

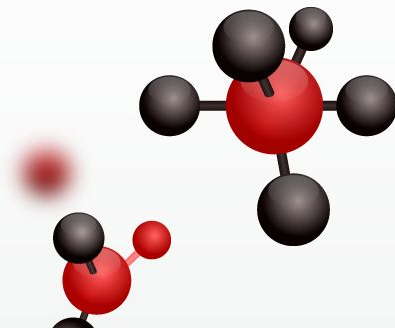
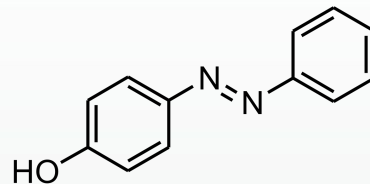
BIORREMEDIAÇÃO DE FENÓIS

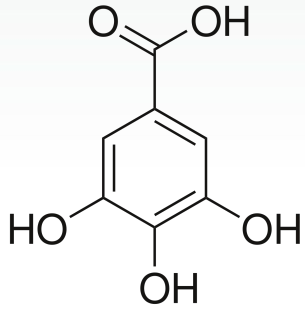
Grupo 9 - Nomes:

Carolina Costa Alborgheti - 11797852

Karine Oliveira da Silva - 11849668

Maria Eduarda Gonzalez Lopes Teixeira - 11876940





Tópicos do trabalho

01

Introdução

- O que é biorremediação?
- Importância da biorremediação

02

Contextualização

- Molécula e suas características
- Impactos do fenol

03

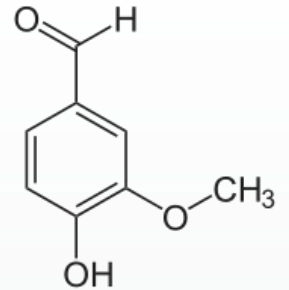
Estudo de caso

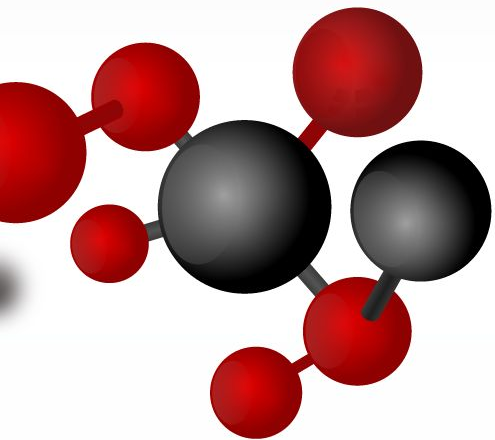
- Biorremediação do fenol
- Análise de tese

04

Outras biorremediações

- Outros lugares que se aplica a biorremediação do fenol

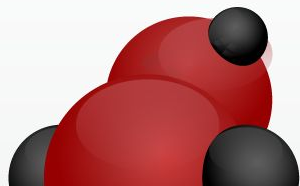




01

INTRODUÇÃO

O que é e a importância da biorremediação

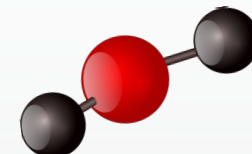
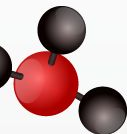


O QUE É BIORREMEDIAÇÃO?



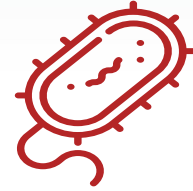
BIO = vida  **REMEDIAÇÃO** = ação de remediar  **REMEDIA**R = reparar, atenuar

- Remover contaminantes tóxicos
- Processo natural - Bactérias, fungos e plantas
- Processos metabólicos
 - Equilíbrio ecológico



IMPORTÂNCIA DA BIORREMEDIAÇÃO

- Degradação de compostos tóxicos
- Causa menos poluição secundária;
- Consegue degradar substâncias não captadas por ETE's e ETA's;
- Regenera os ecossistemas originais de forma equilibrada;
- Gera menos ou nenhum tipo de poluição secundária.



Poluente

+



Microorganismo



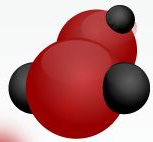
CO₂

Água

Biomassa

Sais minerais





LIMITAÇÕES DA BIORREMEDIAÇÃO

NÃO BIODEGRADAÇÃO

Existem compostos que não são acessíveis a biodegradação



METABOLISMO TÓXICO

Em alguns casos há produção de metabolismos tóxicos



PROCEDIMENTO INTENSO

Deve ser direcionado para condições específicas (muito estudo)



FATORES

Muitos fatores precisam ser considerados na sua aplicação

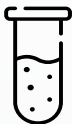


FATORES DA BIORREMEDIAÇÃO

1. Nutrientes



2. pH



3. Temperatura



4. Fonte de energia



5. Aceptores de elétrons



6. Metabolismos inibidores





TIPOS DE BIORREMEDIAÇÃO

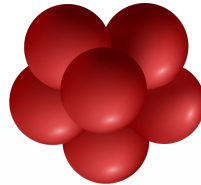
IN SITU

Tratamento do material contaminado no próprio local.

Não é necessário transportar o material.

Baixo custo e a possibilidade de tratamento de grandes áreas.

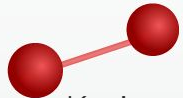
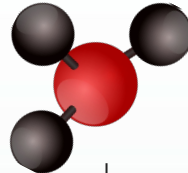
O tratamento é mais lento.



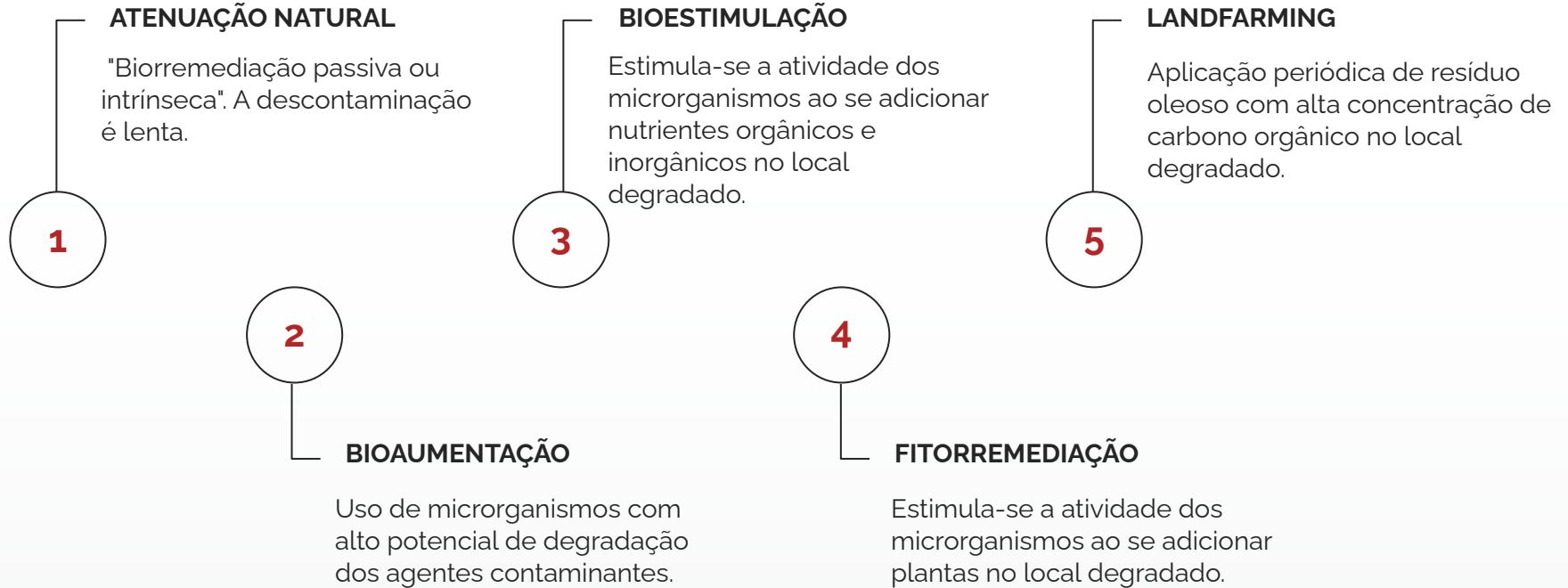
EX SITU

Tratamento do material contaminado num local diferente de sua origem.

Ela é utilizada quando há risco de propagar rapidamente a contaminação.



IN SITU



EX SITU

COMPOSTAGEM

Utilizada para tratamento do solo contaminado. Transformação da poluição em matéria orgânica, CO₂ e H₂O

1

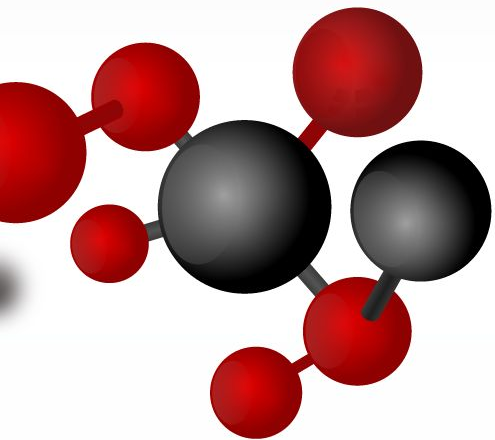


2

BIORREATORES

Uso de grandes tanques fechados, onde se coloca o solo contaminado e mistura-se com água.

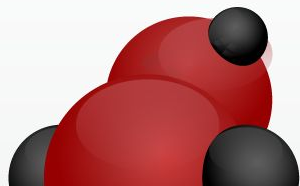




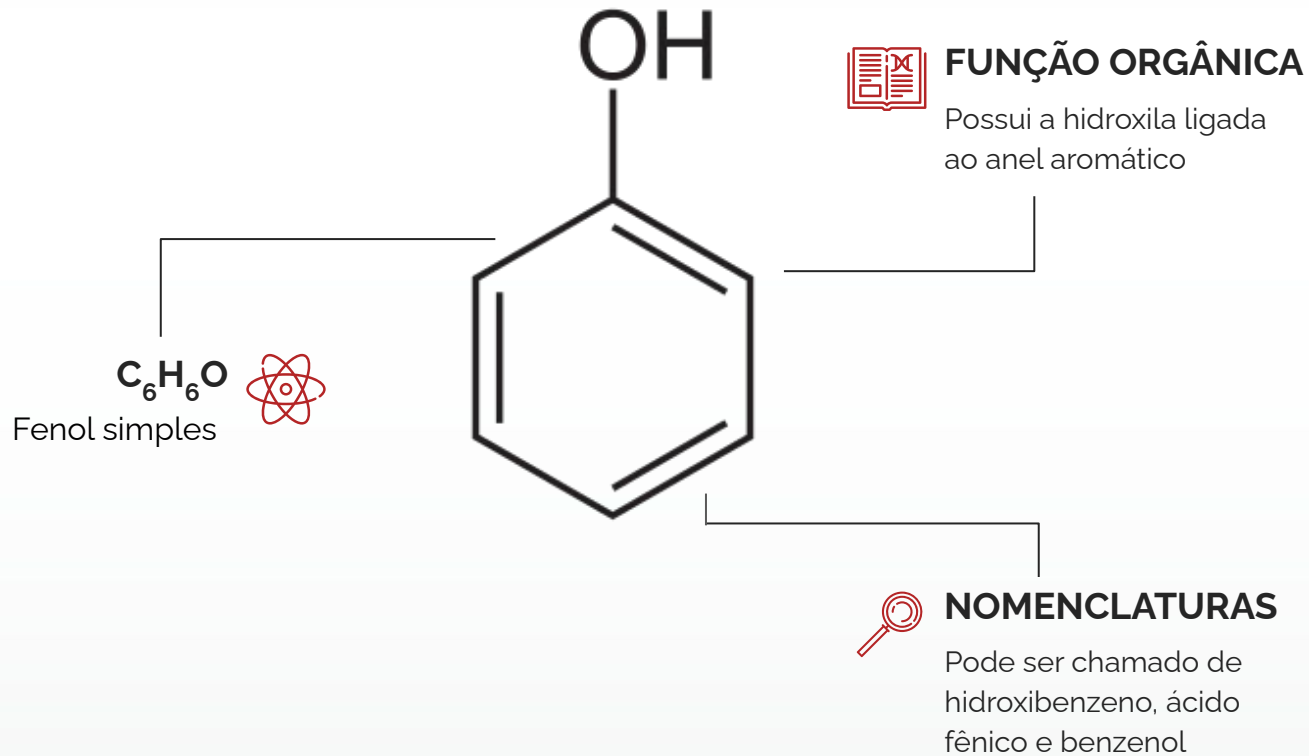
02

CONTEXTUALIZAÇÃO

Impactos dos fenóis no ambiente e características da sua molécula



A MOLÉCULA





PROPRIEDADES DO FENOL



1. SÓLIDO E INCOLOR

A maioria é sólida, mas o fenol simples é líquido na temperatura ambiente.

2. TÓXICO E CORROSIVO

Parou de ser usado como antisséptico.

3. CARÁTER ÁCIDO

Sofrem ionização em água e liberam H_3O^+ .

4. PONTE DE HIDROGÊNIO

Ligação intermolecular forte.

5. SOLUBILIDADE

O benzenol é solúvel, mas outros monofenóis são insolúveis ou muito pouco solúveis.

6. POLARIDADE

Monofenóis são polares, mas alguns difenóis são apolares.

Propriedades Físico-Químicas do Fenol

pH 6,0

pKa 9,9

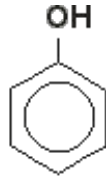
Solubilidade 0,083 g / 1 g H₂O

**Peso
Molecular** 94,11 g
mol⁻¹

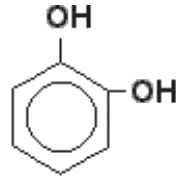
**Temperatura
de Ebulição** 181,8°C

Informações retiradas da tese de **Daniel
Florêncio Filho** - Fonte : CETESB

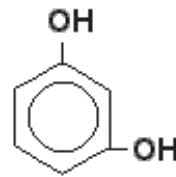
DERIVADOS DO FENOL



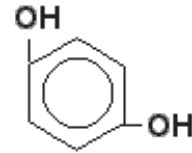
- fenol comum
- ácido fênico
- hidróxi benzeno



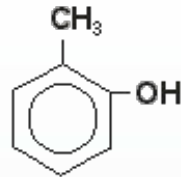
- 1,2-diidróxi benzeno
- orto-diidróxi benzeno
- catecol
- pirocatecol



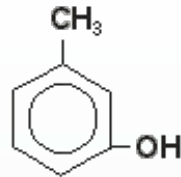
- 1,3-diidróxi benzeno
- meta-diidróxi benzeno
- resorcinol



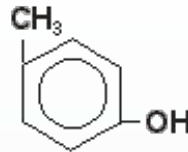
- 1,4-diidróxi benzeno
- para-diidróxi benzeno
- hidroquinona



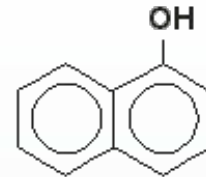
- 2-hidróxi tolueno
- orto-hidróxi tolueno
- orto-cresol



- 3-hidróxi tolueno
- meta-hidróxi tolueno
- meta-cresol



- 4-hidróxi tolueno
- para-hidróxi tolueno
- para-cresol

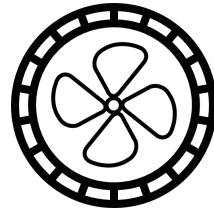


- α - naftol
- α - hidróxi naftaleno



O FENOL E O MEIO AMBIENTE

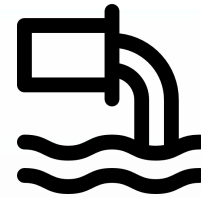
- Considerado um poluente orgânico emergente.



- Liberado no ar por sistemas de ventilação.



- Encontrado em germicidas, pesticidas, desinfetantes, fungicidas, drogas e plásticos.

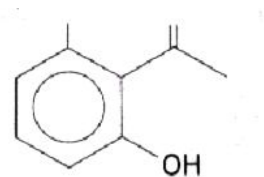


- Presente em rejeitos industriais e domésticos.



FENOL NA NATUREZA

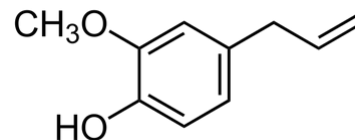
Carqueja



Carquejol
2-isopropenil-3-metilfenol



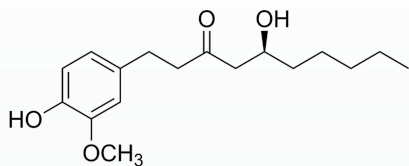
Cravo-da-índia



Eugenol



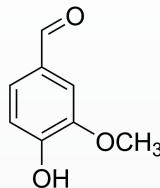
Gengibre



[6]-gingerol



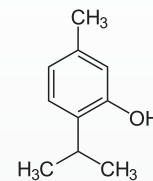
Vanilla planifólia



Vanilina
Essência de baunilha



Orégano



Timol
Essência de tomilho



IMPACTOS NO MEIO AMBIENTE



1

CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA

Decorrente do lançamento de efluentes por indústrias.

2

CONTAMINAÇÃO DO SOLO

Pode ocorrer vazamento durante produção e transporte.

3

TOXICIDADE EM ANIMAIS E PLANTAS

Genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepatotóxicos.

4


BIOACUMULAÇÃO

Acumula na gordura dos peixes, afetam gosto e odor.

5

MORTE DE ORGANISMOS CONTAMINADOS

Provoca hemólise e ação paralisante dos mecanismos neuromusculares.

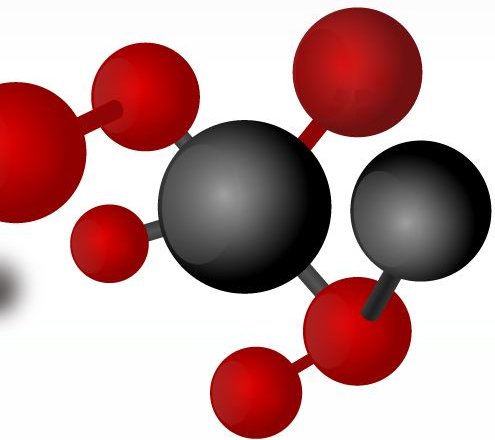


TEORES MÁXIMOS DE FENÓIS EM ÁGUA

Tipo de água	Descrição	Fenóis Totais ^a
Doce - Classe 1	Abastecimento para o consumo humano; proteção de comunidades aquáticas; recreação de contato primário; irrigação de hortaliças.	0,003 mg L ⁻¹
Doce - Classe 3	Abastecimento para o consumo humano; irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; pesca amadora; recreação de contato secundário; dessedentação de animais.	0,01 mg L ⁻¹
Salina - Classe 1	Recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas; aquicultura e pesca.	0,06 mg L ⁻¹
Salobra - Classe 1	Recreação de contato primário; proteção de comunidades aquáticas; aquicultura e pesca; abastecimento para o consumo humano; irrigação.	0,003 mg L ⁻¹
Efluente	Quaisquer fontes poluidoras que lançam resíduos em corpos de água.	0,5 mg L ⁻¹

^a substâncias que reagem com 4-aminoantipirina [17]

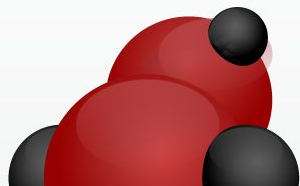
Quadro retirado da tese de **Daniel Florêncio Filho** - Fonte : CETESB



03

ESTUDO DE CASO

Análise de tese



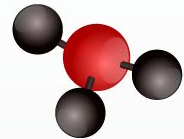
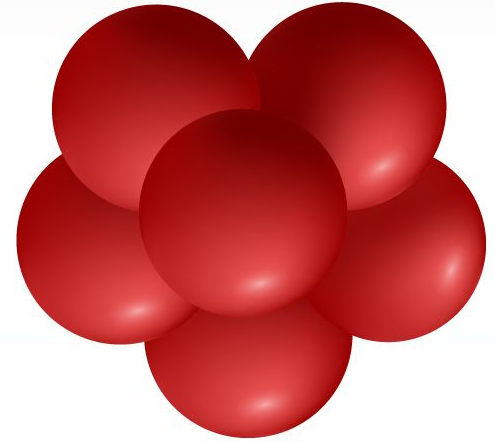
TESE ANALISADA

→ Biorremediação de fenol em meio aquoso por fungos endofíticos de videira

por **Daniel Florêncio Filho**

→ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – **UESB**

→ Programa de pós-graduação em química





TÓPICOS ABORDADOS NO ESTUDO DE CASO

1. O fungo

Características físicas, químicas e biológicas do fungo endófito de videira



2. Materiais e Métodos

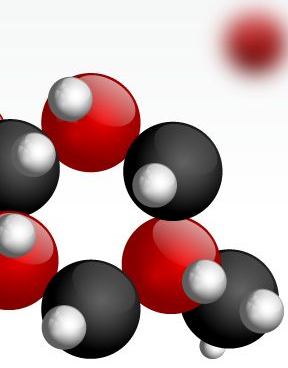
Métodos empregados na pesquisa - desenvolvimento do experimento para obtenção dos resultados



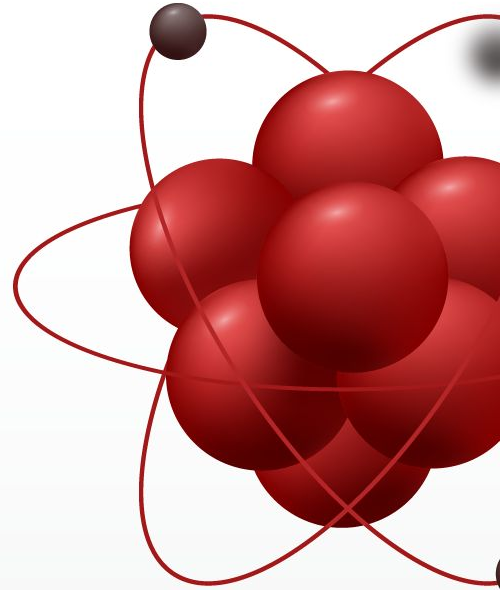
3. Resultados

Resultados obtidos após o desenvolvimento da pesquisa





O FUNGO



FUNGOS FILAMENTOSOS



Multicelulares e assexuados

pH entre 1,5 e 11

MICELO

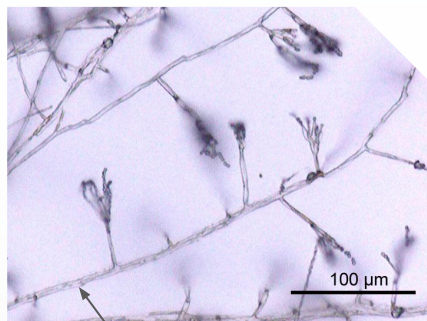
Conjunto de hifas



HIFAS

Cenocíticas - Mastigomycota e Zygomycota.

Septadas - Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota



Hifa



MICELO REPRODUTIVO

Micelo aéreo que sustenta o corpo de frutificação



FUNGOS FILAMENTOSOS ENDOFÍTICOS DE VIDEIRA



54 isolados

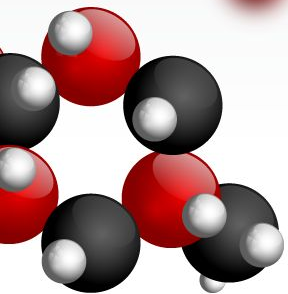


Videira localizada em Diamantina - Minas Gerais

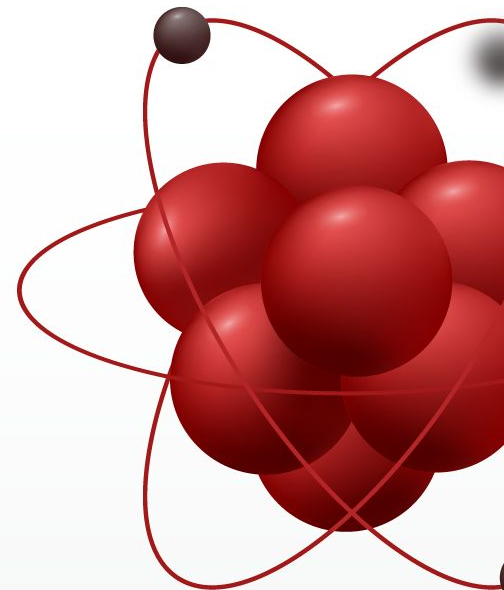


Coleção - LPNBio do CEPEQ, campus de Itapetinga, Bahia

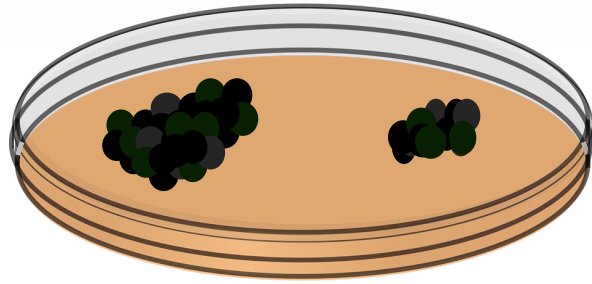




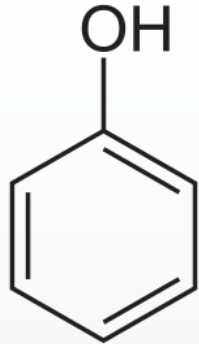
MATERIAIS E MÉTODOS



SELEÇÃO PRIMÁRIA DOS ISOLADOS



Meio sólido enriquecido com fenol



Fenol
cristalizado

Concentrações de Fenol - 200 mg L^{-1} e 700 mg L^{-1}

Exclusão de isolados que não resistem à toxicidade do poluente

Meio de cultivo - Batata, Dextrose e Ágar

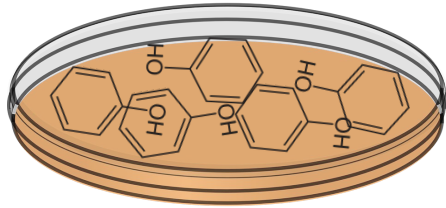
Incubamento - 5 dias a temperatura ambiente ($T \approx 27^\circ\text{C}$)



SELEÇÃO SECUNDÁRIA DOS ISOLADOS



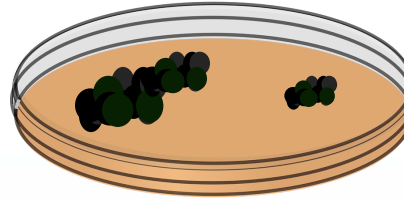
Sistema de análise de biorremediação do fenol



Substrato e
SMC

Solução de fenol - Concentração
de 500 mg L⁻¹

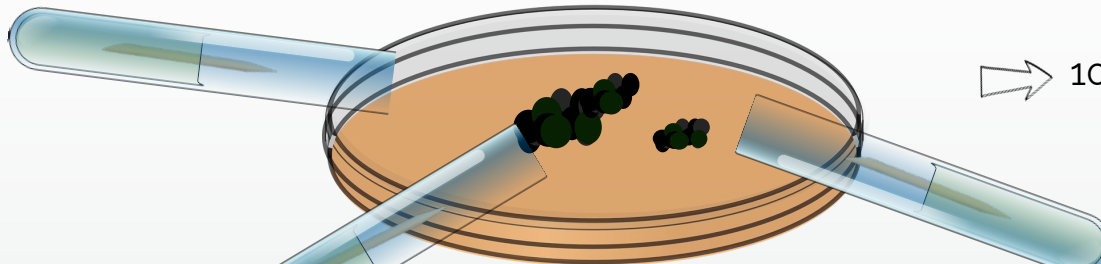
Isolado pré-selecionado



Repicados em meio BDA



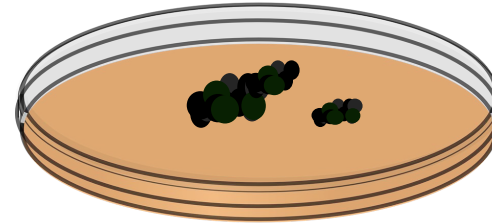
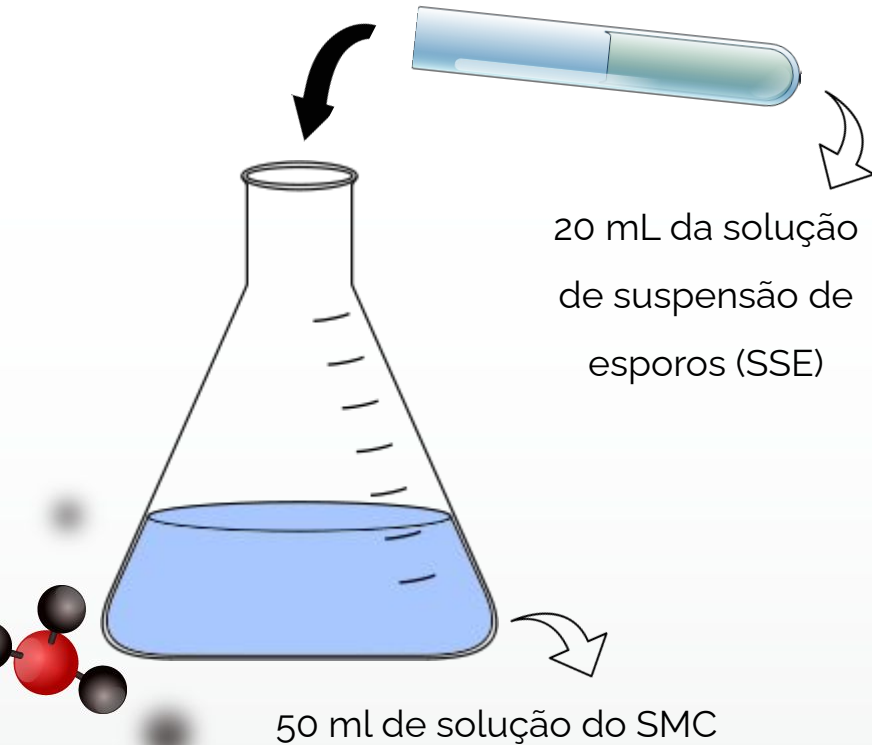
Submetidos a crescimento
por sete dias



10⁸ esporos mL⁻¹



SELEÇÃO SECUNDÁRIA DOS ISOLADOS



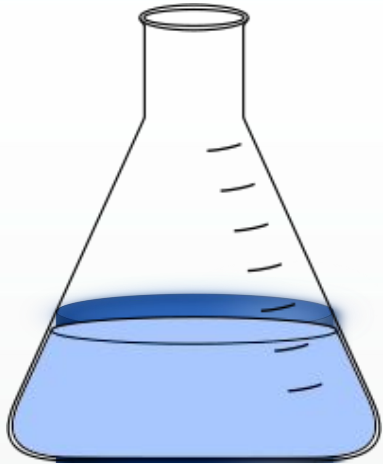
Isolados

- Seleccionados, testados e analisados em triplicata.
- Incubadas sob temperatura de 30°C e a 150 rpm em incubadora por 25 dias.

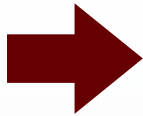


PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL

Alíquotas para análise de cinética de degradação



Meio de fermentação



Identificação do fenol → metodologia de **Wettasinghe e Shahidi** (RFC)



- 0,250 mL do meio de fermentação
- 0,250 mL do RFC
- 0,500 mL de solução aquosa saturada de NaHCO_3
- 5 mL de água destilada

Submetido à **agitação**

Ficou 25 minutos em **repouso** e sob **luz**

Leitura em espectrofotômetro UV-Visível





PERFIL DE DEGRADAÇÃO DE FENOL



Espectrofotômetro



Curva analítica construída com as concentrações:

0,300 g L⁻¹

0,400 g L⁻¹

0,500 g L⁻¹

0,800 g L⁻¹

0,900 g L⁻¹

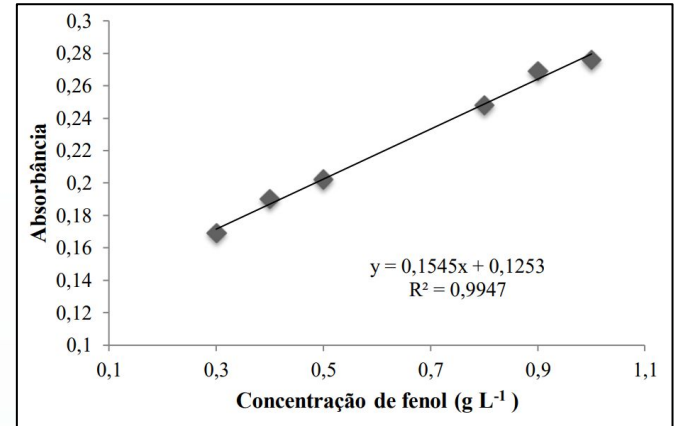
1,000 g L⁻¹



Uso do
fenol cristal

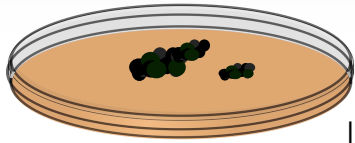


Curva de calibração de concentrações de fenol



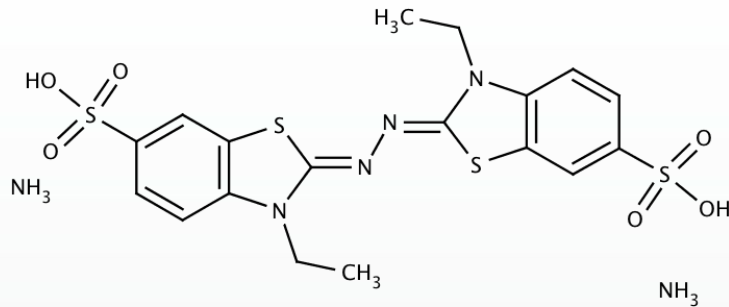
Resultados - gráfico da relação entre absorvância e concentrações de fenol

POTENCIAL DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE



Isolado de melhor agente biorremediante

Determinação da atividade de lacase produzida pela oxidação do:



ABTS-ácido 2,2'-azino-bis

Reação:

- 100 μL do caldo fermentado
- 800 μL de tampão acetato de sódio - concentração 170 mM L^{-1}
- 100 μL de solução de ABTS - concentração 5 mM L^{-1}

Temperatura ambiente ($T \approx 27^\circ\text{C}$)

Leitura

- Espectrofotômetro (comprimento de onda de 420nm) após 5 minutos

POTENCIAL DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

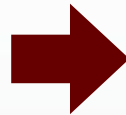
Posteriores ensaios:

- Utilizado o tempo de melhor resposta enzimática de 20 dias de fermentação

Cálculo da atividade enzimática:

- Uso da seguinte equação

$$A = \frac{\Delta E \cdot 10^6}{\epsilon_{420} \cdot \Delta T}$$



A = atividade da lacase (U/mL⁻¹)

ΔE = crescimento do comprimento de onda

ϵ_{420} = absorvidade molar (36000 M⁻¹ cm⁻¹)

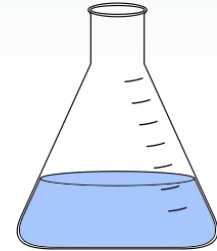
ΔT = tempo (min) para a reação ocorrer.

TERMOESTABILIDADE ENZIMÁTICA

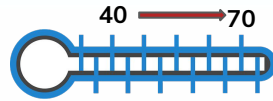


Método de variação de temperatura → a cada 10°C

Alíquota de 10 mL da amostra



Faixa entre 40°C e 70°C



Variando o tempo de permanência entre 0 e 30 minutos

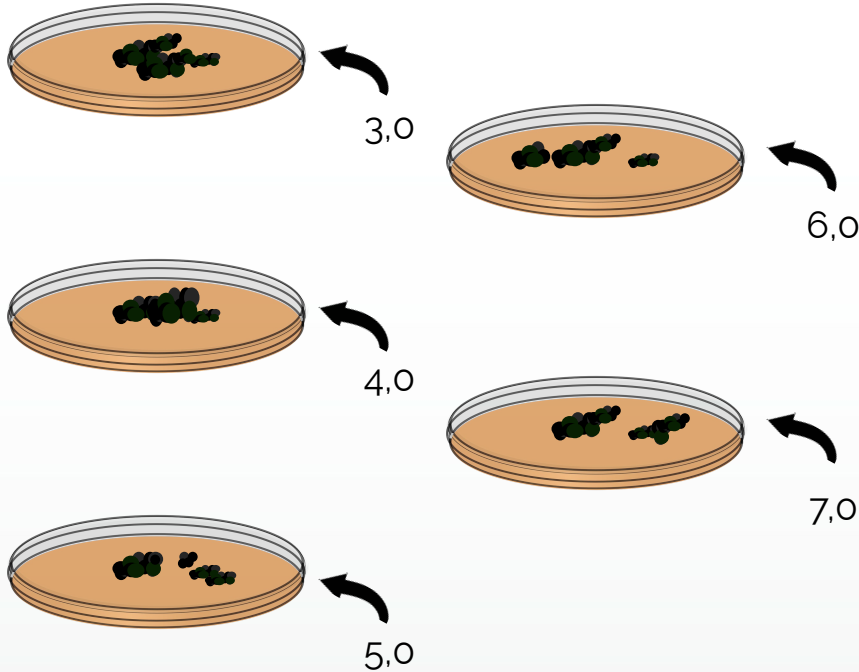


A cada 10 minutos de tratamento térmico é dosada a atividade enzimática residual de lacase



DETERMINAÇÃO DE pH ÓTIMO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Testados os pHs:



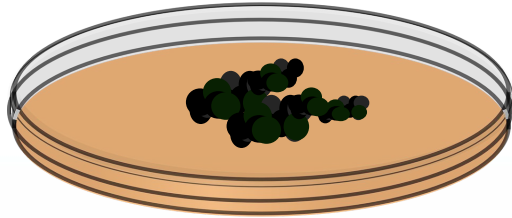
Adição de:



12mL de solução
tampão acetato 200 mM nos pHs

Agitação com temperatura controlada
Analisar a **atividade da lacase**

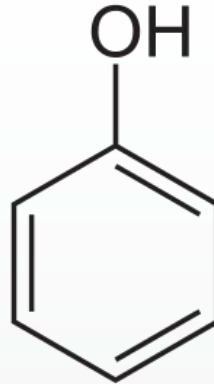
PERFIL DE DEGRADAÇÃO DO FENOL APLICANDO CONDIÇÕES ÓTIMAS DE FERMENTAÇÃO



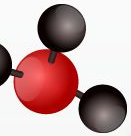
Inoculado em pH e temperatura ideais para crescimento e produção enzimática



Concentrações de fenol presente no meio numa faixa de $0,05 \text{ g L}^{-1}$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$



Foi **avaliada** a resistência do microrganismo frente a **diferentes concentrações** do analito



DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE MICHAELIS-MENTEN (K_m) E DA VELOCIDADE MÁXIMA DE REAÇÃO (V_{\max})



- **Constante de Michaelis**

→ É gerada uma curva de saturação da enzima versus a concentração de substrato de caráter hiperbólico

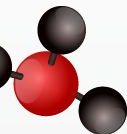
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S_0]}{K_m + [S_0]}$$

V = volts

V_{\max} = velocidade máxima de reação ($\text{g.L}^{-1} \text{min}^{-1}$)

$[S_0]$ = concentração inicial de substrato (g.L^{-1})

K_m = constante de Michaelis (g.L^{-1})



- **Método de quantificação linear**

→ Os valores de concentração e atividade enzimática são invertidos, dando origem a um gráfico linear

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

V = volts

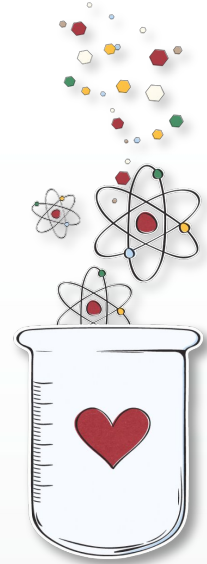
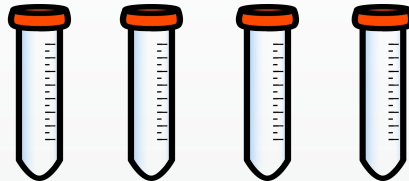
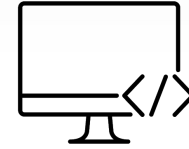
V_{\max} = velocidade máxima de reação ($\text{g.L}^{-1} \text{min}^{-1}$)

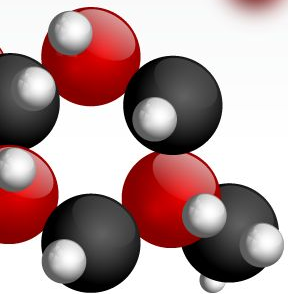
$[S_0]$ = concentração inicial de substrato (g.L^{-1})

K_m = constante de Michaelis (g.L^{-1})

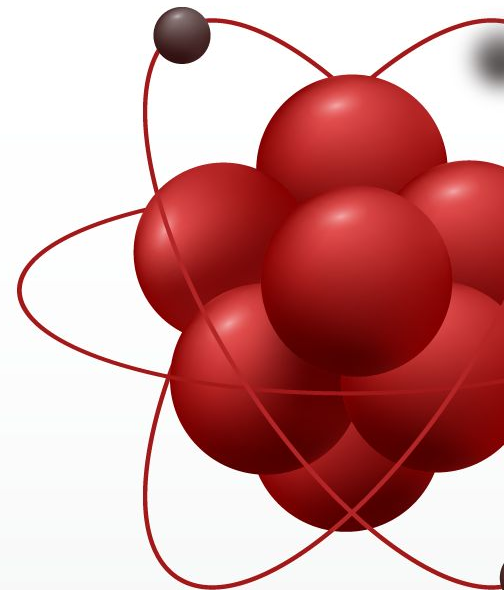
DELINEAMENTO E OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

- Uso de Software para delineamento e otimização
- Seguiu-se o modelo que representa as duas variáveis independentes
- Mais quatro ensaios axiais
 - simulando condições extremas de análise
- pH e % de NaCl foram estudados → adotou o DCCR de ordem 2^2 .





RESULTADOS



SELEÇÃO PRIMÁRIA DOS ISOLADOS



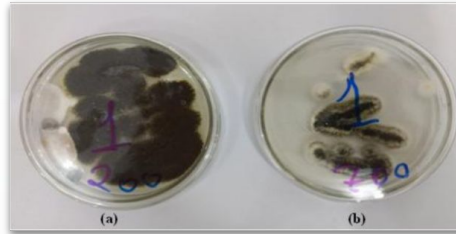
54 ISOLADOS

Avaliação quantitativa
do crescimento.



14 ISOLADOS

Crescimento regular de
colônias nas duas
concentrações.



Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho

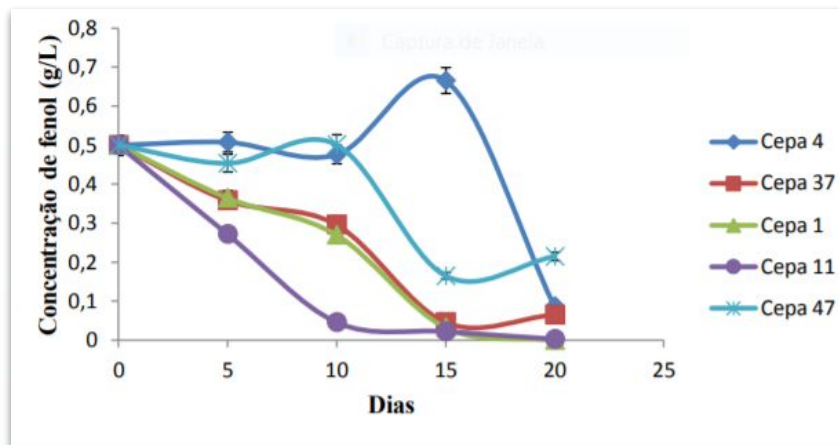


ISOLADOS 27 E 46

Não conseguiram se
desenvolver.

RESULTADO: Comportamento esperado

SELEÇÃO SECUNDÁRIA DOS ISOLADOS



Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho

14 ISOLADOS

Desenvolvimento em meio líquido - fenol como nutriente.

5 ISOLADOS

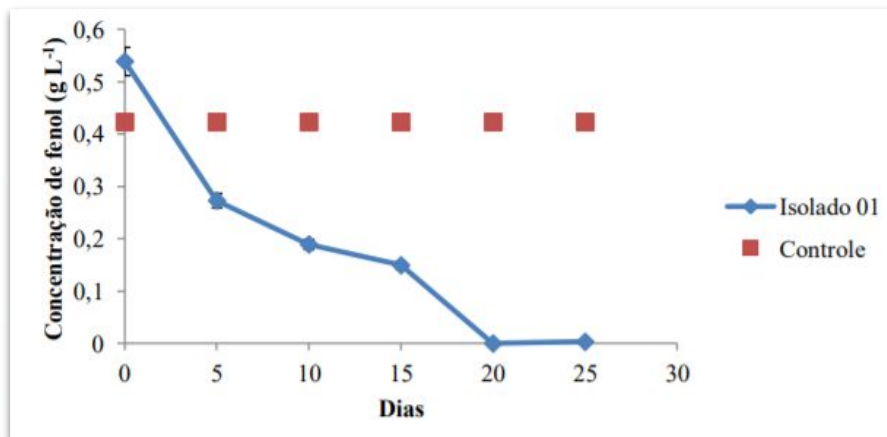
Conseguiram se desenvolver no meio.

ISOLADOS 1 E 11

Melhores resultados na biodegradação.

Concentração final:
reduzido a 0,0% e 0,6%

PERFIL DE DEGRADAÇÃO DO FENOL



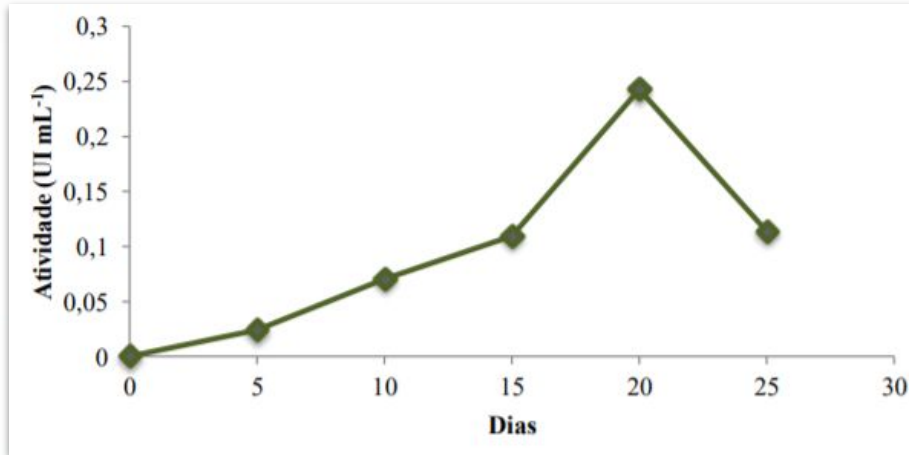
Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho



RESULTADO: perfil de degradação foi mantido e evidenciou a mesma eficiência.

Concentração final: $0,0032 \pm 0,005 \text{ g L}^{-1}$ de fenol.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE



Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho

ATIVIDADE

Mínima: 0,0240 UI mL⁻¹

Máxima: 0,2423 UI mL⁻¹

Média: 0,133 UI mL⁻¹

FARIA, R. A. (2010)

A_{lac} máxima de **0,022±0,001 UI mL⁻¹**

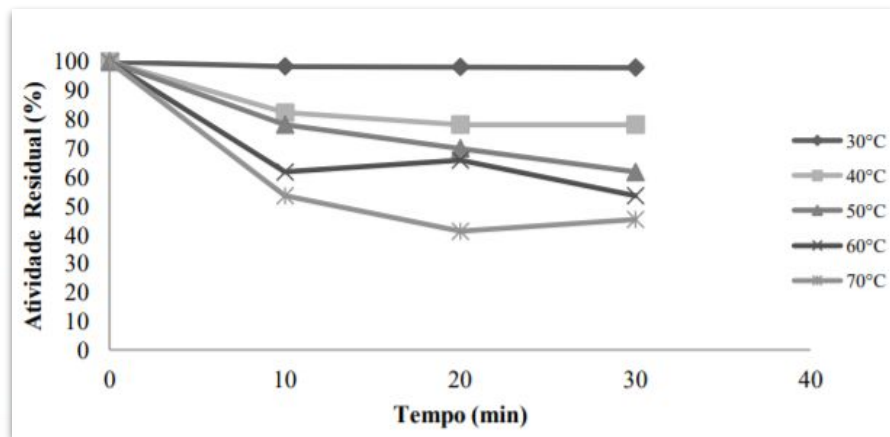
Fungo Ceriporiopsis subvermispora

BAPTISTA, M. N. Q. (2012)

A_{lac} máxima de **0,00194 UI mL⁻¹**

Fungo Penicillium commune

TERMOESTABILIDADE ENZIMÁTICA



Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho

PACHECO E SOARES (2014)

40°C: reduziu cerca de 70%
50°C: total desnaturamento

LIU, Z. (2016)

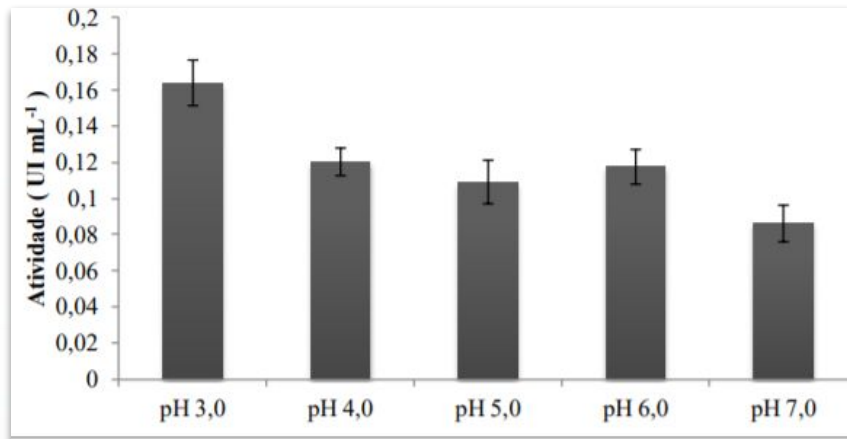
20°C a 35°C: temperatura ótima

RESULTADO:

Maior produção: **30°C**

Sensibilidade térmica

pH ÓTIMO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA



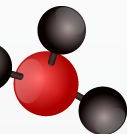
Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho



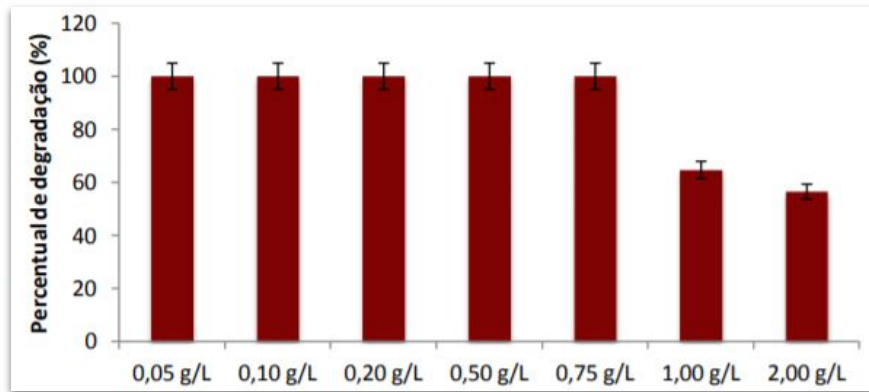
RESULTADO:

pH ótimo: **3,0**

Reafirma o caráter ácido do analito e afinidade com ambientes ácidos.



PERFIL DE DEGRADAÇÃO ÓTIMO E RESISTÊNCIA ENZIMÁTICA FRENTE AO POLUENTE



pH ótimo: **3,0**

Temperatura ótima: **30°C**

Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho

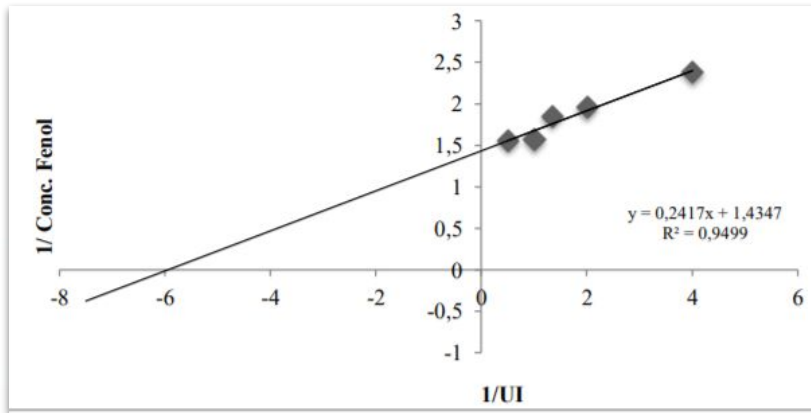
RESULTADO:

Concentrações de fenol:
0,05 g L⁻¹ até 0,750 g L⁻¹

Total remoção pelo
isolado 1

Degrada totalmente:
concentrações **< 0,750 g L⁻¹**
de fenol em efluentes

DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES ENZIMÁTICAS DE LACASE



Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho

RESULTADO:

$$K_m: 0,168 \text{ g L}^{-1}$$

$$V_{\text{máx}}: 0,697 \text{ g L}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

pH ótimo: **3,0**

Temperatura ótima: **30°C**

Concentração: **0,05 g L⁻¹ a 2,0 g L⁻¹**

Resultado bom → atividade enzimática em meio pobre para o desenvolvimento do fungo ocorreu com êxito.

OTIMIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE



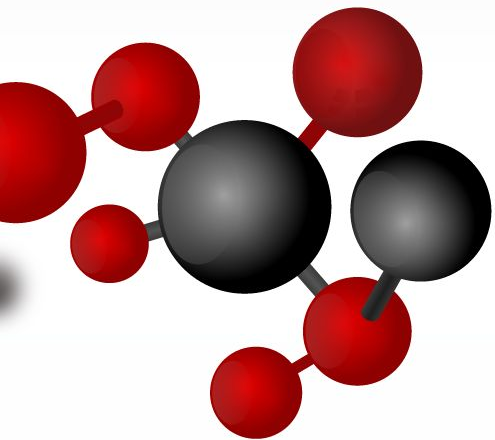
Ensaio	pH	% NaCl (m/v)	Atividade média (UI mL ⁻¹) *
1	3,0	2,75	0,3463
2	7,0	2,75	0,4962
3	3,0	4,25	0,3203
4	7,0	4,25	0,4223
5	2,18	3,5	0,3352
6	7,82	3,5	0,4815
7	5,0	1,0	0,5889
8	5,0	6,0	0,3241
9	5,0	3,5	0,4241
9	5,0	3,5	0,4093
9	5,0	3,5	0,4148

Fonte: Tese de Daniel Florêncio Filho

RESULTADO:

- Condições de pH e porcentagem de sal são inversamente proporcionais;
- O sistema de fermentação do isolado em estudo não se adequou aos modelos matemáticos;
- Sugestão de fazer o experimento na água marinha.

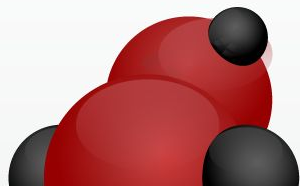




04

OUTRAS BIORREMEDIAÇÕES

Outros lugares que se aplica a biorremediação do fenol

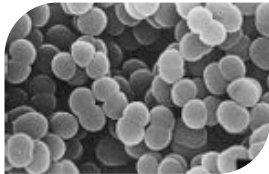


O FENOL PODE SER BIORREDIADO POR...



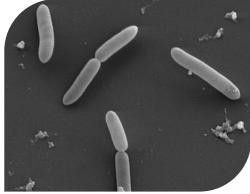
1

HALÓFILAS



3

**SULFOBACILLUS
ACIDOPHILUS TPY**



5

ASPERGILLUS SP

Estudo de Dos Passos e colaboradores (2008)



2

**CÉLULAS DE
GRAPHIUM SP**

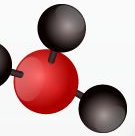
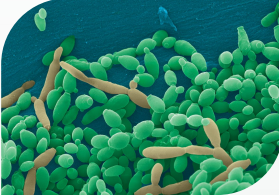
Estudo de Santos e colaboradores (2003)



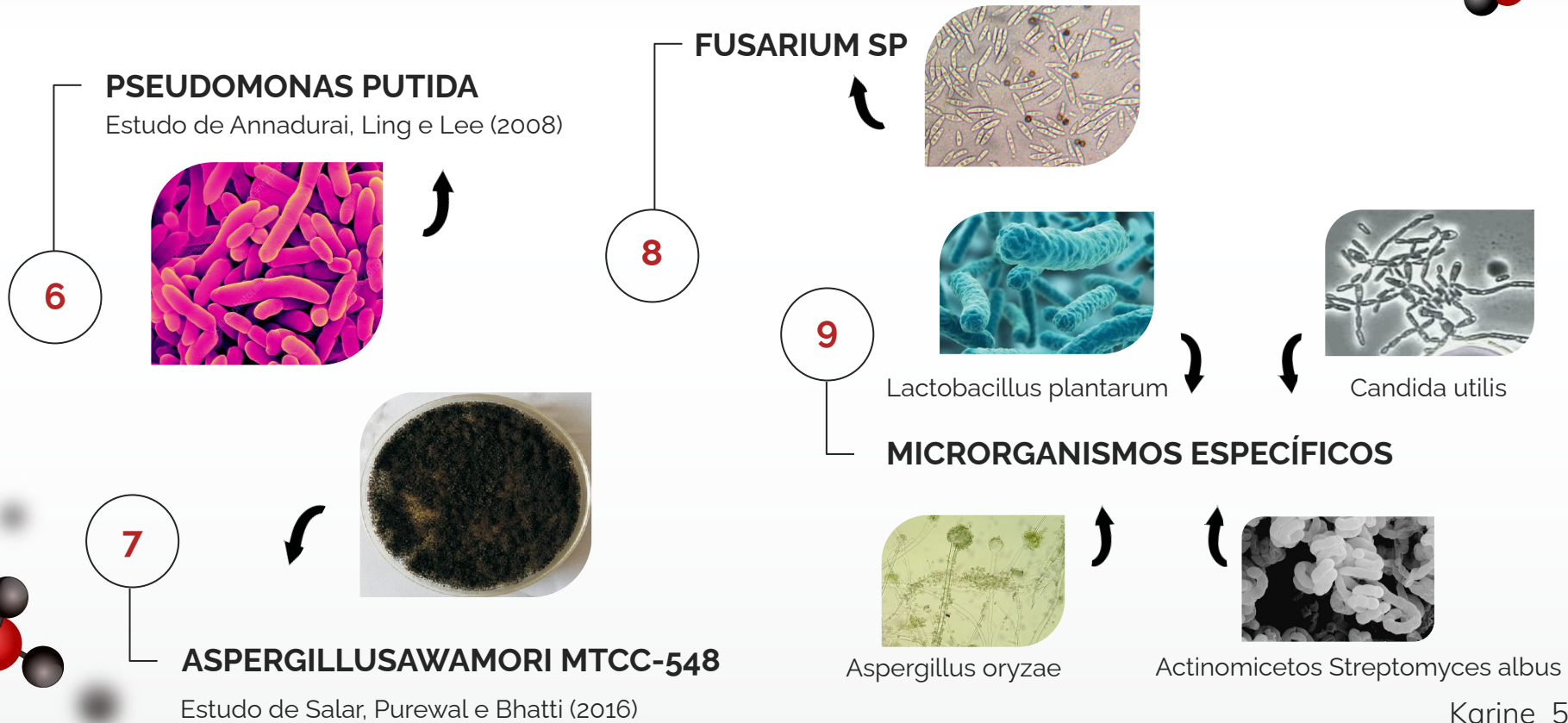
4

CANDIDA TROPICALIS NPD1401

Estudo de Kumar e colaboradores (2017)



O FENOL PODE SER BIORREDIADO POR...





CONCLUSÃO



- Isolado 01 - capacidade de produzir a enzima lacase de forma eficiente e com boa atividade enzimática para a degradação de fenol.
- Notou-se que a concentração de sal, pH e temperatura foram variáveis importantes no processo.
- O referido isolado foi eficiente na aplicação de biodegradação e biorremediação de compostos fenólicos poluentes em águas residuais, eliminando o fenol presente em sua totalidade para meios de concentração máxima de 0,750 g L⁻¹ de fenol.



Referências

- <https://ibapcursos.com.br/caracteristicas-dos-fungos-filamentosos-e-leveduriformes/>
- <https://siteantigo.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/conteudo/fungos/1674#:~:text=As%20col%C3%B4nias%20leveduriformes%20s%C3%A3o%20pastosas,forma%20de%20tubo%20%2D%20as%20hifas.>
- <https://www.todamateria.com.br/biorremediacao/#:~:text=A%20maior%20vantagem%20da%20biorremedia%C3%A7%C3%A3o,de%20tratamento%20de%20%C3%A1reas%20degradadas.>
- <https://www.slideshare.net/AlineLopes117/apresentao-seminrio-biorremedio>
- <https://blog.h2oonline.com.br/2015/09/para-que-serve-biorremediacao.html>
- <https://www.infoescola.com/ecologia/biorremediacao/>
- <https://mundoeducacao.uol.com.br/quimica/principais-fenoi-no-cotidiano.htm#:~:text=Na%20natureza%2C%20os%20fen%C3%B3is%20podem,podem%20ser%20sintetizados%20em%20laborat%C3%B3rio.&text=O%20eugenol%20%C3%A9%20um%20fenol,%C3%A9%20usado%20em%20antiss%C3%A9pticos%20buciais.>
- <https://cetesb.sp.gov.br/mortandade-peixes/alteracoes-fisicas-e-quimicas/contaminantes/fenol/>



OBRIGADA PELA ATENÇÃO

Alguma pergunta?

“A mente é muito mais do que a biologia diz ser, assim como o universo é muito maior do que possa imaginar.” - Y. Othinus

CREDITS: This presentation template was created by **Slidesgo**, including icons by **Flaticon**, and infographics & images by **Freepik**.
Please keep this slide for attribution.