



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LUANE FERREIRA GARCIA**

**Remediação bio-eletrouímica do hormônio sexual sintético  
17- $\alpha$ -etinilestradiol**

**Goiânia  
2016**

LUANE FERREIRA GARCIA

**Remediação bio-eletrquímica do hormônio sexual sintético  
17- $\alpha$ -etinilestradiol**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Mariângela Fontes Santiago.

**Goiânia  
2016**

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e amor dedicado a mim.

Ao meu orientador, Eric de Souza Gil, e à minha co-orientadora, Mariângela Fontes Santiago, pela oportunidade da realização deste trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora pelas sugestões e considerações.

Especialmente aos meus pais e irmão. O amor e apoio de vocês são fundamentais em cada momento da minha vida.

Aos familiares e amigos que me apoiaram e torceram por mim nesta jornada.

Aos amigos de curso e laboratórios (LAFAM e LEnziBio). Em especial à Jhébica e Monike, por tudo que passamos juntas, tenho um carinho imenso por vocês. Ao Stephen por me ajudar nas análises eletroquímicas. À Karla e ao Jerônimo pelo apoio nas pesquisas e nos momentos difíceis.

Ao Adilson Sartoratto e ao pessoal do Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas, da Universidade Estadual de Campinas, por abrirem as portas do Centro e possibilitar as análises cromatográficas.

À querida Fernanda Bellato pelo carinho e disposição em sempre nos ajudar com tudo relacionado ao programa.

Aos professores e servidores da Universidade Federal de Goiás.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Universidade Federal de Goiás.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o mestrado.

Muito obrigada!

## RESUMO

Hormônios são lançados constantemente em esgotos, sejam oriundos de excretas humanas ou animais, sejam de resíduos provenientes das indústrias farmacêuticas, não tratados de forma eficaz. O despejo destes micropoluentes nos recursos hídricos produz grande impacto ambiental, como desregulação do sistema endócrino em animais. O 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) é o mais popular estrogênio sintético, sendo encontrado nos recursos hídricos em concentrações consideráveis. Diversas estratégias estão sendo estudadas para remediação deste poluente. Enzimas como as lacases, que possuem baixa especificidade, são capazes de oxidar diversos poluentes, sugerindo assim seu potencial no tratamento de efluentes. Outra alternativa são os processos eletroquímicos, como a eletro-oxidação e eletrocoagulação. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de remoção do EE2 por processo biológico ou/e eletroquímico. O extrato bruto contendo a lacase de *Pycnoporus sanguineus* foi imobilizado em *beads* de quitosana-alginato-Ca/Cu. Para caracterização parcial da enzima livre e imobilizada foram determinados pH e temperatura ótima de atividade enzimática. A remediação biológica foi realizada nas condições: agitação (100 rpm); temperatura em 28°C ( $\pm$  2); tempos de 4, 8 e 24 horas; solução de EE2 tamponada em pHs 4 e 5, e solução do hormônio sem adição de tampão. A remediação eletroquímica: agitação magnética; tensão de 2,5, 5 e 7,5 V; tempos de 10, 20 e 40 minutos; solução de EE2 tamponada em pHs 5 e 7. Para remediação bio-eletroquímica, de modo sequencial, foram utilizadas as condições mais adequadas para ambas as tecnologias. Nos ensaios de remediação do hormônio EE2 com a enzima imobilizada, o melhor resultado foi obtido para *beads* de quitosana-alginato-Ca com remoção de 89,81% ( $\pm$  2,71) em tampão acetato de sódio pH 5 e 24 horas de tratamento. Nas mesmas condições, para a enzima livre foi obtido 91,81% ( $\pm$  0,86) de remoção. Para remediação eletroquímica, com eletrodo de titânio foi removido 86,21% ( $\pm$  9,30) do EE2, em tampão fosfato pH 7 e 40 minutos. Para a remediação bio-eletroquímica em modo sequencial, obteve-se remoção do EE2 em concentrações abaixo do limite de detecção do cromatógrafo, com a enzima imobilizada atuando em solução não tamponada. Conclui-se que as duas tecnologias são bastante eficientes para a remoção do EE2, podendo ser utilizadas separadamente ou em conjunto.

**Palavras-chave:** desregulador endócrino. Lacase. Imobilização enzimática. Eletrodo de titânio. Eletro-oxidação. Remediação.

## ABSTRACT

Hormones are released constantly in sewage, originated by of human/animal excreta, or waste of pharmaceutical industries, not treated satisfactorily. The eviction of these pollutants in water resources produces great environmental impact, as disruption in animals' endocrine system. The 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) is the most popular synthetic estrogen, which is found in water and in considerable concentrations. Several strategies are being studied to remedy this pollutant. Enzymes as laccases, which have low specificity, are able to oxidize various pollutants, thus suggesting their potential in the treatment of effluents. Another alternative are the electrochemical processes as electro-oxidation and electrocoagulation. The aim of this study was to evaluate the removal efficiency of the EE2 for biological or/and electrochemical process. The crude extract containing the laccase from *Pycnoporus sanguineus* was immobilized in Ca/Cu-alginate-chitosan beads. For partial characterization were determined optimum pH and optimum temperature of enzyme activity, for free and immobilized enzyme. Biological remediation was performed in these conditions: shaking (100 rpm); temperature at 28°C ( $\pm$  2); times of 4, 8 and 24 hours; EE2 solution buffered at pH 4 and 5, and EE2 solution without addition of buffer. For the electrochemical remediation: magnetic stirring; voltage of 2.5, 5 and 7.5 V; times of 10, 20 and 40 minutes; pHs 5 and 7. For bio-electrochemical remediation the best conditions were used. In the remediation assays of the EE2 with immobilized enzyme, the best result was obtained for the support Ca-alginate-chitosan with 89.81% ( $\pm$  2.71) removal, in sodium acetate buffer pH 5.0 and 24 hours of treatment. Under the same conditions to the free enzyme, 91.81% ( $\pm$  0.86) of removal was obtained. For electrochemical remediation with titanium electrode, 86.21% ( $\pm$  9.30) was removed in pH 7 phosphate buffer and 40 minutes. For sequential bio-electrochemical remediation, EE2 concentrations were below the limit of detection of the chromatograph, with the removal by immobilized enzyme acting in unbuffered solution. It can be concluded that the two technologies are very effective for the removal of the EE2.

**Key words:** endocrine disrupter. Laccase. Enzymatic immobilization. Titanium electrode. Electro-oxidation. Remediation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo de atuação dos desreguladores endócrinos.....	15
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do 17 $\beta$ -estradiol (A) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (B). ....	16
<b>Figura 3</b> - Metabolismo e transformação do etinilestradiol no organismo e formas de excreção no meio ambiente. ....	17
<b>Figura 4</b> - Ciclo catalítico da lacase. ....	21
<b>Figura 5</b> - Imobilização de enzima por aprisionamento em poros de matriz polimérica. ....	23
<b>Figura 6</b> - A. Unidade estrutural do alginato. B. Estrutura reticulada entre Ca <sup>2+</sup> e alginato...	24
<b>Figura 7</b> - Estrutura química da quitosana.....	24
<b>Figura 8</b> - Esquema de oxidação indireta que ocorre no ânodo para remediação de compostos orgânicos.....	27
<b>Figura 9</b> - Esquema representando o processo de imobilização em matriz polimérica (quitosana-alginato-Cu/Ca). ....	32
<b>Figura 10</b> - Eletrodos. (A) titânio, (B) grafite, (C) cobre, (D) aço inoxidável, (E) alumínio..	35
<b>Figura 11</b> - Esquema utilizado para tratamento eletroquímico. ....	36
<b>Figura 12</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) para o extrato bruto enzimático do <i>P. sanguineus</i> . Coloração da enzima obtida com substrato ABTS (verde) e seringaldazina (rosa).....	39
<b>Figura 13</b> - Formulações das <i>beads</i> de quitosana-alginato-Cu/Ca. Diâmetro de aproximadamente 4 mm. ....	39
<b>Figura 14</b> – Imagens obtidas por MEV das <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca, sem enzima (A.1-C.1) e com enzima lacase imobilizada (A.2-C.2); <i>beads</i> de quitosana-alginato-Cu, sem enzima (A.3-C.3) e com enzima lacase imobilizada (A.4-C.4). As imagens A estão com aumento de 65x, B com aumento de 1000x e C com 10000x. ....	46
<b>Figura 15</b> - Cromatogramas com os resultados obtidos antes e após tratamento do etinilestradiol. A – Padrão de EE2 (4,59 mg.L <sup>-1</sup> ); B – tratamento com <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca; C – tratamento com lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca; D – tratamento com lacase livre. Cromatogramas em diferentes escalas. ....	50
<b>Figura 16</b> - Lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca utilizadas na remediação do etinilestradiol. A: 3 ciclos em tampão acetato de sódio 50 mmol.L <sup>-1</sup> pH 5. B: 7 ciclos em água destilada. ....	52

**Figura 17** - Cromatogramas com os resultados obtidos antes e após tratamento eletroquímico do etinilestradiol com eletrodos de titânio. A – Padrão de EE2 ( $2,94 \text{ mg.L}^{-1}$ ); B – 10 minutos, C – 20 minutos e D – 40 minutos de tratamento. Cromatogramas em diferentes escalas. ....55

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Produção da enzima lacase pelo <i>P. sanguineus</i> de acordo com o tempo de cultivo. .....	38
<b>Gráfico 2</b> - Porcentagens de rendimento na oxidação do substrato ABTS para as duas formulações de <i>beads</i> com a lacase imobilizada. ....	40
<b>Gráfico 3</b> - Caracterização da enzima lacase livre de <i>P. sanguineus</i> e imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca/Cu, com substrato ABTS. A: pH; B: temperatura. ....	42
<b>Gráfico 4</b> - Reuso da lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca/Cu para oxidação do substrato ABTS. ....	43
<b>Gráfico 5</b> - Estabilidade de armazenamento da lacase livre e imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca. ....	45
<b>Gráfico 6</b> - Remediação do etinilestradiol em diferentes concentrações com a enzima lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca. ....	51
<b>Gráfico 7</b> - Reuso da lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca para remediação do etinilestradiol. ....	52
<b>Gráfico 8</b> - Tratamento por remediação eletroquímica do etinilestradiol com diferentes ânodos. ....	53
<b>Gráfico 9</b> - Tratamento por remediação eletroquímica do etinilestradiol com o eletrodo de titânio, em diferentes pHs (A) e tensões (B).....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Presença de etinilestradiol (EE2) em recursos hídricos de cidades brasileiras. ....	17
<b>Tabela 2</b> - Diferentes poluentes ambientais utilizados como substrato pela lacase. ....	22
<b>Tabela 3</b> - Estudos comparativos envolvendo lacase imobilizada em <i>beads</i> de alginato.....	42
<b>Tabela 4</b> - Porcentagens de remoção do etinilestradiol com as formulações de lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca/Cu e lacase livre. ....	47
<b>Tabela 5</b> - Porcentagens de remoção do etinilestradiol com as formulações de lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca e lacase livre, em diferentes pHs. ....	48
<b>Tabela 6</b> - Atividade enzimática da lacase imobilizada em <i>beads</i> de quitosana-alginato-Ca após 24 horas de tratamento do etinilestradiol em diferentes pHs. ....	49
<b>Tabela 7</b> - Metais quantificados por análise de ICP-OES após tratamento eletroquímico de uma solução aquosa contendo o hormônio etinilestradiol.....	53
<b>Tabela 8</b> - Remoção de estrogênios por eletro-oxidação.....	57
<b>Tabela 9</b> - Tratamento bio-eletroquímico do hormônio etinilestradiol. ....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Sal diamônio 2,2' – azino – bis (3 – etilbenzotriazolina – 6 – sulfônico)
APS	Ammonium Persulfate
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E1	Estrona
E2	17 $\beta$ -estradiol
EE2	17 $\alpha$ -etinilestradiol
ETEs	Estações de Tratamento de Esgoto
HBT	1-hidroxi-benzotriazole
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry
K <sub>OW</sub>	coeficiente de partição octanol/água
LD	Limite de Detecção
LiP	Lignina Peroxidase
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MnP	Manganês Peroxidase
POAs	Processos Oxidativos Avançados
SDS	Sodium dodecyl sulfate
T1, T2, T3	Tipo 1, 2, 3
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 ETINILESTRADIOL E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 REMOÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS</b> .....	<b>18</b>
<b>1.3 <i>PYCNOPORUS SANGUINEUS</i></b> .....	<b>20</b>
<b>1.3.1 Enzima lacase</b> .....	<b>20</b>
<b>1.4 IMOBILIZAÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4.1 Biopolímeros</b> .....	<b>23</b>
<b>1.5 REMEDIAÇÃO ELETROQUÍMICA</b> .....	<b>25</b>
<b>1.6 REMEDIAÇÃO BIO-ELETROQUÍMICA</b> .....	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 TRATAMENTO BIOLÓGICO</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.1 Origem e manutenção do fungo</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.2 Produção e determinação enzimática</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1.3 Eletroforese</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.4 Imobilização</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1.5 Condições ótimas para atividade da enzima livre e imobilizada</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1.7 Remediação do hormônio EE2</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 TRATAMENTO ELETROQUÍMICO</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.1 Eletrodos</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.2 Sistema eletroquímico de tratamento</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.3 Análise em ICP-OES</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3 TRATAMENTO BIO-ELETROQUÍMICO</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4 ANÁLISES EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)</b> .....	<b>36</b>
<b>3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONSTRUÇÃO DE GRÁFICOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 TRATAMENTO BIOLÓGICO</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1.1 Produção enzimática</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1.2 Imobilização e condições ótimas de atividade</b> .....	<b>39</b>

<b>4.1.3 Remediação do EE2</b> .....	<b>46</b>
4.1.3.1 <i>Tempo de tratamento</i> .....	46
4.1.3.2 <i>pH ótimo</i> .....	48
4.1.3.3 <i>Efeito da concentração do EE2</i> .....	51
4.1.3.4 <i>Ciclos de reuso</i> .....	51
<b>4.2 TRATAMENTO ELETROQUÍMICO</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3 TRATAMENTO BIO-ELETROQUÍMICO</b> .....	<b>57</b>
<b>5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA</b> .....	<b>60</b>
5.1 <b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>60</b>
5.2 <b>PERSPECTIVA</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>

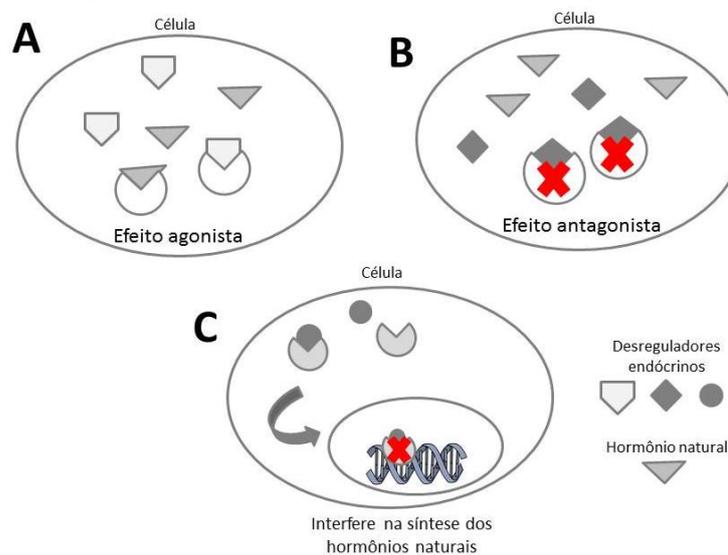
## 1 INTRODUÇÃO

Recentes estudos têm mostrado que vários produtos químicos despejados comumente no meio ambiente, utilizados na agricultura, indústria, atividade doméstica e em produtos para cuidados pessoais, possuem relação com os danos causados ao sistema endócrino de animais. Estes micropoluentes químicos ou desreguladores endócrinos incluem pesticidas, desinfetantes, aditivos plásticos, fármacos, dentre outros (CARR et al., 2008; SOUZA, 2011; PADILHA; LEITZKE, 2013).

Os desreguladores endócrinos são substâncias químicas capazes de interferir no funcionamento natural do sistema hormonal alterando sua função, provocando efeitos adversos a saúde (organismos intactos) e ao ecossistema (descendência e/ou (sub) populações) (COMMISSION of the EUROPEAN COMMUNITIES, 1999; MACHADO, 2010).

Tais micropoluentes podem atuar de três formas distintas (Figura 1): (A) imitando a ação de um hormônio naturalmente produzido, como estrogênio ou testosterona, e desencadeando assim reações químicas semelhantes no corpo; (B) bloqueando os receptores hormonais nas células, impedindo a ação dos hormônios naturais; (C) afetando a síntese, transporte, metabolismo e excreção de hormônios naturais (COMMISSION of the EUROPEAN COMMUNITIES, 1999; CARR et al., 2008).

**Figura 1** - Esquema representativo de atuação dos desreguladores endócrinos.



Fonte: Autora.

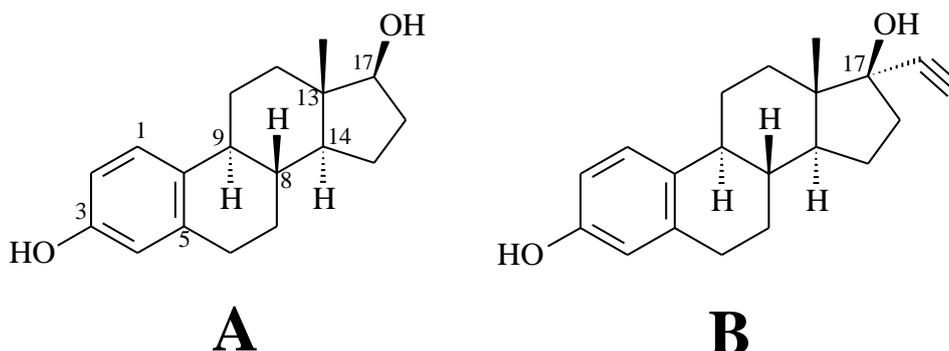
Existem basicamente três classes de substâncias que podem alterar o funcionamento do sistema endócrino: (a) os hormônios naturais que incluem estrogênio, progesterona e testosterona, presentes no corpo humano e nos animais, (b) os fitoestrogênios, substâncias

contidas em algumas plantas, como nas sementes de soja, e que apresentam uma atividade semelhante aos esteroides hormonais; e (c) as substâncias sintéticas que incluem os hormônios sintéticos utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos na alimentação animal, os xenoestrogênios, incluindo nesta categoria os pesticidas, aditivos plásticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos de organoestanho, alquilfenóis, e ainda subprodutos de processos industriais, como as dioxinas e furanos (BILA; DEZOTTI, 2007).

### 1.1 ETINILESTRADIOL E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Derivado do  $17\beta$ -estradiol (E2), um estrogênio natural, o  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) (Figura 2) é um estrogênio sintético utilizado em diversas formulações de pílulas de contraceptivos orais e na terapia de reposição hormonal (FERREIRA, 2008).

**Figura 2** - Estrutura química do  $17\beta$ -estradiol (A) e  $17\alpha$ -etinilestradiol (B).



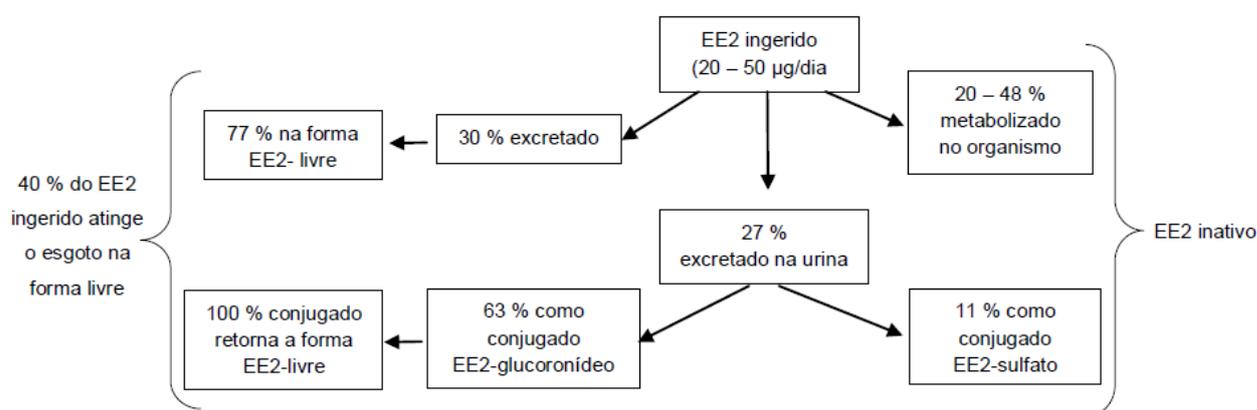
Fonte: Autora.

A adição do grupo etinil, na posição 17 de sua estrutura (Figura 2-B) em relação ao E2, o torna mais resistente ao metabolismo e confere um maior potencial estrogênico. Em seres humanos, a afinidade de ligação do EE2 aos receptores estrogênicos é uma a duas vezes mais elevada do que ao E2 produzido naturalmente, e até cinco vezes mais elevada para algumas espécies de peixes (ANDREW et al., 2010; ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014).

Em relação às propriedades físico-químicas, o EE2 apresenta baixa solubilidade em água ( $4,8 \text{ mg.L}^{-1}$  em  $20^\circ\text{C}$ ), quando comparado aos estrogênios naturais ( $13 \text{ mg.L}^{-1}$  em  $20^\circ\text{C}$ ). O valor de 4,14 para o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ( $K_{OW}$ ) indica certa hidrofobicidade do composto, o que reflete em uma tendência à migração para o meio orgânico, apresentando assim poder de bioacumulação, sendo também encontrado em sedimentos (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014).

A maioria das pílulas anticoncepcionais contém entre 20 e 50  $\mu\text{g}$  de EE2 por comprimido, e são ingeridos em doses diárias. Sendo que 20 a 48% são metabolizadas no organismo e o restante é eliminado na sua forma original ou em conjugados sulfatos, não ativa, ou glucoronídeos, que voltam à forma livre em ambientes naturais (Figura 3) (RAIMUNDO, 2011).

**Figura 3** - Metabolismo e transformação do etinilestradiol no organismo e formas de excreção no meio ambiente.



Fonte: Raimundo (2011).

Projeções realizadas em 2006 pelo setor industrial farmacêutico consideravam que existiam no Brasil cerca de 8 milhões de usuárias de pílulas anticoncepcionais, havendo a perspectiva desse número chegar a 45 milhões nas próximas duas décadas (MACHADO, 2010).

Devido a sua elevada resistência a biodegradação, o EE2 é o principal desregulador endócrino hormonal encontrado no ambiente aquático (FERREIRA, 2008). A detecção desse estrogênio em recursos hídricos varia conforme sua presença em esgotos ou efluentes industriais. Como exemplos, a Tabela 1 apresenta alguns valores encontrados em diversas cidades brasileiras.

**Tabela 1** - Presença de etinilestradiol (EE2) em recursos hídricos de cidades brasileiras.

Cidade	EE2 ( $\text{ng.L}^{-1}$ )	Fonte
Campinas - SP / Rio Atibaíba	>3	Raimundo (2011)
Campo Grande - MS / Águas subterrâneas	>6,25	Souza (2008)
Fortaleza - CE / ETES	1000	Souza (2011)
Belo Horizonte - MG/ Vargem das Flores	54	Moreira (2008)
Curitiba - PR / Alto Iguaçu	<120 a 5900	Machado (2010)
Curitiba - PR / Rio Belém	5830	Padilha e Leitzke (2013)
Goiânia - GO / Rio Meia Ponte	2970	Fonseca et al. (2012)

A grande diferença entre os valores de concentrações observadas na Tabela 1 pode estar relacionada com alguns fatores, como o nível de contaminação da área estudada; o ano de publicação dos trabalhos, uma vez que o consumo de anticoncepcionais cresce em 23% no Brasil a cada ano; a estação do ano em que as amostras foram coletadas, pois o ciclo de chuvas interfere na vazão dos rios (MACHADO, 2010).

Como a detecção e quantificação do EE2 e de outros desreguladores endócrinos são relativamente recentes, a legislação CONAMA 430/2011, que trata da gestão do lançamento de efluentes em corpos de águas receptores, não estabelece limites da concentração destes contaminantes, aceitáveis no meio ambiente (PADILHA; LEITZKE, 2013).

Além dos locais já mencionados, diferentes desreguladores endócrinos também foram detectados em amostras de água mineral engarrafada. No estudo realizado por Plotan et al. (2013), foi constatada atividade hormonal em 78% de um total de 14 marcas distintas. Atividades estrogênica, androgênica, progestogênica e glicocorticóides foram encontradas em 38%, 38%, 36% e 55% das amostras, respectivamente.

Estudos de campo e de laboratório têm fornecido abundantes evidências sobre os efeitos da exposição ao EE2, tais como proporções elevadas de peixes hermafroditas, diminuição da quantidade de ovos e produção de espermatozoides, diminuição da qualidade dos gametas, redução da fertilidade e fecundidade, além de mudanças de comportamento (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014).

Em estudo molecular, o efeito prejudicial do EE2 a saúde de peixes foi comprovado a partir de ensaios de reprodução com o *Danio rerio*, zebrafish. Estes foram expostos à no máximo 25 ng.L<sup>-1</sup> de EE2, e constatou-se má formação gonadal, diminuição da transcrição de genes masculinos predominantes, o que levou a distúrbios reprodutivos no ambiente (CASPILO et al., 2014).

## **1.2 REMOÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS**

Devido aos danos ambientais provocados pelos desreguladores endócrinos, diversos processos estão sendo estudados para remover ou degradar esses poluentes. Os processos podem ser divididos em três grupos, os processos físicos, que envolve apenas adsorção, e os processos químicos e biológicos, que promovem a degradação e/ou adsorção.

Sabe-se que os processos convencionais de tratamento de águas, que envolve as etapas de coagulação, floculação e sedimentação entre outros, têm sido relatados como sendo ineficazes na remoção de fármacos, que incluem os desreguladores endócrinos (PAN et al., 2008).

A remoção por adsorção do EE2 empregando turfa decomposta, um sedimento orgânico obtido da decomposição parcial da matéria vegetal em um ambiente propício, resultou em eficiência de 55% na remoção por adsorção do hormônio em soluções aquosas. A boa capacidade de adsorção deve-se a presença de grupos funcionais reativos que atuam nas reações de troca iônica, elevando assim o potencial de adsorção de espécies como metais e moléculas orgânicas polares (FERNANDES et al., 2011).

Já dentre os processos químicos mais comumente estudados estão os processos oxidativos avançados (POAs). Os POAs são caracterizados por reações de oxidações químicas intermediadas pelo radical hidroxila, espécie extremamente reativa e pouco seletiva. O potencial padrão de redução do radical hidroxila ( $E^0 = 2,73 \text{ V}$ ), muito superior ao dos oxidantes convencionais, faz com que atue na oxidação de uma grande variedade de substâncias (MELO et al., 2009). Dentre esses processos estão a fotocátalise de peróxido de hidrogênio, ozonização, fotocátalise heterogênea, fenton e foto-fenton. Como exemplo, no processo fenton homogêneo assistido por luz solar, ao realizar a remoção de estrogênios, incluindo o EE2, Liz (2013) obteve degradações superiores a 90%.

Ainda em processos químicos para remoção de EE2, a partir da remediação eletroquímica, um grupo de pesquisadores realizou o processo de remoção anódica do hormônio com eletrodos de cartolinas de carbono. Observaram que meios alcalinos ( $\text{pH} > 8$ ) favoreceram a oxidação anódica, enquanto os meios ácidos e neutros favoreceram a remoção física por adsorção à superfície do eletrodo. Entretanto, a taxa de remoção máxima para uma tensão de 1,25V, pH 8 e 30 minutos de eletrólise foi de 45%, valor relativamente baixo considerando-se a elevada relação área eletrodo / volume de solução (LINO et al., 2013).

Os processos biológicos ou biorremediação utilizam as funções naturais dos micro-organismos para a remediação de poluentes ambientais. O baixo custo operacional e a relativa facilidade de aplicação aumentam a possibilidade do uso de micro-organismos no tratamento de contaminantes diversos (UTO, 2009).

O processo biológico mais empregado para remoção de estrogênios é o processo de lodo ativado, como nas estações de tratamento de esgoto. Para o hormônio EE2, as remoções e/ou biodegradações obtidas variam largamente, de 34 a 94 % (ESPERANZA et al., 2004; CARGOUET et al., 2004).

O uso de fungos de decomposição branca da madeira, que degradam celulose, hemicelulose e lignina, quebrando-as em moléculas menores até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , através da ação de enzimas oxidativas extracelulares, está sendo explorado como uma alternativa mais eficaz

quando comparado ao uso do lodo ativado, pois estas enzimas destacam-se pela capacidade de degradar uma ampla gama de xenobióticos (LLORET et al., 2010; GIMENES, 2011).

### 1.3 *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

O *Pycnoporus sanguineus* é um basidiomiceto, fungo de decomposição branca, popularmente conhecido por “orelha-de-pau”, facilmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, e de fácil cultivo, podendo desenvolver-se tanto em plantas vivas como mortas (GARCIA, 2006; BAUMER, 2009). O fungo é uma espécie eutérmica, o que explica sua ocorrência em todas as estações do ano. Este fungo sintetiza cerca de sete pigmentos, e é conhecido por sua intensa cor laranja avermelhada (BAUMER, 2009).

Dentre as enzimas extracelulares, o gênero *Pycnoporus* produz lacases como enzimas lignocelulolíticas predominante, em menor quantidade manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP). Tem sido relatado que a produção de lacase por membros deste gênero aumentou após indução das culturas de fungos com substratos fenólicos, tais como o ácido ferúlico, 2,5-xilidina, álcool veratrílico ou lignosulfonato (VALERIANO et al., 2009).

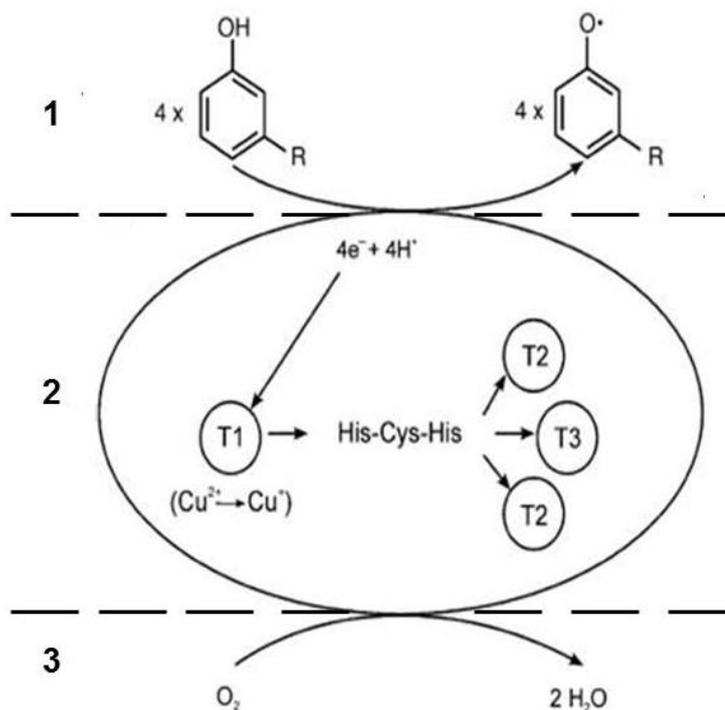
#### 1.3.1 Enzima lacase

As lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoreductase (EC 1.10.3.2)) pertencem ao grupo das polifenoloxidasas, que contêm átomos de cobre no centro catalítico, sendo também chamadas de multicobre oxidases (BALDRIN, 2006). Estas enzimas, além de serem produzidas por fungos basidiomicetos, também estão presentes em plantas e insetos (GARCIA; SANTIAGO; ULHOA, 2007).

As lacases são glicoproteínas monoméricas, diméricas ou tetraméricas, com quatro átomos de cobre (1, 2 ou 3) por monômero localizado no sítio catalítico. Tipo 1 (T1) de cobre é responsável pela oxidação do substrato e confere a cor azul para a enzima. As lacases utilizam oxigênio molecular para oxidar uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos e não aromáticos por meio de um mecanismo que envolve radicais. Estes radicais podem sofrer novas reações catalisadas por lacases e/ou reações não enzimáticas (MAJEAU; BRAR; TYAG, 2010).

O ciclo catalítico da lacase compreende: (1) redução do cobre T1 pelo substrato, (2) com transferência interna de elétrons do cobre T1 para os cobres T2 e T3, e (3) redução de oxigênio molecular para água através de sua interação com os cobres de T2 e T3 (Figura 4) (BALDRIN, 2006).

**Figura 4** - Ciclo catalítico da lacase.



Fonte: Baldrian (2006), modificada.

Para os fungos, em relação à fisiologia, as lacases estão envolvidas em processos de morfogênese, degradação de lignina, patogênese, detoxificação e formação de pigmentos (JUNIOR, 2010). Na degradação da lignina, as lacases atuam em conjunto com outras enzimas, ou na remoção de compostos tóxicos formados durante o processo de degradação (BALDRIAN, 2006).

Lacases não necessitam da adição ou síntese de cofatores, como no caso do peróxido de hidrogênio para a peroxidase. A enzima utiliza o oxigênio molecular disponível no ambiente, reduzindo os custos de produção (JUNIOR, 2010).

Como substratos sintéticos é possível citar o ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) e a seringaldazina (4-Hidroxi-3,5-Dimetoxibenzaldeidazina) (JUNIOR, 2010). Cerca de cem compostos diferentes foram identificados como substratos para as lacases fúngicas (BALDRIAN, 2006).

Na Tabela 2, estão alguns substratos caracterizados como poluentes ambientais e que foram oxidados pela lacase. Conforme a Tabela 2, trabalhos já utilizaram a lacase livre na remediação do EE2, contudo, o uso da enzima nesta forma torna o processo de biorremediação de alto custo, pois não há a possibilidade de reuso da enzima, fazendo-se necessário a imobilização para que seja economicamente viável a aplicação.

**Tabela 2** - Diferentes poluentes ambientais utilizados como substrato pela lacase.

	<b>Químicos</b>	<b>Referência</b>
<b>Agrotóxicos</b>	Organofosforado metil paration	Gao et al. (2014)
	Organofosforado acefato	Jardim (2010)
<b>Corantes</b>	Ácido azul 62, ácido amarelo 36 e ácido laranja 7	Trovaslet et al. (2007)
	Vermelho Congo	Sadighi e Faramarzi (2013)
	Vermelho reativo B-3BF	Wang et al. (2008)
	Remazol Brilliant Blue R, Reactive Black 5 e Bismark Brown R	Daâssi et al. (2014)
<b>Indústria papeleira</b>	Branqueamento da pasta kraft	Tavares (2006)
<b>Monofenóis</b>	Fenol e p-clorofenol	Liu et al. (2012)
	2,6-dimetoxifenol	Hublik e Schinner (2000)
	2,4-diclorofenol	Pan et al. (2014)
<b>Anti- inflamatórios</b>	Diclofenaco e naproxeno	Lloret et al. (2010)
<b>Desreguladores endócrinos</b>	Bisfenol A	Mita et al. (2009)
	Triclosan	Cabana, Ahamed e Leduc (2011) e Ramírez-Cavazos et al. (2014)
	Nonilfenol	Ramírez-Cavazos et al. (2014)
	Etinilestradiol	Junior (2010), Lloret et al. (2010), Lloret et al. (2011) e Lloret et al. (2012)

#### 1.4 IMOBILIZAÇÃO

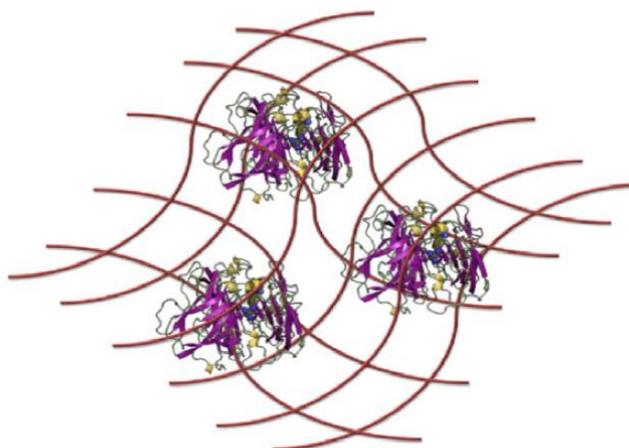
Há diferentes métodos de imobilização e sua escolha depende de aspectos como: (a) características físico-químicas do material a ser utilizado como suporte, (b) propriedades da enzima escolhida (atividade, estabilidade, resistência às condições de trabalho, temperatura, pH), (c) vantagens do método, como processo fácil de ser realizado, capacidade de retenção das enzimas e custo benefício (regeneração do suporte e o valor do produto final) (CAZES et al., 2014).

A imobilização permite uma estabilização bem sucedida de muitas enzimas multiméricas contra a dissociação em subunidades, aumentando a rigidez na estrutura, o que reduz a propensão para a inativação por meio de alterações conformacionais e inativação química. Além disso, a imobilização tem sido praticada para tornar possível o uso repetitivo

de um mesmo lote de enzimas, cessar uma reação rapidamente e obter produto relativamente puro (GUZIK et al., 2014).

Entre os diferentes métodos de imobilização, o aprisionamento (Figura 5) é um processo suave e gera relativamente poucos danos à estrutura nativa da enzima. O aprisionamento é definido como a retenção física de enzimas em uma matriz sólida porosa, como em biopolímeros (poliacrilamida, colágeno, alginato, gelatina ou quitosana). A enzima é adicionada em primeiro lugar na solução de monômeros, e um processo de polimerização subsequente mantém as enzimas presas, impedindo o contato direto com o meio externo (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

**Figura 5** - Imobilização de enzima por aprisionamento em poros de matriz polimérica.



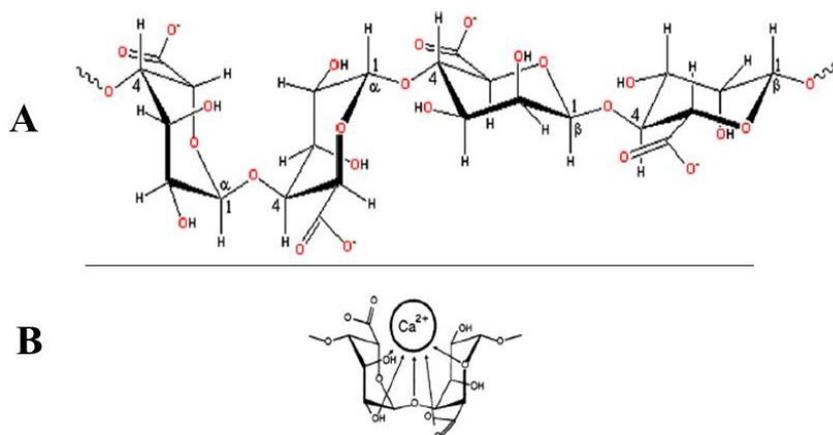
Fonte: Fernández-Fernández, Sanromán e Moldes (2013).

#### 1.4.1 Biopolímeros

O alginato de sódio, também conhecido como sal de sódio do ácido algínico, é um copolímero natural linear de ácido L-gulurônico e ácido D-manurônico encontrado em algas castanhas, que pode formar uma estrutura reticulada em formato de esferas, denominadas de *beads*, quando em contato com  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 6) (MAHMOOD; SIDDIQUE, 2010; SUN et al., 2013),  $\text{Fe}^{3+}$  (SINGH et al., 2014) e  $\text{Cu}^{2+}$  (BRANDI et al., 2006; PAN et al., 2014), dentre outros.

Os alginatos são copolímeros não aleatórios, mas de acordo com a fonte de algas, consiste de blocos de resíduos semelhantes e rigorosamente alternadas, cada um dos quais com diferentes preferências de conformação e de comportamento (MAHMOOD; SIDDIQUE, 2010).

**Figura 6 - A.** Unidade estrutural do alginato. **B.** Estrutura reticulada entre  $\text{Ca}^{2+}$  e alginato.



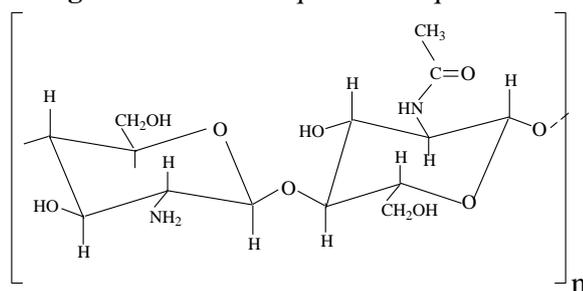
Fonte: Mahmood e Siddique (2010) e Liz (2013).

*Beads* de alginato de cálcio oferecem muitas vantagens devido a sua simplicidade, a natureza eco-amigável, custo-efetividade, biocompatibilidade e resistência ao ataque microbiano. O método por aprisionamento em *beads* protege as enzimas contra fatores ambientais tais como pH, temperatura, solventes orgânicos e agentes quelantes (RAHIM et al., 2013; GUZIK et al., 2014).

Enquanto isso, as desvantagens são a limitação de permeabilidade do substrato, baixa carga enzimática aprisionada, grande tamanho dos poros, consequentemente, fuga elevada de enzima e baixa resistência mecânica (RAHIM et al., 2013; DAÂSSI et al., 2014). Porém, as duas últimas desvantagens podem ser solucionadas, aumentando-se a concentração do biopolímero alginato e/ou adicionando-se polímeros catiônicos.

Outro biopolímero de interesse, a quitosana (Figura 7) é um polissacarídeo catiônico obtido a partir de desacetilação parcial da quitina por processos de hidrólise básica. É composta pelas unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose, as quais são unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  e que podem formar complexos polieletrólitos com polímeros polianiónicos, tais como alginato (JANEGITZ et al., 2007; WANG et al., 2014).

**Figura 7 -** Estrutura química da quitosana.



Fonte: Autora.

A quitosana é conhecida como um material de suporte ideal para imobilização de enzimas. A utilização deste biopolímero é favorecida pelo teor elevado de grupo amino, o qual promove a ligação com a enzima, pela solubilidade em soluções aquosas suaves ácidas, mas insolubilidade perto e acima do seu valor de pKa de 6,3, pela resistência mecânica e resistência à degradação química. Outras vantagens são: produção de baixo custo, ecologicamente interessante, por ser biodegradável e biocompatível, e apresenta propriedades antibacterianas (JANEGITZ et al., 2007; CABANA; AHAMED; LEDUC, 2011).

A quitosana pode ser utilizada na formação da *bead* de alginato de cálcio para aumentar a estabilidade dos poros, pois a quitosana pode interagir com alginato via interações eletrostáticas, formando uma membrana de complexo composta pelos dois polímeros. A reação direta entre eles pode formar *beads* com propriedades mecânicas melhoradas (LU; ZHAO; WANG, 2007; WANG et al., 2014).

### **1.5 REMEDIAÇÃO ELETROQUÍMICA**

A descontaminação de águas, por meio de processos eletroquímicos diretos ou combinados, está sendo considerada como uma alternativa atraente, devido à melhora significativa dos materiais que compõem os eletrodos (SIRÉS; BRILLAS, 2012).

As tecnologias eletroquímicas apresentam como vantagens sua compatibilidade ambiental, versatilidade, alta eficiência energética, manuseamento fácil com o uso de equipamento simples e segurança porque operam em condições brandas (ANGLADA; URTIAGA; ORTIZ, 2009; SIRÉS; BRILLAS, 2012).

Os processos de remediação eletroquímica em ambiente aquoso podem ser divididos em:

a) Físico: a remoção ocorre sem alteração da estrutura química. Tecnologias que combinam processos de pressão impulsão sobre membrana (micro, nano, ultrafiltração e osmose reversa) com processos eletroquímicos são os exemplos mais comuns de remoção física (SIRÉS; BRILLAS, 2012).

b) Físico-químico: a remoção necessita de um procedimento químico e em seguida um físico, ou vice-versa. A eletrocoagulação é um exemplo de processo físico-químico, que envolve a geração de coagulantes por dissolução elétrica de íons alumínio ou ferro, a partir de eletrodos de sacrifício constituintes destes materiais. A dissolução de íons metálicos, em pH adequado, formam hidróxidos metálicos que desestabilizam, adsorvem e agregam contaminantes em suspensão ou precipitado (CHEN, 2004; OUAISSA et al., 2014).

A geração de íons metálicos ocorre no ânodo, equação (1), formando os complexos metálicos em meio ácido, equação (2), ou alcalino, equação (3).



No cátodo ocorre a liberação de gás hidrogênio, em meio ácido, equação (4), ou alcalino, equação (5).

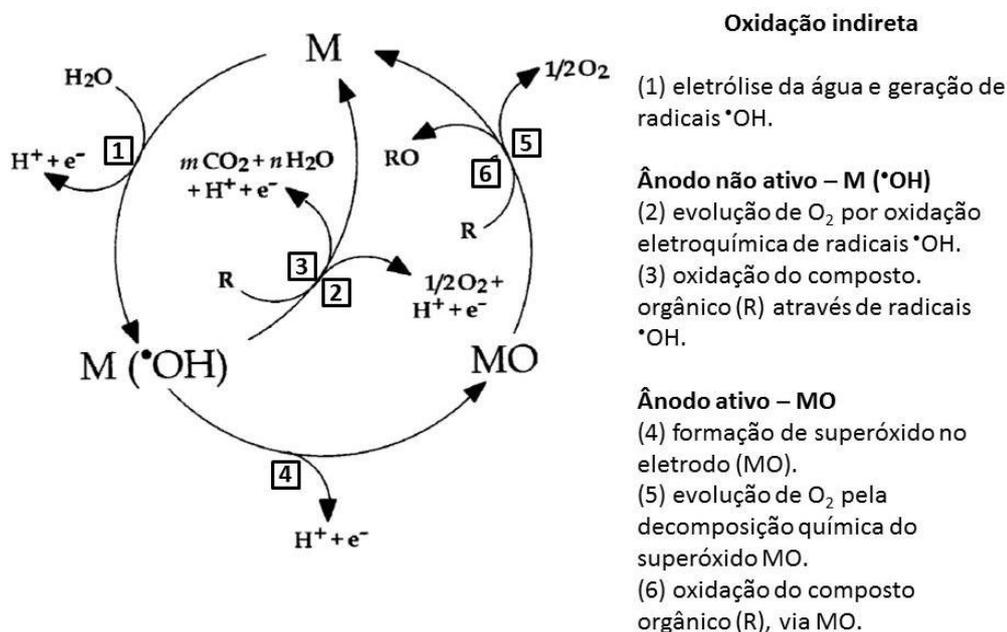


c) Químico: a remoção ocorre com modificação na estrutura e função química do composto. Na técnica eletroquímica mais popular para remediação de águas, a oxidação eletroquímica ou eletro-oxidação, os compostos orgânicos podem ser removidos por eletrólise direta, quando os elétrons são transferidos diretamente para a superfície do ânodo, ou eletrólise indireta, quando espécies reativas de oxigênio atuam na transferência de elétrons entre o composto orgânico e a superfície do eletrodo. Na eletrólise indireta há duas abordagens: adsorção física do radical  $\bullet\text{OH}$ , promovendo combustão eletroquímica, em que os poluentes são mineralizados, ou formação de "oxigênio ativo" quimicamente adsorvido, com conversão eletroquímica dos poluentes em compostos biodegradáveis (Figura 8) (SIRÉS; BRILLAS, 2012).

Conforme a Figura 8, o ânodo (M) oxida a água, levando à formação de radical hidroxila adsorvido fisicamente na superfície ( $\text{M}(\bullet\text{OH})$ ), denominado, então, de ânodo "não ativo". O  $\bullet\text{OH}$  pode então reagir com contaminantes orgânicos (R), gerando um radical orgânico ( $\text{R}\bullet$ ), que na presença de oxigênio ou hidroxilas geram produtos oxidados. Para ânodo "ativo" a interação do radical  $\bullet\text{OH}$  é tão forte com a superfície, que a adsorção química pode formar superóxido MO. Então, o ânodo MO promove a oxidação do poluente (MARSELLI et al., 2003; MURUGANANTHAN et al., 2007; SIRÉS; BRILLAS, 2012; BARRIOS et al., 2015).

Os materiais que constituem os ânodos mais comuns, utilizados em processos que envolvem eletro-oxidação, são os de Pt,  $\text{IrO}_2$ ,  $\text{RuO}_2$ ,  $\text{PbO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$  e diamante dopado com boro (SIRÉS; BRILLAS, 2012). Os constituídos de diamante dopado com boro (MURUGANANTHAN et al., 2007; FRONTISTIS et al., 2011), *beads* de carbono vítreo em reator (CONG; IWAYA; SAKAKIBARA, 2014) e titânio revestidos por  $\text{SnO}_2$  (FENG et al., 2010) são exemplos de ânodos já utilizados na remediação do EE2 e E2.

**Figura 8** - Esquema de oxidação indireta que ocorre no ânodo para remediação de compostos orgânicos.



Fonte: Marselli et al. (2003), modificado.

d) Biológico: utiliza campo elétrico para viabilizar o transporte de micropoluentes aos micro-organismos; ou atuam separadamente, realizando primeiro a remoção biológica e em seguida eletroquímica, ou vice-versa. Sendo assim, a mineralização completa de um poluente pode ser alcançada (BELKHEIRI et al., 2011).

## 1.6 REMEDIAÇÃO BIO-ELETROQUÍMICA

Para realização de uma remediação biológica e eletroquímica, os dois tratamentos podem ser realizados simultaneamente, como no trabalho de Tiehm et al. (2010), para biodegradação de tolueno em sistema aquífero, ou sequencial, dependendo do composto alvo.

Para a remediação de compostos antimicrobianos a eletro-oxidação foi realizada primeiro e posteriormente o tratamento em sistemas de cultura com lodo ativado, devido à inviabilidade de o processo ocorrer simultaneamente, já que esta classe de contaminantes, em geral, reduz o metabolismo e efetividade do processo bioquímico (YAHIAOUI et al., 2013; HAN et al., 2008). Outros compostos de elevada toxicidade também são remediados de forma sequencial, como o pesticida organofosforado, fosmete, em que primeiramente foi realizado a eletro-oxidação e em seguida tratamento biológico com lodo ativado (SALLES et al., 2010).

Na remediação de efluentes têxteis, foi utilizada a oxidação eletroquímica e em seguida lodo ativado de estação de tratamento para remediação biológica (LIN; PENG, 1996). Porém outro trabalho, também para remediação de efluentes têxteis, foi utilizado um biofilme constituído pelos micro-organismos *Aeromonas salmonicida* e *Pseudomonas vesicularis*, e em seguida a oxidação eletroquímica (KIM et al., 2002).

A escolha do processo biológico a ser empregado dependerá principalmente do composto alvo, podendo ser utilizado micro-organismos tolerante ao mesmo, sendo assim passíveis de degradação; o próprio lodo ativado de estações de tratamento, que sem especificidade degrada diversos contaminantes; ou por enzimas, que torna o processo mais ágil.

Para a remediação eletroquímica os eletrodos podem ser de diversos materiais. Assim, a eletrocoagulação, é perfeitamente compatível com eletrodos de metais não nobres e de menor custo como ferro e alumínio; já processos visando mineralização, como a eletro-oxidação, exigem uso de metais mais inertes; enquanto processos adsortivos de compostos orgânicos se adequam a eletrodos de carbono porosos.

De acordo com os dados apresentados, o hormônio EE2 é um contaminante de grande relevância ambiental, devido aos efeitos deletérios causados nos seres vivos expostos aos efluentes na sua presença. A enzima lacase já é comprovadamente capaz de oxidar este hormônio, fazendo com que ele perca a atividade estrogênica. Porém, para aplicação de enzimas a forma livre torna-se de alto custo, pois não é possível o reaproveitamento, o que se justifica, então, a imobilização.

Completa mineralização pode não ser atingida apenas com o tratamento biológico, sendo assim, neste trabalho é proposto o uso da tecnologia eletroquímica objetivando uma degradação mais efetiva do contaminante, realizando um processo inovador de remediação bio-eletroquímica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência de remoção do hormônio sexual sintético EE2 por processos biológico ou/e eletroquímico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e determinar as condições ótimas para atividade da enzima lacase do fungo *P. sanguineus*;
- Otimizar o processo de imobilização da enzima lacase em *beads* de quitosana-alginato-Ca/Cu;
- Determinar as condições ótimas para remediar o EE2 com as *beads* contendo a enzima imobilizada;
- Utilizar diferentes eletrodos para remediação eletroquímica, eletrocoagulação ou eletro-oxidação, do EE2;
- Determinar a concentração dos metais, constituintes dos eletrodos, liberados durante a remediação eletroquímica;
- Realizar sequencialmente a remediação biológica com a lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca e remediação eletroquímica com eletrodo de titânio (ânodo) e aço inoxidável (cátodo);
- Determinar a porcentagem de remediação do EE2 de todos os tratamentos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 TRATAMENTO BIOLÓGICO

##### 3.1.1 Origem e manutenção do fungo

O fungo *P. sanguineus* CCT-4518 utilizado neste trabalho, foi adquirido da Fundação André Tosello – Campinas – São Paulo, e faz parte da coleção de micro-organismos do Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental (LEnziBio) da Faculdade de Farmácia - UFG.

Para manutenção do micro-organismo foram realizados cultivos periódicos em placas de Petri contendo meio sólido batata, dextrose e ágar (BDA) (HiMedia, Índia). Cada placa foi inoculada com um disco de 5 mm de diâmetro do fungo e incubada em Estufa BOD (TE-391, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 28°C durante 7 dias, conforme estabelecido por Garcia (2006). Após o período, os fungos foram armazenados em geladeira a 4°C.

##### 3.1.2 Produção e determinação enzimática

Para obtenção do extrato bruto contendo a enzima lacase, foram preparados erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo: 12,8 g.L<sup>-1</sup> de extrato de malte (HiMedia), 0,005 g.L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> (Cromoline, Diadema, SP, Brasil) e 50 mg.L<sup>-1</sup> de 2,5-xilidina (Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, Estados Unidos) (VALERIANO et al., 2009). Em cada erlenmeyer foram inoculados 5 discos de 5 mm de diâmetro retirados das bordas ativas de uma cultura com o *P. sanguineus* em meio BDA, que permaneceram sob agitação em shaker (refrigeradora com agitação, TE-421, Tecnal) a 140 rpm, 28°C e na ausência de luz por até 4 dias. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas para determinação da produção enzimática.

A metodologia utilizada para determinação da atividade da lacase seguiu a descrita por Bourbonnais e Paice (1990). Os componentes da mistura de reação foram: 10 µL de extrato bruto contendo lacase, 890 µL do tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 4) e 100 µL de ABTS 50 mmol.L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich™). A reação iniciou-se pela adição do ABTS ( $\epsilon_{420\text{ nm}} = 36000\text{ mmol.L}^{-1}\text{.cm}^{-1}$ ), sendo a oxidação do substrato determinada a 420 nm em espectrofotômetro (SP-2000 UV Meter, Spectrum, Shanghai, China) após 5 minutos de reação em temperatura ambiente (25 - 30°C). O branco constituiu-se de 900 µL do tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> e 100 µL de ABTS 50 mmol.L<sup>-1</sup>. Os ensaios para determinação da atividade enzimática foram realizados em triplicata.

Para determinação da atividade enzimática foi utilizada a equação (6) descrita por Leonowicz & Grzywnowicz (1981), com modificação.

$$\text{Atividade enzimática} = (10^6 \times E) / (\epsilon \times R \times t) \quad (6)$$

Em que: E = Absorbância no comprimento de onda específico;  $\epsilon$  = Coeficiente de extinção molar para cada substrato ( $\text{mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ); R = Quantidade de extrato enzimático (mL); t = Tempo de reação (min).

Uma unidade U é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de substrato por minuto. O resultado é expresso em  $\text{U.mL}^{-1}$ .

Foi realizado o ensaio com catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich™) para eliminar o peróxido de hidrogênio do meio, retirando assim o efeito de peroxidases na oxidação do ABTS. Os ensaios foram baseados em Mayer e Staples (2002), em que o extrato bruto enzimático (10  $\mu\text{L}$ ) foi incubado com 50  $\mu\text{L}$  de catalase (5 U) em 840  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 4, por 30 minutos. A atividade enzimática foi determinada com o substrato ABTS. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.1.3 Eletroforese

Os reagentes utilizados para eletroforese foram: sodium dodecyl sulfate – SDS (>98,5%, Sigma-Aldrich™); ammonium persulfate – APS (>98%, Sigma-Aldrich™); N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine – TEMED (~99%, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); acrilamida (99%, Sigma-Aldrich™); trizma® base – tris-hydroxymethyl-amminomethane (>99%, Fluka Analytical); glicina (>99%, Sigma Aldrich™); azul de bromofenol (Sigma-Aldrich™); seringaldazina (>99%, Sigma Aldrich™).

A eletroforese ocorreu em gel de poli(acrilamida) a 12% conforme Gonçalves e Steiner (1996) com modificações. A amostra a ser analisada possuía 2  $\mu\text{L}$  de extrato bruto enzimático diluída em 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (Tris-HCl/SDS 4x – 7 mL; glicerol – 3 mL; SDS – 1 g;  $\beta$ -mercaptoetanol – 0,6 mL; azul de bromofenol – 1,2 mg; água MilliQ - qsp 10 mL), aplicada no gel concentrador (água MilliQ – 1,8 mL; Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 – 0,75 mL; acrilamida 30% - 0,4 mL; SDS 10% - 0,03 mL; APS 10% - 0,015 mL; TEMED - 0,003 mL).

A corrida em sistema de eletroforese ocorreu com voltagem inicial de 90 V para gel concentrador e de 120 V para o gel de corrida (água MilliQ – 0,95 mL; Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 - 2,5 mL; acrilamida 30% - 2,4 mL; SDS 10% - 0,1 mL; APS 10% - 0,045 mL; TEMED - 0,005 mL).

Para renaturar a enzima, incubou-se o gel em tampão acetato de sódio 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  nos pHs 4, 5 e 6, por 15 minutos em cada tampão. O gel foi corado com solução do substrato ABTS ou seringaldazina 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  em tampão acetato 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 4,5.

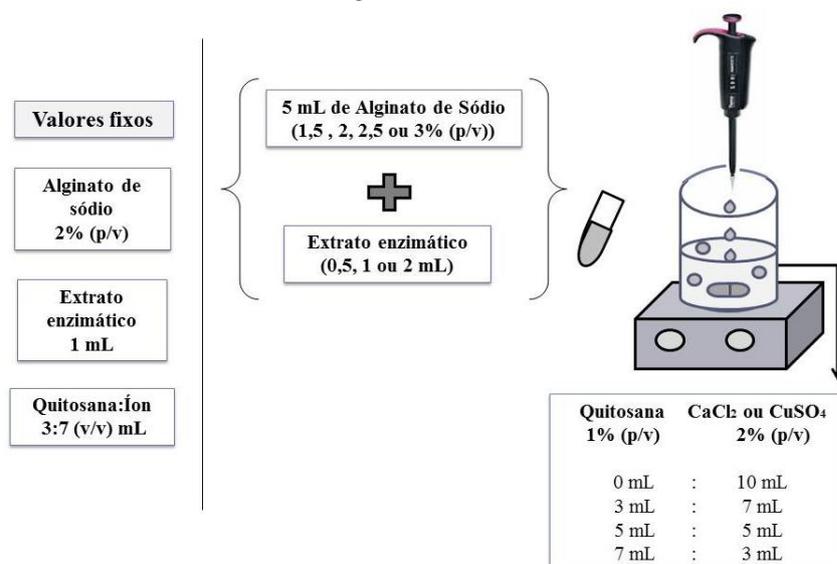
### 3.1.4 Imobilização

A fim de se obter as condições ótimas para a imobilização do extrato enzimático em alginato foram testadas diferentes concentrações de cada constituinte. Quando um constituinte foi testado em diferentes concentrações, os demais foram mantidos fixos, sendo alginato de sódio em 2% (p/v), extrato enzimático em 1 mL e proporção quitosana e íon em 3:7 (v/v), respectivamente. As esferas de alginato, denominadas de *beads*, foram formadas na presença de íons cobre e cálcio, a partir de metodologia proposta por Wang et al. (2014), com modificações.

Soluções de alginato de sódio (Vetec) foram preparadas em água destilada em diferentes concentrações (1,5, 2, 2,5 e 3% p/v). O extrato enzimático foi misturado, em tubos de ensaio, a 5 mL de uma solução de alginato de sódio, nas proporções 0,5:5, 1:5, 2:5 mL (v/v), respectivamente, e agitado em vórtex (Figura 9).

Em seguida, a mistura enzima-alginato foi gotejada, com auxílio de uma pipeta automática de 1 mL, em uma solução de quitosana (Sigma-Aldrich™) (1% p/v, preparada em ácido acético 0,1 mol.L<sup>-1</sup>) e sulfato de cobre (2% p/v) ou cloreto de cálcio (Vetec) (2% p/v) nas proporções 0:10, 3:7, 5:5, 7:3 mL (v/v), respectivamente, em béqueres sob agitação magnética (Figura 9). Ao final, os béqueres que continham a enzima recém-imobilizada, foram levados para shaker em 100 rpm por 1 hora. Cada béquer continha um lote de enzima imobilizada com 3,868 g ( $\pm$  0,207). Para cada formulação foram preparados três lotes distintos de enzima imobilizada.

**Figura 9** - Esquema representando o processo de imobilização em matriz polimérica (quitosana-alginato-Cu/Ca).



Fonte: Autora.

A atividade para a enzima imobilizada foi determinada conforme descrito na seção 3.1.2, apenas com a diferença no volume da reação enzimática, pois esta possuiu 5 vezes mais reagente. Os componentes da mistura de reação foram: um lote de enzimas imobilizadas, 4,5 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> (pH 4) e 0,5 mL de ABTS 50 mmol.L<sup>-1</sup>.

O cálculo da atividade da enzima imobilizada é um valor estimado. A quantidade de caldo enzimático (R) da equação (6) correspondeu a um valor utilizado para o volume total de reação de 5 mL, porém para a enzima livre o volume total foi de 1 mL. Para possibilitar a comparação entre a atividade da enzima livre e a imobilizada, o volume de enzima imobilizada foi dividido por 5, por exemplo, se para um lote de enzimas imobilizadas foram utilizados 0,5 mL do extrato bruto enzimático, o R da fórmula correspondeu a 0,1 mL, se foi 1 mL, o R correspondeu a 0,2 mL, mesmo sabendo que ocorreram perdas de enzimas durante o processo de imobilização.

Para avaliar o rendimento da imobilização foi utilizada a equação (7).

$$\text{Rendimento} = (\text{atividade da enzima imobilizada} / \text{atividade da enzima livre}) \times 100 \quad (7).$$

### 3.1.5 Condições ótimas para atividade da enzima livre e imobilizada

O pH ótimo para enzima livre e imobilizada foram determinados por incubação das amostras em tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pHs 2, 3, 4 e 5.

A temperatura ótima foi determinada no intervalo de 20-70°C, com intervalos de 10°C. As enzimas foram incubadas em tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 4, durante 5 minutos para cada temperatura. Após este período, o substrato ABTS foi adicionado, e a reação ocorreu por mais 5 minutos na temperatura correspondente.

Foram realizados 6 ciclos para reutilização do mesmo lote de *beads* com substrato ABTS. Cada ciclo teve duração de 5 minutos. As enzimas imobilizadas foram removidas da solução e lavadas com água destilada, pelo menos 5 vezes, para um próximo ciclo.

Também foi realizado o ensaio de armazenamento para enzima livre e imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca. As enzimas foram mantidas a 4°C em refrigerador, por até 56 dias. Cada lote de *beads* foi armazenado em água destilada. A atividade enzimática foi determinada todos os dias durante uma semana, depois de 7 em 7 dias, até o 28º dia, e por fim 28 dias depois, totalizando 56 dias.

As atividades enzimáticas para todos os ensaios foram determinadas de acordo com a seção 3.1.2 para enzima livre e 3.1.4 para enzima imobilizada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens da superfície das *beads* foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura, Jeol, JSM – 6610, com um feixe de elétron de 7 kV e ampliação de 65x, 1000x e 10000x, no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), departamento de Física da Universidade Federal de Goiás. Para realização das imagens, as *beads* foram secas naturalmente em dessecador por até 48 horas. As amostras foram metalizadas com ouro.

### 3.1.7 Remediação do hormônio EE2

A solução do hormônio sexual sintético EE2 (98,90%, Zhejiang Xianju Pharmaceutical Co., Ltd.) foi preparada na concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> com 5% de álcool etílico P.A, para dissolução do hormônio.

Para a remediação, foram utilizados erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de solução, sendo 10 mL de solução de EE2 (10 mg.L<sup>-1</sup>) e 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 4, 5 ou apenas água destilada (aproximadamente pH 7), e as enzimas livres ou imobilizadas, com atividade enzimática em cerca de 100 U.mL<sup>-1</sup> (referente ao substrato ABTS).

Os tratamentos foram realizados em condições semelhante à descrita por Lloret et al. (2010), nos tempos de 4, 8 e 24 horas, com agitação em shaker (100 rpm) na ausência de luz, temperatura de 28°C ( $\pm 2$ ), em triplicata e dois ensaios independentes. As reações foram interrompidas pela adição de 100  $\mu$ L de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e as amostras foram congeladas para análise posterior.

Na remediação do EE2 foram testados diferentes pHs para a enzima livre, o suporte de quitosana-alginato-Ca e a enzima imobilizada em quitosana-alginato-Ca, nos tampões acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pHs 4, 5 e apenas água destilada, em 24 horas. Após a remediação, as *beads* com enzima imobilizada foram recolhidas, e determinada a atividade enzimática com o substrato ABTS, conforme a seção 3.1.4, para avaliar a estabilidade da enzima.

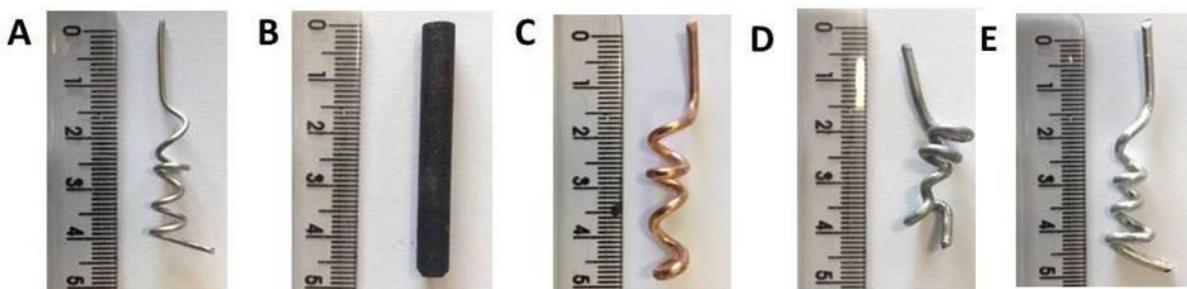
Também foi realizado o teste de reuso de um mesmo lote de *beads*, com 7 ciclos de remediação, em triplicata. Os ciclos duraram 24 horas cada, e foram realizados em tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5 ou em água destilada. Após a retirada das *beads*, as reações foram interrompidas pela adição de 100  $\mu$ L de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup>. Após cada ciclo, as *beads* foram peneiradas e lavadas por 3 vezes com água destilada, para dar continuidade a um próximo ciclo.

## 3.2 TRATAMENTO ELETROQUÍMICO

### 3.2.1 Eletrodos

Para a eletro-oxidação foram utilizados como ânodos os eletrodos de titânio, grafite e cobre (Figura 10: A, B e C), e cátodo de aço inoxidável (Figura 10 D). Para a realização da eletrocoagulação foram utilizados eletrodos de alumínio (Figura 10 E), tanto para o cátodo como para o ânodo.

**Figura 10** - Eletrodos. (A) titânio, (B) grafite, (C) cobre, (D) aço inoxidável, (E) alumínio.



Fonte: Autora.

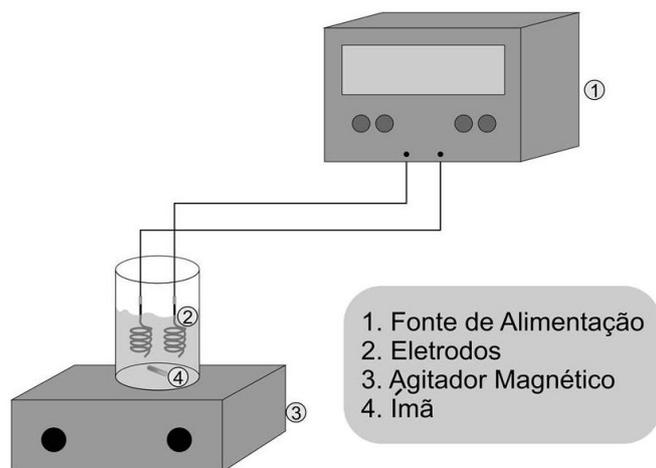
Os eletrodos metálicos possuíam 10 cm de comprimento e 0,3 cm de diâmetro quando em formato linear, aproximadamente 4,5 cm em formato espiral, e área total em torno de 9,56 cm<sup>2</sup>. Já o eletrodo de grafite possuía 4,5 cm de comprimento e 0,7 cm de diâmetro, em formato cilíndrico, e área externa total em torno de 10,66 cm<sup>2</sup>.

### 3.2.2 Sistema eletroquímico de tratamento

Os experimentos foram realizados em um béquer contendo um volume total de solução de 20 mL, sendo 10 mL de uma solução de EE2 10 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 5 ou tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7.

Os eletrodos ficaram a 4 cm de distância um do outro e foram aplicadas tensões de 2,5, 5 ou 7,5 V com uma Fonte de Alimentação Regulável DC (HF-30035, Hikari, São Paulo, SP, Brasil). Os tratamentos foram realizados, nos tempos de 10, 20 e 40 minutos, com agitação magnética, em triplicata e dois ensaios independentes, condições baseadas em trabalhos anteriores (LEI et al., 2007; BARRIOS et al., 2015). As amostras foram congeladas para análise posterior. A Figura 11 apresenta o esquema de tratamento eletroquímico.

**Figura 11** - Esquema utilizado para tratamento eletroquímico.



Fonte: Autora.

### 3.2.3 Análise em ICP-OES

As análises de metais liberados pelos eletrodos durante eletrólise foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ou *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry* (ICP-OES) em um espectrômetro da PerkinElmer - modelo 7300DV com gerador de vapor de hidreto, na Aqualit S/A.

### 3.3 TRATAMENTO BIO-ELETROQUÍMICO

Também foi realizado a remediação sequencial do hormônio EE2, sendo primeiramente realizado o tratamento biológico e em seguida o eletroquímico.

Para o biológico, o tratamento foi realizado em 8 e 24 horas, com hormônio diluído apenas em água destilada. A temperatura e agitação foram controladas conforme seção 3.1.7. Após o tempo de tratamento, 10 mL do tratado biológico foi diluído em 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7, e remediado eletroquimicamente com os eletrodos de titânio e aço a 5 V, por 20 minutos e agitação magnética. Ao término dos tratamentos as amostras foram armazenadas em congelador, para análise posterior.

### 3.4 ANÁLISES EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As análises em CLAE foram realizadas no Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas - CPQBA da Universidade Estadual de Campinas, em Paulínia – SP, em que a metodologia para detecção do EE2 já estava validada. As soluções de EE2 antes e após os tratamentos foram analisadas por sistema cromatográfico DAD Alliance Waters, composto

por bomba Waters 2695, detector Waters 2996 e software Empower, Waters. As amostras foram filtradas em filtro millex HV (PVDF) 0,45  $\mu\text{M}$  (Millex<sup>®</sup>).

Seguindo a metodologia de Santos (2012), em relação às condições cromatográficas foram utilizados: coluna Prodigy ODS(3) (150 x 4,6 mm); comprimento de onda em 280 nm; fase móvel de acetonitrila grau HPLC (Sharlau) e água purificada Mili-Q (1:1); fluxo de 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; temperatura em 30°C; volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ . O limite de detecção (LD) foi de 0,39  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e o limite de quantificação (LQ) 1,31  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (SANTOS, 2012).

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONSTRUÇÃO DE GRÁFICOS**

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o programa BioEstat<sup>®</sup>, versão 5.3. As diferenças estatísticas entre grupos foram determinadas por ANOVA e Teste de Tukey, sendo considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ . Para a construção dos gráficos foi utilizado o programa Origin<sup>®</sup>, versão 6.0.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

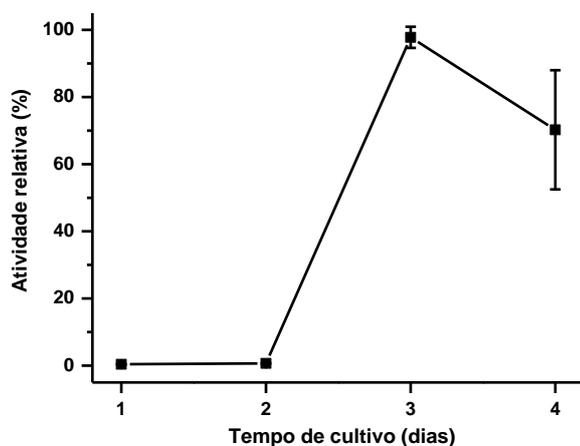
A apresentação dos resultados baseia-se nos objetivos propostos e na ordem de realização dos experimentos, conforme exposto na metodologia.

### 4.1 TRATAMENTO BIOLÓGICO

#### 4.1.1 Produção enzimática

Para obtenção do extrato bruto contendo a enzima lacase, o fungo *P. sanguineus* foi cultivado em meio líquido por até quatro dias. A atividade enzimática, a cada 24 horas, pode ser observada no Gráfico 1. O pico de produção enzimática foi observado no terceiro dia de cultivo, assim como obtido por Garcia, Santiago e Ulhoa (2007) e Garcia et al. (2015). No quarto dia foi observada uma queda na atividade da enzima, o que indica ação de enzimas proteolíticas, liberadas no meio de cultivo devido à lise das hifas (BETTIN et al., 2011). Então, o extrato enzimático para os demais ensaios foi obtido no terceiro dia de cultivo.

**Gráfico 1** - Produção da enzima lacase pelo *P. sanguineus* de acordo com o tempo de cultivo.



Fonte: Autora.

A fim de excluir a oxidação do substrato por peroxidases foram realizados ensaios de determinação da atividade com extrato bruto contendo lacase na presença da enzima catalase. Observou-se que não há diferença estatística significativa com ou sem a enzima catalase ( $p = 0,1327$ ), sendo obtido atividade enzimática de  $319,86 \text{ U.mL}^{-1} (\pm 25,68)$  e  $336,30 \text{ U.mL}^{-1} (\pm 19,90)$ , respectivamente, para o ABTS. Logo, o substrato não foi oxidado por peroxidases.

Também foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida, para visualizar bandas de atividade da enzima lacase *in situ*, presente no extrato bruto. Na Figura 12 é possível observar uma banda para a oxidação de cada substrato, o ABTS e a seringaldazina.

**Figura 12** - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) para o extrato bruto enzimático do *P. sanguineus*. Coloração da enzima obtida com substrato ABTS (verde) e seringaldazina (rosa).



Fonte: Autora.

#### 4.1.2 Imobilização e condições ótimas de atividade

Alguns parâmetros foram testados a fim de se obter melhores resultados de atividade enzimática ao realizar a imobilização. A Figura 13 apresenta as formulações de *beads* de quitosana-alginato-Cu/Ca, com diâmetro de aproximadamente 4 mm.

**Figura 13** - Formulações das *beads* de quitosana-alginato-Cu/Ca. Diâmetro de aproximadamente 4 mm.



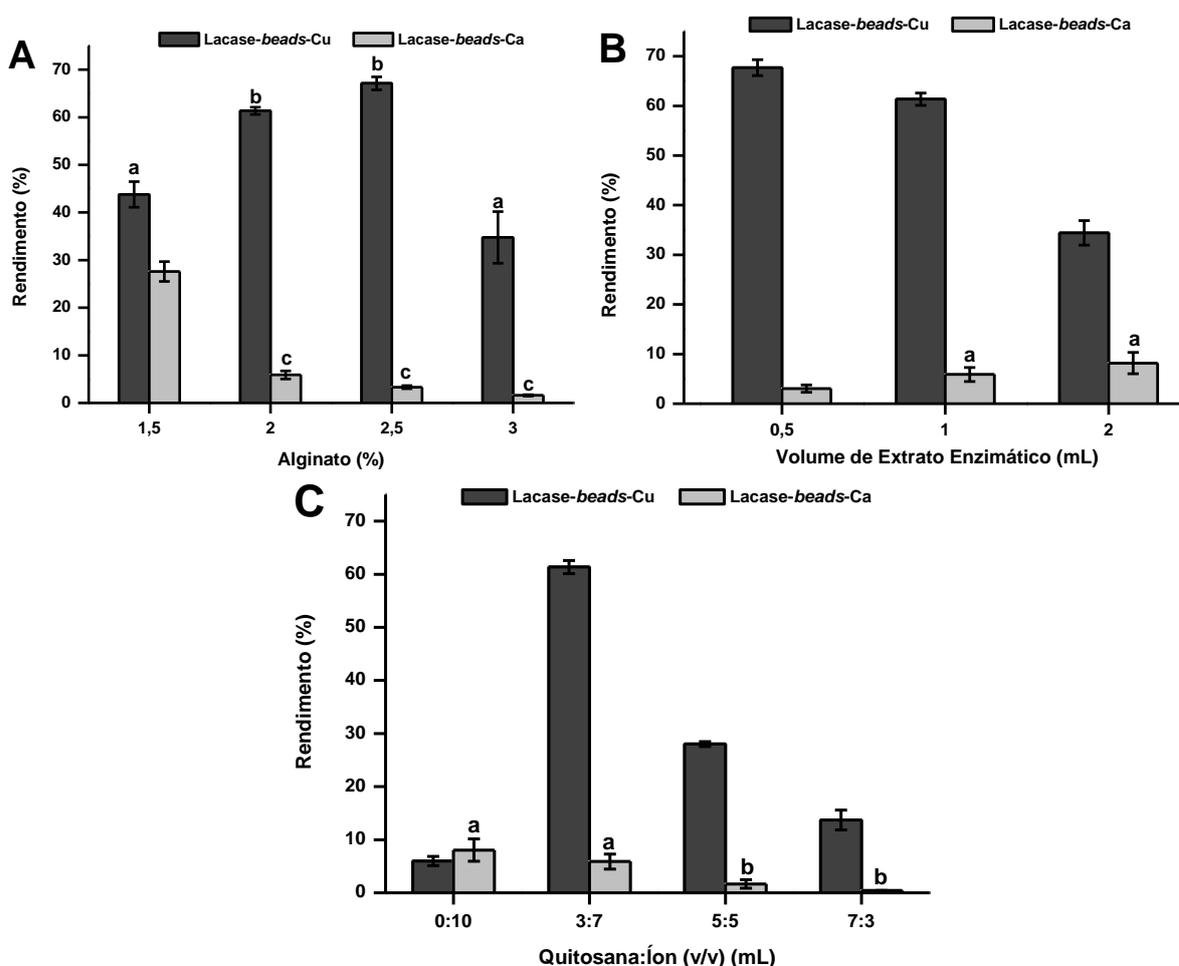
Fonte: Autora.

O rendimento obtido nas diferentes formulações estão presentes no Gráfico 2. Para cada concentração testada, o melhor resultado foi escolhido quando obtido a maior média de rendimento ou quando estatisticamente semelhante, a escolha foi pela menor concentração, por gerar menores custos com reagentes.

A porosidade das formulações poliméricas é o principal indicador para alcançar as condições ideais (LU; ZHAO; WANG, 2007). De acordo com o Gráfico 2-A, para a formulação com cobre, os melhores rendimentos foram observados em concentrações de

alginato em 2 e 2,5%, assim como em outros trabalhos (DAÂSSI et al., 2014; PAN et al., 2014). Já para a formulação com cálcio o melhor rendimento foi em 1,5%, também de acordo com a literatura (CHERIYAN; ABRAHAM, 2010; ALEXA et al., 2011).

**Gráfico 2** - Porcentagens de rendimento na oxidação do substrato ABTS para as duas formulações de *beads* com a lacase imobilizada.



Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey, quando comparado as diferentes concentrações de cada constituinte em uma mesma formulação. Fonte: Autora.

Em relação ao volume de extrato bruto contendo lacase, a formulação com cobre apresentou melhor rendimento com 0,5 mL. Para a formulação com cálcio, não houve diferença estatística significativa entre os volumes de 1 e 2 mL, mesmo dobrando o volume de extrato enzimático (Gráfico 2-B). Provavelmente não foi obtido melhora no rendimento, pois um volume superior a 1 mL diluiu o alginato (1,5%) que estava em uma baixa concentração, assim os poros da malha polimérica estavam grandes o suficiente para permitir uma fuga elevada de enzimas durante o processo de imobilização.

A maioria dos trabalhos científicos, sobre imobilização de lacase, utiliza a enzima purificada, obtida principalmente de *Trametes versicolor*, e comercializada pela Sigma-Aldrich™ ou outros fornecedores específicos de cada país (CHERIYAN; ABRAHAM, 2010; CABANA; AHAMED; LEDUC, 2011; LIU et al. 2012; SPINELLI et al., 2013; XU et al., 2013; KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014; PAN et al., 2014). A enzima comercial vendida no Brasil pela Sigma-Aldrich™ possui atividade de  $\geq 10 \text{ U.mg}^{-1}$  (comercialização interrompida no primeiro semestre de 2016) ou  $\geq 0,5 \text{ U.mg}^{-1}$ . O produto que apresenta menor atividade é vendido por 708 reais referente a 1 grama e 5062 reais referente a 10 g (dados obtidos em março de 2016 pelo site da Sigma-Aldrich™ Brasil).

Também há trabalhos que obtêm a enzima pelo cultivo de fungos de decomposição branca, e realizam processos de purificação, em que a quantidade de enzima utilizada é expressa em  $\text{mg.L}^{-1}$  e não por volume como neste trabalho (HUBLIK; SCHINNER, 2000; BRANDI et al., 2006; SALIS et al., 2009; SADIGHI; FARAMARZI 2013; DAÂSSI et al., 2014).

Logo, o uso do extrato bruto enzimático de *P. sanguineus* apresentou como vantagem o baixo custo, facilidade e rapidez na produção, sem necessidade de purificação ou concentração. Sendo assim, não há como comparar a quantidade de volume enzimático utilizado com dados da literatura para imobilização da enzima lacase.

A quitosana pode ser incorporada aos íons (WANG et al., 2014), ou após a polimerização do alginato, em que as *beads* são mergulhadas em uma solução de quitosana (LU; ZHAO; WANG, 2007). No entanto, como a lacase possui melhor atividade em pH ácido e a quitosana é solúvel em pHs ácidos, observou-se que a melhor opção foi incorporar a quitosana aos íons.

Em relação à quitosana e o íon, para a formulação com cobre, foi obtido melhor resultado na proporção 3:7, respectivamente, em que a quitosana estava na concentração de 0,45% e os íons na concentração de 1,4% (Gráfico 2-C), resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2014) em *beads* de quitosana-alginato-Ca para imobilização de alcalase e tripsina. Para a formulação com cálcio, o melhor resultado foi obtido na ausência do biopolímero quitosana, mas não houve diferença estatística no rendimento entre as proporções 0:10 e 3:7 (Gráfico 2-C). Então, optou-se por usar a quitosana, pois a mesma proporcionou maior resistência à ruptura quando comparada a formulação sem o biopolímero.

Rendimentos próximos ao obtido, para formulações contendo Cu, podem ser encontrados em dados da literatura (Tabela 3). As *beads* de quitosana-alginato-Cu apresentam melhores resultados quando comparadas as *beads* de quitosana-alginato-Ca, isso ocorre

devido a inibição dos íons cloro, proveniente das moléculas de  $\text{CaCl}_2$ . Os íons ligam-se ao sítio T2 e T3, impedindo a transferência de elétrons com o sítio T1 (BATISTELA, 2011). Porém a inibição é reversível e competitiva (PINTO, 2010), o que não inviabiliza o uso do  $\text{CaCl}_2$ .

**Tabela 3** - Estudos comparativos envolvendo lacase immobilizada em *beads* de alginato.

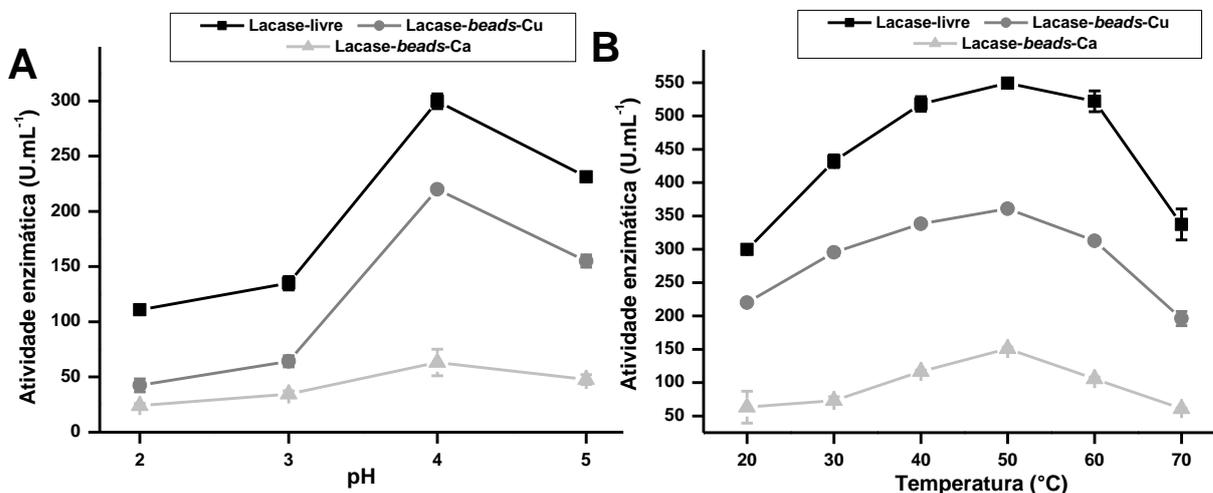
Sistema polimérico para imobilização da lacase	Substrato	Rendimento (%)	Referência
Quitosana-alginato-Cu <sup>1</sup>	ABTS	61,41	Este trabalho
Alginato-Cu	Álcool p-anisilo com mediador HBT	85	Brandi et al. (2006)
Alginato-Cu	2,4-diclorofenol	75	Pan et al. (2014)
Alginato-Cu	ABTS	61	Niladevi e Prema (2008)
Quitosana-alginato-Ca <sup>1</sup>	ABTS	27,66	Este trabalho
Alginato-Ca	Álcool p-anisilo com mediador HBT	51	Brandi et al. (2006)
Quitosana:Alginato-Ca <sup>2</sup>	ABTS	46,93	Lu, Zhao e Wang (2007)
Alginato-Ca	ABTS	42,50	Niladevi e Prema (2008)

Notas: <sup>1</sup> Quitosana adicionada durante o processo de polimerização.

<sup>2</sup> Quitosana incorporada, por imersão, após a polimerização das *beads* de alginato-Ca.

Em relação ao pH e temperatura, para enzima livre e immobilizada nas duas formulações, o melhor foi pH 4 e temperatura em torno de 50°C (Gráfico 3). Observa-se que as condições ótimas para atividade da enzima não sofreram alterações após a imobilização.

**Gráfico 3** - Caracterização da enzima lacase livre de *P. sanguineus* e immobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca/Cu, com substrato ABTS. A: pH; B: temperatura.



Fonte: Autora.

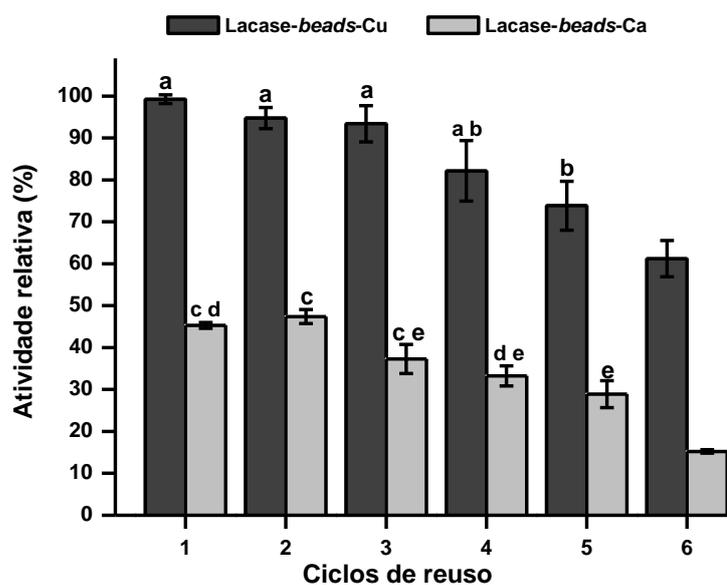
Em trabalhos anteriores para a imobilização da lacase de outros fungos, em diferentes suportes, foram obtidos valores de pHs entre 3 e 4,5 e temperatura entre 40 a 60°C, com substrato ABTS (LU; ZHAO; WANG, 2007; CARDOSO et al., 2012; SPINELLI et al., 2013; XU et al., 2013).

O pH ótimo para lacases depende da diferença de potencial redox do substrato com o sítio ativo T1 de cobre, e a ligação de um ânion hidróxido de cobres T2/T3, que inibe a lacase a um pH mais elevado. Em pHs na faixa de 2,5 a 5, os efeitos negativos do ânion hidróxido não influenciam na atividade enzimática, portanto o valor encontrado para a lacase de *P. sanguineus* corresponde a estes dados (FOKINA et al., 2015).

No geral, as lacases apresentam atividade ótima em temperaturas mais elevadas, podendo chegar a 80°C. A explicação para que uma enzima suporte tais temperaturas, pode estar relacionado com a configuração 3D global da proteína, que protege os sítios ativos de cobre (RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014). A pesar de a enzima suportar altas temperaturas, o processo de remediação foi realizado a temperatura de 28°C ( $\pm 2$ ), por ser a temperatura ambiente da cidade em que os ensaios foram realizados, o que não requer custos adicionais para manter a temperatura.

Ainda sobre as condições ótimas de imobilização, foram realizados 6 ciclos para oxidação do substrato ABTS, sendo cada um de 5 minutos (Gráfico 4). Observou-se que a lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Cu apresentou melhor desempenho.

**Gráfico 4** - Reuso da lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca/Cu para oxidação do substrato ABTS.



Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey, quando comparados os diferentes ciclos para a mesma formulação. Fonte: Autora.

A afinidade do alginato para os cátions divalentes está na ordem de afinidade:  $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+}$ . Com a substituição do  $Ca^{2+}$  por outros cátions de maior afinidade, as *beads* podem ser estabilizadas e apresentarem redução dos poros, o que também explicaria os melhores resultados para *beads* de quitosana-alginato-Cu (BRANDI et al., 2006; JAISWAL; PANDEY; DWIVEDI, 2014).

Após a análise estatística, observou-se que apenas o sexto ciclo difere dos demais, quando analisado em cada formulação a atividade da enzima. Em 6 ciclos de oxidação, a lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Cu, apresentou redução de 38,78% da atividade inicial quando comparado ao primeiro ciclo, enquanto as de quitosana-alginato-Ca reduziram 67,91% da atividade inicial (Gráfico 4).

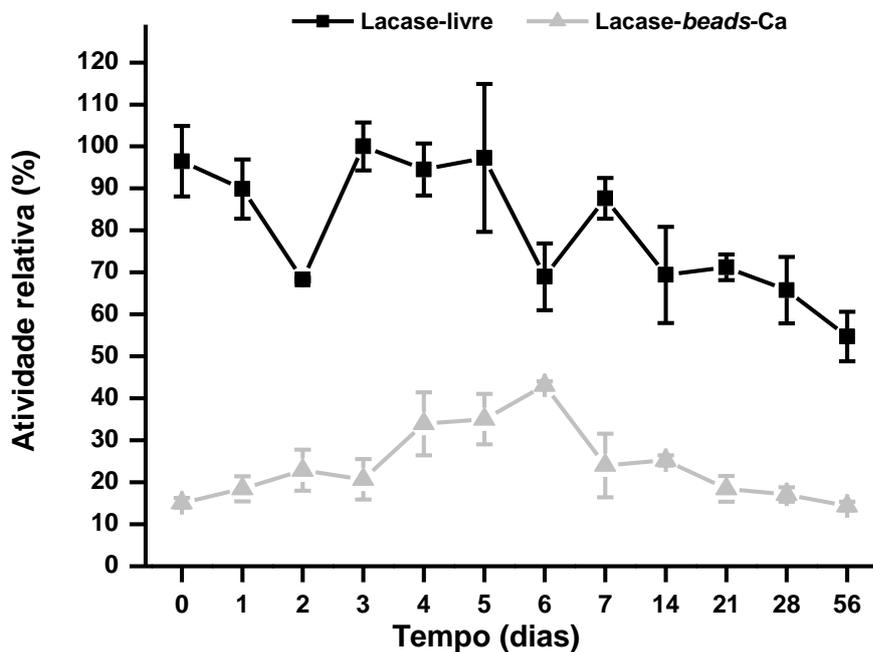
Outros autores, também utilizaram o substrato ABTS e a lacase imobilizada em uma matriz complexa formada por polímeros (poli(metacrilato de metila - metacrilato de glicidila)), e observaram redução da atividade de 6,7% após 10 ciclos de oxidação do substrato (UYGUN, 2013), em microesferas de quitosana magnética redução de 20% após 10 ciclos (JIANG et al., 2005), e em *beads* de Amberlite IR-120 H redução de 70% após 7 ciclos (SPINELLI et al., 2013).

Observou-se também que o suporte de alginato é sensível ao meio reacional, uma vez que ao decorrer dos ciclos, mais precisamente no quarto ciclo, as *beads* constituídas pelos dois cátions começaram a se desfazer. O fato pode ter ocorrido principalmente devido ao pH ácido, que solubiliza a quitosana e desestrutura a formulação. Wang et al. (2014) também observaram que em meio reacional contendo etanol, com alcalase e tripsina imobilizadas em *beads* de quitosana-alginato-Ca, ocorreu perda da integridade do suporte no terceiro ciclo de reação.

A lacase livre e imobilizada foram armazenadas a 4°C para determinar a estabilidade de armazenamento. Após 56 dias de armazenamento, a atividade residual das *beads* de alginato-quitosana-Ca foi mantida em 95,78% da atividade inicial (tempo 0 dia) e lacase livre foi mantida em 54,34% (Gráfico 5), o que demonstra a melhor estabilidade de armazenamento para a enzima imobilizada.

Resultados semelhantes foram obtidos com o armazenamento de lacase imobilizada em *beads* de alginato-Ca, em que no final dos 20 dias de armazenamento, a enzima livre e imobilizada mantiveram 22,4% ( $\pm 1,8$ ) e 82,7% ( $\pm 0,9$ ) da sua atividade inicial, respectivamente (DAÂSSI et al., 2014).

**Gráfico 5** – Estabilidade de armazenamento da lacase livre e imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca.



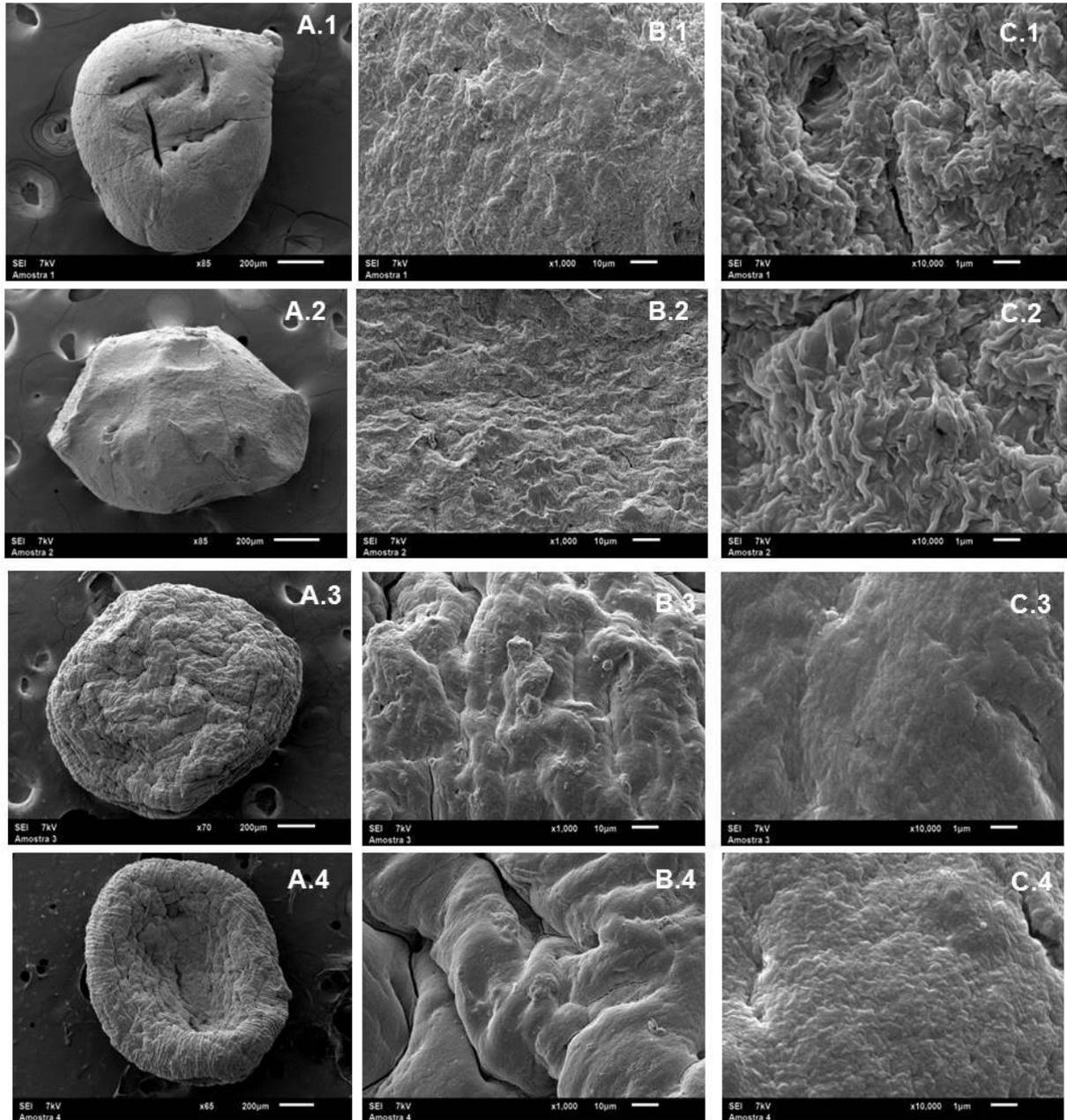
Fonte: Autora.

A morfologia das *beads* de quitosana-alginato-Ca/Cu antes e após a imobilização da lacase foi examinada utilizando MEV (Figura 14). Durante o processo de secagem, elas sofreram deformações, por isso não apresentaram formato esférico.

No menor aumento (65x) é possível observar que as *beads* de quitosana-alginato-Ca apresentam uma superfície lisa, enquanto as *beads* de quitosana-alginato-Cu, superfície entrelaçada, em formato de rede (Figura 14, A.1-4). Segundo Wang et al. (2014), este formato de rede é adquirido devido interação entre a quitosana e o alginato, indicando que as formulações com quitosana-alginato-Ca a quantidade de quitosana incorporada à formulação é menor, podendo estar relacionado com a quantidade de alginato, que é de 1,5%, enquanto nas *beads* de quitosana-alginato-Cu é de 2%.

No maior aumento (10000x), as superfícies das *beads* sem enzima exibiram menos rugosidade (Figura 14, C.1 e C.3), já as *beads* com lacase imobilizada exibiram maior irregularidade e rugosidade (Figura 14, C.2 e C.4), indicando a presença da enzima, resultados semelhantes foram observados por Nawaz et al. (2015).

**Figura 14** – Imagens obtidas por MEV das *beads* de quitosana-alginato-Ca, sem enzima (A.1-C.1) e com enzima lacase imobilizada (A.2-C.2); *beads* de quitosana-alginato-Cu, sem enzima (A.3-C.3) e com enzima lacase imobilizada (A.4-C.4). As imagens A estão com aumento de 65x, B com aumento de 1000x e C com 10000x.



Fonte: Autora.

### 4.1.3 Remediação do EE2

#### 4.1.3.1 Tempo de tratamento

A partir dos bons resultados obtidos com o substrato sintético ABTS, a lacase imobilizada mostrou-se viável na aplicação para remediação de poluentes. Devido a pouca

especificidade, esta enzima vem sendo utilizada em diversos processos de remediação de contaminantes ambientais recalcitrantes com tendência a bioacumulação.

Para remediação do EE2, foram realizados ensaios com a enzima livre, o controle com *beads* sem enzimas e com as formulações de *beads* com lacase imobilizada (Tabela 4).

**Tabela 4** - Porcentagens de remoção do etinilestradiol com as formulações de lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca/Cu e lacase livre.

	4 horas	8 horas	24 horas
<b><i>Beads</i>-Ca</b>	43,46% ( $\pm$ 0,49) <b>a</b>	7,95% ( $\pm$ 1,44)	15,75% ( $\pm$ 0,74)
<b><i>Beads</i>-Cu</b>	42,32% ( $\pm$ 0,33) <b>a</b>	15,50 % ( $\pm$ 1,48)	23,05% ( $\pm$ 0,92)
<b>Lacase-<i>Beads</i>-Ca</b>	57,11% ( $\pm$ 5,97) <b>b</b>	48,43% ( $\pm$ 2,32)	79,93% ( $\pm$ 2,60) <b>a</b>
<b>Lacase-<i>Beads</i>-Cu</b>	62,75% ( $\pm$ 7,61) <b>b</b>	61,84% ( $\pm$ 2,65)	80,58% ( $\pm$ 0,09) <b>a</b>
<b>Lacase-Livre</b>	66,57% ( $\pm$ 4,82) <b>b</b>	70,98% ( $\pm$ 6,99)	92,60 % ( $\pm$ 2,42)

Notas: Condições de tratamento: etinilestradiol em 4,59 mg.L<sup>-1</sup>, tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 4, agitação (100 rpm), temperatura 28  $\pm$  2 °C.

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey, quando comparados na mesma hora de tratamento.

Observa-se que as formulações de *beads* sem enzimas apresentaram um processo de adsorção, devido à porosidade da malha reticulada formada pelas *beads*, como também foi observado por outros autores (CHERIYAN; ABRAHAM, 2010; DAÂSSI et al., 2014). Esta adsorção ocorre principalmente nas primeiras horas de tratamento, já em 8 e 24 horas a quantidade de hormônio adsorvido é menor. O processo que ocorre no decorrer dos tempos de tratamento é a dessorção, uma vez que o hormônio estaria apenas adsorvido fisicamente, e a agitação do meio, no decorrer do tempo, é suficiente para promover a retirada dos compostos no interior das *beads* (KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014).

Em 4 horas de tratamento, não há diferença estatística significativa entre o tratamento com a enzima livre e a as duas formulações de *beads* imobilizadas. Nos demais tempos de tratamento, a enzima livre apresentou atividade pouco superior, obtendo 92% de remediação em 24 horas. Lloret et al. (2010) com 24 horas de tratamento, com lacase livre de *Myceliophthora thermophila*, conseguiu remediação completa do EE2. Junior (2010), no mesmo tempo de tratamento, com lacase proveniente de *Phoma sp.* e *Pleurotus ostreatus*, degradou 87,54% e 100% do EE2, respectivamente.

Para enzima imobilizada, ao final de 24 horas de tratamento, em quitosana-alginato-Ca obteve-se 79,93% de remoção do EE2, e para quitosana-alginato-Cu 80,58%. A lacase de

*Myceliophthora thermophila* já foi imobilizada em sol-gel (metiltrimetoxissilano e tetrametoxissilano), eupergit C 250L, e em biorreator com membrana de ultrafiltração polietersulfona, obtendo remoção do EE2 em 60, 80 e 100%, respectivamente (LLORET et al., 2011; LLORET et al., 2012; LLORET et al., 2013).

Diferente do que ocorreu com o ABTS, em que as *beads* de quitosana-alginato-Cu apresentavam melhores resultados, a atividade da enzima imobilizada nos dois suportes apresentaram comportamentos semelhante em 4 e 24 horas para remediação do EE2, segundo análise estatística. Isto ocorre, pois o tempo de reação com o ABTS era de apenas 5 minutos, enquanto o tratamento do hormônio foi no mínimo de 4 horas, mostrando que a inibição provocada pelos íons  $Cl^-$  é reversível e competitiva (PINTO, 2010).

Como os resultados em 24 horas foram semelhantes para as duas formulações, nas etapas seguintes, optou-se por utilizar apenas as *beads* formadas por quitosana-alginato-Ca, devido o menor impacto ambiental causado pelo suporte quando for descartado após o uso.

#### 4.1.3.2 pH ótimo

De acordo com dados da literatura, a enzima lacase atua em pH ácido, porém o valor pode variar com diferentes substratos. Por isso, para degradação do EE2 foram testados pHs 4 e 5. Para realizar o processo de remediação bio-eletroquímica, era possível que a remediação eletroquímica atuasse melhor em pH neutro, mas não foi utilizado tampão fosfato de sódio pH 7, pois o mesmo reagiu com os componentes da formulação das *beads*-Ca, formando uma solução de cor branca, sendo assim foi escolhido realizar a remediação biológica em meio sem adição de tampão, apenas o hormônio solubilizado em água destilada (Tabela 5).

**Tabela 5** - Porcentagens de remoção do etinilestradiol com as formulações de lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca e lacase livre, em diferentes pHs.

	<b>pH 4</b>	<b>pH 5</b>	<b>Água destilada</b>
<b><i>Beads</i>-Ca</b>	15,75% ( $\pm 0,74$ ) *	18,43% ( $\pm 5,02$ ) *	18,54% ( $\pm 5,02$ ) *
<b>Lacase-<i>Beads</i>-Ca</b>	79,93% ( $\pm 2,60$ )	89,81% ( $\pm 2,71$ ) <b>a</b>	61,82% ( $\pm 3,02$ ) <b>b</b>
<b>Lacase-Livre</b>	92,60 % ( $\pm 2,42$ ) #	91,81% ( $\pm 0,86$ ) # <b>a</b>	65,50% ( $\pm 2,89$ ) <b>b</b>

Notas: Condições de tratamento: etinilestradiol em  $4,59 \text{ mg.L}^{-1}$ , 24 horas, agitação (100 rpm), temperatura  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Letras e símbolos iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey, quando comparados no mesmo pH e em pHs diferentes, respectivamente.

Segundo os dados apresentados na Tabela 5, a melhor atividade foi em pH 5 para a enzima imobilizada. A atividade da enzima livre e imobilizada em *beads* de quitosana-

alginato-Ca não diferem estatisticamente entre si, em pH 5. O mesmo pH ótimo foi obtido por Cabana, Ahamed e Leduc (2011) e Catapane et al. (2013), com lacase imobilizada em quitosana para degradar triclosano e imobilizada em poliacrilonitrila para degradar nonilfenol e octilfenol, respectivamente, e pH de 5,5 por Diano et al. (2007) com lacase imobilizada em membranas de nylon para tratamento de bisfenol A em biorreator.

De acordo com as análises estatísticas, observou-se que a adsorção do hormônio que ocorreu com o suporte de *beads* de quitosana-alginato-Ca sem a lacase imobilizada, independe do pH. E que para enzima livre, nos pHs 4 e 5, apresentaram atividade semelhante na remoção.

Observa-se também que mesmo em meio sem controle de pH, apenas em água destilada, a lacase apresentou bom resultado, com até 65,50% de atividade, e que as enzimas livre e imobilizada, apresentaram atividade semelhante. Optou-se pelo não uso de tampão e nem controle de pH, para tornar o processo de remediação com menor custo, mostrando assim sua viabilidade.

Também foi realizada a determinação da atividade enzimática, com as *beads* retiradas da remediação com o EE2, para verificar a possibilidade de reuso das mesmas (Tabela 6).

**Tabela 6** - Atividade enzimática da lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca após 24 horas de tratamento do etinilestradiol em diferentes pHs.

<b>Tratamentos</b>	<b>Atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>Controle</b>	93,15 (± 6,29) <b>a</b>
<b>pH 4</b>	134,69 (± 15,98) <b>bc</b>
<b>pH 5</b>	144,82 (± 8,49) <b>b</b>
<b>Água destilada</b>	111,82 (± 9,86) <b>ac</b>

Notas: Controle = atividade enzimática inicial da lacase imobilizada em *beads*.

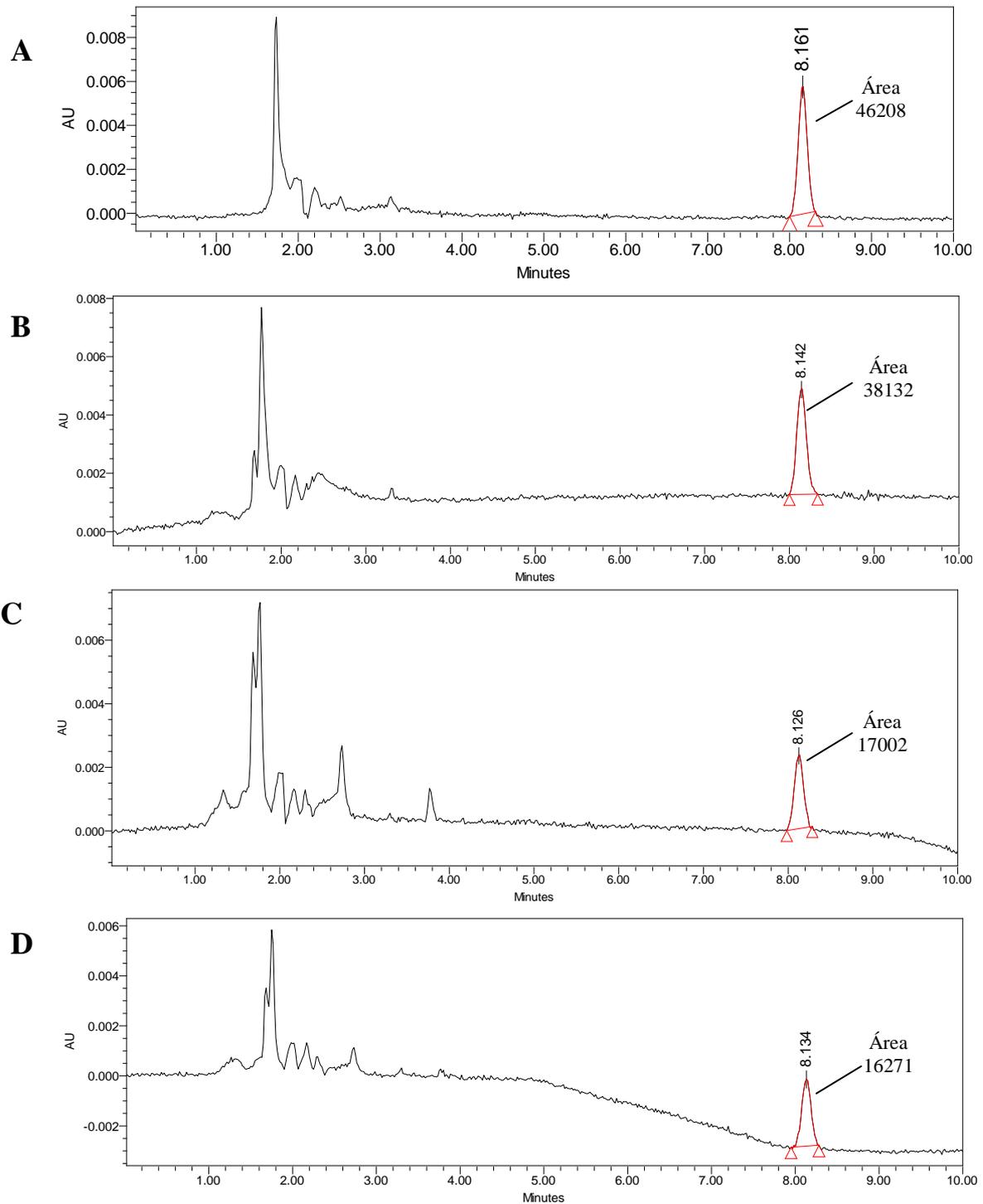
Condições: pH 4, substrato ABTS e 5 minutos de reação.

Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Lloret et al. (2010), também realizou a determinação da atividade enzimática após os processos de remediação, com a lacase livre. Após 8 horas de reação, obtiveram que a enzima apresentava cerca de 70% mais de atividade em pH 7, quando comparado aos tratamentos realizados em pHs 4 e 5. Neste trabalho, as enzimas imobilizadas apresentaram maior atividade após o uso em pHs 4 e 5, e que em meio sem controle de pH, ou água destilada, apresentaram atividade semelhante ao controle, evidenciando assim que o suporte proporcionou boa estabilidade para a enzima, apresentando possibilidade de reuso.

A Figura 15 apresenta os cromatogramas obtidos antes e após a remediação do EE2 em água destilada. Os primeiros picos presentes nos cromatogramas são da matriz, uma vez que estão presentes no padrão.

**Figura 15** - Cromatogramas com os resultados obtidos antes e após tratamento do etinilestradiol. **A** – Padrão de EE2 (4,59 mg.L<sup>-1</sup>); **B** – tratamento com *beads* de quitosana-alginato-Ca; **C** – tratamento com lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca; **D** – tratamento com lacase livre. Cromatogramas em diferentes escalas.



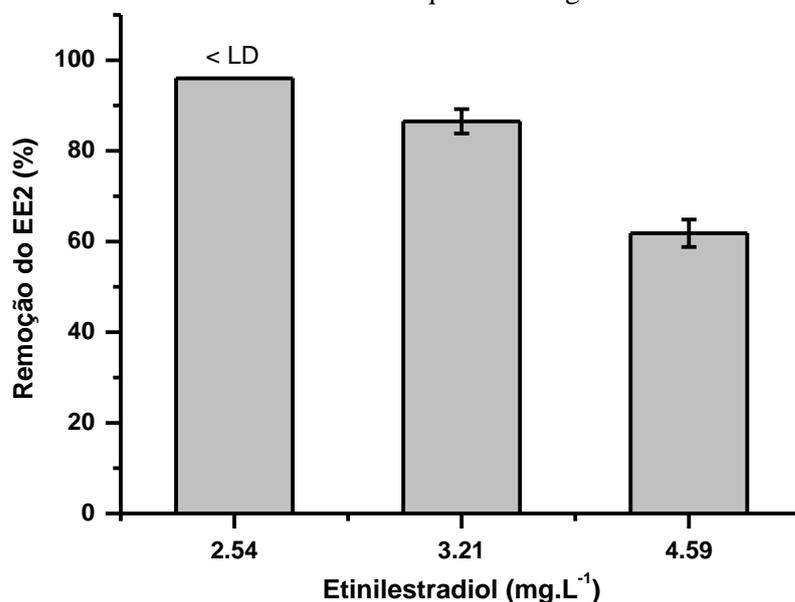
Fonte: Autora.

#### 4.1.3.3 Efeito da concentração do EE2

Em relação à concentração do hormônio, pode-se observar que quanto menor a concentração, maior a remoção do composto quando comparado no mesmo tempo (Gráfico 6). Logo em concentrações menores que  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , é possível que, mesmo sem controle de pH, a remediação seja a maior possível (valor abaixo do LD), após 24 horas de tratamento.

Como em situações reais a concentração encontrada do EE2 é em sua maioria na concentração de  $\text{ng.L}^{-1}$ , a remediação realizada é bastante viável, principalmente porque ela ocorre sem a necessidade de controle de pH.

**Gráfico 6** - Remediação do etinilestradiol em diferentes concentrações com a enzima lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca.

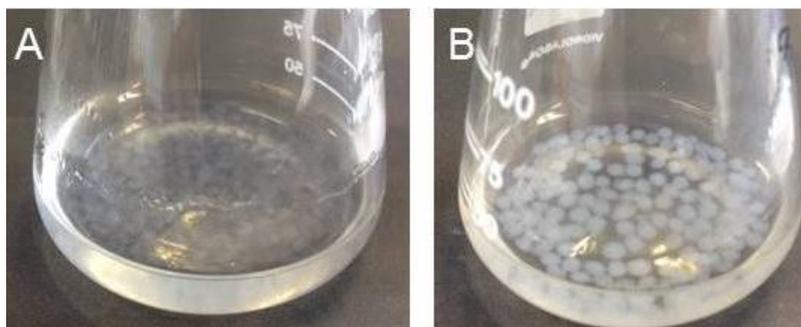


Condições de tratamento: 24 horas, agitação (100 rpm), temperatura  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . LD = Limite de Detecção. Fonte: Autora.

#### 4.1.3.4 Ciclos de reuso

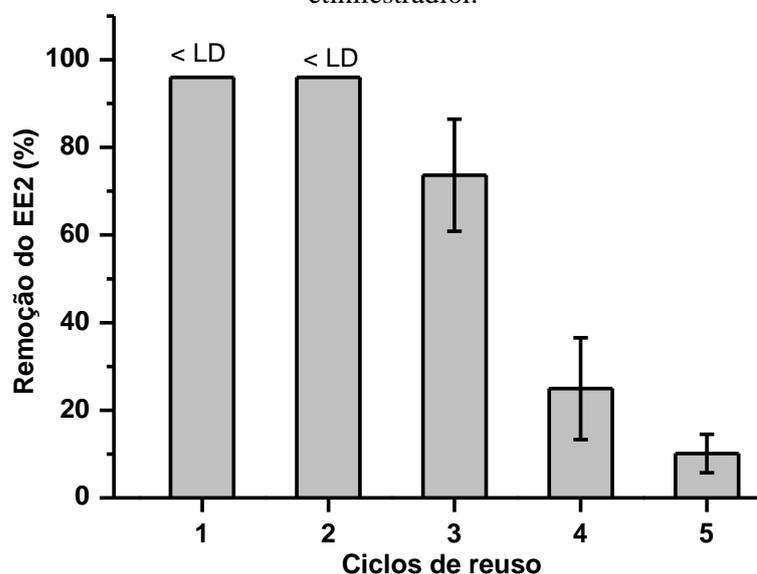
Como foi obtido melhor remoção do EE2 em pH 5 e bom resultado no meio sem controle de pH, foram realizados 7 ciclos de remoção do hormônio para cada situação. Porém, no terceiro ciclo em pH 5, as *beads* perderam a estabilidade e se desfizeram, inviabilizando o uso em pH ácido (Figura 16-A). Já as *beads* que foram utilizadas em água destilada, sem controle de pH, permaneceram estáveis e sólidas até o final do sétimo ciclo (Figura 16-B). O Gráfico 7 apresenta os ciclos de reuso das *beads* em meio sem controle de pH, observa-se que a enzima imobilizada conseguiu remover o hormônio até o quinto ciclo.

**Figura 16** - Lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca utilizadas na remediação do etinilestradiol. **A:** 3 ciclos em tampão acetato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 5. **B:** 7 ciclos em água destilada.



Fonte: Autora.

**Gráfico 7** - Reuso da lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca para remediação do etinilestradiol.



Condições de tratamento: etinilestradiol em 2,54 mg.L<sup>-1</sup>, 24 horas, agitação (100 rpm), temperatura 28 ± 2 °C. LD = Limite de Detecção. Fonte: Autora.

De acordo com dados obtidos, foi possível realizar três ciclos de remoção do EE2 com valores próximos de 100% a 70%, já o quarto e quinto ciclo não foram superiores a 30% cada. Daâssi et al. (2014), com ciclos de 24 horas e pH 7, obtiveram 4 ciclos de remoção de corantes superiores a 70%, com lacase de *Corioliopsis gallica* imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca. Niladevi e Prema (2008), com ciclos de 6 horas e pH 9,2, manteve 50% de remoção de fenóis após 8 ciclos, com lacase de *Streptomyces psammoticus* imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Cu.

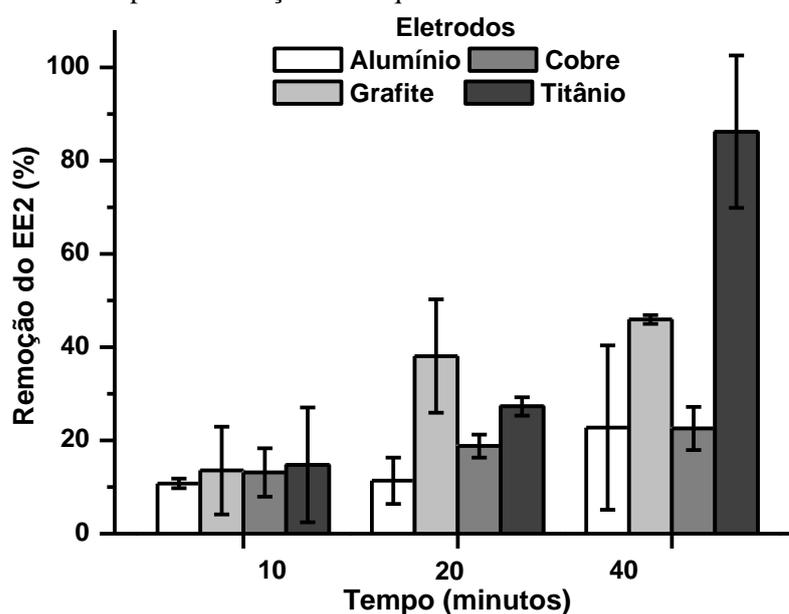
Uma vez que a enzima livre não pode ser reutilizada, a imobilização em *beads* de quitosana-alginato-Ca mostrou-se bastante eficiente devido à possibilidade de estabilização da

enzima e reutilização. O método de imobilização é aplicável e não requer um controle rígido, atuando melhor em pH neutro devido a instabilidade do suporte em pH ácido.

#### 4.2 TRATAMENTO ELETROQUÍMICO

O Gráfico 8 apresenta os resultados obtidos com a remediação do EE2 para os eletrodos de alumínio, grafite, cobre e titânio. E a Tabela 7 apresenta os resultados obtidos na análise de ICP-OES, para determinação dos metais após cada tratamento.

**Gráfico 8** - Tratamento por remediação eletroquímica do etinilestradiol com diferentes ânodos.



Condições de tratamento: etinilestradiol em  $2,94 \text{ mg.L}^{-1}$ , tampão fosfato de sódio  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7; com agitação magnética; tensão de 5 V. Fonte: Autora.

**Tabela 7** - Metais quantificados por análise de ICP-OES após tratamento eletroquímico de uma solução aquosa contendo o hormônio etinilestradiol.

Eletrodos Concentração	Alumínio/aço Al ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Cobre/aço Cu ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Titânio/aço Ti ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
<b>Tempo</b>			
<b>10 min</b>	0,030 ( $\pm 0,010$ )	64,417 ( $\pm 6,869$ )	<0,08
<b>20 min</b>	0,040 ( $\pm 0,014$ )	127,375 ( $\pm 9,878$ )	<0,08
<b>40 min</b>	0,029 ( $\pm 0,003$ )	148,250 ( $\pm 10,136$ )	<0,08
<b>Controle</b>	Al ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Cu ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Ti ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
	0,0270 ( $\pm 0,008$ )	0,0233 ( $\pm 0,009$ )	<0,08

No sentido de mimetizar situações reais, como o pH de águas e efluentes em geral está em torno de 7, este valor foi o escolhido para realizar a remediação eletroquímica comparativa entre os eletrodos. A força iônica do meio eletrolítico foi igualmente mantida baixa ( $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ) a fim de simular situações práticas.

O desempenho do tratamento depende da natureza dos poluentes, podendo ocorrer melhor remoção por eletrocoagulação perto de pH 7. No entanto, o consumo de energia é superior neste pH devido à variação de condutividade (CHEN, 2004). Por eletrocoagulação com eletrodos de alumínio, o EE2 foi removido entre 10,77% a 22,74% em até 40 minutos (Gráfico 8).

Para o antibiótico tetraciclina utilizando eletrodos de alumínio, pH variando 4-10, 20 minutos e 0,8 A de corrente, obtiveram eficiência de remoção perto de 99% (OUAISSA et al., 2014). Na remediação de efluente da indústria farmacêutica com eletrodos do mesmo material, obtiveram em pH 7,2,  $80 \text{ A.m}^2$  e 25 minutos, redução de 24% de DQO, 35% de DBO e 70,25% de cor (DESHPANDE; SATYANARAYAN; RAMAKANT, 2010). Logo, a eficiência de remediação por eletrocoagulação está diretamente relacionada ao tipo do composto a ser tratado.

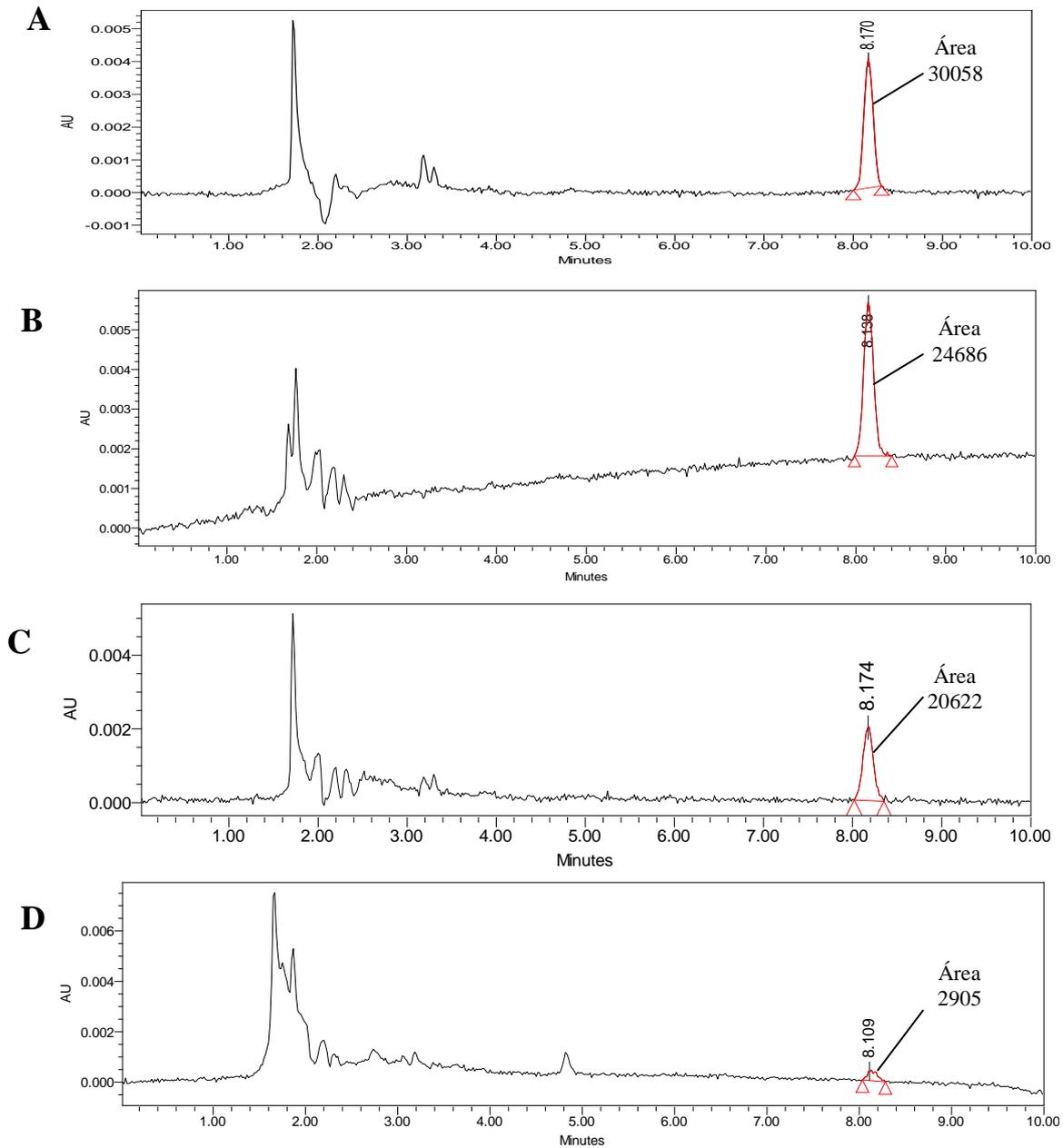
O grafite é um material muito utilizado na eletroquímica, apresentando como principal vantagem o baixo custo (YAN; REIBLE, 2015). Neste trabalho, para remoção do EE2 com ânodo de grafite foram obtidos valores entre 13,54% a 45,94% em até 40 minutos, podendo ocorrer processos oxidativos ou adsortivos, devido a natureza porosa do grafite. Kumar et al. (2012) em um sistema bio-eletroquímico de remediação e eletrogênese, utilizando micro-organismos e eletrodos de grafite, conseguiram remoção do EE2 de 44,60 %, em até 48 horas, com geração de energia.

A desvantagem do eletrodo de grafite foi a corrosão sofrida durante o tratamento, principalmente quando o processo ocorreu em maior tempo. O mesmo foi observado por Jara et al. (2007) que comparou materiais metálicos e o grafite na remediação de antibióticos, também observou que os materiais metálicos apresentaram melhor performance.

O processo corrosivo foi mais intenso para o ânodo de cobre, em que a solução tratada após 40 minutos, apresentava  $148,25 \text{ mg.L}^{-1}$  do metal, o que inviabilizou o uso do mesmo (Tabela 7). As remoções do EE2 com esse ânodo ficaram entre 13,14% a 22,55%.

A melhor resposta foi obtida pelo ânodo de titânio, em que a remoção do EE2 foi de 14,76%, 27,30% e 86,21%, nos tempos de 10, 20 e 40 minutos, respectivamente (cromatogramas presentes na Figura 17). Não foi encontrado o metal nas soluções após os tratamentos (Tabela 7).

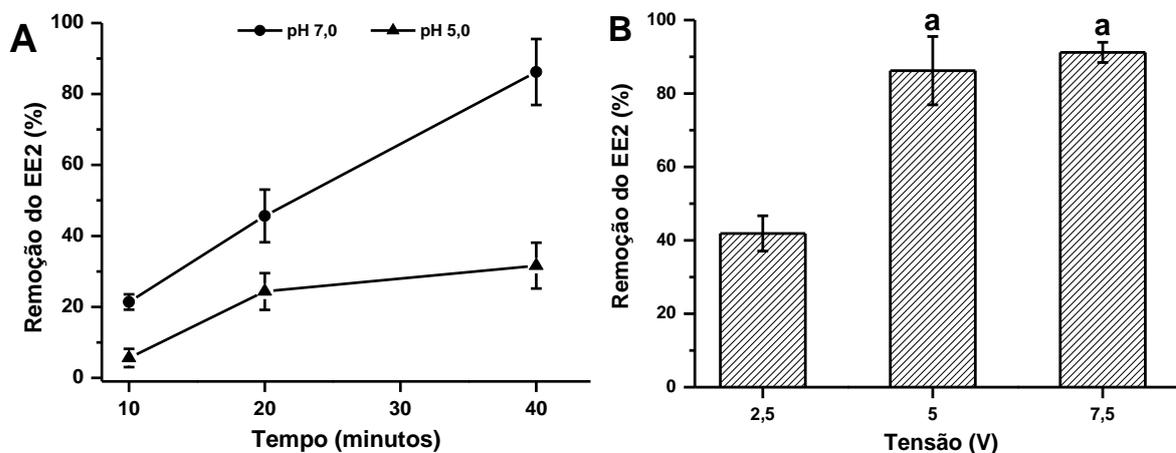
**Figura 17** - Cromatogramas com os resultados obtidos antes e após tratamento eletroquímico do etinilestradiol com eletrodos de titânio. **A** – Padrão de EE2 ( $2,94 \text{ mg.L}^{-1}$ ); **B** – 10 minutos, **C** – 20 minutos e **D** – 40 minutos de tratamento. Cromatogramas em diferentes escalas.



Fonte: Autora.

Também foi realizada a remediação com eletrodo de titânio em pH 5, porém a remoção não foi superior a 21,36 % ( $\pm 2,16$ ) após 40 minutos (Gráfico 9-A). Em relação à tensão aplicada foram testadas 2,5, 5 e 7,5 V em pH 7 e 40 minutos (Gráfico 9-B).

**Gráfico 9** - Tratamento por remediação eletroquímica do etinilestradiol com o eletrodo de titânio, em diferentes pHs (A) e tensões (B).



Condições de tratamento: etinilestradiol em  $2,62 \text{ mg.L}^{-1}$ . Em diferentes pHs foi aplicada uma tensão de 5V; em diferentes tensões foram utilizados tampão fosfato  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$  pH 7 e 40 minutos de tratamento. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Fonte: Autora.

Em pH neutro a eletrólise da água para gerar radicais hidroxila é favorecida, pois apresentam equivalentes quantidades de íons  $\text{OH}^-$  e  $\text{H}^+$  no meio reacional, como representado na equação:  $\hat{\text{Anodo}} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \hat{\text{Anodo}}(\cdot\text{OH}) + \text{H}^+ + \text{e}^-$ . Já em pH ácido a reação é dificultada pois no meio reacional há muito  $\text{H}^+$ , então a reação ocorre em menor proporção. Logo, os resultados obtidos para a baixa remoção em pH 5 podem ser explicados (Gráfico 9-A).

Para a tensão aplicada, o melhor resultado foi obtido em 7,5 V, mas conforme a análise estatística, não houve diferença significativa entre 5 e 7,5 V, então, foi escolhido utilizar 5 V, pois o custo com energia é menor (Gráfico 9-B).

Em relação à área do ânodo de titânio, o volume total de solução (20 mL) não era capaz de submergir todo o eletrodo ( $9,56 \text{ cm}^2$ ), então a área em contato com a solução tratada era de aproximadamente  $7,61 \text{ cm}^2$ , e assim ao aplicar 5 V por 40 minutos foi possível remediar 86,21% de EE2.

Em comparação com outros eletrodos de titânio, ao aplicar 5V em uma área de  $30 \text{ cm}^2$  (ânodo de  $\text{Ti/PbO}_2$ ), em conjunto com reatores biológicos, foi possível remover 51,4% de carbono orgânico total após 30 minutos de eletrólise na remediação de chumbo (LEI et al., 2007); e em ânodos de  $\text{Ti/RuO}_2$  ao aplicar 16,7 V em uma área de  $12 \text{ cm}^2$  foi possível remover 100% de fenóis, após 50 minutos de tratamento (YAVUZ; KOPARAL, 2006). Logo, o tratamento realizado neste trabalho foi tão ou mais eficiente que os trabalhos citados na

literatura, pois o eletrodo apresentou uma área menor e não foi modificado por óxidos, que aumenta a atividade catalítica.

A Tabela 8 apresenta resultados obtidos para remediação eletroquímica de estrogênios. É possível observar que o EE2 é uma molécula passível de oxidação por diferentes materiais.

**Tabela 8 - Remoção de estrogênios por eletro-oxidação.**

<b>Eletrodos / Áreas</b>	<b>Concentrações iniciais (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Condições</b>	<b>Remoções</b>	<b>Referências</b>
Titânio (7,61 cm <sup>2</sup> )	2,94	40 min e 5V	86,21% de EE2	Este trabalho
Diamante dopado com boro (19 cm <sup>2</sup> )	0,1	7 min e 2,1 mA/cm <sup>2</sup>	100% de EE2	Frontistis et al. (2011)
Diamante dopado com boro (4 cm <sup>2</sup> )	0,5	40 min e 25 mA/cm <sup>2</sup>	100% de E2	Muruganathan et al. (2007)
Ti/SnO <sub>2</sub> (6 cm <sup>2</sup> )	2	60 min e 10 mA/cm <sup>2</sup>	~100% de EE2	Feng et al. (2010)
Carbono vítreo granular em reator (2000 cm <sup>2</sup> )	0,001	180 min em sistema de fluxo, 0,5 e 1 mA	98% de E1, E2 e EE2	Cong, Iwaya e Sakakibara (2014)

### 4.3 TRATAMENTO BIO-ELETROQUÍMICO

Os trabalhos que apresentam a remediação bio-eletroquímica, em geral, utilizam micro-organismos para promover a remediação biológica (KIM et al., 2002; SALLES et al., 2010; TIEHM et al., 2010; FONTMORIN et al., 2013), o uso de enzimas imobilizadas para aumentar a eficiência do tratamento em relação ao tempo, foi uma ideia inovadora.

Observou-se que tanto o sistema biológico quanto o sistema eletroquímico, realizados neste trabalho, podem remediar o EE2. A princípio, pretendiam-se realizar os dois processos de remediação em conjunto, porém o suporte em que a lacase foi imobilizada não é compatível com tampão fosfato, e nem o processo eletroquímico e nem o biológico são viáveis em pH ácido, como já apresentado. Então, para interação das duas técnicas de remoção foi realizada a remediação sequencial do EE2, com o tratamento biológico em água destilada, sem adição de tampão, e o tratamento eletroquímico em tampão fosfato de sódio pH 7.

Para o tratamento bio-eletroquímico, com o EE2 na concentração de 3,62 mg.L<sup>-1</sup>, utilizou-se a lacase imobilizada em *beads* de quitosana-alginato-Ca após 8 e 24 horas de tratamento. Em seguida, foi realizada a remediação eletroquímica com eletrodos de titânio (ânodo) e aço inoxidável (cátodo), tensão em 5 V e 20 minutos. Obtiveram-se remoções do EE2 abaixo do LD do método utilizado no CLAE (Tabela 9).

**Tabela 9** – Tratamento bio-eletroquímico do hormônio etinilestradiol.

<b>Tempo de tratamento bio/eletroquímico</b>	<b>Remoção do EE2 (%)</b>	
	<b>Biológica</b>	<b>Eletroquímica</b>
8 horas/20 minutos	68,60% ( $\pm 2,61$ )	< LD
24 horas/20 minutos	86,52% ( $\pm 2,69$ )	< LD

Nota: LD = Limite de Detecção.

É mais difícil utilizar primeiro a remediação biológica, pois a maioria dos compostos alvos de degradação apresentam toxicidade aos micro-organismos. Para remediação de efluentes têxteis, foi utilizado um biofilme constituído pelos micro-organismos *A. salmonicida* e *P. vesicularis*, com redução de 68,8% de DQO e 54,5% de eficiência na remoção de cor. Ainda foi realizado um processo de coagulação química e por fim a oxidação eletroquímica até alcançar redução de 95,4% de DQO e 98,5% de cor (KIM et al., 2002).

Para o tratamento de chorume, foi utilizado dois biorreatores em sequência e posterior eletro-oxidação, com Ti/PbO<sub>2</sub> como ânodo. As eficiências de remoção de carbono orgânico total foram de 98% para o processo biológico e 51,4% para o eletroquímico (LEI et al., 2007).

Já para trabalhos com a remediação eletroquímica antes da remediação biológica, bons resultados foram obtidos na remediação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (FONTMORIN et al., 2013) e do pesticida organofosforado, fosmete (SALLES et al., 2010), com remoções em 97% e 79%, respectivamente, utilizando eletrodos de grafite (ânodo) e em seguida lodo ativado. Cloridrato de tetraciclina foi tratado por eletro-oxidação com eletrodo de Pb/PbO<sub>2</sub> e em seguida lodo ativado, com remoção completa do composto (YAHIAOUI et al., 2013).

A principal vantagem do processo bio-eletroquímico realizado nesse trabalho é o tempo de tratamento biológico (8 horas). Mesmo com boas remoções, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético reduziu 57-63% do seu valor inicial durante os primeiros dias de cultura, permaneceu constante e só depois de quase 18 dias de cultura ocorreu 97% de remoção (FONTMORIN et al., 2013). O fosmete foi removido 66% após o segundo dia de cultivo e 79% após o sétimo dia (SALLES et al., 2010). E o cloridrato de tetraciclina em 30 dias (YAHIAOUI et al., 2013).

Os processos bio-eletrquímicos são cada vez mais utilizados devido à eficiência de tratamento e possibilidade de remediação de diversos poluentes, que podem ser substâncias puras ou em efluentes. O processo bio-eletrquímico realizado, mostrou-se eficiente para o EE2 com remoção em torno de 100%, após 8 horas de tratamento biológico e 20 minutos de tratamento eletrquímico.

## 5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

### 5.1 CONCLUSÃO

Segundo a metodologia utilizada foi possível produzir a enzima lacase do fungo *P. sanguineus*. Na imobilização do extrato bruto contendo lacase em *beads* de quitosana-alginato-Ca/Cu, as *beads* que possuíam cobre apresentaram rendimento superior quando a atividade enzimática foi determinada utilizando o substrato ABTS.

Para a remediação biológica, as duas formulações de *beads* apresentaram comportamentos semelhantes em 24 horas de tratamento, sendo assim optou-se por utilizar apenas as *beads* de quitosana-alginato-Ca. A melhor condição para o tratamento foi em meio aquoso sem adição de tampão. Foi possível realizar até 5 ciclos de reuso com o mesmo lote de *beads*.

Em relação à remediação eletroquímica os eletrodos de titânio (ânodo) e aço inoxidável (cátodo) apresentaram os melhores resultados, em pH 7 e 20 minutos de reação. Além de melhor remoção, o eletrodo de titânio foi inerte, não sendo possível determinar o metal na solução aquosa após o tratamento.

Como nem sempre a remediação biológica com a lacase imobilizada promoveu remoção completa do EE2, ao realizar a remediação eletroquímica com eletrodos de titânio e aço em sequência, obteve-se resultados em torno de 100% de remoção. Conclui-se que os dois processos são eficientes separadamente e em conjunto, levando a quase completa remoção do EE2 em solução aquosa.

### 5.2 PERSPECTIVA

- Otimizar o processo de remediação bio-eletroquímica.
- Realizar ensaios de toxicidade com a solução obtida dos tratamentos.
- Ampliar o volume de tratamento visando à aplicação ambiental.

## REFERÊNCIAS

ALDA, M. J. L.; BARCELÓ D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 391–406, 2000.

ALEXA, R. I.; MOUNSEY, J. S.; O'KENNEDY, B. T.; JACQUIER, J-C. Oxidative stability of water/oil mixtures as influenced by the addition of free Cu<sup>2+</sup> or Cu–alginate gel beads. **Food Chemistry**, v. 129, p. 253–258, 2011.

ANDREW, M. N.; O'CONNOR, W. A.; DUNSTAN, R. H.; MACFARLANE, G. R. Exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the Sydney rock oyster. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 8, p. 1440-1451, 2010.

ANGLADA, A.; URTIAGA, A.; ORTIZ, I. Contributions of electrochemical oxidation to waste-water treatment: fundamentals and review of applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 12, p. 1747–1755, 2009.

ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEEN, S. M. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**, v. 69, p. 104–119, 2014.

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

BARRIOS, J. A.; BECERRIL, E.; DE LEÓN, C.; BARRERA-DÍAZ, C.; JIMÉNEZ, B. Electrooxidation treatment for removal of emerging pollutants in wastewater sludge. **Fuel**, v. 149, p. 26–33, 2015.

BAUMER, J. D. **Produção do antibiótico cinabarina pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* utilizando resíduos lignocelulósicos como substrato**. Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

BATISTELA, D. M. **Estudo da atividade e estabilidade de lacases em líquidos iônicos**. Dissertação de mestrado em química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BELKHEIRI, D.; FOURCADE, F.; GENESTE, F.; FLONER, D.; AÏT-AMAR, H.; AMRANE, A. Feasibility of an electrochemical pre-treatment prior to a biological treatment for tetracycline removal. **Separation and Purification Technology**, v. 83, p. 151–156, 2011.

BETTIN, F.; ROSA, L. O. da; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T. A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. da; DILLON, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 758–764, 2011.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase on lignin biodegradation. **FEBS Letters**, 267, p. 99-102, 1990.

BRANDI, P.; D'ANNIBALE, A.; GALLI, C.; GENTILI, P.; PONTES, A. S. N. In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 41, p. 61–69, 2006.

CABANA, H.; AHAMED, A.; LEDUC R. Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1656–1662, 2011.

CARDOSO, F. P.; NETO, S. A.; CIANCAGLINI, P.; ANDRADE A. R. The use of PAMAM dendrimers as a platform for laccase immobilization: kinetic characterization of the enzyme. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 167, p. 1854–1864, 2012.

CARGOUËT, M.; PERDIZ, D.; MOUATASSIM-SOUALI, A.; KAROLAK, S. T.; LEVI, Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area. **Science Total Environmental**, v. 324, p. 55-66, 2004.

CARR, G. M.; NEARY, J. P.; HODGSON, K.; ROABARTS, R.; BARKER, S.; ZALEWSKI, M.; WAGNER, I. **Emerging threats to water quality**. Water quality for ecosystem and human health, 2<sup>a</sup> ed., cap. 4, p. 67, ed. Global Environment Monitoring System (GEMS) / Water Programme, 2008.

CASPILLO, N. R.; VOLKOVA, K.; HALLGREN, S.; OLSSON, P.; PORSCHE-HÄLLSTRÖM, I. Short-term treatment of adult male zebrafish (*Danio Rerio*) with 17 $\alpha$ -ethinylestradiol affects the transcription of genes involved in development and male sex differentiation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 164, p. 35–42, 2014.

CATAPANE, M.; NICOLUCCI, C.; MENALE, C.; MITA, L.; ROSSI, S.; MITA, D. G.; DIANO, N. Enzymatic removal of estrogenic activity of nonylphenol and octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 248–249, p. 337–346, 2013.

CAZES, M.; ABEJÓN, R.; BELLEVILLE, M-P.; SANCHEZ-MARCANO, J. Membrane bioprocesses for pharmaceutical micropollutant removal from waters. **Membranes**, v. 4, p. 692-729, 2014.

CHEN, G. Electrochemical technologies in wastewater treatment. **Separation and Purification Technology**, v. 38, p. 11–41, 2004.

CHERIYAN, S.; ABRAHAM, E. T. Enzymatic bioremediation of cashew nut shell liquid contamination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 1097–1100, 2010.

COMMISSION of the EUROPEAN COMMUNITIES. **Community Strategy for Endocrine Disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife**. Brussels, 1999.

CONG, V. H.; IWAYA, S.; SAKAKIBARA, Y. Removal of estrogens by electrochemical oxidation process. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, p. 1355–1360, 2014.

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

DESHPANDE, A. M.; SATYANARAYAN, S.; RAMAKANT, S. Treatment of high-strength pharmaceutical wastewater by electrocoagulation combined with anaerobic process. **Water Science and Technology**, v. 61, p. 463–72, 2010.

DIANO, N.; GRANO, V.; FRACONTE, L.; CAPUTO, P.; RICUPITO, A.; ATTANASIO, A.; BIANCO, M.; BENCIVENGA, U.; ROSSI, S.; MANCO, I.; MITA, L.; POZZO, G. D.; MITA, D. G. Non-isothermal bioreactors in enzymatic remediation of waters polluted by endocrine disruptors: BPA as a model of pollutant. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 69, p. 252–261, 2007.

ESPERANZA, M.; SUIDAN, M. T.; NISHIMURA, F.; WANG, Z.; SORIAL, G. A.; ZAFFIRO, A.; MCCAULEY, P.; BRENNER, R.; SAYLES, G. Determination of sex hormones and nonylphenol ethoxylates in the aqueous matrixes of two pilot-scale municipal wastewater treatment plants. **Environmental Science and Technology**, v. 38, n. 11, p. 3028-3035, 2004.

FENG, Y.; WANG, C.; LIU, J.; ZHANG, Z. Electrochemical degradation of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) and estrogenic activity changes. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 12, p. 404–408, 2010.

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

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

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 $\beta$ -estradiol e de 17 $\alpha$ -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**. Tese de Doutorado em Engenharia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FOKINA, O.; EIPPER, J.; WINANDY, L.; KERZENMACHER, S.; FISCHER R. Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 445–453, 2015.

FONSECA, Y. V. P.; XAVIER, I. O.; ZANG, J. W.; SANTIAGO, M. F. **Análise de hormônios sexuais sintéticos no Rio Meia Ponte em Goiânia, Goiás**. Trabalho de Conclusão Curso de Especialização em planejamento e gerenciamento de recursos hídricos. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

FONTMORIN, J-M.; FOURCADE, F.; GENESTE, F.; FLONER, D.; HUGUET, S.; AMRANE, A. Combined process for 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid treatment—Coupling

of an electrochemical system with a biological treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 17– 22, 2013.

FRONTISTIS, Z.; BREBOU, C.; VENIERI, D.; MANTZAVINOSA D.; KATSAOUNISA, A. BDD anodic oxidation as tertiary wastewater treatment for the removal of emergingmicropollutants, pathogens and organicmatter. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 1233–1236, 2011.

GAO, Y.; TRUONG, Y. B.; CACIOLI, P.; BUTLER, P.; KYRATZIS, I. L. Bioremediation of pesticide contaminated water using an organophosphate degrading enzyme immobilized on nonwoven polyester textiles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 54, p. 38– 44, 2014.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Tese de Doutorado em Biologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F.; ULHOA, C. J. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 75, p. 311–318, 2007.

GARCIA, L. F.; LOBÓN, G. S.; SANTIAGO, M. F.; GIL, E. de S. Immobilization of laccase produced by *Pycnoporus sanguineus* for reuse in the remediation of catechol. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 2, p. 273-280, 2015.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. Interferentes Endócrinos no Ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.

GIMENES, L. J. **Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares**. Tese de doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2011.

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

GUO, S.; FAN, R.; LI, T.; HARTOG, N.; LI, F.; YANG, X. Synergistic effects of bioremediation and electrokinetics in the remediation of petroleum-contaminated soil. **Chemosphere**, v. 109, p. 226–233, 2014.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K; MARCHLEWICZ, A.; WOJCIESZYŃSKA, D. Enhancement of biodegradation potential of catechol 1,2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 17, p. 83–88, 2014.

HAN, W-Q.; WANG, L-J.; SUN, X-Y.; LI, J-S. Treatment of bactericide wastewater by combined process chemical coagulation, electrochemical oxidation and membrane bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 306–315, 2008.

HUANG, D.; GUO, S.; LI, T.; WU, B. Coupling interactions between electrokinetics and bioremediation for pyrene removal from soil under polarity reversal conditions. **Clean – Soil, Air, Water**, v. 41, n. 4, p. 383–389, 2013.

- HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 330–336, 2000.
- JAISWAL, N.; PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Purification of a thermostable laccase from *Leucaena leucocephala* using a copper alginate entrapment approach and the application of the laccase in dye decolorization. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1196–1204, 2014.
- JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879-884, 2007.
- JARA, C. C.; FINO, D.; SPECCHIA, V.; SARACCO, G.; SPINELLI, P. Electrochemical removal of antibiotics from wastewaters. **Appl Catal B- Environ**, v. 70, p. 479–87, 2007.
- JARDIM, V. L. **Seleção de fungos de decomposição branca para a redução da toxicidade do acefato**. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.
- JIANG, D-S.; LONG, S-Y.; HUANG, J.; XIAO, H-Y.; ZHOU, J-Y. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 15–23, 2005.
- JUNIOR, N. L. **Estudo de lacases fúngicas para degradação de compostos interferentes endócrinos**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Processos. Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.
- KIM, T-H.; PARK, C.; LEE, J.; SHINB, E-B.; KIM, S. Pilot scale treatment of textile wastewater by combined process (fluidized biofilm process–chemical coagulation–electrochemical oxidation). **Water Research**, v. 36, p. 3979–3988, 2002.
- KUMAR, A. K., REDDY, M. V., CHANDRASEKHAR, K., SRIKANTH, S., MOHAN, S. V. Endocrine disruptive estrogens role in electron transfer: Bio-electrochemical remediation with microbial mediated electrogenesis. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 547–556, 2012.
- KUMAR, V. V.; SIVANESAN, S.; CABANA, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates — Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. **Science of the Total Environment**, v. 487, p. 830–839, 2014.
- LEI, Y.; SHEN, Z.; HUANG, R.; WANG, W. Treatment of landfill leachate by combined aged-refuse bioreactor and electro-oxidation. **Water research**, v. 41, p. 2417 – 2426, 2007.
- LEONOWICZ, A. & GRZYWNOWICZ, K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. **Enzyme Microbial Technology**, v. 3, p. 55-58, 1981.
- LIN, S. H.; PENG, C. F. Continuous treatment of textile wastewater by combined coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. **Water Research**, v. 30, n. 3, p. 587-592, 1996.

LINO, F. M. A.; DIAS, D. C.; BATISTA, R. C.; GIL, E. S.; SILVA, I. S.; ANGNES, L. Electrochemical Remediation of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 7, p. 344-350, 2013.

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

LIZ, M. V. **Estudo da potencialidade da fotocatalise heterogênea (TiO<sub>2</sub> e ZnO) e dos processos fenton para remediação de águas contaminadas pelos estrogênios estrona, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol**. Tese de doutorado em Química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

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

LLORET, L.; EIBES, G.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M.; HOLLMANN, F. Immobilization of laccase by encapsulation in a sol-gel matrix and its characterization and use for the removal of estrogens. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 6, 2011.

LLORET, L.; HOLLMANN, F.; EIBES, G.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. Immobilisation of laccase on Eupergit supports and its application for the removal of endocrine disrupting chemicals in a packed-bed reactor. **Biodegradation**, v. 23, p. 373-386, 2012.

LLORET, L.; EIBES, G.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. Removal of Estrogenic Compounds from Filtered Secondary Wastewater Effluent in a Continuous Enzymatic Membrane Reactor. Identification of Biotransformation Products. **Environmental Science Technology**, v. 47, p. 4536-4543, 2013.

LU, L.; ZHAO, M.; WANG, Y. Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 159-166, 2007.

MACHADO, K. S. **Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do alto iguaçu, região metropolitana de Curitiba-PR**. Dissertação de mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MAHMOOD, S. J.; SIDDIQUE, A. Ionic studies of sodium alginate isolated from *Sargassum terrarium* (brown alga) karachi coast with 2,1-electrolyte. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 14, p. 117-123, 2010.

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

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

MARSELLI, B.; GARCIA-GOMEZ, J.; MICHAUD, P.-A.; RODRIGO, M. A. ; COMNINELLIS, CH. Electrogeneration of hydroxyl radicals on boron-doped diamond electrodes. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 150, n. 3, p. D79-D83, 2003.

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

MITA, D. G.; DIANO, N.; GRANO, V.; PORTACCIO, M.; ROSSI, S.; BENCIVENGA, U.; MANCO, I.; NICOLUCCI, C.; BIANCO, M.; GRIMALDI, T.; MITA, L.; GEORGIEVA, S.; GODJEVARGOVA, T. The process of thermodialysis in bioremediation of waters polluted by endocrine disruptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p. 199–207, 2009.

MORAIS, R. L. **Remoção de hormônios sexuais sintéticos por carbonização hidrotermal e por fungos de decomposição branca**. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente. Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2012.

MOREIRA, D. S. **Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte**. Dissertação de mestrado em Engenharia Ambiental. Universidade de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

MURUGANANTHAN, M.; YOSHIHARA, S.; RAKUMA, T.; UEHARA, N.; SHIRAKASHI, T. Electrochemical degradation of 17-estradiol (E2) at boron-doped diamond (Si/BDD) thin film electrode. **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 3242–3249, 2007.

NAWAZ, M. A.; REHMAN, H. U.; BIBI, Z.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 4, p. 250–256, 2015.

NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 24, p. 1215–1222, 2008.

OUAISSA, Y. A.; CHABANI, M.; AMRANE, A.; BENSMAILI, A. Removal of tetracycline by electrocoagulation: Kinetic and isotherm modeling through adsorption. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 177–184, 2014.

PADILHA, C. F.; LEITZKE, F. L.S. **Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do Alto Rio Iguaçu na região de Curitiba-PR**. Trabalho de Conclusão de Curso. Bacharelado em Química Tecnológica. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PAN, B.; LIN, D.; MASHAYEKHI, H.; XING, B. Adsorption and hysteresis of bisphenol a and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on carbon nanomaterials. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 15, p. 5480-5485, 2008.

PAN, T.; SUN, Y.-J.; WANG, X.-L.; SHI, T.; ZHAO, Y.-L. Influence of counteranions on catalytic ability of immobilized laccase in Cu-alginate matrices: Inhibition of chloride and activation of acetate. **Chinese Chemical Letters**, v. 25, p. 983–988, 2014.

PINTO, P. A. C. S. B. **Deslenhificação de palha de trigo por fungos da podridão branca Inibição da lacase de *Fomes fomentarius* pelo íão Cl<sup>-</sup>**. Dissertação de mestrado em ciências agrárias: produção animal. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2010.

PLOTAN, M.; FRIZZELL, C.; ROBINSON, V.; ELLIOTT, C. T.; CONNOLLY L. Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1590–1596, 2013.

RAHIM, S. N. A.; SULAIMANA, A.; HAMZAHB, F.; HAMIDB, K. H. K.; RODHIB, M. N. M.; MUSAB, M.; EDAMAA, N. A. Enzymes encapsulation within calcium alginate-clay beads: Characterization and application for cassava slurry saccharification. **Procedia Engineering**, v. 68, p.411-417, 2013.

RAIMUNDO, C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. Tese de doutorado em Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

RAMÍREZ-CAVAZOS, L. I.; JUNGHANNS, C.; ORNELAS-SOTO, N.; CÁRDENAS-CHÁVEZ, D. L.; HERNÁNDEZ-LUNA, C.; DEMARCHE, P.; ENAUD, E.; GARCÍA-MORALES, R.; AGATHOS, S. N.; PARRA, R. Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 32–42, 2014.

SADIGHI, A.; FARAMARZI, M. A. Congo red decolorization by immobilized laccase through chitosan nanoparticles on the glass beads. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 156–162, 2013.

SALIS A.; PISANO M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; SANJUST E. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, p. 175–180, 2009.

SALLES, N. A.; FOURCADE, F.; GENESTE, F.; FLONER, D.; AMRANE, A. Relevance of an electrochemical process prior to a biological treatment for the removal of an organophosphorous pesticide, phosmet. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 617–623, 2010.

SANTOS, I. J. S. **Estudo do potencial de biodegradação de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, carbamazepina e ibuprofeno por fungos ligninolíticos e bactérias**. Dissertação de mestrado em ciências de alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SIRÉS, I.; BRILLAS, E. Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review. **Environment International**, v. 40, p. 212–229, 2012.

SOUZA, J. B. G. **Estudo da ocorrência de tetraciclina e estrógenos em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de Campo Grande (MS)**. Tese de doutorado em Química. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SOUZA, N. C. **Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais**. Tese de doutorado em Engenharia Civil. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SPINELLI, D.; FATARELLA, E.; MICHELE, A. D.; POGNI, R. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: Optimization and characterization. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 218–223, 2013.

SUN, X.; SHI, J.; XU, X.; CAO, S. Chitosan coated alginate/poly(N-isopropylacrylamide) beads for dual responsive drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 273–281, 2013.

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. Tese de doutorado em Engenharia Química. Universidade de Aveiro, 2006.

TIEHM, A.; AUGENSTEIN, T.; ILIEVA, D.; SCHELL, H.; WEIDLICH, C.; MANGOLD, K.-M. Bio-electro-remediation: electrokinetic transport of nitrate in a flow-through system for enhanced toluene biodegradation. **Journal Applied Electrochemical**, v. 40, p. 1263–1268, 2010.

TROVASLET, M.; ENAUD, E.; GUIAVARC'H, Y.; CORBISIER, A.-M.; VANHULLE, S. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 368–376, 2007.

UTO, F. N. **Remoção do vermelho ponceau 4r utilizando biofiltro de areia e o fungo *Trametes versicolor***. Dissertação de mestrado em Engenharia do Meio Ambiente. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

UYGUN, M. Preparation of laccase immobilized cryogels and usage for decolorization. Hindawi Publishing Corporation, **Journal of Chemistry**, 2013.

VALERIANO, V. S.; SILVA, A. M. F.; SANTIAGO, M. F.; BARA, M. T. F.; GARCIA, T. A. Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5 - xylydine and ethanol. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 40, p. 790-794, 2009.

WANG, P.; FAN, X.; CUI, L.; WANG, Q.; ZHOU, A. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blent with PEG. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 1519–1522, 2008.

WANG, Y.; CHEN, H.; WANG, J.; XING, L. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate–chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1682–1690, 2014.

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

YAHIAOUI, I.; AISSANI-BENISSAD, F.; FOURCADE, F.; AMRANE, A. Removal of tetracycline hydrochloride from water based on direct anodic oxidation (Pb/PbO<sub>2</sub> electrode) coupled to activated sludge culture. **Chemical Engineering Journal**, v. 221, p. 418–425, 2013.

YAN, F.; REIBLE, D. Electro-bioremediation of contaminated sediment by electrode enhanced capping. **Journal of Environmental Management**, v. 155, p. 154–161, 2015.

YAVUZ, Y.; KOPARAL, A. S. Electrochemical oxidation of phenol in a parallel plate reactor using ruthenium mixed metal oxide electrode. **Journal of Hazardous Materials**, B136, p. 296–302, 2006.

YEUNG, A. T.; GU, Y-Y. A review on techniques to enhance electrochemical remediation of contaminated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 195, p. 11– 29, 2011.