

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
Trabalho de Conclusão de Curso | Bacharelado em Química

Carlos Eduardo Rodrigues Gracio

**Avaliação da Degradação de Bisfenol-A por
Trametes versicolor: Impactos de Solventes
Orgânicos na Atividade Enzimática**

Santo André
DEZEMBRO – 2020

Carlos Eduardo Rodrigues Gracio

**Avaliação da Degradação de Bisfenol-A por
Trametes versicolor: Impactos de Solventes
Orgânicos na Atividade Enzimática**

Monografia de Trabalho de
Conclusão de Curso, apresentado ao
Bacharelado em Química da UFABC
para obtenção do título de Bacharel
em Química
Orientador: Professora Doutora
Elizabete Campos de Lima.



Carlos Eduardo Rodrigues Gracio



Prof.ª. Dra. Elizabete Campos de Lima

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso do candidato CARLOS EDUARDO RODRIGUES GRACIO, realizada em 10 de dezembro de 2020.

Prof. Dr. André Sarto Polo
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof^a. Dra. Heloísa França Maltez
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

Prof^a. Dra. Elizabete Campos de Lima
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Meire e Eduardo, meu irmão, Lucas,
minha família, amigos, e a todos os docentes
que, de alguma maneira, me modificaram.*

AGRADECIMENTOS

A meus pais, educadores, por terem me criado num ambiente de amor e sempre me incentivado a estudar. A meu irmão, pelo companheirismo e por me ouvir sempre que preciso. À toda minha família – pelo orgulho que me fizeram sentir quando eu “passei na federal”, e pelo apoio durante minha graduação.

À minha querida orientadora, Professora Elizabete Campos de Lima, pelo acolhimento desde o primeiro momento, pelas orientações durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade construída.

Ao corpo docente do bacharelado em química da Universidade Federal do ABC, em especial aos professores: Amedea, André, Fernando, Giselle, Heloísa, João Henrique, Karina, Leonardo, Mirela e Rodrigo Luiz; por através do ensino possibilitarem meu crescimento profissional.

À minha fiel escudeira – ou seria eu o fiel escudeiro dela? – Júlia Mamud. Pela amizade que vou levar para a vida inteira, pelos inúmeros trabalhos que fizemos juntos, pela irmandade e pelo carinho.

Ao Antônio, futuro economista, pelo apoio, carinho, auxílio e afeto durante diversos momentos deste período de graduação e durante a elaboração deste manuscrito.

À minhas companheiras de pesquisa: Patrícia, minha mestranda, por ter me ensinado tanto, pelas risadas, conversas e amizades; Viviane, pelos congressos, orientações, desabafos, abraços que me suspendem no ar e pela enorme amizade que construímos; e Andressa, por ter aceitado meu convite, pelos conselhos, e por tanto amor que transborda.

À todas e todos os(as) amigos(as) que fiz durante minha trajetória no bacharelado em química: Akemi, Andressa, Ariane, Dimas, Gabriela, Gustavo, Heloísa, Hugo, Izabela, João, Joyce, Júlia, Leonardo, Mariana(s), Mélori, Victor, Victória e Wendel; e todos os inúmeros amigos não citados aqui.

À equipe de técnicos administrativos dos laboratórios didáticos: Rachel, Fernando, Nathália, Willians, Michelle, Eliane, Fernanda e Erica, pelo imenso auxílio não apenas durante os experimentos da graduação, mas também para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

Poluentes emergentes, ou micropoluentes, são compostos frequentemente encontrados em matrizes ambientais, geralmente biologicamente ativos e potencialmente danosos não somente à saúde humana mas também aos ecossistemas como um todo. Dentre estes poluentes encontram-se os disruptores endócrinos: são compostos que, mesmo em baixíssimas concentrações, podem interferir nos processos biológicos do sistema endócrino – que regula a produção hormonal. Os hormônios são essenciais à saúde pois controlam ou fazem parte de diversos outros processos biológicos. O Bisfenol A (BPA), tido pela literatura como uma substância disruptiva ao sistema endócrino, é utilizado amplamente na indústria atual como agente plastificante, estando presente em plásticos policarbonatos, resinas epóxi, revestimento de embalagens metálicas de alimentos, papéis térmicos, entre outras fontes de contaminação. Como a maior parte dos poluentes emergentes, a legislação para limitação do uso desta substância não é restritiva, principalmente nos países emergentes. Além disso, não são encontradas legislações ambientais que regulamentem concentrações aceitáveis para o aporte de Bisfenol A em corpos d'água. Visto que a tecnologia atual para tratamento de águas servidas mais utilizada no Brasil – por lodo ativado - é relativamente ineficiente em relação ao tratamento de diversos micropoluentes, pesquisadores concentram esforços em estudar alternativas para a remediação. Dentre elas, o tratamento enzimático utilizando fungos basidiomicetos se mostra uma técnica promissora e versátil. Neste estudo, buscou-se compreender melhor a atividade enzimática de lacases e manganês peroxidase, enzimas ligninolíticas produzidas pelo basidiomiceto *Trametes versicolor*, quando expostas a três tipos de meio de cultivo: (1) Com BPA solubilizado em acetonitrila ou tetrahidrofurano; (2) com a presença apenas de um dos solventes citados; e (3) ausência de BPA e solvente. Além disso, realizaram-se análises da remoção do contaminante e persistência em meio sem atividade enzimática utilizando cromatografia líquida de alta performance. Como resultado, dados não mostram evidências significativas de interferência da adição de solventes na atividade enzimática de lacases. Também, não foi encontrada evidência de interferência na atividade de manganês peroxidase pela presença de acetonitrila no meio de cultivo.

Palavras-chave: Bisfenol A, enzimas ligninolíticas, acetonitrila, tetrahidrofurano.

ABSTRACT

Emerging concern pollutants, or micropollutants, are compounds often found in environmental matrices, generally biologically active and potentially harmful not only to human health but also to ecosystems. Amongst these pollutants are endocrine disruptors: they are compounds that, even in very low concentrations, can interfere with the biological processes of the endocrine system - which regulates hormonal production. Hormones are essential to health for they control or are part of several other biological processes. Bisphenol A (BPA), considered by the literature as a disruptive substance to the endocrine system, is currently widely used in the industry as a plasticizer, being present in polycarbonate plastics, epoxy resins, coating of metallic food packaging, thermal papers, amongst other sources contamination. Like most emerging concern pollutants, legislation to limit the use of this substance is not restrictive, especially in emerging countries. In addition, there are no environmental laws that regulate acceptable concentrations for the dumping of Bisphenol A in rivers. Since the current technology for wastewater treatment most used in Brazil - activated sludge - is relatively inefficient in relation to the treatment of several micropollutants, researchers are concentrating efforts on studying alternatives for remediation. Among them, enzymatic treatment using basidiomycete fungi is a promising and versatile technique. In this study, we sought to better understand the enzymatic activity of laccases and manganese peroxidase, ligninolytic enzymes produced by the basidiomycete *Trametes versicolor*, when exposed to three types of culture medium: (1) With BPA solubilized in acetonitrile or tetrahydrofuran; (2) with the presence of only one of the solvents mentioned; and (3) absence of BPA and solvent. In addition, analyzes of contaminant removal and persistence in medium without enzymatic activity were performed using high performance liquid chromatography. As a result, data do not show significant evidence of interference from the addition of solvents on the enzymatic activity of laccases. Also, there was no evidence of interference in the activity of manganese peroxidase due to the presence of acetonitrile in the culture medium.

Key-words: Bisphenol A, Lininolytic enzymes, acetonitrile, tetrahydrofuran.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. MICROPOLUENTES E POLUENTES EMERGENTES.....	9
1.1.1. DISRUPTORES ENDÓCRINOS	9
1.1.1.1. BISFENOL-A (BPA).....	11
1.1.2. LEGISLAÇÃO REGULATÓRIA	12
1.1.2.1. NO BRASIL	12
1.1.2.2. EM OUTROS PAÍSES	13
1.2. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO BISFENOL A	14
1.2.1. LACASES (EC 1.10.3.2)	16
1.2.2. MANGANÊS PEROXIDASE (EC 1.11.1.13).....	17
2. OBJETIVOS	19
3. METODOLOGIA	20
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	20
3.1.1. SOLUÇÕES PADRÃO	20
3.2. INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO	20
3.3.1. ENSAIO UTILIZANDO TETRAHIDROFURANO (THF)	21
3.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA	22
3.4.1. LACASES	22
3.4.2. MANGANÊS PEROXIDASE.....	22
3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).....	23
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1. LACASES	24
4.1.1. ACETONITRILA	24
4.1.2. TETRAHIDROFURANO	26
4.2. MANGANÊS PEROXIDASE	27
4.3. DEGRADAÇÃO DO BISFENOL A	28
5. CONCLUSÕES	30
6. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

Ecosistemas aquáticos são fundamentais para a sobrevivência não somente humana, mas também de outros seres vivos. É de conhecimento comum que a interferência antropológica nestes sistemas pode acarretar danos severos à manutenção da vida. Recentemente, uma classe de compostos denominados poluentes emergentes (em inglês, *emerging concern pollutants*) tem sido alvo de grande movimento de pesquisa, por seu potencial dano aos seres vivos (CAJTHAML, 2015).

1.1. MICROPOLUENTES E POLUENTES EMERGENTES

Também denominados “micropoluentes”, os poluentes emergentes são compostos orgânicos, em sua grande maioria, que podem ser encontrados em baixas concentrações em ecossistemas aquáticos e terrestres, e ali introduzidos devido à atividade humana. Devido ao seu potencial bioacumulativo, persistência ambiental, e efeitos biológicos negativos mesmo a concentrações ínfimas (atrelados a diversos problemas fisiológicos e até surgimento de câncer), representam um enorme risco à saúde humana e ao meio ambiente (BILAL et al., 2019; GOGOI et al., 2018; MIRTUTUSAUS et al., 2018).

Estes compostos são classificados pela literatura em três grandes grupos: (1) Fármacos; (2) Produtos de Cuidado Pessoal; e (3) Desreguladores ou Disruptores Endócrinos. Por outro lado, estudos recentes têm mostrado que as substâncias classificadas como poluentes emergentes não se restringem a estes grupos, como o caso de nanoplásticos, metabólitos, drogas ilegais, pesticidas, tinturas têxteis, entre outros (BILAL et al., 2019; GOGOI et al., 2018).

Existem algumas maneiras pelas quais estes materiais são despejados no meio ambiente: efluentes industriais, efluentes domésticos tratados e não tratados (GOGOI et al., 2018). A preocupação em relação a estes contaminantes tem se agrado devido ao aumento da população mundial, principalmente nos grandes centros urbanos (MORSI et al., 2020).

1.1.1. DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Os disruptores endócrinos (EDCs, do inglês *endocrine disrupting compounds*) são agentes exógenos que podem interferir em alguma das atividades que os hormônios naturais de um organismo desempenham, sendo que estes têm como

função manter a reprodução, desenvolvimento e comportamento dos seres vivos (CRISP et al., 1998). Os EDCs são definidos pela EPA (Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) como substâncias exógenas que interferem na atividade, produção, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais (PONTELLI et al., 2019). De acordo com Bila e Dezotti (2007) os EDCs são uma classe de poluentes ambientais com efeitos conhecidos relativamente novos, considerando-os como substâncias que causam desequilíbrio no sistema endócrino dos seres vivos.

O sistema endócrino é um conjunto de glândulas que atuam em conjunto com o sistema nervoso e é responsável pela produção dos hormônios. Estes são secretados pelas glândulas, lançados diretamente na corrente sanguínea e percorrem todo o corpo até chegar nos principais órgãos em que atuam. As glândulas endócrinas estão localizadas em diferentes partes do corpo sendo estas responsáveis por tarefas distintas (DARBRE, 2019). Na figura 1 pode-se visualizar melhor cada parte do sistema endócrino. Podem-se destacar (GHISELLI; JARDIM, 2007):

- 1) *Hipófise*: está localizada no centro da cabeça e produz hormônios como o do crescimento, o antidiurético e também estimula o funcionamento de outras glândulas, como a tireoide e as glândulas sexuais;
- 2) *Tireoide*: age sobre a produção de energia controlando a velocidade do metabolismo celular, além de ser responsável pela temperatura corporal, pelo crescimento e ajuste de reservas de sal e água no corpo;
- 3) *Paratireoides*: distribuem cálcio e fósforo no sangue e ossos;
- 4) *Timo*: principal atuação no sistema linfático, responsável pela distribuição dos nutrientes, pelo transporte dos leucócitos e por colher dejetos do metabolismo celular;
- 5) *Glândulas supra renais*: responsáveis pela produção de adrenalina, pelo equilíbrio de água e sais nos rins (cátions Na^+ e K^+), e ajudam na produção de hormônios sexuais;
- 6) *Pâncreas*: secreta hormônios de regulação do metabolismo da glicose (insulina e glucagon);
- 7) *Glândulas sexuais (ovários e testículos)*: fazem parte do sistema reprodutor e controlam características sexuais - como ciclo menstrual, produção de espermatozoides, desenvolvimento embrionário, etc.

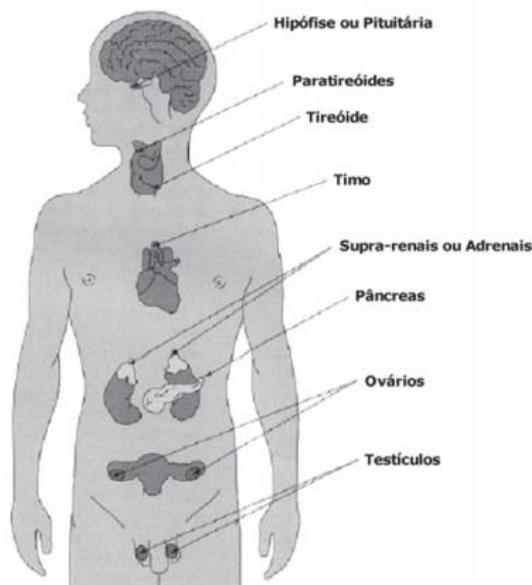


Figura 1: Sistema endócrino do corpo humano (Reproduzido de: GHISELLI; JARDIM, 2007)

Por conta do sistema endócrino ser complexo e totalmente interligado com os outros sistemas do corpo humano, houve um considerável aumento nas pesquisas que procuram soluções que diminuam as concentrações dos EDCs no meio ambiente já que a exposição dos seres humanos a essas substâncias pode causar diversos distúrbios ou doenças (VIEIRA et al., 2020).

Os mecanismos de ação disruptiva dos EDCs são vários: estes compostos podem alterar a síntese, o transporte e/ou o metabolismo dos hormônios naturais. Além disso, há ainda a possibilidade de ligação entre os EDCs e os sítios receptores hormonais das células, onde competem pela interação. As alterações causadas pelos disruptores endócrinos incluem o aumento da atividade hormonal - mas não está limitada a isto, abrangendo também a diminuição ou inclusive o aparecimento da atividade hormonal em oportunidades inadequadas ao estado natural do corpo (VIEIRA et al., 2020).

1.1.1.1. BISFENOL-A (BPA)

O Bisfenol A (BPA, 4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol) (Figura 2) é amplamente utilizado na indústria como agente plastificante e pode ser encontrado em policarbonatos, polímeros usados na fabricação de garrafas e potes plásticos, além de resinas epóxi e papéis térmicos (WANG; CHEN; BORNEHAG, 2016). Em 2011, a demanda mundial por BPA foi de 5,5 milhões de toneladas (FLINT et al., 2012) e não

obstante, tem aumentado nos últimos anos, levando a níveis preocupantes de utilização do composto (CAREGHINI et al., 2015). Além disso, o BPA é muito comumente encontrado em embalagens metálicas de alimento, como revestimento interno - estando em constante contato com o material que será consumido, permitindo a lixiviação da substância (RUSSO et al., 2019).

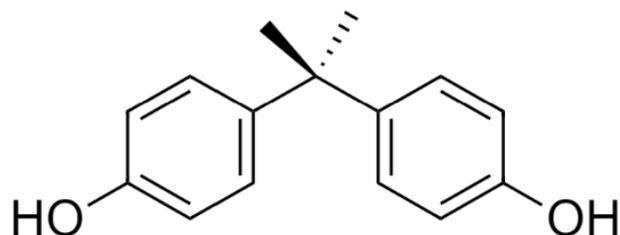


Figura 2: Estrutura molecular do Bisfenol A.

O BPA é classificado como disruptor endócrino: embora sua afinidade aos receptores localizados nos núcleos celulares seja baixa, há uma série de outras maneiras pelas quais a atividade estrogênica pode ser provocada pelo BPA, comparando-se à do 17-beta estradiol (E2), um hormônio estrógeno natural. Inclusive, seus metabólitos podem possuir maior potencial estrogênico que o próprio BPA (MICHAŁOWICZ, 2014; ROCHESTER, 2013). O Bisfenol A pode desencadear a atividade estrogênica mesmo em concentrações baixíssimas, como 1 ng.L^{-1} (RUSSO et al., 2019) e estudos demonstram que a exposição à esta substância pode estar relacionada com a menarca precoce, disfunções no sistema reprodutivo, obesidade e até mesmo a carcinogenicidade (MICHAŁOWICZ, 2014).

1.1.2. LEGISLAÇÃO REGULATÓRIA

Vários são os compostos classificados como disruptores endócrinos e a legislação nos países pode variar de acordo com a substância em questão. Portanto, no presente trabalho, trazem-se informações acerca dos aspectos regulatórios relacionados ao Bisfenol A.

1.1.1.1. NO BRASIL

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta o uso do Bisfenol A em território nacional, motivada por agências regulatórias de outros países como os Estados Unidos e União Européia (MANDEL et al., 2019). A fabricação e

importação de mamadeiras fabricadas em polycarbonato contendo Bisfenol A é proibida no país desde 2012, segundo a resolução RDC nº 41/2011. Para a fabricação de materiais em contato com alimentos, a mesma legislação altera o limite de migração específica (LME) para o BPA, descrito na RDC nº 105/1999: de 3 mg.kg⁻¹ para 0,6 mg.kg⁻¹. Vale ressaltar que não existe legislação no país que regulamente o limite de concentração para o aporte de BPA em corpos hídricos.

1.1.1.2. EM OUTROS PAÍSES

Em 2016, Baluka e Rumbelha fizeram um levantamento das legislações regulatórias referentes ao Bisfenol A de países desenvolvidos e em processo de desenvolvimento em relação à segurança alimentar (BALUKA; RUMBEIHA, 2016). Nos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*, agência regulatória nacional) banuiu em 2013 o uso de resinas epóxi no revestimento de embalagens de alimentos para crianças e mencionou em 2014 que os níveis atuais de exposição ao BPA são seguros à saúde humana e que continua monitorando os estudos recentes para garantir a segurança dos consumidores (BALUKA; RUMBEIHA, 2016). O banimento uso do BPA em embalagens infantis pela FDA é devido a questões de segurança ou proteção à saúde, e sim em função de pedido do Conselho Americano de Química, pois os consumidores evitavam consumir embalagens nas quais a substância estava presente. A FDA também mantém o limite de não-observação de efeitos adversos em 5 mg/kg corpóreo/dia para o BPA (MANDEL et al., 2019).

Na Europa, a EFSA (*European Food Safety Authority*, autoridade regulatória do bloco econômico) mencionou em 2014 que o BPA não representa risco iminente em nenhuma faixa etária e não representa preocupações devido à exposição agregada - posicionamento muito semelhante ao da FDA. Contraditoriamente, a mesma agência diminuiu o nível de ingestão diária tolerável (TDI, do inglês *tolerable daily intake*) de 50 µg/kg para 4 µg/kg de peso corporal por dia, e mencionou que a exposição diária direta e indireta (devido ao consumo de alimentos, exposição à poeira, cosméticos e papel térmico) está abaixo deste limite de tolerância (BALUKA; RUMBEIHA, 2016). Em 2018 a mesma agência reduziu o limite de migração específica de BPA para plásticos em contato com alimentos para 0,05 mg/kg. No seu relatório mais recente sobre o assunto, adverte a população a serem precavidos com relação a bebês e crianças, uma vez que estudos vem demonstrando efeitos

toxicológicos negativos e apresentado relações com danos fisiológicos irreversíveis (MANDEL et al., 2019).

Em 2010 a agência regulatória para Austrália e Nova Zelândia (*Food Standards Authority for Australia & Zealand*) revisitou uma série de estudos e concluiu que a exposição ao BPA não representa um risco de saúde a nenhum grupo etário (incluindo crianças). Já o Japão conduziu, em 2011, uma avaliação de riscos e concluiu que a exposição atual ao BPA representa um risco muito pequeno, embora os fabricantes de produtos alimentícios tenham excluído o BPA da formulação das embalagens.

Na Coreia, África do Sul e Colômbia, o BPA é de uso restrito e proibido em produtos para armazenamento de alimentos infantis - assim como no Brasil. Outros países presentes do estudo de Baluka e Humbeih (2016), como Índia, Uganda, Nigéria, Camarões, Gana, Nepal, República Popular do Kampuchea e Vietnã, não apresentam legislações que regulamentem o uso do BPA em nenhum caso, bem como algum posicionamento de suas agências regulatórias a respeito.

Fica evidente, então que as legislações regulatórias são presentes em poucos países, enquanto isso o BPA é de uso irrestrito em muitas nações (BALUKA; RUMBEIHA, 2016). Não foram encontradas legislações que definam os limites de aporte deste poluente em ecossistemas aquáticos.

1.2. TRATAMENTO ENZIMÁTICO DO BISFENOL A

Diversos estudos apontam que Bisfenol A pode ser encontrado em ecossistemas aquáticos e nos animais que neles vivem - nos sedimentos destes ambientes, a concentração de BPA é ainda maior (LIU et al., 2021). Altas concentrações são encontradas em esgotos industriais e águas de estações de tratamento (CAREGHINI et al., 2015; MICHAŁOWICZ, 2014). Estudos também apontam a presença não somente do BPA mas também dos seus análogos (substâncias com semelhança estrutural ao BPA, como o Bisfenol S) em diversas embalagens de produtos alimentícios. A atividade humana é a única forma pela qual o Bisfenol A pode ser lançado ao meio ambiente e as águas tratadas são a principal fonte de contaminação da natureza. O sistema de tratamento por lodo ativado, usualmente empregado no Brasil e em outros países é, dentre os processos de tratamento atuais, o mais eficaz em termos remoção do BPA - média de 74,7% de remoção. Entretanto, dada a quantia considerável do contaminante lançada aos esgotos e, corroborado pela determinação frequente do composto em corpos d'água

em diversos estudos pelo mundo, percebe-se que mesmo assim a tecnologia é relativamente ineficiente (WANG et al., 2019).

Existe então uma urgência por inovações em sistemas de tratamento de efluentes que permitam maior eficiência no tratamento de efluentes. Podem ser destacadas algumas técnicas muito eficazes, como ozonólise, oxidação fotocatalítica e oxidação ultrassônica (HUSAIN; QAYYUM, 2013). Entretanto, o tratamento enzimático dos EDCs têm se mostrado uma técnica potencialmente eficaz de degradação por diversos estudos científicos: Trata-se de uma alternativa mais verde, com melhor custo-benefício e que dispensa a utilização de solventes tóxicos ou etapas intermediárias de reação (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018; BILAL; IQBAL; BARCELÓ, 2019; MIR-TUTUSAUS et al., 2018; MORSI et al., 2020). Além disso, pode operar em elevadas ou baixíssimas concentrações de poluentes, ao contrário das bactérias, por exemplo, que operam apenas elevadas concentrações; a tecnologia gera menos lodo; pode operar de forma catalítica (enzimas podem ser “recuperadas” ao final do processo); é aplicável a uma grande variedade de poluentes; entre outros aspectos positivos (MORSI et al., 2020).

Os chamados “fungos de podridão branca”, em inglês *white-rot fungi* (WRF), representam um grupo de fungos majoritariamente basidiomicetos (que pertencem ao filo Basidiomycota) capazes de degradar a lignina presente em estruturas celulares de árvores e plantas. Eles recebem este nome pois a madeira atingida adquire coloração esbranquiçada. As espécies *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor* estão entre as mais estudadas devido ao seu potencial de utilização em processos de biodegradação de poluentes (CAJTHAML, 2015; MIR-TUTUSAUS et al., 2018).

A lignina é um biopolímero extenso e complexo e não pode ser internalizado pelas células dos fungos para ser metabolizada. Como alternativa, são produzidas enzimas extracelulares capazes de catalisar as reações de oxidação do polímero. Estas enzimas, denominadas “modificadoras de lignina” (LME, do inglês *lignin modifying enzymes*) ou ligninolíticas, possuem pouca especificidade ao substrato, podendo ser então empregadas em processos de degradação de uma série de micropoluentes, dentre eles os EDCs – além de reduzir sua atividade estrogênica (GASSARA et al., 2013; KŘESINOVÁ et al., 2018; MIR-TUTUSAUS et al., 2018; SHREVE et al., 2016). São exemplos de LMEs as lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases, entre outras (BILAL et al., 2019; NGUYEN et al., 2013).

As limitações e oportunidades de uso dos WRFs e das LMEs na biorremediação e biodegradação de micropoluentes são extensamente discutidos na literatura: alguns problemas podem estar associados ao tratamento enzimático com fungos, tais como a competição por crescimento em um meio não estéril, estabilidade das enzimas durante o processo de degradação em uma matriz complexa, entre outros. As enzimas podem ser acopladas em outras estruturas como zeólitos ou encapsuladas para estender sua utilidade e resistência, garantindo sua integridade e atividade frente a diversas condições químicas e físicas (BILAL; IQBAL; BARCELÓ, 2019; MIR-TUTUSAUS et al., 2018). Deste estas técnicas está a utilização de cápsulas de microgéis poliméricos, como a poliacrilamida associada a pectina (um polímero natural encontrado em plantas), cuja eficiência de degradação têm se mostrado consideravelmente elevada por diversos estudos (GASSARA et al., 2013).

A literatura acerca dos produtos de degradação do BPA por LMEs oriundas de diversas espécies de fungos, bem como os mecanismos envolvidos no processo é extensa e inconclusiva. Vários estudos mais recentes mostram a formação de dímeros de BPA por meio de ligações C-C e C-O através da atividade catalítica das lacases, podendo gerar oligômeros de maior peso molecular e menor solubilidade no meio, além de outros subprodutos de menor peso molecular que podem ser oxidados, como o 4-isopropenil-fenol (BECK et al., 2018; BILAL; IQBAL; BARCELÓ, 2019; CAJTHAML, 2015). Enquanto isso algumas referências sugerem uma completa mineralização do BPA, ou formação apenas de compostos de menor peso molecular (DAÂSSI et al., 2016; HIRANO et al., 2000; HONGYAN et al., 2019). Cajthaml (2015) propõe em seu trabalho algumas rotas de degradação para EDCs, incluindo o BPA, mostrando os mecanismos de degradação pela atividade das enzimas citadas anteriormente, entre outras. Neste mesmo estudo, é ressaltado o potencial das LMEs de remover a atividade estrogênica do BPA durante o processo de degradação.

1.2.1. LACASES (EC 1.10.3.2)

As lacases (p-difenol: dióxido oxidoreductases) são enzimas oxidases multicópidas produzidas por uma série de seres vivos: plantas, bactérias, fungos e insetos, participando de diversos processos bioquímicos. Mais de 100 lacases foram isoladas de fungos ascomicetos e basidiomicetos, estes últimos extensivamente estudados por sua eficiência em degradar lignina e celulose em gás carbônico (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Embora as lacases possuam menor caráter oxidante que outras enzimas, são alvo de grande parte dos estudos em degradação por sua capacidade de catalisar reações de oxidação de uma grande variedade de compostos orgânicos (BOURBONNAIS; PAICE, 1990) – em sua maioria compostos fenólicos, entretanto sua utilização pode ser estendida a compostos não fenólicos por meio da adição de mediadores, como o ABTS (ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolino-(6)-sulfônico) (RIVERA-HOYOS et al., 2013). A utilização de fungos para o tratamento de poluentes é extremamente vantajosa uma vez que as enzimas ligninolíticas atuam de maneira extracelular, ou seja, em contato direto com o composto que se quer degradar, dispensando etapas de lise celular ou extração (BARRIOS-ESTRADA et al., 2018).

Como mencionado, as lacases catalisam a reação de oxidação de compostos fenólicos, possuindo radicais livres como produtos de reação. Estas enzimas possuem pelo menos um cobre tipo-1 (T1), um tipo-2 (T2) e dois tipo-3 (T3) em sua estrutura. O substrato é então oxidado no T1 e os elétrons são transferidos por meio de uma sequência tripeptídica Hys-Cys-His para os sítios em T2 e T3, onde a redução do oxigênio em água acontece (CATHERINE; PENNINCKX; FRÉDÉRIC, 2016). Nota-se então que a capacidade catalítica destas enzimas é diretamente correlacionada com o potencial redox (E^0) do cobre T1. Estudos apontam que lacases de fungos possuem maior E^0 (próximo de + 800 mV) quando comparadas com as oriundas de outros microrganismos e esta diferença se deve ao elevado grau de conservação das geometrias dos sítios de coordenação do cobre T1 (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

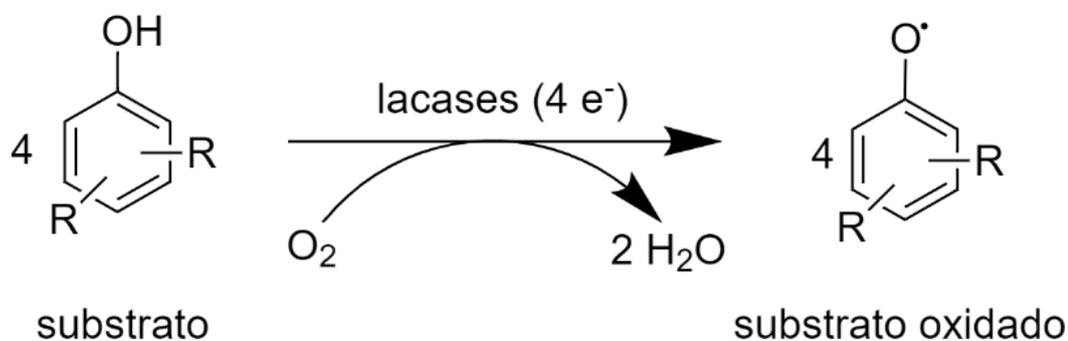


Figura 3: representação da reação catalisada pelas enzimas lacases (Adaptado de CATHERINE; PENNINCKX; FRÉDÉRIC, 2016).

1.2.2. MANGANÊS PEROXIDASE (EC 1.11.1.13)

A Manganês Peroxidase (MnP; Mn(II): hidrogenoperóxido oxirredutase), também conhecida como peroxidase dependente do manganês, é uma enzima capaz

de modificar a lignina considerada uma das primeiras a ser utilizadas na degradação de poluentes (BILAL et al., 2019). Esta hemoproteína é capaz de oxidar o Mn (II) em Mn (III) na presença de peróxido de hidrogênio no meio. O íon Mn(III) é então estabilizado por ácidos orgânicos como o oxalato, e atua como um agente mediador de reações redox, pode se difundir pela membrana celular e ataca moléculas orgânicas de maneira não específica, retirando um elétron e um átomo de hidrogênio das estruturas moleculares (HOFRICHTER, 2002). É importante mencionar que o ciclo catalítico é dependente da presença de peróxido de hidrogênio no meio.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral elucidar o impacto da presença de solventes orgânicos amplamente empregados em laboratórios de química: acetonitrila (ACN) e tetrahidrofurano (THF), na atividade enzimática de lacases e manganês peroxidase, quando são utilizados no preparo de soluções-padrão de Bisfenol A para estudos de degradação utilizando o fungo basidiomiceto *Trametes versicolor*.

Como objetivo específico, busca-se corroborar os estudos recentes no que tange a diminuição de concentração de Bisfenol A devido à ação de enzimas ligninolíticas frente a diferentes estágios de crescimento fúngico, elencando possíveis interferentes orgânicos no processo de biorremediação atrelados à variação de atividade enzimática.

3. METODOLOGIA

No presente trabalho, foi adotada a metodologia descrita abaixo.

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os materiais utilizados no preparo das soluções foram de grau analítico ou superior, com exceção dos compostos-base dos meios de cultura (extrato de malte, peptona bacteriana e ágar). A água utilizada em todos os sistemas obedeceu os padrões classificatórios ASTM Tipo 1 (18.0 MΩ.cm de resistividade elétrica, máximo de 50 µg.L⁻¹ de carbono orgânico total, máximo de 1 µg.L⁻¹ de sódio, cloretos e 3 µg.L⁻¹ de silicatos totais).

3.1.1. SOLUÇÕES PADRÃO

Os materiais utilizados o preparo de soluções padrão foram de elevado grau de pureza (maior que 99%). Os solventes orgânicos utilizados tanto no estudo quanto no preparo de fase móvel foram de grau HPLC.

3.2. INOCULAÇÃO E INCUBAÇÃO

A cepa de *Trametes versicolor* foi adquirida na Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos do Instituto de Botânica de SãoPaulo (CCIBt) e mantido em *Malt Extract Agar 2%* (MEA 2%; 20g de extrato de malte, 20g dextrose anidra, 1g de peptona bacteriana, 7,5g de ágar bacteriológico em 1L de água destilada; esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 20 min) a 4°C. O inóculo fúngico foi crescido em placa de Petri contendo MEA 2% por 7 dias, à 28°C, em incubadora. Assepticamente, 10 discos de meio MEA de 5 mm de diâmetro contendo micélio crescido foram inoculados em frascos tipo erlenmeyer contendo 100 mL de meio enriquecido (ME; extrato de malte 2%, CuSO₄ 0,0049%, K₂HPO₄ 0,02%, MgSO₄ 0,005%, MnSO₄ 0,0016%, sacarose 1,2%, oxalato de amônio 0,1%), incubados por 7 ou 14 dias a 28°C.

3.3. ENSAIO UTILIZANDO ACETONITRILA (ACN)

O bisfenol-A, padrão analítico (Sigma-Aldrich), foi solubilizado em acetonitrila (ACN, grau HPLC) até concentração 1000 mg.L⁻¹. Após 7 dias ou 14 dias de crescimento fúngico, de maneira asséptica os frascos erlenmeyer contendo o meio enriquecido inoculado receberam 100µL da solução de BPA preparada e foram

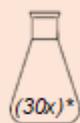
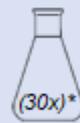
denominados sistemas de tratamento (TR). Como controle abiológico (CA) foram utilizados frascos com o mesmo meio enriquecido sem inoculação 100 µL de solução de BPA e como controle biológico (CB), frascos inoculados sem adição de solução de BPA. Também foram inoculados controles biológicos com solvente (CBX), onde foram adicionados 100 µL de ACN ao meio enriquecido inoculado, com finalidade de comparação de atividade enzimática com os frascos CB. Todo o experimento foi realizado em replicata, para tratamento estatístico dos dados. Os erlenmeyers foram incubados por mais 48 horas sob as mesmas condições de temperatura. Para os monitoramentos da degradação e atividade enzimática, retiraram-se alíquotas logo após adição do padrão, 24 h e 48h após isto. As alíquotas foram estocadas em congelador até que fossem realizadas as análises de atividade enzimática ou de degradação.

3.3.1. ENSAIO UTILIZANDO TETRAHIDROFURANO (THF)

Foi repetido o procedimento adotado no item 3.2.1, porém solubilizou-se o BPA em tetrahidrofurano (THF). Foram apenas performadas análises de atividade de lacases e eficiência de degradação utilizando HPLC-DAD. A tabela 1 representa visualmente os procedimentos adotados.

Tabela 1: Representação visual dos procedimentos de inoculação e incubação adotados.

**Número de replicatas realizadas na etapa.*

Tempo					
<p><i>Trametes versicolor</i> incubado em Placas de Petri, meio MEA por 7 dias a 28°C.</p> 	<p>Estudo THF</p>	<p>10 discos de MEA de 5 mm de diâmetro são adicionados a 100 mL de ME.</p>  <p>(30x)*</p>	7 dias de incubação a 28°C	(5x)* Controle Biológico (CB)	<p>4 mL de amostra foram retiradas de cada frasco no momento da adição de solução/solvente (0h), e após 24 e 48h.</p>  <p>0h 24h 48h</p>
			(5x)* Controle com Solvente (CBX)		
		(5x)* Sistema de Tratamento (TR)			
		14 dias de incubação a 28°C	(5x)* Controle Biológico (CB)		
	(5x)* Controle com Solvente (CBX)				
	(5x)* Sistema de Tratamento (TR)				
<p>Estudo ACN</p>	<p>10 discos de MEA de 5 mm de diâmetro são adicionados a 100 mL de ME.</p>  <p>(30x)*</p>	7 dias de incubação a 28°C	(5x)* Controle Biológico (CB)		
		(5x)* Controle com Solvente (CBX)			
	(5x)* Sistema de Tratamento (TR)				
<p>Controle abiótico (CA) - 100 mL de ME, sem adição de micélio, apenas solução de BPA</p>  <p>(5x)*</p>					

3.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

As análises de atividade enzimática foram realizadas em um espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis da Thermo Fischer Scientific.

3.4.1. LACASES

A atividade de lacases foi determinada pelo aumento de absorbância durante a oxidação do ABTS (ácido 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolino-(6)- sulfônico), em 420 nm ($\epsilon_{420}=36000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por 5 minutos, segundo metodologia descrita por Bourbonnais e Paice (1990). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

3.4.2. MANGANÊS PEROXIDASE

A atividade de manganês peroxidase foi determinada para conforme metodologia descrita por Kuwahara et al. (KUWAHARA et al., 1983), utilizando-se o corante vermelho de fenol como substrato. 1 mL do meio reacional contém 0,3 mL de solução (tampão succinato 0,2 mol.L⁻¹ pH 4,5, lactato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ e albumina de soro bovino a 0,5%), 0,05 mL de solução 2 mmol.L⁻¹ de MnSO₄, 0,1 mL de solução

0,1% de vermelho de fenol, 0,5 mL de extrato enzimático e 0,05 mL de solução 2 mmol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. A reação ocorreu durante 10 minutos, sendo interrompida em períodos de 2 minutos pela adição de 25 µL de solução de hidróxido de sódio (2 mol.L⁻¹). A variação da absorbância foi lida em comprimento de onda de 610 nm. Uma unidade enzimática correspondeu a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de substrato por minuto.

3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Para a avaliação da degradação do BPA, amostras da fase líquida dos cultivos foram filtradas em membrana Millex 0,45µm e adicionadas aos vials; as análises foram realizadas pelo cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Agilent Infinity 1220 com detector arranjos de diodo (DAD), $\lambda=228\text{nm}$, fase móvel (50:50, v/v) acetonitrila (marca JT Baker) e água acitificada com ácido o-fosfórico (LabSynth, 3 mMol.L⁻¹). A coluna utilizada foi Phenomenex Kinetex C18 (30 mm x 2,1mm x 5µ), conforme método descrito por Rosa et al. (SANTOS ROSA, 2018) validado segundo o documento ICH Q2(R1).

Em replicata, frascos contendo 100 mL de ME esterilizado foram contaminados com as soluções de BPA (em ACN e THF) em cabine de fluxo laminar. Realizou-se então as análises segundo método descrito acima 0, 24 e 48 horas após a adição do micropolvente – para o teste de persistência deste em meio ausente de atividade enzimática de lacases e manganês peroxidase.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados foram analisados utilizando o teste-t de Student para determinação de diferenças significativas. O nível de significância utilizado foi $P<0,10$. Também realizou-se a análise de variância (ANOVA) para comparação de atividade enzimática entre os sistemas experimentais, também com $P<0,10$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para todos os casos em que os valores informados seguem de um asterisco (*), os critérios estatísticos estabelecidos não foram atendidos, portanto, estatisticamente há uma significativa diferença entre as determinações.

4.1. LACASES

Os resultados das análises de lacases indicam certo impacto da presença dos solventes na atividade enzimática, como mostrado nos itens seguintes. Existem algumas maneiras pelas quais a atividade enzimática pode ser inibida, mesmo que parcialmente. São elas:

a) *Inibição reversível*: são 3, (1) a competitiva, quando ocorre a presença de uma substância que compete com o substrato pela ligação ao sítio ativo; (2) a não competitiva: quando a substância inibidora se liga em outros sítios no complexo enzima-substrato, diminuindo sua atividade; e (3) a inibição mista, quando um inibidor pode desencadear os dois processos anteriormente citados.

b) *Inibição irreversível*: ocorre quando os inibidores realizam ligações covalentes com a enzima ou acabam destruindo um grupo funcional essencial à sua atividade.

4.1.1. ACETONITRILA

Foram determinados os resultados de atividade enzimática, onde o BPA foi solubilizado em acetonitrila, como mostram a figuras 4 e 5.

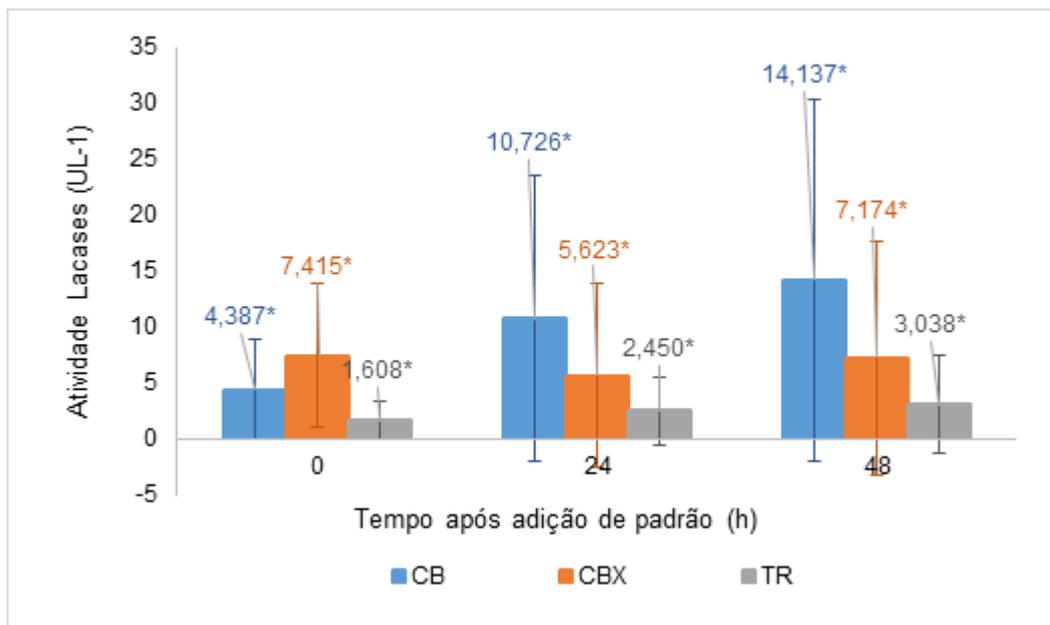


Figura 4: Atividade de lacases após 7 dias de incubação.

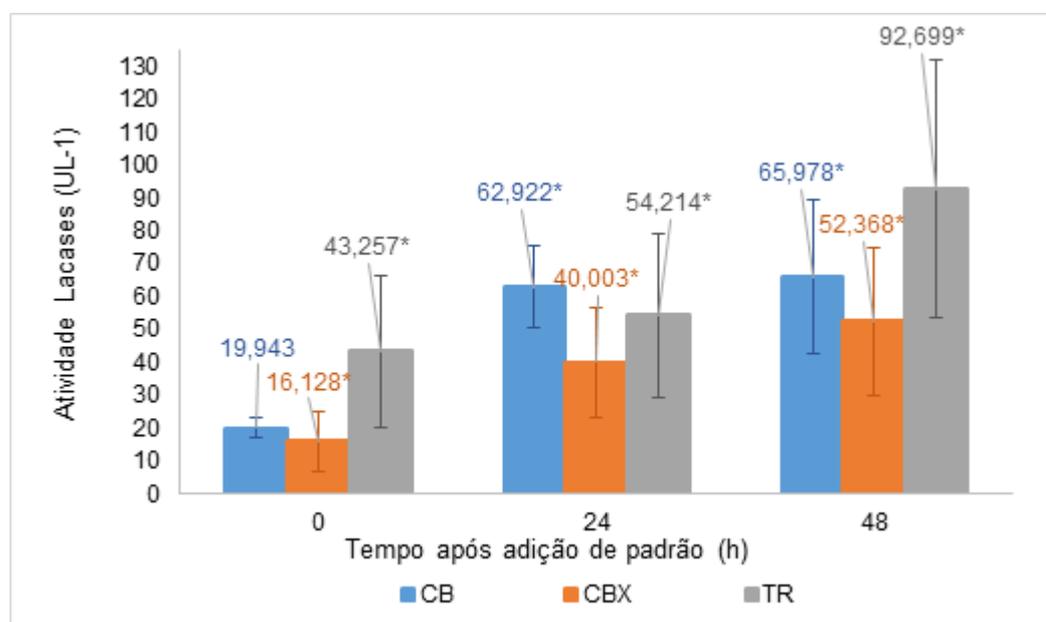


Figura 5: Atividade de lacases após 14 dias de incubação.

A figura 5 sugere que a adição de solvente diminui ligeiramente a atividade enzimática de lacases, uma vez que os frascos com adição de solvente orgânico (CBX) também foram menores que os de controle biológico (CB). Entretanto, os mesmos dados não são significativamente diferentes em 7 dias de crescimento (Figura 4). É possível também observar na figura 5 um aumento substancial da atividade enzimática média frente à adição de padrão de BPA em 0 e 48h, indicando que o poluente pode ter induzido uma maior atividade enzimática (após 14 dias de

incubação), fato que vai ao encontro do descrito por Cajathml (2015). Entretanto o ocorrido não é percebido na figura 4 (7 dias de incubação) sugerindo que diferentes estágios de desenvolvimento do microrganismo podem acarretar respostas divergentes.

4.1.2. TETRAHIDROFURANO

As análises de lacases para o ensaio onde o solvente utilizado foi o tetrahidrofurano estão representadas nas figuras 6 e 7.

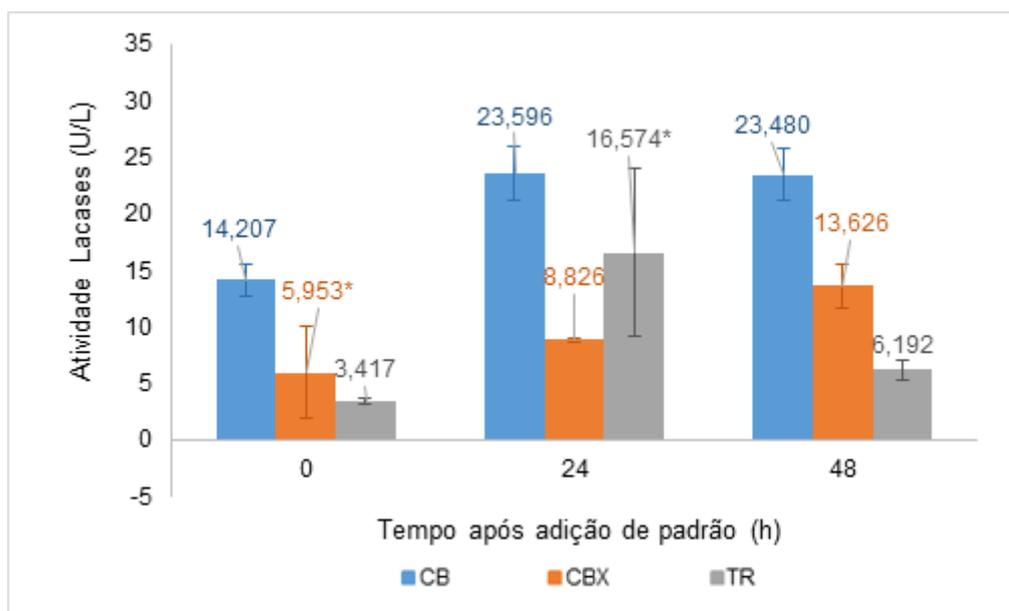


Figura 6: atividade de lacases após 7 dias de incubação.

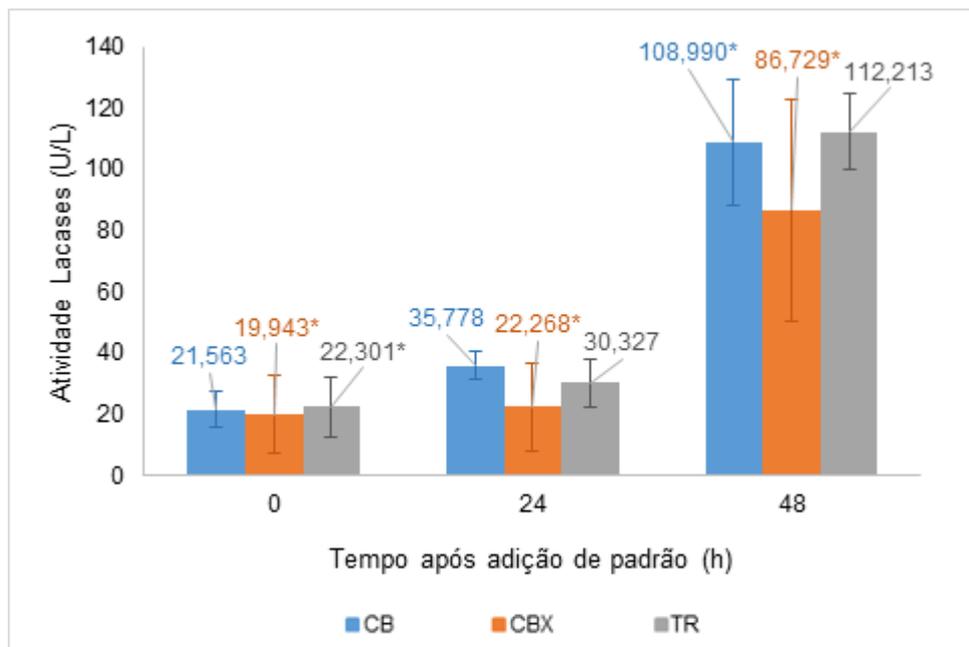


Figura 7: atividade de lacases após 14 dias de incubação.

É notado pela figura 6 que a atividade enzimática também é menor nos sistemas de tratamento que nos controles biológicos, sugerindo que a presença de THF no meio pode ser, em certo grau, inibidora de atividade enzimática. Entretanto, em 14 dias de incubação, não foram encontrados resultados significativamente diferentes entre as amostras de controle biológico e as com adição de THF. Também vale ressaltar que, diferentemente do ensaio com acetonitrila, a adição de solução de BPA (em THF) não induziu maior ou menor atividade enzimática em 7 ou 14 dias de incubação.

4.2. MANGANÊS PEROXIDASE

Os resultados de atividade enzimática para o sistema de tratamento utilizando ACN como solvente estão descritos na figura 8.

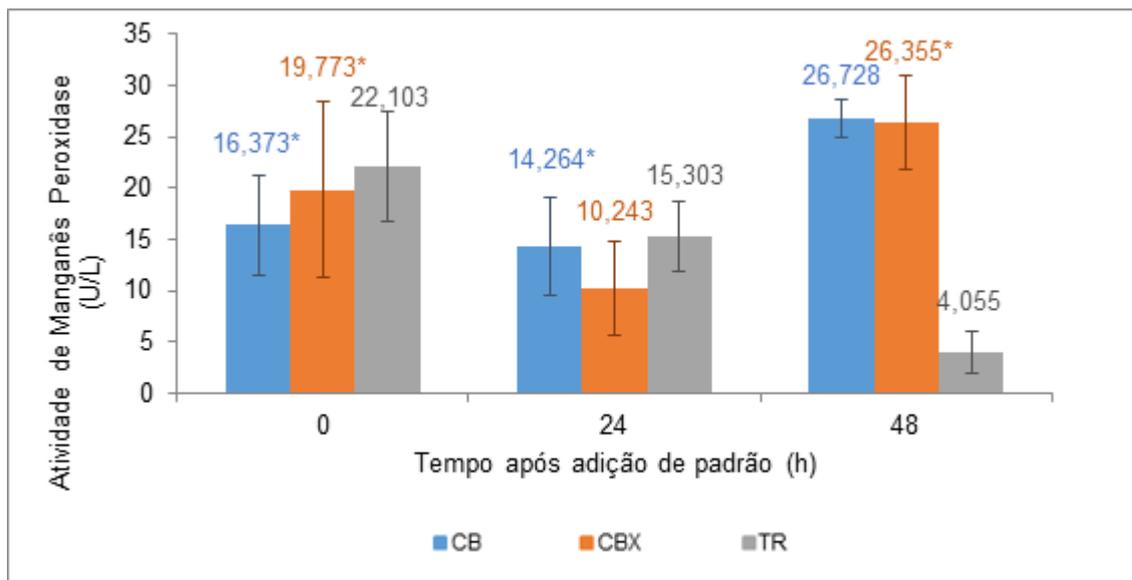


Figura 8: Atividade de Manganês peroxidase para 14 dias de incubação

Percebe-se que a atividade enzimática da MnP decresce com a adição de padrão de BPA, corroborando o relatado por Cajthaml e companheiros (2009) possivelmente devido ao esgotamento do Mn(III) (espécie química mediadora das reações de oxidação). Nota-se também que a adição de solvente no sistema não provoca alterações palpáveis de atividade enzimática no meio.

Não foi possível determinar pelo método utilizado a atividade enzimática de nenhum dos sistemas após 7 dias de incubação.

4.3. DEGRADAÇÃO DO BISFENOL A

A figura 9 demonstra que, nos sistemas onde a atividade enzimática foi maior (14 dias de incubação), a concentração de BPA diminuiu consideravelmente. Mesmo na amostra em 0h, houve uma diminuição quase imediata. A eficácia de degradação neste caso foi de 58,9% para 7 dias, e 93,7% para 14 dias de crescimento.

A determinação da concentração não pode ser realizada para o ensaio utilizando o THF pois os resultados apresentaram ruídos consideráveis, impossibilitando a realização do cálculo da área no cromatograma.

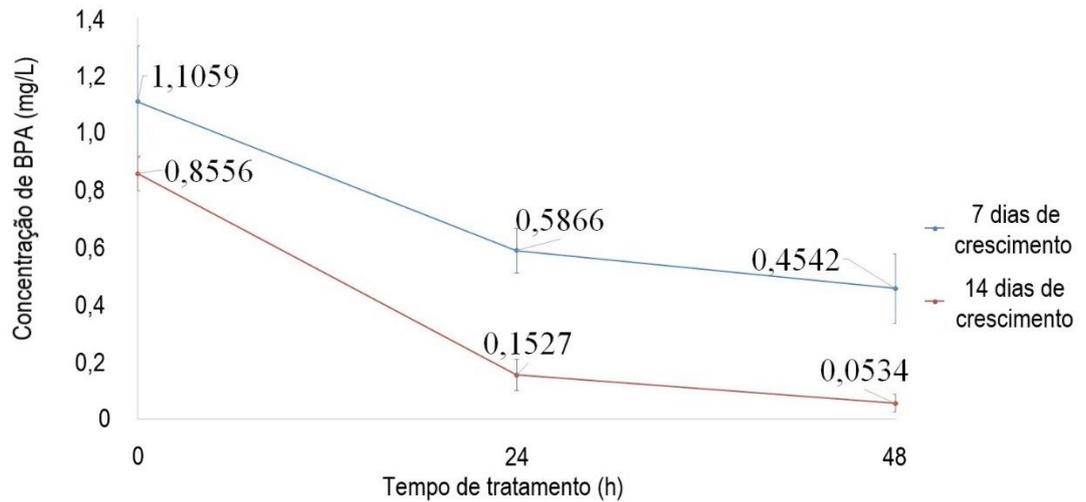


Figura 9: Diminuição da concentração de BPA nos sistemas de tratamento.

A figura 10 demonstra os resultados do teste de permanência do BPA (em ACN) no meio enriquecido. Nota-se que, ausentes as atividades enzimáticas de MnP e Lac, o BPA persiste no meio por, pelo menos 48 horas, evidenciando que o poluente foi degradado devido à ação das enzimas, e não por própria instabilidade química.

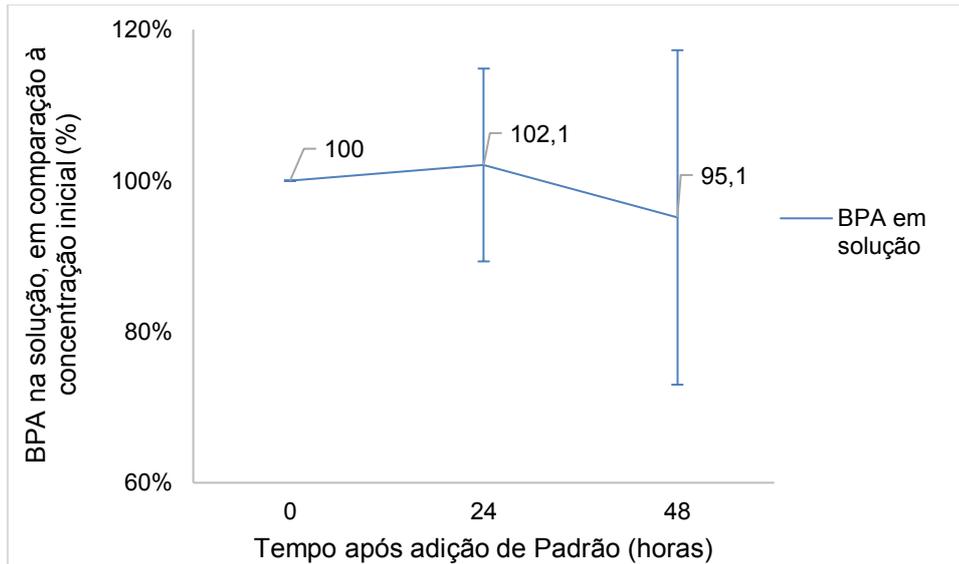


Figura 10: Persistência do BPA em 48 horas de experimento, em meio ME estéril.

5. CONCLUSÕES

Cajthaml (2015) descreve a íntima relação entre a atividade das enzimas ligninolíticas e a eficiência na degradação de disruptores endócrinos em seu trabalho. Devido à elevada atividade destas enzimas ligninolíticas nos resultados apresentados, pode-se corroborar que a espécie de fungo estudada apresenta elevado potencial de degradação de poluentes como o BPA, o que foi corroborado no presente estudo.

O presente estudo não demonstrou evidências sólidas que a adição de ACN ou THF tenham impacto na atividade enzimática de lacases ou manganês peroxidases produzidas pelo fungo *Trametes versicolor*. Entretanto, a adição de ACN pode ter causado a ligeira diminuição de atividade enzimática de lacases em 14 dias de crescimento do fungo, e não desencadeou mudanças significativas de atividade enzimática para a manganês peroxidase. Para o THF, os dados sugerem uma ligeira diminuição após adição do solvente no meio com crescimento após 7 dias. Deve-se então, em trabalhos futuros, desenhar um experimento físico-químico que permita a elucidação da inibição causada pela adição dos solventes em questão na atividade de lacases e manganês peroxidase, e discutir a influência do tempo de incubação dos fungos (i.e. o quão “crescido” está) frente à diminuição da atividade após a adição de solvente ao meio.

Também se conclui que o BPA é um poluente persistente em 48h após seu aporte em um sistema onde não há atividade enzimática suficiente que o degrade, representando então um perigo aos ecossistemas e à saúde humana, devido também à seu aporte contínuo no meio ambiente (MICHAŁOWICZ, 2014).

Por fim, é de suma importância que se conheçam também os produtos de degradação deste processo, dado este que pode ser acessado utilizando técnicas cromatográficas acoplada a espectrometria de massas, uma vez que a literatura não é consistente acerca das rotas metabólicas empregadas pelo fungo durante a degradação, nem acerca dos produtos propriamente ditos – não apenas para o Bisfenol A, mas também para seus compostos análogos que vêm cada vez mais sendo empregados pela indústria, como o Bisfenol S. (CAJTHAML, 2015; CATHERINE; PENNINGX; FRÉDÉRIC, 2016; DE FREITAS et al., 2017; GASSARA et al., 2013; ROCHA et al., 2016)

6. REFERÊNCIAS

- BALUKA, Sylvia Angubua; RUMBEIHA, Wilson K. Bisphenol A and food safety: Lessons from developed to developing countries. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 92, p. 58–63, 2016.
- BARRIOS-ESTRADA, Carlos et al. Potentialities of active membranes with immobilized laccase for Bisphenol A degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 108, p. 837–844, 2018.
- BECK, Samuel et al. Characterization of *Trametes versicolor* laccase-catalyzed degradation of estrogenic pollutants: Substrate limitation and product identification. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 127, p. 146–159, 2018.
- BILA, Daniele Maia; DEZOTTI, Márcia. **DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MEIO AMBIENTE: EFEITOS E CONSEQUÊNCIAS** *Quim. Nova*. [s.l: s.n.].
- BILAL, Muhammad et al. **Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review** *Environment International* Elsevier Ltd, , 2019.
- BILAL, Muhammad; IQBAL, Hafiz M. N.; BARCELÓ, Damiá. **Mitigation of bisphenol A using an array of laccase-based robust bio-catalytic cues – A review** *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 2019.
- BOURBONNAIS, Robert; PAICE, Michael G. **Oxidation of non-phenolic substrates An expanded role for lactase in lignin biodegradation**. [s.l: s.n.].
- CAJTHAML, Tomáš et al. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. **Chemosphere**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 745–750, 2009.
- CAJTHAML, Tomáš. **Biodegradation of endocrine-disrupting compounds by ligninolytic fungi: Mechanisms involved in the degradation** *Environmental Microbiology* Blackwell Publishing Ltd, , 2015.
- CAREGHINI, Alessandro et al. Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 5711–5741, 2015.
- CATHERINE, Hautphenne; PENNINCKX, Michel; FRÉDÉRIC, Debaste. **Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review** *Environmental Technology and Innovation* Elsevier, , 2016.
- CRISP, Thomas M. et al. Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 106, n. SUPPL. 1, p. 11–56, 1998.
- DAÂSSI, Dalel et al. Degradation of bisphenol A by different fungal laccases and identification of its degradation products. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 110, p. 181–188, 2016.
- DARBRE, Philippa D. **The history of endocrine-disrupting chemicals** *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* Elsevier Ltd, , 2019.

DE FREITAS, Emanuelle Neiverth et al. Removal of bisphenol A by laccases from *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and evaluation of ecotoxicity of degradation products. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 330, p. 1361–1369, 2017.

FLINT, Shelby et al. **Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective***Journal of Environmental Management*, 2012.

GASSARA, Fatma et al. Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes. **Chemosphere**, [s. l.], v. 92, n. 10, p. 1356–1360, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653513004451>>. Acesso em: 6 abr. 2018.

GHISELLI, Gislaine; JARDIM, Wilson F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300032&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 1 nov. 2020.

GOGOI, Anindita et al. **Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review***Groundwater for Sustainable Development*Elsevier B.V., , 2018.

HIRANO, Taeko et al. Degradation of bisphenol a by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *pleurotus oslrearus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 9, p. 1958–1962, 2000.

HOFRICHTER, Martin. **Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/enzymictec>.

HONGYAN, Liu et al. Study on transformation and degradation of bisphenol A by *Trametes versicolor* laccase and simulation of molecular docking. **Chemosphere**, [s. l.], v. 224, p. 743–750, 2019.

HUSAIN, Qayyum; QAYYUM, Shariq. **Biological and enzymatic treatment of bisphenol A and other endocrine disrupting compounds: A review***Critical Reviews in Biotechnology*, 2013.

KŘESINOVÁ, Zdena et al. Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. **New Biotechnology**, [s. l.], v. 43, p. 53–61, 2018.

KUWAHARA, Masaaki et al. **Separation and characterization of two extracellular HZOZ-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium***. [s.l: s.n.].

LIU, Jianchao et al. Occurrence, toxicity and ecological risk of Bisphenol A analogues in aquatic environment – A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 208, 2021.

MANDEL, Nicolas D. et al. Challenges to regulate products containing bisphenol A: Implications for policy. **Salud Publica de Mexico**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 692–697, 2019.

MICHAŁOWICZ, Jaromir. **Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation***Environmental Toxicology and Pharmacology*Elsevier, , 2014.

MIR-TUTUSAUS, Josep Anton et al. **Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review***Water Research* Elsevier Ltd, , 2018.

MORSI, Rana et al. **Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants***Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 2020.

NGUYEN, Luong N. et al. Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 148, p. 234–241, 2013.

PONTELLI, Regina C. N. et al. The role of endocrine disruptors in ocular surface diseases. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 122, p. 157–164, 2019.

RIVERA-HOYOS, Claudia M. et al. **Fungal laccases***Fungal Biology Reviews*, 2013.

ROCHA, Bruno Alves et al. A fast method for bisphenol A and six analogues (S, F, Z, P, AF, AP) determination in urine samples based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, [s. l.], v. 154, p. 511–519, 2016.

ROCHESTER, Johanna R. **Bisphenol A and human health: A review of the literature***Reproductive Toxicology*, 2013.

RUSSO, Giacomo et al. **Occurrence of Bisphenol A and its analogues in some foodstuff marketed in Europe***Food and Chemical Toxicology* Elsevier Ltd, , 2019.

SANTOS ROSA, Derval Dos. Degradation study of BPA-containing plastics in water samples collected from an urban reservoir. **International Journal of Hydrology**, [s. l.], v. 2, n. 3, 2018.

SHREVE, Michael J. et al. The white-rot fungus *Trametes versicolor* reduces the estrogenic activity of a mixture of emerging contaminants in wastewater treatment plant effluent. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 109, p. 132–140, 2016.

VIEIRA, Wedja Timóteo et al. Endocrine-disrupting compounds: Occurrence, detection methods, effects and promising treatment pathways—A critical review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], p. 104558, 2020.

WANG, Hao et al. **Insights into removal mechanisms of bisphenol A and its analogues in municipal wastewater treatment plants***Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 2019.

WANG, I. Jen; CHEN, Chia Yang; BORNEHAG, Carl Gustaf. Bisphenol A exposure may increase the risk of development of atopic disorders in children. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [s. l.], v. 219, n. 3, p. 311–316, 2016.