitrado, apresenta bandas em $1460\text{ e }1452\text{ cm}^{-1}$, assinaladas como devido à deformação axial simétrica e assimétrica do grupo NO_2 .

Figura 37 – Espectro de FT-IR do copolímero STY-DVB nitrato



Fonte: O autor (2023).

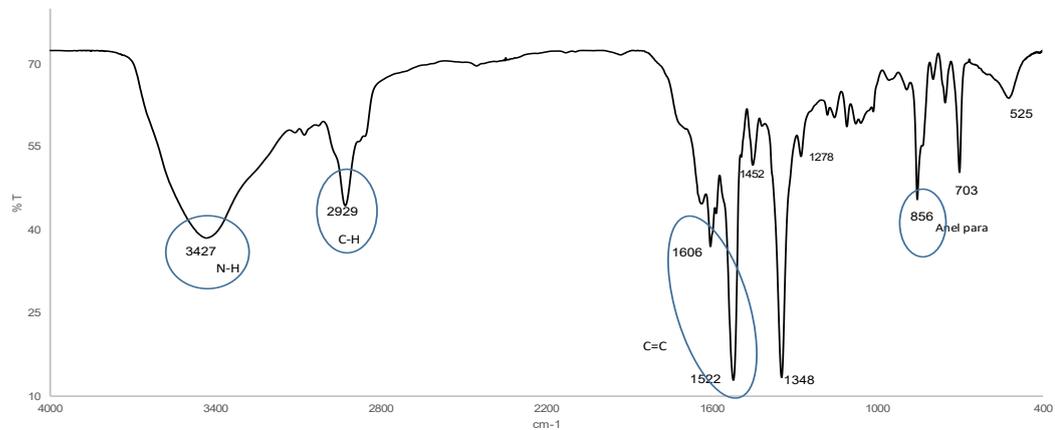
A Figura 38 mostra o espectro de FTIR do copolímero STY-DVB Reduzido, contendo grupos amino (NH_2). O espectro de FTIR do copolímero reduzido apresenta uma redução significativa na banda relativa ao grupo nitro, um aumento da intensidade da banda em 3426 cm^{-1} relacionado com deformação axial do grupo N-H e uma nova banda em 1507 cm^{-1} relativa à deformação angular do grupo NH_2 .



STY – DVB Reduzido NH_2 (B1)
Fonte: O autor (2023).

Na Figura 39, observa-se o espectro de FTIR do copolímero STY-DVB após diazotação e imobilização da lacase. Observa-se que ocorreu a diazotação, devido a mudança na coloração das partículas. A presença do grupo diazônio foi detectada através do teste qualitativo com papel amido iodetado. Observa-se uma mudança no perfil do espectro de FTIR do copolímero diazotado e contendo a enzima lacase. No entanto, não foi possível observar a banda relativa aos grupos diazônio, pois esta vibração de estiramento não é permitida no infravermelho, podendo ser observada somente no espectro Raman. A presença de banda em torno de $3500 - 3250\text{ cm}^{-1}$ é relacionada à vibração OH proveniente da umidade da amostra (Silverstein et al., 2005).

Figura 39 – Espectro de FTIR do copolímero Diazotado e com a enzima lacase

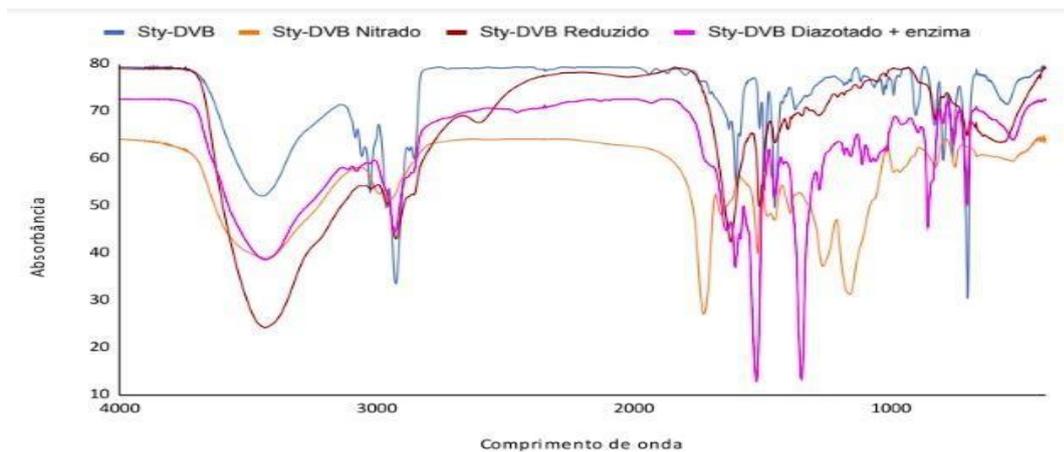


Sty-DVB diazotado e com enzima (B4)

Fonte: O autor (2023).

A Figura 40, mostra os espectros de FT-IR sobrepostos do copolímero STY-DVB antes e após cada uma das reações de modificação comentadas, evidenciando a mudança no perfil destes espectros após cada uma destas reações.

Figura 40 – Espectros de FT-IR dos copolímeros sobrepostos



Fonte: O autor (2023).

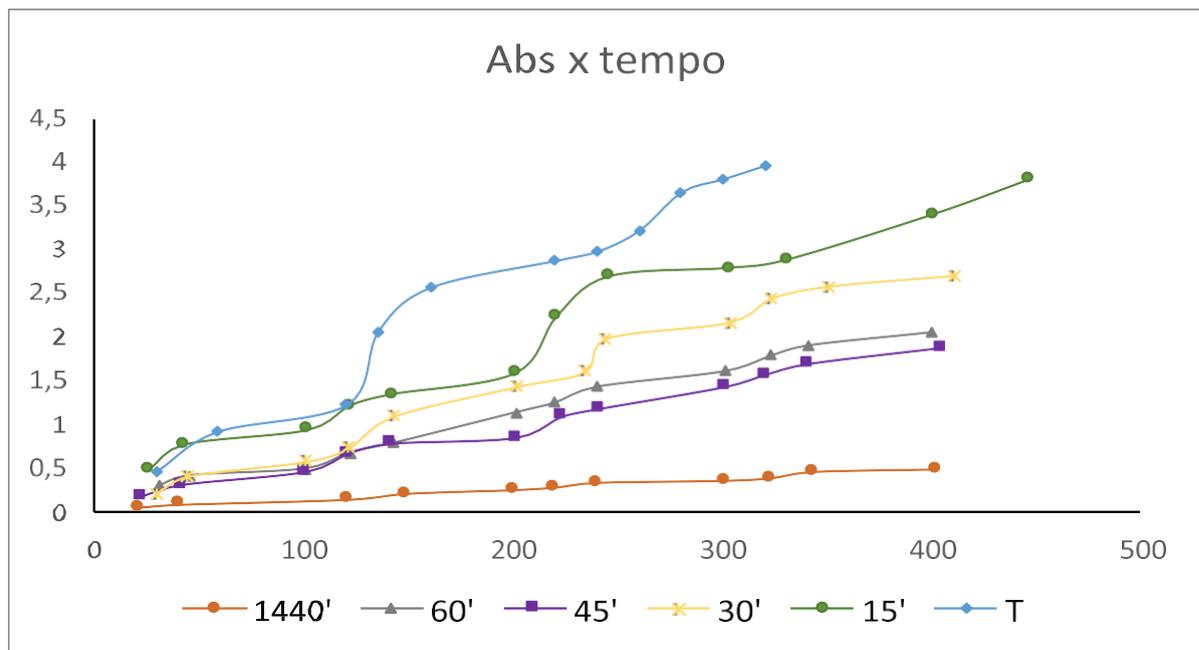
4.2 Preparação dos biocatalisadores

O copolímero STY-DVB diazotado, após seu preparo nas condições apropriadas, recebeu a enzima lacase, onde a partir da reação de oxidação do substrato ABTS, pode-se tão

somente perceber a cinética de imobilização. Foram recolhidas alíquotas da solução sobrenadante deste contato, em diferentes intervalos de tempo, que foram transferidas para uma cubeta de quartzo que também recebeu uma alíquota de solução de ABTS.

A cinética de imobilização foi acompanhada nos tempos zero, 15, 30, 45, 60 e 1440 minutos de contato entre o suporte diazotado e a solução enzimática. Na Figura 41, observa-se a análise espectrofotométrica do meio em que (x) é o tempo de contato e (y) a leitura da absorbância, obtida através de análise no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 436 nm da reação. Observa-se uma redução da absorbância ao longo do tempo de imobilização indicando uma menor concentração do cromóforo resultante da oxidação do substrato ABTS. Este resultado indica redução de enzimas no sobrenadante ao longo do tempo de imobilização, demonstrado pela diminuição de atividade na oxidação do ABTS.

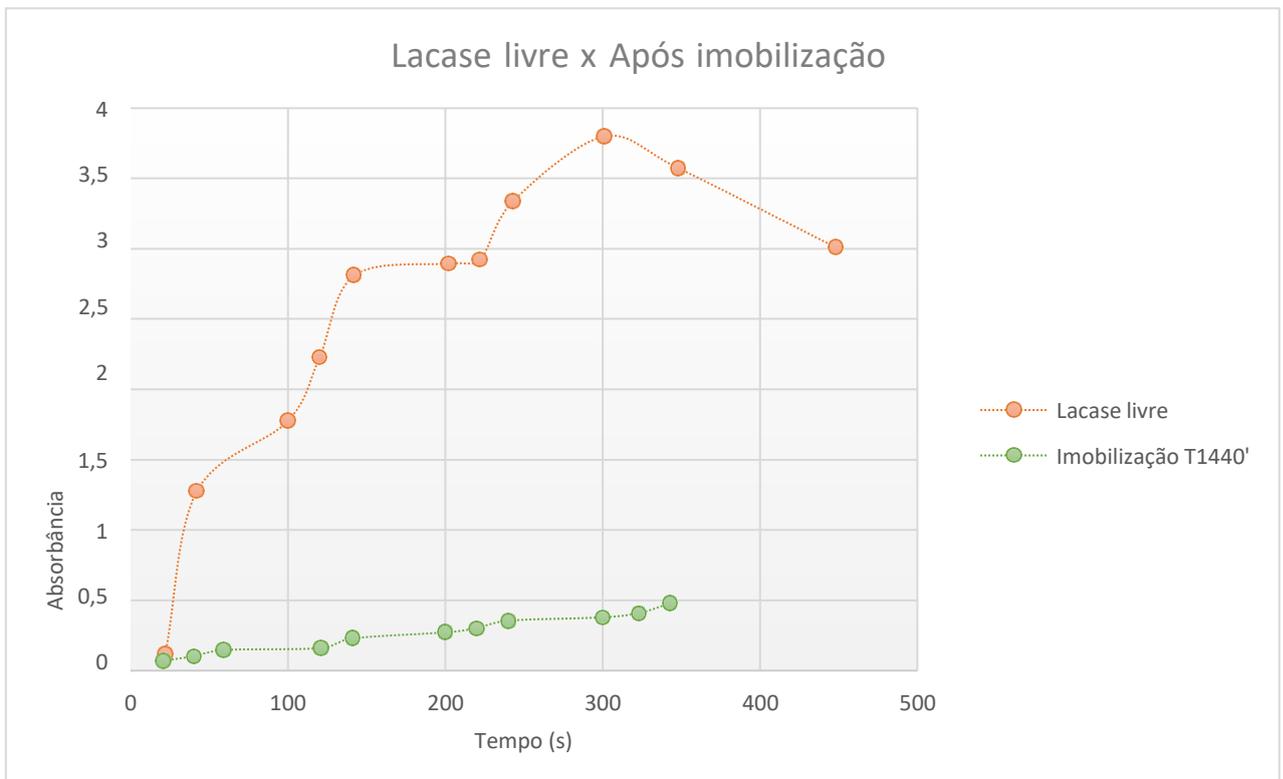
Figura 41 – Períodos de reação de imobilização em cada intervalo de tempo Abs x tempo



Fonte: O autor (2022).

Na Figura 42, observa-se o comportamento da lacase na forma livre, ainda em relação a absorbância, relacionada com o tempo, tem-se como base a coleta do sobrenadante no tempo 1440, é notório que após a imobilização da enzima, essas estão aderidas ao suporte oferecido, pois nesse tempo, quase não se observa lacase na forma livre.

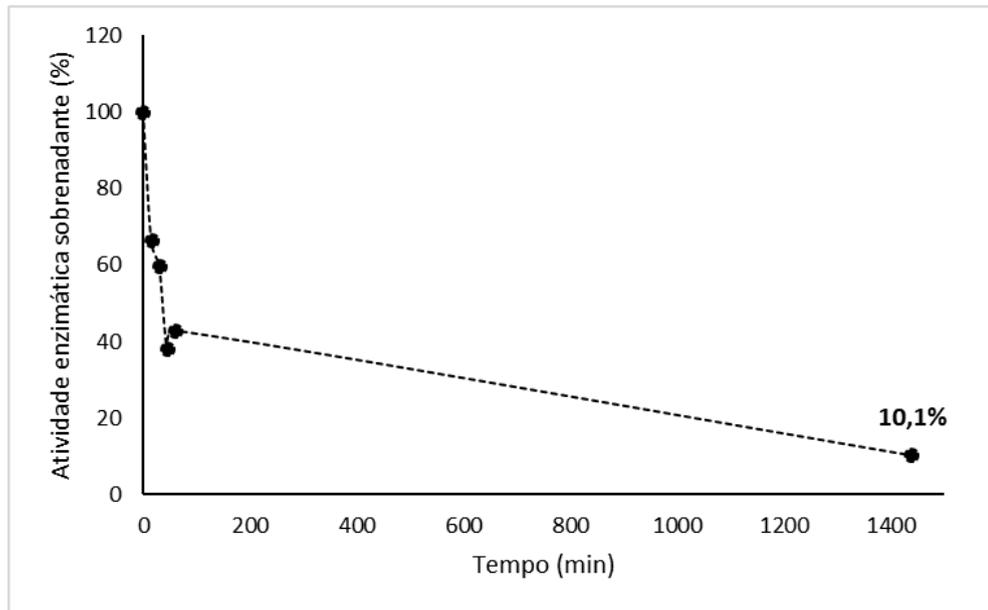
Figura 42 – Gráfico da Absorbância x Tempo da lacase livre em comparação com a alíquota coletada após 24 horas de reação de imobilização



Fonte: o Autor 2023

A Figura 43, mostra que ocorreu uma redução de atividade da enzima no sobrenadante de cerca de 89,9%, mostrando o processo de imobilização no suporte diazotado. Ao final do tempo de 24h de imobilização enzimática, observa-se apenas 10,1% de atividade da lacase no meio. Essa redução da atividade da lacase no sobrenadante de imobilização é inversamente proporcional à imobilização teórica da enzima ao suporte.

Figura 43 – Atividade enzimática da lacase ao longo do tempo reacional de imobilização



Fonte: O autor (2023).

A imobilização de lacase ao copolímero foi repetida em um segundo experimento para a determinação do rendimento de imobilização. Neste segundo experimento foram coletados apenas os pontos de controles, além das coletas de alíquotas nos tempos de 30 minutos e de 240 minutos de contato. Este experimento foi conduzido em duplicata. Foi possível alcançar um rendimento da imobilização (RI) de 89,55%. Para esse cálculo, foi utilizado o trabalho de Pinto et al. (2017).

Nesta seção, são mostradas algumas equações que foram utilizadas para determinação da atividade enzimática da lacase (Equação 2) e cálculo de rendimento de imobilização (RI) (Equação 2).

Equação 2

$$U = \left(\left\{ \frac{Abs * V_t}{\epsilon * l * V_e * T} \right\} 10^3 \right) * D$$

Onde:

U: unidade de atividade enzimática é expressa em $\mu\text{moles L}^{-1} \text{min}^{-1}$;

Abs: absorvância da amostra em 436 nm;

V_t: volume total da reação (1,5 mL);

V_e: volume de solução enzimática (40 μL);

E: coeficiente de extinção molar (29200 $\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$);

l: caminho óptico (0,5 cm);

T: tempo de reação

D: fator de diluição da amostra

$$R_a^{l)} = \frac{A_{imohyd} * 100}{U_{theo}}; U_{theo} = U_e - U_s$$

Onde:

RI: Rendimento de imobilização

U_{teo}: Teor de enzima teoricamente imobilizada no suporte U entrada: Teor de enzima oferecida ao suporte

U_{saída}: Teor de enzima no fim do processo de imobilização

A Tabela 4 apresenta os dados de atividade da lacase livre, atividade da lacase imobilizada e atividade recuperada, considerando a razão entre a atividade da lacase imobilizada e atividade da lacase livre. A lacase livre apresentou uma atividade muito maior no meio em torno de 61,5%, quando comparada com a lacase imobilizada que está em 0,11%. A atividade recuperada do biocatalisador foi de somente 3,62%, indicando que deve ser proposto uma estratégia para aumentar a atividade da lacase imobilizada.

Tabela 4 – Atividade da lacase livre do biocatalisador e atividade recuperada (AR)

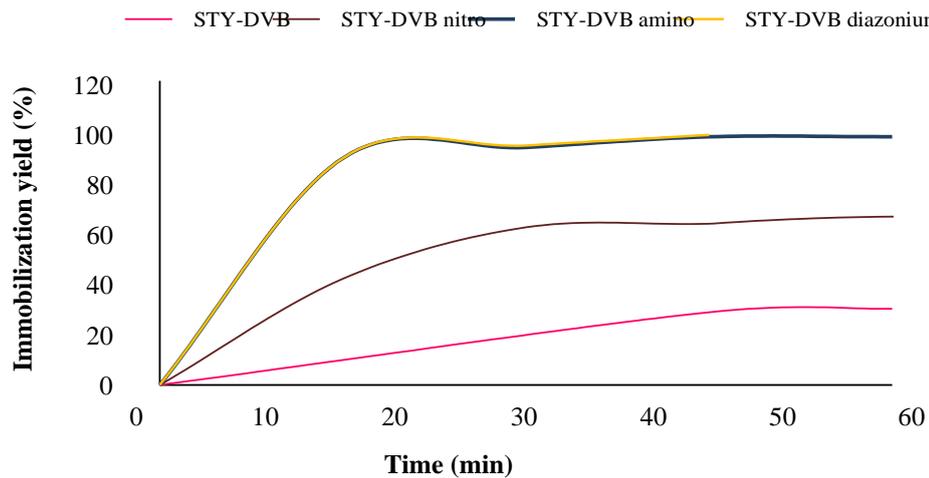
	Atividade do biocatalisador (U/mL)	AR (%)
Lacase livre	61,5	-
Lacase imobilizada	0,11	-
		3,62

Fonte: O autor (2023).

A Figura 44, mostra curvas comparativas relacionando o rendimento de imobilização em função do tempo (60 minutos) para o copolímero STY-DVB, após reações para introdução de grupos nitro, amino e diazônio. O rendimento da imobilização da lacase ao final do tempo de contato foi: 30,1%, 92,3%, 97,9% e 98,6%, respectivamente para o copolímero não modificado, para o copolímero com grupos nitro, grupos amino e grupos diazônio. Este resultado indica a necessidade de grupos funcionais polares no polímero para melhor interação enzimática. Provavelmente a imobilização da lacase em suportes modificados envolve

interações provavelmente não específicas entre grupos funcionais e enzimas. Mais especificamente, interações de Van der Waals e ligações de imunidade entre esses grupos específicos e cadeias laterais de aminoácidos de enzimas.

Figura 44 – Rendimento comparativo de imobilização de lacases em diferentes suportes: copolímeros STY-DVB e STY-DVB contendo grupos nitro, amino e diazônio



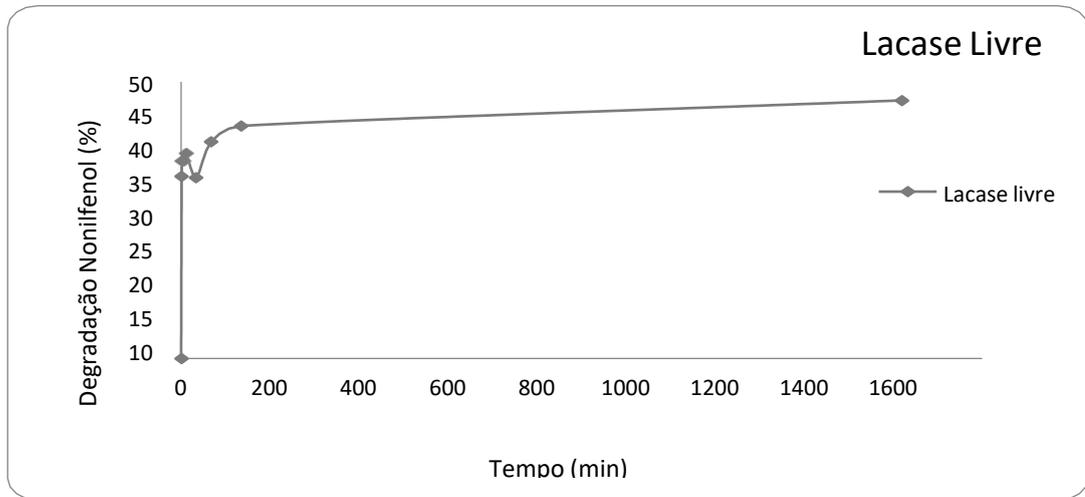
Fonte: O autor (2023).

4.3 Estudo de degradação do nonilfenol

A análise da degradação do nonilfenol se deu a partir de alguns cálculos e seguindo os protocolos criados a partir de alguns autores, como já citados anteriormente neste trabalho. A leitura foi feita de 3 a 5 vezes cada amostra com o ajuste de excitação 280nm e emissão de 305nm, no aparelho espectrofluorímetro. As Figuras 45, 46 e 47 permitem a verificação concreta que ocorreu a degradação do nonilfenol com a lacase imobilizada e faz uma comparação com a lacase livre, após seguir os protocolos.

A lacase livre apresentou uma degradação do nonilfenol em torno de 42% ao final do tempo de 1400 minutos, nas condições de pH 5 a 5°C, como pode ser verificado na Figura 45, onde são mostrados a porcentagem de degradação do nonilfenol em relação ao tempo em minutos.

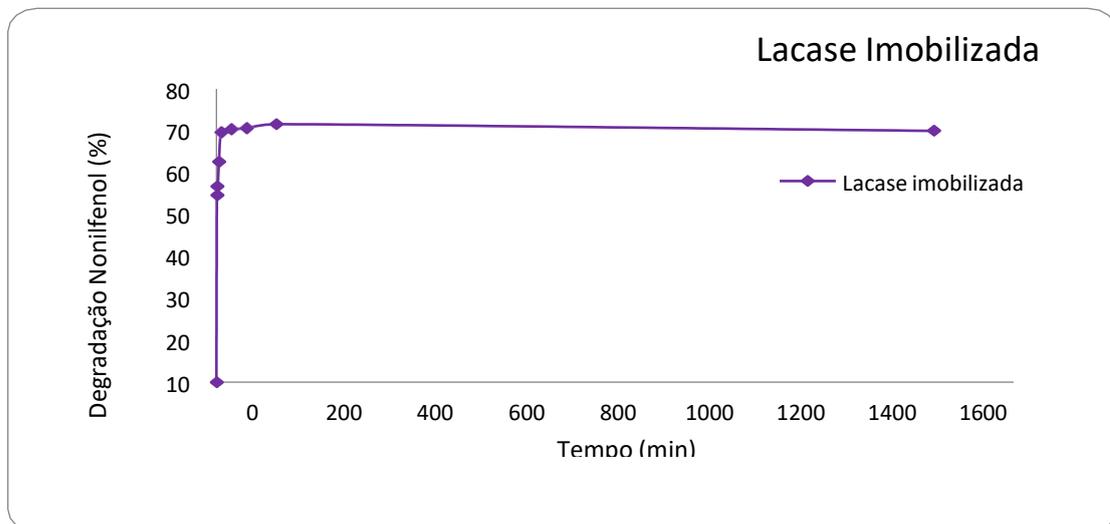
Figura 45 – Porcentagem de degradação do nonilfenol pela lacase na forma livre, em relação ao tempo em minutos



Fonte: O autor (2023).

Para a lacase imobilizada diazotada foi possível alcançar uma redução da concentração de nonilfenol do meio em torno de 74% ao final do tempo de 1400 minutos nas condições de pH 5 a 5°C(Figura 45). Pode-se constatar ainda, que o biocatalisador heterogêneo, baseado na imobilização da enzima lacase de *Trametes versicolor* em copolímero estireno-divinilbenzeno contendo grupos diazônio foi eficiente na redução da concentração desse disruptor endócrino, com as vantagens da possibilidade do reuso da enzima, principalmente sabendo-se que as enzimas imobilizadas estão menos suscetíveis a sofrerem com as intempéries do meio.

Figura 46 – Porcentagem de degradação do nonilfenol com a lacase imobilizada em relação ao tempo em minutos



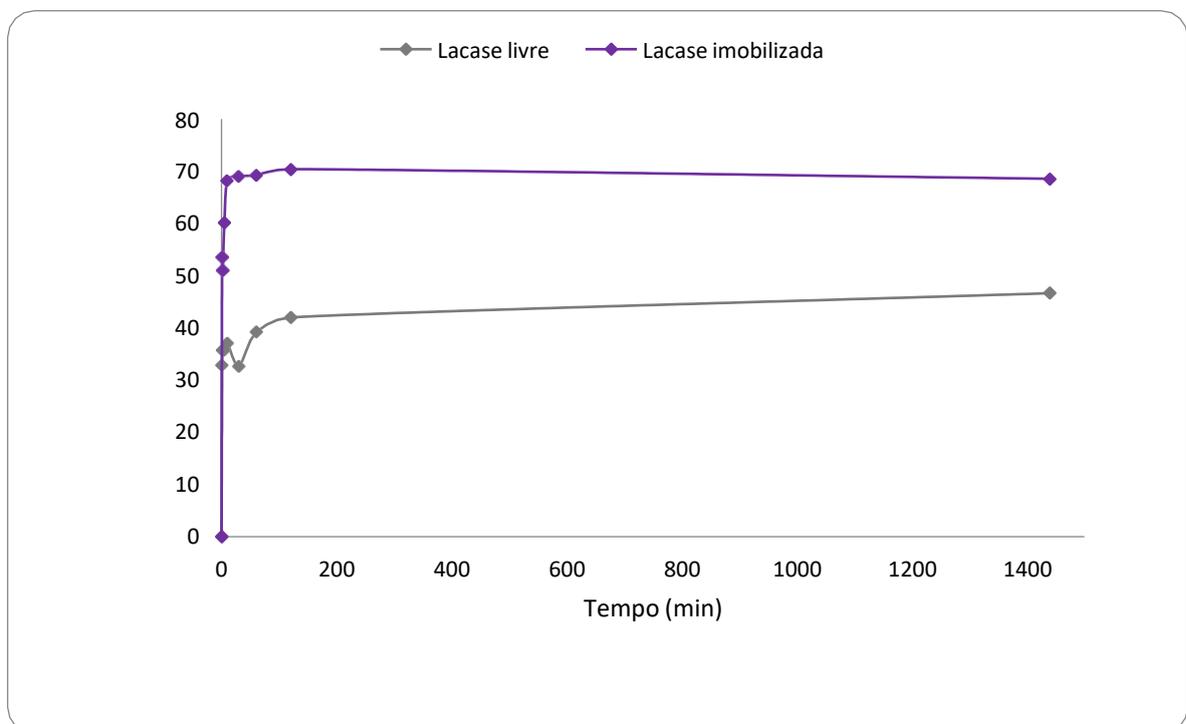
Fonte: O autor (2023).

A Figura 47, faz um comparativo de degradação do nonilfenol, entre a lacase imobilizada e a lacase na forma livre em relação ao tempo em minutos. Nesse sentido, observa-se o desempenho da lacase imobilizada. Mostra-se aqui ainda, a importância do biocatalisador no processo de degradação do nonilfenol, principalmente pelas inúmeras vantagens já mencionadas, enquanto com a lacase na forma livre, verifica-se um processo de degradação, porém muito menor, entendendo-se, portanto, que na forma livre, essas enzimas poderão estar sujeitas às diversas condições desfavoráveis do meio, como pH, temperatura e tipos de substratos e no momento não tendo como mensurar os danos ao ambiente.

É possível que parte do nonilfenol esteja sendo adsorvido pelo polímero e não, de fato degradado pela lacase imobilizada. Por isso, esses estudos serão continuados empregando os suportes não contendo a enzima imobilizada.

Também na continuidade deste estudo, há necessidade de usar um mediador para garantir uma degradação eficiente do nonilfenol.

Figura 47 – Dados de degradação do nonilfenol com a lacase imobilizada, comparando com a lacase na forma livre, em relação ao tempo em minutos



Fonte: O autor (2023).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Lacases (benzenediol oxidoreductase de oxigênio, EC 1.10.3.2), pertencem a um grupo de polifenol oxidases, contendo átomos de cobre em seu centro ativo. A enzima estudada neste trabalho, provém do fungo *Trametes versicolor*. Pode se inferir que tanto a enzima lacase utilizada na forma livre, quanto na forma imobilizada se mostraram eficientes no estudo inicial de remoção do nonilfenol.

A produção do biocatalisador baseado na lacase imobilizado se deu basicamente em quatro etapas: preparação do copolímero STY-DVB, através de reação de polimerização em suspensão aquosa, modificação química dos copolímeros para a introdução de grupos diazônio, imobilização das lacases e avaliação da lacase livre e imobilizada na degradação de nonilfenol.

A avaliação do copolímero feita no microscópio óptico, mostrou que as pérolas formadas eram esféricas e polidispersas. As análises de adsorção de nitrogênio mostraram histerese entre o processo de adsorção e dessorção, indicando que o copolímero era mesoporoso. A confirmação se deu através do dado de diâmetro médio de poros de 174,1 Å. O copolímero apresentou área superficial específica de 175,2 m²/g e volume médio de poros de 0,62 cm³/g.

Para a introdução de grupos diazônio, os copolímeros foram submetidos a reações de nitração, redução dos grupos nitro, e diazotação dos anéis aromáticos. Estas modificações químicas foram confirmadas por espectrometria de infravermelho (FT-IR). A imobilização da lacase ao copolímero diazotado, foi acompanhada espectrofotometricamente, empregando substrato ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato (ABTS). O rendimento de imobilização alcançado foi de 89,55%, entretanto, a lacase livre apresentou atividade de oxidação do ABTS de 61,55 U/mL, enquanto a lacase imobilizada apresentou atividade de apenas 0,11 U/mL. A atividade recuperada, calculada comparando a atividade da lacase livre e imobilizada foi de apenas 3,62%. Estes dados indicam necessidade de maiores estudos para melhorar o desempenho da atividade imobilizada. A respeito da degradação do nonilfenol, observou-se que o biocatalisador baseado na lacase imobilizada diazotada reduziu em 74% a concentração do disruptor endócrino nonilfenol no meio, enquanto, a lacase livre, mesmo com uma atividade de oxidação do ABTS muito superior, apresentou um desempenho menor, em relação a remoção do nonilfenol. É possível que parte do contaminante nonilfenol esteja sendo adsorvido pelo polímero. O estudo foi conclusivo, apenas para degradação do nonilfenol em relação ao tempo, este se deu na condição de pH 5 e a 5° C. Necessita-se, portanto, que se faça posteriormente estudos de variação da concentração do nonilfenol, pH e temperatura para efeito

de comparação. Também é necessário realizar os estudos de degradação do nonilfenol empregando um mediador de lacase e estudos de adsorção do nonilfenol pelos polímeros não contendo lacase imobilizada.

REFERÊNCIAS

- AMERI, Atefeh et al. Bio-removal of phenol by the immobilized laccase on the fabricated parent and hierarchical NaY and ZSM-5 zeolites. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 120, p. 300-312, 2021.
- ASGHER, M; NOREEN, S; BILAL, M. Enhancement of catalytic, reusability, and long-term stability features of *Trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p.54- 62, 2017.
- BAPTISTELA, Daniela Moraes. **Estudo da atividade e estabilidade de lacase em líquidos iônicos**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BRYJAK, Jolanta et al. Laccase immobilization on copolymer of butyl acrylate and ethylene glycol dimethacrylate. **Biochemical engineering journal**, v. 35, n. 3, p. 325- 332, 2007.
- CANEVAROLO Jr, S.V. **Técnica de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004.
- CATAPANE, Maria et al. Enzymatic removal of estrogenic activity of nonylphenol and octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Journal of hazardous materials**, v. 248-249C, p. 337-46, 2013.
- CHAMPAGNE, P.-P.; RAMSAY, J. A. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2230-2235, 2010.
- CORVINI, P. F. X.; SCHÄFFER, Andreas; SCHLOSSER, Dietmar. Microbial degradation of nonylphenol and Other alkylphenols—our evolving view. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 223-243, 2006.
- DARONCH, N. A. et al. Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, n. 125506, 2020.
- DEBLONDE, Tiphanie et al. Poluentes emergentes em águas residuais: uma revisão da literatura. **Jornal Internacional de Higiene e Saúde Ambiental**, v. 214, p. 442-448, 2011.
- FARIAS, Luciana A.; FÁVARO, Débora I.A. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química nova**, v. 34, p.1089-1093, 2011.
- FERNANDES, A.R.A. **Estudo da imobilização de lacase em nanopartículas magnéticas e sua aplicação**. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2015.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M et al. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnol Adv**, v. 31, n. 8, p.1808-25, dezembro de 2013.
- FUKUDA, T. et al. Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, p. 704–706, 2001.

GARCIA-MORALES, R. et al. Biotransformation of endocrine-disrupting compounds in groundwater: bisphenol A, nonylphenol, ethynylestradiol and triclosan by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 8, p. 1-14, 2015.

HU, Xiaoke; ZHAO, Xueheng; HWANG, Huey-min. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1618-1626, 2007.

JARDIM, Valéria de Lima. **Aplicação de fungos de podridão branca na degradação de 4-nonilfenol, 4-octilfenol e bisfenol-A e avaliação da redução da atividade estrogênica pela linhagem celular MCF-7 bus**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, 2017.

JUNIOR, Nelson Libardi. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. Dissertação (Mestrado) – Univille Universidade. Joinville, 2010.

KATO-SCHWARTZ, C.G. et al. Application of laccases in organic synthesis and obtainment of bioactives with antioxidant activity: A review. **Congresso Internacional da Agroindústria. Ciência, Tecnologia e Inovação: do campo à mesa**. CIAGRO 25 a 27 de setembro de 2020.

LOCATELLI, Marcelo et al. Métodos analíticos para a determinação de compostos desreguladores endócrinos em amostra de água ambiental. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p.1-18, 2016.

MAINARDI, P. H. **Produção de lacases pelo fungo filamentosos de origem marinha *Peniophora sp.* CBMAI 1063 em biorreator de bancada**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2015.

MELO, C.F. et al. Synergistic Effect of Adsorption and Enzymatic Conversion in the Bisphenol-A Removal by Laccase Immobilized on Poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2192-2201, 2017.

MILLER, Alex Henrique. **Nanozeólitas como suporte para imobilização de lacases: aplicação dos biocatalisadores na reação de oxidação mediada do glicerol**. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2020.

MONTAGNER, Cassiana C. et al. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, p. 1094-1110, 2017.

NEVES, M. A.F.S. et al. **STYrene-divinylbenzene copolymers for application in exclusion chromatography**, 2010.

PACHECO, Thalyta Fraga; MENDES, Thaís Demarchi. **Guia prático para a caracterização de enzimas**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2021.

PAVIA, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. **Introduction to Spectroscopy** (5th ed.). Brooks/Cole Cengage Learning, 2015.

PINTO, Martina Costa Cerqueira. **Desenvolvimento de suportes enzimáticos por polimerização simultânea em suspensão e emulsão**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Res**, v. 44, n. 2, p. 578–588, 2010.

Ramírez-Montoya. L.A et al. Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from *Trametes versicolor*. **Journal of Molecular Liquids**. p. 30 – 37. 2015.

SANTOS, Camila Souza Almeida dos. **Síntese de corantes naturais pela oxidação de compostos fenólicos utilizando lacases fúngicas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

SILVERSTEIN, M.S. et al. **Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos**. 7ª Edição, Editora LTC – gen, 2005.

SOUZA, Lívia Tereza de Andrade et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 529-568. São Paulo: Blucher, 2017.

STENHOLM, Åke et al. Removal of nonylphenol polyethoxylates by adsorption on polyurethane foam and biodegradation using immobilized *Trametes versicolor*. **Science of The Total Environment**, v. 724, p. 138159, 2020.

VOGELSANG, C. et al. Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway. **Water Res**, v. 40, p. 3559–3570, 2006.

Jiang, X.; Yu, Y.; Li, X. Kong, X.Z., Preparação de alto rendimento de microesferas de poliureia uniformes através de polimerização por precipitação e sua aplicação como suporte de imobilização de lacase. **Revista de Engenharia Química**, 2017.

YASSIN, Mohamed A.; GAD, Abdul Aziz M. Immobilized enzyme on modified polystyrene foam waste: a biocatalyst for wastewater decolorization. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 104435, 2020.

ZHANG, Jie et al. Laccase immobilization on D380 macroporous exchange resin by cross-linking with glutaraldehyde. **Materials Research**, v. 113-114, p. 2115-2118, 2010.

ZHANG, Xiaolin et al. Simple fabrication of polymer-based *Trametes versicolor* laccase for decolorization of malachite green. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 16– 20, 2012.

ANEXO – Poluentes Ambientais

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental
Mestrado Profissional

POLUENTES AMBIENTAIS
Poluentes Orgânicos Persistentes, Poluentes Emergentes e
disruptores endócrinos no meio ambiente

Autoria

Adilson Muniz de Araujo

Luciana da Cunha Costa

Colaborador

Ezaine Cristina Corrêa Torquato dos Santos

Agradecimentos

Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Campus Zona Oeste

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental UERj-ZO

Laboratório de Síntese Orgânica UERJ-ZO

Projeto de Extensão RESOLVA AMBI



**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Araújo, Adilson Muniz de
Poluentes ambientais [livro eletrônico] :
poluentes orgânicos persistentes, poluentes
emergentes e disruptores endócrinos no meio ambiente
/ Adilson Muniz de Araújo, Luciana da Cunha Costa ;
colaborador Ezaine Cristina Corrêa Torquato dos
Santos. -- Rio de Janeiro : Ed. dos Autores, 2024.
PDF

Bibliografia.
ISBN 978-65-00-92683-5

1. Educação ambiental 2. Meio ambiente -
Conservação e Proteção 3. Pesticidas - Aspectos
ambientais 4. Poluição - Aspectos ambientais
5. Resíduos sólidos - Aspectos ambientais I. Costa,
Luciana da Cunha. II. Santos, Ezaine Cristina Corrêa
Torquato dos. III. Título.

24-191487

CDD-304.2

Índices para catálogo sistemático:

1. Educação ambiental : Ecologia humana 304.2

Eliane de Freitas Leite - Bibliotecária - CRB 8/8415

Muniz, Adilson de Araujo.

POLUEENTES AMBIENTAIS

Poluentes Orgânicos Persistentes, Poluentes Emergentes e disruptores endócrinos no meio ambiente. Rio de Janeiro. 2023.

16f

Produto da Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental – Universidade do Estado do Rio de Janeiro UERJ-ZO (2023).

Orientadora: Luciana da Cunha Costa

1. Poluentes ambientais. 2. Poluentes emergentes. 3. Disruptores endócrinos. 4. Educação ambiental.

APRESENTAÇÃO

Este material tem caráter didático. O público-alvo são estudantes do Ensino Médio que buscam ampliar o conhecimento acerca da problemática envolvendo poluentes ambientais tais como poluentes orgânicos persistentes e poluentes emergentes.

Esta apostila foi elaborada como produto do Trabalho de dissertação para obtenção de título de Mestre, do Programa de Pós-graduação *Strictu senso* em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA/UERJ.

Sumário

Capítulo 1: Entendendo o que são poluentes	1
1. Poluentes orgânicos persistentes	1
1.1. Definição	1
1.2. Principais tipos de poluentes orgânicos persistentes.....	3
1.2.1. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS.....	3
1.2.2. HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	5
1.2.3. DIOXINAS, FURANOS E BIFENILAS POLICLORADOS	6
Capítulo 2: Entendendo o que são disruptores endócrinos	8
2. Poluentes emergentes.....	8
2.1. Principais tipos de poluentes emergentes	9
2.1.1. FÁRMACOS	9
2.1.2. HORMÔNIOS E ESTERÓIDES	10
2.1.3. SURFACTANTES	10
2.1.4. RESÍDUOS PLÁSTICOS	11
2.2. Disruptores endócrinos	12
Referências Bibliográficas	15

Entendendo o que são poluentes

Poluentes podem ser definidos como elementos (compostos orgânicos, inorgânicos, energia) capazes de causar alterações físicas ou químicas no meio ambiente, afetando o equilíbrio deste ambiente. Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), Poluentes Emergentes e disruptores endócrinos estão entre as principais substâncias que geram preocupação ambiental.

1. POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES

1.1. Definição

Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) são uma classe de poluentes com características físicas e químicas que fazem com que estes compostos persistam no meio ambiente. Dentre as principais características destes compostos estão a baixa pressão parcial de vapor e conseqüentemente baixa velocidade de evaporação, estabilidade frente a decomposição e degradação e elevada lipossolubilidade (solubilidade em lipídios), que favorece processos de bioacumulação nos tecidos dos consumidores terciários e quaternários (nos topos das cadeias alimentares) (BAIRD & CANN, 2005).

A Convenção de Estocolmo, tratado assinado em 2001, acordou que os países-partes deveriam adotar medidas de controle de todas as etapas de ciclo de vida dos POPs, visando reduzir/eliminar os estoques, emissões, além da gestão das áreas contaminadas. Estes POPs compreendiam inicialmente doze poluentes (dúzia suja) que sofreram ampliações posteriores (Ministério do Meio Ambiente, 2023). A Figura 1 apresenta os principais tipos de Poluentes Orgânicos Persistentes.

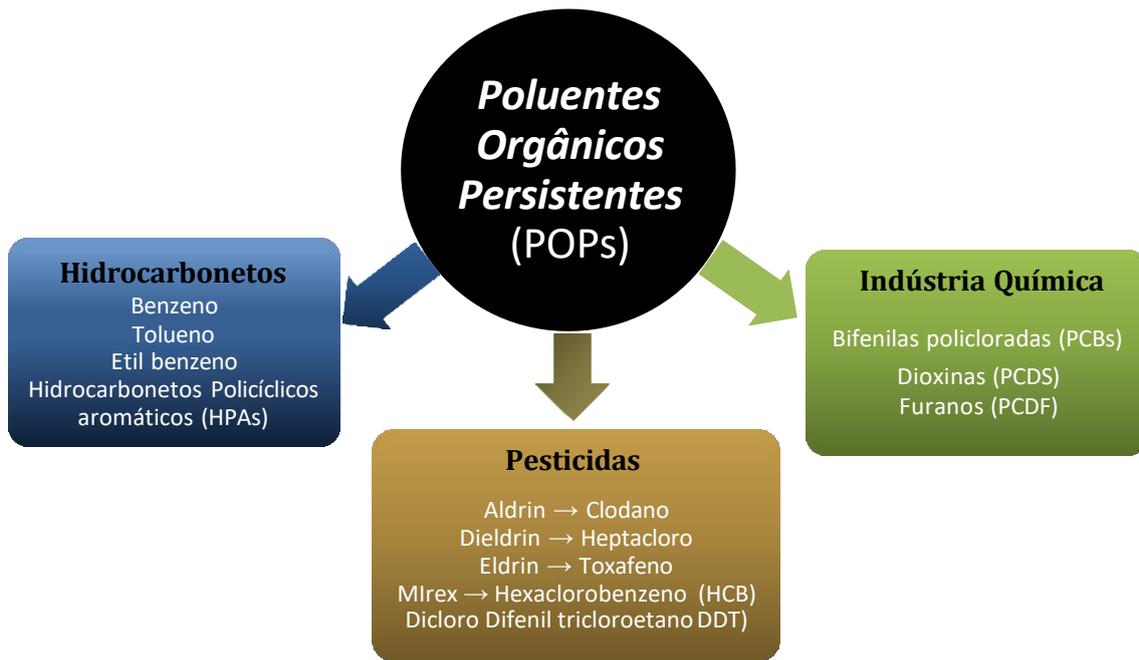


Figura 1: Principais Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (baseado no trabalho de KRITHIGAET al., 2022)

Como já comentado uma das características dos POPs é a tendência de sofrer processos de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar. Bioconcentração é uma medida da tendência do poluente de estar em uma maior concentração no tecido adiposo do organismo em relação a água que circunda este tecido. Bioacumulação é o aumento da concentração do poluente em um determinado organismo em função do tempo. Biomagnificação é o fenômeno para demonstrar o acúmulo progressivo de substâncias nos tecidos dos organismos dos níveis tróficos ao longo da cadeia alimentar, passando dos organismos produtores, para consumidores primários, secundários, terciários, quaternários, etc (BAIRD & CANN, 2005).

A diversidade de contaminantes lançados nas águas de mares e rios torna estes ambientes um importante reservatório global para a reciclagem destes compostos orgânicos hidrofóbicos. Estes poluentes são lançados nas águas principalmente através de pontos de descarga industrial e urbana, nos rios, lagos e águas costeiras. As trocas entre as interfaces ar-água e sedimento-água, as quais são cruciais para o entendimento do fluxo destes poluentes entre estes compartimentos. Dentre os principais fatores que afetam a distribuição de contaminantes entre os diferentes tipos ambientais, são a quantidade de matéria orgânica presente no sedimento, a área de contato e os coeficientes de partição

do poluente nos solventes 1-octanol e água

O coeficiente de partição octanol-água é uma estratégia usada para determinar a lipofilicidade do poluente e conseqüentemente tendência de sofrer processos de bioconcentração, bioacumulação e biomagnificação. O 1-octanol é um álcool de cadeia longa. É possível dizer que a estrutura do octanol é semelhante à estrutura de um triglicerídeo (gordura) presente nos tecidos dos organismos aquáticos (Figura 2). Deste modo, quanto maior o coeficiente de partição do poluente em octanol-água maior a tendência deste poluente de se concentrar nos tecidos gordurosos dos animais (BAIRD & CANN, 2005).

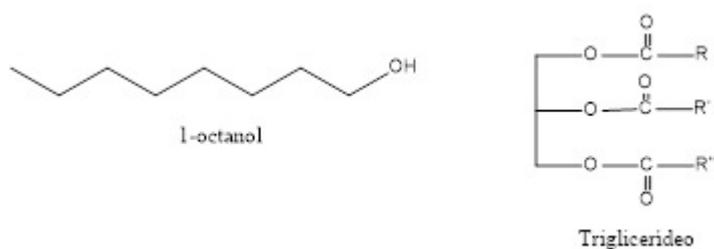


Figura 2: Estrutura das moléculas de 1-octanol e de um triacilglicerídeo

1.2. Principais Tipos de Poluentes Orgânicos Persistentes

1.2.1. PESTICIDAS ORGANOCLORADOS

A União de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define como pesticidas as substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou no armazenamento de alimentos. Além de atuar no controle dos organismos indesejáveis estes compostos também podem atuar no combate aos insetos e vetores de doenças, dentre outras aplicações (GALLI et al., 2006).

Os pesticidas organoclorados foram a primeira classe de pesticidas orgânicos sintéticos. O Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) foi sintetizado pela primeira vez em 1873, usado para combater doenças transmitidas por vetores, como a malária e tifo durante a Segunda Guerra Mundial. Após a guerra, o DDT tornou-se amplamente disponível para uso comercial na agricultura e no controle de vetores causadores de doenças. O modo de ação é a paralisação do inseto ou de seus ovos, podendo ser aplicado

em qualquer fase da plantação ou após a colheita. Embora os cientistas tenham levantado preocupações sobre os perigos potenciais representados pelo DDT já na década de 1940 o reconhecimento público mais amplo do perigo relacionado a estes contaminantes e seus metabólitos só veio após a publicação do livro “Silent Spring, da pesquisadora Rachel Carson, em 1962. Com evidências cada vez mais crescentes dos malefícios destes poluentes, os EUA, o Reino Unido e outros países europeus proibiam a comercialização de DDT nas décadas de 1970 e 80. O Dieldrin foi sintetizado no final da década de 1940 como uma alternativa ao DDT, com pico de uso nas décadas de 1960 e 70, mas também banido nos EUA e Europa em torno de 1987 por conta da elevada toxicidade (PADAYACHEE et al., 2023).

Os poluentes organoclorados são uma classe mais ampla de POPs, que inclui além dos pesticidas organoclorados, compostos como dioxinas, furanos policlorados e bifenilas policloradas (BAIRD & CANN, 2005) (Figura 3).

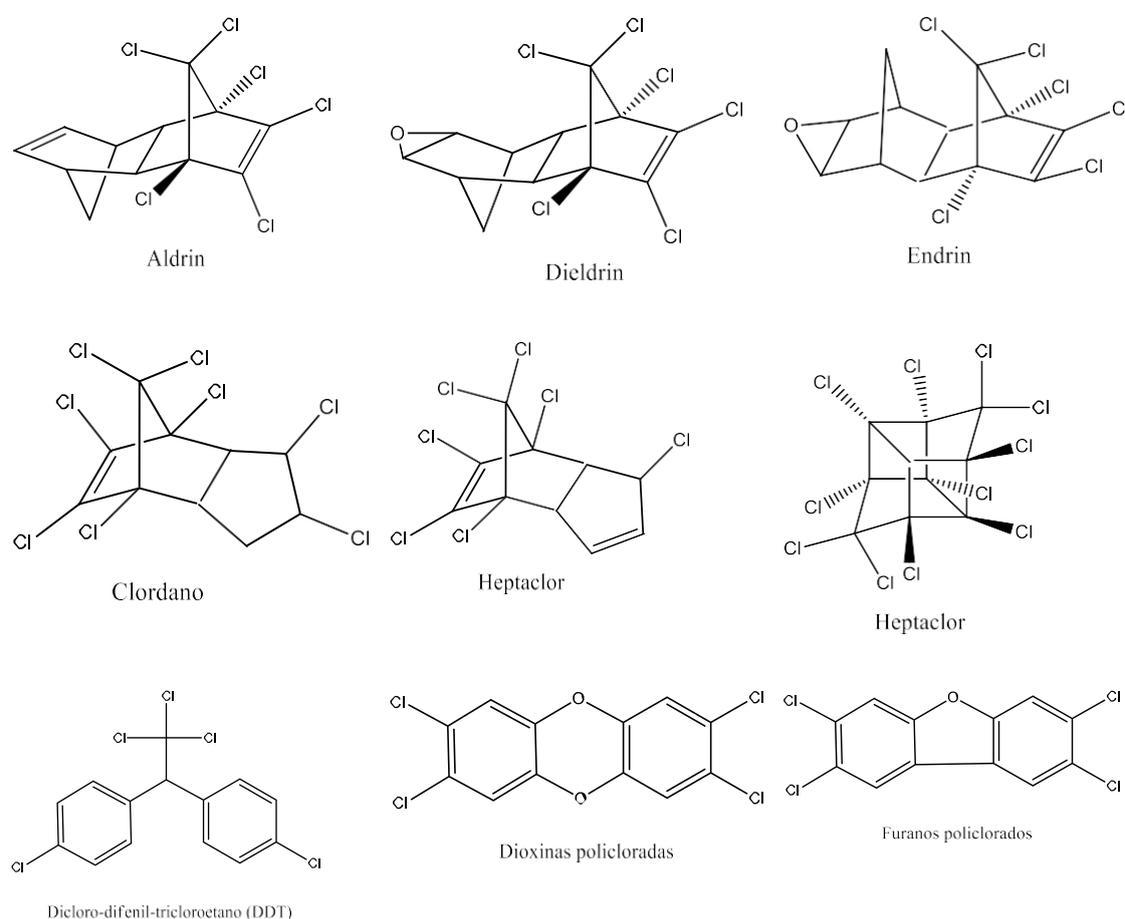
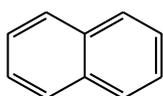


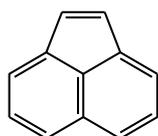
Figura 3: Principais Poluentes Organoclorados

1.2.2. HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

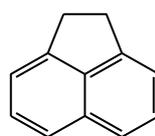
Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos persistentes formados por carbono e hidrogênio, dispostos em anéis aromáticos planares e que apresentam elevada estabilidade e lipoficidade. Estes bem como seus derivados nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais, sofrem processos de bioacumulação, são transportados através de longas distâncias e comumente associados a material particulado fino (BAIRD & CANN, 2005). As estruturas dos 16 HPAs prioritários de importância ambiental, são mostradas na Figura 4.



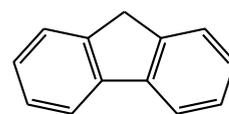
Naftaleno



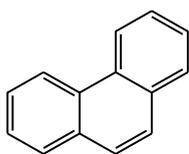
Acenaftileno



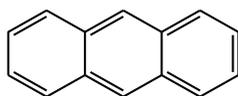
Acenafteno



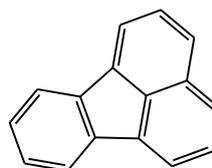
Fluoreno



Fenantreno

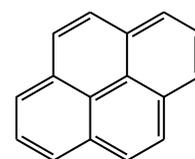


Antraceno

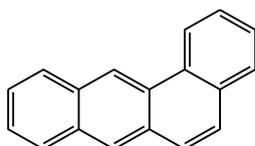


Fluoranteno

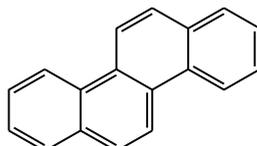
-0



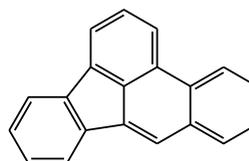
Pireno



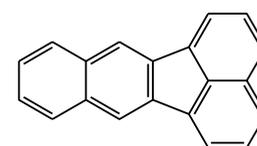
Benzo[a]antraceno



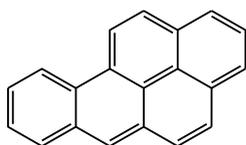
Criseno



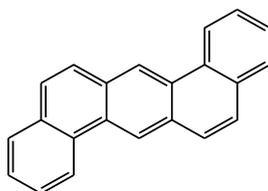
Benzo[b]fluoranteno



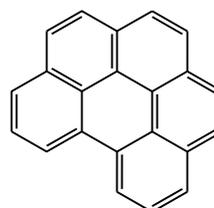
Benzo[k]fluoranteno



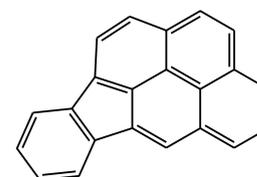
Benzo[a]pireno



Dibenzo[a,h]antraceno



Benzo[g,h,i]perileno



Indeno[1,2,3-cd]pireno

Figura 4: Estrutura dos 16 Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs) (PINTO, 2022)

Os HPAs são classificados como poluentes prioritários devido a sua toxicidade, particularmente possibilidade de serem carcinogênicos. Estes poluentes estão associados a uma grande variedade de cânceres, principalmente devido à associação resultante de interações genéticas e ambientais (BAIRD & CANN, 2005; PEREIRA NETTO et al., 2000).

Os HPAs são formados principalmente em processos de combustão incompleta a altas temperaturas. As fontes de contaminação podem ser divididas em natural e antropogênica. As fontes naturais incluem as erupções vulcânicas. As fontes antropogênicas incluem os processos de combustão de material orgânico (particularmente a exaustão de motores a diesel ou a gasolina), a queima de carvão, incineração de rejeitos, a fumaça de cigarro além de vários processos industriais como, por exemplo, a produção de alumínio e a gaseificação do coque (BAIRD & CANN, 2005; PEREIRA NETTO et al., 2000).

1.2.3. DIOXINAS, FURANOS E BIFENILAS POLICLORADAS

Dioxinas e furanos são compostos aromáticos, contendo função éter, comumente policlorados ou polibromados, e que possuem propriedades físicas e químicas semelhantes. Como os átomos de halogênio podem estar ligados em diferentes posições dos anéis benzênicos, há possibilidade de formação de um grande número de congêneres e isômeros (BAIRD & CANN, 2005; ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999).

A entrada de dioxinas e furanos na atmosfera ocorre de forma não intencional, devido à queima de materiais contendo cloro, como por exemplo queima de plástico poli(cloreto de vinila) PVC. Diversas pesquisas apontam que dentre os processos de geração de dioxinas e furanos, estão o branqueamento de papel com compostos clorados, incineração de resíduos, incêndios, processos de combustão (incineração de resíduos de serviços de saúde, incineração de resíduos urbanos, incineração de resíduos industriais, veículos automotores), dentre outros processos (BAIRD & CANN, 2005; ASSUNÇÃO & PESQUERO, 1999).

Ao contrário das dioxinas e furanos, as bifenilas poli halogenadas, comumente policloradas, são produtos intencionais. Estes compostos possuem estruturas similares às dioxinas e furanos. As bifenilas policloradas eram usadas antigamente na composição de fluidos de resfriamento, plastificantes de polímeros, solventes para a remoção de tintas etc. (PENTEADO et al., 2001).

A síntese e comercialização de PCBs foi banida em vários países, porém ainda há estoques destes resíduos em várias partes do mundo. Estes passivos constituem grande problema ambiental em função da elevada persistência ambiental e toxicidade destes compostos (PENTEADO et al., 2001).

POLUENTES EMERGENTES/DISRUPTORES ENDÓCRINOS

2. Poluentes Emergentes

Poluentes emergentes representam uma grande variedade de compostos químicos que tem sido detectados no ambiente e são originados de práticas antropogênicas diárias de processos industriais, domésticos e da agricultura. Estes compostos são normalmente encontrados em diferentes compartimentos ambientais, em quantidades muito pequenas (traço) e comumente não são monitorados pelos órgãos de proteção ambiental. Embora a ocorrência destes compostos no ambiente não seja recente, eles têm se tornado mais relevantes na última década em função do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, capazes de detectar a presença destes contaminantes nestas concentrações muito baixas no ar, solo, água, plantas, animais e no ser humano (RAMIREZ-MALULE et al., 2020).

Os poluentes emergentes podem estar presentes nas substâncias de limpeza, detergentes, sabões (surfactantes), resíduos de medicamentos ou resíduos farmacêuticos excretados diretamente pelo organismo ou metabólitos gerados em função do uso destes medicamentos, nos ftalatos (substâncias plastificantes) e em algumas toxinas de algas.

Estes poluentes também incluem a presença de microplásticos e nanoplásticos. Quando disponíveis no meio ambiente, os microplásticos e nanoplásticos também podem interagir com os organismos, promovendo a bioacumulação nos tecidos e órgãos.

Os efeitos dos poluentes emergentes nos organismos são os mais variados. Dentre os quais, o aumento da toxicidade devido à permanência destes poluentes nos organismos, podendo ser confundidos por hormônios naturais, interferindo nas reações metabólicas, ocasionalmente, poderá provocar diversos problemas, como mudança do

sexo em animais, diminuindo a eclosão dos ovos, provocar infertilidade e inclusive câncer.

2.1. Principais Tipos de Poluentes Emergentes

Dente os poluentes emergentes estão fármacos (de uso humano e veterinário), hormônios e esteroides, subprodutos de desinfecção, produtos de higiene e cuidados pessoais, surfactantes, retardantes de chama, produtos agroquímicos (pesticidas, fertilizantes), microplásticos e nanoplásticos, metais traço, etc (RAMIREZ-MALULE et al., 2020). Alguns destes contaminantes são comentados aqui.

2.1.1. FÁRMACOS

Os medicamentos (remédios) são substâncias utilizadas pelas pessoas visando cuidados pessoais de saúde. Estes compostos também incluem medicamentos para promover a saúde e crescimento de animais. Estes poluentes incluem medicamentos prescritos, medicamentos não prescritos e medicamentos veterinários. Entre as diferentes classes de fármacos de preocupação ambiental estão os antibióticos, antiinflamatórios não esteróides (AINEs), anticonvulsivantes e estimulantes (RAJAN et al., 2022).

De modo geral os métodos convencionais de tratamento de águas residuais não são muito eficazes na remoção dos fármacos e dos metabólitos (subprodutos gerados quando estes compostos são metabolizados pelos homens e animais). As águas residuais hospitalares, se não forem tratadas, podem levar a graves surtos de doenças transmissíveis, diarreia e cólera (RAJAN et al., 2022), além dos problemas decorrentes de contaminação destas águas com os fármacos e metabólitos destes fármacos.



Figura 5: Embalagens de medicamentos. Fonte, o autor.

2.1.2. HORMÔNIOS E ESTERÓIDES

Durante as últimas duas décadas os hormônios esteróides tem sido uma classe de poluentes orgânicos emergentes de grande preocupação, devido ao seu impacto na saúde humana e ao meio ambiente. Os estrogênios esteróides comuns no ambiente incluem estrona (E1), 17 β -estradiol (17 β -E2) e estriol (E3), 17 hidroxiprogesterona (17OHP) e estrogênio sintético 17 α - Etinilestradiol (EE2). Os hormônios esteróides são oriundos predominantemente da excreção humana e animal no meio ambiente. Também tem sido demonstrado que os esteróides e estrogénios não são completamente removidos no sistema tradicional de tratamento de águas residuais. Deste modo estes contaminantes podem estar presentes no meio ambiente em concentrações relevantes (LI et al., 2022).

2.1.3. SURFACTANTES

Os surfactantes são definidos como moléculas que contém porções apolares (hidrofóbicas) e polares (hidrofílicas). Os surfactantes podem ser de diferentes tipos. De modo geral estes compostos contém entre 10 e 20 átomos de carbono em sua cauda hidrofóbica, além de um grupo químico polar ou eletrificado na sua cabeça, que lhes permite formar ligações de hidrogênio com outras moléculas como moléculas de água. Esta característica faz com que estas substâncias possam participar de uma ampla quantidade de interações intermoleculares, que contribuem para a sua atividade superficial, como ação como sabões (JENA et al., 2023).

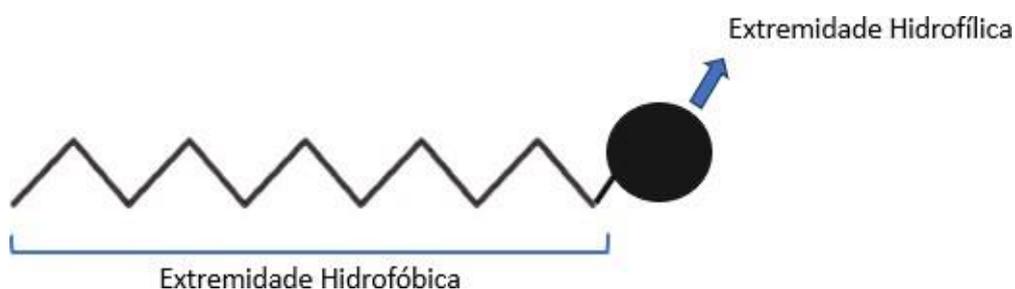


Figura 6: Representação esquemática: molécula de tensoativo (adaptado de Souza et al., 2022).

Os surfactantes são amplamente utilizados em ambientes domésticos e comerciais devido às suas características físicas e químicas distintas. Detergentes, tecidos, tintas, plásticos, produtos farmacêuticos, pesticidas, herbicidas, papéis e itens de higiene pessoal são numerosos produtos que dependem de surfactantes. Devido ao seu uso frequente, quantidades de surfactantes em residências, indústrias e esgotos urbanos podem acabar em estações de tratamento de águas residuais municipais (JENA et al., 2023)

2.1.4. RESÍDUOS PLÁSTICOS

A poluição por resíduos plásticos e os detritos globais de microplásticos tornou-se um dos mais sérios problemas ambientais. De acordo com a literatura, mais de 8 milhões de toneladas de resíduos microplásticos estão presentes como contaminantes no oceano global, e a quantidade de resíduos microplásticos no solo e na água superficial não é precisa. De acordo com tamanho estes resíduos são classificados como mega, macro, meso, micro e nanoplásticos. Estes poluentes podem atuar como vetores de antibióticos, metais pesados, poluentes orgânicos persistentes. (TANG et al., 2021). Os microplásticos são quimicamente estáveis e podem existir durante muito tempo em ambientes marinhos, no solo e água doce e não são facilmente degradados (LIU & YOU, 2023).

Os microplásticos têm sido detectados no trato respiratório superior e inferior, no sangue, trombos, placenta e em outras partes do corpo humano, bem como expectoração e nas fezes, indicando que os humanos têm sido amplamente expostos a estes contaminantes. O mecanismo de toxicidade destes poluentes inclui principalmente

estresse oxidativo, danos às organelas da membrana celular, resposta imune, toxicidade genética (LIU & YOU, 2023).

Os microplásticos podem induzir fortes reações antioxidantes após entrarem nas células, o que pode levar ao estresse oxidativo. A elevada área superficial específica dos microplásticos, a liberação de substâncias oxidantes adsorvidas em sua superfície e a liberação de espécies reativas de oxigênio durante a resposta inflamatória são fatores que contribuem para o estresse oxidativo (LIU & YOU, 2023).

Os estudos também têm mostrado que estes contaminantes também podem promover a absorção celular aumentando a permeabilidade da membrana. Os microplásticos podem desencadear a geração de espécies reativas excessivas de oxigênio e acionar o sistema antioxidante causando estresse oxidativo celular, que por sua vez leva a danos mitocondriais e lisossômicos e, em última análise danificando a membrana celular (LIU & YOU, 2023).

Adicionalmente estes contaminantes podem desencadear respostas do sistema imunológico, afetando a expressão e liberação de fatores pré-inflamatórios, causando assim inflamação. Experimentos *in vitro* utilizando linfócitos periféricos humanos tem mostrado que o contato com os microplásticos gera uma tendência de aumento das aberrações cromossômicas, como quebras cromossômicas e cromossomos dicêntricos, bem como aumento da formação de pontes nucleoplasmáticas e brotamento nuclear, causando instabilidade genômica em linfócitos humanos (LIU & YOU, 2023).

2.2. Disruptores endócrinos

Alguns autores definem como disruptores ou desreguladores endócrinos as substâncias capazes de interagir com os sítios receptores dos hormônios. Outros pesquisadores entendem que estes compostos incluem qualquer composto capaz de provocar um desequilíbrio, ou uma alteração no sistema endócrino, independentemente se atua diretamente no sítio receptor do hormônio ou não (BILA & DEZOTTI, 2007).

Ao longo dos anos, tem sido registrados numerosos fenômenos ambientais causados por esses poluentes, como alterações do sistema reprodutivo de diversos animais, redução e data de eclosão dos ovos, baixa sobrevivência juvenil de tartarugas

marinhas e crocodilos. (LOCATELLI et al., 2016).

O sistema endócrino juntamente com o sistema nervoso regula todas as funções fisiológicas do corpo. Os hormônios, substâncias químicas secretadas pelas glândulas endócrinas diretamente na corrente sanguínea, se comunicam com órgãos e tecidos controlando suas atividades por meio de estímulos de liberação ou inibição.

Devido à complexidade e sensibilidade do sistema endócrino, a exposição a essas substâncias pode efetivamente causar distúrbios. Schug et al. (2013) afirmam que não há processos hormonais que estão imunes ao poder de um interferente endócrino. Isso ocorre porque os eixos de atuação de um determinado hormônio ou glândula interage com outros eixos gerando respostas endócrinas muito específicas e complexas, e quando ocorre a alteração de um eixo de atuação certamente outros estarão suscetíveis, essa parece ser uma preocupante consequência, pois tais efeitos podem ser difíceis de prever devido à incompreensão total do processo endócrino.

Dentre os contaminantes com potencial ação como disruptores endócrinos estão inseticidas como DDT, herbicidas como Atrásina, fungicidas como Mancozeb, metais pesados como cádmio, estanho e chumbo, surfactantes como nonilfenol e acetato de nonilfenol, plastificantes como Bisfenol A, fitoestrogênios como Genisteína e Cumestrol, produtos ou subprodutos químicos industriais como bifenilas policloradas, dioxinas e furanos, protetores solares e constituintes de fragrâncias (Figura 7) (LOCATELLI et al., 2016).

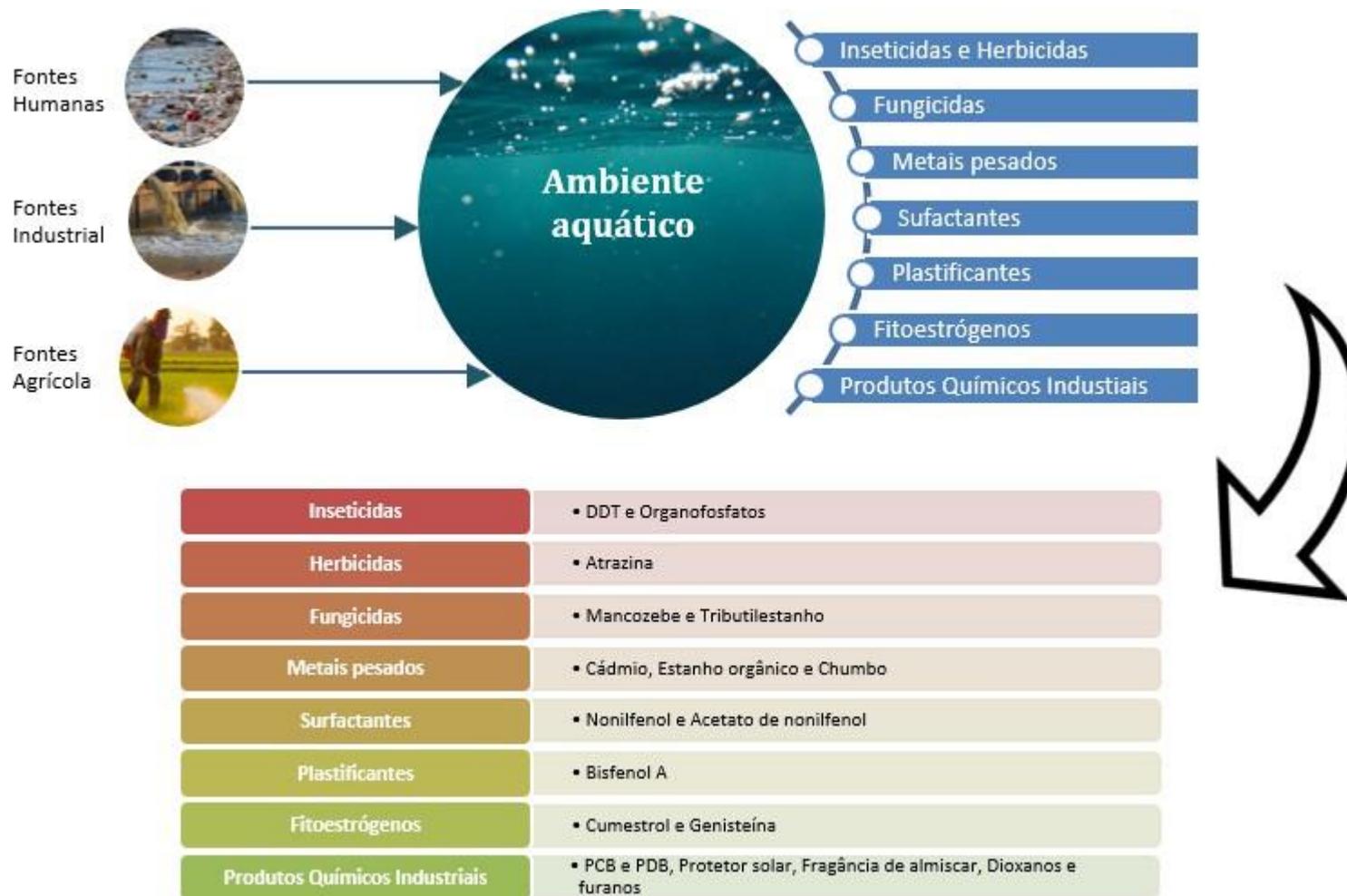


Figura 7. Principais poluentes disruptores endócrinos (baseado no trabalho de LOCATELLI et al., 2016)

Referências Bibliográficas

ASSUNÇÃO, J. V., & PESQUERO, C. R. (1999). Dioxinas e furanos: origens e riscos. *Revista de Saúde Pública*, 33, 523-530.

BAIRD, C., & CANN, M. (2005). *Environmental chemistry*. Macmillan.

BILA, D. M., & DEZOTTI, M. (2007). Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química nova*, 30, 651-666.

Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Ministério do Meio Ambiente, Brasil. Disponível em: <<https://antigo.mma.gov.br/seguranca-quimica/convencao-de-estocolmo.html>> Acesso em: 20 de jul. de 2023.

GALLI, A., DE SOUZA, D., GARBELLINI, G. S., COUTINHO, C. F., MAZO, L. H., AVACA, L. A., & MACHADO, S. A. (2006). Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Química Nova*, 29, 105-112.

KRITHIGA, T., SATHISH, S., RENITA, A. A., PRABU, D., LOKESH, S., GEETHA, R., ... & SILLANPAA, M. (2022). Persistent organic pollutants in water resources: Fate, occurrence, characterization and risk analysis. *Science of The Total Environment*, 831, 154808.

LI, Z., GAO, X., LI, M., YAN, Q., ZHANG, N., YU, B., ... & BOKHARI, A. (2022). Steroid hormone-inducible biosensor based on EGFP-tagged and environmental application. *Environmental Research*, 215, 114303.

LIU, Z., & YOU, X. Y. (2023). Recent progress of microplastic toxicity on human exposure base on in vitro and in vivo studies. *Science of The Total Environment*, 166766.

LOCATELLI, M., SCIASCIA, F., CIFELLI, R., MALATESTA, L., BRUNI, P., & CROCE, F. (2016). Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1434, 1-18.

PADAYACHEE, K., REYNOLDS, C., MATEO, R., & AMAR, A. (2023). A global review of the temporal and spatial patterns of DDT and dieldrin monitoring in raptors. *Science of The Total Environment*, 858, 159734.

PENTEADO, J. C. P., & VAZ, J. M. (2001). O legado das bifenilas policloradas (PCBs). *Química Nova*, 24, 390-398.

PEREIRA NETTO, A. D., MOREIRA, J. C., DIAS, A. E. X., ARBILLA, G., FERREIRA, L. F. V., OLIVEIRA, A. S., & BAREK, J. (2000). Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Química nova*, 23, 765-773.

PINTO, R. L. (2022) Estudo da capacidade de remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes em solução aquosa utilizando resinas poliméricas reticuladas.

Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

RAMÍREZ-MALULE, H., QUINONES-MURILLO, D. H., & MANOTAS-DUQUE, D. (2020). Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. *Emerging contaminants*, 6, 179-193.

RANJAN, N., SINGH, P. K., & MAURYA, N. S. (2022). Pharmaceuticals in water as emerging pollutants for river health: A critical review under Indian conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247, 114220.

SOUZA, Adriano Lopes de; VOLPATI, Diogo; CASELI, Luciano; CERIDÓRIO, Lucinéia Ferreira; MIRANDA, Paulo Barbeitas; NOBRE, Thatyane Morimoto; JR., Osvaldo N. Oliveira; "Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett", p. 373 - 422. In: *Nanotecnologia Aplicada a Polímeros*. São Paulo: Blucher, 2022. 1ISBN: 9786555502527, DOI 10.5151/9786555502527-12

TANG, Y., LIU, Y., CHEN, Y., ZHANG, W., ZHAO, J., HE, S., ... & YANG, Z. (2021). A review: Research progress on microplastic pollutants in aquatic environments. *Science of The Total Environment*, 766, 142572.