



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

THALYTA ARAUJO DA SILVA

TRANSFORMANDO RESÍDUOS EM SOLUÇÃO: APLICAÇÃO DA LACASE DE
Penaeus vannamei NA DEGRADAÇÃO DE ESTROGÊNIO SINTÉTICO

Recife

2025

THALYTA ARAUJO DA SILVA

TRANSFORMANDO RESÍDUOS EM SOLUÇÃO: APLICAÇÃO DA LACASE DE
Penaeus vannamei NA DEGRADAÇÃO DE ESTROGÊNIO SINTÉTICO

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado ao Bacharelado em Ciências
Biológicas com ênfase em Ciências
Ambientais da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel.

Orientador: Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra
Coorientadora: Me. Amanda Barbosa da Rocha

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Thalyta Araujo da .

TRANSFORMANDO RESÍDUOS EM SOLUÇÃO: APLICAÇÃO DA
LACASE DE *Penaeus vannamei* NA DEGRADAÇÃO DE ESTROGÊNIO
SINTÉTICO / Thalyta Araujo da Silva. - Recife, 2025.

64 : il., tab.

Orientador(a): Ranilson de Souza Bezerra

Coorientador(a): Amanda Barbosa da Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. Bioquímica . 2. Sustentabilidade . 3. Enzimas. 4. Carcinicultura. 5.
Biorremediação . 6. Hormônio . I. Bezerra, Ranilson de Souza. (Orientação). II.
Rocha, Amanda Barbosa da. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

THALYTA ARAUJO DA SILVA

TRANSFORMANDO RESÍDUOS EM SOLUÇÃO: APLICAÇÃO DA LACASE DE
Penaeus vannamei NA DEGRADAÇÃO DE ESTROGÊNIO SINTÉTICO

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado ao Bacharelado em Ciências
Biológicas com ênfase em Ciências
Ambientais da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: 31/07/2025

COMISSÃO EXAMINADORA

Me. Amanda Barbosa da Rocha
Universidade Federal de Pernambuco

Me. Ariadja Monique de Sá Vanderley
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Me. Rianne Ferreira Felix
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2025

A quem sempre sentiu orgulho ao me chamar de universitária,
agora poderá me chamar de bióloga. Este espaço, que hoje
ocupo graças às suas renúncias, lutas e esperança,
dedico a vocês. Obrigada, mainha e painho.

AGRADECIMENTOS

Posso dizer que o caminho não foi fácil, e um pouco mais longo do que o previsto, mas finalmente estou diante do fim de um ciclo que me moldou como pessoa e vem me ensinando que o esforço compensa e dignifica. Essa conquista não é singular, é plural.

Agradeço, primeiramente, ao autor da minha história neste curso: Deus. Com sua bondade, sabedoria e paciência, Ele me deu condições, esteve comigo ao entrar pelas portas desta Universidade e agora está ao meu lado enquanto sigo para trilhar o meu caminho.

Aos meus pais, Joaquim e Aurea, dois trabalhadores incansáveis que, mesmo sem terem tido a oportunidade de se formar, fizeram de tudo para que eu pudesse. E a vovó, Severina, que com sua força e sabedoria ajudou a me criar e a moldar quem eu sou. Vocês podem ver o diploma com o meu nome, mas sempre vou ler com o de vocês.

Aos meus irmãos, Lane e Talinho, pelas conversas e risadas, as quais foram essenciais durante esse tempo. Obrigada por tornarem os momentos difíceis mais tranquilos e por estarem sempre por perto, mesmo nos silêncios.

À Josefa, que foi uma segunda mãe para mim, me ensinou a ler e a escrever, guiando o meu primeiro contato com a educação. Sua presença foi fundamental nos meus primeiros passos e continuará comigo por toda a vida.

Ao meu namorado e melhor amigo, João, que sempre acreditou em mim mais do que eu mesma, disponibilizando seu abraço, palavras de conforto e nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Este sempre vai ser um dos maiores atos de amor que poderia fazer por mim. Agradeço também à sua família, que se tornou a minha, especialmente enquanto a minha estava a quilômetros de distância, deixando os momentos difíceis mais acolhedores.

À irmã que a vida me deu, Amanda Laís, que me mostrou na prática, durante 18 anos de amizade, o que é o Provérbios 17:17, *“Em todo tempo ama o amigo, e para a hora da angústia nasce o irmão.”* Obrigada por estar sempre ao meu lado, com amor e apoio incondicionais.

Aos meus amigos Duda, Igor, Josi, Milena, Rauane e Vanessa, foi com vocês que percebi que os laços podem nascer no meio da exaustão, dos prazos apertados e dos sonhos em construção. Levarei comigo a alegria de ter vivido ao lado de pessoas tão especiais.

À minha coorientadora e amiga, Amanda Barbosa, um dos principais pilares deste trabalho. Amanda sempre foi gentil, paciente e muito comprometida, tive o privilégio de aprender com alguém que possui não apenas o dom, mas também o prazer de ensinar. Serei sempre grata por todo apoio e dedicação.

Ao professor Ranilson, por ter me recebido de braços abertos no Labenz e me orientado ao longo de toda esta jornada.

Aos lugares que me receberam e contribuíram para que eu me tornasse uma profissional melhor, meu sincero agradecimento ao Hospital das Clínicas/SOST da UFPE, à Diretoria de Meio Ambiente (DMA) da UFPE, ao Instituto Avançado de Tecnologia e Inovação (IATI) e ao Laboratório de Enzimologia (Labenz).

Por fim, a todas as pessoas que, de alguma forma, caminharam ao meu lado durante essa trajetória: deixo aqui minha profunda gratidão. Cada gesto de apoio, cada palavra de incentivo e cada demonstração de afeto foram essenciais. Afinal, não caminhei só, e por isso cheguei até aqui.

“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente
entendam que a mão do Senhor fez isso.”

Isaías 41:20

RESUMO

A crescente presença de estrogênios sintéticos em ambientes aquáticos tem levantado preocupações ambientais e sanitárias, especialmente devido à capacidade desses compostos de atuarem como desreguladores endócrinos mesmo em baixas concentrações. O 17 β -estradiol (E2), em particular, destaca-se por sua alta atividade estrogênica, persistência ambiental e baixa remoção por tratamentos convencionais. Diante dessa problemática, este trabalho avaliou a capacidade da enzima lacase, extraída do hepatopâncreas do camarão *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), em degradar o E2 em condições laboratoriais. Essa lacase, proveniente de resíduos da carcinicultura, representa uma alternativa sustentável e inovadora para a biorremediação de micropoluentes. A enzima foi purificada por cromatografia de afinidade com Concanavalina A, atingindo um rendimento de 52,46%, o que demonstra uma extração eficaz em etapa única. Em seguida, a lacase foi imobilizada em quitosana magnetizada, obtendo-se excelente eficiência (93,33%) e rendimento de imobilização (80%), o que confirma a estabilidade e o potencial de reutilização do biocatalisador. Foram conduzidos ensaios de degradação do E2 utilizando lacase nas formas livre e imobilizada, sob diferentes concentrações do hormônio (25, 50 e 100 mg/L). Os testes demonstraram que a lacase é capaz de degradar significativamente o E2, principalmente em concentrações mais baixas. A degradação mais expressiva foi observada com lacase livre na concentração de 25 mg/L, sugerindo que o desempenho enzimático é influenciado diretamente pela concentração do substrato. A imobilização, embora apresente leve redução de atividade, foi vantajosa para aplicações repetidas, oferecendo estabilidade e viabilidade operacional. Além disso, o estudo destaca que o uso dessa enzima animal dispensa o uso de mediadores redox, geralmente necessários para ampliar a ação das lacases, o que reduz o custo e complexidade do processo. Os dados obtidos em análises espectrofotométricas preliminares, indicam fortemente o potencial da lacase de *P. vannamei* como ferramenta eficiente na degradação de compostos hormonais, contribuindo para a redução da carga de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos. A proposta deste trabalho ganha relevância não apenas pelo ineditismo do uso dessa enzima específica, mas também pela valorização de um resíduo da indústria do camarão, setor amplamente desenvolvido no Nordeste do Brasil. Ao transformar resíduos em solução, este estudo contribui para a economia circular, sustentabilidade ambiental e desenvolvimento de novas abordagens biotecnológicas voltadas ao tratamento de efluentes.

Palavras-chave: Enzima. Biorremediação. Estradiol. Micropoluente. Sustentabilidade.

ABSTRACT

The increasing presence of synthetic estrogens in aquatic environments has raised environmental and public health concerns, particularly due to these compounds' ability to act as endocrine disruptors even at low concentrations. Among them, 17 β -estradiol (E2) stands out for its high estrogenic activity, environmental persistence, and low removal efficiency by conventional treatment methods. In response to this issue, this study evaluated the capacity of the enzyme laccase, extracted from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Boone, 1931), to degrade E2 under laboratory conditions. This laccase, derived from aquaculture waste, represents a sustainable and innovative alternative for the bioremediation of micropollutants. The enzyme was purified by affinity chromatography using Concanavalin A, achieving a yield of 52.46%, indicating effective extraction in a single step. Subsequently, the laccase was immobilized in magnetized chitosan, achieving excellent efficiency (93.33%) and immobilization yield (80%), confirming the biocatalyst's stability and reuse potential. E2 degradation assays were carried out using both free and immobilized laccase at different hormone concentrations (25, 50, and 100 mg/L). The results showed that laccase was capable of significantly degrading E2, especially at lower concentrations. The highest degradation rate was observed with free laccase at 25 mg/L, suggesting that enzymatic performance is directly influenced by substrate concentration. Although immobilization caused a slight reduction in activity, it proved advantageous for repeated applications, offering operational stability and feasibility. Furthermore, the study highlights that the use of this animal-derived enzyme eliminates the need for redox mediators, typically required to enhance laccase activity, which reduces both cost and process complexity. The preliminary spectrophotometric analyses strongly indicate the potential of *P. vannamei* laccase as an efficient tool for the degradation of hormonal compounds, contributing to the reduction of emerging contaminants in aquatic environments. This study is relevant not only for the novelty of using this specific enzyme but also for the valorization of waste from the shrimp industry, a sector widely developed in northeastern Brazil. By turning waste into a solution, this work contributes to the circular economy, environmental sustainability, and the development of new biotechnological approaches for wastewater treatment.

Keywords: Enzyme. Bioremediation. Estradiol. Micropollutant. Sustainability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura molecular geral dos estrogênio e do 17 β -estradiol	23
Figura 2 –	Atividade catalítica das lacases	28
Figura 3 –	Esquema dos centros catalíticos das lacases	29
Figura 4 –	Atividade da lacase pelo uso de LMS	30
Gráfico 1 –	Eluição da lacase pela presença de sacarose	40
Figura 5 –	SDS-PAGE da purificação enzimática	41
Figura 6 –	Representação da imobilização da lacase em quitosana	42
Gráfico 2 –	Representação gráfica dos parâmetros de rendimento de imobilização	43
Gráfico 3 –	Espectro de absorbância do 17 β -estradiol	45
Gráfico 4 –	Degradação do E2 na concentração de 25 mg/L	45
Gráfico 5 –	Degradação do E2 na concentração de 50 mg/L	46
Gráfico 6 –	Degradação do E2 na concentração de 100 mg/L	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Propriedades físico-químicas do 17 β -estradiol	24
Tabela 2 –	Tabela de purificação	39
Tabela 3 –	Eficiência e rendimento	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de Soro Bovino
CES	Contaminantes Emergentes
ConA	Concanavalina A
DEs	Desreguladores Endócrinos
E2	17 β -estradiol
EC	Eficiência de Carga
ERs	Receptores Nucleares de Estrogênio
ER α	Receptor Nuclear de Estrogênio (alfa)
ETEs	Estação de Tratamento de Efluentes
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
Labenz	Laboratório de Enzimologia
LMS	Sistema Lacase Mediador
OMS	Organização Mundial de Saúde
PACs	Compostos Farmacêuticos
PCPs	Produtos de Higiene e Cuidados Pessoais
RI	Rendimento de Imobilização
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
UE	União Europeia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

LISTA DE SÍMBOLOS

E^0	Potencial Redox
H_2O	Molécula de Água
O_2	Oxigênio molecular
$\log K_{ow}$	Logaritmo do Coeficiente de Partição Octanol-Água
-OH	Hidroxila
Cu	Elemento Cobre
T1	Cobre T1
T2	Cobre T2
T3	Cobre T3
pH	Potencial Hidrogeniônico
NaCl	Cloreto de Sódio
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
$MnCl_2$	Cloreto de Manganês (II)
$C_{12}H_{22}O_{11}$	Sacarose
$FeCl_2$	Cloreto de Ferro (II)
$FeCl_3$	Cloreto de Ferro (III)
NaOH	Hidróxido de Sódio
Mn^{2+}	Íon Manganês (estado de oxidação 2+)
Ca^{2+}	Íon Cálcio (estado de oxidação 2+)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
M	Molaridade
mM	Milimolar
mg/mL	Miligrama por mililitro
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
kDa	Kilodalton
μL	Microlitro
HCl	Ácido Clorídrico
g/L	Gramas por Litro
g/mol	Gramas por mol
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mU	Miliunidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS, PROBLEMA E HIPÓTESES	19
2.1	OBJETIVOS	19
2.1.1	Objetivo geral	19
2.1.2	Objetivos específicos	19
2.2	PROBLEMA DE PESQUISA	19
2.3	HIPÓTESES	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	CONTAMINANTES EMERGENTES E DESREGULADORES ENDÓCRINOS	21
3.2	DESCRIÇÃO DO 17 β -estradiol	23
3.3	MECANISMO DE AÇÃO AMBIENTAL DO 17 β -estradiol	24
3.4	BIORREMEDIAÇÃO ENZIMÁTICA	26
3.5	ESTRUTURA DAS LACASE	27
3.6	POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LACASES	31
3.7	LACASE DO CAMARÃO <i>Penaeus vannamei</i>	31
4	METODOLOGIA	34
4.1	PURIFICAÇÃO DA LACASE	34
4.1.1	Obtenção do material animal	34
4.1.2	Preparo do extrato	34
4.1.3	Protocolo de purificação da lacase	34
4.1.4	Monitoramento da purificação da lacase por SDS-PAGE	35
4.1.5	Ensaio de atividade da lacase	35
4.1.6	Quantificação de proteínas totais	35
4.2	PREPARO DA QUITOSANA E IMOBILIZAÇÃO DA LACASE	36
4.2.1	Purificação da quitosana	36
4.2.2	Preparo da quitosana magnetizada	36
4.2.3	Ativação da quitosana magnetizada	36
4.2.4	Determinação do tempo de imobilização da lacase na quitosana	37
4.3	DEGRADAÇÃO DO ESTROGÊNIO	38
4.3.1	Preparo das amostras de 17 β -estradiol	38

4.3.2	Ensaio de degradação do 17 β -estradiol	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1	PURIFICAÇÃO DA LACASE	39
5.2	IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM QUITOSANA	41
5.3	DEGRADAÇÃO DO 17 β -estradiol	44
5.3.1	Ensaio de degradação do 17 β -estradiol	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
6.1	CONCLUSÕES	49
6.2	LIMITAÇÕES DA PESQUISA	49
6.3	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	49
	REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A água, em condições adequadas, é essencial para a manutenção da vida, tornando sua pureza e acessibilidade temas de grande relevância. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo de água contaminada é responsável por aproximadamente 40% das doenças no mundo. Apesar das diversas iniciativas destinadas à preservação dos recursos hídricos, os impactos provocados por ações antrópicas continuam comprometendo a integridade dos corpos d'água, configurando um sério desafio ambiental e de saúde pública (Arnold *et al.*, 2014).

Em escala global, a poluição contínua de ambientes aquáticos por substâncias químicas de origem humana e animal têm prejudicado os ecossistemas devido à sua elevada toxicidade e resistência à degradação (Johnson e Willams, 2004; Shaheen *et al.*, 2022). Nesse contexto, compostos de origem natural ou sintética, entre eles os desreguladores endócrinos (DEs), como os hormônios esteróides, são considerados contaminantes emergentes (CEs) e constituem as principais fontes de micropoluentes presentes na água, sendo detectados em concentrações que variam de nanogramas a gramas por litro (Kim e Zoh, 2016; Kanaujiya *et al.*, 2019). A alta periculosidade desses contaminantes é amplamente reconhecida como um risco significativo tanto para o equilíbrio ambiental quanto para saúde humana.

Diversas entidades internacionais como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), a União Europeia (UE), a OMS e o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), têm estabelecido diretrizes para o controle da contaminação por micropoluentes em áreas e ecossistemas aquáticos (Ahmed *et al.*, 2017). Apesar disso, ainda não existem padrões globais claros para descarte seguro da maioria das substâncias. Como medida de controle, a UE elaborou a Diretiva-Quadro da Água (2000/60/CE), que identifica 45 substâncias prioritárias, incluindo os DEs, com orientações para sua remoção antes da liberação de efluentes. Complementarmente, a Decisão 2015/495/UE introduziu uma lista de monitoramento contendo diversos compostos, entre eles o 17 β -estradiol (E2), reforçando a necessidade de vigilância contínua sobre esses poluentes de baixa concentração (Barbosa *et al.*, 2016). No entanto, no Brasil, ainda não há nenhuma norma específica que limite a concentração de estrogênio em água ou efluente, o que evidencia uma lacuna regulatória importante frente aos riscos ambientais associados a esses compostos.

O E2 é um dos compostos estrogênicos mais frequentemente detectados em efluentes (Racz e Goel, 2010). Esse hormônio sexual feminino, essencial para a regulação de diversas funções fisiológicas, pode ser eliminado por humanos e animais através de processos

metabólicos (Desbrow *et al.*, 1998) em proporções variadas, de acordo com aspectos como faixa etária (Zheng *et al.*, 2008). No ambiente, o E2 possui alta atividade estrogênica (Conroy *et al.*, 2007), ligando-se a receptores de estrogênio em organismos vivos e atuando como um imitador ou inibidor dos estrogênios naturais, interferindo em seus mecanismos biológicos (Miège *et al.*, 2009).

As características físico-químicas do E2, como a baixa solubilidade em água (Ghiselli e Jardim 2007), caráter hidrofóbico e reduzida volatilidade (Silva *et al.*, 2012), contribuem para sua persistência no ambiente e potencial de bioacumulação. A exposição a esse composto está associada a distúrbios reprodutivos em peixes e mamíferos (Tetreault *et al.*, 2011; Meyer *et al.*, 2019), além de aumentar o nível de infertilidade (Balabanič *et al.*, 2011), câncer (Xu *et al.*, 2013), obesidade e anomalias (Fernandez *et al.*, 2007).

A presença de estrogênios têm sido identificada em recursos hídricos situados nas proximidades de Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs), Estações de Tratamento de Águas Residuais e áreas com aplicação de resíduos de origem animal. Esses compostos podem ser detectados em águas subterrâneas, infiltradas no solo, fluxos de escoamento de regiões agrícolas e corpos d'água superficiais (Adeel *et al.*, 2017). Grande parte das estações de tratamento convencionais não possui sistemas efetivos na remoção desses poluentes em baixa concentração, o que contribui para a disseminação de contaminantes no meio ambiente (Tijani *et al.*, 2013). Sob esse enfoque, a modernização das técnicas e dos métodos aplicados no tratamento de efluentes pode minimizar a descarga desses compostos em corpos hídricos e promover uma melhoria significativa na qualidade da água tratada.

Atualmente, embora o tratamento de lodo ativado seja o método mais utilizado globalmente para o tratamento de águas, ele não é considerado uma solução ambientalmente sustentável nem energeticamente eficiente. Isso ocorre devido ao seu elevado consumo de energia e a produção excessiva de lodo residual, que pode gerar impactos negativos no meio ambiente (Feng *et al.*, 2025). Diante dessas limitações, estudos indicam que enzimas, por atuarem como catalisadores biológicos, são capazes de degradar de forma eficiente contaminantes presentes em ambientes aquáticos (Kang *et al.*, 2023; Rybarczyk *et al.*, 2023). Nesse contexto, destacam-se as lacases, proteínas catalíticas versáteis que promovem reações de oxidação em uma variedade de micropoluentes (Wong, 2008), tornando-se promissoras para a descontaminação de corpos hídricos. Complementando essa abordagem, Feng *et al.* (2025) indicam que o aproveitamento de resíduos orgânicos como fontes alternativas de enzimas representa uma estratégia inovadora e sustentável, visto que materiais descartados de

origem animal, vegetal e microbiana podem ser utilizados na produção enzimática voltada ao tratamento de efluentes.

Corroborando esta perspectiva, Rocha *et al.* (2023) demonstraram o potencial da lacase extraída de resíduos do camarão *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), apontando-a como alternativa ecológica promissora para biorremediação de ambientes contaminados por petróleo. Considerando que o *P. vannamei* está entre as espécies mais cultivadas no Brasil (IBGE 2024), o seu processamento gera, conseqüentemente, um alto volume de resíduos (Bhaskar *et al.*, 2007), tornando imprescindível o aproveitamento deste material para o desenvolvimento de novas aplicações. Assim, havendo a necessidade de explorar as aplicações e eficiências desta lacase, o presente estudo visa utilizar a lacase extraída do *P. vannamei* para degradar o estrogênio 17 β -estradiol em condições laboratoriais, a fim de minimizar os impactos ambientais associados ao descarte desta substância.

2. OBJETIVOS, PROBLEMA E HIPÓTESES

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da lacase obtida do subproduto do camarão *Penaeus vannamei*, na forma livre e imobilizada em quitosana magnetizada, na degradação do estrogênio 17 β -estradiol em condições laboratoriais.

2.1.2 Objetivos específicos

- Purificar a enzima lacase do hepatopâncreas do *P.vannamei*;
- Verificar a atividade da lacase por meio de análise espectrofotométrica;
- Imobilizar a lacase em quitosana magnetizada e determinar as melhores condições para imobilização;
- Avaliar a eficiência de degradação do 17 β -estradiol pela lacase livre e imobilizada, sob diferentes concentrações;
- Analisar eficácia da degradação.

2.2 PROBLEMA DE PESQUISA

De acordo com Georgin *et al.* (2024), mesmo em concentrações baixas, os hormônios são classificados como contaminantes emergentes e representam uma ameaça significativa à saúde dos ecossistemas aquáticos e dos seres vivos. Dentre esses compostos o E2 se destaca por seus efeitos adversos e por sua permanência mesmo após tratamento convencional de águas (Almazrouei *et al.*, 2023). Enquanto a aplicação de enzimas lacases fúngicas tem sido explorada na biorremediação de estrogênios (Savinova *et al.*, 2022), sua instabilidade e custo operacional limitam o uso em larga escala (Zdarta *et al.*, 2020; Wadhwa *et al.*, 2023). Até o momento, apenas um estudo na literatura científica descreve a degradação de poluentes através de lacase do camarão *P. vannamei* (Rocha *et al.*, 2023), o que torna esse campo ainda pouco explorado. Diante disso, questiona-se se a lacase proveniente no camarão branco do pacífico é capaz de degradar o estrogênio 17 β -estradiol em condições laboratoriais.

2.3 HIPÓTESES

- H1: A enzima lacase presente no hepatopâncreas de *P.vannamei* apresenta atividade enzimática detectável.
- H2: A enzima lacase ser capaz de degradar o E2 de forma significativa.
- H3: A eficiência da degradação varia conforme condições de incubação (imobilização e tempo).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CONTAMINANTES EMERGENTES E DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Segundo Petrović, González e Barceló (2003), os contaminantes emergentes (CEs) correspondem a substâncias e produtos, de origem natural ou sintética, sem regulamentação legal específica, embora sua normatização seja considerada necessária diante dos potenciais riscos que representam a saúde e ao meio ambiente. Nos últimos anos, os CEs passaram a ser reconhecidos como uma fonte significativa de poluição dos recursos hídricos, sendo detectados em águas residuais, superficiais e na água potável (Chen *et al.*, 2022).

Entre os principais grupos de CEs destacam-se os desreguladores endócrinos (DEs), compostos farmacêuticos (PACs) e elementos químicos presentes em produtos de higiene e cuidados pessoais (PCPs), como benzofenona-1 e bisfenol A (Hordern *et al.*, 2009), têm atraído crescente atenção científica devido ao seu uso intensivo pela população (Prajapati *et al.*, 2023). Esses contaminantes são frequentemente introduzidos no ambiente por meio dos efluentes de estações de tratamento de águas residuais urbanas e outras formas. Resíduos de origem animal, por exemplo, também constituem fontes relevantes desses poluentes, incluindo hormônio naturais e sintéticos oriundos de uso doméstico, de laboratórios, hospitais e de indústrias (Lin e Tsai, 2009).

Em razão do uso generalizado de produtos que contêm essas substâncias, os CEs são lançados continuamente no ambiente, mesmo que em concentrações reduzidas. Sua persistência, a capacidade de formar complexos e o elevado potencial de bioacumulação podem gerar efeitos crônicos importantes em organismos expostos por longos períodos (Rout *et al.*, 2021; Pesqueira *et al.*, 2020). Muitos desses compostos apresentam estruturas químicas complexas, frequentemente associadas a formulações combinadas. Sua origem pode estar relacionada tanto à produção industrial quanto à metabolização no organismo. Uma vez lançados no meio ambiente, o trajeto que percorrem tornam-se variados e de difícil rastreamento. Cabe destacar que cada indivíduo representa uma fonte contínua de CEs, especialmente em virtude do crescente consumo de fármacos (Wilkinson *et al.*, 2017).

Os DEs são considerados contaminantes emergentes altamente preocupantes devido à sua capacidade de provocar alterações adversas no sistema hormonal de humanos e animais. Segundo a OMS (2012), os DEs são definidos como substâncias ou misturas exógenas capazes de interferir no funcionamento do sistema endócrino, ocasionando efeitos adversos à saúde de organismos vivos, suas descendências ou subpopulações. Esses compostos

conseguem inibir ou simular a ação de hormônios naturais, afetando o funcionamento adequado de alguns órgãos e sistemas fisiológicos (Vieira *et al.*, 2020). Entre os DEs, os hormônios mais utilizados em pesquisas são os andrógenos, estrógenos e a progesterona, que desempenham um papel essencial na manutenção do equilíbrio endócrino e nos processos de crescimento e desenvolvimento (Georgin *et al.*, 2024).

Dentre estes, os estrogênios têm sido amplamente investigados. Devido ao rápido metabolismo dos hormônios naturais, a sua administração por via oral apresenta baixa eficácia ou demanda de doses elevadas, impulsionando o desenvolvimento de estrogênios sintéticos mais estáveis para uso terapêutico. O 17 β -estradiol (E2), principal hormônio sexual feminino, serve de base estrutural para compostos como etinilestradiol, mestranol e valerato de estradiol, comumente empregados em terapias hormonais. Além da contracepção, os estrogênio são utilizados no tratamento da menopausa, terapias de reposição hormonal e no combate a certos tipos de câncer, como o de mama e o de próstata (Kuster *et al.*, 2004). Biologicamente ativos, esses hormônios derivam do colesterol e são secretados pelas glândulas adrenais, testículos, ovários e placenta (Adeel *et al.*, 2017).

Devido a alta afinidade entre os estrogênios e receptores nucleares de estrogênio (ERs) presente em organismos humanos e animais, estudos mostram que a presença destes compostos em concentrações mínimas, como nanogramas por litro, podem provocar disfunções endócrinas (Combalbert e Hernandez-Raquet, 2010), dentre estas substâncias, o E2 se destacam por sua grande incidência em efluentes de ETEs (Racz e Goel, 2010).

Entre as principais fontes de estrogênios estão a população humana e as criações de animais (Wojnarowski *et al.*, 2021). Dentre os animais de produção, como os bois, porcos e aves, são considerados os principais responsáveis pelas excreções urinária e fecal contendo esses compostos. Combalbert e Hernandez-Raquet (2010) afirmam que o nível desta liberação varia conforme a espécie, o sexo, a faixa etária, o estado reprodutivo e o ritmo biológico. Em ruminantes, o hormônio é liberado principalmente pelas fezes, enquanto em suínos e aves a excreção ocorre, em sua maioria, por meio da urina. Também se observa que peixes conseguem liberar hormônios em águas superficiais, especialmente nos períodos que antecedem e durante a reprodução (Gray *et al.*, 2002). Esses organismos podem excretar estrogênios na água por meio da urina, brânquias e da bile (Liu *et al.*, 2012a).

Além disso, a dispersão destes hormônios em corpos d'água superficiais pode ocorrer a partir da prática de aplicação de esterco animal em áreas agrícolas. Isto pode acontecer por meio do escoamento superficial, tornando-se um exemplo clássico de fonte difusa de poluição (Dutta *et al.*, 2010). No caso dos humanos, a eliminação também ocorre por vias excretoras,

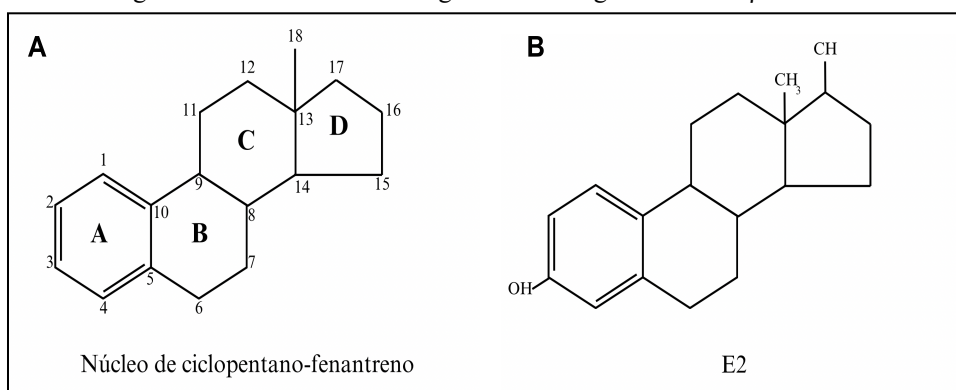
mas devido à degradação incompleta durante o tratamento nas ETEs, os estrogênios podem ser liberados no ambiente por meio dos efluentes, caracterizando uma fonte pontual de contaminação (Wilkinson *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2011).

3.2 DESCRIÇÃO DO 17 β -estradiol

Conforme ilustrado pela figura 1A, os estrogênios possuem uma estrutura geral composta por 18 átomos de carbono distribuídos entre três anéis hexagonais (exemplificados pelas letras A, B, C) e um anel pentagonal (D), os E2, como visto na figura 1B, são caracterizados pela presença de dois grupos hidroxila (-OH), um na posição 3 do anel A e outro na posição 17 β do anel D (Combalbert e Hernandez-Raquet, 2010).

O E2 é o estrogênio predominante em vertebrados, atuando no funcionamento do sistema reprodutivo feminino e na preservação das características sexuais secundárias (Welshons *et al.*, 2003). Esse hormônio é eliminado pelo organismo humano e animal por meio da urina e das fezes, tanto em sua forma livre e ativa quanto conjugada, como glicuronídeos e sulfatos, estas últimas com baixa atividade biológica (Johnson e Willams, 2004). A quantidade excretada varia de acordo com o sexo, condições fisiológica e o estágio de desenvolvimento. Mulheres gestantes e em período menstrual são as principais fontes, liberando cerca de 308 e 4,66 μ g/dia de E2 na urina, e 202 e 0,2 μ g/dia nas fezes, respectivamente (Xu *et al.*, 2012). Com exceção dessas fases, homens e mulheres apresentam níveis de excreção semelhantes, entre 1,5 a 7 μ g/dia (Combalbert e Hernandez-Raquet, 2010).

Figura 1– Estrutura molecular geral dos estrogênios e do 17 β -estradiol



Fonte: Adaptada de Combalbert e Hernandez-Raquet (2010).

A tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas relevantes do E2. O peso molecular do composto, tabelado como 272,4 g/mol, sugere a alta capacidade de absorção

dessa substância pelos organismos, enquanto a solubilidade de 13 mg/L confirma a sua limitada dissolução em água, significando que o E2 não se dissolve facilmente, contribuindo para sua tendência de aderir a sedimentos (Westrup, 2020).

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do 17 β -estradiol

Peso molecular (g/mol)	Solubilidade em água (mg/L)	Log K _{ow}	Pressão de vapor (mmHg)
272,4	13	4,01	2,3x10 ⁻¹⁰

Fonte: Adaptada de Hansch *et al.* (1995); Nazari e Suja (2016); Forghani *et al.* (2018).

O coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow}), com valor 4,01 revela que o E2 é uma substância lipofílica, com alta afinidade por membranas celulares e matéria orgânica, o que favorece a acumulação em tecidos biológicos e fixação em partículas sedimentares (Jones-Lepp e Stevens, 2007; Silva *et al.*, 2012). Assim, segundo Adeel *et al.* (2017), entre os estrogênios, o E2 tem a maior hidrofobicidade.

Outro parâmetro relevante é a pressão de vapor, que expressa a tendência de volatilização de uma substância. No caso do E2, esse valor é bastante reduzido, o que indica baixa volatilidade e, conseqüentemente, maior persistência. Em conjunto, essas propriedades indicam que o E2 possui alta estabilidade ambiental e um comportamento típico de contaminante persistente, com potencial de bioacumulação e efeitos adversos prolongados no ecossistema (Silva *et al.*, 2012; Nazari e Suja, 2016).

3.3 MECANISMO DE AÇÃO AMBIENTAL DO 17 β -estradiol

Com natureza lipofílica, o E2 penetra facilmente nas membranas celulares. Uma vez no interior da célula, ele se liga ao receptor nuclear de estrogênio ER α e ativa sua função, regulando assim a expressão de diversos genes (Nazari e Suja, 2016). Os receptores nucleares funcionam como fatores de transcrição dependentes de ligantes, com papel específico na regulação de genes envolvidos em funções como metabolismo, desenvolvimento e reprodução (McKenna *et al.*, 1999).

Em humanos, o receptor de estrogênio possui uma cavidade no domínio de ligação ao ligante com tamanho quase duas vezes maior do que o necessário para acomodar o E2, permitindo, assim, que diversas outras moléculas também se associem a esse receptor. De modo geral, todas as espécies de vertebrados provavelmente compartilham essa característica

estrutural, apresentando domínios de ligação ao ligante igualmente inespecífico (Brzozowski *et al.*, 1997; Körner *et al.*, 2001).

Essa flexibilidade do domínio de ligação faz com que a afinidade do receptor seja alterada de acordo com características estruturais das moléculas, como o tamanho e o grau de ramificação de grupos alquila e a posição destes no anel fenólico (Routledge e Sumpter, 1997). Além disso, compostos não estrogênicos presentes no ambiente podem competir com o E2 pela ligação ao receptor, contribuindo para uma possível perda de sua atividade estrogênica. A presença de outros contaminantes e a complexidade da matriz química, como em águas residuais, também podem limitar a absorção e ação do E2 (Conroy *et al.*, 2007). Portanto, o E2 ao mimetizar a ação do estrogênio natural, pode interferir na função normal do sistema endócrino por meio de vias como imitação, modulação ou atuação antagonista (Forghani *et al.*, 2018).

Segundo Kandarakis *et al.* (2009), diversos fatores influenciam o mecanismo de ação deste desregulador endócrino, entre eles a idade do indivíduo em exposição, já que os fetos e recém-nascidos são mais suscetíveis do que adultos. Esse conceito fundamenta a chamada “base do desenvolvimento da doença adulta”, que relaciona exposições precoces a disfunções que podem surgir apenas na vida adulta ou durante o envelhecimento, evidenciando o intervalo de tempo entre a exposição a um DEs e a manifestação dos efeitos adversos (Coster e Larebeke, 2012). Outro ponto importante é a exposição simultânea a múltiplos contaminantes, uma vez que os DEs raramente ocorrem de forma isolada no ambiente, podendo interagir entre si no meio ou no organismo exposto (Crews *et al.*, 2009).

Cabe ressaltar ainda que esses compostos frequentemente apresentam dinâmicas de dose-resposta não tradicionais, em que baixas concentrações são suficientes para causar efeitos significativos, por vezes mais intensos que em doses maiores (Sheehan *et al.*, 1999; Saal *et al.*, 2007), além de apresentarem maior tendência de bioacumulação em tecidos adiposos devido a sua baixa solubilidade em água e elevada afinidade com lipídios. Nenhum sistema endócrino está isento de sua ação, devido às semelhanças estruturais dos compostos químicos e a interação com receptores e enzimas envolvidos na síntese, liberação e degradação hormonal (Kandarakis *et al.*, 2009; Thornton, 2001). Os efeitos epigenéticos transgeracionais também se destacam, já que são transmitidos por meio de alterações na expressão gênica, como metilação do DNA, sem necessidade de mudanças na sequência genética, afetando gerações futuras (Anway e Skinner, 2006).

Os organismos são expostos ao E2 por diferentes formas, como o consumo da água e alimentos contaminados, inalação de ar e absorção pela pele (Nazari e Suja, 2016). Nos

ambientes aquáticos, os peixes absorvem por meio da pele e das brânquias, enquanto predadores marinhos de topo os assimilam principalmente pela ingestão de água (Thacharodi *et al.*, 2023). Bergman *et al.* (2013) demonstraram que tecidos de espécies aquáticas coletadas próximas a descargas de estações de tratamento de esgoto apresentam compostos ativos provenientes de contraceptivos de uso humano, evidenciando a contínua exposição desses organismos a fármacos presentes no ambiente.

A presença de estrogênios na água também tem sido associada a efeitos reprodutivos adversos em mamíferos, como prejuízo à gestação em camundongos (Meyer *et al.*, 2019). Em ambientes aquáticos, a exposição a estrogênios presentes em efluentes e em águas a jusante tem sido relacionada à feminização de peixes machos, resultando no aumento dos níveis de vitelogenia, redução do tamanho testicular, perda de características sexuais e ocorrência de intersexo (Tetreault *et al.*, 2011; Vadja *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que a exposição aquosa precoce ao E2 pode provocar efeitos duradouros no eixo somático da tilápia, sistema este responsável por controlar o crescimento e o desenvolvimento ao longo do ciclo de vida dos vertebrados (Celino-Brady *et al.*, 2019). Em humanos, investigações realizadas na Espanha indicam que a exposição a estrogênios exógenos está ligada a um aumento no risco de câncer de mama (Xia *et al.*, 2013). De igual forma, esta exposição traz impactos negativos sobre a saúde humana, como a redução na contagem de espermatozoides, ocorrência de endometriose, infertilidade e casos de obesidade (Balabanič *et al.*, 2011). Um outro estudo também identificou um maior risco de anomalias genitais, como hipospádia e criptorquidia, relacionadas à presença de estrogênios no ambiente (Fernandez *et al.*, 2007).

3.4 BIORREMEDIAÇÃO ENZIMÁTICA

Desde a década de 1960, enzimas extracelulares se tornaram insumos industriais fundamentais em processos industriais de diversos setores (Godfrey e Reichelt, 1982; Gianfreda e Rao, 2004; Ruggaber e Talley, 2006). Conforme apontam Godfrey e Reichelt (1982), o uso de enzimas é altamente desejável por sua capacidade de substituir produtos químicos agressivos, como solventes, realizando as mesmas funções em condições brandas, como pH neutro, temperatura moderada e sem a geração de resíduos nocivos. Apesar do custo elevado, decorrente dos processos de extração e purificação, as enzimas podem ser economicamente vantajosas, uma vez que reduzem significativamente a produção de resíduos e a necessidade de aquecimento, contribuindo para processos mais sustentáveis e eficientes.

A biorremediação é uma tecnologia baseada no uso de sistemas biológicos, como microrganismos ou enzimas, para degradar ou transformar contaminantes ambientais em substâncias menos danosas (Seah *et al.*, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2025). Pode ser classificada em biorremediação microbiana, quando envolve organismos vivos que metabolizam os poluentes, ou enzimática, quando utiliza enzimas extracelulares capazes de degradar diretamente os contaminantes, sem a necessidade de cultivo celular. A biorremediação enzimática consiste na aplicação direta de enzimas naturais e sintéticas para a degradação de compostos tóxicos, persistentes e indesejáveis. Essas enzimas atuam como biocatalisadores, reduzindo a energia de ativação das reações químicas e promovendo uma decomposição rápida e eficiente dos poluentes. Além disso, por apresentarem tamanho reduzido, as enzimas conseguem acessar os contaminantes com maior facilidade, favorecendo uma interação mais direta (Kumar e Bharadvaja, 2019).

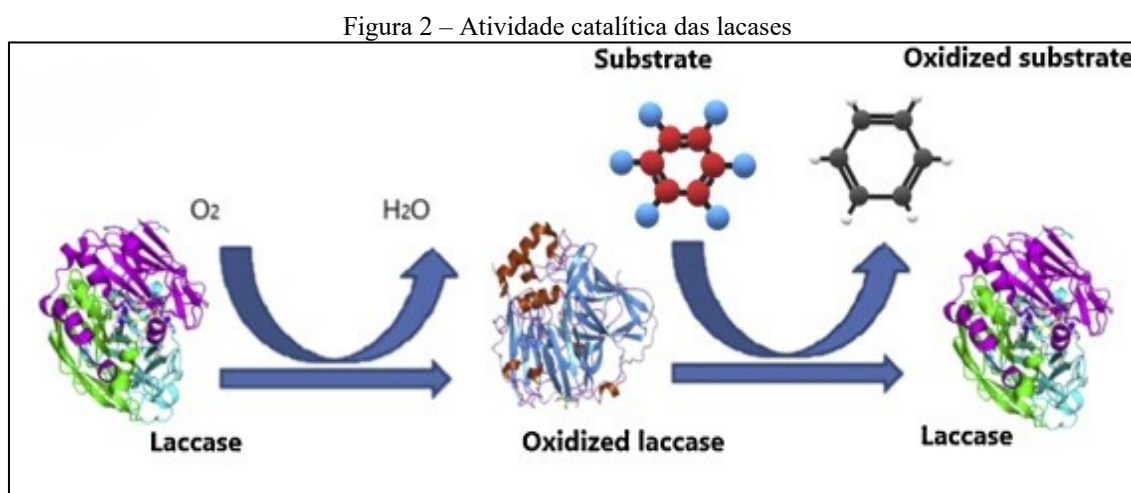
Esse tipo de abordagem apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais de tratamento, como alta especificidade e eficiência mesmo em baixas concentrações, menor impacto ambiental e maior agilidade no processo, sem necessidade de manutenção de culturas microbianas. Em contrapartida, os métodos físicos e químicos tradicionais, comumente empregados em ETEs, demonstram limitações significativas na remoção de DEs. Esses processos, além de dispendiosos, muitas vezes são ineficientes na remoção de compostos em baixas concentrações e podem, ainda, gerar subprodutos ainda mais tóxicos (Wee e Aris, 2017; Adeyeye e Laub, 2020).

Estudos apontam que os esteróides sexuais, como o E2, são responsáveis por grande parte da atividade estrogênica observada em efluentes de ETEs (Snyder *et al.*, 2001; Körner *et al.*, 2001; Ting e Praveena, 2017). Como consequência, mesmo após o tratamento, cargas contaminantes ainda são liberadas no ambiente, frequentemente associadas a lodos e efluentes (Qiang *et al.*, 2013; Esteban *et al.*, 2014). Diante desse cenário, a biorremediação enzimática surge como uma solução promissora e eficaz para a degradação do E2, especialmente em sistemas onde os métodos tradicionais não conseguem alcançar eficiência satisfatória, uma vez que, estas substâncias apresentam características que dificultam sua remoção por processos convencionais, como baixa solubilidade em água, lipofilicidade, alta persistência e tendência à bioacumulação em organismos aquáticos (Clouzot *et al.*, 2008).

3.5 ESTRUTURA DAS LACASES

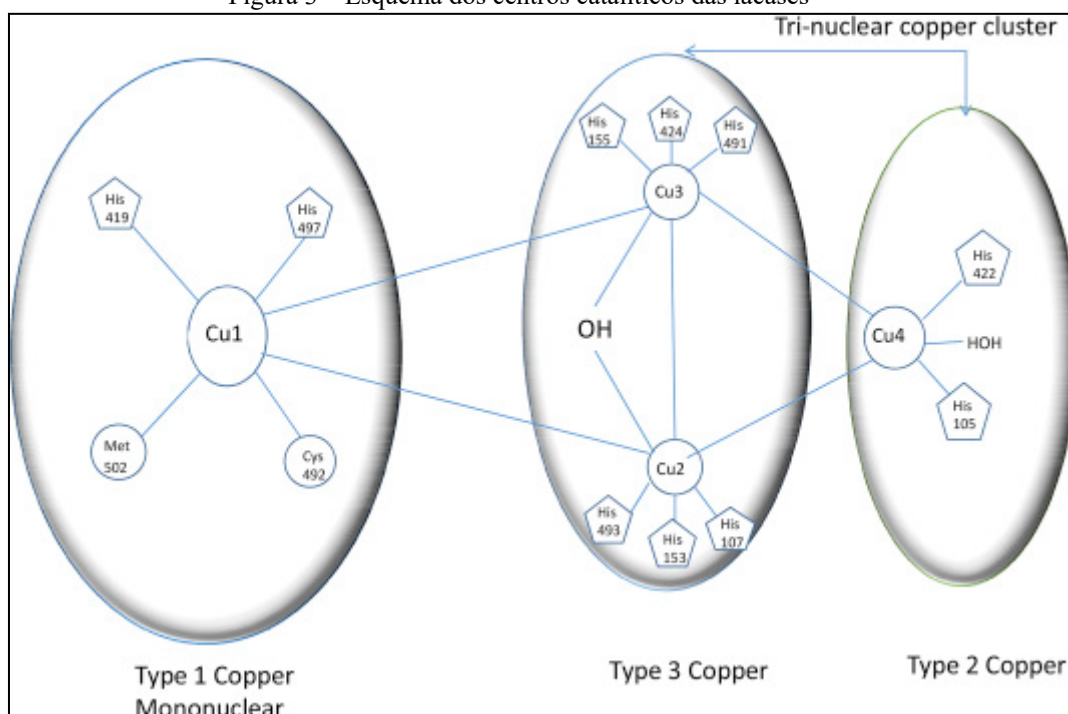
As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas que pertencem a um grupo chamado multicobre oxidases, que usam átomos de cobre para auxiliar em relações de oxidação (Martin *et al.*,

2024). Elas foram descobertas em 1883 pelo pesquisador H. Yoshida, na seiva de uma árvore japonesa chamada *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). Atualmente, sabe-se que as lacases estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas em diversos organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais (Liu *et al.*, 2020). Essas enzimas catalisam a oxidação de diversos compostos fenólicos e não fenólico, utilizando oxigênio molecular (O_2) comoceptor final de elétrons e convertendo-o em água (H_2O), sem a geração de subprodutos tóxicos (Arregui *et al.*, 2019), conforme ilustrado pela figura 2.



A função catalítica das lacases está diretamente relacionada aos átomos de cobre (Cu) presentes em sua estrutura, distribuídos em três tipos distintos de centros metálicos, representado visualmente pela figura 3. Esses centros são classificados como cobre tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) e tipo 3 (T3) (Małgorzata e Kończak, 2019). Vale destacar que cada um desses centros apresenta propriedades espectroscópicas específicas, onde o T1 é conhecido como centro azul, o T2 como centro comum e o T3 como centro binuclear acoplado (Götze e Bühl, 2016). O centro T1, composto por um único átomo de cobre, é responsável pela coloração azul característica da enzima, sendo o local onde ocorre a oxidação do substrato e onde se determina o potencial redox da lacase. Os centros T2 e T3 formam um sítio trinuclear, contendo 3 átomos de cobre, no qual são um do tipo 2 e dois do tipo 3. Esse sítio tem como função principal receber os elétrons provenientes da oxidação realizada em T1 e promover a redução do oxigênio molecular em água (Debnath e Saha, 2020).

Figura 3 – Esquema dos centros catalíticos das lacases



Fonte: Debnath e Saha (2020).

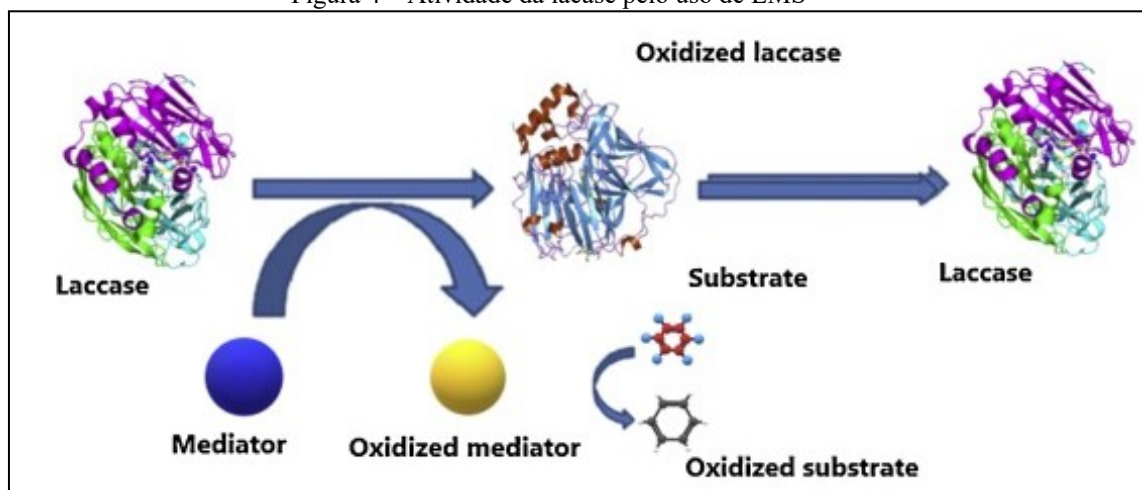
Desse modo, as lacases atuam na remoção de um elétron do substrato e o transferem para um centro catalítico através da interação entre os funcionais da proteína. Esse fluxo de elétrons continua progressivamente até que o quarto elétron atinja o cluster de cobre. Durante esse processo, uma molécula de O_2 é incorporada e reduzida por meio da aceitação dos elétrons. A conversão final do oxigênio em H_2O ocorre com a participação dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico, que fornecem os átomos de hidrogênio necessários para completar a reação redox (Polyakov *et al.*, 2017).

Lacases são enzimas compostas por 200 a 800 aminoácidos, com massa molecular variando entre 40 e 140 kDa (More *et al.*, 2011; Arregui *et al.*, 2019). A atividade oxidativa dessas enzimas sobre diferentes substratos está diretamente relacionada à sua origem, uma vez que as propriedades estruturais e funcionais podem variar de acordo com a fonte de extração. Um aspecto relevante é a presença da fração de carboidrato glicanos N-ligados na estrutura da lacase, que contribui significativamente para sua estabilidade estrutural e ainda atua como proteção contra a degradação proteolítica (Maestre-Reyna *et al.*, 2015). Além disso, lacases com alto potencial redox (E^0) são preferencialmente utilizadas no tratamento de águas residuais, especialmente quando os compostos alvo, como fenóis, apresentam também elevado potencial redox (Kuramitz *et al.*, 2002).

Graças ao seu mecanismo catalítico, as lacases são classificadas como catalisadores verdes, pois funcionam em condições amenas e geram subprodutos não tóxicos. Contudo, algumas lacases possuem um baixo potencial redox, o que restringe sua atuação direta sobre substratos com elevado potencial redox, dificultando a ligação específica com alguns compostos. Para contornar essa limitação, foi desenvolvido o sistema lacase mediador (LMS), que amplia significativamente a gama de substratos passíveis de oxidação pela lacase (Hilgers *et al.*, 2018). Esse sistema permite que a enzima atue sobre compostos além dos fenólicos, utilizando um mediador como intermediário entre a lacase e o substrato.

Nesse processo, representado pela figura 4, a lacase oxida o mediador, que, por sua vez, transfere elétrons ao substrato, promovendo sua oxidação. Os mediadores possuem potenciais redox mais elevados que o da lacase e, uma vez oxidados, originam compostos estáveis com capacidade de oxidar não apenas grupos não fenólicos, mas também regiões de substrato inacessíveis a enzima (Rakotovelo *et al.*, 2019). Essa limitação de acesso ocorre, por exemplo, em matrizes lignocelulósicas, nas quais o tamanho e a conformação espacial da lacase impedem sua penetração. O mediador, nesse contexto, atua como um “transportador” de elétrons, conduzindo o potencial oxidante até essas regiões. O mediador ideal deve ser uma molécula de pequeno porte, capaz de formar um radical estável após a oxidação e ser reciclada no processo. Além disso, sua forma radical não deve inibir a atividade da enzima. Considerando as aplicações ambientais do sistema lacase mediador, especialmente em processos industriais, é fundamental que os mediadores sejam economicamente viáveis e ecologicamente seguros (Cañas e Camarero, 2010).

Figura 4 – Atividade da lacase pelo uso de LMS



Fonte: Adaptada de Małgorzata e Kończak (2019).

3.6 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS LACASES

Devido ao seu conhecido potencial catalítico, as lacases se destacam como biocatalisadores versáteis capazes de atuar nas mais diversas áreas biotecnológicas (Zhai *et al.*, 2024). Entre as suas aplicações já conhecidas, as lacases apresentam alta aplicabilidade em processamento de alimentos, por reagir com carboidratos, ácidos graxos insaturados, compostos fenólicos e proteínas sulfidríla, componentes presentes em diversos alimentos e bebidas; na segurança alimentar, por atuar como biocatalisador, auxiliando na humificação do carbono orgânico e na redução da contaminação por E2 no trigo; na criação de sensores biológicos para monitoramento de contaminantes; e na descontaminação ambiental (Zhai *et al.*, 2024).

Na remediação de ambientes contaminados, a crescente preferência pelos métodos biológicos pela ação enzimática se tornam destaque devido a sustentabilidade, economicidade e reduzida produção de poluentes a longo prazo. Em contrapartida, as técnicas físico-químicas tradicionais, como adsorção e oxidação, embora reconhecidamente eficazes, apresentam limitações de custo e geração de subprodutos tóxicos. (Ji *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2020; Si *et al.*, 2021; Hedar *et al.*, 2023). Desta forma, a degradação bioenzimática surge como uma estratégia promissora para desenvolver métodos de biorremediação eficientes, econômicos e ambientalmente seguros, com potencial para substituir ou complementar tecnologias convencionais.

No tratamento de águas residuais, por exemplo, o uso de enzimas se destaca pela alta especificidade na degradação de compostos fenólicos (Hong *et al.*, 2022), além disso, a literatura científica demonstra o uso eficiente desta enzima na biorremediação de diversos poluentes como, bisfenol (Zeng *et al.*, 2017), corantes industriais (Chivukula e Renganathan, 1995), produtos farmacêuticos (Alharbi *et al.*, 2019), fenólicos (Collins *et al.*, 1996), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Cañas *et al.*, 2007), plásticos (Sumathi *et al.*, 2016), pesticidas (Jin *et al.*, 2016) e hormônios (Suresh e Abraham, 2018).

3.7 LACASE DO CAMARÃO *Penaeus vannamei*

A produção aquícola representou, em 2022, um importante motor econômico global, com a produção mundial alcançando aproximadamente 94,4 milhões de toneladas, correspondendo a um valor estimado de 312,8 bilhões de dólares (FAO, 2024). Essa atividade foi amplamente dominada pela criação intensiva da espécie *Penaeus vannamei*, conhecida

popularmente por camarão branco do Pacífico. O *P. vannamei* consolidou-se como a principal espécie cultivada na carcinicultura global, representando 53,3% da produção de crustáceos em 2022, com um volume de 6,8 milhões de toneladas. (Filho *et al.*, 2024).

Estima-se que, anualmente, cerca de 167 bilhões de indivíduos têm sido cultivados e colhidos em escala comercial, refletindo a crescente demanda por esse organismo nos mercados (Albalat *et al.*, 2022). Os autores ainda afirmam que o *P. vannamei* é uma espécie nativa da Costa do Pacífico Oriental, distribuída do México ao Peru, em regiões tropicais com temperaturas de águas superiores a 20°C durante o ano. A criação comercial e a reprodução em cativeiro da espécie tiveram início na década de 1970, na América Central e do Sul, expandindo-se posteriormente para os Estados Unidos e outros países.

No Brasil, especialmente na região Nordeste, a carcinicultura constitui uma atividade econômica relevante, em razão de seu papel significativo no desenvolvimento socioeconômico regional. Em 2023, essa atividade gerou aproximadamente R\$2,6 bilhões (IBGE, 2024; Rocha *et al.*, 2023). Essa espécie apresenta elevada tolerância a diferentes faixas de salinidade, o que possibilita seu cultivo em ambientes oligohalinos e mesohalinos, ampliando as possibilidades de uso de recursos hídricos continentais e costeiros na atividade aquícola (Oliveira *et al.*, 2022).

Durante o processamento do camarão, avalia-se que aproximadamente 40 a 50% de sua massa total seja convertida em resíduos, predominantemente constituídos por cefalotórax e carapaça. A ausência de estratégias adequadas para o manejo desses resíduos, os quais são frequentemente descartados a céu aberto ou enterrados de maneira inadequada em áreas costeiras, contribui significativamente para a poluição ambiental (Bhaskar *et al.*, 2007). Tais resíduos representam um subproduto com elevado potencial econômico, atualmente subutilizado. Sua valorização pode oferecer uma alternativa inovadora e economicamente viável para mitigar os impactos ambientais da atividade aquícola e agregar valor ao setor produtivo (Carvalho, 2010; Cruz, 2019).

No estudo realizado por Shi *et al.* (2017) uma lacase foi identificada no hepatopâncreas do *P. vannamei*, confirmando o seu papel nos mecanismos de resposta imune inata. Anos mais tarde, Rocha *et al.* (2023) purificaram e caracterizaram uma lacase do hepatopâncreas de *P. vannamei* de forma eficiente em uma única etapa. A enzima apresentou alta atividade em pH 8,0, estabilidade térmica até 105°C e tolerância a solventes e íons metálicos. Mostrou-se também eficaz na degradação de 42,40% dos HPAs presentes no petróleo bruto sem a necessidade de mediadores. Além disso, seu uso a partir de resíduos da carcinicultura representa uma alternativa ecologicamente e economicamente viável, sendo

vantajoso por aproveitar um material de baixo custo e alta disponibilidade, proveniente dos resíduos da cadeia produtiva do camarão.

4. METODOLOGIA

4.1 PURIFICAÇÃO DA LACASE

4.1.1 Obtenção do material animal

Os hepatopâncreas do *P. vannamei* foram obtidos a partir de organismos cultivados em viveiros localizados na região da Ponte dos Carvalhos, no município de Cabo de Santo Agostinho, estado de Pernambuco, área caracterizada por expressiva atividade de carcinicultura. Após a coleta, o material coletado foi imediatamente acondicionado em recipientes estéreis e mantidos sob refrigeração, a fim de preservar a estabilidade estrutural e funcional das enzimas presentes. O transporte até o Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco (Labenz/UFPE) foi realizado em caixas isotérmicas contendo gelo, minimizando a degradação térmica das biomoléculas e assegurando a integridade do material biológico.

4.1.2 Preparo do extrato bruto

Os hepatopâncreas coletados foram submetidos à maceração em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7.5) contendo 0,5 M de cloreto de sódio (NaCl), 0,1 mM de cloreto de cálcio (CaCl_2) e 0,1 mM de cloreto de manganês (MnCl_2), resultando em uma concentração de 40 mg/mL. Para isto, as glândulas foram homogeneizadas sob baixas temperaturas para preservar a estabilidade molecular da amostra. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 20 minutos, a 4°C, para promover a separação das frações solúveis e insolúveis. O sobrenadante resultante, correspondente à fração solúvel, foi cuidadosamente coletado e encaminhado às etapas subsequentes do protocolo experimental.

4.1.3 Protocolo de purificação da lacase

A enzima lacase foi obtida seguindo a metodologia proposta por Rocha *et al.* (2023) para isto, o extrato bruto foi submetido a cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de Concanavalina A acoplada à matriz de agarose (ConA), equilibrada com Tris-HCl 0,1 M pH 7.5 contendo 0,5 M de NaCl, 0,1 mM de CaCl_2 e 0,1 mM de MnCl_2 .

A eluição das enzimas adsorvidas na coluna foi realizada por meio do uso do tampão de equilíbrio suplementado com sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) em um gradiente crescente de 0 a 0,5 M. Visando a identificação proteica, as frações eluídas foram monitoradas por absorvância a 280 nm e, paralelamente, submetidas a ensaio de atividade enzimática, utilizando catecol como substrato.

As frações com atividade de lacase foram reunidas e submetidas à diálise contra o tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7.5, com o objetivo de remover sais e sacarose para utilização em análises futuras.

4.1.4 Monitoramento da purificação da lacase por SDS-PAGE

A purificação da enzima lacase foi acompanhada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), seguindo o método descrito por Laemmli (1970), através do uso de um gel de corrida de 12,5% e um gel de concentração de 4%. O processo de migração das proteínas através do gel ocorreu pelo uso do tampão Tris-Glicina-SDS em corrente contínua de 12mA. Como padrão de peso molecular foi utilizado o Bio-Rad Broad Range, composto por miosina (200 kDa), β -galactose (116,2 kDa), fosforilase b (97,4 kDa), Albumina sérica (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa), lisozima (14,4 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). Após a conclusão da eletroforese, as bandas proteicas foram coradas pela utilização do corante Coomassie Blue.

4.1.5 Ensaio de atividade da lacase

Para identificar a presença da enzima lacase, tanto no extrato bruto quanto nas alíquotas purificadas, foram determinadas por meio de ensaios de degradação do catecol, seguindo a metodologia proposta por Matijošytė (2010). O ensaio consistiu na incubação da solução enzimática com 10 mM de catecol em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 8.0. A incubação foi conduzida por 30 minutos sob aquecimento de 37°C, a formação de produtos da reação foi monitorada pela leitura da absorvância a 405 nm.

4.1.6 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas presente no extrato bruto e alíquotas contendo lacase foi determinada através do método colorimétrico de Bradford (1976). Para isto, foi realizada a incubação de 40 μ L da solução protéica com 40 μ L de água destilada e 120 μ L do reagente de Bradford. A mistura foi mantida protegida da luz pelo tempo de 15 minutos e submetida a leitura de absorbância a 595 nm. A quantificação precisa de proteínas foi realizada através da interpolação de valores de absorbância em uma curva de calibração padrão construída com albumina do soro bovino (BSA).

4.2 PREPARO DA QUITOSANA E IMOBILIZAÇÃO DA LACASE

4.2.1 Purificação da quitosana

A quitosana de médio peso molecular, adquirida da Sigma-Aldrich, foi purificada seguindo a metodologia proposta por Cahú *et al.* (2012). Para isto, 10 mg de quitosana foi completamente solubilizada em ácido acético a 20%. Posteriormente, a solução foi precipitada pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) a 4 M até atingir pH 12. Após a formação do precipitado, o pH foi reajustado para 8 pela adição gradual de ácido acético. Para coleta da quitosana purificada, a solução foi filtrada a vácuo, o precipitado foi lavado abundantemente com água destilada e submetida a centrifugação a 10.000 g por 15 minutos.

4.2.2 Preparo da quitosana magnetizada

Para o processo de magnetização, conforme descrito por Azevedo *et al.* (2018), 1 g da quitosana purificada foi solubilizada em uma solução de ácido acético a 1%. Após completa homogeneização, 5 mL de cloreto ferroso (FeCl_2) 0,6 M e cloreto férrico (FeCl_3) 1,1 M foram adicionados e mantidos sob constante agitação. Em seguida, o pH da suspensão foi ajustado para 11 pela adição de NaOH 1M e mantido sob aquecimento a 80°C por 30 minutos. Ao final do aquecimento, as partículas magnetizadas foram coletadas e lavadas com água destilada até completa neutralização. Por fim, a quitosana foi filtrada à vácuo para remoção do excesso de água, seca em estufa ventilada e macerada para uniformização do tamanho das partículas.

4.2.3 Ativação da quitosana magnetizada

Para possibilitar a interação entre a quitosana e a enzima lacase, o suporte magnetizado foi previamente ativado seguindo a metodologia de Azevedo *et al.* (2018). Para isto, 1 mL de uma solução de glutaraldeído a 12,5% foi adicionado a eppendorfs contendo 10 mg da quitosana magnetizada, a mistura foi incubada em agitador hematológico por 2h. Após o tempo proposto, o glutaraldeído não reagente foi removido através de 10 ciclos de lavagens do suporte com tampão citrato-fosfato 0,05M (pH 8.0). O tampão submetido a remoção do glutaraldeído foi descartado e a quitosana ativada submetida para as etapas seguintes.

4.2.4 Determinação do tempo de imobilização da lacase na quitosana

Para otimizar as condições reacionais do processo de imobilização enzimática, o processo de imobilização foi avaliado em diferentes tempos reacionais. Este método foi conduzido a partir das recomendações de Azevedo *et al.* (2018), considerando algumas adaptações. A incubação ocorreu pela mistura de 2 mL da concentração de lacase purificada com a quitosana ativada durante 2, 4 e 16 horas. Para conservar as propriedades da enzima, o experimento foi dirigido sob condições de refrigeração e agitação constante. Após cada período de imobilização, as enzimas não ligadas ao suporte foram removidas através de 10 lavagens do suporte com tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 8.0). O sobrenadante resultante das lavagens foi submetido a dosagem de atividade enzimática, conforme tópico 4.1.5, e quantificação de proteínas, conforme tópico 4.1.6. A quantidade total de proteína imobilizada foi determinada pela subtração da concentração de proteínas identificadas nas lavagens da quantidade de proteína inicialmente adicionada. Por fim, a eficiência e o rendimento da imobilização foram calculados pelas equações determinadas em Jaiswal, Pandey e Dwivedi (2016), conforme descritas a seguir:

$$EC (\%) = \frac{C_i V_i - C_f V_f}{C_i V_i} \times 100$$

Na equação 1, cada símbolo representa:

C_i e V_i - concentração proteica e volume da solução enzimática inicial;

C_f - concentração proteica das lavagens;

V_f - volume das lavagens.

$$RI (\%) = \frac{AEI}{AEF} \times 100$$

Já na equação 2, cada símbolo representa:

A_{EI} - atividade específica da enzima imobilizada;

A_{EL} - atividade específica da enzima livre.

4.3 DEGRADAÇÃO DO ESTROGÊNIO

4.3.1 Preparo das amostras de 17 β -estradiol

As soluções de E2 foram preparadas conforme metodologia descrita por Procópio *et al.* (2023), com adaptações para as condições experimentais deste estudo. Inicialmente, uma solução estoque de 1g/L foi preparada pela solubilização do E2 (Sigma Chemical Company) em metanol de grau analítico sob agitação constante e proteção luminosa. A solução estoque foi diluída para preparo de soluções de trabalho em concentrações de 100, 50 e 25 mg/L nas mesmas condições relatadas anteriormente. As soluções foram armazenadas sob refrigeração até posterior utilização.

4.3.2 Ensaio de degradação do 17 β -estradiol

A degradação do E2 foi avaliada a partir da incubação das soluções testes do hormônio com a enzima lacase em seu estado livre e imobilizado em quitosana, a montagem das reações foi realizada com base descrito por Lloret *et al.* (2010), com algumas adaptações. Para cada concentração de E2, 1 mL das soluções testes foram incubadas separadamente com 2 mL de lacase solúvel ou com a lacase imobilizada nos 10 mg de quitosana magnetizada. O progresso da degradação enzimática do E2 foi monitorada pela diminuição da absorbância característica do estrogênio no comprimento de onda de 228 nm nos tempos de 0, 12, 60 e 84 horas, seguindo o método de Fonseca, Lima e Esteves (2011). Para validação do processo de degradação, controles de cada concentração teste do E2 (sem a adição da enzima) e das lacases livres e imobilizadas (na ausência do substrato) foram monitorados e aplicados no tratamento dos dados. Todo o experimento foi conduzido em triplicata, garantindo a reprodutibilidade dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO DA LACASE

Conforme é possível observar na tabela 2, a única etapa de purificação aplicada demonstrou eficiência, considerando que nenhum outro método além da cromatografia foi utilizado. Ao comparar o extrato bruto e a fração eluída após a cromatografia de afinidade com ConA, a redução da proteína total de 8,48 µg/mL para 0,16 µg/mL revela a eliminação de grande parte das proteínas não específicas e, assim, aumento da concentração da molécula de interesse, visto que ocorre o aumento significativo da atividade específica de 15,71 mU/mg para 436,33 mU/mg. Esse acréscimo corresponde a um fator de purificação de 27,77 vezes, indicando que a fração obtida após a interação com a ConA apresenta uma concentração superior da lacase em relação às proteínas contaminantes presentes no extrato.

Por fim, o processo de purificação demonstrou rendimento de 52,46%, valor considerado adequado para etapas de purificação com alto ganho de seletividade, especialmente em sistemas baseados em afinidade (Oztekin *et al.*, 2019). Esses resultados demonstram que a estratégia de purificação empregada foi eficiente na obtenção da lacase, evidenciada pelo aumento expressivo na atividade específica e rendimento satisfatório, configurando um processo tecnicamente viável para aplicações que exijam maior pureza da lacase.

Tabela 2 – Tabela de purificação

Amostra	Volum e (mL)	Ativ. (mU/min)	Prot. (µg/mL)	Ativ. total (mU)*	Prot. total (µg/mL)	Ativ. específica (mU/mg)	Purifi cação	Rendimento (%)
Extrato bruto	25	5,33	339,170	133,25	8,48	15,71	1	100
Lacase purificada	15	4,66	10,68	69,9	0,16	436,33	27,77	52,46

* Quantidade de enzima empregada para oxidação de 1 µM de catecol.

Fonte: A autora (2025).

Em comparação com o estudo de Rocha *et al.* (2023), o qual realizou a purificação da lacase do *P. vannamei* através do mesmo método, o resultado aqui relatado evidencia maior sucesso na remoção de proteínas não desejadas, uma vez que apresenta um grau de purificação 12,3 vezes superior ao dos autores, que relatam a obtenção da enzima apenas 2,25 vezes mais pura do que no extrato bruto. Por outro lado, a atividade específica aqui obtida foi consideravelmente menor (0,16 mU/mg frente a 6744,10 mU/mg), o que pode indicar perda

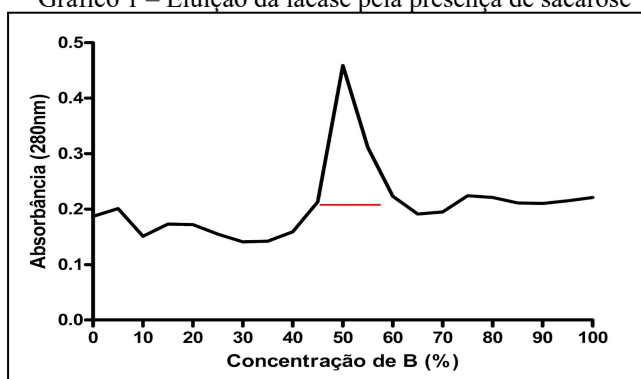
de atividade enzimática durante a purificação. Ainda assim, a atividade total foi mais elevada (69,9 mU contra 7,10 mU), sugerindo uma maior recuperação de enzima ativa.

De maneira semelhante, no estudo conduzido por Jaiswal *et al.* (2016), a lacase extraída de *Trichoderma harzianum* (Ehrenberg, 1820) foi purificada utilizando cromatografia de afinidade com ConA, alcançando um rendimento de apenas 0,39% e uma atividade específica de 130,5 mU/mg. Em contraste, no presente trabalho, a lacase obtida do *P. vannamei* apresentou atividade específica em torno de 400 mU/mg e um rendimento de 52,46%, indicando uma recuperação enzimática significativamente mais eficiente. Esses resultados evidenciam a eficácia do protocolo de purificação adotado para a enzima neste estudo.

A viabilidade do processo de purificação utilizado pode ser atribuída à forte interação entre a ConA, uma lectina reconhecida pela sua alta afinidade por glicoproteínas, e as lacases glicosiladas. Durante a cromatografia, na presença dos íons Mn^{2+} e Ca^{2+} , a ConA liga-se fortemente aos resíduos de carboidratos presente nas enzimas, possibilitando assim a sua retenção e a exclusão de compostos que não são capazes de participar desta interação. Posteriormente, pela adição de uma solução contendo moléculas com maior afinidade pela ConA, como a glicose, a lacase retida a coluna pode ser recuperada de modo eficiente (Chen *et al.*, 2009).

No gráfico 1, ao monitorar a eluição das moléculas pelo uso de um gradiente de sacarose (entre 0 e 0,5 M), o pico protéico evidenciado na presença das concentrações de 40 a 60% de sacarose apresentou atividade de lacase, confirmando assim o seu desprendimento da matriz cromatográfica. Com base nisso, as alíquotas situadas na região do pico foram agrupadas e selecionadas para os estudos posteriores. Essa abordagem permitiu a concentração seletiva da lacase, assegurando a continuidade dos experimentos com material enzimático representativo e com maior grau de pureza.

Gráfico 1 – Eluição da lacase pela presença de sacarose

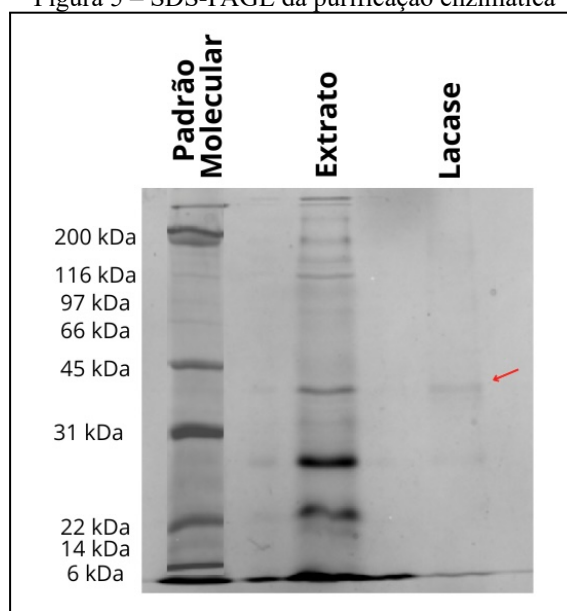


Fonte: A autora (2025).

Através da análise SDS-PAGE do extrato bruto e das alíquotas agrupadas (figura 5), é possível observar a exclusão de moléculas pela cromatografia de afinidade. Na coluna correspondente ao extrato bruto há a incidência de diversas bandas correspondentes às proteínas presentes, quando analisada a alíquota purificada, apenas duas bandas podem ser visualizadas, confirmando a eficiência da etapa de purificação empregada.

Levando em consideração os dados de rendimento expostos pela tabela anterior, a banda predominante assinalada pela presença de uma seta na coluna referente a purificação da lacase (figura 5), sugere ser a enzima de interesse. Apesar do aparecimento de mais de uma banda proteica, indicando a purificação parcial da enzima, o isolamento foi bem sucedido já na primeira etapa. Em contextos industriais, é comum que a purificação de enzimas envolve muitos processos que, consequentemente, estão ligados a um custo elevado, o que limita sua aplicação comercial (Robinson, 2015). Nesse sentido, a forma de extração da lacase mostrou-se eficaz e promissora para usos industriais.

Figura 5 – SDS-PAGE da purificação enzimática



Fonte: A autora (2025).

5.2 IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM QUITOSANA

De acordo com Xu *et al.* (2013), a imobilização da lacase na quitosana magnetizada ocorre por meio de ligações covalentes entre os grupos amino livres da quitosana e os grupos funcionais da enzima, mediadas pela ação do glutaraldeído, como ilustrado pela figura 6. Os autores ainda afirmam que este agente entrecruzante atua como uma ponte bifuncional,

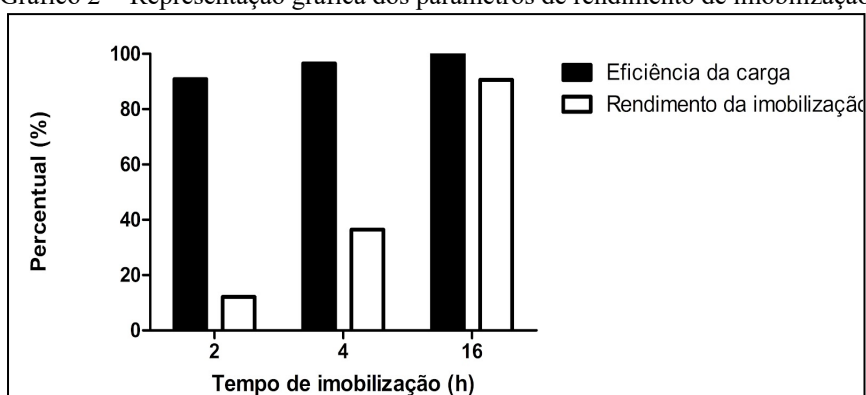
Tabela 3 – Eficiência e rendimento			
	2h	4h	16h
Eficiência da carga (%)	90,90	96,52	100
Rendimento de imobilização (%)	12,08	36,47	90,62

Fonte: A autora (2025).

Entretanto, o rendimento da imobilização, referente a preservação da atividade catalítica da enzima após a imobilização, foi mais sensível ao tempo de incubação. Apesar da alta eficiência de carga, na imobilização ocorrida em 2 horas, obteve-se rendimento de 12,08%, sugerindo que a ligação entre a enzima e o suporte pode ter ocorrido de forma instável ou com perda da conformação ativa. Em 4 horas de incubação, o rendimento aumentou para 36,47%, indicando um avanço na estabilização da enzima, mas ainda com perdas consideráveis de atividade.

O tempo de 16 horas demonstrou o melhor desempenho para a imobilização enzimática, com 100% de eficiência de carga e rendimento de imobilização de 90,62%, demonstrando que o tempo prolongado de incubação favoreceu significativamente a interação entre a lacase e os grupos funcionais do suporte. O prolongado tempo de interação entre enzima e suporte insolúvel possibilitou uma ancoragem mais estável e uma melhor preservação da estrutura da enzima, resultando em maior retenção da atividade catalítica (Halder *et al.*, 2013). Assim, o tempo de incubação de 16 horas revelou-se a condição mais adequada para o processo de imobilização, uma vez que proporcionou a máxima fixação enzimática concomitantemente a uma elevada atividade residual. Os suportes incubados por 2 e 4 horas não foram submetidos ao ensaio de degradação do E2, por apresentarem desempenho inferior nas etapas anteriores. Este resultado é crucial para aplicações futuras em processos de biorremediação, onde a estabilidade e a funcionalidade da enzima imobilizada são fatores essenciais.

Gráfico 2 – Representação gráfica dos parâmetros de rendimento de imobilização



Fonte: A autora (2025).

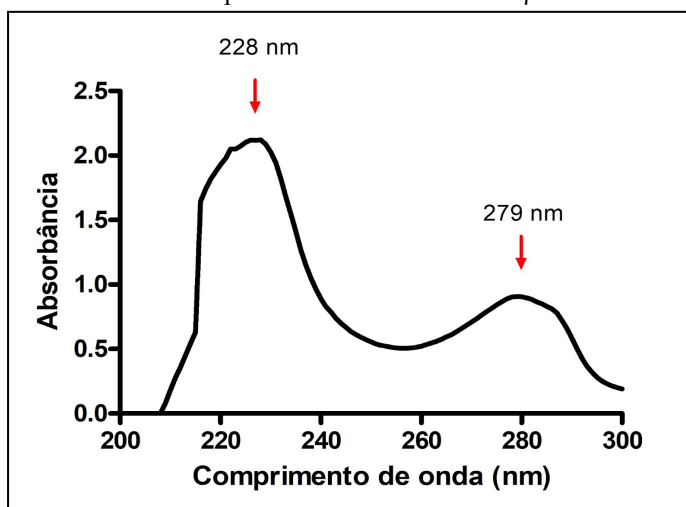
Os resultados obtidos neste trabalho, com Ec de 100% e Ri de 90,62% após 16 horas de incubação, demonstraram desempenho superior em relação a diversos estudos na literatura. No estudo de Zhang *et al.* (2009), embora a eficiência de carga tenha sido alcançada em tempo reduzido, o rendimento de imobilização foi limitado e ainda menor em tempos prolongados. Já o trabalho de Lin *et al.* (2015) reportou rendimento de imobilização de 66,9% no tempo de 6 horas, com queda de atividade em períodos mais longos. Esses contrastes sugerem que a lacase do camarão pode necessitar de um tempo maior para uma imobilização eficiente, possivelmente devido a particularidades estruturais da enzima, mas ainda assim apresentou desempenho final superior.

5.3 DEGRADAÇÃO DO 17 β -estradiol

Este estudo avaliou a degradação do estrogênio E2 pela enzima lacase nas formas livre e imobilizada, em diferentes concentrações do hormônio (25, 50 e 100 mg/L) e tempos de incubação (0, 12, 60 e 84 horas). Os resultados obtidos estão representados nos gráficos 4, 5 e 6, os quais evidenciam o comportamento distinto da enzima em função do tipo de aplicação e da concentração do E2.

5.3.1 Ensaio de degradação do 17 β -estradiol

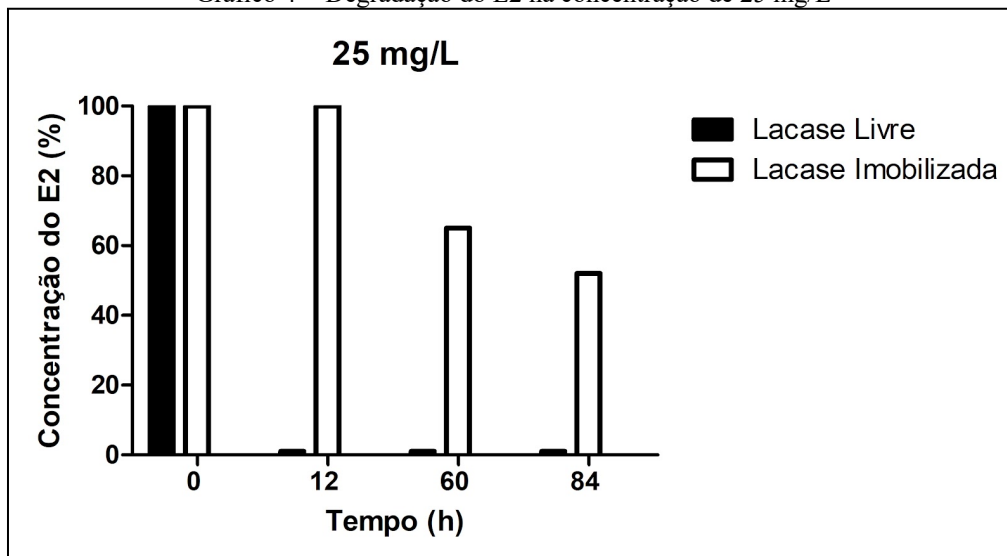
A degradação do E2 catalisada pela lacase livre e imobilizada foi avaliada através de monitoramento espectrofotométrico. Fonseca, Lima e Esteves (2011), ao estudarem a degradação deste hormônio através da radiação solar, descrevem o espectro de absorção destas moléculas com picos característicos na região entre 228 nm e 279 nm no espectro visível, conforme ilustrado pelo gráfico 3. Durante o processo de degradação observou-se uma redução progressiva na intensidade dessas bandas, refletindo a diminuição da concentração do hormônio. Essa correlação permite o uso da espectrofotometria como ferramenta sensível e eficaz para acompanhar a degradação do composto ao longo do tempo.

Gráfico 3 – Espectro de absorbância do 17 β -estradiol

Fonte: A autora (2025).

O gráfico 4 apresenta os dados referentes à degradação do E2 na concentração de 25 mg/L. É possível observar que a lacase livre promoveu uma redução drástica da concentração de E2 nas primeiras 12 horas de reação, atingindo concentrações baixas ou impossíveis de identificar pelo aparelho utilizado. Esse resultado sugere a degradação completa do estrogênio, sendo condizente com o alto potencial oxidativo da lacase frente a uma baixa concentração de substrato (Bilal *et al.*, 2019). No entanto, devido a limitação do método utilizado, não se pode descartar a possibilidade de interferências experimentais ou falhas na detecção, havendo a necessidade de confirmação da análise por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

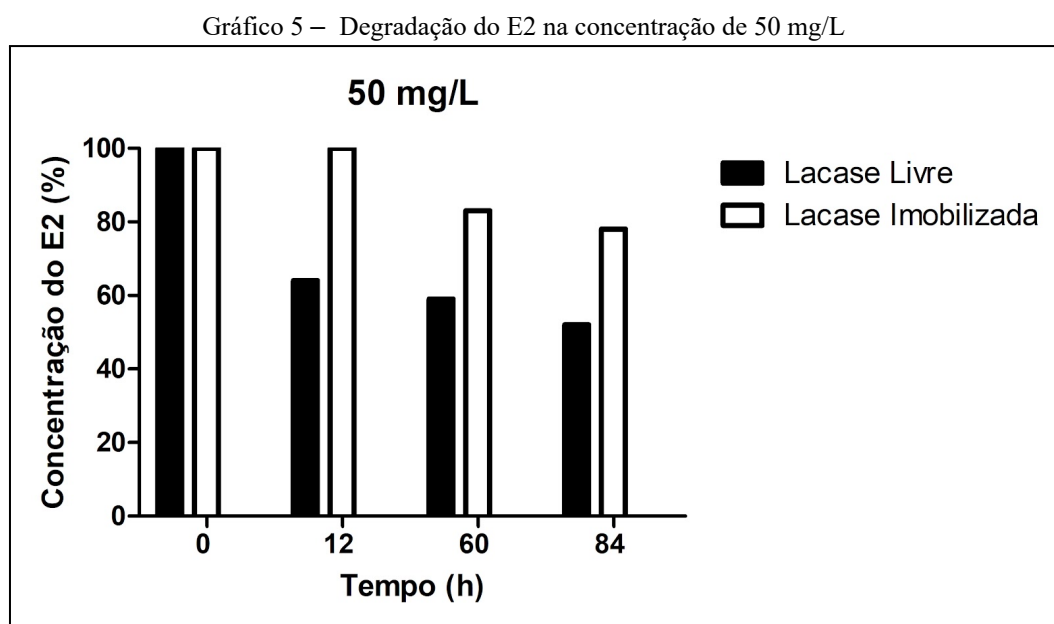
Gráfico 4 – Degradação do E2 na concentração de 25 mg/L



Fonte: A autora (2025).

Quando avaliado o comportamento da lacase imobilizada, a reação nas 12 horas iniciais não causou degradação do estrogênio. No entanto, os tempos reacionais seguintes apresentam uma diminuição progressiva do composto, chegando, respectivamente, a aproximadamente 60% e 50% da concentração inicial. Isso indica que, embora mais lenta, a lacase imobilizada também degrada estrogênio ao longo do tempo, reforçando a hipótese de uma cinética de reação retardada devido à imobilização da enzima.

No gráfico 5 é observado que na concentração intermediária de 50 mg/L, a lacase livre promoveu uma degradação nas primeiras 12 horas, reduzindo a concentração de E2 para aproximadamente 65%. Porém, essa redução não se intensificou consideravelmente com o tempo, mantendo-se em torno de 60% em 60 horas, e 55% em 84 horas.



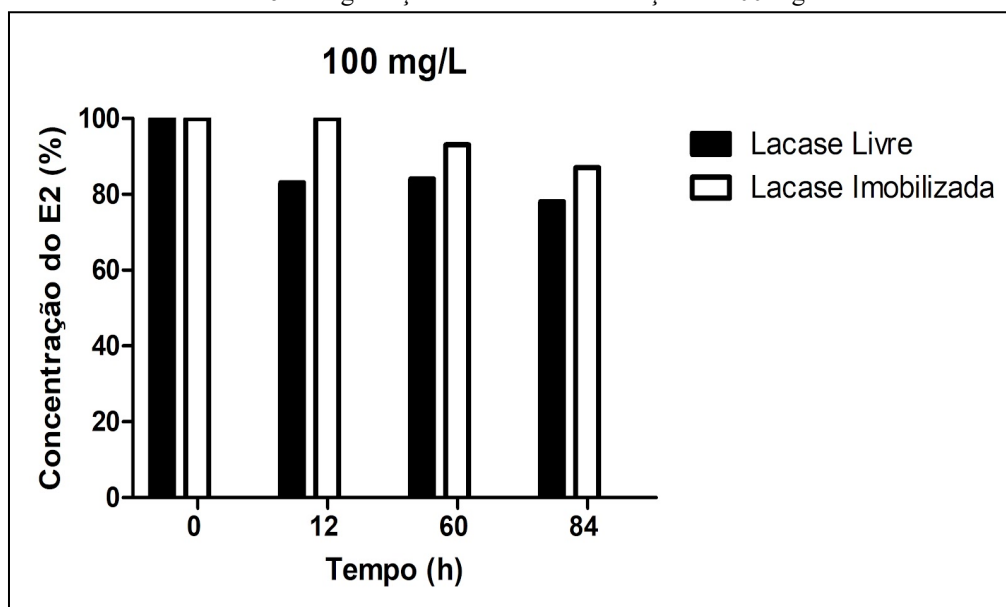
Fonte: A autora (2025).

A lacase imobilizada, por sua vez, manteve a concentração de E2 em 100% nas primeiras 12 horas, contudo, nos tempos seguintes foi identificado a queda de concentração do estrogênio para cerca de 85% e 80%. Assim, como observado em 25 mg/L, há uma tendência clara de atraso na atividade da enzima imobilizada, com ação mais perceptível somente após períodos prolongados de incubação.

No gráfico 6, correspondente a maior concentração de estrogênio testada (100 mg/L), a enzima nas suas duas formas apresenta uma menor eficiência de degradação em comparação às concentrações anteriores. Ao analisar, a enzima imobilizada seguiu a tendência até então observada, apresentando degradação significativa apenas após as 12 horas iniciais, enquanto a lacase livre foi capaz de causar uma diminuição do composto para aproximadamente 80% da

concentração inicial. Nas análises referentes a 84 horas, o E2 na presença da lacase livre apresentou diminuição para 76% da sua concentração, enquanto aquele em contato com a lacase imobilizada manteve-se por volta de 87%. Isso mostra que a eficiência da degradação diminui em concentrações mais elevadas de estrogênio, o que pode estar associado a uma saturação do sítio ativo da enzima, inibição por excesso de substrato ou limitações difusionais nos sistemas imobilizados (Halder *et al.*, 2014).

Gráfico 6 – Degradação do E2 na concentração de 100 mg/L



Fonte: A autora (2025).

A análise comparativa dos dados obtidos demonstra que a lacase livre apresenta maior eficiência na degradação do E2, especialmente nas concentrações de 25 mg/L e 50 mg/L. Esse comportamento sugere que a enzima, em sua forma solúvel, possui maior acessibilidade ao substrato, favorecendo a interação direta do E2 e, conseqüentemente, promovendo uma degradação mais rápida e expressiva. A redução significativa da concentração do estrogênio já nas primeiras 12 horas, principalmente na condição de 25 mg/L, evidencia o potencial da lacase livre como biocatalisador em processos de remoção de contaminantes hormonais (Bilal *et al.*, 2019). Em estudo comparativo, Ranimol e Sunkar (2022) observaram que a lacase livre apresentou eficiência catalítica cerca de duas vezes superior a lacase imobilizada em alginato de cobre, evidenciando que a forma livre possui melhor afinidade e desempenho em baixas concentrações de substrato, embora apresente menor estabilidade durante o armazenamento.

Por outro lado, a lacase imobilizada apresentou uma resposta mais lenta, sem degradação perceptível nas primeiras 12 horas em nenhuma das concentrações testadas.

Apenas em tempos de incubação mais longos, como 60 e 84 horas, foi possível observar redução na concentração de E2, embora essa degradação tenha sido menor quando comparada à enzima livre. Essa diferença de desempenho pode estar associada à imobilização da enzima, que, apesar de aumentar sua estabilidade estrutural, pode restringir sua flexibilidade conformacional ou dificultar o acesso do substrato ao centro ativo. O tempo de imobilização é uma variável crucial no processo, pois períodos muito curtos podem impedir que as moléculas de lacase penetrem adequadamente na matriz do suporte, levando a redução da atividade enzimática (Halder *et al.*, 2014). Além disso, limitações comuns em sistemas imobilizados podem retardar o início da atividade catalítica. Esse desempenho inferior pode estar relacionado ao uso de reticuladores como o glutaraldeído, que, embora aumentem a estabilidade da enzima ao formar ligações com grupos amino, podem também causar alterações estruturais e dificultar o acesso ao sítio ativo, comprometendo a atividade catalítica (Migneault *et al.*, 2004; Palvannan *et al.*, 2014; Daâssi *et al.*, 2014).

Nas concentrações mais altas de estrogênio, observou-se uma redução geral da eficiência de degradação, tanto para a lacase livre quanto para a imobilizada. Isso pode estar relacionado a uma possível inibição enzimática por excesso de substrato, a saturação do sistema enzimático ou ainda a formação de agregados que dificultam a oxidação (Zheng *et al.*, 2016). De modo geral, a lacase livre apresentou desempenho superior mesmo nessa condição, embora com degradação menos acentuada do que em concentrações mais baixas. Considerando os resultados obtidos, a degradação do E2 em 50 mg/L pela lacase livre demonstrou melhor desempenho comprovado, com degradação expressiva já nas primeiras horas e manutenção da atividade ao longo do tempo. Já na condução de 25 mg/L com lacase livre, a degradação parece ter sido total, embora essa hipótese ainda careça de confirmação por HPLC.

Em síntese, os dados reforçam que a forma livre da lacase tem maior potencial para aplicação direta na degradação de estrogênio, enquanto a forma imobilizada, embora mais estável e reutilizável, exige tempo de reação mais longos para alcançar resultados similares. Assim, testes com maior tempo de incubação e aplicação de métodos analíticos mais sensíveis, como o HPLC, são recomendados para avaliar com maior precisão a real eficiência da lacase imobilizada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo confirmam, de modo geral, as hipóteses propostas e sustentam o potencial da lacase extraída de subprodutos do camarão *P. vannamei* na degradação do E2 em condições laboratoriais. A atividade enzimática da lacase proveniente do hepatopâncreas foi comprovada, evidenciando sua capacidade de atuar sobre o substrato alvo. A eficiência na degradação do E2 foi particularmente notável quando a enzima foi aplicada em sua forma livre, indicando elevado desempenho catalítico sob baixas concentrações do contaminante.

A imobilização da lacase em quitosana magnetizada, embora tenha conferido maior estabilidade e potencial de reutilização, resultou em menor eficiência nas fases iniciais da incubação, com degradação significativa apenas em períodos prolongados. Isso sugere que fatores como limitações difusionais ou alteração conformacional da enzima podem impactar negativamente sua atividade imediata.

De forma abrangente, os achados demonstram que a lacase oriunda de resíduos da indústria pesqueira é funcional e promissora para aplicações em processos de biorremediação, especialmente em sua forma livre. Além disso, o aproveitamento de subprodutos do *P. vannamei* reforça o valor estratégico de integrar soluções ambientais a práticas de economia circular e valorização de resíduos industriais.

6.2 LIMITAÇÕES DA PESQUISA

Apesar dos resultados positivos obtidos, este estudo apresentou algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos dados. A principal limitação foi a ausência de um método quantitativo, como o HPLC, para confirmação precisa a respeito da eficiência da técnica e a identificação de possíveis produtos intermediários da oxidação. Isso se tornou particularmente relevante no experimento de degradação do E2 a 25 mg/L pela lacase livre, onde a concentração residual foi indetectável. Outra limitação refere-se ao tempo de incubação utilizado. Apesar da tendência observada ao longo das 84 horas, especialmente com a lacase imobilizada, esse período pode ter sido insuficiente para identificar o potencial da enzima quando insolúvel, cuja ação foi visivelmente mais lenta.

6.3 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das limitações identificadas e com base nos resultados obtidos, diversas possibilidades de continuidade podem ser propostas para aprofundar o conhecimento sobre o uso da lacase do *P. vannamei* na degradação de compostos. Em primeiro lugar, destaca-se a importância da aplicação de técnicas analíticas sensíveis, que permitirão não apenas confirmar a degradação do estrogênio, mas também caracterizar os produtos formados, contribuindo para uma compreensão mais completa. Também é recomendada a amplificação do tempo de incubação nos ensaios com a enzima imobilizada, uma vez que os resultados apontaram para uma atividade tardia e progressiva. Outra linha de pesquisa promissora envolve o teste de novos métodos de imobilização ou suportes alternativos que reduzam as limitações e preservem a atividade catalítica da enzima. Por fim, considerando uma abordagem sustentável deste trabalho, o aproveitamento desse resíduo do camarão como fonte enzimática reforça a necessidade de investir em estratégias de reaproveitamento de resíduos da aquicultura, promovendo soluções de baixo custo, ambientalmente responsáveis e tecnicamente eficientes.

REFERÊNCIAS

- ADEEL, M. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. **Environment International**, fev. 2017. v. 99, n. 99, p. 107–119. Acesso em: 13 jun 2025.
- ADEYEYE, A. O.; LAUB, B. G. Quantification of estrogen concentration in a creek receiving wastewater treatment plant effluent. **Environmental Monitoring and Assessment**, 13 jun. 2020. v. 192, n. 7. Acesso em: 18 mar. 2025.
- AHMED, M. B. *et al.* Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. **Journal of Hazardous Materials**, fev. 2017. v. 323, p. 274–298. Acesso em: 28 mai. 2025.
- ALBALAT A. *et al.* Welfare in Farmed Decapod Crustaceans, With Particular Reference to *Penaeus vannamei*. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, 2022. Acesso em: 22 jun 2025.
- ALHARBI, S. K. *et al.* Degradation of diclofenac, trimethoprim, carbamazepine, and sulfamethoxazole by laccase from *Trametes versicolor*: Transformation products and toxicity of treated effluent. **Biocatalysis and Biotransformation**, 11 abr. 2019. v. 37, n. 6, p. 399–408. Acesso em: 26 mai 2025.
- ALMAZROUEI, B. *et al.* Steroid hormones in wastewater: Sources, treatments, environmental risks, and regulations. **Emerging Contaminants**, jun. 2023. v. 9, n. 2, p. 100210. Acesso em: 07 jun 2025.
- AMAYA, A. *et al.* Welfare in Farmed Decapod Crustaceans, With Particular Reference to *Penaeus vannamei*. **Frontiers in Marine Science**, 6 maio. 2022. v. 9. Acesso em: 25 mai 2025.
- ANWAY, M. D.; SKINNER, M. K. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors. **Endocrinology**, jun. 2006. v. 147, n. 6, p. s43–s49. Acesso em: 18 mai 2025.
- ARNOLD, E. *et al.* Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1656, p. 20130569, 2014. Acesso em: 21 jun 2025.
- ARREGUI, L. *et al.* Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. **Microbial Cell Factories**, 14 nov. 2019. v. 18, n. 1. Acesso em: 22 mai 2025.
- AZEVEDO, R. D. S.; AMARAL, I. P. G.; FERREIRA, A. C. M.; ESPÓSITO, T. S.; BEZERRA, R. S. Use of fish trypsin immobilized onto magnetic-chitosan composite as a new tool to detect antinutrients in aquafeeds. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 257, p. 302-309, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.034>. Acesso em: 18 jun 2025.
- BAHAMONDE, P. A.; MUNKITTRICK, K. R.; MARTYNIUK, C. J. Intersex in teleost fish: Are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? **General and Comparative Endocrinology**, 1 out. 2013. v. 192, p. 25–35. Acesso em: 22 mai 2025.

BALABANIČ, D.; RUPNIK, M.; KLEMENČIČ, A. K. Negative impact of endocrine-disrupting compounds on human reproductive health. **Reproduction, Fertility and Development**, 2011. v. 23, n. 3, p. 403. Acesso em: 18 mai 2025.

BARBOSA, M. O. *et al.* Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. **Water Research**, 1 maio. 2016. v. 94, p. 257–279. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135416301063>>. Acesso em: 27 mai 2025.

BARKER, D. Editorial: The Developmental Origins of Adult Disease. **European Journal of Epidemiology**, 2003. v. 18, n. 8, p. 733–736. Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/3582917>>. Acesso em: 19 mai 2025.

BARREIROS, L. *et al.* Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review. **Microchemical Journal**, maio. 2016. v. 126, p. 243–262. Acesso em: 26 jun. 2025.

BERGMAN, Å. *et al.* State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012. **World Health Organization**. [S.l: s.n., s.d.]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/78101/9789241505031_eng.pdf>. Acesso em: 20 mai 2025.

BHASKAR, N. *et al.* Shrimp biowaste fermentation with *Pediococcus acidolactici* CFR2182: Optimization of fermentation conditions by response surface methodology and effect of optimized conditions on deproteinization/demineralization and carotenoid recovery. **Enzyme and Microbial Technology**, abr. 2007. v. 40, n. 5, p. 1427–1434. Acesso em: 19 mai 2025.

BHATTACHARYA, A. *et al.* Advances in Bioremediation Strategies for PFAS-Contaminated Water and Soil. **Soil & Environmental Health**, p. 100126–100126, 2024. Acesso em: 04 ago 2025.

BILAL, M. *et al.* Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. **Environment International**, mar. 2019. v. 124, p. 336–353. Acesso em 17 mai 2025.

BRADFORD, M.M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Acesso em 18 mai. 2025.

BRASIL. Censo da carcinicultura dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí. **Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**. [S.l: s.n., s.d.]. Disponível em: <https://aprece.org.br/wp-content/uploads/2022/11/aprece-associacao-dos-municipios-do-estado-do-ceara_censo-ce-pi-rn-versao-digital.pdf>. Acesso em: 01 mai 2025.

BRZOZOWSKI, A. M. *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. **Nature**, out. 1997. v. 389, n. 6652, p. 753–758. Acesso em 01 jul 2025.

CAHÚ, T. B.; SANTOS, S. D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO, L. B.; NADER, H. B.; BEZERRA, R. S.. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

processing waste. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 570-577, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.012>. Acesso em: 15 jul 2025.

CAÑAS, A. *et al.* Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Is Strongly Enhanced by Phenolic Compounds Present in Soil. **Environmental Science & Technology**, 21 mar. 2007. v. 41, n. 8, p. 2964–2971. Acesso em: 27 jun 2025.

CARVALHO, T. V. Bioprocessamento de resíduos de camarão para obtenção de quitina, quitosana e mistura de proteínas, pigmentos e minerais. 2024. 108 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010. Disponível em: <https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UECE-0_ac6e24067824b2b03809b95e2ec5b673>. Acesso em: 04 jun 2025.

CELINO-BRADY, T. *et al.* Early-life exposure to 17 β -estradiol and 4-nonylphenol impacts the growth hormone/insulin-like growth-factor system and estrogen receptors in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Aquatic Toxicology**, v. 217, p. 105336, 2019. Acesso em: 07 jun 2025.

CHEN G. *et al.* Concanavalin a affinity chromatography for efficient baculovirus purification, **Biotechnology Progress**. 25 (2009) 1669–1677. <https://doi.org/10.1002/btpr.253>. Acesso em: 09 jun 2025.

CHEN, Y.; LIN, M.; ZHUANG, D. Wastewater treatment and emerging contaminants: Bibliometric analysis. **Chemosphere**, jun. 2022. v. 297, p. 133932. Acesso em: 11 jun 2025.

CHIVUKULA, M.; RENGANATHAN, V. Phenolic Azo Dye Oxidation by Laccase from *Pyricularia oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, dez. 1995. v. 61, n. 12, p. 4374–4377. Acesso em: 22 jun 2025.

CLOUZOT, L. *et al.* 17 α -Ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern. Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. **Environmental Progress**, out. 2008. v. 27, n. 3, p. 383–396. Acesso em: 19 jun 2025.

COLLINS, P. J. *et al.* Oxidation of Anthracene and Benzo[a]pyrene by Laccases from *Trametes versicolor*. **Applied and environmental microbiology**, 1996. v. 62, n. 12, p. 4563–4567. Acesso em: 22 mai 2025.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1 maio. 2010. v. 86, n. 6, p. 1671–1692. Acesso em: 13 mai 2025.

CONROY, O. *et al.* Changes in estrogen/anti-estrogen activities in ponded secondary effluent. **Science of The Total Environment**, 1 set. 2007. v. 382, n. 2-3, p. 311–323. Acesso em: 16 mai 2025.

COSTER, S.; LAREBEKE, N. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2012, p. 1–52, 2012. Acesso em: 23 mai 2025.

CREWS, D. *et al.* Wildlife as models for the study of how mixtures, low doses, and the embryonic environment modulate the action of endocrine-disrupting chemicals. **Pure and Applied Chemistry**, 1 jan. 2003. v. 75, n. 11-12, p. 2305–2320. Acesso em: 15 mai 2025.

CRUZ, C. A. Biomassa da carcinicultura para a produção a produção de biogás no litoral cearense. 2019. 29 f. Monografia (Especialização em Tecnologias da Cadeia Produtiva do Biogás) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/20503/2/biomassacarciniculturaproducaolito ral.pdf>> Acesso em: 25 mai 2019.

DAÂSSI, D. *et al.* Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 90, p. 71–78, maio 2014. Acesso em: 21 mai 2025.

DEBNATH, R.; SAHA, T. An insight into the production strategies and applications of the ligninolytic enzyme laccase from bacteria and fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, jul. 2020. v. 26, p. 101645. Acesso em: 21 mai 2025.

DESBROW, C. *et al.* Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 11, p. 1549–1558, 1998. Acesso em: 14 mai 2025.

MAŁGORZATA, D.; KOŃCZAK, B. Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process – State of the art. **Process Biochemistry**, set. 2019. v. 84, p. 112–123. Acesso em: 08 mai 2025.

KANDARAKIS, E. *et al.* Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocrine Reviews**, jun. 2009. v. 30, n. 4, p. 293–342. Acesso em: 08 mai 2025.

DUONG, C. *et al.* Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. 1 jan. 2010. v. 78, n. 3, p. 286–293. Acesso em: 08 mai 2025.

DUTTA, S. *et al.* Free and Conjugated Estrogen Exports in Surface-Runoff from Poultry Litter-Amended Soil. **Journal of environmental quality**, 1 set. 2010. v. 39, n. 5, p. 1688–1698. Acesso em: 17 mai 2025.

ESTEBAN, S. *et al.* Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. 1 jan. 2014. v. 466-467, p. 939–951. Acesso em: 29 jun 2025.

FAO. DSpace. **Fao.org**, 2024. Disponível em: <<https://openknowledge.fao.org/items/06690fd0-d133-424c-9673-1849e414543d>>. Acesso em: 13 jul 2025.

FENG, S. *et al.* Enzyme sources in wastewater treatment: Their influence on enzymatic bioremediation and large-scale applications. **Chemical Engineering Journal**, 23 mar. 2025. v. 510, p. 161891. Acesso em: 23 jun 2025.

FERNANDEZ, F. M. *et al.* Human Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals and Prenatal Risk Factors for Cryptorchidism and Hypospadias: A Nested Case–Control Study. **Roderic.uv.es**, 2007. Acesso em: 19 jun 2025.

FILHO, O. *et al.* Vista da viabilidade econômica na carcinicultura: avaliação de *Penaeus vannamei* em áreas costeiras e interiores sob diferentes níveis de salinidade no Nordeste do Brasil. **Observatorio de la economía latino americana**, 2025. Acesso em: 19 mai. 2025.

FONSECA, A. P.; LIMA, D. L. D.; ESTEVES, V. I. Degradation by Solar Radiation of Estrogenic Hormones Monitored by UV–Visible Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 215, n. 1-4, p. 441–447, 5 jun. 2010. Acesso em: 20 mai 2025.

FORGHANI, M.; SADEGHI, G.; PEYDA, M. The Presence of 17 Beta-Estradiol in the Environment: Health Effects and Increasing Environmental Concerns. **International Journal of Epidemiologic Research**, 25 dez. 2018. v. 5, n. 4, p. 151–158. Acesso em: 02 mai 2025.

GEORGIN, J. *et al.* A critical and comprehensive review of the current status of 17 β -estradiol hormone remediation through adsorption technology. **Environmental Science and Pollution Research**, 15 mar. 2024. v. 31, n. 17, p. 24679–24712. Acesso em: 11 jun 2025.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, jun. 2007. v. 30, n. 3, p. 695–706. Acesso em: 03 mai 2025.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, set. 2004. v. 35, n. 4, p. 339–354. Acesso em: 23 mai 2025.

GODFREY, T.; REICHEL, J. Industrial enzymology: the application of enzymes in industry. **U.S. Department of Energy**, 2012. Disponível em: <<https://www.osti.gov/biblio/5395037>>. Acesso em: 21 jun 2025.

GÖTZE, J. P.; BÜHL, M. Laccase Redox Potentials: pH Dependence and Mutants, a QM/MM Study. **The Journal of Physical Chemistry B**, 17 ago. 2016. v. 120, n. 35, p. 9265–9276. Acesso em: 30 jun 2025.

GRAY, L. E. *et al.* Xenoendocrine disrupters-tiered screening and testing. **Toxicology**, dez. 2002. v. 181-182, p. 371–382. Acesso em: 21 mai 2025.

GUAN, Y. C. *et al.* Concanavalin a affinity chromatography for efficient baculovirus purification, *Biotechnology Progress*. 25 (2009) 1669–1677. <https://doi.org/10.1002/btpr.253>. Acesso em: 02 maio 2025.

HALDER, S. K. *et al.* Chitinases biosynthesis by immobilized *Aeromonas hydrophila* SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 170–177, 29 ago. 2013. Acesso em: 23 mai 2025.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. Washington, DC: **American Chemical Society**, 1995., p. 158. Acesso em: 20 jun 2025. Acesso em: 29 jun 2025.

HEDAR M. *et al.* Immobilized enzyme systems for wastewater treatment. **Advances in chemical pollution, environmental management and protection**, p. 183–206, 2023. Acesso em 30 mai 2025.

HILGERS, R. *et al.* Laccase/Mediator Systems: Their Reactivity toward Phenolic Lignin Structures. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 22 jan. 2018. v. 6, n. 2, p. 2037–2046. Acesso em: 16 mai 2025.

HONG, C. *et al.* Nanozyme: A promising tool from clinical diagnosis and environmental monitoring to wastewater treatment. **Particuology**, 1 dez. 2022. v. 71, p. 90–107. Acesso em: 16 mai 2025.

HORDERN, B. *et al.* The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. **Water Research**, v. 43, n. 2, p. 363–380, 2009.

IBGE. Produção Agropecuária. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/camarao/br>>. Acesso em: 26 jun 2025.

JAISWAL, N.; PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 86, p. 288–295, 2016. Acesso em: 16 mai 2025.

JAISWAL, N.; PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Purification of a thermostable alkaline laccase from papaya (*Carica papaya*) using affinity chromatography. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 72, p. 326–332, 2015. Acesso em: 23 mai 2025.

Jl, C.; HOU, J.; CHEN, V. Cross-linked carbon nanotubes-based biocatalytic membranes for micro-pollutants degradation: Performance, stability, and regeneration. **Journal of Membrane Science**, dez. 2016. v. 520, p. 869–880. Acesso em: 21 jun 2025.

JIANG, D.; LONG, S.; HUANG, J.; XIAO, H.; ZHOU, J.. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 15-23, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2005.03.007>. Acesso em: 11 jun 2025.

JIN, X. *et al.* Conditions Optimizing and Application of Laccase-mediator System (LMS) for the Laccase-catalyzed Pesticide Degradation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016. Acesso em: 05 jun 2025.

JOHNSON, A. C.; WILLIAMS, R. J. A Model To Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol, Estrone, and Ethinylestradiol at Sewage Treatment Works. **Environmental Science & Technology**, jul. 2004. v. 38, n. 13, p. 3649–3658. Acesso em: 25 mai 2025.

KANAUJIYA, D. K. *et al.* Biological Treatment Processes for the Removal of Organic Micropollutants from Wastewater: a Review. **Current Pollution Reports**, 1 jun. 2019. v. 5, n. 3, p. 112–128. Acesso em: 11 jun 2025.

KANG, X. *et al.* Optimization of operating conditions in the biological enzymes for efficient waste activated sludge dewatering. **Process Safety and Environmental Protection**, fev. 2023. v. 170, p. 545–552. Acesso em: 11 jun 2025.

KIM, M. K. *et al.* Occurrence and removals of micropollutants in water environments. **Environmental Engineering Research**, 29 nov. 2016. v. 21, n. 4, p. 319–332. Acesso em: 18 mai 2025.

KÖRNER, W. *et al.* Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, out. 2001. v. 20, n. 10, p. 2142–2151. Acesso em: 19 jun 2025.

KUMAR, L.; BHARADVAJA, N. Chapter 6 - Enzymatic bioremediation: a smart tool to fight environmental pollutants. **ScienceDirect**, 1 jan. 2019. Acesso em 03 mai 2025

KURAMITZ, H. *et al.* Electrochemical removal of p-nonylphenol from dilute solutions using a carbon fiber anode. **Water Research**, 4 mar. 2002. v. 36, n. 13, p. 3323–3329. Acesso em 30 jun 2025.

KUSTER, M.; JOSÉ, L. M.; BARCELÓ, D. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, nov. 2004. v. 23, n. 10-11, p. 790–798. Acesso em: 01 mai 2025.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Acesso em: 23 jun 2025.

LIN, A. C.; TSAI, Y. T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. **Science of The Total Environment**, jun. 2009. v. 407, n. 12, p. 3793–3802. Acesso em 24 mai 2025.

LIN, J. *et al.* Enhancing catalytic performance of laccase via immobilization on chitosan/CeO₂ microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 78, p. 1–8, 2015. Acesso em: 20 jul 2025.

LIU, N. *et al.* Fungal laccase: Multi-biofunction and complicated natural substrates. **Agric. Biotechnol**, 2020. Acesso em: 01 jun 2025.

LIU, J. L.; WONG, M. H. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China. **Environment International**, set. 2013. v. 59, p. 208–224. Acesso em: 10 mai 2025.

LIU, S. *et al.* Fate and occurrence of steroids in swine and dairy cattle farms with different farming scales and wastes disposal systems. **Environmental Pollution**, 1 nov. 2012a. v. 170, p. 190–201. Acesso em: 12 jun 2025.

LIU, Z. *et al.* **Chemistry of Materials**, 2012b. p. 1585–1591 Disponível em: <<https://pubs.acs.org/action/doSearch?AllField=LIU+Z>> Acesso em: 14 mai 2025.

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**, [s. l.], v. 51, n. 3, p.124–131, 2010. Acesso em: 27 jun 2025.

MAESTRE-REYNA, M. *et al.* Structural and Functional Roles of Glycosylation in Fungal Laccase from *Lentinus* sp. **PLOS ONE**, 7 abr. 2015. v. 10, n. 4, p. e0120601–e0120601. Acesso em: 29 mai 2025.

MARTIN, E. *et al.* Recent advances in laccase activity assays: A crucial challenge for applications on complex substrates. **Enzyme and Microbial Technology**, fev. 2024. v. 173, p. 110373. Acesso em: 14 jul 2025.

MATEEN, H. *et al.* Immobilized enzyme systems for wastewater treatment. **Advances in chemical pollution, environmental management and protection**, 1 jan. 2023. p. 183–206. Acesso em: 04 jun 2025.

MATIJOŁYTE, I.; ARENDS, I.; VRIES, S.; SHELDON, R. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.L.], v. 62, n. 2, p. 142-148, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.09.019>. Acesso em: 04 jun 2025.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology. **Endocrine Reviews**, 1 jun. 1999. v. 20, n. 3, p. 321–344. Acesso em: 21 mai 2025.

MENG, S. *et al.* The role of transparent exopolymer particles (TEP) in membrane fouling: A critical review. **Water Research**, ago. 2020. v. 181, p. 115930. Acesso em: 01 mai 2025.

MEYER, N. *et al.* Exposure to 17 α -ethinyl estradiol during early pregnancy affects fetal growth and survival in mice. **Environmental Pollution**, 1 ago. 2019. v. 251, p. 493–501. Acesso em: 01 mai 2025.

MIÈGE, C. *et al.* Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 1 fev. 2009. v. 28, n. 2, p. 186–195. Acesso em: 18 jul. 2025.

MIGNEAULT, I. *et al.* Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790–802, nov. 2004. Acesso em: 22 mai 2025.

MORE, S. *et al.* Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

NAZARI, E.; SUJA, F. Effects of 17 β -estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: a review. **Reviews on Environmental Health**, 1 dez. 2016. v. 31, n. 4. Acesso em: 09 mai 2025.

OLIVEIRA, A. G. J. Cultivo de camarões marinhos em águas oligo e mesohalinas na

Paraíba. **Revista Feed&Food**. Sorocaba. 179: 86-87 p. 2022. Acesso em: 26 mai 2025.

OMS. **State of the science of endocrine disrupting chemicals**. 2012. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/state-of-the-science-of-endocrine-disrupting-chemicals>>.

OZTEKIN, A. *et al.* Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. **Journal of Chromatography B**, 01 mai. 2019. v. 1114–1115, p. 86-92. Acesso em: 25 jun 2025.

PALVANNAN T. *et al.* Efficient transformation of phenyl urea herbicide chloroxuron by laccase immobilized on zein polyurethane nanofiber. **Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic**, v. 99, p. 156–162, 2014. Acesso em: 12 jun 2025.

PESQUEIRA, J. F. J. R.; PEREIRA, M. F. R.; SILVA, A. M. T. Environmental impact assessment of advanced urban wastewater treatment technologies for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern: A review. **Journal of Cleaner Production**, jul. 2020. v. 261, p. 121078. Acesso em: 03 mai 2025.

PETROVIC, M. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, nov. 2003. v. 22, n. 10, p. 685-696. Acesso em: 05 mai 2025.

POLYAKOV, K. M. *et al.* Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, 26 abr. 2017. v. 73, n. 5, p. 388–401. Acesso em: 11 jun 2025.

PRAJAPATI, D. *et al.* A critical review on emerging contaminants: origin, discernment, and remedies. **Sustainable Water Resources Management**, 11 abr. 2023. v. 9, n. 3. Acesso em: 21 jun 2025.

PROCÓPIO, A. M. da S.; ANDRADE, F. V.; SILVA, F. S.; ANDRADE, S. J. Removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2) from aqueous solutions by peanut shells (*Arachis hypogaea*): adsorption kinetic, isothermal, and thermodynamic studies. **Water Practice and Technology**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 2543–2560, 2023. Acesso em: 05 mai 2025.

QI, X. *et al.* Novel insights into the mechanism of laccase-driven rhizosphere humification for alleviating wheat 17 β -estradiol contamination. **Environment International**, 1 mar. 2024. v. 185, p. 108576–108576. Acesso em 27 mai 2025.

QIANG, Z. *et al.* A comparison of various rural wastewater treatment processes for the removal of endocrine-disrupting chemicals (EDCs). **Chemosphere**, ago. 2013. v. 92, n. 8, p. 986–992. Acesso em: 09 jun 2025.

RACZ, L.; GOEL, R. K. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. **Journal of environmental monitoring: JEM**, 1 jan. 2010. v. 12, n. 1, p. 58–70. Acesso em: 06 jun 2025.

RAKOTOVELO. Lignine: Structure, production et valorisation chimique. **Techniques de L'ingénieur**, 10 abr 2019. Acesso em: 10 mai 2025.

RANIMOL, G.; SUNKAR, S. A comparative study of free laccase immobilized in copper alginate. **Indian Journal of Biochemistry e Biophysics**, fev. 2022. v. 59, p 214–223. Acesso em: 03 mai 2025.

ROBINSON, P. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, n. 1, p. 1–41, 15 nov. 2015. Acesso em: 22 mai 2025.

ROCHA, A. B. *et al.* Shrimp laccase degrades polycyclic aromatic hydrocarbons from an oil spill disaster in Brazil: A tool for marine environmental bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, 1 set. 2023. v. 194, p. 115445. Acesso em: 15 jun 2025.

ROSTAMI, A. *et al.* Applications and mechanisms of free and immobilized laccase in detoxification of phenolic compounds — A review. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 39, n. 4, p. 821–832, 26 jan. 2022. Acesso em: 23 mai 2025.

ROUT, P. R. *et al.* Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. **Science of The Total Environment**, 20 jan. 2021. v. 753, p. 141990. Acesso em: 29 jun 2025.

ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P. Structural Features of Alkylphenolic Chemicals Associated with Estrogenic Activity. **Journal of Biological Chemistry**, 7 fev. 1997. v. 272, n. 6, p. 3280–3288. Acesso em: 21 mai. 2025.

RUGGABER, T. P.; TALLEY, J. W. Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: A Review. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, abr. 2006. v. 10, n. 2, p. 73–85. Acesso em: 02 jun 2025.

RYBARCZYK, A. *et al.* 3D printed polylactide scaffolding for laccase immobilization to improve enzyme stability and estrogen removal from wastewater. **Bioresource Technology**, ago. 2023. v. 381, p. 129144. Acesso em: 20 mai 2025.

SAAL, F. S. *et al.* Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: Integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. **Reproductive Toxicology**, ago. 2007. v. 24, n. 2, p. 131–138. Acesso em: 22 mai 2025.

SAVINOVA, O. S. *et al.* Comparative analysis of the white rot fungus *Trametes hirsuta* 072 laccases ability to modify 17 β -oestradiol in the aqueous medium. **Biocatalysis and Biotransformation**, 13 jun. 2022. v. 41, n. 6, p. 475–485. Acesso em: 21 jun 2025.

SEAH, S. *et al.* Comparative Specificities of Two Evolutionarily Divergent Hydrolases Involved in Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1511–1516, 2001. Acesso em: 25 jun 2025.

SHAHEEN, J. F.; SIZIRICI, B.; YILDIZ, I. Fate, transport, and risk assessment of widely prescribed pharmaceuticals in terrestrial and aquatic systems: A review. **Emerging Contaminants**, 2022. v. 8, p. 216–228. Acesso em: 21 jun 2025.

SHEEHAN, D. M. *et al.* No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? **Environ Health Perspect**, 1 fev. 1999. v. 107, n. 2, p. 155–159. Acesso em: 21 jun 2025.

SHI, L. *et al.* Identification and characterization of a laccase from *Litopenaeus vannamei* involved in anti-bacterial host defense. **Fish & Shellfish Immunology**, 3 maio. 2017. v. 66, p. 1–10. Acesso em: 21 jun 2025.

SI, J. *et al.* Selection of a pH- and temperature-stable laccase from *Ganoderma australe* and its application for bioremediation of textile dyes. **Journal of Environmental Management**, dez. 2021. v. 299, p. 113619. Acesso em: 21 jun 2025.

SILVA, B. F. *et al.* Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. **Chemosphere**, nov. 2011. v. 85, n. 8, p. 1331–1339. Acesso em: 20 mai 2025.

SILVA, C. P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. **Environmental Pollution**, jun. 2012. v. 165, p. 38–58. Acesso em: 06 mai 2025.

SNYDER, S. A. *et al.* Identification and Quantification of Estrogen Receptor Agonists in Wastewater Effluents. **Environmental Science & Technology**, set. 2001. v. 35, n. 18, p. 3620–3625. Acesso em: 06 mai 2025.

STEPHEN *et al.* Comparative Specificities of Two Evolutionarily Divergent Hydrolases Involved in Microbial Degradation of Polychlorinated Biphenyls. **Journal of Bacteriology**, 1 mar. 2001. v. 183, n. 5, p. 1511–1516. Acesso em: 25 jun 2025.

STEVENS, R. *et al.* Pharmaceuticals and personal care products in biosolids/sewage sludge: the interface between analytical chemistry and regulation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 1 fev. 2007. v. 387, n. 4, p. 1173–1183. Acesso em: 13 jun 2025.

SUMATHI, T. *et al.* Production of Laccase by *Cochliobolus* sp. Isolated from Plastic Dumped Soils and Their Ability to Degrade Low Molecular Weight PVC. **Biochemistry Research International**, 2016. v. 2016, p. 1–10. Acesso em: 21 jun 2025.

SURESH, A.; ABRAHAM, J.. Bioremediation of Hormones from Waste Water. **Springer eBooks**, p. 1–31, 2018. Acesso em: 09 jun 2025.

SUTAONEY, P. *et al.* Feasibility and potential of laccase-based enzyme in wastewater treatment through sustainable approach: A review. **Environmental Science and Pollution Research**, 30 jun. 2022. v. 29, n. 57, p. 86499–86527. Acesso em: 03 mai 2025.

TETREAULT, G. R. *et al.* Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. **Aquatic Toxicology**, ago. 2011. v. 104, n. 3-4, p. 278–290. Acesso em: 03 mai 2025.

THACHARODI, A. *et al.* Water a major source of endocrine-disrupting chemicals: An overview on the occurrence, implications on human health and bioremediation strategies. **Environmental Research**, v. 231, p. 116097, 2023.. Acesso em: 7 mai. 2025.

THAYUMANAVAN, P. *et al.* Efficient transformation of phenyl urea herbicide chloroxuron by laccase immobilized on zein polyurethane nanofiber. **Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic**, v. 99, p. 156–162, 1 jan. 2014. Acesso em: 03 mai 2025.

THORNTON, J. W. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, maio. 2001. v. 98, n. 10, p. 5671–5676. Acesso em: 11 jun 2025.

TIJANI, J. O.; FATOBA, O. O.; PETRIK, L. F. A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections. **Water, Air, & Soil Pollution**, 23 out. 2013. v. 224, n. 11. Acesso em 12 mai 2025.

TING, Y. F.; PRAVEENA, S. M. Sources, mechanisms, and fate of steroid estrogens in wastewater treatment plants: a mini review. **Environmental Monitoring and Assessment**, 24 mar. 2017. v. 189, n. 4. Acesso em: 01 jun 2025.

VADJA, A. M. *et al.* Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. **Aquatic Toxicology**, jun. 2011. v. 103, n. 3-4, p. 213–221. Acesso em: 30 mai 2025.

VIEIRA, W. T. *et al.* Removal of endocrine disruptors in waters by adsorption, membrane filtration and biodegradation. A review. **Environmental Chemistry Letters**, 9 abr. 2020. v. 18, n. 4, p. 1113–1143. Acesso em: 10. jun 2025.

WADHWA, H. *et al.* Occurrence and Applications of Fungal Laccases: A Comprehensive Biotechnological Review. **Biological Forum – An International Journal**, jan. 2023. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Reena-Singh-10/publication/371292911_Occurrence_and_Applications_of_Fungal_Laccases_A_Comprehensive_Biotechnological_Review/link/s/647db5e5b3dfd73b7767dc15/Occurrence-and-Applications-of-Fungal-Laccases-A-Comprehensive-Biotechnological-Review.pdf> Acesso em: 15 mai 2025.

WEE, S. Y.; ARIS, A. Z. Endocrine disrupting compounds in drinking water supply system and human health risk implication. **Environment International**, set. 2017. v. 106, p. 207–233. Acesso em: 15 jun 2025.

WELSHONS, W. V. *et al.* Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. **Environmental Health Perspectives**, jun. 2003. v. 111, n. 8, p. 994–1006. Acesso em: 18 jun 2025.

WESTRUP, J. L. Remoção de compostos desreguladores endócrinos (edc) empregando microfibras poliméricas obtida por eletrofiliação. 2020. 125 f. Tese (Doutorado em química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/213585/001117993.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 30 mai 2025.

WILKINSON, J. *et al.* Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. **Environmental Pollution**, dez. 2017. v. 231, p. 954–970. Acesso em: 14 mai 2025.

WOJNAROWSKI, K. *et al.* Impact of Estrogens Present in Environment on Health and Welfare of Animals. **Animals**, 20 jul. 2021. v. 11, n. 7, p. 2152. Acesso em: 17 jun 2025.

WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 26 jun. 2008. v. 157, n. 2, p. 174–209. Acesso em: 09 mai 2025.

XIA, F. *et al.* Castration-induced testosterone deficiency increases fasting glucose associated with hepatic and extra-hepatic insulin resistance in adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, n. 1, 2013. Acesso em: 22 mai 2025

XU, N. *et al.* Removal of estrogens in municipal wastewater treatment plants: A Chinese perspective. **Environmental Pollution**, jun. 2012. v. 165, p. 215–224. Acesso em 25 mai 2025.

XU, R. *et al.* Laccase immobilization on chitosan/poly (vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal. **Chemical Engineering Journal**, 15 abr. 2013. p 321–329. Acesso em: 27 jun 2025.

YOSHIDA, H. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. **J. Chem. Soc., Trans.**, 1883. v. 43, n. 0, p. 472–486. Acesso em: 02 mai 2025.

ZDARTA, J. *et al.* A promising laccase immobilization using electrospun materials for biocatalytic degradation of tetracycline: Effect of process conditions and catalytic pathways. **Catalysis Today**, maio. 2020. v. 348, p. 127–136. Acesso em: 18 jun 2025.

ZENG, S.; ZHAO, J.; XIA, L. Simultaneous production of laccase and degradation of bisphenol A with *Trametes versicolor* cultivated on agricultural wastes. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 23 maio. 2017. v. 40, n. 8, p. 1237–1245. Acesso em 19 mai 2025.

ZHAI, T. *et al.* Laccase: A Green Biocatalyst Offers Immense Potential for Food Industrial and Biotechnological Applications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 22 out. 2024. Acesso em: 22 mai 2025.

ZHANG, J. *et al.* Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 54–59, 2009. Acesso em: 20 jul 2025.

ZHENG, F. *et al.* Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 69–78, maio 2016. Acesso em: 13 jun 2025.

ZHENG, W.; YATES, S. R.; BRADFORD, S. A. Analysis of Steroid Hormones in a Typical Dairy Waste Disposal System. **Environmental Science & Technology**, jan. 2008. v. 42, n. 2, p. 530–535. Acesso em: 22 jun 2025.