



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Erick Paiva Cancelli

Suporte à Base de Bismuto Silicato para Imobilização de Lacase de
Myceliophthora thermophila Expressa em *Aspergillus* sp.: Uma Solução Sustentável
para o Tratamento Ambiental de Efluentes da Indústria Têxtil e Farmacêutica

São José do Rio Preto

2024

Erick Paiva Cancelli

Suporte à Base de Bismuto Silicato para Imobilização de Lacase de
Myceliophthora thermophila Expressa em *Aspergillus* sp.: Uma Solução Sustentável
para o Tratamento Ambiental de Efluentes da Indústria Têxtil e Farmacêutica

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES Processo 88887.513909/2020-00

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

Coorientador: Fábio Rogério de Moraes

São José do Rio Preto

2024

P149s	Paiva Cancelli, Erick Suporte à Base de Bismuto Silicato para Imobilização de Lacase de <i>Myceliophthora thermophila</i> Expressa em <i>Aspergillus</i> sp.: Uma Solução Sustentável para o Tratamento Ambiental de Efluentes da Indústria Têxtil e Farmacêutica / Erick Paiva Cancelli. -- São José do Rio Preto, 2024 165 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: José Geraldo Nery Coorientador: Fabio Rogério de Moraes [UNESP] 1. Microbiologia industrial, ambiental e de alimentos. 2. Biologia e sistemática de microrganismos. 3. Bioprodutos: produção e aplicação em microrganismos. I. Título.
-------	--

Erick Paiva Cancellia

Suporte à Base de Bismuto Silicato para Imobilização de Lacase de
Myceliophthora thermophila Expressa em *Aspergillus* sp.: Uma Solução Sustentável
para o Tratamento Ambiental de Efluentes da Indústria Têxtil e Farmacêutica

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – Campus de São José do Rio Preto/SP
Orientador

Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes
UNESP – Campus de São José do Rio Preto/SP

Prof.^a Dr.^a Ieda Pastre Fertoni
UNESP – Campus de São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
UNIFAL – Campus Alfenas/MG

Prof.^a Dr.^a Leticia Maria Zanphorlin Murakami
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) – Campinas/SP

São José do Rio Preto

6 de setembro de 2024

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Herbert e Alessandra, a minha namorada Mariana e a meus avós
Romildo (*in memoriam*) e Elinor.

Agradecimentos

Com imensa gratidão e emoção, expresso meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste sonho. Este trabalho só é possível com o apoio e as valiosas contribuições de muitos indivíduos e instituições.

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha profunda gratidão ao meu orientador, José Geraldo Nery, pela orientação cuidadosa, paciência e contribuições valiosas ao longo do processo de pesquisa. Sua dedicação e comprometimento foram decisivos para o desenvolvimento desta tese, e sou grato por ter tido a oportunidade de aprender sob sua orientação.

À minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo apoio emocional, compreensão e incentivo incondicional, agradeço do fundo do coração. Seu amor e encorajamento foram a força motriz que me impulsionou durante os desafios desta jornada acadêmica, especialmente ao meu avô Romildo de Paiva, que tinha o grande sonho de ver seu neto se tornar um Doutor. Infelizmente, ele não presenciará este momento, mas tenho certeza de que ele está me observando onde quer que esteja. **Isso é para você, vovô!**

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Vinícius, Oscar, Guarnieri e Sacco, agradeço pelas discussões estimulantes, troca de ideias e pelo companheirismo que tornaram esta jornada mais próspera e significativa. Cada conversa e colaboração contribuíram para enriquecer meu trabalho e minha pessoa.

Suas contribuições foram essenciais para a realização deste projeto de pesquisa. Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os participantes da pesquisa, cuja generosidade ao compartilhar suas experiências e conhecimentos foi crucial para o

sucesso deste estudo. Também menciono a Prof.^a Dr.^a Giselle Maria Maciel por abrir as portas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, permitindo a continuidade do projeto, e por sua imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 88887.513909/2020-00.

Este trabalho é o resultado do esforço coletivo de muitos, e sou verdadeiramente grato por fazer parte disso. Cada um de vocês desempenharam um papel vital nesta jornada.

“The flow of time is always cruel... its speed seems different for each person, but no one can change it... A thing that does not change with time is a memory of younger days...”

Legend of Zelda: Ocarina of Time

Resumo

A crescente demanda por materiais avançados para aplicações ambientais tem impulsionado a pesquisa de novos compostos com propriedades únicas e eficientes. Nesse contexto, a lacuna no conhecimento sobre a síntese e aplicação de materiais avançados oferece uma oportunidade significativa para inovação e progresso científico. À vista de tais afirmações, a presente tese teve como objetivo sintetizar e caracterizar um novo material hierárquico de bismuto (BS) e modular sua superfície para imobilizar lacases provenientes de *Myceliophthora thermophila* e aplicá-lo em experimentos de remediação ambiental. Para tal, foi empregado o biocatalisador Lac-BS na biodegradação do corante Tectilon 4R (Acid Blue 277) e do fármaco Ibuprofeno, conhecidos por serem poluentes emergentes. Inicialmente, foi realizada a investigação acerca da importância de diferentes agentes direcionadores de estrutura (SDAs) e da influência do envelhecimento na síntese do material. Em seguida, análises como DRX, FTIR, MEV, MET, BET, RMN e XANES identificaram um material inédito com estrutura hierárquica de poros em escalas micro e meso, além de uma alta área superficial. Ademais, o processo de extração Soxhlet se fez necessário para preservar a estrutura cristalográfica durante a remoção do SDA. Posteriormente, o BS passou por processos que visaram a modulação da superfície com o intuito de ser empregado na imobilização de enzimas. O método utilizado para a realização desta pesquisa foi bem-sucedido devido a confirmação através de resultados de FTIR e DRX, e a imobilização da lacase no suporte BS alcançou 100% de rendimento, mantendo alta eficiência mesmo com variações na massa do suporte e diferentes concentrações de enzima. Os resultados de imobilização obtidos apresentaram um efeito denominado de hiperativação enzimática, no qual a atividade do biocatalisador supera a atividade da enzima livre, especialmente em utilizando concentrações de lacase de 0,5 U/mL. As simulações de dinâmica molecular indicaram que, durante a imobilização, os

resíduos Lys-188 – Pro-193 adotaram uma conformação ao redor do sítio ativo, aumentando o volume e se mostrando como uma possível explicação para o efeito de hiperativação mencionado anteriormente. Além disso, todos os parâmetros de caracterização bioquímica da Lac-BS foram superiores aos da enzima livre, demonstrando maior estabilidade térmica, durante a qual a atividade foi mantida a 40 °C e ocorreu a proteção parcial da enzima a 50 °C, além do biocatalisador apresentar excelentes resultados através de ciclos de testes catalíticos repetidos. Nos testes de degradação do corante, o biocatalisador Lac-BS demonstrou 100% de eficácia na remoção em 2 horas, enquanto o suporte funcionalizado sem a enzima (Func-BS) alcançou 88,46%, ambos superando os resultados obtidos pela enzima livre. Portanto, a combinação do suporte BS com a enzima lacase promoveu uma potente sinergia na degradação do corante. Na remoção de ibuprofeno, o biocatalisador Lac-BS atingiu 72,58% de degradação em duas horas em solução aquosa a 40 °C devido à combinação de adsorção e atividade enzimática, superando a eficiência do Func-BS (52,43%) e da enzima livre (49,83%). Portanto, pode-se afirmar que os resultados obtidos comprovam que a integração da lacase com o suporte BS mostrou potencial para ser uma solução promissora na remediação de corantes e fármacos em matrizes aquosas.

Palavras-chave: Síntese; bismuto silicato; estrutura hierárquica; lacase imobilizada; processo de biodegradação.

Abstract

The growing demand for advanced materials for environmental applications has driven the research of new compounds with unique and efficient properties. In this context, the knowledge gap in the synthesis and application of advanced materials offers a significant opportunity for innovation and scientific progress. Considering these statements, the present thesis aimed to synthesize and characterize a new hierarchical bismuth material (BS) and modify its surface to immobilize laccases derived from *Myceliophthora thermophila* for use in environmental remediation experiments. For this purpose, the Lac-BS biocatalyst was employed in the biodegradation of the dye Tectilon 4R (Acid Blue 277) and the drug Ibuprofen, known to be emerging pollutants. Initially, an investigation was conducted on the importance of different structure-directing agents (SDAs) and the influence of aging on the material synthesis. Subsequently, analyses such as XRD, FTIR, SEM, TEM, BET, NMR, and XANES identified a novel material with a hierarchical pore structure at micro and meso scales, in addition to a high surface area. Moreover, the Soxhlet extraction process was necessary to preserve the crystallographic structure during SDA removal. Afterward, the BS underwent surface modification processes to be used in enzyme immobilization. The method employed for this research was successful, as confirmed by FTIR and XRD results, and the laccase immobilization on the BS support achieved 100% yield, maintaining high efficiency even with variations in support mass and enzyme concentrations. The immobilization results exhibited a phenomenon known as enzymatic hyperactivation, wherein the activity of the biocatalyst surpasses that of the free enzyme, especially when using laccase concentrations of 0.5 U/mL. Molecular dynamics simulations indicated that, during immobilization, the Lys-188 – Pro-193 residues adopted a conformation around the active site, increasing its volume and potentially explaining the hyperactivation effect. Additionally, all biochemical

characterization parameters of Lac-BS were superior to those of the free enzyme, demonstrating greater thermal stability, with activity maintained at 40 °C and partial enzyme protection at 50 °C. The biocatalyst also showed excellent results through repeated catalytic test cycles. In dye degradation tests, the Lac-BS biocatalyst demonstrated 100% efficacy in removal within 2 hours, while the functionalized support without the enzyme (Func-BS) achieved 88.46%, both surpassing the results obtained by the free enzyme. Therefore, the combination of the BS support with the laccase enzyme promoted a potent synergy in dye degradation. In ibuprofen removal, the Lac-BS biocatalyst achieved 72.58% degradation in two hours in an aqueous solution at 40 °C due to the combination of adsorption and enzymatic activity, outperforming the efficiency of Func-BS (52.43%) and the free enzyme (49.83%). Thus, it can be affirmed that the obtained results demonstrate that the integration of laccase with the BS support showed potential to be a promising solution for the remediation of dyes and pharmaceuticals in aqueous matrices.

Keywords: Synthesis; Bismuth silicate; hierarchical structure; immobilized laccase; biodegradation process.

Lista de Figuras

Figura 1 Esquema ilustrativo de um método de obtenção de uma zeólita hierárquica. Fonte: Adaptado (FARSANA; KUMARI, 2023).	25
Figura 2 Exemplos de templates orgânicos para a produção de materiais hierarquicamente estruturados Fonte: Adaptado (WANG et al., 2010; XIAO et al., 2006).	26
Figura 3 Estrutura molecular do anti-inflamatório Ibuprofeno. Fonte: PUBCHEM 3672.	29
Figura 4 Estrutura molecular do corante têxtil Acid Blue 277, empregado neste trabalho. Fonte: Chemical Book CB6875176.	31
Figura 5 Ligação das unidades de construção (unidades de construção primárias; PBU e unidades de construção secundárias; SBU) na estrutura tridimensional da zeólita-clinoptilolita. Fonte: Adaptado (MARGETA et al., 2013).	35
Figura 6 Tipos comuns de estruturas de zeólitas. A esfera azul representa o átomo T e a esfera vermelha representa o átomo de oxigênio. Fonte: (LI; LI; YU, 2017).	36
Figura 7 Representação esquemática de (A) A formação de blocos construtivos zeolíticos Y primários (topologia FAU) ao redor de agentes direcionadores de estrutura orgânicos (TMA ⁺). (B) a formação da super cavidade da zeólita Y pela montagem de blocos construtivos secundários. Fonte: Adaptado (ASGAR POUR; SEBAKHY, 2022a).	39
Figura 8 Estrutura do material ETS-10 mostrando as diferentes coordenações. Fonte: Adaptado (KRISNANDI; LACHOWSKI; HOWE, 2006).	40
Figura 9 Pedra mineral de bismuto. Fonte: Public Domain Archive.	45
Figura 10 Representação computacional das estruturas cristalinas. Na parte de cima: Estruturas poliédricas do EMS-4 vistas ao longo das direções [1 0 0] (a) e [0 1 0] (b) . Poliedros: vermelho (BiO ₇), laranja (Na/BiO ₆), verde (SiO ₄). Na parte de baixo: (a) Representação poliédrica do EMS-5 vista ao longo da direção (0 0 1). O hexágono evidencia a pequena gaiola que caracteriza a estrutura do EMS-5 e esboçada como representação de bastão e bola em (b) . Fonte: Adaptado (ZANARDI et al., 2006).	48
Figura 11 Estrutura cristalográfica da enzima lacase de <i>Myceliophthora thermophila</i> . Fonte: Adaptado (ERNST et al., 2018b).	50
Figura 12 Aplicações de enzimas lacase em oxidação de poluentes. Fonte: Adaptado (MAHURI; PAUL; THATOI, 2023).	51
Figura 13 Técnicas utilizadas para a imobilização de enzimas. Fonte: Adaptado (NGUYEN; KIM, 2017).	55
Figura 14 Ilustração esquemática da síntese de BS. Fonte: Autoria Própria.	64
Figura 15 Esquema ilustrativo dos métodos de remoção do SDA empregados neste trabalho. (a) Extração via rota térmica - calcinação (b) Extração via Soxhlet. Fonte: Autoria Própria.	66
Figura 16 Esquema de imobilização da enzima lacase usando suporte de bismuto silicato (BS); Si-BS, BS silanizado; Func-BS, BS funcionalizado; e Lac-BS, lacase imobilizada em bismuto silicato. Fonte: Autoria Própria.	72
Figura 17 Padrões de DRX utilizados para investigar a estrutura cristalina e composição de fase dos BS preparados com diferentes tempos de envelhecimento utilizando TPA Br como agente direcionador de estrutura. Fonte: Autoria Própria.	80

- Figura 18** Padrões de DRX do estudo realizado para a compreensão da remoção do SDA (TPA Br) com tempo de envelhecimento de 24 horas através da calcinação em diferentes temperaturas. **Fonte:** Autoria Própria..... 86
- Figura 19** Padrões de DRX do estudo realizado para a compreensão do papel do SDA na síntese de BS. Síntese utilizando TPA Br, PDADMAC e sem SDA. **Fonte:** Autoria Própria. 89
- Figura 20** Os espectros de FT-IR do estudo realizado para a compreensão da remoção do SDA (TPA Br) e 24 horas de envelhecimento através da calcinação em diferentes temperaturas. **Fonte:** Autoria Própria..... 91
- Figura 21** Ampliação das bandas na região de 400-1500 cm^{-1} . **Fonte:** Autoria Própria. 91
- Figura 22** Os espectros de FT-IR do estudo realizado para a compreensão da remoção do SDA (TPA Br) e 24 horas de envelhecimento através do método Soxhlet. **Fonte:** Autoria Própria. 93
- Figura 23** Isotermas de adsorção/dessorção de N_2 e curvas de distribuição de tamanho de poros de BS1 (a), BS2 (b), BS3 (c), BS4 (d), BS5 (e) e BS6 (f). **Fonte:** Autoria Própria. 97
- Figura 24** Análises térmicas do BS sintetizados na presença de TPA Br e 24 horas de envelhecimento conduzido em uma rampa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 25 a 900 $^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de N_2 (40 mL min^{-1}) e uma etapa isotérmica (900 $^{\circ}\text{C}$) de 60 min em atmosfera de ar sintético (60 mL min^{-1}). **Fonte:** Autoria Própria..... 100
- Figura 25** A, B e C são imagens de MEV de bismuto silicato (A) BS1 (24 horas de envelhecimento e TPABr como DAS), (B) calcinado a 550 $^{\circ}\text{C}$ e (C) calcinado a 750 $^{\circ}\text{C}$. D mostra a EDX do bismuto silicato BS1. **Fonte:** Autoria Própria. 102
- Figura 26** Micrografia de MET da amostra de BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento. **Fonte:** Autoria Própria..... 104
- Figura 27** Micrografia de MET da amostra de BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento e calcinadas a 550 $^{\circ}\text{C}$. **Fonte:** Autoria Própria. 105
- Figura 28** Micrografia de MET da amostra de BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento e calcinadas a 750 $^{\circ}\text{C}$. **Fonte:** Autoria Própria. 106
- Figura 29** Espectros de RMN de estado sólido com rotação no ângulo mágico de uma amostra de bismuto silicato como fabricado. (a) Topo: espectros de ^1H ^{29}Si de polarização cruzada sob rotação no ângulo mágico (CPMAS) adquiridos com tempo de polarização cruzada (CT) de 1ms. Também é mostrado o ajuste dos espectros usando três linhas gaussianas com posições e porcentagens indicadas. Meio: espectros de CPMAS com tempo de contato de 5 ms. Inferior: espectros de Excitação de Pulso Único sob rotação no ângulo mágico (SPEMAS) adquiridos com tempo de reciclagem (d1) de 20s. O ajuste dos espectros foi realizado usando três linhas gaussianas nas mesmas posições das mostradas em (a) e (b) e resultando nas áreas percentuais indicadas. (b) Espectro EASY de ^1H da amostra de bismuto silicato como fabricado. (c) Espectros de ^1H - ^{13}C CPMAS da amostra de bismuto silicato as made. **Fonte:** Autoria Própria..... 109
- Figura 30** Espectros de RMN de estado sólido de ^{29}Si com rotação no ângulo mágico de amostras envelhecidas de bismuto silicato. (a) Amostra a com 12 horas de envelhecimento. Topo e meio: espectros de ^1H ^{29}Si CPMAS adquiridos com tempo de polarização cruzada (CT) de 1ms e 5ms. Inferior: ^{29}Si SPEMAS adquiridos com longo

tempo de relaxamento (20s) juntamente com os ajustes gaussianos considerando os grupos terminais Q2, Q3 e Q4 de silanol como na Fig. 17. As porcentagens de cada tipo de grupo estão indicadas. (b) Mesmo que (a) para a amostra com 24 horas de envelhecimento. **Fonte:** Autoria Própria..... 110

Figura 31 Espectros de ^1H ^{29}Si CPMAS e ^{29}Si SPEMAS de amostras de bismuto silicato calcinadas a 450 °C (a), 550 °C (b) e 750 °C (d). **Fonte:** Autoria Própria..... 111

Figura 32 Os espectros de XANES e a derivação dos espectros de XANES para a folha de Bi, que serve como padrão, e as medições repetidas nas amostras BS1 sintetizado com TPA Br e 24 horas de envelhecimento e BS2 sintetizado com TPA Br e 12 horas de envelhecimento. **Fonte:** Autoria Própria. 112

Figura 33 Comparação dos espectros de XANES medidos e a derivação em comparação com os espectros teóricos para mp-558953 do material. **Fonte:** Autoria Própria. 113

Figura 34 Padrões de DRX usados para investigar a estrutura cristalina e a composição de fases do BS preparado. BS (linha preta); Si-BS (linha verde); Func-BS (linha vermelha); Lac-BS (linha azul). **Fonte:** Autoria Própria..... 114

Figura 35 Espectros de FT-IR de BS (linha preta); Si-BS (linha verde); Func-BS (linha vermelha); Lac-BS (linha azul). **Fonte:** Autoria Própria..... 115

Figura 36 (a) Resultados do rendimento de imobilização do desenho experimental variando massa e atividade enzimática. Cada ponto representa o erro padrão de duas experiências. (b) Resultados da atividade recuperada do desenho experimental variando massa e atividade enzimática. Cada ponto representa o erro padrão de duas experiências. **ns: p > 0,05. Fonte:** Autoria Própria. 119

Figura 37 A) mostra os gráficos estatísticos de perfil desejabilidade de unidades de lacase versus massa de material de suporte empregado no planejamento experimental para a condição ótima para experimentos futuros; B) mostra o gráfico estatístico de Pareto empregado no planejamento experimental para a condição ótima para experimentos futuros. **Fonte:** Autoria Própria..... 120

Figura 38 Modelagem bioinformática da função da lacase: (A) Quatro etapas de simulações de dinâmica molecular livre demonstram a convergência do raio de giração da proteína (nm) durante a simulação de 5 ns. (B) Análise de componentes principais das trajetórias concatenadas da proteína indica que o primeiro componente principal representa aproximadamente 13% dos principais movimentos da proteína. (C) Sobreposição da estrutura cristalográfica da lacase e uma imagem da nona componente principal revela o loop compreendendo Lys188 - Pro193.(D) Monitoramento do volume do bolso através da análise de componentes principais mostra um aumento no volume do bolso do sítio ativo para 379 Å³ e 423 Å³ nos primeiros e nonos componentes principais, respectivamente. **Fonte:** Autoria Própria. 122

Figura 39 Efeito da temperatura na atividade da enzima imobilizada (barra vermelha) e da enzima livre (barra cinza). Cada ponto representa o erro padrão de três experimentos. **Fonte:** Autoria Própria. 124

Figura 40 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada Lac-BS (barras vermelhas e cinzas) e da enzima livre (barras azul claro e verde) ao longo do tempo (uma hora e duas horas). Cada ponto representa o erro padrão de três experimentos. **ns: p > 0,05; **: p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001; ****: p ≤ 0,0001** em comparação com Lac-BS 1 hora. **Fonte:** Autoria Própria. 127

Figura 41 Reutilização da lacase imobilizada. Cada ponto representa o erro padrão de três experimentos. Fonte: Autoria Própria.	129
Figura 42 (A) Impacto da lacase imobilizada (25 mg; 0,5 U/mL) no processo de descoloração do Tectilon 4R-01 200% do controle (barra azul escuro); enzima livre (barra cinza); apenas Func-BS (barra verde); Lac-BS (barra vermelha). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$. (B) Ilustração esquemática da adsorção e biodegradação dos experimentos com Tectilon Blue 4R 200%, comparando Func-BS e Lac-BS. Fonte: Autoria Própria.	133
Figura 43 Caminho de reação possível para a transformação do Tectilon Blue 4R em produtos secundários, de acordo com os resultados obtidos de LC-MS. Fonte: Autoria Própria.	135
Figura 44 Espécies geradas detectadas por LC-MS, de acordo com o mecanismo proposto para a degradação do Tectilon Blue 4R-01.	136
Figura 45 Impacto da lacase imobilizada (25 mg; 0,5 U/mL) no processo de remoção de Ibuprofeno com enzima livre (barra cinza); Func-BS (barra verde); Lac-BS (barra vermelha). ns: $p > 0,05$; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. Fonte: Autoria Própria. ...	138
Figura 46 Possível via de reação para a transformação do Ibuprofeno em metabólitos (1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno e 1,2-dihidroxiibuprofeno). Fonte: Autoria Própria.	140
Figura 47 Mecanismo plausível para a degradação do Ibuprofeno através da catálise enzimática. Fonte: Autoria Própria.	141

Lista de Tabelas e Equações

Tabela 1 Valores permitidos para a manutenção da qualidade do padrão de águas doces perante a liberação de poluentes. Fonte: Adaptado (CONAMA, 2005).....	57
Tabela 2 Valores calculados de cristalinidade de cada amostra em diferentes tempos de envelhecimento utilizando TPA Br como agente direcionador de estrutura. Fonte: Autoria Própria.	81
Tabela 3 Variação dos parâmetros de síntese de BS em diferentes amostras, destacando o tempo de envelhecimento, qual SDA utilizado, o pH do gel antes e depois do processo de envelhecimento e da água-mãe, e a formação de monocristais de NaNO_3 na água-mãe. Fonte: Autoria Própria.	83
Tabela 4 Distâncias interplanares e intensidades relativas do BS antes e depois do tratamento térmico para a remoção do SDA. Fonte: Autoria Própria.	87
Tabela 5 Valores calculados de cristalinidade de cada amostra em diferentes agentes direcionadores de estrutura. Fonte: Autoria Própria.	89
Tabela 6 Valores de propriedades texturais dos BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento (área superficial (S), volume de poros (V_{poros}) e diâmetro de poros (Φ_{poros})). Fonte: Autoria Própria.	96
Tabela 7 Análise elementar dos BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento e suas proporções teóricas e experimental. Fonte: Autoria Própria.	98
Tabela 8 Diferentes materiais e suas propriedades texturais utilizados como matrizes inorgânicas para imobilização de enzimas. Fonte: Autoria Própria.	125
Tabela 9 Resultados de testes de biodegradação realizados em corantes comuns usando vários biocatalisadores. Fonte: Autoria Própria.	134
 Equação 1 Fórmula geral da formação da estrutura cristalina de uma zeólita. Fonte: Adaptado (GHOBARKAR; GUTH, 1999).	34
Equação 2 Fórmula para o cálculo de rendimento de imobilização.	73
Equação 3 Fórmula para o cálculo de atividade recuperada.	73
Equação 4 Fórmula para o cálculo da porcentagem de cristalinidade total da amostra.	77
Equação 5 Equação de Bragg utilizada para o cálculo de distâncias interplanares do DRX.	83

Lista de Abreviatura e Siglas

ABTS	2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
APTES	(3-aminopropil)triethoxissilano
BET-N₂	Análise de Fisissorção de N ₂
BS	Bismuto Silicato
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EXAFS	Espectroscopia de estrutura fina de absorção de raios X prolongada
FT-IR Fourier	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de
Func-BS	Bismuto Silicato funcionalizado
GA	Glutaraldeído
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente
IY	Rendimento de Imobilização
Lac-BS	Lacase imobilizada em Bismuto Silicato
MAS-NMR	Ressonância Magnética Nuclear do estado sólido com giro no ângulo mágico
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OPT	Octaedro-Pentaedro-Tetraedro
PDADMAC	Cloreto de polidialildimetilamônio
RA	Atividade recuperada
SDA	Agente direcionador de estrutura
Si-BS	Bismuto Silicato silanizado
TGA	Análise Termogravimétrica
TPA Br	Brometo de tetrapropilamônio

Sumário

1. Introdução	24
2. Revisão da Literatura	34
2.1. Zeólitas	34
2.2. Síntese de Zeólitas Sintéticas	36
2.3. A Química e Materiais de Bismuto	44
2.4. Enzimas Lacase	49
2.5. Imobilização Enzimática.....	53
2.6. Remediação Ambiental.....	55
3. Justificativa da pesquisa.....	59
4. Objetivos Gerais.....	61
4.1. Objetivos Específicos	61
5. Materiais e Métodos	63
5.1. Síntese Hidrotermal de Bismuto Silicato (BS)	63
5.2. Extração do Agente Direcionador de Estrutura (SDA)	64
5.3. Caracterização Físico-Química	66
5.4. Modulação da superfície do suporte	70
5.5. Delineamento Experimental	72
5.6. Ensaios de determinação de atividade do biocatalisador	73
5.7. Modelo de Bioinformática.....	73
5.8. Caracterização bioquímica do biocatalisador.....	75
5.9. Remoção de corante têxtil	76
5.10. Remoção de Ibuprofeno.....	77
5.11. Análises Estatísticas	77
6. Resultados e Discussão	79
6.1. Caracterização Físico-Química do suporte	79
6.1.1. Síntese de Bismuto Silicato (BS) e remoção de agente direcionador de estrutura (SDA) 79	
6.1.2. Análise de adsorção de Nitrogênio (N ₂)	93
6.1.3. Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) 98	
6.1.4. Análise termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DSC)	99
6.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	100
6.1.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	103
6.1.7. Ressonância Magnética Nuclear ¹ H (RMN ¹ H)	107
6.1.8. Absorção de Raios-X próximo à estrutura da borda (XANES)	112

6.2.	Modulação da superfície do suporte	113
6.3.	Delineamento Experimental	115
6.4.	Modelo de Bioinformática.....	120
6.5.	Caracterização bioquímica do biocatalisador.....	123
6.5.1.	Temperatura Ótima e Estabilidade Térmica	123
6.5.2.	Reutilização	127
6.6.	Remoção de corante têxtil	129
6.7.	Remoção de Ibuprofeno.....	136
7.	<i>Considerações finais e conclusões</i>	142
7.1.	Caracterização Físico-Química do Bismuto Silicato	142
7.2.	Caracterização Físico-Química da Modulação do Suporte	143
7.3.	Delineamento Experimental	144
7.4.	Modelagem de Bioinformática.....	144
7.5.	Caracterização Bioquímica do Biocatalisador	145
7.6.	Remoção de Corante	146
7.7.	Remoção de Ibuprofeno.....	147
8.	<i>Perspectivas Futuras</i>	148
	<i>Referências</i>	149

1. Introdução

As zeólitas fazem parte de uma classe de materiais composta por aluminossilicatos caracterizados por suas estruturas abertas e possuindo uma rede cristalina que forma uma rede de canais e poros, criando uma vasta área superficial característica. Esses materiais geralmente contêm cátions de metais alcalinos terrosos e metais alcalinos em sua composição estrutural. A estrutura cristalográfica de uma zeólita é composta por uma rede tridimensional de tetraedros arranjados de $[\text{SiO}_4]^{4-}$ e $[\text{AlO}_4]^{5-}$ ligados por oxigênio, formando canais do tamanho de moléculas. Esses materiais possuem propriedades físico-químicas que conferem características desejáveis para seu uso como catalisadores heterogêneos. Isso inclui a estabilidade térmica de sua estrutura, a capacidade de atingir altas temperaturas, uma área superficial interna variando tipicamente de 70 a 300 m^2g^{-1} , e a apresentação de sítios catalíticos ácidos ou básicos, que podem variar de acordo com o uso da troca iônica na estrutura (CUNDY; COX, 2003; ROCHA, 2005; ZONES; DAVIS, 1996).

A maioria das zeólitas, por definição, apresentam microporos ($< 2 \text{ nm}$). No entanto, é possível modular a porosidade do material para exibir diferentes tamanhos de poros dentro do mesmo material, recebendo a designação de estrutura hierarquicamente estruturada (CHEN et al., 2012). É possível obter zeólitas micro-mesoporosas, micro-macroporosas ou até mesmo micro-meso-macroporosas. A literatura apresenta duas abordagens distintas para a síntese desses materiais: uma envolve o uso de agentes direcionadores de estrutura, chamados de templates ou SDAs, e a outra consiste em um processo sem o uso deles (JACOBSEN et al., 2000; XIAO et al., 2006). Os principais processos para a produção de zeólitas hierarquicamente estruturadas sem o uso de SDAs são a dessilicificação, que envolve a remoção seletiva de silício da estrutura da zeólita através de tratamento alcalino, e a desaluminação, que é a remoção de átomos de alumínio

da estrutura por meio de tratamentos com vapor ou lixiviação ácida (TAO et al., 2006; VAN DONK et al., 2003).

Agentes direcionadores de estrutura desempenham um papel crucial na síntese de zeólitas. Esses agentes, geralmente sais orgânicos, auxiliam na moldagem da estrutura do material ao direcionar o arranjo dos átomos de alumínio e silício durante a síntese (ASGAR POUR; SEBAKHY, 2022b; GUO et al., 2019; LOBO; ZONES; DAVIS, 1995; ZHANG; ZAWOROTKO, 2014). No caso de usar SDAs para produzir zeólitas hierarquicamente estruturadas, o processo envolve adicionar essas moléculas ao gel precursor. Após a síntese, essas moléculas são removidas do material, principalmente por meio de processos térmicos. A literatura indica que os SDAs mais comumente usados na produção de materiais hierárquicos são moléculas orgânicas que exibem características anfífilas, como cloreto de polialildimetilamônio, organossilanos, brometo de cetrimônio, polivinil butiral, sais de amônio quaternário, entre outros, onde existem casos em que mais de um SDA pode ser usado simultaneamente, com um direcionando para microporos e o outro para mesoporos (Figura 1) (WANG et al., 2010; XIAO et al., 2006).

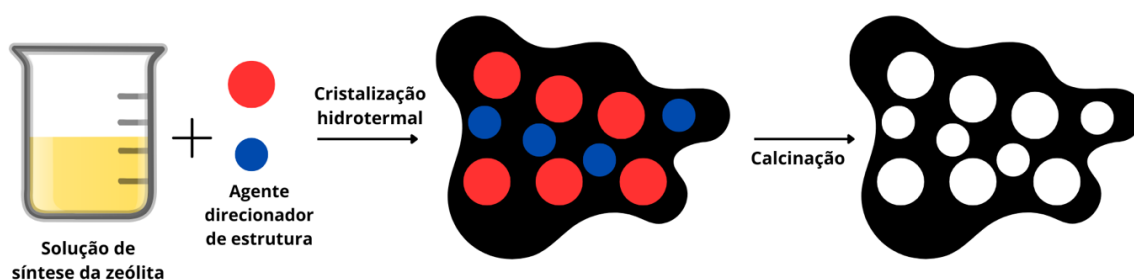


Figura 1 Esquema ilustrativo de um método de obtenção de uma zeólita hierárquica. **Fonte:** Adaptado (FARSANA; KUMARI, 2023).

A escolha do SDA pode afetar não só o tamanho e a forma dos cristais resultantes, mas também sua porosidade e atividade catalítica (GUO et al., 1997). É crucial selecionar e utilizar os SDAs com cuidado para sintetizar zeólitas com propriedades personalizadas

para aplicações específicas (ASGAR POUR; SEBAKHY, 2022b; JO; HONG, 2018; LOBO; ZONES; DAVIS, 1995). Neste estudo, utilizamos dois agentes direcionadores de estrutura orgânicos comuns: o brometo de tetrapropilamônio (TPA Br) e o cloreto de polialildimetilamônio (PDADMAC). O íon de amônio quaternário positivamente carregado desses agentes serve como molde durante a síntese, orientando o arranjo dos átomos de alumínio e silício (Figura 2) (JO; HONG, 2018).

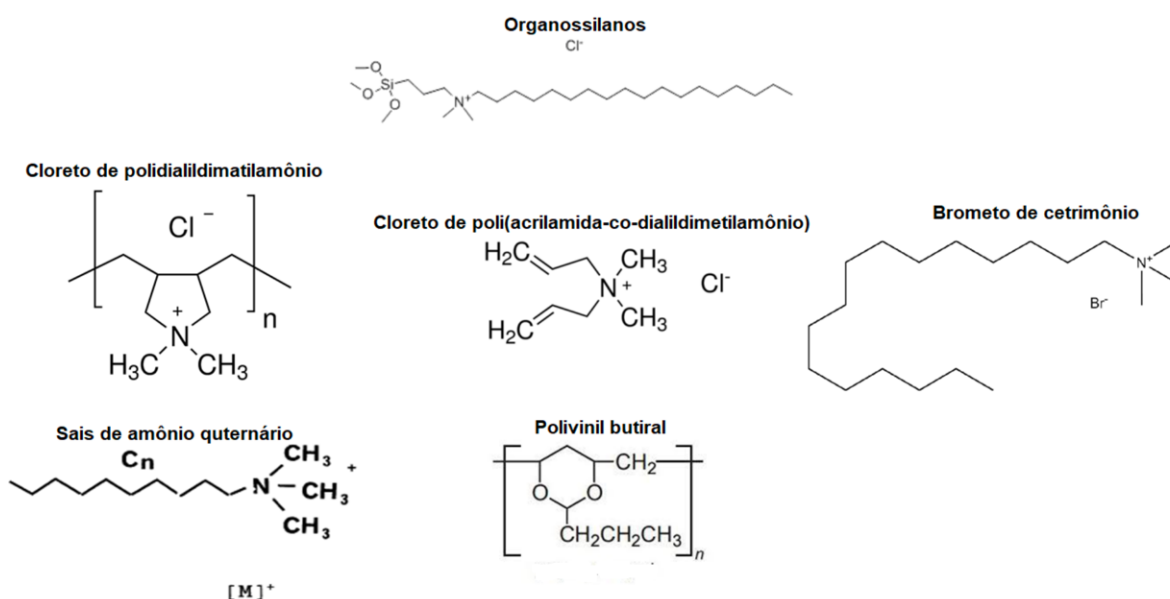


Figura 2 Exemplos de templates orgânicos para a produção de materiais hierarquicamente estruturados **Fonte:** Adaptado (WANG et al., 2010; XIAO et al., 2006).

O TPA Br tem se mostrado especialmente eficaz na síntese de zeólitas com poros grandes, como aquelas pertencentes às famílias FAU e ZSM-5 (DOUGNIER; GUTH, 1996; KERSTENS et al., 2020; VALTCHEV; BOZHILOV, 2004; VAN DER GAAG; JANSEN; VAN BEKKUM, 1985). Além disso, é solúvel em soluções aquosas e solventes orgânicos polares, o que facilita sua incorporação na mistura de síntese. No entanto, seu uso pode levar à formação de impurezas ou subprodutos indesejados, exigindo uma otimização cuidadosa das condições de síntese para alcançar as propriedades desejadas

do produto (BAI et al., 2016; CREA et al., 1987; GUO et al., 1997; KERSTENS et al., 2020).

Na síntese desses materiais, é possível substituir os átomos de Si e Al na estrutura cristalográfica por cátions de metais de transição e lantanídeos, como abordado neste trabalho, o Bismuto (Bi). Essas alterações favorecem a obtenção de novos materiais com características físico-químicas e estruturais diferentes entre si. Esses materiais, que possuem o esqueleto estrutural dos cristais, mas com o alumínio substituído por outro metal na rede cristalina, são chamados de materiais com estrutura cristalográfica mista ou pela sigla OPT, derivado do inglês Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral. Esse nome se deve ao fato de que esses metais normalmente assumem coordenações octaédricas (MO_6) e pentaédricas (MO_5) na rede cristalina, enquanto o silício assume uma coordenação tetraédrica (SiO_4) (ROCHA, 2005; ROCHA; ANDERSON, 2000).

Materiais à base de Bismuto são relatados na literatura como importantes cintiladores, catalisadores fotocatalíticos, vidros, condutores iônicos e agentes de remoção de iodo (GIRSOVA et al., 2020; ISHIIB; HARADAB, 1996; KANG; YANG; YIM, 2020; KARTHIK et al., 2019; KOBAYASHI et al., 1997; KUSZ; TRZEBIATOWSKI; BARCZYNSKI, 2003). No entanto, a produção de materiais OPT contendo átomos de Bismuto em sua estrutura foi relatada. (ZANARDI et al., 2006) relataram com sucesso a síntese, sob condições hidrotérmicas, de dois silicatos microporosos de Bismuto, caracterizados por diferentes refinamentos de estrutura cristalina. A presença de Bismuto em uma estrutura cristalográfica zeolítica pode oferecer vantagens para aplicação como um catalisador heterogêneo devido à sua alta força ácida, devido à sua capacidade de apresentar cátions +3 ou +5. Uma vez que os estudos sobre a síntese de zeólitas envolvendo Bismuto como o metal primário são raros, estudos indicaram que a incorporação de cátions em zeólitas utilizando fontes de Bismuto já está

bem estabelecida. Zeólitas 1 são alguns exemplos de zeólitas usadas para a incorporação de Bismuto (LEI et al., 2015; SUN et al., 2012b; ZARUBIN, 2014; ZHAO et al., 2019b; ZHAO; KOBAYASHI, 2001).

Como materiais de suporte, as zeólitas mantêm a atividade e melhoram a estabilidade das enzimas – térmica, de pH e de armazenamento – possibilitando sua reciclagem em reatores industriais, por exemplo. Em certas circunstâncias, podem até aumentar a atividade catalítica das enzimas. Além disso, por serem excelentes catalisadores químicos, a combinação de zeólitas com enzimas biocatalisadoras pode promover efeitos sinérgicos ou viabilizar reações em cascata quimio-enzimáticas de várias áreas, principalmente na área de meio ambiente (COSTA et al., 2009; DE VASCONCELLOS et al., 2015; DEBECKER et al., 2021; WEHAIDY et al., 2019a; XING et al., 2000).

O aumento exponencial e alarmante de poluentes provenientes de atividades humanas em corpos d'água superficiais exige atenção imediata e total (A. IBRAHIM; MUHAMMAD ABDULLAHI IBRAHIM; ALI GAMBO YUSUF, 2021). A presença de compostos tóxicos em ambientes aquáticos, variando de efluentes industriais a resíduos residenciais e agrícolas não apenas representa uma ameaça significativa à saúde humana, mas também aos ecossistemas, ressaltando a gravidade e urgência da situação (POOJA; KUMAR; SINGH, 2020).

As abordagens tradicionais de tratamento empregadas para mitigar o impacto desses poluentes muitas vezes necessitam de reavaliação devido às complexidades e resistência de seus alvos químicos. Além disso, embora sejam parcialmente eficazes, esses métodos convencionais de tratamento de água lutam para erradicar contaminantes emergentes como drogas, corantes e compostos disruptores endócrinos. A maioria dos

métodos padrão também são demorados, caros e podem ter efeitos adversos (ROCCARO, 2018). Portanto, é imprescindível reconsiderar os procedimentos tradicionais para garantir a qualidade da água, destacando a necessidade crítica de tecnologias inovadoras e sustentáveis de tratamento de água (ISLAS-FLORES et al., 2014; ROCCARO, 2018).

O Ibuprofeno, um medicamento anti-inflamatório não esteroidal (AINE) (Figura 3) amplamente utilizado na saúde moderna, alivia a dor e a inflamação. No entanto, o consumo global de ibuprofeno levou à sua presença generalizada e persistente nos sistemas aquáticos (CLEUVERS, 2004; ISLAS-FLORES et al., 2014). O ibuprofeno e seus metabólitos, originados do consumo humano, excreção e métodos inadequados de descarte, estão sendo cada vez mais reconhecidos como novos poluentes ambientais devido ao seu aparecimento contínuo em águas superficiais, subterrâneas e até mesmo em efluentes de esgoto tratados (BUSER; POIGER; MULLER, 1999; ZHANG et al., 2021).

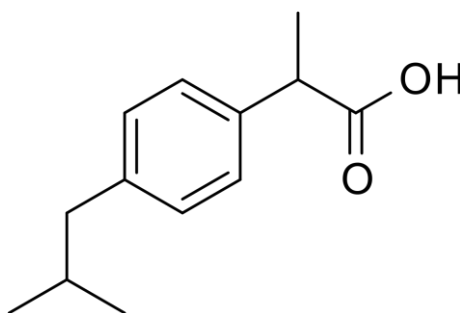


Figura 3 Estrutura molecular do anti-inflamatório Ibuprofeno. **Fonte:** PUBCHEM 3672.

À medida que o ibuprofeno continua a se infiltrar em habitats aquáticos, devemos enfrentar seu profundo impacto na vida aquática, as tendências alarmantes de bioacumulação e a potencial transferência desses contaminantes através da cadeia alimentar (RAGUGNETTI et al., 2011; ZHANG et al., 2021). Essa tarefa exige uma abordagem interdisciplinar envolvendo estudos de química ambiental, eco toxicologia e

saúde pública. Compreender a presença e as consequências de contaminantes farmacêuticos, como o Ibuprofeno, nos sistemas aquáticos é uma responsabilidade fundamental que todos compartilhamos na luta pela integridade ecológica de nossos recursos hídricos e pela salvaguarda do bem-estar das populações humanas (OBA et al., 2021).

Os efluentes da indústria têxtil também representam um desafio ambiental premente. Este setor, chave na economia global, é um grande contribuinte para a poluição da água, sendo responsável por 140.000 toneladas/ano de poluição industrial da água (ISLAM et al., 2023). A característica marcante desses efluentes é a sua coloração intensa, resultante da fixação incompleta de corantes no processo produtivo, culminando na liberação desses corantes nos efluentes industriais (BERRADI et al., 2019). Muitos corantes sintéticos são resistentes à degradação natural, e sua pigmentação intensa obstrui a penetração de luz nos corpos d'água, levando à redução da atividade fotossintética e à inibição da biota aquática (BERRADI et al., 2019; ISLAM; MOSTAFA, 2018; ISLAM et al., 2023).

Os efluentes têxteis são ainda caracterizados por alta demanda química de oxigênio (DQO), aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), sais e metais, toxicidade e, em alguns casos, mutagenicidade, o que ameaça o meio ambiente e a saúde humana (Figura 4) (ISLAM; MOSTAFA, 2018; ISLAM et al., 2023).

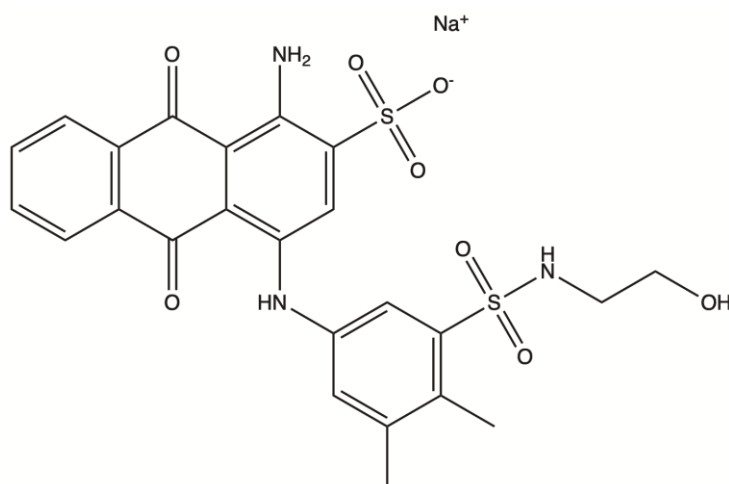


Figura 4 Estrutura molecular do corante têxtil Acid Blue 277, empregado neste trabalho. **Fonte:** Chemical Book CB6875176.

Neste contexto, a busca por tecnologias alternativas que sejam eficazes e ambiental e economicamente viáveis torna-se uma luz de esperança. A integração de métodos físico-químicos e biológicos, particularmente aqueles que envolvem enzimas como lacases, pode fornecer alternativas eficazes e sustentáveis, revolucionando nossa abordagem ao tratamento de água e instigando otimismo em nossa batalha contra a poluição.

As enzimas lacases são oxidases multicobre (EC 1.10.3.2) com quatro átomos de cobre em sua estrutura dispostos em três tipos (T1, T2 e T3). O cobre T1 é responsável pelo potencial redox da enzima em relação ao eletrodo de hidrogênio normal (ENH), podendo ser classificado em alto E^0 (780 mV vs. ENH), intermediário E^0 (430-710 mV vs. ENH) e baixo E^0 (430 mV vs. ENH) (ALI et al., 2023; SHARMA et al., 2013). É constatado que as lacases oriundas de *Myceliophthora thermophila* possuem um ENH por volta de 470 mV, estabelecendo a faixa intermediária de potencial redox (LLORET et al., 2013; XU et al., 1998). Além deste átomo de cobre, as lacases possuem um cluster tri nuclear, composto por um átomo de cobre T2 e dois átomos de cobre T3, onde ocorre a

redução de oxigênio molecular a água. Essas enzimas desempenham um papel importante nas reações de oxidação de diversos compostos fenólicos e não fenólicos, utilizando oxigênio como aceitador de elétrons.

As lacases podem ser produzidas industrialmente por bactérias e fungos e aplicadas em vários contextos biotecnológicos, desde a eliminação de compostos fenólicos indesejados nas indústrias de alimentos e papel até a degradação de poluentes ambientais recalcitrantes, incluindo medicamentos e corantes sintéticos (BILAL et al., 2019; MAGALHÃES et al., 2019; MISHRA; MAITI, 2019; MOJSOV et al., 2016; ULSON DE SOUZA; FORGIARINI; ULSON DE SOUZA, 2007). No entanto, desafios práticos obstruíram sua ampla implementação, incluindo o alto custo de produção, as dificuldades na separação pós-reação e a suscetibilidade à inativação térmica e por solventes durante a aplicação. A imobilização de lacases em suportes inertes oferece uma solução, possibilitando a separação pós-reação eficiente, aumentando a estabilidade operacional e facilitando a reutilização (GEOR MALAR et al., 2020; LIU; DONG, 2020; QIU et al., 2020; SIGURDARDÓTTIR et al., 2018).

Ao utilizar um único suporte inorgânico, é difícil alcançar alta atividade e carga enzimática, propriedades físico-químicas consistentes, excelente resistência mecânica, alta afinidade pelo substrato e limitações de difusão do produto (GEOR MALAR et al., 2020; LIU; DONG, 2020; QIU et al., 2020). Devido à sua estrutura hierárquica de poros, inerte em condições normais e área superficial extraordinária, que pode ultrapassar $700 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, o uso de materiais com estrutura mista octaédrica-pentaédrica-tetraédrica (OPTs) surgem como uma solução substancial para os desafios existentes (KERSTENS et al., 2020; ROCHA, 2005).

A fim de responder tais questionamentos e dada ainda a importância do processo catalítico de remediação ambiental e da necessidade de obter processos mais eficientes, este trabalho investigou a síntese e caracterização de um novo suporte inorgânico de bismuto silicato concomitantemente com a modulação de sua superfície por agentes orgânicos como aminosilanos e glutaraldeído com o objetivo da imobilização de lacases de *Myceliophthora thermophila* para empregar este biocatalisador nas reações de degradação de Ibuprofeno e o corante azul Acid Blue 277.

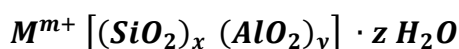
2. Revisão da Literatura

2.1. Zeólitas

Zeólitas são tradicionalmente descritas como aluminossilicatos policristalinos que possuem um sistema de microporos e cavidades de dimensões moleculares (LI; LI; YU, 2017). Suas estruturas são compostas por unidades do tipo TO_4 , onde “T” representa átomos tetraedricamente coordenados como Si, Al, P, entre outros. Esses tetraedros se conectam de diversas formas, gerando uma ampla variedade de estruturas zeolíticas (LI; YU, 2014). Segundo a Associação Internacional de Zeólitas (do inglês, International Zeolite Association, IZA), a última atualização em 20/02/2024 registrou 256 tipos de estruturas de zeólitas ("Database of Zeolite Structures", 2024). As zeólitas geralmente apresentam um desequilíbrio de carga devido aos tetraedros formados por átomos de Al^{+3} , que é compensado por cátions, que podem ser monovalentes ou divalentes (DAVIS, 2002).

A fórmula geral de uma zeólita baseada em aluminossilicatos pode ser expressa como:

Equação 1 Fórmula geral da formação da estrutura cristalina de uma zeólita. **Fonte:** Adaptado (GHOBARKAR; GUTH, 1999).



Sendo,

M = cátion de compensação extra rede, podendo ser metal do grupo 1A ou 2A;

m^+ = número de valência do cátion M extra rede;

x = número de alumínio por fórmula unitária na rede;

y = número de silício por fórmula unitária na rede;

z = número de moléculas de água adsorvida.

A partir da estrutura básica, ou PBU (do inglês, primary building unit) exemplificada pela Equação 1, as estruturas das zeólitas podem ser formadas apresentando anéis internos de diferentes tamanhos, constituindo a SBU (do inglês, secondary building unit). Esses anéis são classificados por poros pequenos (formados por até 8 átomos T), poros médios (com 10 átomos T), poros grandes (12 átomos T) e poros extragrandes (com mais de 12 átomos T) (DAVIS, 2002; MARGETA et al., 2013). A Figura 5 ilustra a formação de um tipo de estrutura de zeólita.

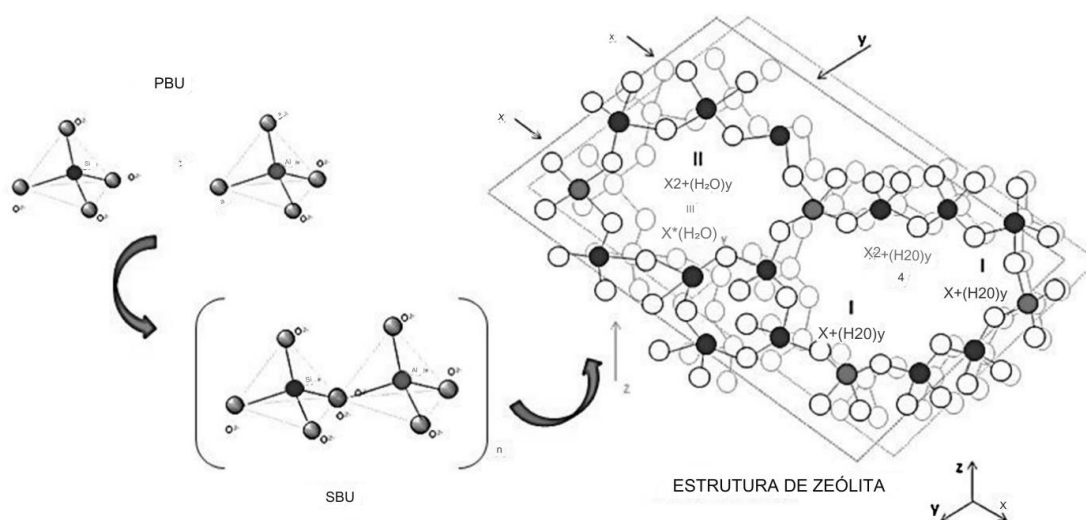


Figura 5 Ligação das unidades de construção (unidades de construção primárias; PBU e unidades de construção secundárias; SBU) na estrutura tridimensional da zeólita-clinoptilolita. **Fonte:** Adaptado (MARGETA et al., 2013).

As zeólitas ocorrem naturalmente, sendo encontradas em depósitos geológicos através de processos hidrotermais, geralmente em ambientes vulcânicos (BOLES, 2002). Porém, elas apresentam impurezas, que dificultam sua aplicação, sendo necessário etapas de purificação o que ao longo dos anos levou a busca sobre a produção de zeólitas sintéticas, onde o processo de obtenção é realizado em laboratórios através de processos hidrotérmicos mimetizando os processos e condições naturais (KRÓL, 2020). O aspecto positivo de zeólitas sintéticas é a permissão da produção de zeólitas com estruturas e

composições diferentes, como mostrado na Figura 6 e melhorando propriedades desejáveis, além do controle das impurezas presentes (DERBE; TEMESGEN; BITEW, 2021).

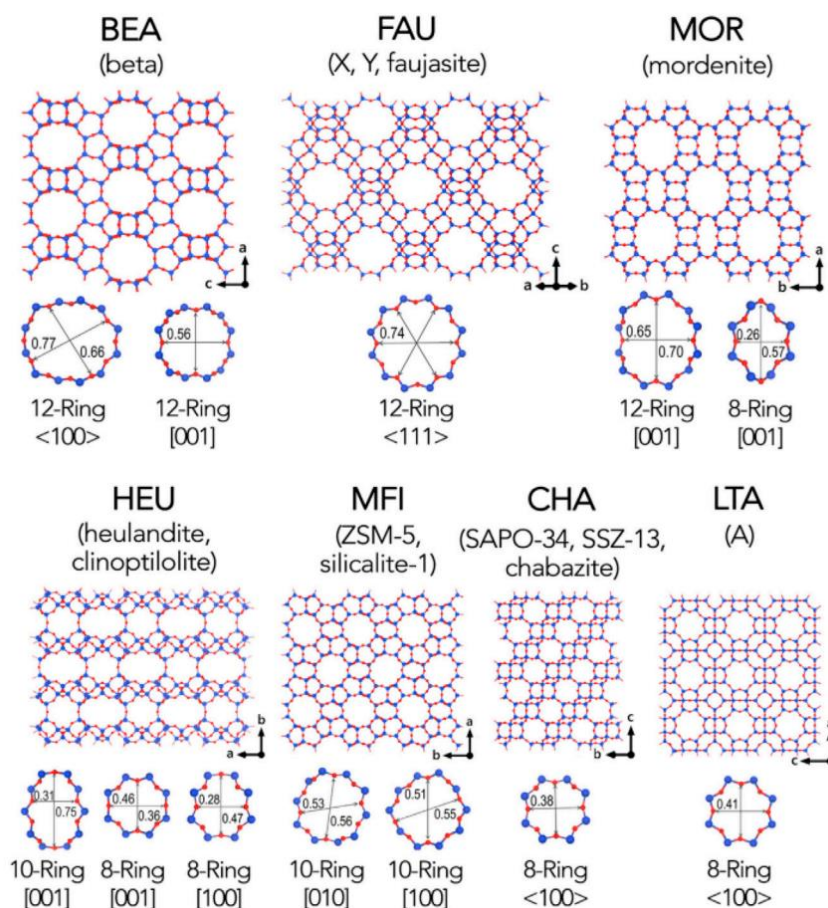


Figura 6 Tipos comuns de estruturas de zeólitas. A esfera azul representa o átomo T e a esfera vermelha representa o átomo de oxigênio. **Fonte:** (LI; LI; YU, 2017).

2.2. Síntese de Zeólitas Sintéticas

Historicamente, o primeiro registro de síntese de zeólita sintética data de 1845 e foi reportado no estudo realizado por Schafhautle, que tentou produzir quartzo aquecendo silicato em gel usando uma autoclave (FLANIGEN, 1991). Ao longo dos anos, houve outras tentativas de síntese realizadas por St. Claire Deville em 1862 e por Schulten em 1882; porém, essas tentativas não foram bem-sucedidas devido à escassez de dados (FLANIGEN, 1991). Em 1948, foi publicado o trabalho pioneiro sobre a síntese de zeólita

sintética, realizado por (BARRER, 1948). A síntese descrita no estudo baseou-se na adição de substâncias alcalinas em meio aquoso a fontes de alumínio e silício em proporções definidas, em um ambiente com temperatura controlada. Com o passar dos anos e com estudos aprofundados, a síntese de zeólitas sintéticas foi sendo cada vez mais compreendida. Atualmente, entendemos as diferentes estruturas atingíveis a partir das alterações nos aspectos físicos (temperatura, pressão, agitação e tempo) e nos aspectos químicos, como, por exemplo, razão Si/Al, alcalinidade, tempo de envelhecimento, e presença de agentes direcionadores de estrutura – conhecidos como SDA, do inglês *structure directing agent* – e solventes.

Uma síntese hidrotermal de zeólita sintética é tipicamente conduzida em um reator selado devido à necessidade de altas pressões, que, neste caso, são autogeradas. Além disso, a síntese é realizada em meio fortemente alcalino ou ácido e em temperaturas que podem variar de 90 °C até 400 °C (KHALEQUE et al., 2020). Qualquer alteração nos parâmetros durante a síntese pode resultar em estruturas diferentes, como trazido por diversos estudos.

Desde 1975, os efeitos da composição do gel em termos de quantidade são conhecidos. Quando a composição do gel $\text{Na}_2\text{O}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2-\text{H}_2\text{O}$ é utilizada e conduzida a 100 °C, usando silicato de sódio e 90 a 98% de H_2O , as zeólitas X e Y (FAU), A (LTA), B (ANA) e HS (SOD) são obtidas sozinhas ou em fases competitivas. No entanto, ao diminuir apenas o conteúdo de água do gel para 60-85%, apenas a fase cristalina da zeólita HS é favorecida. Além disso, a alteração da fonte de sílica pode favorecer outras formações (BRECK, 1975; NAKHAEI POUR; MOHAMMADI, 2021; VEGERE et al., 2020; YANG; VLESSIDIS; EVMIRIDIS, 1997).

Em contrapartida, a fonte de sílica e/ou de alumínio, bem como a razão Si/Al também impacta de forma significativa o resultado da síntese. As fontes de silício diferem

tanto em reatividade como em solubilidade, portanto, a natureza do poli silicato utilizado em uma síntese ocasiona em alterações na nucleação e cristalização dos produtos, acarretando em diferenças na taxa de cristalização, tamanho do cristal, distribuição dos cristais no material. A sílica com alta área superficial se dissolve muito mais facilmente em meio básico do que a sílica com baixa área superficial. A alta área de superfície resulta em maior supersaturação e nucleação mais rápida em solução básica, favorecendo a formação de pequenos cristais. Por outro lado, uma fonte de silício com baixa área de superfície e baixa solubilidade favorece a formação de cristais grandes. Contudo, pesquisas indicam que fontes de silício menos reativas podem gerar menos sítios de nucleação, o que favorece a formação de cristais maiores (KLUNK et al., 2020; KRACHUAMRAM; CHANAPATTHARAPOL; KAMONSUTTHIPAIJIT, 2021; MOHAMED et al., 2005; ROUND et al., 1997; WANG et al., 2020).

As fontes de alumínio também influenciam a cristalização das zeólitas. As fontes de alumínio comumente usadas na síntese de zeólitas são aluminato de sódio, pseudo-boemita, hidróxido de alumínio, isopropóxido de alumínio, nitrato de alumínio, sulfato de alumínio e alumínio metálico (pó ou folha de alumínio). (ZHANG; TANG; JIANG, 2013) mostrou em seu estudo que a fonte de alumínio teve impacto tanto na fase do cristal como no tamanho dos cristais e das partículas. (LIU et al., 2013) mostrou em seus resultados experimentais que, embora a temperatura ideal de cristalização fosse a mesma, os tempos necessários para cristalizar a zeólita NaA de forma adequada variaram significativamente entre as duas fontes de alumínio: 4 horas para o cloreto de alumínio e 2 horas para o sulfato de alumínio. Além disso, é importante destacar que, nos experimentos realizados com um tempo de cristalização mais longo e maior alcalinidade, o produto obtido com cloreto de alumínio foi principalmente zeólita NaX, enquanto o produto obtido com sulfato de alumínio foram predominantemente sodalita.

Além dos fatores que podem alterar a estrutura de uma zeólita, uma alternativa para a formação de novas estruturas de zeólitas sintéticas é a utilização de um agente direcionador de estrutura (ADS, ou SDA em inglês), como mostrado na Figura 7. Esses agentes podem incluir sais orgânicos/inorgânicos quaternários, cátions inorgânicos como F^- , K^+ e Na^+ , além de métodos conhecidos como "soft templating" e "hard templating". O soft templating envolve o uso de surfactantes, polímeros catiônicos, organossilanos e organossilanos anfifílicos, enquanto o hard templating utiliza reagentes sólidos, como nano tubos de carbono. Ambas as técnicas são comumente empregadas para preparar zeólitas com diferentes tipos de poros, conhecidas como zeólitas hierárquicas (ASGAR POUR; SEBAKHY, 2022a; BAI et al., 2016; LI; CORMA; YU, 2015; LOBO; ZONES; DAVIS, 1995; MUMTAZ; IRFAN; USMAN, 2021).

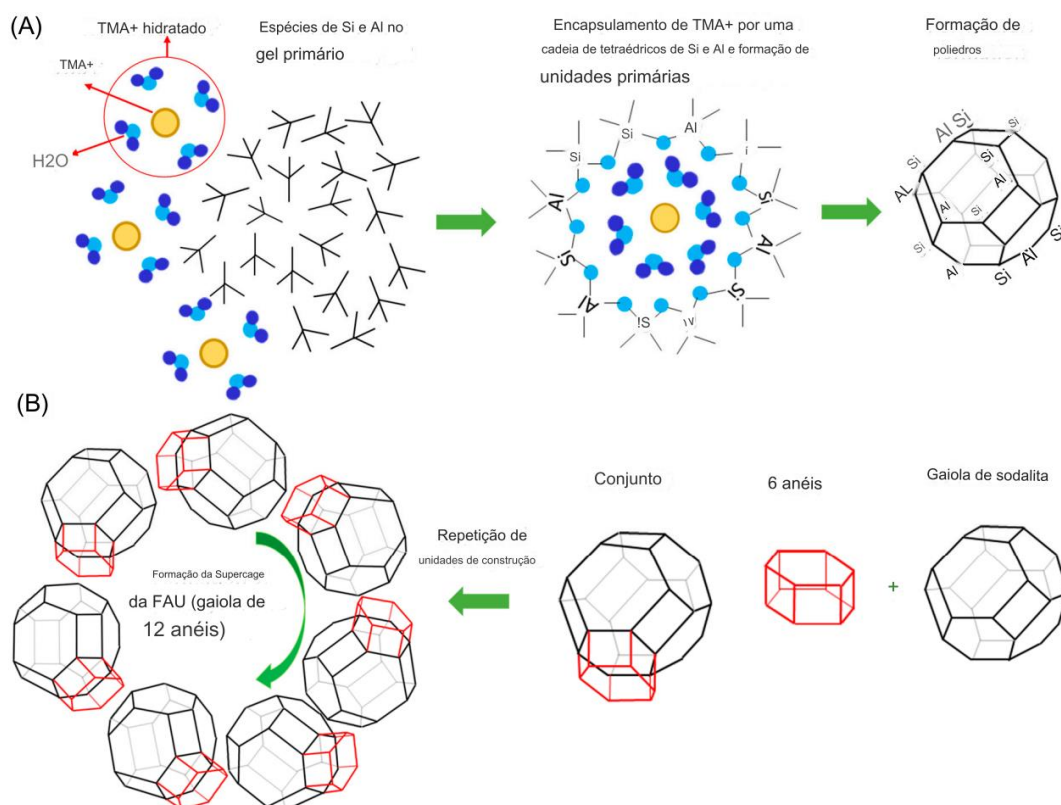


Figura 7 Representação esquemática de **(A)** A formação de blocos construtivos zeolíticos Y primários (topologia FAU) ao redor de agentes direcionadores de estrutura orgânicos (TMA⁺). **(B)** a formação da super cavidade

da zeólita Y pela montagem de blocos construtivos secundários. **Fonte:** Adaptado (ASGAR POUR; SEBAKHY, 2022a).

No último aspecto de variação na composição do gel de síntese, pode-se substituir o heteroátomo nos tetraedros $[TO_4]$, onde naturalmente o T é representado por átomos de alumínio. Há a possibilidade de trocar este átomo por outros, como B, Be, Ge, Sn, Y, V, Cr e Bi, conforme sugerido inicialmente na década de 1990 por (ANDERSON et al., 1994; PHILIPPOU; ANDERSON, 1996). Os materiais onde ocorre a substituição do heteroátomo são chamados de materiais de estrutura cristalográfica mista, ou OPT (do inglês octaédrica, pentaédrica e tetraédrica), em referência aos tipos de coordenação envolvidos entre as unidades monoméricas, como mostrado na Figura 8. Esses materiais apresentam características físico-químicas interessantes, destacando-se a capacidade de troca iônica e a estabilidade térmica (ROCHA; ANDERSON, 2000), sendo promissores para aplicação como catalisadores para diversas reações industriais (DA SILVA et al., 2018; LITRENTA MEDEIROS et al., 2020; LUIZON FILHO et al., 2020; PAULA et al., 2016).

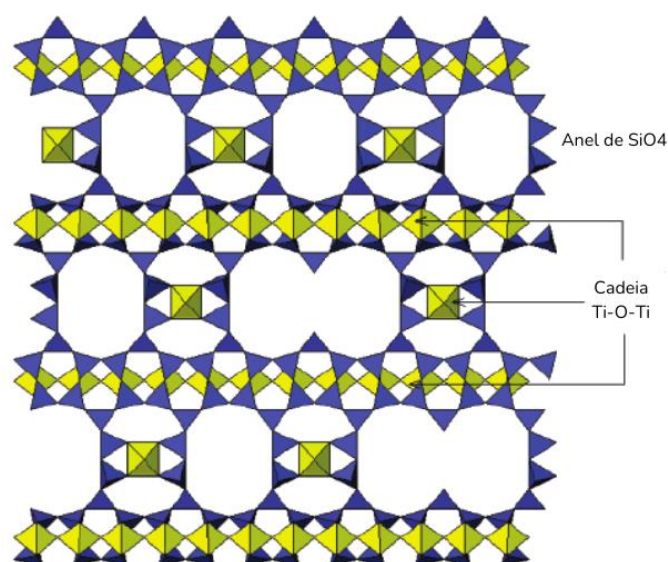


Figura 8 Estrutura do material ETS-10 mostrando as diferentes coordenações. **Fonte:** Adaptado (KRISNANDI; LACHOWSKI; HOWE, 2006)

A síntese dos OPTs geralmente segue os mesmos métodos empregados na síntese de zeólitas sintéticas, utilizando condições hidrotérmicas em reatores fechados com pressão autogerada. Esse processo pode durar desde algumas horas até várias semanas, sob temperaturas variando entre 150 °C e 250 °C (ROCHA; ANDERSON, 2000). A pesquisa sobre a síntese desses materiais microporosos e sua análise estrutural se baseia principalmente em estudos detalhados de minerais naturais conduzidos por geólogos e mineralogistas. Exemplos significativos incluem a semelhança estrutural entre o titanossilicato sintético ETS-4 e o mineral Zorita (ANDERSON et al., 1994; MER'KOV et al., 1973) a criação de zirconossilicatos sintéticos com estruturas semelhantes aos minerais Gaidonnayite e Umbita (JALE; OJO; FITCH, 1999). Além disso, há também materiais sintéticos, como o niobiossilicato sintético AM-11, que não possuem minerais naturais equivalentes (ROCHA et al., 1998).

O envelhecimento do gel é um outro parâmetro crítico na síntese de zeólitas sintéticas, podendo influenciar diretamente a estrutura cristalina e as propriedades finais do material. Este processo envolve a maturação do gel precursor antes da cristalização hidrotermal, permitindo que as unidades estruturais se organizem de maneira mais eficiente. O envelhecimento pode ser controlado por vários parâmetros, como temperatura, tempo e presença/ausência de agitação.

Durante o envelhecimento, ocorrem rearranjos estruturais no gel que facilitam a formação de núcleos cristalinos uniformes. Este processo é fundamental para obter zeólitas com alta pureza e cristalinidade. A temperatura de envelhecimento, por exemplo, pode acelerar a mobilidade dos íons no gel, promovendo a formação de precursores nucleares. Além disso, a duração do envelhecimento deve ser cuidadosamente otimizada; tempos curtos podem resultar em nucleação insuficiente, enquanto tempos excessivamente longos podem levar à dissolução de núcleos já formados. A agitação

impacta diretamente na cinética de cristalização, particularmente no tamanho dos cristais, onde a aplicação da agitação leva a formação de cristais menores devido a superação das barreiras de transferência de massa.

O envelhecimento do gel também influencia a distribuição de tamanho de cristais das zeólitas. Um envelhecimento adequado pode levar a uma distribuição mais estreita de tamanhos, resultando em materiais com propriedades mais uniformes e previsíveis. As condições de envelhecimento podem ser ajustadas para modificar as propriedades físico-químicas das zeólitas, como a acidez (LIU et al., 2016). Por exemplo, a presença de certos íons ou agentes orgânicos durante o envelhecimento pode incorporar-se na estrutura da zeólita, alterando suas propriedades de superfície.

Em resumo, o envelhecimento do gel é um fator determinante na síntese de zeólitas sintéticas, afetando a nucleação, crescimento cristalino e propriedades finais do material. A otimização desse processo é essencial para a produção de zeólitas de alta qualidade, com características ajustáveis para diversas aplicações tecnológicas (AZIZI; YOUSEFPOUR, 2010; GINTER et al., 1992; GINTING et al., 2019; KOVO; HOLMES, 2010; SELVIN et al., 2011; YOO et al., 2009).

Além disso, outro fator externo ao gel que desempenha papel fundamental na síntese de zeólitas sintética é a temperatura, influenciando cada etapa do processo, desde a nucleação até o crescimento dos cristais. A variação da temperatura pode afetar a estrutura cristalina, o tamanho dos cristais, a pureza do produto e até mesmo a distribuição de poros nas zeólitas resultantes. Entender como a temperatura impacta esses aspectos é fundamental para a otimização do processo de síntese e a obtenção de materiais com propriedades desejáveis para aplicações específicas. Em temperaturas mais altas, a energia cinética das moléculas aumenta, promovendo uma nucleação mais rápida e um crescimento cristalino acelerado. Isso pode resultar em cristais maiores e mais bem

definidos. Por outro lado, temperaturas mais baixas tendem a favorecer a nucleação em detrimento do crescimento, produzindo uma maior quantidade de núcleos, mas com cristais menores.

Diferentes estruturas de zeólitas podem ser obtidas ao variar a temperatura de síntese. Algumas fases de zeólitas são estáveis apenas em faixas de temperatura específicas. Por exemplo, a zeólita ZSM-5 é frequentemente sintetizada em temperaturas mais baixas (cerca de 70-90°C) (BENSAFI; CHOUAT; DJAFRI, 2023), enquanto a zeólita Y pode exigir temperaturas mais elevadas (150-200°C) (LUTZ, 2014) para sua formação, concomitantemente, zeólitas contendo outros héteroátomos em suas estruturas também apresentam variações de temperatura em sua síntese. No entanto, geralmente, essas sínteses ocorrem a temperaturas mais altas. Por exemplo, na síntese de vanádiossilicatos, é necessário realizar o processo a 180 °C (PAULA et al., 2016), enquanto estanhossilicatos requerem 200 °C (DA SILVA; DE VASCONCELLOS; NERY, 2021), ítriossilicatos necessitam de 230 °C (LITRENTA MEDEIROS et al., 2020) e cromossilicatos devem ser sintetizados a 165 °C (LUIZON FILHO et al., 2020).

Por fim, o pH se mostra como outro fator do meio reacional importante na síntese de zeólitas sintéticas, influenciando diretamente a nucleação, o crescimento dos cristais, a estrutura final das zeólitas e suas propriedades físico-químicas. O controle preciso do pH permite a obtenção de zeólitas com características desejadas, como tamanho de poros, cristalinidade e pureza. O pH do meio reacional afeta significativamente a taxa de nucleação e o crescimento dos cristais de zeólita. Em meio altamente alcalino, geralmente usados na síntese de zeólitas, a alta concentração de íons hidroxila (OH^-) favorece a formação de espécies solúveis de alumínio e silício, que são essenciais para a nucleação de zeólitas. Níveis de pH elevados aumentam a solubilidade dos precursores, promovendo uma nucleação rápida e a formação de núcleos de cristal mais numerosos. No entanto, um

pH excessivamente alto pode também levar a uma taxa de crescimento cristalino rápida demais, resultando em cristais menores e menos definidos (LECHERT, 2001; LI et al., 2024; MELANINGTYAS; KRISNANDI; EKANANDA, 2019; YU, 2007).

Por outro lado, um pH mais baixo pode reduzir a solubilidade dos íons silicatos e aluminatos, retardando a nucleação e permitindo um crescimento cristalino mais controlado e uniforme. Este ambiente menos alcalino pode ser utilizado para sintetizar zeólitas com estruturas mais ordenadas e tamanhos de cristais maiores (LECHERT, 2001; LI et al., 2024; MELANINGTYAS; KRISNANDI; EKANANDA, 2019; YU, 2007).

2.3. A Química e Materiais de Bismuto

O bismuto, um elemento com número atômico 83, ocupa uma posição distinta no grupo 15 da tabela periódica. Historicamente conhecido desde os tempos antigos, foi frequentemente confundido com chumbo e estanho devido à sua aparência similar. A redescoberta de suas propriedades exclusivas somente ocorreu no século XVIII. Com uma densidade de 9.78 g/cm³, o bismuto é mais leve que a maioria dos metais pesados, mas apresenta uma coloração característica rosa acinzentada. Este elemento é o mais diamagnético e possui a menor condutividade térmica entre os metais, tornando-o interessante para diversas aplicações tecnológicas.

O bismuto é um metal pesado, com um ponto de fusão relativamente baixo (271,4°C) e uma densidade elevada. Destaca-se por sua baixa toxicidade em comparação com outros metais pesados, o que o torna atraente para aplicações biomédicas e ambientais. Quimicamente, o bismuto exibe uma configuração eletrônica [Xe]4f¹⁴5d¹⁰6s²6p³, apresentando estados de oxidação +3 e +5, sendo o estado +3 o mais comum e estável. Essas propriedades conferem ao bismuto uma química diversa e complexa, possibilitando a formação de uma ampla variedade de compostos. Os

compostos de bismuto (III) são amplamente estudados, incluindo o óxido de bismuto (Bi_2O_3), que é um óxido básico e reage prontamente com ácidos fortes para formar sais solúveis. Estes compostos são úteis em uma variedade de reações químicas e processos industriais, especialmente devido à sua estabilidade e baixa toxicidade relativa.



Figura 9 Pedra mineral de bismuto. **Fonte:** Public Domain Archive

Os compostos de bismuto apresentam uma gama diversificada de comportamentos químicos. O Bi_2O_3 , por exemplo, é conhecido por suas excelentes propriedades ópticas e elétricas. A fase $\alpha\text{-Bi}_2\text{O}_3$, por exemplo, apresenta uma banda larga ($\sim 2,8$ eV), tornando-o um bom material para aplicações como foto catalisadores. Já a fase $\delta\text{-Bi}_2\text{O}_3$ exibe uma condutividade iônica extremamente alta, sendo de grande interesse para aplicações em células de combustível de óxido sólido (do inglês, solid oxide fuel cell, SOFCs) (AI et al., 2011; BALCI et al., 2022; CHOUKE et al., 2022; FAN et al., 2005; GOMEZ et al., 2014; LENG; CHAN, 2006). A transição entre diferentes fases do Bi_2O_3 pode ser utilizada para ajustar suas propriedades, dependendo da aplicação desejada. Compostos como o penta fluoreto de bismuto (BiF_5) são agentes oxidantes potentes, utilizados em sínteses químicas complexas. A capacidade do bismuto de formar complexos coordenados amplia ainda mais suas aplicações, permitindo a formação de compostos estáveis com ligantes variados, o que é explorado em diversas indústrias, desde a eletrônica até a farmacêutica (BARTLETT, 2006; MÖBS et al., 2024).

A química de coordenação do bismuto é rica e variada, com o metal formando complexos com diferentes tipos de ligantes, incluindo oxigênio, nitrogênio, enxofre e halogênios. Os complexos de bismuto(III) são particularmente notáveis pela sua estabilidade e diversidade estrutural. A capacidade do bismuto de formar ligações covalentes e interações mais fracas, como ligações de hidrogênio e interações π - π , permite a criação de estruturas complexas e funcionais. Estudos sobre a química de coordenação do bismuto têm revelado potenciais aplicações em catálise, onde os complexos de bismuto podem atuar como catalisadores em reações orgânicas, incluindo oxidações e reações de acoplamento (YANG; SUN, 2007).

Na tecnologia moderna, o bismuto desempenha um papel crucial em várias inovações. O telureto de bismuto (Bi_2Te_3) é um material termoelétrico de destaque, utilizado em dispositivos que convertem calor em eletricidade, fundamental para o desenvolvimento de tecnologias de energia renovável (HONG; CHEN; ZOU, 2018). Uma área promissora para a aplicação do bismuto é a medicina. Compostos de bismuto, como o subsalicilato de bismuto, são amplamente utilizados no tratamento de distúrbios gastrointestinais devido às suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. Além disso, o bismuto tem sido explorado em terapias anticâncer, onde seus compostos podem induzir apoptose em células tumorais e atuar sinergicamente com outros agentes quimioterápicos (SHETU et al., 2022). A baixa toxicidade relativa do bismuto, aliada à sua eficácia terapêutica, justifica o interesse contínuo na pesquisa de novos compostos de bismuto para aplicações médicas (BIERER, 1990; BRUM et al., 2021). Além disso, a baixa toxicidade do bismuto em comparação com outros metais pesados o torna uma escolha segura para uma ampla gama de aplicações.

Recentemente, a pesquisa sobre bismuto tem se expandido para novas fronteiras, como a foto catálise. Bismutos silicatos, por exemplo, têm demonstrado grande potencial

na degradação de poluentes orgânicos sob luz visível, oferecendo soluções promissoras para a purificação de água e tratamento de resíduos industriais. Além disso, estudos indicam que compostos de bismuto podem melhorar a eficácia da radioterapia no tratamento do câncer, aumentando a absorção de radiação pelos tecidos cancerígenos e minimizando os danos aos tecidos saudáveis circundantes. Estas descobertas abrem novas possibilidades para o uso do bismuto em aplicações médicas avançadas (HU et al., 2021; LI et al., 2022; SONG et al., 2022; SUN et al., 2009a).

No campo dos materiais, o bismuto é um componente-chave em ligas de baixo ponto de fusão e materiais termoelétricos. Sua capacidade de formar ligas com outros metais, como estanho e chumbo, é utilizada na produção de soldas ecológicas, substituindo ligas tradicionais mais tóxicas. Em catálise, compostos de bismuto têm sido investigados como catalisadores para uma variedade de reações químicas. Por exemplo, o molibdato de bismuto (Bi_2MoO_6) é um catalisador eficiente para a oxidação seletiva de propileno a acroleína, uma reação importante na indústria química (BELL, 2022).

Por outro lado, estudos que trazem materiais zeolíticos possuindo átomos de bismuto em sua estrutura são escassos. Até os dias recentes, apenas um estudo se encontra na literatura abordando a síntese de um material cristalino de fato de bismuto. O estudo conduzido por (ZANARDI et al., 2006) relatou com sucesso a nova síntese sob condições hidrotérmicas de dois silicatos microporosos de bismuto caracterizados por diferentes refinamentos de estrutura cristalina, fazendo uso do agente direcionador de estrutura o TMAOH, mostrados na Figura 10. Os autores identificaram que a estrutura cristalina do primeiro silicato microporoso de bismuto denominada de EMS-4 está relacionada a um polimorfo monoclinico da tobermorita 11 Å, um mineral de silicato de cálcio de ocorrência natural cuja estrutura cristalina está bem estabelecida na literatura (MERLINO; BONACCORSI; ARMBRUSTER, 2001), a caracterização ocorreu em

forma de agulhas com dimensões de 20 μm , feito também uma correlação com a estrutura do material AV-20 – onde o heteroátomo presente na estrutura é o Európio (Eu) – tendo a mesma célula unitária, porém, com o bismuto ocupando o lugar do lantanídeo. O segundo silicato sintetizado neste trabalho foi o EMS-5, que, após seu refinamento estrutural, observou-se ter uma estrutura semelhante a um clatrato com dimensões aproximadas de 4,0 x 4,2 x 2,2 Å na forma de folhas tetraédricas e octaédricas, podendo estar relacionado ao germânio de bismuto ($\text{Bi}_2\text{Ge}_3\text{O}_9$) (GRABMAIER; HAUSSÜHL; KLÜFERS, 1979).

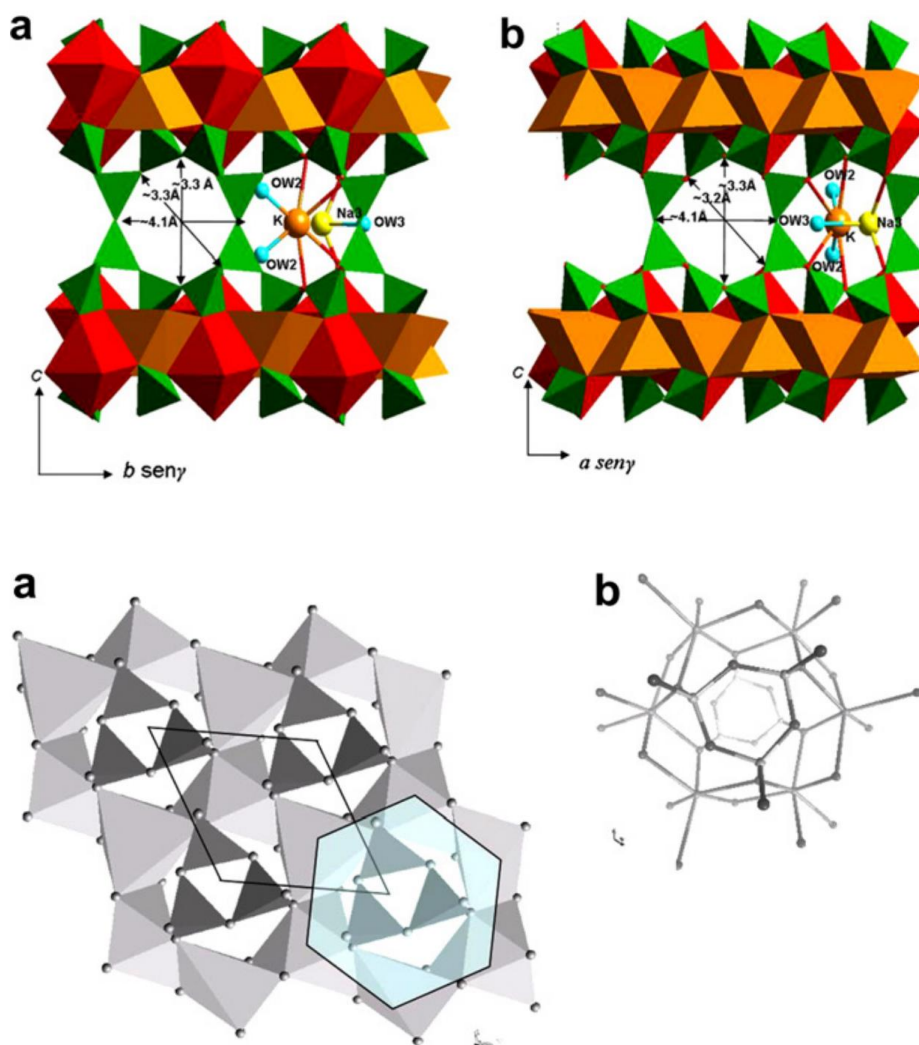


Figura 10 Representação computacional das estruturas cristalinas. Na parte de cima: Estruturas poliédricas do EMS-4 vistas ao longo das direções [1 0 0] **(a)** e [0 1 0] **(b)**. Poliedros: vermelho (BiO_7), laranja (Na/BiO_6), verde (SiO_4). Na parte de baixo: **(a)** Representação poliédrica do EMS-5 vista ao longo da direção (0 0 1). O hexágono evidencia a pequena gaiola que caracteriza a estrutura do EMS-5 e esboçada como representação de bastão e bola em **(b)**. **Fonte:** Adaptado (ZANARDI et al., 2006).

Outra estratégia adotada na literatura é a síntese de estruturas cristalinas já conhecidas, e após a síntese, por métodos físicos – adsorção ou por aplicação de pressão – os autores fazem com que o bismuto seja embutido na estrutura previamente formada. As zeólitas utilizadas para esse processo foram a zeólita 1 (ZHAO et al., 2019a), Y (SUN et al., 2012a) e SBA-15 (YANG et al., 2015).

2.4. Enzimas Lacase

As enzimas são proteínas especializadas que atuam como catalisadores em várias reações bioquímicas. Elas facilitam e aceleram esses processos sem serem consumidas na reação. Cada enzima é específica para um substrato particular, ligando-se a ele e convertendo-o em um produto através de um sítio ativo único. Essa especificidade e eficiência tornam as enzimas cruciais para numerosos processos fisiológicos, incluindo digestão, metabolismo, replicação do DNA e respiração celular (PANDEY et al., 2006).

As enzimas reduzem a energia de ativação necessária para as reações, permitindo que as atividades bioquímicas complexas necessárias para a vida ocorram a temperaturas compatíveis com a sobrevivência do organismo. Sua atividade pode ser influenciada ou destruída por vários fatores, podendo se destacar a temperatura, pH e a presença de inibidores ou ativadores, destacando seu papel dinâmico na manutenção dos sistemas vivos (PANDEY et al., 2006).

As enzimas lacases são enzimas benzenodiol:oxigênio oxidoredutases EC 1.10.3.2 que são uma das mais antigas e presentes na natureza, foi primeiramente descoberta da extração da árvore laca-japonesa *Rhus vernicifera* e posteriormente introduzida como uma enzima fúngica (REINHAMMAR, 2018; WILLIAMSON, 1994) porém também podendo ser extraídas de insetos, plantas e bactérias. Essas enzimas são conhecidas por possuírem quatro átomos de cobre presente em sua estrutura proteica,

sendo um átomo de cobre T1 – chamado de cobre azul devido a absorção máxima em 600 nm e responsável pela oxidação do substrato, reduzindo oxigênio molecular a água – e um cluster tri nuclear com um átomo T2 (centro de cobre normal) e dois átomos T3 (DESAI; NITYANAND, 2011; RIVA, 2006a). Os átomos de cobre T2 agem como aceptores dos elétrons para a reação de catálise possa ocorrer e baixa absorção na faixa do visível e por fim, os átomos T3 são fortemente acoplados entre eles, participando das reações comoceptor de um par de elétrons (GABDULKHAKOV et al., 2019). A lacase de *M. thermophila*, cuja sua estrutura está representada na Figura 11 é composta por um único polipeptídeo, contendo três pontes dissulfeto internas e quatro átomos de cobre. Tanto a sequência de nucleotídeos do gene da lacase quanto a sequência de aminoácidos da enzima já foram identificadas. A massa molecular da lacase é de 85 kDa, e a enzima permanece ativa em temperaturas de até 70°C (CHAN et al., 2021).

A atividade da lacase é avaliada utilizando siringaldazina como substrato. Na presença de oxigênio atmosférico, a siringaldazina é oxidada, formando tetrametoxi-azobis(metileno) quinona, cuja absorção é medida por espectrofotometria UV-vis a 530 nm. A atividade da lacase é expressa em Unidades de Lacase *Myceliophthora* (LAMU), onde uma LAMU corresponde à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 micromol de siringaldazina por minuto, sob condições padrão (pH 7,5; 30°C) (CHAN et al., 2021).

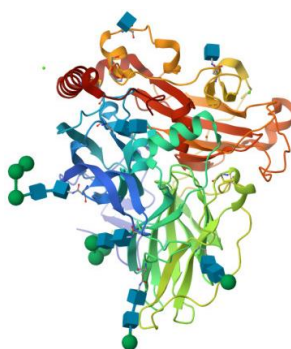


Figura 11 Estrutura cristalográfica da enzima lacase de *Myceliophthora thermophila*. **Fonte:** Adaptado (ERNST et al., 2018b).

As lacases são capazes de participar da oxidação de diversas moléculas orgânicas e inorgânicas, podendo ser ressaltado fenóis, aminas aromáticas, pesticidas, corantes, antibióticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e disruptores endócrinos, como mostrado na Figura 12. Além disso, essa enzima é altamente adequada para uma ampla gama de aplicações comerciais, incluindo celulose e papel, têxteis, biorremediação, processamento de alimentos, produtos farmacêuticos, branqueamento biológico de corantes sintéticos e biodegradação de xenobióticos. A produção de lacase para várias aplicações varia dependendo da especificidade do substrato, características moleculares, diversidade microbiana, teor de umidade, temperatura, pH, propriedades físico-químicas, disponibilidade de nutrientes e o efeito da toxicidade de contaminantes emergentes, devido à sua notável estabilidade (JANUSZ et al., 2020; JEYABALAN et al., 2023; KHATAMI et al., 2022; MAHURI; PAUL; THATOI, 2023).



Figura 12 Aplicações de enzimas lacase em oxidação de poluentes. **Fonte:** Adaptado (MAHURI; PAUL; THATOI, 2023).

Embora as enzimas lacase tenham como substratos específicos os compostos fenólicos, o uso dessa enzima em diferentes substratos é possível quando se emprega os radicais mediadores. Esse grupo de enzimas exibe diferentes potenciais redox dependendo da fonte produtora, potenciais estes que variam de 430 a 790 mV em comparação com o eletrodo normal de hidrogênio (ENH). Em geral a oxidação de composto não fenólico é impedida devido ao seu alto potencial redox, no entanto, quando utilizadas na presença de radicais mediadores, por exemplo, 1-hidroxibenzotriazol (HBT), 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil (TEMPO) ou 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), as enzimas lacase se tornam capazes de oxidar compostos não fenólicos devido a um aumento considerável em sua reatividade, este método é conhecido como sistema lacase-mediador (CORIA-ORIUNDO; BATTAGLINI; WIRTH, 2021; CRESTINI; JURASEK; ARGYROPOULOS, 2003; FABBRINI et al., 2001; FABBRINI; GALLI; GENTILI, 2002; GU et al., 2021; PARK et al., 2021).

A família de mediadores TEMPO (radicais N-oxil estáveis) foram aplicadas com sucesso na oxidação de álcoois na presença de lacase, e foi observado que a oxidação é dependente da presença da enzima, e não somente da interação entre substrato e o radical N-oxil (R-N-O[•]). Foi sugerido que a forma ativa do TEMPO é o íon amônio resultante da oxidação, e este íon seria responsável pela oxidação dos álcoois a aldeídos sem a necessidade de transferência eletrônica. A enzima regeneraria TEMPO da forma hidroxilamina, assim, o íon amônio seria recuperado tanto pela oxirredução do TEMPO, ou através de oxidação pela lacase. Como as lacases são reoxidadas por oxigênio, estes processos representam um sistema “limpo” de oxidação de substratos por ar, catalisado pelo sistema lacase-mediador (CORIA-ORIUNDO; BATTAGLINI; WIRTH, 2021;

CRESTINI; JURASEK; ARGYROPOULOS, 2003; FABBRINI et al., 2001; FABBRINI; GALLI; GENTILI, 2002; GU et al., 2021; PARK et al., 2021).

2.5. Imobilização Enzimática

A imobilização enzimática é uma técnica amplamente utilizada na biotecnologia e na engenharia de processos para fixar enzimas em suportes sólidos, mantendo sua atividade catalítica enquanto facilita a separação e reutilização do biocatalisador. Este método oferece várias vantagens em comparação com a utilização de enzimas livres, como a possibilidade de uso contínuo em reatores, maior estabilidade térmica e operacional, e a redução dos custos associados ao processo enzimático que costumam ser bem altos. A imobilização pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo adsorção física, ligação covalente, encapsulamento e entrelaçamento, do inglês, cross-linked enzymes aggregates (CLEA) como mostrado na Figura 13. Cada método tem suas próprias características, vantagens e desvantagens, dependendo da natureza da enzima e do suporte utilizado (LIU et al., 2021; MAGHRABY et al., 2023; NGUYEN; KIM, 2017).

A adsorção física é um dos métodos mais simples e envolve a interação entre a enzima e o suporte através de forças não covalentes, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Embora este método seja o mais fácil de realizar e não exija reagentes químicos específicos, ele trás como desvantagens o fato de sofrer de problemas de lixiviação da enzima durante o uso. A ligação covalente, por outro lado, proporciona uma fixação mais estável, pois envolve a formação de ligações químicas entre grupos funcionais da enzima e do suporte. Em casos em que o suporte não apresente grupos funcionais disponíveis para a conexão com a enzima é possível utilizar técnicas de modulação da superfície do suporte inorgânico a fim de deixar disponíveis sítios de ligação para que a ligação covalente com a enzima aconteça. Nesta abordagem,

é necessário a utilização de aminosilanos para o preparo – comumente utilizados o APTMS (3-aminopropil trimetoxisilano) ou APTES (3-aminopropil trietoxisilano) – seguido com um tratamento utilizando um agente reticulante, onde na literatura, é imensamente utilizado o glutaraldeído (1,5-pentanodial) (IQHRAMMULLAH et al., 2023; MAHMOODI; SAFFAR-DASTGERDI, 2020a). Este método, no entanto, pode afetar a atividade da enzima se os sítios catalíticos forem modificados durante o processo de imobilização. O encapsulamento e/ou aprisionamento, envolve a inclusão da enzima em uma matriz polimérica ou em uma rede tridimensional, respectivamente, oferecendo proteção física à enzima, mas podendo limitar a difusão de substratos e produtos. Os CLEAs são agregados de enzimas que são formados através da ligação cruzada de proteínas, resultando em um material altamente estável e reutilizável. Esse método de imobilização de enzimas apresenta diversas vantagens, como resistência a mudanças de pH e temperatura, além de facilitar a separação da enzima do meio reacional (LIU et al., 2021; MAGHRABY et al., 2023; NGUYEN; KIM, 2017).

As zeólitas se apresentam como suportes altamente eficazes para a imobilização enzimática, graças às suas propriedades físico-químicas vantajosas, incluindo a possibilidade de modulação da superfície, características hidrofílicas/hidrofóbicas, comportamento ácido/base, durabilidade mecânica e química, além de morfologia e estrutura de poros adequadas. Algumas zeólitas possuem poros pequenos, o que restringe a entrada de enzimas ou moléculas orgânicas maiores em suas cavidades internas – as enzimas podem variar de tamanho de 20 a 160.000 kDa (ERICKSON, 2009) – porém, é possível a “engenharia de poros” fazendo com que a estrutura cristalográfica possua diferentes tamanhos de poros, concomitantemente ou isolados (MAHMOODI; SAFFAR-DASTGERDI; HAYATI, 2020; MITCHELL; PÉREZ-RAMÍREZ, 2011; SOLDATKINA et al., 2019; ZHAO et al., 2024).

Por causa disso, os avanços no estudo sobre imobilização enzimática têm permitido a aplicação destes biocatalisadores em uma ampla gama de processos industriais, incluindo a síntese de produtos químicos finos (MAGHRABY et al., 2023), a produção de biocombustíveis (SHAMSUDIN; TAN; TSUJI, 2021), a bioconversão de resíduos (CHAVAN et al., 2022) e o tratamento de efluentes (AL-MAQDI et al., 2021; ZDARTA et al., 2021). A escolha do método de imobilização e do suporte é extremamente importante para otimizar a performance catalítica e a viabilidade econômica do processo.

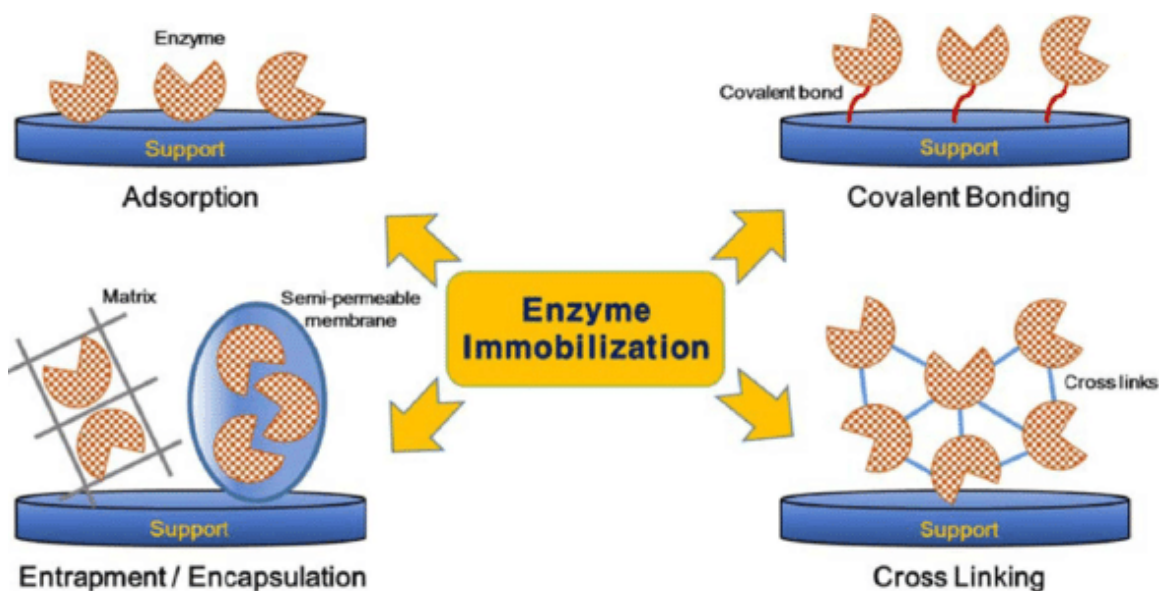


Figura 13 Técnicas utilizadas para a imobilização de enzimas. **Fonte:** Adaptado (NGUYEN; KIM, 2017)

2.6. Remediação Ambiental

A poluição ambiental é um dos problemas mais graves enfrentados pelo planeta hoje. Ela resulta da liberação de substâncias nocivas no ar, água e solo, provenientes principalmente de atividades humanas como a queima de combustíveis fósseis, a indústria, a agricultura intensiva e a gestão inadequada de resíduos. Esses poluentes afetam gravemente os ecossistemas, causando danos à flora e fauna, e comprometendo a saúde humana. A poluição do ar, por exemplo, está ligada a doenças respiratórias e

cardiovasculares, enquanto a contaminação da água pode levar a surtos de doenças transmitidas por água contaminada e comprometimento da vida aquática (FULLER et al., 2022).

A remediação ambiental surge como uma alternativa ao combate à poluição e degradação dos ecossistemas. A remediação ambiental com o uso de enzimas emerge como uma abordagem promissora, oferecendo alternativas eficazes e sustentáveis para a degradação de poluentes. As enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações químicas específicas, oferecendo vantagens significativas em processos de remediação ambiental. Elas são capazes de atuar em condições ambientais suaves, como temperatura e pH próximos aos encontrados na natureza, o que minimiza impactos adversos ao ecossistema. Além disso, as enzimas são específicas em sua ação, reduzindo a formação de subprodutos indesejados. Diversas enzimas têm sido investigadas e aplicadas na remediação ambiental, entre as quais se destacam as oxido redutases, utilizadas neste trabalho. As oxido redutases, como peroxidases e lacases, são especialmente eficazes na degradação de compostos orgânicos complexos, incluindo pesticidas, corantes e produtos farmacêuticos.

A aplicação de enzimas na remediação ambiental tem sido demonstrada em vários estudos, por exemplo, a utilização de peroxidases para a degradação de fenóis em águas residuais industriais mostrou-se altamente eficaz, com remoção superior a 90% dos contaminantes. Em solos contaminados por hidrocarbonetos, enzimas como as lipases têm sido usadas para acelerar a biorremediação, reduzindo significativamente os níveis de poluição em tempos mais curtos comparados aos métodos tradicionais. Apesar dos avanços, a implementação de enzimas na remediação ambiental enfrenta desafios significativos. A estabilidade das enzimas em condições ambientais variadas, a produção em larga escala e os custos associados são algumas das barreiras a serem superadas. No

entanto, a engenharia genética e a biotecnologia oferecem ferramentas promissoras para o desenvolvimento de enzimas mais robustas e economicamente viáveis. Além disso, a integração de enzimas em sistemas de tratamento híbridos, combinando métodos físicos, químicos e biológicos, pode potencializar a eficácia dos processos de remediação.

A legislação brasileira referente aos corantes utilizados na indústria têxtil é regida por normas que visam garantir a segurança ambiental e a saúde pública. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Conselho Nacional do Meio Ambiente são os principais órgãos responsáveis pela regulamentação e fiscalização desses produtos. A Resolução CONAMA nº 357/2005, mostrado na Tabela 1, estabelece os critérios e padrões de lançamento de efluentes contendo corantes, estipulando limites específicos para a concentração de substâncias químicas nos corpos d'água, visando a proteção da qualidade ambiental (CONAMA, 2005).

Tabela 1 Valores permitidos para a manutenção da qualidade do padrão de águas doces perante a liberação de poluentes. **Fonte:** Adaptado (CONAMA, 2005).

TABELA II - CLASSE 1 - ÁGUAS DOCES	
PADRÕES PARA CORPOS DE ÁGUA ONDE HAJA PESCA OU CULTIVO DE ORGANISMOS PARA FINS DE CONSUMO INTENSIVO	
PARÂMETROS INORGÂNICOS	Valor máximo
Arsênio total	0,14 µg/L As
PARÂMETROS ORGÂNICOS	Valor máximo
Benzidina	0,0002 µg/L
Benzo (a) antraceno	0,018 µg/L
Benzo (a) pireno	0,018 µg/L
Benzo(b) fluoranteno	0,018 µg/L
Benzo (k) fluoranteno	0,018 µg/L
Criseno	0,018 µg/L
Dibenzo (a,h) antraceno	0,018 µg/L
3,3-Diclorobenzidina	0,028 µg/L
Heptacloro epóxido + Heptacloro	0,000039 µg/L
Hexaclorobenzeno	0,00029 µg/L
Indeno (1,2,3-cd) pireno	0,018 µg/L
PCBs - Bifenilas policloradas	0,000064 µg/L
Pentaclorofenol	3,0 µg/L
Tetracloro de carbono	1,6 µg/L
Tetracloroetano	3,3 µg/L
Toxafeno	0,00028 µg/L
2,4,6-triclorofenol	2,4 µg/L
* Benzo (a) antraceno	0,05 µg/L

* em águas doces gerais

A legislação brasileira que regula a geração de poluentes na indústria farmacêutica, incluindo a produção de Ibuprofeno, é robusta e visa minimizar os impactos ambientais decorrentes das atividades industriais. A Lei nº 6.938/1981, que institui a Política Nacional do Meio Ambiente, estabelece diretrizes gerais para a proteção e melhoria da qualidade ambiental no Brasil, aplicáveis a todos os setores industriais. A Lei de Nº 12.305/2010, conhecida como Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS) define os critérios e padrões de lançamento de efluentes líquidos industriais nos corpos d'água, com limites específicos para contaminantes químicos e orgânicos, acolhendo quatro resoluções do CONAMA (Lei nº 9.974/2000 – que trata do destino final de resíduos e embalagens de agrotóxicos; Resolução Conama nº 362/2005 – sobre o recolhimento, coleta, e destinação final de óleo lubrificante usado ou contaminado; Resolução Conama nº 401/2008 – que estabelece os limites máximos de chumbo, cádmio e mercúrio para pilhas e baterias comercializadas no território nacional e os critérios e padrões para o seu gerenciamento ambientalmente adequado, que substituiu a Resolução nº 257/1999; Resolução Conama nº 416/2009 – que dispõe sobre a prevenção à degradação ambiental causada por pneus inservíveis e sua destinação ambientalmente adequada, que substituiu as Resoluções nº 258/ 1999 e nº 301/2002).

Essas normas exigem que as indústrias farmacêuticas adotem tecnologias de tratamento de efluentes que garantam a remoção eficaz de resíduos farmacêuticos, incluindo substâncias ativas e excipientes, antes do descarte. Porém, ainda se apresenta como um problema a ser combatido, além da constante necessidade de processos cada vez mais atualizados se adequando as necessidades industriais e do meio ambiente.

3. Justificativa da pesquisa

A crescente demanda por materiais avançados para aplicações ambientais tem impulsionado a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com propriedades únicas e eficientes. O bismuto silicato é um desses materiais que, apesar de seu potencial promissor, ainda é pouco explorado na literatura científica dos últimos anos. A lacuna existente no conhecimento sobre a síntese e aplicação deste material oferece uma oportunidade significativa para a inovação e avanço científico.

Os materiais inorgânicos, como o bismuto silicato, possuem características desejáveis como a sua estabilidade química, resistência térmica e capacidade de formar estruturas porosas. As enzimas surgem como uma alternativa sustentável de remediação, devido sua alta eficiência catalítica, porém, apresentam algumas desvantagens destacáveis, por exemplo, o alto custo e a dificuldade de recuperação após a utilização. Tendo em vista essas dificuldades, a imobilização de enzimas em suportes sólidos se apresenta como uma técnica que pode aumentar a eficiência catalítica, facilitar a recuperação e reutilização das enzimas, além de melhorar a resistência a condições adversas, como variações de pH e temperatura.

Por causa disso, foram empregadas neste trabalho as enzimas lacase. As lacases são enzimas capazes de realizar reações oxidativas que desempenham um papel decisivo na degradação de uma ampla variedade de compostos orgânicos, incluindo poluentes ambientais como corantes industriais e medicamentos. Neste contexto, a síntese de bismuto silicato como suporte para a imobilização de lacases representa uma abordagem inovadora que pode preencher uma lacuna significativa na literatura. A caracterização detalhada deste material e a avaliação de sua eficácia na degradação de corante e

Ibuprofeno contribui de forma importante sobre suas propriedades e potencial de aplicação.

Além disso, a escolha do Ibuprofeno e o corante Acid Blue 277 como poluentes modelos é particularmente relevante, dado o seu amplo uso mundial e persistência ambiental. A presença de fármacos em corpos d'água representa um desafio crescente para a saúde pública e o meio ambiente, e a degradação eficaz desses compostos é uma necessidade urgente.

Portanto, esta pesquisa visa não apenas contribuir para o avanço do conhecimento científico sobre a síntese de um novo material, e sua caracterização, mas também oferecer soluções práticas e eficientes para problemas ambientais contemporâneos.

4. Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como principais objetivos: sintetizar e caracterizar zeólitos hierarquicamente estruturados de topologias e estruturas cristalográficas diferentes e contendo cátions de Bismuto em suas estruturas; estudar parâmetros físico-químicos dos materiais; estudar o uso dessas matrizes para imobilização de lacases derivadas de *Myceliophthora thermophila* expressas em *Aspergillus sp.*, como também, avaliar a atividade catalítica da zeólita pura, da enzima livre e do complexo zeólita/enzima.

4.1. Objetivos Específicos

- Síntese dos materiais OPT hierarquicamente estruturados tendo como cátion substituído de Al^{+3} por Bi^{+3} ;
- Caracterização físico-química empregando as seguintes técnicas: Difração de Raios-X (DRX), análise de adsorção de nitrogênio (BET- N_2), microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (MEV e MET), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DSC), ressonância magnética nuclear no estado sólido com rotação em torno do ângulo mágico (do inglês, MAS-NMR ^1H , ^{13}C e ^{29}Si), absorção de Raio-X próximo a estrutura da borda (XANES) utilizando Luz Sincrotron e espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES);
- Funcionalização dos materiais hierarquicamente estruturados com uso de agentes espaçadores (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) e

glutaraldeído (GA) para posterior utilização destes na imobilização de lacases via ligação covalente;

- Imobilização das lacases comerciais de *Aspergillus sp.* sobre os novos suportes zeolíticos funcionalizados;
- Quantificação da quantidade de proteína ligada no suporte zeolítico pela técnica de absorção molecular na região UV/vis em 420 nm utilizando como molécula indicadora o ácido (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) (ABTS);
- Avaliação da atividade enzimática dos complexos pela oxidação do ABTS;
- Aplicação dos biocatalisadores selecionados para a remediação do corante Acid Blue 277 e Ibuprofeno, bem como analisar os possíveis metabólitos formados.

5. Materiais e Métodos

5.1. Síntese Hidrotermal de Bismuto Silicato (BS)

As etapas da síntese sol-gel mais representativa explorada neste trabalho estão resumidas na Figura 14. A síntese típica descrita se faz uso de Ludox-HS 30 (SiO_2 , 30% em massa, Sigma-Aldrich – EUA) como fonte de sílica coloidal e hidróxido de sódio pellets (NaOH , 97% em massa, Sigma-Aldrich – EUA) como única fonte de ânion hidroxila. Nitrato de bismuto (III) pentahidratado ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), 98% em massa, Sigma-Aldrich – EUA) como única fonte de cátions de bismuto, brometo de tetrapropilamônio (TPA Br, $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_4\text{N}(\text{Br})$, 98% em massa, Sigma-Aldrich – EUA) e solução de cloreto de poli(alil dimetil amônio) (PDADMAC $(\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NCl})_n$, 20% em massa em H_2O) como agentes direcionadores de estrutura (ADS, ou, do inglês, SDA).

Observação: Foi necessária a retirada da quantidade de cada reagente utilizado devido a processos patentários.

O procedimento de síntese consista na adição de X g de nitrato de bismuto (III) pentahidratado em uma solução aquosa de brometo de tetrapropilamônio (X g) ou X g de cloreto de poli(alil dimetil amônio) – mantendo a relação Si/SDA fixo em 0,2 – ou em uma solução na ausência de agente direcionador de estrutura. Em seguida, X g de sílica coloidal (Ludox HS-30) e X g de hidróxido de sódio são adicionados.

Após a adição de todos os reagentes, o gel resultante é mantido sob agitação magnética constante (850 rpm) por um período de 1 hora, tendo seu pH medido após o período. O efeito do envelhecimento estático do gel também foi abordado neste trabalho, variando até o máximo de 72 horas, variando em alíquotas (0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas), tendo seu pH medido após o período novamente.

O gel resultante foi transferido para um reator (Parr 4748) e levado a estufa (modelo 315 SE, FANEM, Brasil) a 200 °C sob pressão autogerada, onde permaneceu por 7 dias. O sólido foi filtrado a vácuo à temperatura ambiente, utilizando água deionizada e acetona (reagente ACS) para lavar o sólido três vezes com a intenção da remoção de reagentes excedentes. Finalmente, o sólido foi obtido e a água-mãe armazenada à temperatura ambiente.

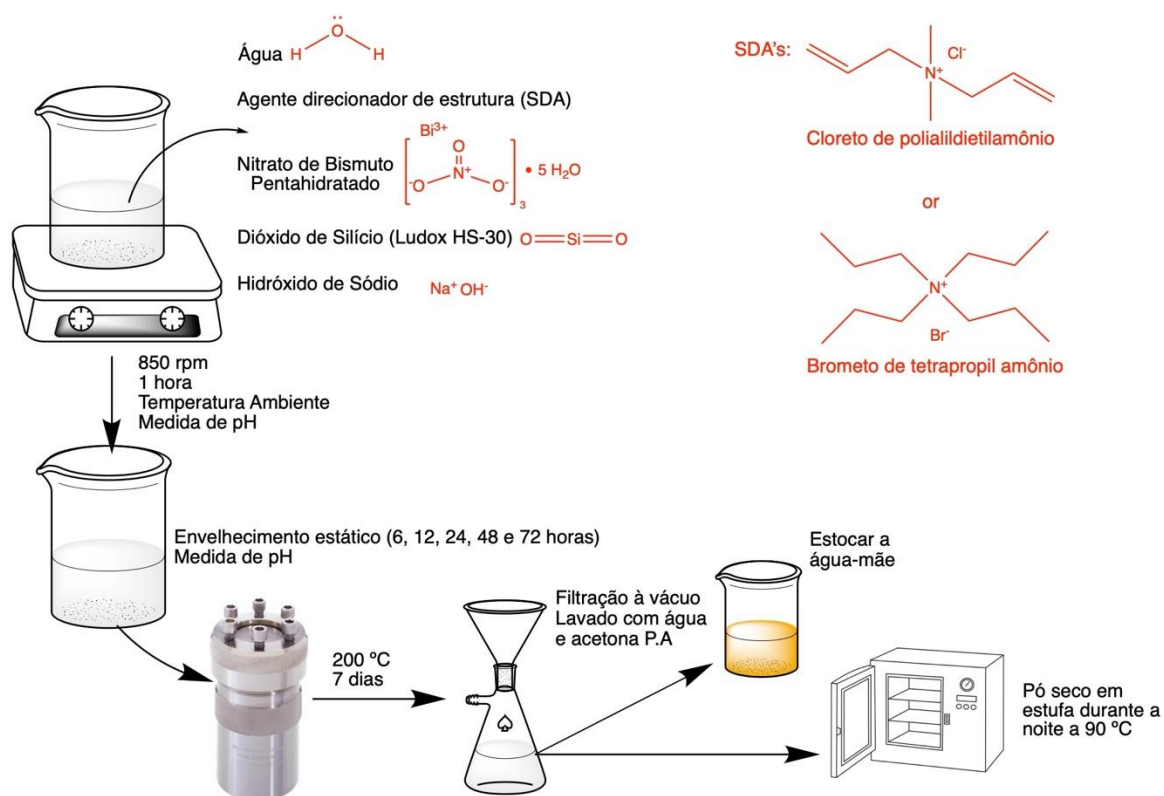


Figura 14 Ilustração esquemática da síntese de BS. **Fonte:** Autoria Própria.

5.2. Extração do Agente Direcionador de Estrutura (SDA)

A extração de SDA é um processo muito utilizado na ciência dos materiais para remover os templates orgânicos utilizados em sínteses. Esses templates orgânicos são geralmente usados no processo de síntese para orientar a formação da estrutura cristalina desejada e a morfologia dos poros do material. No entanto, eles também podem prejudicar o desempenho e as propriedades do material em diversas aplicações, como catálise,

adsorção e separação. A calcinação e a extração via Soxhlet, são dois métodos mais consolidados na literatura e que foram utilizados neste trabalho, sendo exemplificados na Figura 15.

O processo de calcinação foi realizado em um forno mufla a três diferentes temperaturas (450, 550 e 750 °C). O pó de BS seco (aproximadamente 1 g) foi colocado em um cadinho de cerâmica e aquecido a uma taxa de 10 °C/min até atingir a temperatura desejada. A amostra foi mantida nas temperaturas citadas acima por 8 horas antes de ser resfriada até temperatura ambiente.

A extração via Soxhlet, alternativamente, envolve a utilização de um solvente, ou uma combinação de solventes – usualmente orgânicos – para dissolver e remover os templates orgânicos do material (HAWTHORNE et al., 2000). Neste trabalho, foi feita uma mistura de dois solventes no processo: 90% diclorometano e 10% de etanol a 90 °C sob refluxo e com agitação a 850 rpm.

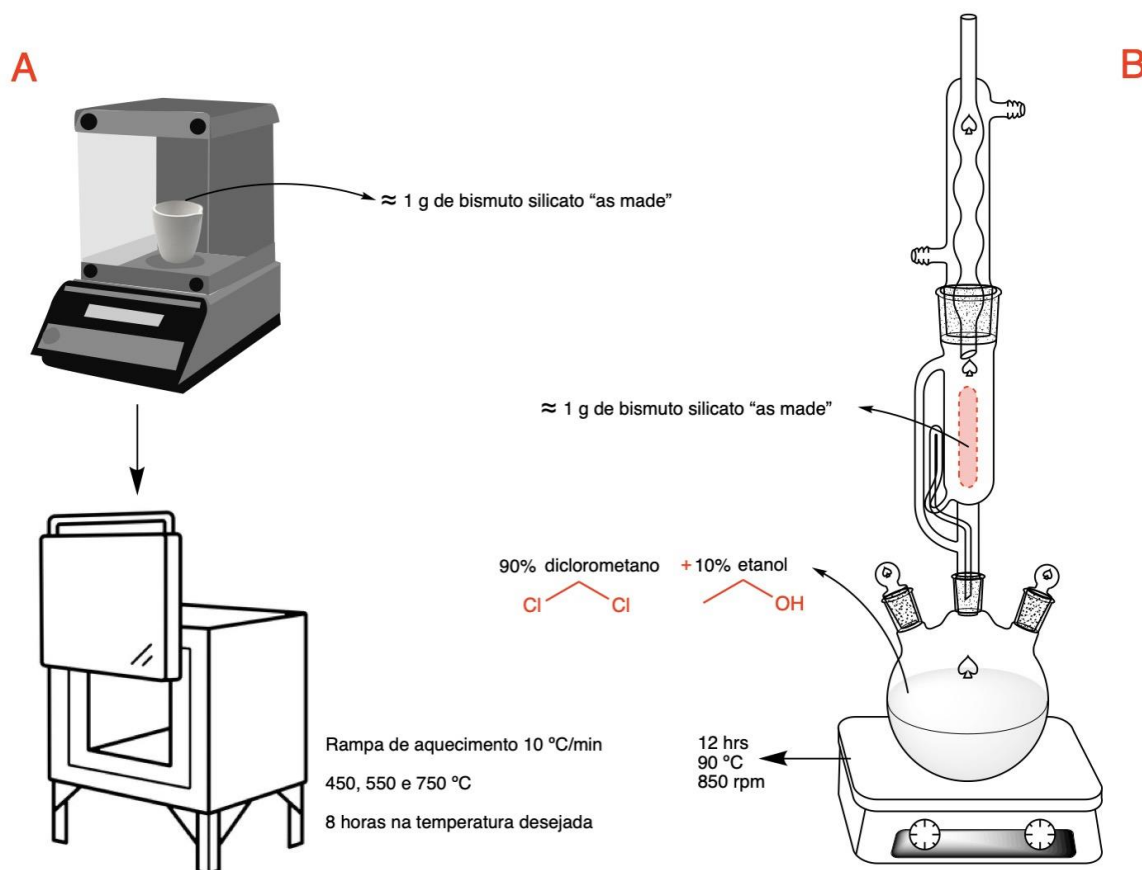


Figura 15 Esquema ilustrativo dos métodos de remoção do SDA empregados neste trabalho. (a) Extração via rota térmica - calcinação (b) Extração via Soxhlet. **Fonte:** Autoria Própria.

5.3. Caracterização Físico-Química

Os materiais preparados na seção anterior foram caracterizados por difração de Raio-X em pó (DRX), análise de adsorção de N_2 (BET), análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura e transmissão (MEV e MET) espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), ressonância magnética nuclear no estado sólido com rotação em torno do ângulo mágico (RMN ou do inglês, MAS-NMR ^1H , ^{13}C e ^{29}Si), absorção de Raio-X próximo a estrutura da borda (XANES) utilizando Luz Síncrotron e espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES).

As análises de DRX foram realizadas utilizando um difratômetro Rigaku Miniflex II operando a 30 kV e 15 mA , com um filtro de níquel e radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5418\text{ \AA}$)

em 40 kV e 15 mA. Os padrões de difração foram obtidos na faixa de 2θ de 3° a 50° , em uma taxa de varredura de 2° min^{-1} .

Os espectros de FT-IR foram obtidos usando um espectrômetro Shimadzu IRTracer-100, na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e média de 64 varreduras. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr contendo cerca de 10% em massa do material de teste.

A análise química elementar quantitativa para Si, Na e Bi das composições dos materiais foi realizada utilizando espectroscopia de emissão óptica no Centro de Análise da Universidade de São Paulo (USP-SP) utilizando um ICP-OES Radial (Spectro, Arcos). A digestão das amostras foi realizada usando uma mistura de ácido fluorídrico com uma solução de ácido bórico a 4% na proporção de 1:12, com aquecimento em bloco digestor a 100°C em frascos selados.

As análises térmicas do material foram realizadas no centro analítico do Instituto de Química (Universidade de São Paulo, São Paulo). Foi utilizado o equipamento TGA Q500 (V20.13 Build 39, TA Instruments – New Castle), conduzido em uma rampa de aquecimento de 10°C/min de 25 a 900°C em atmosfera de N_2 (40 mL min^{-1}) e uma etapa isotérmica (900°C) de 60 min em atmosfera de ar sintético (60 mL min^{-1}). O equipamento foi calibrado usando um padrão analítico de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich). Foi utilizado um cadinho de platina (Pt) contendo 15 mg da amostra.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram registradas utilizando os instrumentos FEI Magellan 400 L e Philips XL-30 FEG, ambos acoplados a analisadores de raios X por energia dispersiva (EDS) e operados com tensões de feixe de elétrons ajustáveis de 5 a 25 kV. Antes das análises, um revestimento fino de ouro foi depositado nas amostras. Imagens de MET foram obtidas pelo FEI Tecnai G2F20.

Imagens de HRTEM e os mapas correspondentes de EDX foram coletados pelo FEI Tecnai G2F20 equipado com um espectrômetro de raios X por energia dispersiva (EDX) SUTW (janela super ultrafina). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos (LCE/DEMa/UFSCar).

Espectros de RMN de estado sólido de ^{29}Si com rotação em ângulo mágico (MAS) (ENGELHARDT; KOLLER, 1994) foram obtidos no Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, usando um espectrômetro Bruker(R) AVANCE operando a um campo estático de 9,4 T. O instrumento estava equipado com uma sonda de dupla ressonância de 7 mm, design Jackobsen, com um sistema pneumático de rotação de amostras, proporcionando estabilidade de frequência maior que 2 Hz. Experimentos de excitação por pulso único sob MAS (^{29}Si SPEMAS) foram realizados a uma frequência de MAS de 6 kHz, usando um intervalo de reciclagem de 20 s para obter espectros de ^{29}Si mais quantitativos. Experimentos de polarização cruzada ^1H - ^{29}Si (^1H - ^{29}Si CPMAS) foram realizados utilizando uma rampa de potência (80-100%) no canal de radiofrequência de ^1H , frequência de MAS de 6 kHz e intervalo de reciclagem de 5 s. Em ambos os experimentos CPMAS e SPEMAS, o desacoplamento de ^1H foi realizado usando uma sequência de pulsos SPINAL-64 a um campo de 60 kHz durante 15 ms de tempo de aquisição. Rotores de zircônia foram utilizados em todos os experimentos e a ausência de sinais de fundo foi verificada medindo rotores vazios. Os deslocamentos químicos de ^{29}Si foram calibrados usando caulinita como referência externa.

Experimentos adicionais de RMN MAS ^{13}C foram realizados no Instituto Federal Alemão de Pesquisa e Teste de Materiais (BAM) em Berlim, utilizando um espectrômetro Bruker(R) AVANCE sob um campo estático de 14 T. Para as medições de ^{13}C , a amostra foi embalada em um rotor de zircônia de 2,5 mm e girada a 25 kHz ao longo do ângulo mágico (MAS) em uma sonda de ressonância dupla de amplo diâmetro à temperatura

ambiente. A polarização cruzada foi aplicada com tempos de contato de 9 ms e a potência do canal de ^1H foi ajustada em rampa. Durante um tempo típico de aquisição de cerca de 10 ms, o desacoplamento de ^1H foi realizado usando a sequência spinal64. Experimentos muito longos, com acumulações entre 16k e 64k varreduras, foram realizados para superar a baixa sensibilidade observada para essas amostras. Sob o mesmo hardware, medições de ^1H foram realizadas aplicando o programa de pulso EASY proposto por Jaeger e Hermann (JAEGER; HEMMANN, 2014) para a remoção de sinais de fundo. Aplicamos dois pulsos de 90° com um pequeno intervalo entre eles. Subtraindo o FID após cada um desses pulsos, o sinal de fundo foi efetivamente cancelado. Para as medições de ^{29}Si , a amostra foi embalada em rotores de zircônia de 4 mm e girada a 15 kHz ao longo do ângulo mágico (MAS) em uma sonda de ressonância dupla de amplo diâmetro à temperatura ambiente. A polarização cruzada foi aplicada com parâmetros semelhantes aos relatados para os núcleos de ^{13}C . Novamente, foram necessárias acumulações mais longas para alcançar a relação sinal-ruído desejada.

Para diferenciar entre várias espécies de bismuto (Bi), foram realizadas medições de absorção de Raios-X próximo à estrutura da borda (XANES) na BAMline, parte da instalação BESSY II no Helmholtz-Zentrum Berlin, Alemanha (RIESEMEIER et al., 2005). Esta análise focou na borda de absorção Bi-L3, localizada a uma energia de 13,418 keV. Para essas medições, a faixa de varredura começou em uma energia mínima de 13,22 keV, utilizando um tamanho de passo de 10 eV abaixo da borda e 0,5 eV na região da borda. O limite máximo de energia foi definido pela presença de bromo (Br) na amostra, especificamente na borda K do Br a 13,474 keV. O Monocromador de Cristal Duplo de Silício (Si) 111 foi empregado para esses procedimentos, proporcionando uma alta resolução de energia de $\Delta E/E = 1,37 \cdot 10^{-4}$, essencial para medições precisas de XANES na faixa de energia de 4 a 15 keV. Devido à alta energia relativa da borda de Bi

examinada, não foi necessário suprimir os harmônicos. O tamanho do feixe foi ajustado para 1 mm horizontalmente e 0,5 mm verticalmente. As medições foram realizadas em condições de ar ambiente no modo de fluorescência com uma exposição de 2 segundos por ponto de dados. O detector utilizado foi o Detector de Deriva de Silício (SDD) de 4 canais LLA. Este detector é particularmente avançado, consistindo em quatro módulos, cada um com uma área de 30 mm², dispostos em uma geometria de retro espalhamento. A combinação de sua geometria eficaz e eletrônica de leitura moderna permite processar até 8 milhões de contagens por segundo. Uma descrição detalhada de todos os componentes da linha de feixe pode ser encontrada em (GUILHERME BUZANICH et al., 2023).

As amostras foram posicionadas com precisão usando um estágio de motor Micos de três eixos, garantindo uma precisão em níveis submicrométricos. Para calibração de energia, foi utilizada uma folha de bismuto (Bi) com espessura especificada de 5 micrômetros. A análise dos dados foi conduzida usando um software especializado desenvolvido internamente. A principal métrica para avaliação foi a taxa de contagem do pico $L\alpha_1$ a 10,836 keV. Esta taxa de contagem foi normalizada contra a corrente medida pela câmara de ionização para garantir resultados precisos e confiáveis. Cada uma das amostras, rotuladas como BS1 e BS2, passou por três medições separadas em diferentes locais. Essas medições repetidas não revelaram variações significativas (GUILHERME BUZANICH et al., 2023; RIESEMEIER et al., 2005).

5.4. Modulação da superfície do suporte

Glutaraldeído (solução 6% em massa) e (3-aminopropil)triethoxysilano (APTES) ($\geq 99\%$ em massa) foram utilizados para modificar e preparar a superfície da matriz inorgânica para imobilização da lacase. Lacase de *Aspergillus sp.* (Novozym 51003, atividade ≥ 1000 LAMU/g) e 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfônico) (ABTS) ($\geq$

98% em massa) foram usados para os ensaios de atividade enzimática. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Para modificar a superfície do suporte sólido, o agente de acoplamento silano APTES, foi utilizado seguindo a metodologia proposta por (WANG et al., 2018) para ativar a superfície do material para subsequente funcionalização com glutaraldeído. Este estudo selecionou o APTES, que possui uma extremidade amino, como agente de acoplamento para silanizar o material. O grupo silano foi incorporado empregando o método de refluxo de suspensão com APTES e álcool etílico (EtOH) $\geq 95\%$

Inicialmente, 500 mg de bismuto silicato (BS) foram colocados em 15 mL de EtOH, e 1 mL de APTES foi adicionado, permitindo que a mistura agitasse magneticamente a 180 rpm por 16 horas. O material silanizado (Si-BS) foi recuperado por centrifugação (10.000 rpm por 3 minutos) e lavado com EtOH três vezes para remover o APTES não reagido. Subsequentemente, o produto sólido foi seco em forno a 60 °C por 4 horas.

Após a silanização com APTES, o Si-BS foi introduzido em uma solução de glutaraldeído a 6,0% e agitado por 3 horas à temperatura ambiente e 180 rpm, conforme descrito por (WANG et al., 2018). Em seguida, foram realizadas três lavagens com água destilada para eliminar o excesso de glutaraldeído. Este processo resultou no BS funcionalizado, denominado Func-BS. A Figura 16 ilustra a rota de modulação empregada para formar uma ligação covalente entre o suporte e a enzima, resultando em Lac-BS (CARDOSO, 2009).

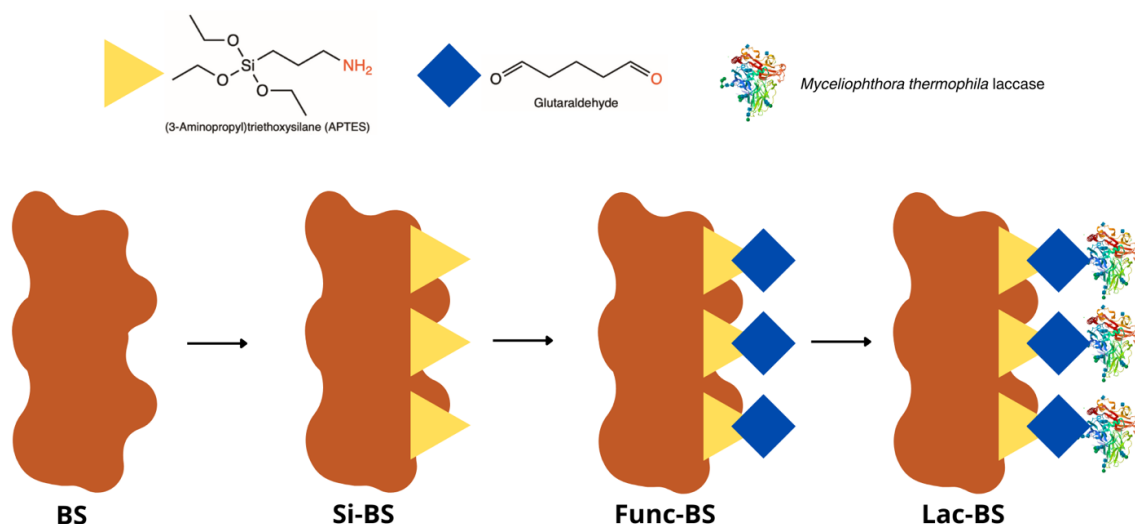


Figura 16 Esquema de imobilização da enzima lacase usando suporte de bismuto silicato (BS); Si-BS, BS silanizado; Func-BS, BS funcionalizado; e Lac-BS, lacase imobilizada em bismuto silicato. **Fonte:** Autoria Própria.

5.5. Delineamento Experimental

O experimento de delineamento experimental foi conduzido para determinar estatisticamente as condições ótimas de imobilização e aplicar essas condições em experimentos subsequentes.

Para o delineamento, dois fatores (variação de massa da matriz inorgânica e atividade da lacase livre) foram definidos estatisticamente, cada um com três níveis (três concentrações e três quantidades de massa), e os experimentos foram realizados em duplicata. Três valores de atividade (0,5 U/mL, 1 U/mL, 1,5 U/mL) foram escolhidos com base na atividade da solução enzimática inicial. Três valores para Func-BS usados na imobilização foram definidos em 15 mg, 20 mg e 25 mg.

O procedimento de imobilização no delineamento envolveu a adição da massa de Func-BS a 1 mL das concentrações de solução enzimática pré-definidas. A solução resultante foi agitada a 130 rpm por 1 hora. Após o período de incubação, a solução foi submetida a centrifugação (10.000 rpm) para coletar o sobrenadante, que foi usado para calcular o rendimento de imobilização (IY%) e separar o material imobilizado (Lac-BS).

5.6. Ensaios de determinação de atividade do biocatalisador

A oxidação do ABTS foi monitorada a um comprimento de onda constante de 420 nm usando um espectrofotômetro UV-M51 da BEL Engineering S.R.L. (Monza, MB, Itália). O método experimental foi adaptado de (HOU et al., 2004), envolvendo a adição de 100 µL da amostra a um tubo de ensaio contendo 1,7 mL de tampão de acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ a pH 5 e 200 µL de uma solução de ABTS 10 mmol L⁻¹. A mistura de reação foi incubada em banho-maria a 40 °C por 2 minutos. As medições de atividade foram realizadas em duplicata, e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol do substrato ABTS por minuto.

Os principais parâmetros da imobilização, rendimento de imobilização (IY%) e atividade recuperada (RA%), foram determinados de acordo com a Equação 1 e a Equação 2, respectivamente (MODKOVSKI et al., 2021).

Equação 2 Fórmula para o cálculo de rendimento de imobilização.

$$RI(\%) = \left(\frac{Ai - Af}{Ai} \right) \times 100$$

Equação 3 Fórmula para o cálculo de atividade recuperada.

$$AtR(\%) = \left(\frac{Ar}{Ai} \right) \times 100$$

onde "Ai" se refere à atividade enzimática fornecida para a imobilização (U), "Af" corresponde à atividade enzimática no sobrenadante após a imobilização (U); "Ar" representa a atividade das enzimas imobilizadas (U mg⁻¹).

5.7. Modelo de Bioinformática

Uma investigação bioinformática foi conduzida para compreender o fenômeno da lacase ativa após a imobilização. Inicialmente, informações estruturais cristalográficas para a lacase de *Myceliophthora thermophila* expressa em *Aspergillus sp.* foram

recuperadas do Protein Data Bank (BERMAN et al., 2000) sob o código de acesso 6F5K (ERNST et al., 2018a). A relação entre estrutura e função da proteína é bem estabelecida, com a flexibilidade da proteína desempenhando um papel importante na regulação da função enzimática. Portanto, é essencial compreender o comportamento dinâmico da proteína para a compreensão do processo de imobilização da lacase em uma conformação ativa. Por exemplo, entender a flexibilidade inerente da lacase e explorar conformações que permitem acesso ao sítio catalítico pode ajudar no desenvolvimento de um modelo. Este modelo pode fornecer insights valiosos sobre o mecanismo subjacente à sua atividade aprimorada após a imobilização.

Neste estudo, simulações de dinâmica molecular (MD) foram realizadas usando o software GROMACS (HESS et al., 2008; VAN DER SPOEL et al., 2005) acessado através do Visual Dynamics Web Server (VIEIRA et al., 2023), com o campo de força CHARMM selecionado (BROOKS et al., 2009) e tempo de 4 ns. A estrutura da lacase foi colocada no centro de uma caixa cúbica, garantindo uma distância mínima de 1,0 nm de cada átomo da proteína, e o sistema foi solvatado com um modelo de água SPC. A minimização de energia foi realizada usando um integrador de descida mais íngreme e um algoritmo de gradiente conjugado, com uma força máxima de $1000 \text{ kJ mol}^{-1}\text{nm}^{-1}$ definida como critério de parada. Interações eletrostáticas de longo alcance foram tratadas usando o método de Ewald com malha de partículas (PME) (ESSMANN et al., 1995).

A temperatura foi mantida em 300 K usando um termostato com reescalonamento de velocidade com uma constante de tempo de 0,1 ps (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007), enquanto a pressão foi controlada a 1 atm com um termostato de Berendsen, empregando uma constante de tempo de 2 ps (BERENDSEN; GRIGERA; STRAATSMA, 1987). As ligações químicas foram restringidas usando o resolvidor de restrição linear paralelo (HESS, 2008). Os sistemas foram equilibrados através de

simulações NVT e NPT, cada uma com duração de 100 ps. Subsequentemente, uma execução final de produção consistindo em quatro simulações independentes de cinco ns sem restrições de posição foi conduzida. As trajetórias resultantes foram concatenadas, e a análise de componentes principais (PCA) foi realizada para analisar movimentos de baixa frequência ao longo da trajetória (SKJÆRVEN; REUTER; MARTINEZ, 2011).

A avaliação do volume do bolso catalítico e das assinaturas físico-químicas foi conduzida para os dez primeiros componentes principais da trajetória final usando o servidor web TRAPP (KOKH et al., 2013). A versão 1.5.0.4 do PyMol (Schrödinger, LLC.) foi utilizada para visualização e preparação de figuras, permitindo uma análise abrangente da distribuição do potencial eletrostático na superfície da lacase.

5.8. Caracterização bioquímica do biocatalisador

Na caracterização bioquímica foram avaliados alguns parâmetros tanto para a enzima livre quanto para o biocatalisador para tornar possível a comparação do biocatalisador e da enzima livre, tornando evidente as vantagens do complexo, como por exemplo, os possíveis benefícios da interação entre o material de suporte e a enzima. Especificamente neste trabalho foi avaliado a temperatura ótima, a estabilidade térmica e a estabilidade operacional.

Para determinar a temperatura ótima, as enzimas tanto livres quanto imobilizada foram expostas a três temperaturas distintas (25, 40 e 50 °C) e monitoramos seu impacto no procedimento de oxidação do ABTS.

Para avaliar a estabilidade térmica, as amostras foram imersas em um tampão de acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ em duas temperaturas diferentes (40 °C e 50 °C) por 1 e 2 horas sem a presença de substrato. Após o período de incubação, as amostras foram

centrifugadas a 10.000 rpm por 3 minutos para a remoção do tampão, e a oxidação do ABTS foi subsequentemente medida nas condições padronizadas.

Para avaliar a reutilização das enzimas imobilizadas, submetemos as mesmas a uma sequência de dez ciclos consecutivos de reação de oxidação do ABTS. Após cada ciclo de reação, as lacases imobilizadas foram separadas por centrifugação e reintroduzidas na reação.

5.9. Remoção de corante têxtil

Os experimentos foram conduzidos utilizando 10 mL de solução de corante (10 mg L^{-1}) e 25 mg de BS, incubando a 130 rpm, 40 °C por 2 horas. Após o período especificado, a solução resultante foi centrifugada a 10.000 rpm para isolar o sobrenadante. Para determinar a concentração de corantes residuais no sobrenadante, foi utilizado um espectrofotômetro UV-visível (UV-M51 da BEL Engineering SRL em Monza, MB, Itália) na faixa de comprimento de onda de 576 nm para o Tectilon Blue 4R-01 200% (Acid Blue 277). Curvas de calibração foram empregadas para calcular as concentrações de corante no sobrenadante, variando de 10 a 100 mg L^{-1} . Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os testes foram realizados com enzima livre, BS, Lac-BS e apenas solução de corante (controle).

Os produtos gerados pelo desempenho catalítico do biocatalisador para a degradação do corante foram analisados por cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS) realizados na Central Analítica da USP (CA-USP). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna LunaC18 (Phenomenex) com dimensões de 250x4,6mm; e tamanho de partícula de 5 μm , com a temperatura da coluna mantida a 30 °C. A fase móvel consistiu na utilização de H₂O e metanol fluindo a uma taxa de 1 mL/min. O espectrômetro de massas utilizado foi o

AmazonSpeed ETD (Bruker) com nebulizador de 27 PSI, drygas de 7 L/min a uma temperatura de 300 °C a uma voltagem de 4.5 kV.

5.10. Remoção de Ibuprofeno

Os experimentos foram conduzidos utilizando 10 mL de solução de ibuprofeno, com concentrações de 10 mg L⁻¹ e 25 mg de BS. Essas misturas foram incubadas a 130 rpm e 40 °C por 2 horas. Após o período de incubação designado, a amostra resultante foi centrifugada a 10.000 rpm para separar o sobrenadante. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os testes incluíram enzima livre, BS, Lac-BS e controle com apenas a solução do medicamento. Os produtos gerados pelo desempenho catalítico do biocatalisador para a degradação do ibuprofeno foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Poroshell C18 com dimensões de 2,1 x 100 mm e tamanho de partícula de 2,7 µm, com a temperatura da coluna mantida a 45 °C. A fase móvel consistiu em 5 mM de acetato de amônio (0,05% de ácido acético) fluindo a uma taxa de 0,3 mL/min.

5.11. Análises Estatísticas

A cristalinidade relativa das amostras foi determinada pela separação dos difratogramas em uma fase cristalina, identificada pelas reflexões de Bragg, e uma fase amorfa, definida pelas regiões 2theta sem interferência construtiva na radiação difratada. O cálculo é baseado na razão entre a área correspondente à fase cristalina e a área total dos difratogramas:

Equação 4 Fórmula para o cálculo da porcentagem de cristalinidade total da amostra.

$$\% \text{ cristalinidade} = \frac{I_c}{(I_c + I_a)}$$

Onde I_c é definida como a área sob as reflexões de Bragg e I_a a área sob as regiões amorfas 2θ . As áreas foram calculadas por integração usando o software 'Origin Lab', com correções aplicadas à linha de base dos difratogramas quando necessário.

O desenho experimental de Plackett-Burman foi avaliado estatisticamente para identificar os parâmetros significativos que afetam o desenho experimental. Gráficos de Pareto e tabelas ANOVA criadas pelo Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK) foram utilizados para examinar os principais efeitos e interações entre os tratamentos, bem como a significância estatística em $p < 0,05$ (nível de confiança de 95%) (DRISCOLL, 1996; PLACKETT; BURMAN, 1946).

Análises estatísticas adicionais foram conduzidas usando o software GraphPad Prism versão 10.1.1 (270), com os dados relatados como média $\pm$ DP (Desvio Padrão). O teste de Tukey para significância estatística foi realizado para identificar diferenças significativas nas médias das amostras dentro de um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$) (DRISCOLL, 1996).

6. Resultados e Discussão

6.1. Caracterização Físico-Química do suporte

6.1.1. Síntese de Bismuto Silicato (BS) e remoção de agente direcionador de estrutura (SDA)

Os dados de DRX apresentados na Figura 17 destacam as características cristalográficas de BS sintetizado sob várias condições de envelhecimento. Os picos de difração observados em valores específicos de 2θ ($3,79^\circ$, $6,36^\circ$, $7,72^\circ$, $24,66^\circ$, $27,95^\circ$, $28,59^\circ$, $31,09^\circ$, $32,24^\circ$, $33,03^\circ$, $46,40^\circ$ e $46,97^\circ$) indicam a natureza cristalina do material. A análise desses padrões destaca que o BS é um material de fase pura e, até o momento, nenhum padrão de difração como o apresentado neste trabalho foi encontrado na literatura. As variações nos tempos de envelhecimento causam mudanças discerníveis nos padrões de DRX. Os BS sintetizados com tempos de envelhecimentos mais curtos apresentam uma diminuição na cristalinidade, evidenciada por larguras de pico mais amplas, especialmente nos picos mais baixos ($2\theta = 3 - 8^\circ$), como está apresentado em valores quantitativos utilizando a Equação 3 com seus resultados expostos na Tabela 2. Essa observação sugere a presença de cristais menores, além da cristalização incompleta sob condições de tempo de polimerização mais curta. À medida que o tempo de envelhecimento foi estendido, uma melhoria progressiva na cristalinidade se torna evidente, sendo representada por picos mais definidos e de larguras mais estreitas atingindo um nível de aproximadamente 72% de cristalinidade. Essa correlação dos picos, implica no crescimento de cristais maiores e mais definidos na estrutura cristalográfica do material. Em contrapartida, os tempos de envelhecimento acima de 24 horas indicam que o processo de cristalização não foi melhorado, inclusive, houve perda de definição nos picos de difração atingindo 68 e 61,9% de cristalinidade, respectivamente. Além disso, uma análise abrangente dos padrões de DRX revela mudanças sutis na composição de fase do BS ao longo de diferentes tempos de envelhecimento. Picos específicos

surtem, indicando alterações na rede cristalina e a aparição de fases distintas, possivelmente atribuídos a polimorfos ou impurezas. Essa evolução dinâmica na composição de fase destaca a sensibilidade da síntese de BS às condições de envelhecimento e a complexidade do sistema, ressaltando a importância do controle preciso sobre os parâmetros de síntese.

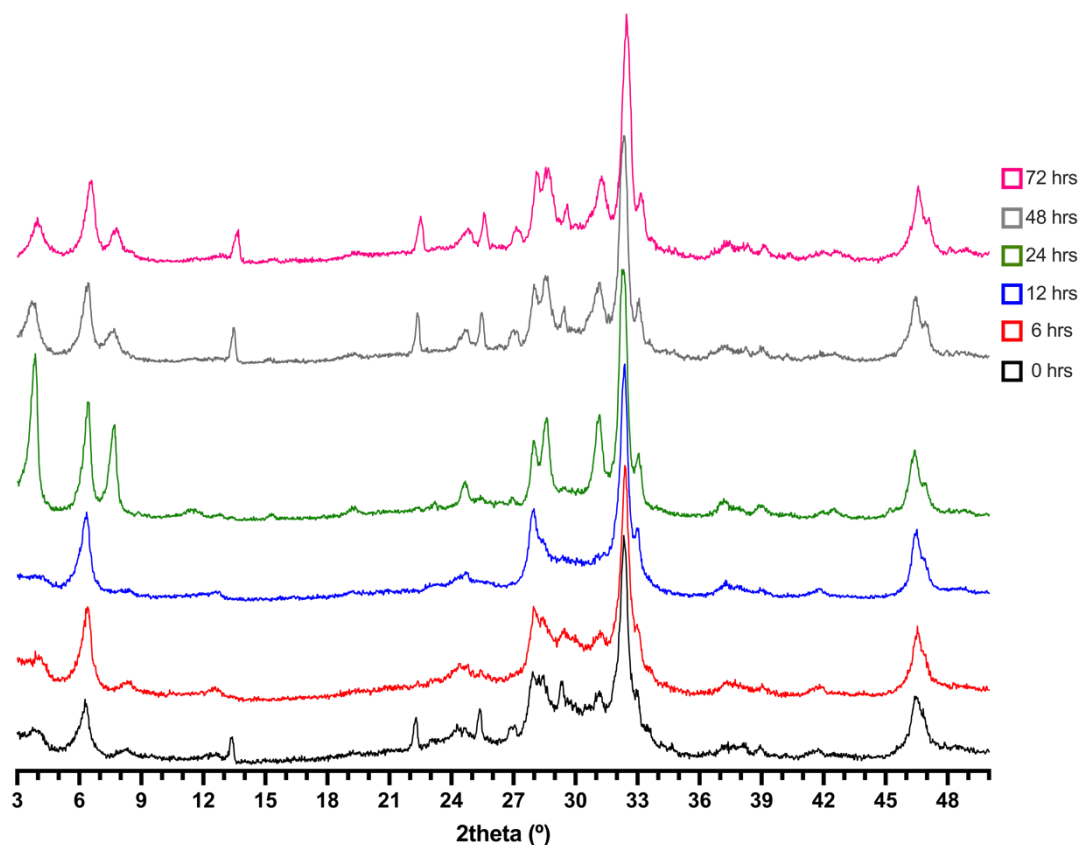


Figura 17 Padrões de DRX utilizados para investigar a estrutura cristalina e composição de fase dos BS preparados com diferentes tempos de envelhecimento utilizando TPA Br como agente direcionador de estrutura. **Fonte:** Autoria Própria.

Tabela 2 Valores calculados de cristalinidade de cada amostra em diferentes tempos de envelhecimento utilizando TPA Br como agente direcionador de estrutura. **Fonte:** Autoria Própria.

Envelhecimento (h)	I_c	I_c + I_a	%Cristalinidade
0	5628,3	9958,7	56,5
6	6990,2	12181,7	57,4
12	4646,9	8415,4	55,2
24	7106,9	9852,3	72,1
48	6835,5	10044,0	68,0
72	5325,9	8607,2	61,9

Nos seus estudos, (ZANARDI et al., 2006) utilizaram hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) em várias composições de química sol-gel, variando temperatura e tempo, e obtiveram bismuto silicato isomórfico puro. Embora tenham obtido as fases puras EMS-4 e EMS-5, também relataram a presença de várias fases competitivas (eulitita, quartzo) e fases amorfas. No presente estudo, essas fases não foram observadas; no entanto, foi observado que a alcalinidade desempenha um papel importante na cristalização do BS mais cristalino, uma vez que o material é formado em uma faixa de pH entre 9 e 12, com sua formulação sendo $x\text{Na}_2\text{O} : x\text{TPA Br} : x\text{SiO}_2 : \text{Bi}_2\text{O}_3 : x\text{H}_2\text{O}$ ($0,25 < x < 6,5$) com seus resultados detalhados mostrados na Tabela 3. Nessas condições, na água mãe das sínteses, ocorreu a formação de monocristais de NaNO_3 . Em outras condições em que não houve formação de NaNO_3 , observou-se a formação de BS menos cristalino. Embora existam vários estudos experimentais e teóricos relatando os efeitos da presença ou ausência de alcalinidade na formação e na cinética de várias zeólitas como MFI, MEL, MTW, LEV (HIKICHI et al., 2019; HONG et al., 2023; KIM et al., 2000; LOBO; ZONES; DAVIS, 1995; MOUSAVI et al., 2013; PELLENS et al., 2022; PEREZ-PARIENTE; A. MARTENS; A. JACOBS, 1987; QI et al., 2022; THOMPSON, [s.d.]; WU et al., 2008), informações sobre o papel de cátions alcalinos na

síntese de BS são escassas na literatura. Com base nos dados experimentais e na literatura, é bastante plausível que o processo de envelhecimento utilizado nestas sínteses, antes dos tratamentos hidrotermais em alta temperatura, possa suprimir a formação de fases impuras, como as observadas por (ZANARDI et al., 2006). Além disso, os cátions Na^+ desempenharam um papel importante na dissolução e/ou precipitação das espécies de BS no processo de envelhecimento antes da nucleação. Estudos individuais do NaNO_3 foram realizados utilizando o XtaLAB Synergy-S (Rigaku, Japão), e os parâmetros da célula unitária desses cristais foram determinados como $a = 5,0688 (4) \text{ \AA}$; $b = 5,0688 (4) \text{ \AA}$; $c = 16,5247 (18) \text{ \AA}$, em forma hexagonal. A análise da database de cristalografia mostrou a correspondência JCPDS 71-1558, o que revelou e confirmou que esses cristais são de nitrato de sódio (NaNO_3).

Tabela 3 Variação dos parâmetros de síntese de BS em diferentes amostras, destacando o tempo de envelhecimento, qual SDA utilizado, o pH do gel antes e depois do processo de envelhecimento e da água-mãe, e a formação de monocristais de NaNO_3 na água-mãe. **Fonte:** Autoria Própria.

Amostras	Envelhecimento (h)	SDA	pH do gel			NaNO_3^a
			Antes	Depois	Água-mãe	
BS-01	48	TPA Br	9,74	9,51	6,47	Sim
BS-02	24	TPA Br	9,77	9,52	6,14	Sim
BS-03	12	TPA Br	9,80	9,46	6,28	Não
BS-04	6	TPA Br	9,75	9,43	6,25	Não
BS-05	24	PDADMA C	11,57	9,56	7,13	Não
BS-06	24	Nenhum	12,02	10,13	8,01	Não

^a formação de monocristais de NaNO_3 na água-mãe retirada da síntese

Os padrões de DRX para as diversas temperaturas de calcinação do BS, utilizando TPA Br como SDA, são ilustrados na Figura 18, e suas distâncias interplanares e intensidades relativas apresentadas na Tabela 4 foram calculadas através da Equação 4.

Equação 5 Equação de Bragg utilizada para o cálculo de distâncias interplanares do DRX.

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

onde "n" se refere ao número inteiro de comprimentos de onda (geralmente é considerado como 1); "d" corresponde à distância entre os planos; "θ" representa o ângulo de Bragg.

Observa-se que os picos de difração exibem um deslocamento para ângulos 2θ mais elevados à medida que a temperatura de calcinação aumenta, além do desaparecimento de alguns picos, podendo indicar destruição de fases do material, sendo plausível deduzir que a temperatura cause mudanças significativas na estrutura. Este acontecimento é determinante, uma vez que a temperatura de calcinação surge como um fator preponderante na remoção do SDA, onde sais quaternários de amônio possuem elevadas temperaturas de remoção (aproximadamente 500 °C), e que a estabilidade térmica é uma característica das mais desejadas em uma zeólita. Este deslocamento para ângulos mais elevados sugere uma reorganização cristalográfica mais intensa, possivelmente relacionada ao rearranjo da rede cristalina. A interpretação desses deslocamentos requer uma análise mais aprofundada, considerando aspectos como o efeito nas dimensões unitárias da célula cristalina e possíveis variações na orientação dos cristais.

Além da análise inerente dos padrões de difração de raios-X do BS sob diversas condições de calcinação, foi necessário realizar uma comparação desses padrões com materiais já existentes em bases de dados, como a Internacional Centre for Diffraction Data (ICDD). Tal abordagem permitiu uma correlação mais precisa das características cristalográficas do BS com aquelas já conhecidas e catalogadas na literatura científica. Diferentemente do que foi evidenciado com o material *as-made*, foi possível localizar algumas estruturas análogas aos apresentados neste trabalho. Após a calcinação a temperaturas de 450 e 550 °C, os difratogramas quando comparados, apresentam grandes semelhanças entre si. (LI et al., 2022; WANG; LI, 2003) reportaram em seus estudos, maneiras distintas para sintetizar o óxido de brometo de bismuto (BiOBr – JCPDS nº 09-0393) com uma fase cristalina tetragonal e índices de célula unitária $a = 5,48$ e $c = 35,69$ Å. Em ambos os trabalhos, o difratograma apresentado se mostrou semelhante aos

obtidos, indicando a possível formação deste óxido como um dos produtos da calcinação do BS.

A investigação das propriedades cristalográficas do BS calcinado a 750 °C revelou padrões de difração distintos aos discutidos anteriormente, marcando uma mudança significativa na estrutura do material. Após a busca por difratogramas equivalentes, foi descoberto uma notável semelhança entre as duas estruturas cristalinas – um mineral natural denominado de Eulitina (ou Agricolita) e o BS calcinado. A Eulitina, um bismuto silicato de fórmula química $\text{Bi}_4(\text{SiO}_4)_3$ e PDF (Powder Diffraction File) 35-1007 possui uma célula unitária isométrica com $a = 10,3 \text{ \AA}$, relativamente rara e encontrada em locais limitados ao redor do mundo. Os cristais desse mineral são usados como cintiladores em física de alta energia, tomografia computadorizada e dosimetria. Até o momento, não há relatos na literatura de rotas sintéticas com zeólitos e tratamento térmico para a obtenção de Eulitina (CHANDRAWANSHI; BISEN; BRAHME, 2023; MARINA et al., 2011; SEGAL; SANTOROAND; NEWNHA1U, 1966; XU et al., 2023).

Esses resultados foram obtidos devido a temperatura de 750 °C é capaz de desencadear processos de reconfiguração na estrutura do BS atribuído a perda de moléculas de água formadas pela condensação de grupos silanóis (SiH_3OH) causando o colapso da rede cristalográfica do material inicial, culminando na formação de uma fase cristalina semelhante ao mineral eulitita – o mesmo mineral observado por (ZANARDI et al., 2006) –.

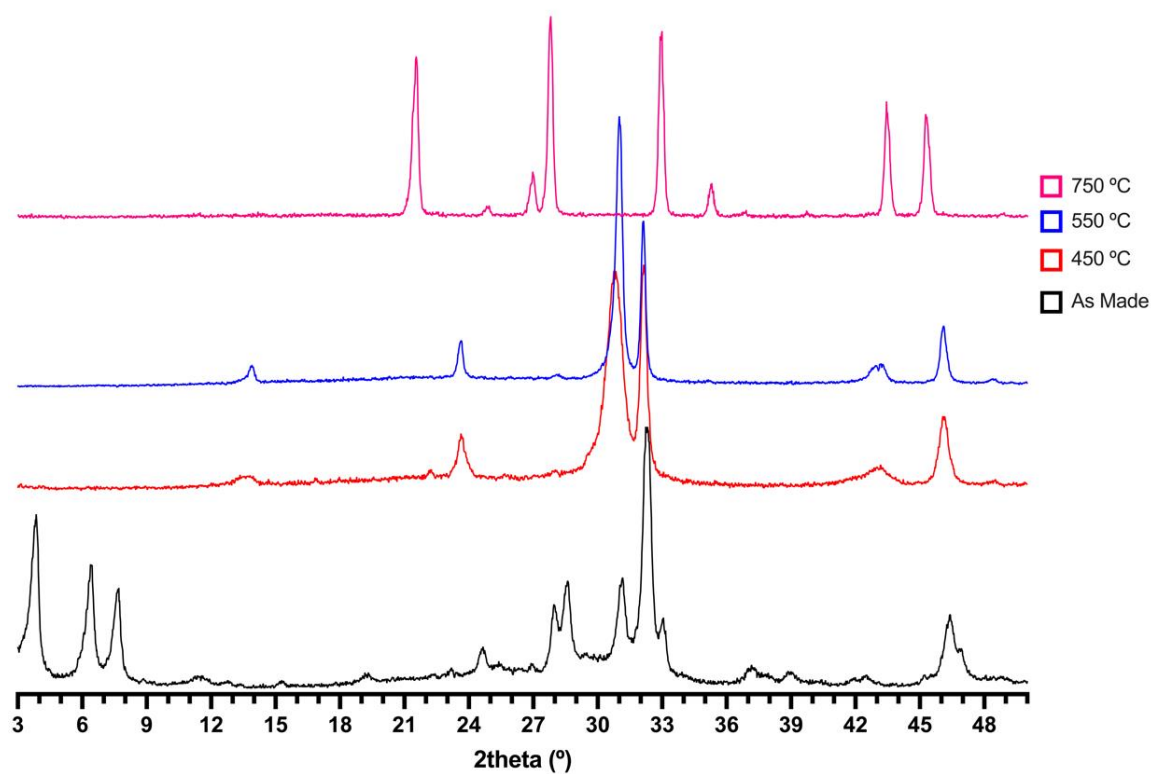


Figura 18 Padrões de DRX do estudo realizado para a compreensão da remoção do SDA (TPA Br) com tempo de envelhecimento de 24 horas através da calcinação em diferentes temperaturas. **Fonte:** Autoria Própria.

Tabela 4 Distâncias interplanares e intensidades relativas do BS antes e depois do tratamento térmico para a remoção do SDA. **Fonte:** Autoria Própria.

As-made		450 °C		550 °C		750 °C	
d(Å)	I/I ₀	d(Å)	I/I ₀	d(Å)	I/I ₀	d(Å)	I/I ₀
23,25	530,5	6,29	141	6,38	126,4	4,20	1000
13,85	326,5	4,30	54,7	3,78	105,5	4,07	95,4
11,60	35,6	3,53	88,6	2,98	220	3,64	43,8
3,98	43,8	3,14	125,7	2,89	1000	3,35	135,7
3,84	128,6	2,82	1000	2,80	512,1	3,25	947,7
3,61	61,3	2,78	534,5	2,26	10,5	2,75	908,7
3,38	256,6	2,29	702,6	2,10	139,4	2,57	128,5
3,19	345,1	2,02	80,9	1,98	188,6	2,10	420,3
3,04	82,2	1,93	345,8	-	-	2,02	384,9
2,87	339,3	-	-	-	-	-	-
2,77	1000	-	-	-	-	-	-
2,71	154,6	-	-	-	-	-	-
2,42	56,1	-	-	-	-	-	-
1,96	260,5	-	-	-	-	-	-

Os dados de DRX para o material sem e com diferentes SDAs, são apresentados na Figura 19. Os padrões revelam diferenças notáveis na intensidade e posição dos picos, que indicam alterações significativas na estrutura cristalina. As sínteses realizadas sem a presença do SDA em um padrão de difração com menor quantidade de picos, porém mais definidos e intensos, o que possivelmente indica a presença de apenas uma única fase ordenada no material, além de uma alta cristalinidade de aproximadamente 74%. Torna-se necessário um estudo mais aprofundado para compreender como o sistema de síntese se comporta sem a presença de um direcionador, pois até o presente momento, não foram encontradas correspondências desta estrutura com qualquer outra previamente documentada na literatura. Essa diferença é particularmente relevante, porque, ao ser comparado com a forma que acreditava-se ser a mais provável para se formar na síntese, o óxido de bismuto (Bi_2O_3), – em suas duas formas cristalográficas, α e β (JCPDS: 71-2274 e 27-0050, respectivamente), ou Bi_2SiO_5 (JCPDS: 36-0287) – não apresentou coincidência entre os padrões de difração. No entanto, ao analisar a síntese com a incorporação de dois diferentes agentes direcionadores – em sínteses diferentes – observou-se novamente a formação de duas estruturas novamente distintas entre elas, e perante a padrões de difração reportados na literatura atual. A introdução do agente direcionador PDADMAC – um polímero orgânico de grande tamanho, tipicamente na faixa de centenas de milhares de gramas por mol, e até mesmo um milhão para alguns produtos, conhecido por ser utilizado em estudos buscando a formação de mesoporos – resultou em uma nova configuração cristalográfica, evidenciada pelos picos de difração de Bragg em $2\theta = 3,68; 11,88; 23,87; 25,97; 28,81; 32,76; 33,49; 34,96; 36,23; 40,96; 47,06; 48,63$ e $49,62^\circ$. Neste padrão, é destacada a presença do pico de difração situado em $3,68^\circ$, mesmo que mal definido, indicando baixa cristalinidade como mostrado na Tabela 5, é um pico comumente associado a presença de mesoporos pela sua alta distância

interplanar. Este pico está situado muito próximo ao pico de menor 2θ obtido através da síntese realizada com a utilização do TPA Br como SDA, sugerindo que a utilização destes sais quaternários de amônio desempenha um papel significativo na orientação da formação da estrutura cristalina do BS.

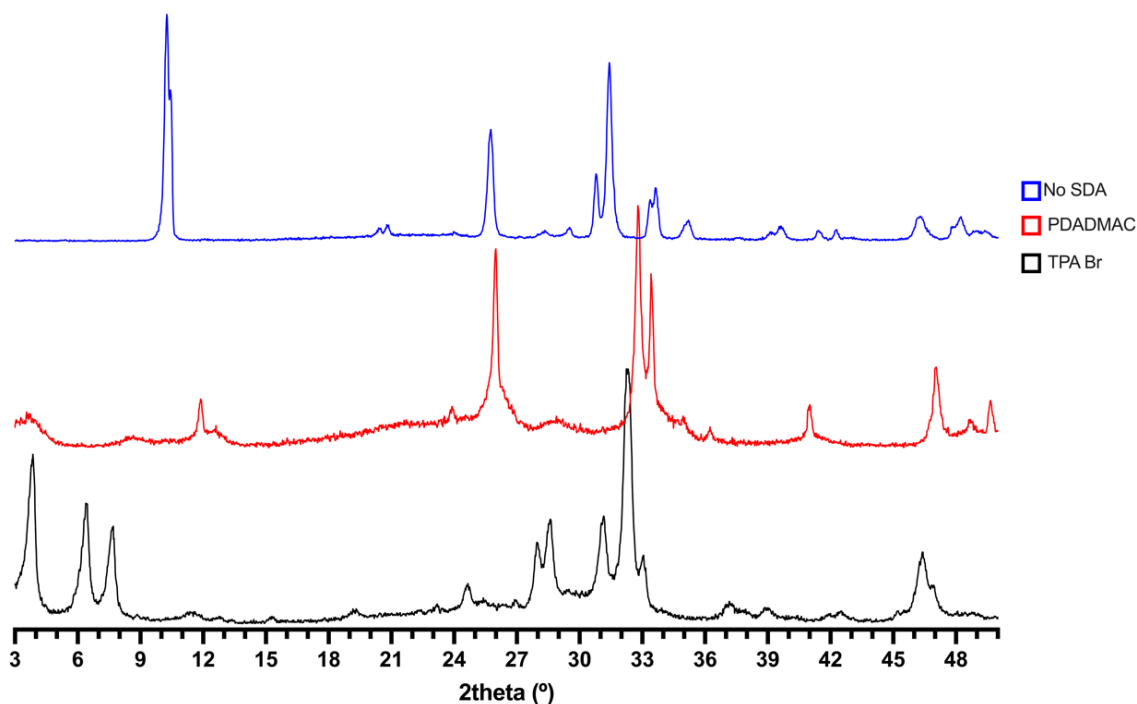


Figura 19 Padrões de DRX do estudo realizado para a compreensão do papel do SDA na síntese de BS. Síntese utilizando TPA Br, PDADMAC e sem SDA. **Fonte:** Autoria Própria.

Tabela 5 Valores calculados de cristalinidade de cada amostra em diferentes agentes direcionadores de estrutura. **Fonte:** Autoria Própria.

SDA	Ic	Ic + Ia	%Cristalinidade
No SDA	5550,0	7453,2	74,5
PDADMAC	3734,6	6461,5	57,8
TPA Br	7106,9	9852,3	72,1

Os espectros de FT-IR da zeólita sintetizada e das seguintes extrações de SDA são mostrados nas Figuras 20 e 21. O estudo desses espectros demonstraram que as bandas de zeólitas na faixa de 200 a 1300 cm^{-1} , área comumente conhecida como “fingerprint”,

podem ser atribuídos a vibrações causadas por vibrações internas do tetraedro (TO_4) da estrutura, conhecidas como unidades de construção primária, do inglês, primary building units (PBU) em todas as estruturas zeolíticas, além de vibrações relacionadas a ligações externas entre os tetraedros que são sensíveis à estrutura e à presença de algumas unidades poliédricas de blocos de construção e unidades de construção secundária, do inglês, secondary Building units (SBU), como anéis e aberturas de poros grandes (BYRAPP; KUMAR, 2007; FLANIGEN; KHATAMI, 1974).

Os materiais apresentam bandas de absorção em 469 cm^{-1} , 802 cm^{-1} , 1119 cm^{-1} , 1381 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} , 2959 cm^{-1} e 3446 cm^{-1} . Os picos amplos em 1119 cm^{-1} e 3446 cm^{-1} estão relacionados ao estiramento assimétrico do Si-O-Si e à frequência vibracional do grupo O-H, respectivamente. As bandas em 469 cm^{-1} e 802 cm^{-1} fornecem evidências da incorporação de Bismuto na estrutura cristalográfica, sendo atribuídas ao modo de vibração de estiramento das ligações Bi-O, modo de vibração de flexão das ligações Bi-O, ou vibrações de estiramento de $(\text{SiO}_4)^4$, respectivamente (CHEN et al., 2017; SUN et al., 2009b). As bandas em 1381 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} e 2959 cm^{-1} podem ser atribuídas à presença do agente direcionador de estrutura, principalmente porque as bandas estão presentes apenas no material recém-produzido. As bandas em 2959 cm^{-1} e 1442 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento de C-H dos íons TPA^+ , e a banda em 1381 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento C-N.

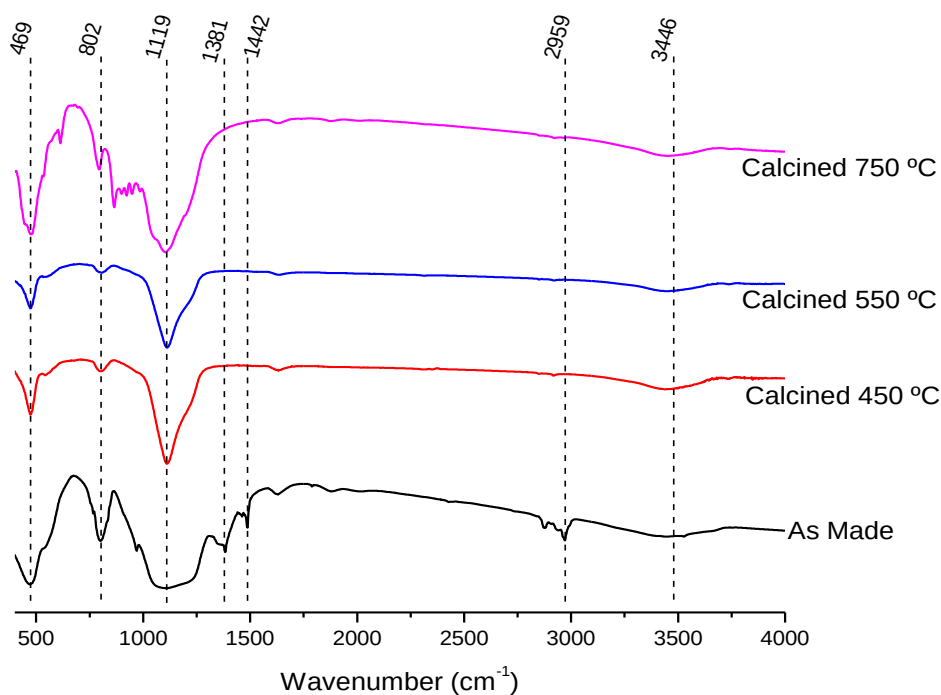


Figura 20 Os espectros de FT-IR do estudo realizado para a compreensão da remoção do SDA (TPA Br) e 24 horas de envelhecimento através da calcinação em diferentes temperaturas. **Fonte:** Autoria Própria.

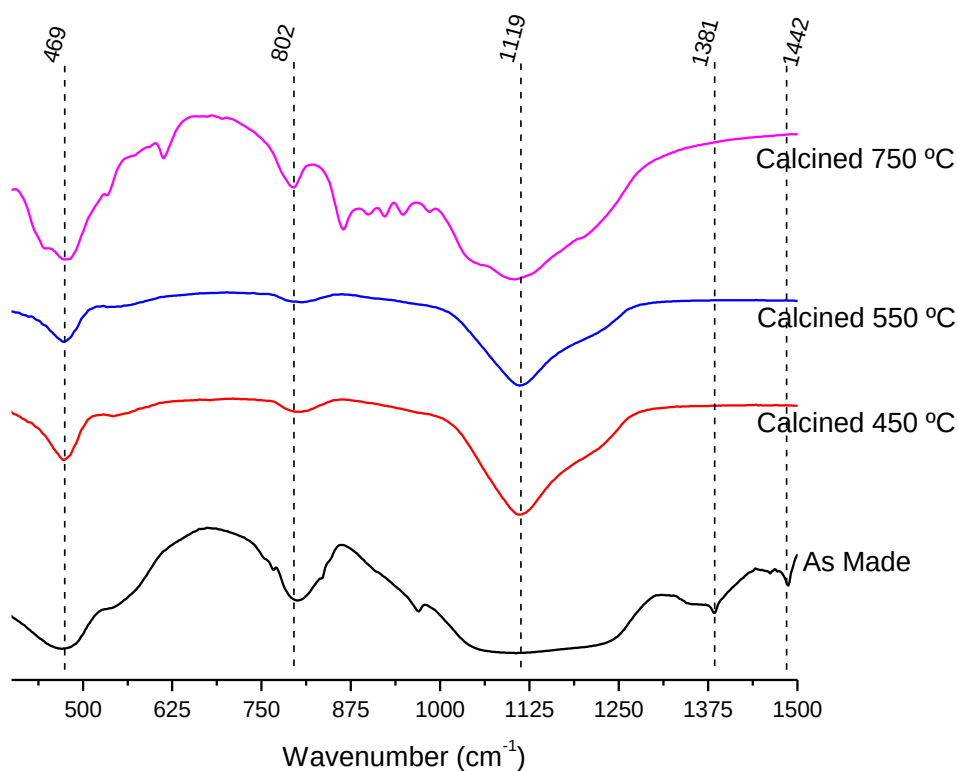


Figura 21 Ampliação das bandas na região de 400-1500 cm^{-1} . **Fonte:** Autoria Própria.

Os espectros de FT-IR da amostra tratada utilizando o método de extração com Soxhlet está representada na Figura 22. As bandas de absorção aproximadamente em 2900 cm^{-1} são comumente associadas ao SDA, comparando os espectros do material zeolítico final e o inicial, foi possível visualizar uma diminuição em suas intensidades. Para corroborar a eficácia do método Soxhlet, após o procedimento, além da análise do material final, também foi realizado o armazenamento da solução utilizada a extração, para também ser analisada. Uma comparação dos espectros de FT-IR da solução remanescente em relação aos espectros documentados na literatura, existente exibiram uma notável concordância (ChemicalBook 1941-30-6). Essa correlação leva a crer na possível validação da utilização do método de extração via Soxhlet.

A importância desse resultado reside em sua relação direta com as modificações estruturais causadas pelos processos tradicionais de calcinação, especialmente no que diz respeito à preservação da estrutura cristalina do material zeolítico. A calcinação, frequentemente empregada para remover modelos orgânicos, envolve tratamento em alta temperatura levando os materiais aqui abordados, à reconfiguração da estrutura cristalina. Em contrapartida, o método de extração Soxhlet ofereceu uma remoção mais controlada e gradual do SDA, minimizando o risco de danos estruturais. Essa abordagem tornou possível manter a cristalinidade inerente do material, garantindo que o framework desejado e a estrutura porosa permaneçam intactos.

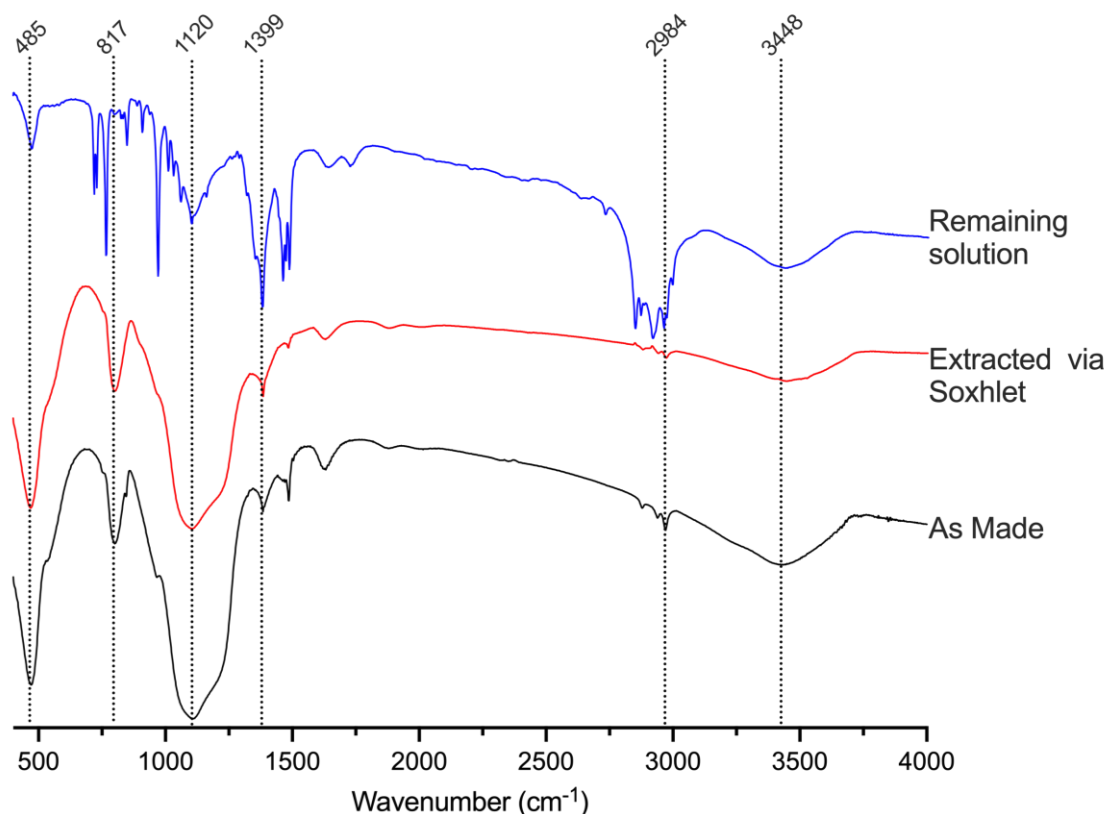


Figura 22 Os espectros de FT-IR do estudo realizado para a compreensão da remoção do SDA (TPA Br) e 24 horas de envelhecimento através do método Soxhlet. **Fonte:** Autoria Própria.

6.1.2. Análise de adsorção de Nitrogênio (N₂)

As medições de adsorção de nitrogênio foram realizadas em um Analisador de Superfície Específica e Porosidade Micromeritics modelo ASAP2020Plus (Sistema Acelerado de Área de Superfície e Porosimetria), na faixa de pressões parciais P/P_0 de 0,001 a 1, e temperatura de -196,15 °C. As amostras foram submetidas a degaseificação a 120 °C sob vácuo, pelo tempo necessário para remover a umidade da superfície, variando entre 12 e 16 horas entre as diferentes amostras. Devido à sua microporosidade, após serem transferidas para o porta-análise, uma segunda etapa de degaseificação foi realizada com aquecimento, para garantir que esses microporos estivessem livres de umidade ou contaminação com outros vapores. Os valores de área de superfície específica (S) foram calculados usando o modelo de Brunauer-Emmet-Teller, conhecido como BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). Perto da pressão parcial $P/P_0 = 1$, o N₂

condensa em todo o volume de poros disponível, e o ponto final da isoterma indica o volume total de poros. Para determinar a distribuição do tamanho dos poros na escala dos mesoporos, foi utilizado o modelo matemático de Barret-Joyner-Halenda (BARRETT; JOYNER; HALENDA, 1951; JOYNER; BARRETT; SKOLD, 1951), baseado na equação de Kelvin. Na escala de microporos, a determinação do diâmetro médio foi feita usando o método de Horwath-Kawazoe (H-K). O método Horvath-Kawazoe (HK) foi desenvolvido para determinar a distribuição do tamanho dos poros de fendas gráficas em carvões microporosos usando medições de adsorção de N_2 a $-196,15\text{ }^{\circ}\text{C}$, mostrado na Tabela 6 (HORVÁTH; KAWAZOE, 1983). O método assume que poros de uma determinada largura serão preenchidos a uma pressão relativa determinada, para descrever a interação entre as moléculas adsorvidas e a parede do poro (EVERETT; POWL, 1976). Todos os pós mostraram poros na faixa de tamanho de mesoporos e um pequeno volume de poros na faixa de microporos, com as amostras BS2 e BS5 mostrando valores de volume de poros muito baixos e uma isoterma na forma de uma linha de inclinação de 45° , típica de materiais com pouca ou nenhuma porosidade. Com base na Figura 23, as isotermas das Figuras 23a, 23c, 23d, 23f podem ser classificadas como tipo IV, de acordo com a classificação da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), que são típicas de materiais mesoporosos, com um ciclo de histerese mais próximo do tipo H1, caracterizado por dois ramos da isoterma, quase paralelos. Normalmente, esse tipo de histerese está associado a materiais porosos constituídos por aglomerados rígidos de partículas esféricas de tamanho uniforme. Algumas mudanças significativas podem ser observadas nessas isotermas, como uma diminuição sistemática na quantidade de nitrogênio adsorvido com o aumento da temperatura de sinterização de $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $750\text{ }^{\circ}\text{C}$, o que indica uma redução no volume de poros, com uma consequente redução no valor da superfície específica. Após a calcinação a $750\text{ }^{\circ}\text{C}$, os poros são

praticamente eliminados e a isoterma perde sua aparência de mesoporosa (tipo IV) para não porosa (tipo III). As inserções em cada gráfico da Figura 23 mostram curvas de distribuição de tamanho de poro para bismuto silicatos, BS1 (a), BS2 (b), BS3 (c), BS4 (d), BS5 (e), BS6 (f), obtidas pelo modelo BJH. Todos os tamanhos médios dos poros estão na faixa de mesoporos, com BS1, BS4 e BS5 apresentando volumes de poros muito baixos (Tabela 6). Comparando as curvas de distribuição de tamanho de poro dos pós calcinados nas três temperaturas, é possível verificar que o aumento da temperatura de calcinação resultou em uma redução no volume total de poros. O aumento da temperatura de 450 °C para 550 °C resultou em uma redução no volume total de poros, com eliminação da maioria dos poros menores que 100 Å, de modo que o diâmetro médio dos poros aumentou de 63 para 120 Å. Aumentando ainda mais a temperatura de calcinação para 750 °C, praticamente eliminou os poros, reduzindo o valor da área para 27 m²/g. O maior valor de superfície específica e volume de poros foi verificado para o pó extraído por Soxhlet S = 310 m²/g e volume de poros 0,36 cm³/g, mostrando que este método é eficiente na obtenção de bismuto silicato poroso com alta área de superfície específica, sendo eficiente na remoção do molde orgânico, sem a necessidade de tratamento térmico que resulta na eliminação de poros e redução da área de superfície. Ao comparar os silicatos BS1 e BS2, que diferem apenas no tempo de envelhecimento, é possível concluir que o aumento do tempo de envelhecimento de 12 para 24 h resultou em maior cristalização e um aumento no volume de poros de 0,065 para 0,21 cm³/g, com um consequente aumento na área de superfície específica, de 62 para 149 m²/g. A distribuição do tamanho de poro BJH das amostras BS1, BS3, BS4 e BS6 está na faixa de 5,5-12,2 nm, confirmando a presença de mesoporos hierárquicos nesses de bismuto. Vale destacar que o volume de mesoporos do BS1 (0,21 cm³/g), BS3 (0,20 cm³/g), BS4 (0,14 cm³/g) e

BS6 (0,36 cm³/g) são maiores do que de outras zeólitas convencionais, como a zeólita Beta (0,09 cm³/g), ZSM-5 (0,05 cm³/g) (MOLINER et al., 2011; WANG et al., 2010).

Tabela 6 Valores de propriedades texturais dos BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento (área superficial (S), volume de poros (V_{poros}) e diâmetro de poros (Φ_{poros})). **Fonte:** Autoria Própria.

Amostras	S (m ² /g) ^a	V _{mesoporos} (cm ³ /g) ^b	Φ _{mesoporos} (Å) ^c	V _{microporos} (cm ³ /g) ^b	Φ _{microporos} (Å) ^d
BS1-24hs	149	0.21	55 (5.5nm)	0.039	1.1 (0,11nm)
BS2-12hs	62	0.065	43 (4.3nm)	0.011	1.1 (0,11nm)
BS3- calcinado 450°C	118	0.20	63 (6.3 nm)	0.034	1.0 (0,1nm)
BS4- calcinado 550°C	44	0.14	122 (12.2nm)	0.015	1.0 (0,1nm)
BS5- calcinado 750°C	27	0.023	45 (4.5nm)	0.004	1.2 (0,12nm)
BS6-soxhlet	310	0.36	54 (5.4nm)	0.054	1.2 (0,12nm)

^a indica a área de superfície determinada pela teoria BET.

^b Indica o volume de poros determinado pela teoria BJH com isotermas de adsorção.

^c Indica o tamanho de poros determinado pela teoria Hovarth-Kawazoe com isotermas de adsorção.

^d Indica o tamanho de poros determinado pela teoria Hovarth-Kawazoe com isotermas de adsorção.

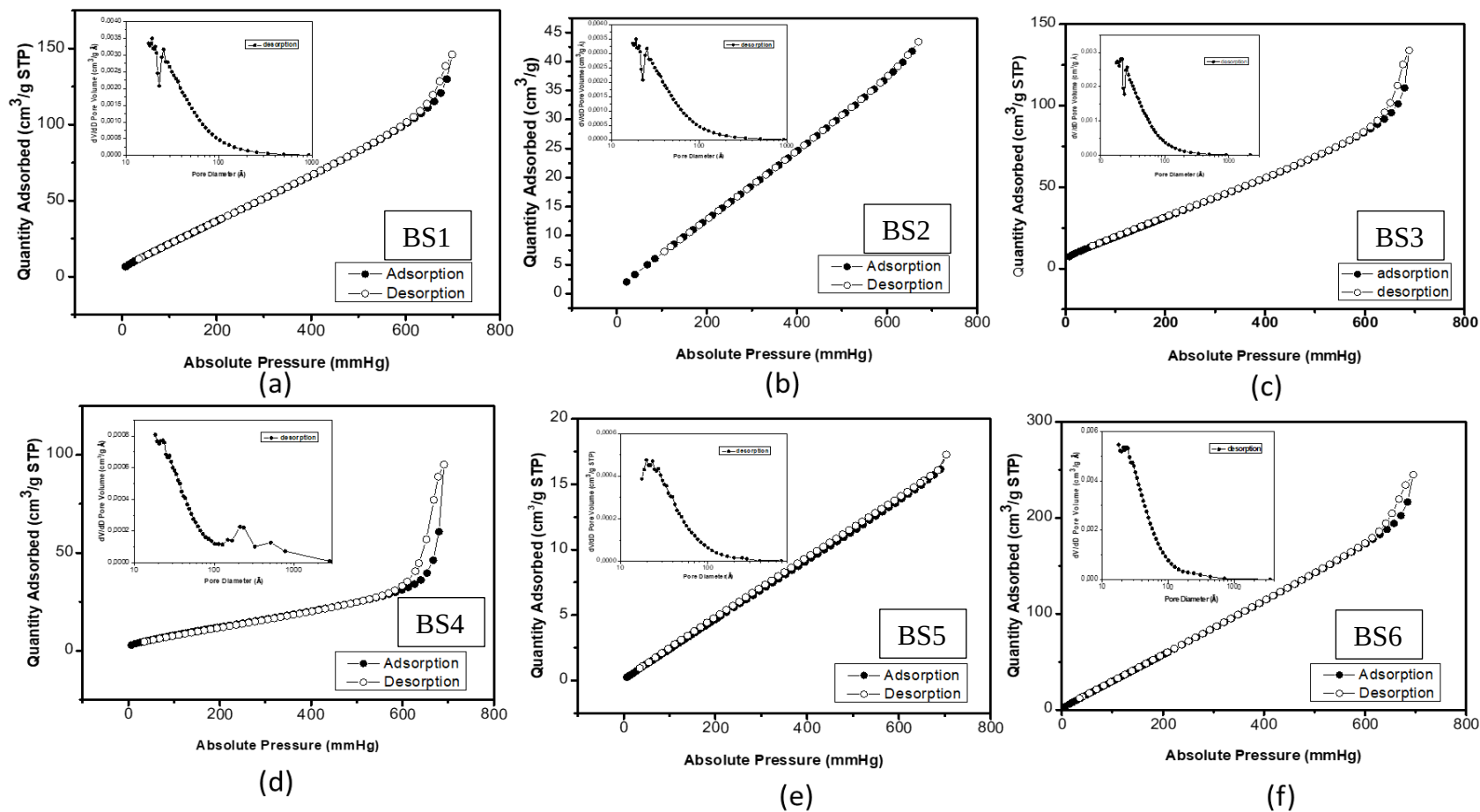


Figura 23 Isothermas de adsorção/dessorção de N_2 e curvas de distribuição de tamanho de poros de BS1 (a), BS2 (b), BS3 (c), BS4 (d), BS5 (e) e BS6 (f). **Fonte:** Autoria Própria.

6.1.3. Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

O material utilizando o SDA TPA Br com tempo de envelhecimento de 24 horas foi analisado usando ICP-OES para determinar sua composição química. A análise foi conduzida duas vezes para garantir a precisão e confiabilidade dos resultados e são mostrados na Tabela 7. As amostras foram analisadas na forma de pó e abertas usando uma mistura de ácido fluorídrico com uma solução de ácido bórico a 4% na proporção de 1:12, com aquecimento em bloco digestor a 100 °C em frascos selados. A análise revelou que a razão Bi/Si do material é 3:1, indicando a presença predominante de Bi na estrutura, porém a não incorporação total de silício na rede zeolítica, podendo estar relacionada ao pH do gel de síntese, por ser uma mistura reacional fortemente básica – variando de 10,3 até 11 – a despolimerização da sílica coloidal oferecida para a síntese, parte do silício permanece na solução na forma de silicatos solúveis. Casos semelhantes já foram observados na literatura por (JIA et al., 2010; KIM; JUNG; PARK, 2011).

Tabela 7 Análise elementar dos BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento e suas proporções teóricas e experimental. **Fonte:** Autoria Própria.

Amostra	Bi (%)	Na (%)	Si (%)	Bi ₂ O ₃ /SiO ₂	
				Teórico	Experimental
1	39,60	4,76	13,13	5,25	3,01
2	39,18	4,79	13,15	5,25	2,97

6.1.4. Análise termogravimétrica (TGA) e Análise Térmica Diferencial (DSC)

As curvas de análise térmicas foram realizadas para determinar a remoção de água e o conteúdo do SDA TPABr do material, conforme mostrado na Figura 24. À medida que a temperatura aumenta, o material apresentou cinco grandes perdas de massa. A primeira, na faixa de 49 °C, pode ser associada à dessorção de moléculas de água fora da estrutura cristalina do material, resultando em uma perda de massa de 1,05% (MOHAMED; ZIDAN; FODAIL, 2007). O segundo evento de perda de massa (7,71%) a 222 °C pode ser atribuído à decomposição do $\text{Bi}(\text{OH})_3$, causando um rearranjo da estrutura, apoiando a análise de DRX, onde é possível observar a desconfiguração da estrutura inicial do material e possivelmente formando BiOOH como resultado, que posteriormente é decomposto a 316 °C, resultando na perda de massa de 2,95% (BAI et al., 2007). Em seguida, a 556 °C, há uma perda de 3,47% em massa, que pode ser atribuída à decomposição dos íons TPA^+ do agente direcionador de estrutura estabilizado na estrutura da zeólita (KOTASTHANE; SHIRALKAR, 1986). Observa-se um novo evento de perda de massa começando em torno de 600 °C (7,58%), o que indica o início do colapso da estrutura do material. Esse colapso é atribuído à eliminação da água resultante da condensação dos grupos silanol presentes na superfície. A desintegração estrutural continua até aproximadamente 678 °C, onde ocorre o colapso final da estrutura. (MUSYOKA et al., 2015). Este comportamento mostrou que o processo de remoção do agente direcionador de estrutura é eficaz, mas causando alterações irreversíveis na estrutura cristalográfica inicial; além disso, esses resultados mostraram que o material pode suportar temperaturas elevadas de até 678 °C sem que sua estrutura sinterize.

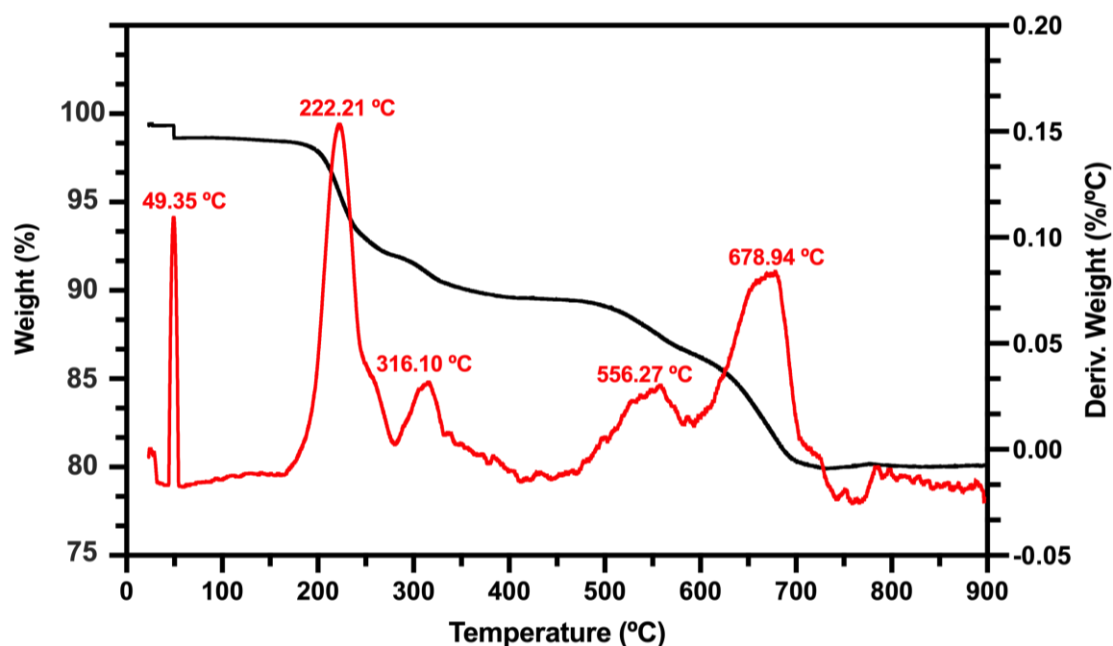


Figura 24 Análises térmicas do BS sintetizados na presença de TPA Br e 24 horas de envelhecimento conduzido em uma rampa de aquecimento de 10 °C/min de 25 a 900 °C em atmosfera de N₂ (40 mL min⁻¹) e uma etapa isotérmica (900 °C) de 60 min em atmosfera de ar sintético (60 mL min⁻¹). **Fonte:** Autoria Própria.

6.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Com a finalidade de confirmar a morfologia e tamanho das partículas dos materiais sintetizados utilizando TPA Br como SDA e 24 horas de envelhecimento, as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas. Binning 1982 e Keating 2009 reportaram em seus estudos a importância desses fatores na interação de um suporte com a enzima visando a imobilização da proteína. O tamanho e a forma das partículas podem ser cruciais na imobilização de enzimas. A área superficial da matriz sólida está diretamente relacionada à sua capacidade de imobilização; assim, um suporte com maior área superficial pode imobilizar mais enzimas, desde que haja sítios de ligação disponíveis. Além disso, a hierarquização de um suporte, pode contribuir positivamente em diversos parâmetros de imobilização enzimática, como mostrado no estudo realizado por (BINNIG et al., 1982; CEDERQUIST; KEATING, 2009)

Figura 25 mostra a morfologia do BS1 (material recém-sintetizado, envelhecido por 24 horas) e do BS calcinado a 450, 550 e 750 °C. A morfologia do BS-1 se assemelha aos irídios mesoporosos 2D ordenados, nanosheets de TiO_2 e zeólitas nanosheets conforme relatado na literatura (HAO et al., 2021; JI et al., 2017; JIANG et al., 2018; LAN et al., 2018; QIU et al., 2021), o que é bastante diferente do EMS-4 e EMS-5 – bismuto silicatos microporosos –, que cristalizam na forma de agulhas e placas hexagonais, respectivamente (MERLINO; BONACCORSI; ARMBRUSTER, 1999, 2001; ZANARDI et al., 2006).

A espectroscopia de dispersão de energia (EDS), representada na imagem 25D, fornece informações qualitativas e semiquantitativas sobre a composição elementar dos materiais analisados. O espectro EDS revela a presença de elementos como bismuto (Bi), oxigênio (O), cobre (Cu), silício (Si), e bromo (Br), que são componentes esperados dos materiais sintetizados.

A presença predominante de picos de bismuto e oxigênio é consistente com a composição dos BS. Os picos de bromo indicam a presença residual do template TPA Br utilizado durante a síntese, o que pode ser esperado em materiais que ainda não passaram por processos de calcinação mais agressivos, como a calcinação com temperaturas acima de 550 °C, onde o material orgânico remanescente é geralmente removido. A detecção de cobre provavelmente está relacionada ao uso de filamentos de cobre no instrumento de MEV, enquanto a presença de silício pode ser atribuída tanto ao suporte como a possíveis contaminações.

Em suma, os dados de EDS complementam as observações morfológicas, confirmando a presença dos elementos esperados e fornecendo um entendimento mais completo da composição dos materiais sintetizados.

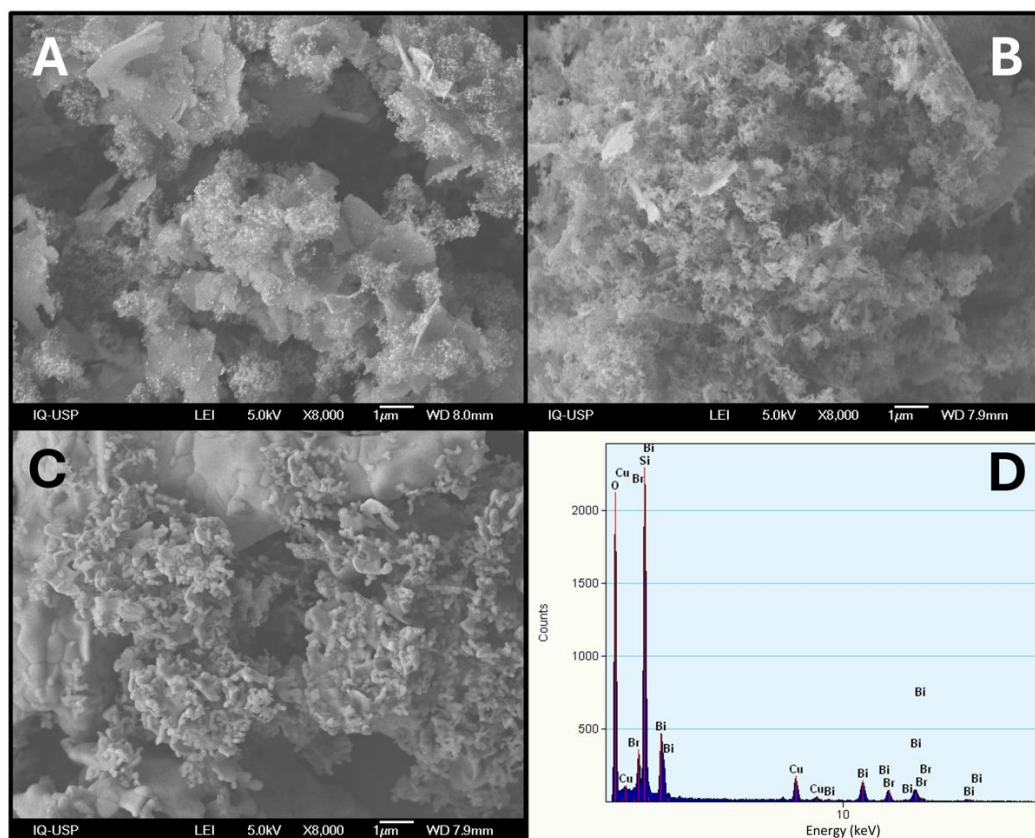


Figura 25 A, B e C são imagens de MEV de bismuto silicato (A) BS1 (24 horas de envelhecimento e TPABr como DAS), (B) calcinado a 550 °C e (C) calcinado a 750 °C. D mostra a EDX do bismuto silicato BS1. **Fonte:** Autoria Própria.

6.1.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do BS-1 recém-sintetizado (material envelhecido por 24 horas) e do BS calcinado a 450, 550 e 750 °C são mostradas nas Figuras 26-28. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) confirmam a presença de mesoporosidade hierárquica ordenada e microporos ordenados na amostra recém-sintetizada (Fig. 26) com tamanho de mesoporos em torno de 5,4 nm e microporos em torno de 0,12 nm e na amostra calcinada a 750 °C (Fig. 14) com mesoporos de tamanho em torno de 4,5 nm e microporos de tamanho em torno de 0,12 nm. O arranjo regular de pontos brilhantes (Fig. 26 e Fig. 28) também revela que o material mesoporoso é do tipo gaiola tridimensional e é consistente com resultados anteriores relatados na literatura para outros materiais mesoporosos hierárquicos (VINU; MORI; ARIGA, 2006; WANG et al., 2010). Além disso, as análises de DRX, adsorção de nitrogênio e SEM confirmam as análises de TEM de que o material possui simetria do tipo gaiola tridimensional.

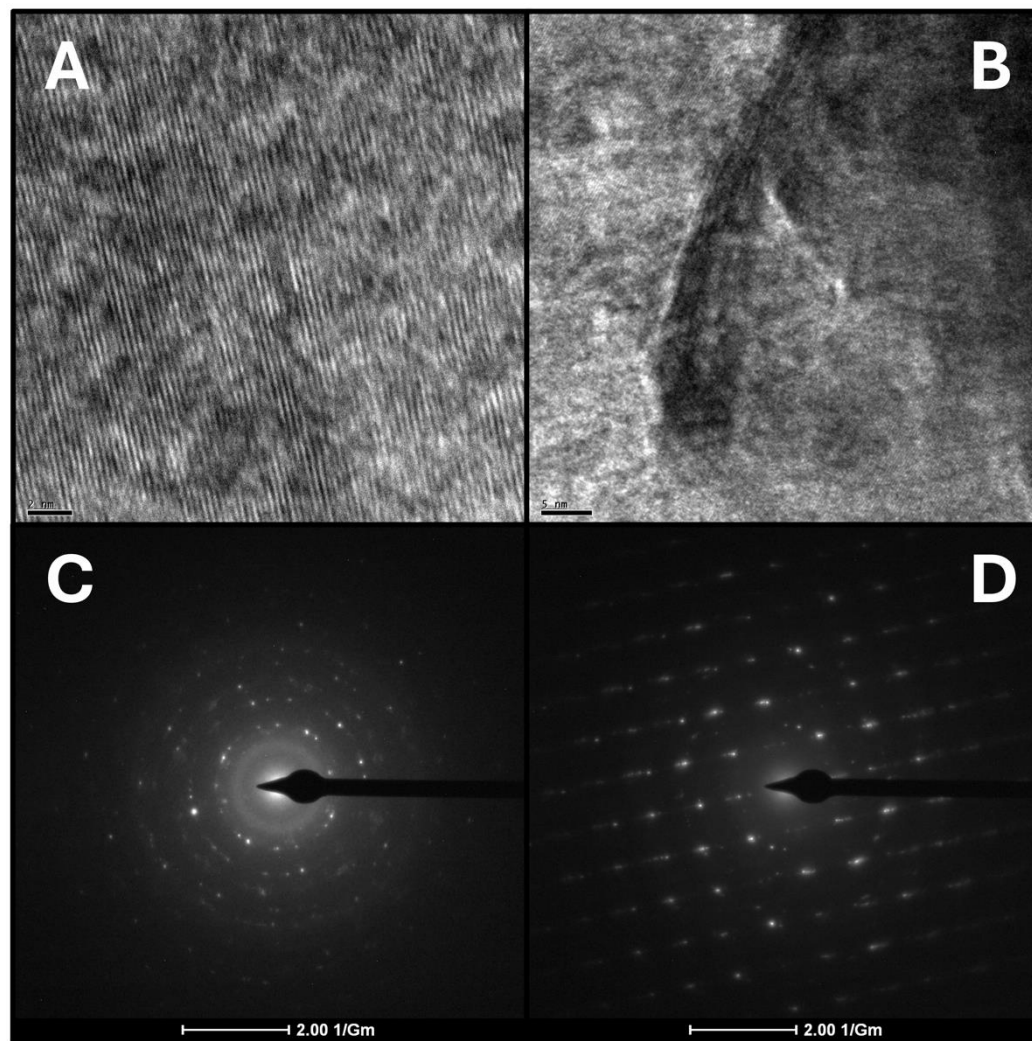


Figura 26 Micrografia de MET da amostra de BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento. **Fonte:** Autoria Própria.

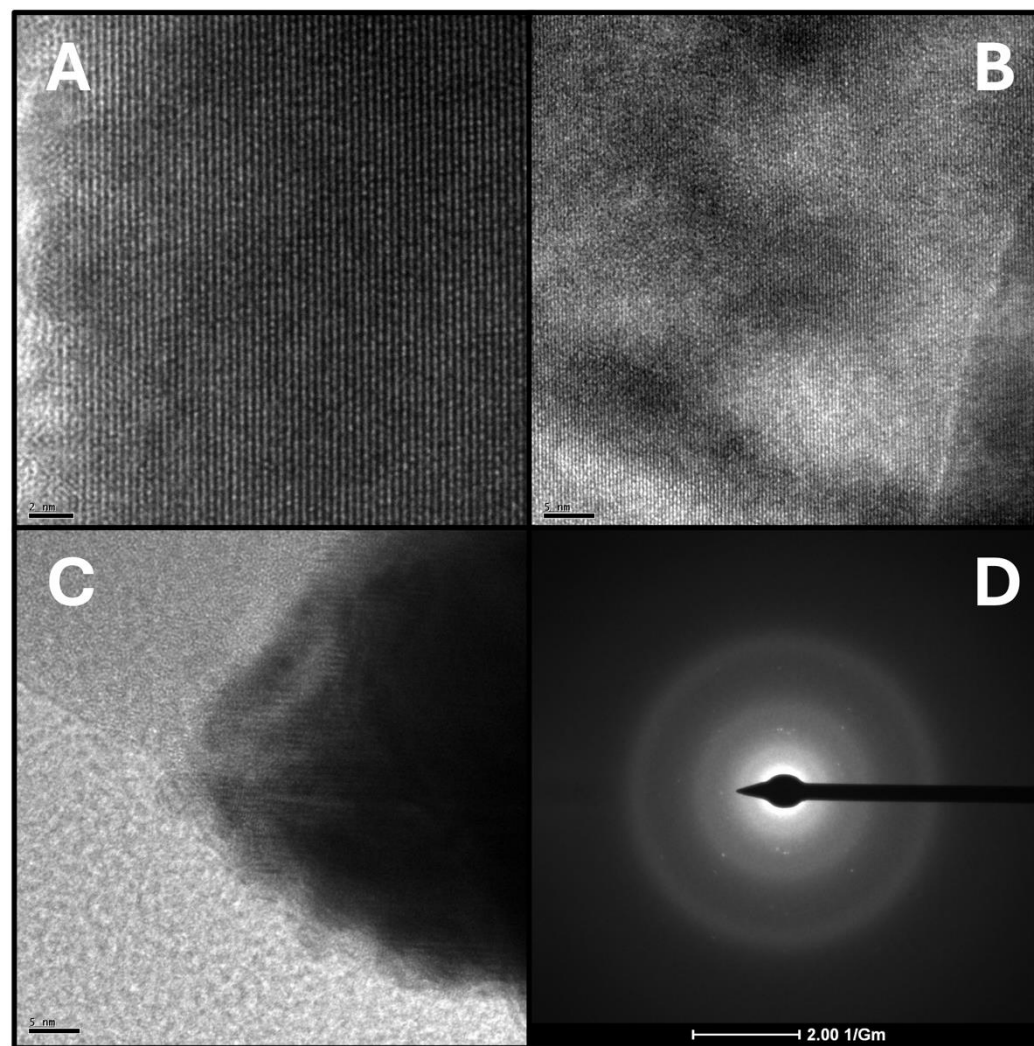


Figura 27 Micrografia de MET da amostra de BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento e calcinadas a 550 °C. **Fonte:** Autoria Própria.

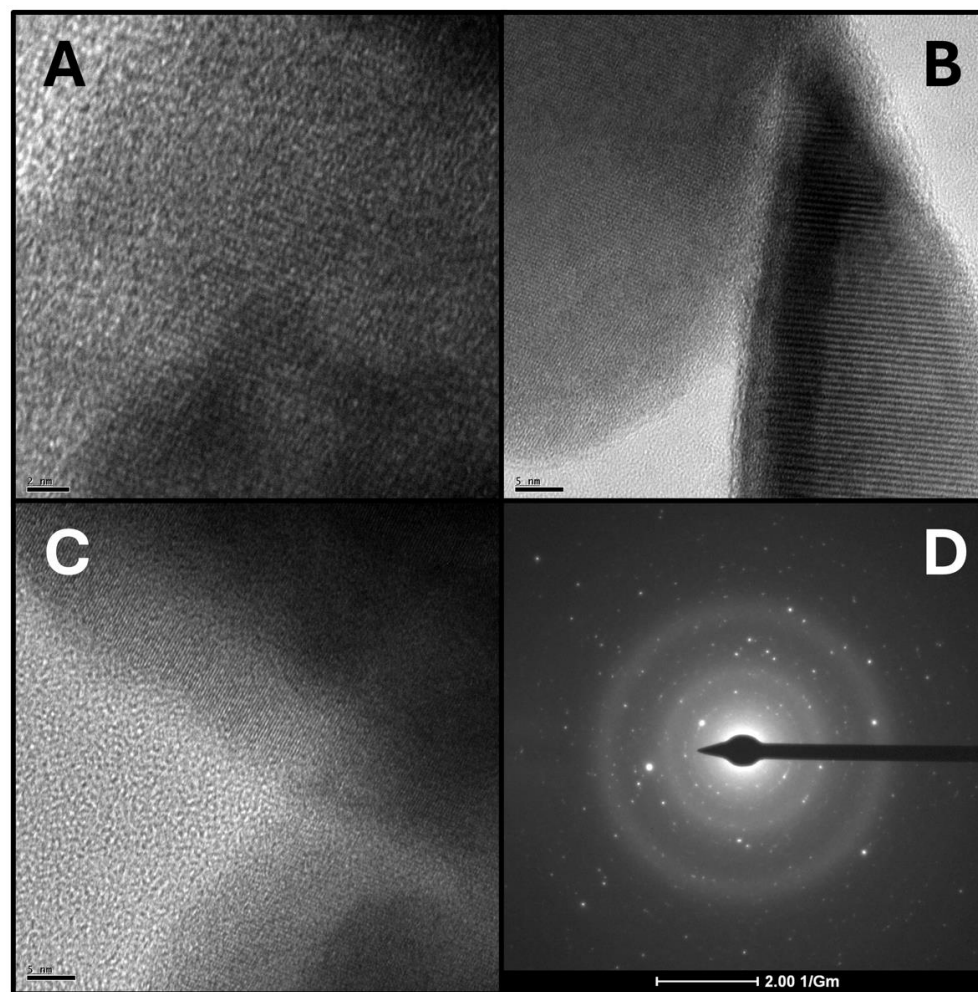


Figura 28 Micrografia de MET da amostra de BS sintetizados na presença de TPA Br com 24 horas de envelhecimento e calcinadas a 750 °C. **Fonte:** Autoria Própria.

6.1.7. Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN ^1H)

A Figura 29 mostra o espectro de polarização cruzada com rotação em ângulo mágico de ^1H ^{29}Si (CPMAS) de uma amostra de bismuto silicato recém-sintetizada usando um tempo de polarização cruzada (CT) de 1 ms. O espectro foi ajustado usando três funções Gaussianas com picos em 113,2 ppm, 102,5 ppm e 92 ppm, com áreas percentuais (relativas à área total do espectro) de 47%, 44% e 9%, respectivamente. Ao aumentar o tempo de polarização cruzada para 5 ms, as áreas percentuais mudam para 61%, 34% e 4%, enquanto as posições dos picos permanecem inalteradas.

Como é bem conhecido, a intensidade do ^1H ^{29}Si CPMAS varia com o tempo de polarização cruzada de acordo com a quantidade de núcleos de ^1H vizinhos, apresentando um aumento inicial até um máximo ser atingido, seguido por uma diminuição devido ao relaxamento dos spins (conhecido como relaxamento $T_{1\rho}$). Como a taxa do aumento inicial com o tempo de polarização cruzada é proporcional à densidade local de ^1H , adquirir espectros de ^1H ^{29}Si CPMAS com diferentes tempos de polarização cruzada é útil para identificar núcleos de ^{29}Si próximos a diferentes números de ^1H , fornecendo informações complementares aos deslocamentos químicos típicos (posição do pico), que dizem respeito à identificação do número de oxigênios ligantes do ^{29}Si . Nesse sentido, o deslocamento químico de 113,2 ppm, 102,5 ppm e 92 ppm observado na Figura 29 é consistente com a presença de grupos terminais de silanol Q4 $((\text{SiO})_3 - \text{Si}-\text{O}-\text{Si})$, Q3 $((\text{SiO})_3 - \text{Si}-\text{OH})$ e Q2 $((\text{SiO})_2=\text{Si}=(\text{OH})_2)$ (CARROLL et al., 2002). Isso é ainda mais confirmado ao observar que a área relativa do pico de 113,2 ppm aumenta de 47% para 61%, enquanto a área do sinal de -102,5 ppm diminui de 44% para 34% e a área dos picos de -92,0 ppm diminui de 9% para 4%. Esse comportamento mostra que, para o tempo de CT variando de 1 ms para 5 ms, o sinal de 113,2 ppm ainda está no aumento inicial (menos ^1H vizinhos), enquanto os picos de 102,5 ppm e 92 ppm já tiveram sua intensidade

diminuída devido ao relaxamento $T1\rho$, consistente com um ambiente local mais rico em ^1H . Além disso, o sinal de 102,5 ppm mostra uma redução menor na área do que o de 92 ppm, sugerindo que o primeiro tem menos ^1H ao redor. Em resumo, a atribuição dos sinais aos grupos terminais de silanol Q4, Q3 e Q2 está totalmente de acordo com as mudanças de intensidade observadas nos espectros de ^1H ^{29}Si CPMAS para tempos de polarização cruzada de 1 ms e 5 ms.

Para obter uma imagem mais quantitativa da quantidade relativa dos grupos terminais de silanol Q4, Q3 e Q2 na amostra, um espectro de Excitação por Pulso Único sob MAS (SPEMAS) foi adquirido com um tempo de reciclagem de 20 s. Sob essa condição, os espectros são mais quantitativos, então as áreas relativas dos picos obtidas a partir do ajuste fornecem uma boa estimativa da quantidade relativa dos grupos terminais de silanol Q4, Q3 e Q2 na amostra. No entanto, apesar de exigir um tempo de medição substancialmente maior do que o ^1H ^{29}Si CPMAS, os espectros ainda apresentam a pior relação sinal/ruído, tornando o ajuste com a posição dos picos como parâmetros livres não muito confiável. Assim, fixamos as posições dos picos Gaussianos obtidas a partir do espectro CPMAS e deixamos apenas as áreas relativas como parâmetro livre no ajuste. Com esse procedimento, a quantidade relativa dos grupos terminais de silanol Q4, Q3 e Q2 foi estimada como 77%, 11% e 12%, respectivamente, revelando um excesso considerável de grupos Q4 em comparação com Q3 e Q2, onde Q1 parece ser negligenciável.

Além do ^{29}Si NMR, espectros de ^1H MAS a 15 kHz e ^{13}C CPMAS a 25 kHz também foram adquiridos, Figura 30. O espectro de ^1H mostra sinais em torno de 1,0 ppm (pico d) e 1,7 ppm (pico c), indicando a presença de solventes orgânicos. Também é observado um sinal em torno de 3,4 ppm (pico b), provavelmente decorrente de grupos terminais Si-OH em troca com água fisicamente adsorvida. Um sinal menor a 4,75 ppm

(pico a) emerge da umidade da amostra. O espectro é amplo e sinais menores podem passar despercebidos. Não está claro se o sinal a 1,0 ppm pode ter um ombro em torno de 1,1 ppm. Este ombro poderia ser decorrente de terminações SiOH não ligadas. No entanto, o nível aparente de umidade da amostra fala contra a presença de grupos hidroxila não ligados, mostrando uma presença clara do SDA no produto recém-sintetizado. Os espectros de ^1H MAS também parecem ser dominados por esses compostos. Os espectros de ^{13}C confirmam a presença de solventes orgânicos da síntese.

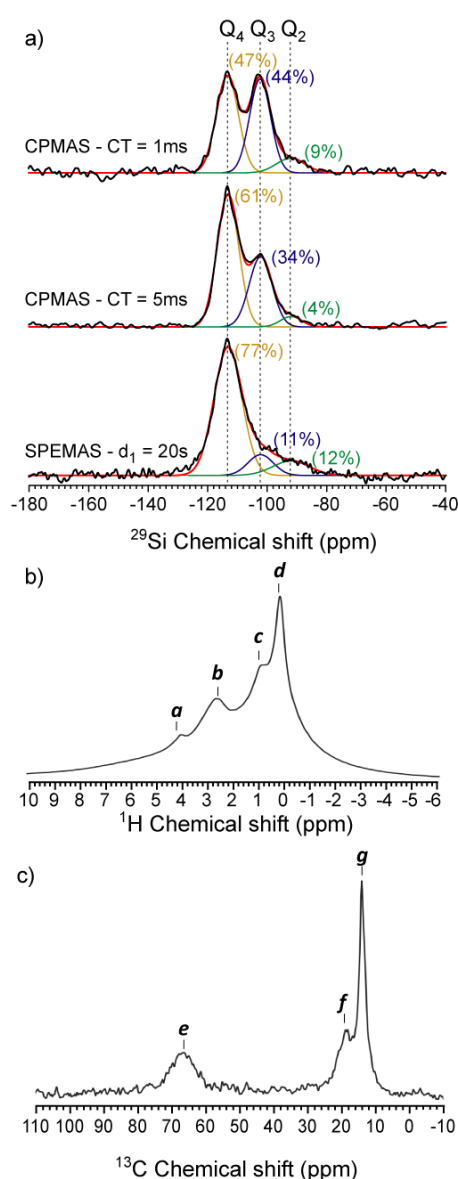


Figura 29 Espectros de RMN de estado sólido com rotação no ângulo mágico de uma amostra de bismuto silicato como fabricado. (a) Topo: espectros de ^1H ^{29}Si de polarização cruzada sob rotação no ângulo mágico (CPMAS)

adquiridos com tempo de polarização cruzada (CT) de 1ms. Também é mostrado o ajuste dos espectros usando três linhas gaussianas com posições e porcentagens indicadas. Meio: espectros de CPMAS com tempo de contato de 5 ms. Inferior: espectros de Excitação de Pulso Único sob rotação no ângulo mágico (SPEMAS) adquiridos com tempo de reciclagem (d_1) de 20s. O ajuste dos espectros foi realizado usando três linhas gaussianas nas mesmas posições das mostradas em (a) e (b) e resultando nas áreas percentuais indicadas. (b) Espectro EASY de ^1H da amostra de bismuto silicato como fabricado. (c) Espectros de ^1H - ^{13}C CPMAS da amostra de bismuto silicato as made. **Fonte:** Autoria Própria.

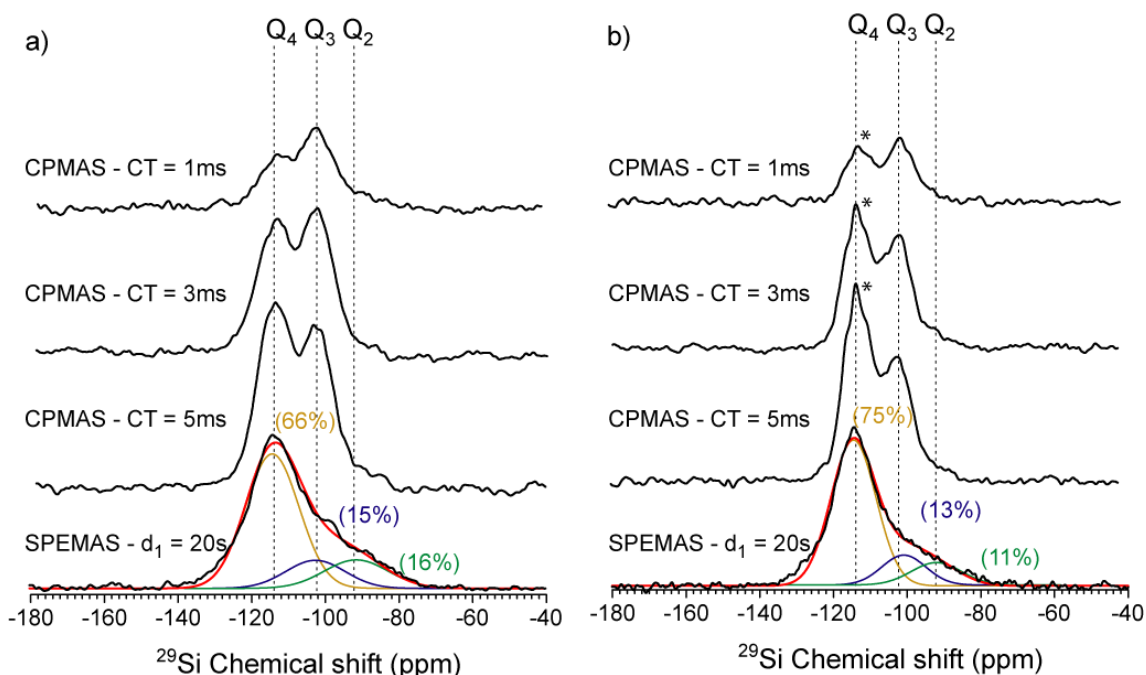


Figura 30 Espectros de RMN de estado sólido de ^{29}Si com rotação no ângulo mágico de amostras envelhecidas de bismuto silicato. (a) Amostra a com 12 horas de envelhecimento. Topo e meio: espectros de ^1H ^{29}Si CPMAS adquiridos com tempo de polarização cruzada (CT) de 1ms e 5ms. Inferior: ^{29}Si SPEMAS adquiridos com longo tempo de relaxamento (20s) juntamente com os ajustes gaussianos considerando os grupos terminais Q2, Q3 e Q4 de silanol como na Fig. 17. As porcentagens de cada tipo de grupo estão indicadas. (b) Mesmo que (a) para a amostra com 24 horas de envelhecimento. **Fonte:** Autoria Própria.

Os espectros de RMN de ^{29}Si dos bismutos silicatos preparados usando TPA Br com tempos de envelhecimento de 12 h e 24 h são mostrados na Figura 31. Os espectros de ^1H - ^{29}Si CPMAS e SPEMAS revelam a presença de grupos terminais de silanol Q4, Q3 e Q2, com um excesso considerável de grupos Q4. No entanto, ao comparar o ^1H - ^{29}Si CPMAS de ambas as amostras, é possível notar o aparecimento de alguma estrutura de

sinal mais nítida (marcada com um asterisco) na amostra preparada com 24h de envelhecimento. Isso pode ser visto como resultado de um aumento na ordem estrutural local, que pode estar relacionado com o aparecimento da fase mais cristalina após 24 horas de envelhecimento, conforme mostrado nos resultados de difração de raios X apresentados na Figura 17.

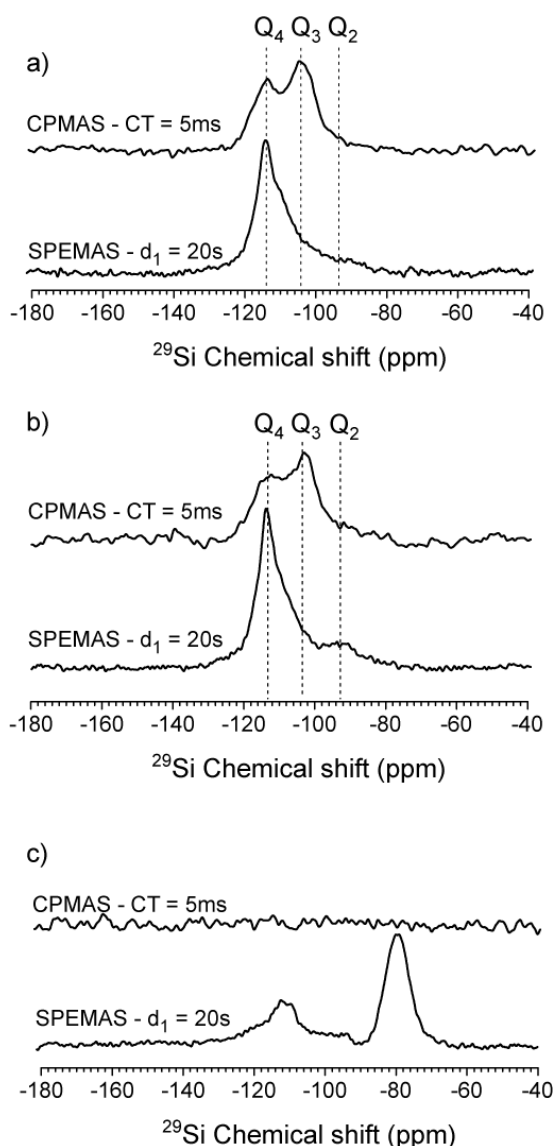


Figura 31 Espectros de ^1H ^{29}Si CPMAS e ^{29}Si SPEMAS de amostras de bismuto silicato calcinadas a 450 °C (a), 550 °C (b) e 750 °C (d). **Fonte:** Autoria Própria.

O efeito da calcinação das amostras no espectro de RMN de ^{29}Si é mostrado na Figura 31. Como pode ser observado, há uma diminuição progressiva na relação

sinal/ruído do ^1H - ^{29}Si CPMAS para temperaturas de calcinação mais elevadas. Isso ocorre devido à perda de hidrogênio pelo processo de calcinação, o que diminui a eficiência do processo de cross-polarization de ^1H - ^{29}Si . De fato, para a temperatura de calcinação de 750 °C, nenhum sinal de ^1H - ^{29}Si CPMAS é detectado, indicando a ausência de hidrogênio próximo ao ^{29}Si na amostra. Interessantemente, os espectros de ^{29}Si SPEMAS são semelhantes para as temperaturas de calcinação de 450 °C e 550 °C, mas mudam drasticamente para a temperatura de calcinação de 750 °C, mostrando que a perda de hidrogênio é acompanhada por uma mudança drástica na estrutura local dos grupos ^{29}Si , em concordância com os resultados de difração de raios X e FTIR.

6.1.8. Absorção de Raios-X próximo à estrutura da borda (XANES)

Após a aquisição experimental dos espectros de Estrutura Próxima da Borda de Absorção por Raios-X (XANES) para as espécies de bismuto (Bi) na linha BAM da instalação BESSY II, a análise dos dados foi realizada para alinhar e comparar esses espectros experimentais com modelos teóricos. Na Figura 32, são mostradas as medições individuais e a derivação desses dados.

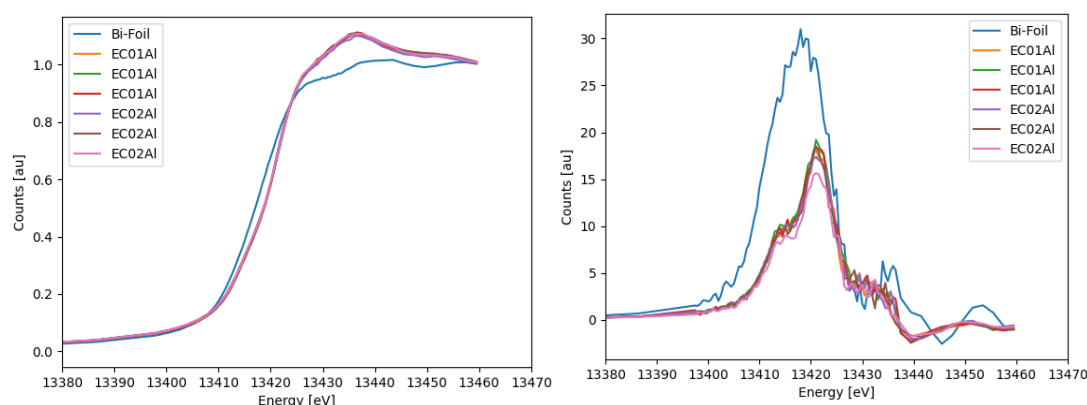


Figura 32 Os espectros de XANES e a derivação dos espectros de XANES para a folha de Bi, que serve como padrão, e as medições repetidas nas amostras BS1 sintetizado com TPA Br e 24 horas de envelhecimento e BS2 sintetizado com TPA Br e 12 horas de envelhecimento. **Fonte:** Autoria Própria.

Para análises adicionais, obtivemos os espectros teóricos calculados de XANES do Projeto de Materiais através da API REST (JI et al., 2017; QIU et al., 2021). Otimização bayesiana, implementada via Scikit-Optimize, foi utilizada para otimizar o ajuste entre os espectros teóricos e experimentais. Isso envolveu ajustar parâmetros de escala e deslocamento para minimizar a discrepância entre eles. Os parâmetros otimizados foram então aplicados aos espectros teóricos para ajustá-los de perto aos dados experimentais. A análise comparativa incluiu plotagem dos espectros originais e ajustados, bem como de suas primeiras derivadas, para avaliar o alinhamento em termos de posições e intensidades de picos. Como exemplo, mostramos na Figura 33 o ajuste e a derivada para a folha de Bi e como exemplo para uma medição da amostra BS1. Para todas as medições, o melhor ajuste foi obtido com o material mp-558953, que é o Bi_2O_3 . Considerando as diferenças entre experimento e simulação, como a resolução de energia da medição, o acordo é satisfatório.

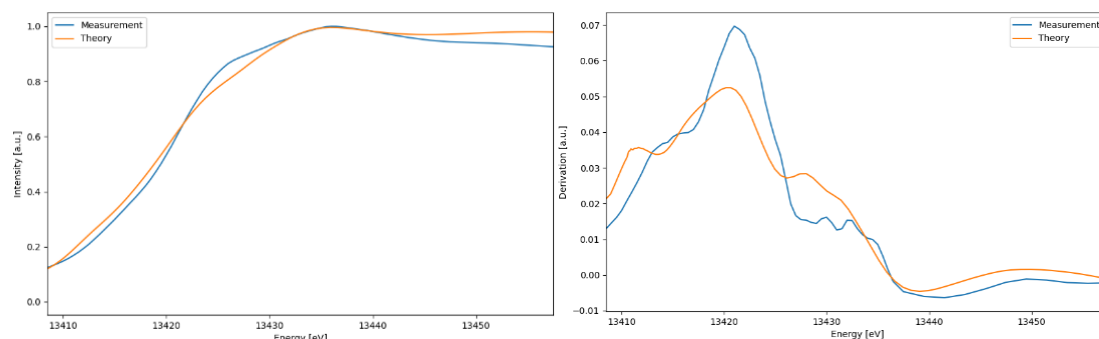


Figura 33 Comparação dos espectros de XANES medidos e a derivação em comparação com os espectros teóricos para mp-558953 do material. **Fonte:** Autoria Própria.

6.2. Modulação da superfície do suporte

A Figura 34 mostra dados de DRX para diferentes modificações de superfície deste suporte. Os resultados de DRX para a silanização e funcionalização mostram padrões quase idênticos, com perda de cristalinidade visível em todos os padrões de difração, apoiando a probabilidade de um tratamento químico bem-sucedido. A

imobilização da lacase na superfície do BS reduziu a intensidade dos picos. No entanto, a fase ou natureza do material sintetizado não foi afetada, como evidenciado pelo padrão de difração.

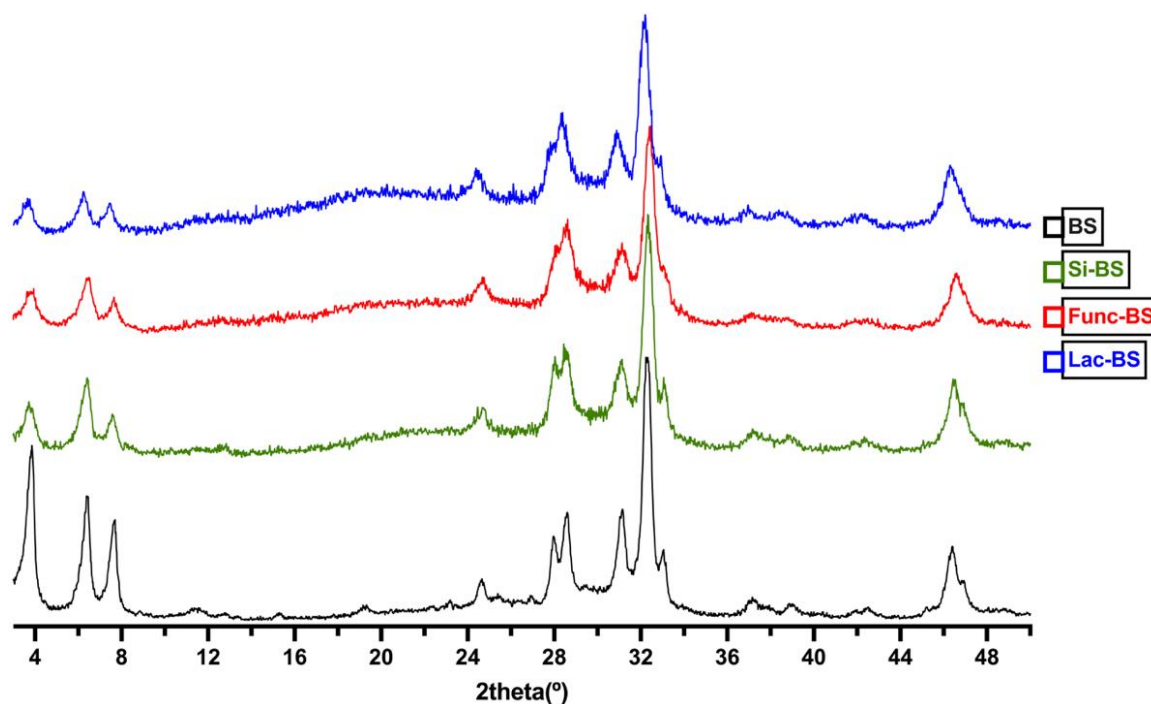


Figura 34 Padrões de DRX usados para investigar a estrutura cristalina e a composição de fases do BS preparado. BS (linha preta); Si-BS (linha verde); Func-BS (linha vermelha); Lac-BS (linha azul). **Fonte:** Autoria Própria.

A investigação do FT-IR foi realizada para os grupos funcionais incluídos nos materiais, conforme mostrado na Figura 35. Vibrações associadas aos tetraedros internos (TO_4) e ligações externas entre tetraedros são observadas na faixa de 400 a 1300 cm^{-1} para o BS (FLANIGEN; KHATAMI; SZYMANSKI, 1974). Características-chave são indicadas por bandas de absorção em 469 cm^{-1} (1), 801 cm^{-1} (2), 1119 cm^{-1} (3), 1381 cm^{-1} (4), 1442 cm^{-1} (5), 1570 cm^{-1} (6), 1640 cm^{-1} (7), 2150 cm^{-1} (8), 2370 cm^{-1} (9), 2959 cm^{-1} (10) e 3446 cm^{-1} (11). Os picos proeminentes em 1119 cm^{-1} e 3446 cm^{-1} , respectivamente, representam o estiramento assimétrico de Si-O-Si e a frequência vibracional de grupos O-H. A banda em 1381 cm^{-1} é atribuída ao esqueleto C-N, bandas em torno de 1600 cm^{-1} podem ser creditadas às vibrações N-H devido aos grupos R-NH_2 agora ligados à

superfície, e bandas em torno de 2900 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de estiramento C-H. Esses resultados corroboram a existência de bandas C-NH-C devido à reação do grupo etóxido-amina após o processo de silanização. Posteriormente, a funcionalização química com glutaraldeído mostra uma banda de absorção em torno de 1640 cm^{-1} C=N que se sobrepõe em Func-BS e Lac-BS devido à interação entre o grupo aldeído e o BS-NH₂, formando grupos amida II presentes em ambos os processos, confirmando a alteração química da superfície e o processo de imobilização (MAHMOODI; SAFFAR-DASTGERDI, 2020b; TOCCO et al., 2023).

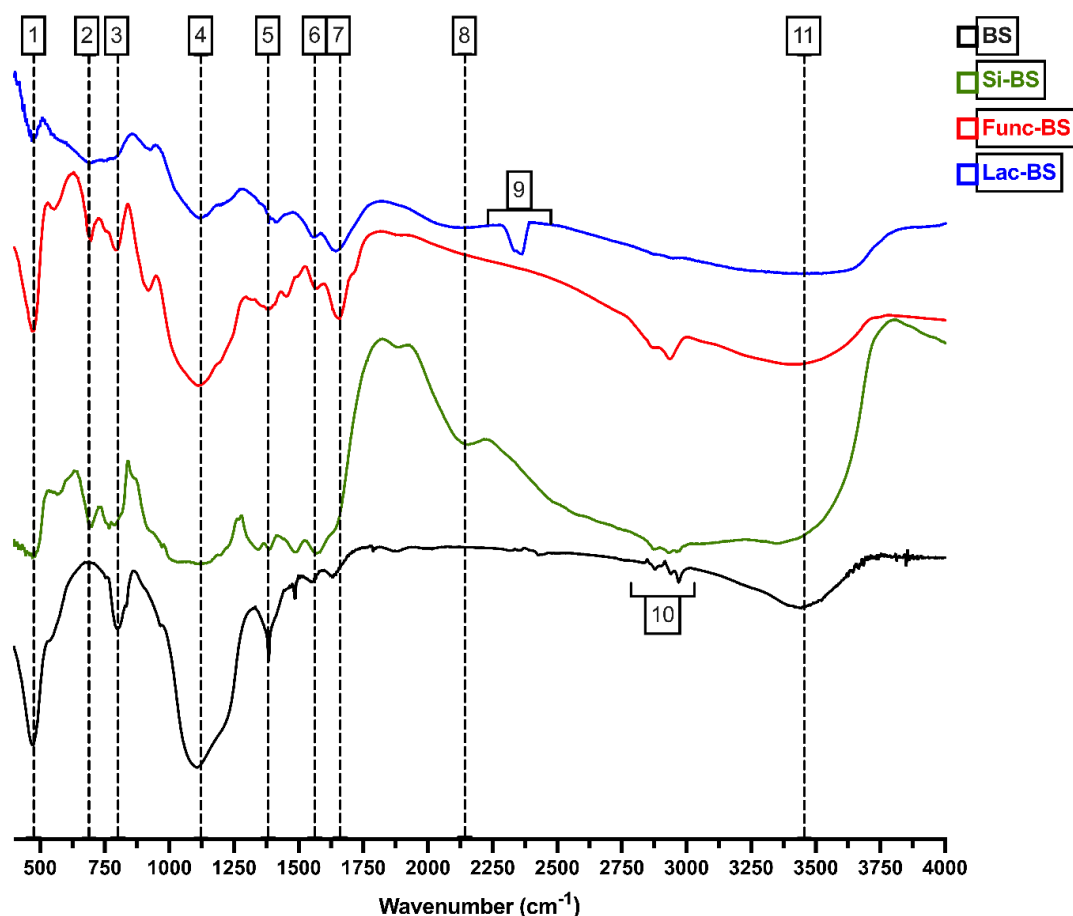


Figura 35 Espectros de FT-IR de BS (linha preta); Si-BS (linha verde); Func-BS (linha vermelha); Lac-BS (linha azul).

Fonte: Autoria Própria.

6.3. Delineamento Experimental

Alta eficiência na imobilização da lacase foi alcançada com o suporte BS (Figura 36a), atingindo 100% de rendimento na imobilização (IY). Este resultado sugere que o

processo de imobilização é altamente eficiente, permitindo a ligação cruzada bem-sucedida das enzimas ao suporte. Além disso, o rendimento da imobilização não foi afetado pela variação sistemática da massa do suporte de 15 mg a 25 mg, resultando em um rendimento de 100% e implicando que o suporte pode fornecer área de superfície suficiente e locais de ligação para a enzima, alcançando máxima eficiência na imobilização.

Além disso, nosso estudo considerou o efeito da variação das concentrações de enzima (0,5, 1 e 1,5 U/mL) no processo de imobilização. Os resultados mostraram altos rendimentos de imobilização; no entanto, é importante mencionar que, em concentrações mais altas de enzima, o rendimento da imobilização diminuiu, alcançando um mínimo de $55,47 \pm 3,51\%$. Isso pode ser atribuído à saturação dos sítios de ligação do suporte. Isso sugere uma faixa ótima de atividade de enzima junto com a massa do suporte para alcançar a máxima otimização do método. Os resultados obtidos nesta pesquisa são consistentes com aqueles relatados em estudos anteriores (FORTES et al., 2017; MODKOVSKI et al., 2021; WU et al., 2019). (FORTES et al., 2017; MODKOVSKI et al., 2021), empregaram nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 com a superfície modificada com aminosilanos (APTMS e APTES, respectivamente) e glutaraldeído utilizando concentrações de enzima de 2 U/mL e 0,1, 0,3 e 1 U/mL, respectivamente (FORTES et al., 2017; MODKOVSKI et al., 2021). (WU et al., 2019), estudaram diferentes estruturas metal-orgânicas (Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$, MIL-101(Cr), MIL-101(Cr)- NH_2 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{@MIL-101(Cr)}$) amino-funcionalizadas variando a carga de lacase de 0,05 a 0,30 mL/mL. Embora os autores não tenham utilizado a mesma matriz inorgânica para imobilizar lacases, observaram a mesma tendência no comportamento da enzima (WU et al., 2019).

Este resultado é importante porque sugere que a atividade de enzima dentro da faixa testada impacta significativamente o processo de imobilização. Isso é especialmente relevante para aplicações práticas, pois sugere que mesmo em concentrações mais baixas de enzima, é possível alcançar uma imobilização eficiente, o que poderia resultar em benefícios econômicos em processos em larga escala.

A atividade recuperada da Lac-BS (Figura 36b) demonstrou uma relação entre a atividade final da enzima e a atividade inicial de enzima fornecida para o processo de imobilização. Observamos a ocorrência de hiperativação enzimática ($109,78 \pm 2,88\%$), onde a atividade da enzima superou a atividade inicial da enzima livre em 0,5 U/mL. Uma possível explicação para esses resultados é que durante a imobilização, as enzimas podem sofrer mudanças conformacionais que tornam seus sítios ativos mais acessíveis ou mais eficientes na catalisação de reações; além disso, a matriz de suporte pode fornecer uma superfície ou estrutura ideal para a ligação da enzima, o que pode resultar em uma orientação melhorada da enzima, acesso ao substrato e possível proteção da enzima durante o processo catalítico. A lacase imobilizada manteve sua atividade completa após o processo. Essa ocorrência intrigante foi observada inicialmente por (GEORGE et al., 2022; PATEL; KALIA; LEE, 2023). (GEORGE et al., 2022), conseguiram atividades de lacases de agregados de *Trametes versicolor* (CLEAs) de 204%, 124% e 182%. Eles continuaram a aprimorar seus resultados utilizando uma combinação de sulfato de amônio e t-butanol (TPP), resultando em uma atividade ainda maior de 281% (GEORGE et al., 2022). Seguindo seus passos, (PATEL; KALIA; LEE, 2023), realizaram uma implementação bem-sucedida de um processo que envolveu a modificação da superfície de uma matriz inorgânica. O objetivo era imobilizar lacases de *Rhus vernicifera* em nanopartículas magnéticas de cobre. A atividade relativa (AR) resultante foi encontrada entre 140-112% (PATEL; KALIA; LEE, 2023). Os pesquisadores observaram que, à

medida que o carregamento de proteína aumentava, a atividade recuperada diminuía em certa medida.

É importante entender que conforme a atividade da enzima aumenta para 1 U/mL e 1,5 U/mL, a atividade recuperada diminui. Isso pode ser devido à superlotação da superfície de suporte em concentrações mais altas de enzima, o que pode causar interferência estérica e restringir o acesso dos substratos aos sítios ativos da enzima. Além disso, altas concentrações de enzima podem levar a interações intermoleculares entre as moléculas de enzima, o que pode resultar em agregados ou complexos enzimáticos menos cataliticamente ativos do que moléculas individuais de enzima (BEGUM et al., 2019; PATEL; KALIA; LEE, 2023; PEZZELLA et al., 2014; SCHMIDT-WINKEL et al., 1999).

O desenvolvimento da hiperativação enzimática implica que o processo de imobilização introduziu um microambiente único e altamente favorável para a lacase. A interação elaborada entre a matriz inorgânica e as propriedades catalíticas da enzima sugere efeitos sinérgicos, contribuindo para um nível melhorado de atividade enzimática. Modelos bioinformáticos têm sido explorados para explicar a hiperatividade enzimática, o que melhora a compreensão desses fenômenos e suas implicações biotecnológicas.

A maioria dos estudos que avaliaram a atividade recuperada de lacase imobilizada apresentaram resultados inferiores aos apresentados neste artigo. (BRYJAK; SZYMAŃSKA; JARZEBSKI, 2012) imobilizou lacase de *Cerreña unicolor* em espuma silicosa mesoestruturada (MCF) e em três sílicas mesoporosas hexagonalmente ordenadas (SBA-15L, SBA-15SF e SBA-15S) via adsorção e ligação covalente, obtendo uma atividade recuperada de 5,5 a 44,6%. (HU et al., 2015) utilizou nanopartículas de sílica magnética amino-funcionalizadas (AF-MSNPs) como suporte para imobilizar lacase de *Aspergillus sp.*, obtendo uma atividade recuperada média de $53,4 \pm 3,1\%$.

Com base nos resultados obtidos por meio do delineamento experimental sistemático, identificamos com sucesso uma condição ótima por meio de análises estatísticas (Figura 37) para nossos próximos experimentos e alcançamos resultados promissores em comparação com a literatura.

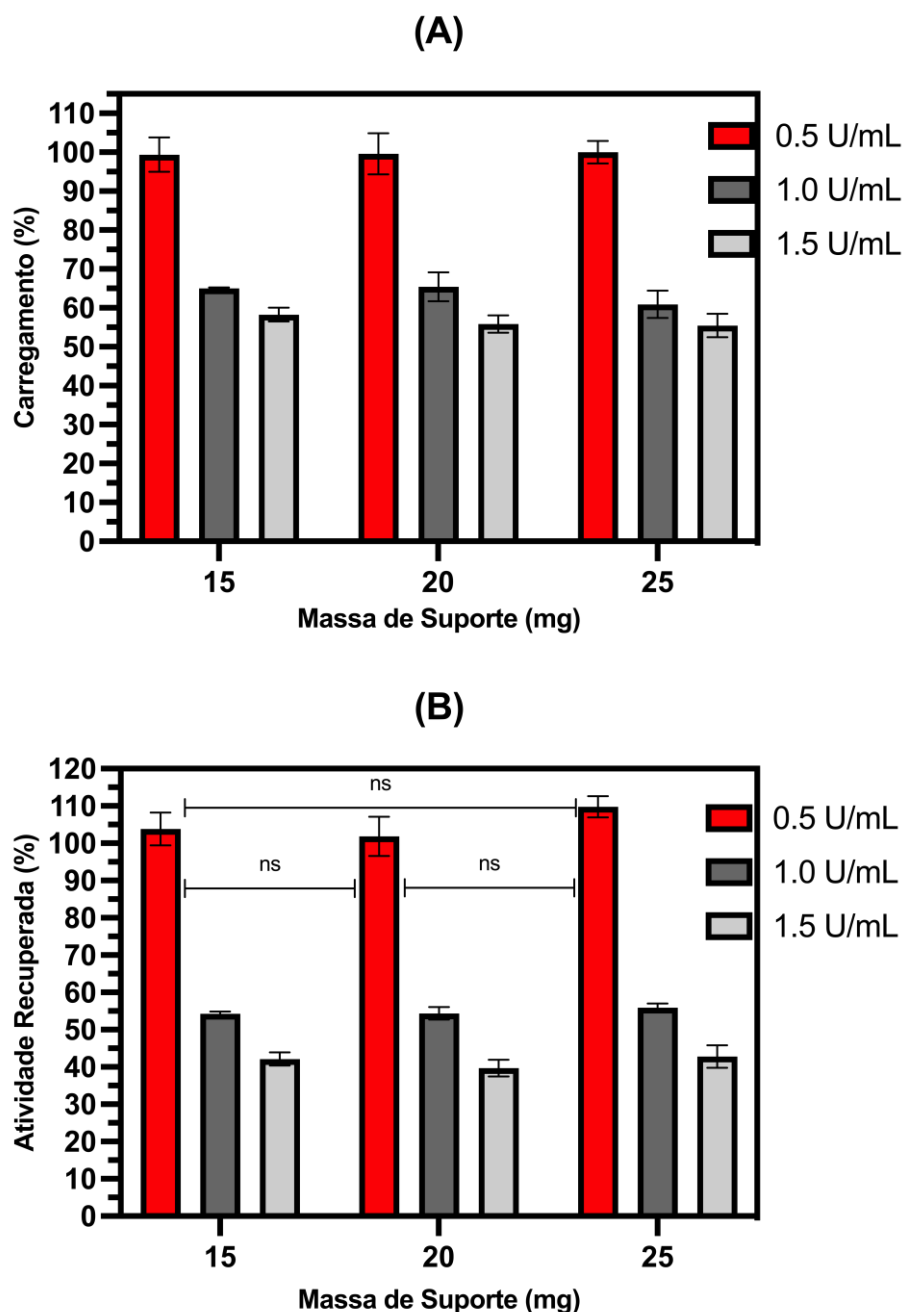


Figura 36 (a) Resultados do rendimento de imobilização do desenho experimental variando massa e atividade enzimática. Cada ponto representa o erro padrão de duas experiências. (b) Resultados da atividade recuperada do desenho experimental variando massa e atividade enzimática. Cada ponto representa o erro padrão de duas experiências.

ns: $p > 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

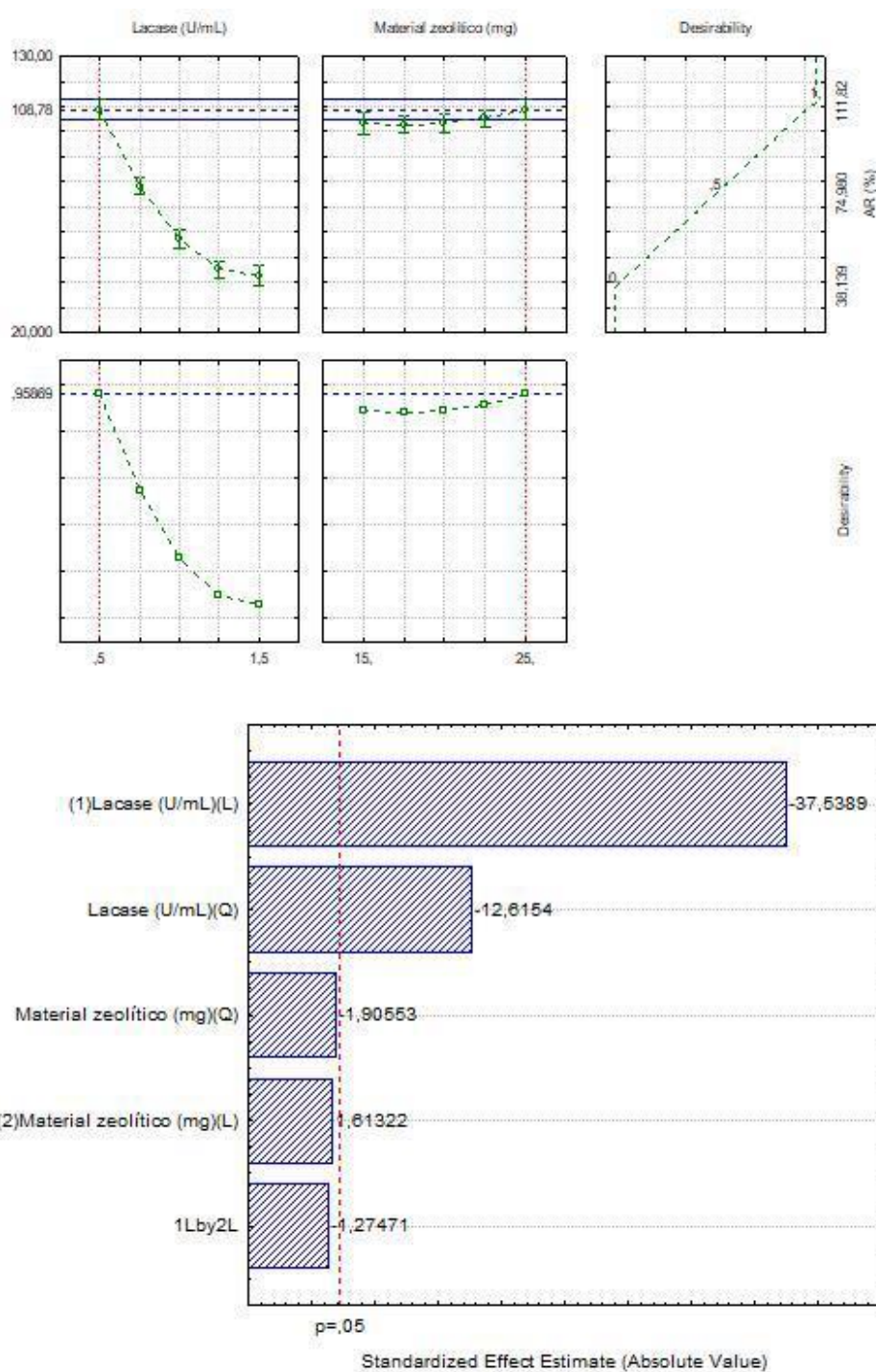


Figura 37 A) mostra os gráficos estatísticos de perfil desejabilidade de unidades de lacase versus massa de material de suporte empregado no planejamento experimental para a condição ótima para experimentos futuros; B) mostra o gráfico estatístico de Pareto empregado no planejamento experimental para a condição ótima para experimentos futuros. **Fonte:** Autoria Própria.

6.4. Modelo de Bioinformática

As trajetórias de dinâmica molecular de cada execução independente foram observadas convergir, conforme indicado pelo raio de giração da proteína (ver Figura

38a). Consequentemente, as trajetórias foram concatenadas e a trajetória final resultante foi submetida à análise de componentes principais para filtrar os movimentos de alta frequência. Os primeiros dez componentes principais explicam coletivamente aproximadamente 43% do movimento da proteína, sendo que o primeiro componente sozinho representa 13,3% (Figura 38b).

A visualização molecular das trajetórias usando PyMol não revelou mudanças conformacionais significativas que resultariam na exposição completa do sítio ativo da lacase. No entanto, embora o íon cobre no sítio catalítico estivesse completamente enterrado na estrutura cristalográfica, foi observado na superfície molecular da proteína em instantâneos obtidos das simulações de dinâmica molecular. Especificamente, observou-se que o loop contendo os resíduos Lys188 - Pro193 adota uma conformação diferente, aumentando o volume do bolso ao redor do sítio ativo (ver Figura 38c). Além disso, os resíduos Leu363, Phe371 e Leu429 localizados dentro do sítio ativo impõem restrições à acessibilidade ao solvente. No entanto, suas coordenadas originais permanecem relativamente inalteradas ao longo da dinâmica.

Além disso, cada componente principal na trajetória de dinâmica molecular expandiu o volume do bolso do sítio ativo. Esta observação foi feita usando PyMol, e o TRAPP foi empregado para quantificar o aumento de volume devido à avaliação da dinâmica molecular. O volume original do bolso a partir da estrutura cristalográfica era de 342 Å³. O primeiro componente principal aumentou para 359 Å³, alcançando um máximo de 379 Å³ antes de diminuir para 330 Å³ (Figura 38d). Notavelmente, o nono componente principal apresentou o maior aumento de volume do bolso, atingindo 423 Å³, representando um aumento de 24% em relação à estrutura cristalográfica (ver Figura 38d). As mudanças conformacionais observadas nas simulações de dinâmica molecular refletem movimentos inerentes da proteína.

Consequentemente, postula-se que a enzima se estabilizaria em uma conformação aberta após a imobilização, resultando em um maior volume do bolso. Este aumento de volume proporcionaria maior acesso ao substrato pela enzima no sítio ativo, potencializando assim a atividade enzimática. Uma vez que a imobilização da enzima ocorre em resíduos de lisina, Lys188 pode ser um potencial local para estabilizar a lacase de *Myceliophthora thermophila* em uma conformação aberta.

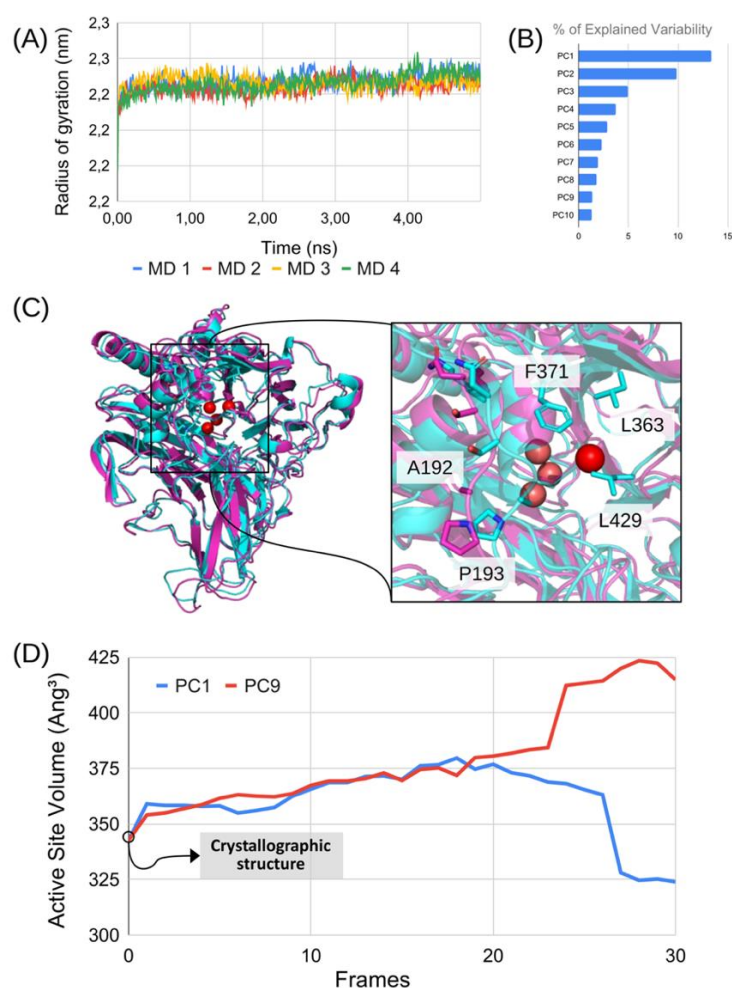


Figura 38 Modelagem bioinformática da função da lacase: (A) Quatro etapas de simulações de dinâmica molecular livre demonstram a convergência do raio de giração da proteína (nm) durante a simulação de 5 ns. (B) Análise de componentes principais das trajetórias concatenadas da proteína indica que o primeiro componente principal representa aproximadamente 13% dos principais movimentos da proteína. (C) Sobreposição da estrutura cristalográfica da lacase e uma imagem da nona componente principal revela o loop compreendendo Lys188 - Pro193. (D) Monitoramento do volume do bolso através da análise de componentes principais mostra um aumento no volume do bolso do sítio ativo para 379 Å³ e 423 Å³ nos primeiros e nonos componentes principais, respectivamente. **Fonte:** Autoria Própria.

6.5. Caracterização bioquímica do biocatalisador

6.5.1. Temperatura Ótima e Estabilidade Térmica

Figura 39 mostra a investigação da temperatura ótima para a operação da lacase imobilizada, um aspecto crucial da biotecnologia enzimática, pois fornece esclarecimentos sobre o desempenho da enzima sob condições térmicas variáveis. Nossos resultados, que indicaram que a maior atividade da lacase foi alcançada a 40 °C, são consistentes com o comportamento esperado das lacases, como biocatalisadores altamente especializados, as enzimas exibem uma interação complexa de parâmetros cinéticos e termodinâmicos que controlam sua atividade (BRYJAK; SZYMAŃSKA; JARZEBSKI, 2012; HU et al., 2015). Em nosso estudo, a observação da maior atividade da lacase a 40 °C pode ser atribuída à sensibilidade inerente da temperatura à taxa de reação enzimática. Nessa temperatura, a taxa de movimento molecular e colisões de substrato são aumentadas, facilitando reações enzimáticas mais frequentes. Esses resultados estão alinhados com o entendimento convencional de que reações catalisadas por enzimas tendem a exibir atividade aumentada em temperaturas moderadas, otimizando o equilíbrio entre movimento molecular e estabilidade enzimática.

As enzimas possuem uma faixa de temperatura ótima na qual funcionam mais eficientemente, além da qual a atividade diminui gradualmente. A redução da atividade da lacase a 25 °C pode ser atribuída ao efeito da temperatura na taxa de reação, onde o movimento molecular é reduzido em temperaturas mais baixas, e a maioria das moléculas enzimáticas exibe atividade catalítica diminuída, mas a atividade recuperada do Lac-BS é significativamente aumentada em comparação com a enzima livre, uma possível explicação para este efeito alinha-se com modelagem bioinformática, onde foi indicado que o volume do sítio ativo em Lac-BS é principalmente aumentado, facilitando o acesso ao substrato, resultando em uma atividade recuperada mais significativa mesmo em

temperaturas mais baixas. A desnaturação das enzimas em altas temperaturas poderia explicar esta observação. A 50 °C, a enzima lacase pode ter passado pelo desdobramento de sua estrutura tridimensional e subsequente perda de função catalítica (HAKAMADA; TAKAHASHI; MABUCHI, 2012; PATEL et al., 2014; YANG et al., 2017). Por outro lado, as características hierárquicas do BS podem estar protegendo a enzima, diminuindo os efeitos da temperatura na estrutura e preservando a atividade recuperada, como mostrado na Tabela 8.

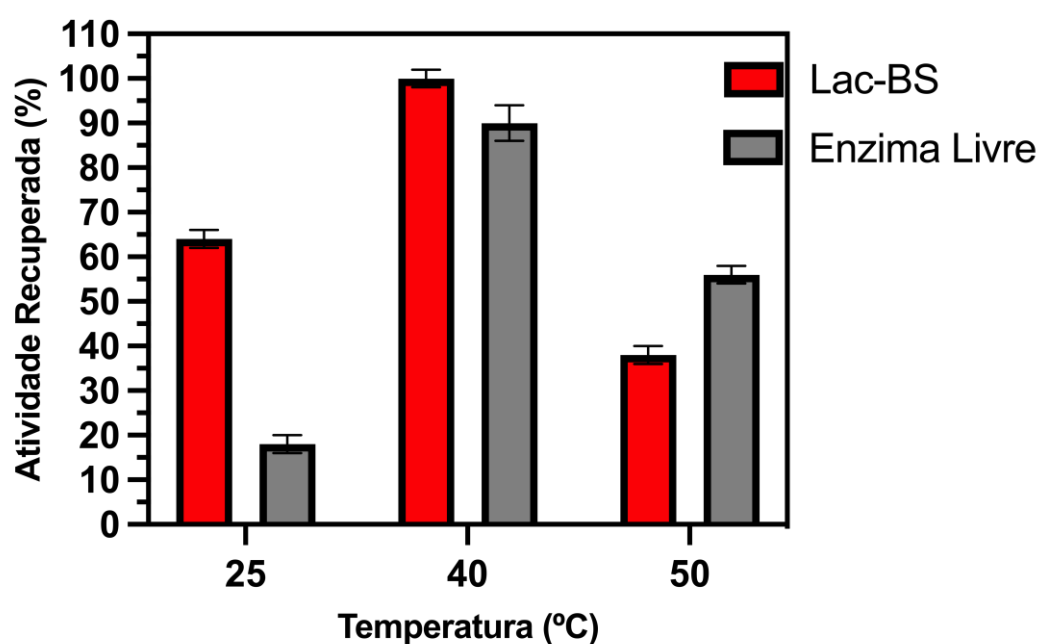


Figura 39 Efeito da temperatura na atividade da enzima imobilizada (barra vermelha) e da enzima livre (barra cinza).

Cada ponto representa o erro padrão de três experimentos. **Fonte:** Autoria Própria.

Tabela 8 Diferentes materiais e suas propriedades texturais utilizados como matrizes inorgânicas para imobilização de enzimas. **Fonte:** Autoria Própria.

Lacase	Suporte	Área Superficial (m²/g)	Volume de Poros Micro/meso (cm³/g)	Atividade Relativa (%)	Referência
<i>Trametes versicolor</i>	NaY	426.5	0.15/0.07	74.4	(AMERI et al., 2021)
<i>Trametes versicolor</i>	HR-Y	462.4	0.20/0.08	98	(AMERI et al., 2021)
<i>Trametes versicolor</i>	ZSM-5	398.8	0.14/0.06	71.6	(AMERI et al., 2021)
<i>Trametes versicolor</i>	HR-ZSM-5	461.5	0.25/0.34	94	(AMERI et al., 2021)
<i>Aspergillus sp.</i>	HR-MFI zeolite	534	0.27	79.4	(TOCCO et al., 2023)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	BS	310	0,054/0,36	109	Esse trabalho

Nossa exploração da estabilidade térmica do Lac-BS é mostrada na Figura 40 e proporcionou a compreensão, especialmente ao contrastá-la com o desempenho da enzima livre. Os resultados mostram diferenças significativas na estabilidade térmica entre as formas livre e imobilizada, com a lacase imobilizada exibindo superior estabilidade.

A descoberta de que a lacase imobilizada mantém sua atividade de maneira mais eficaz ao longo do tempo em temperaturas elevadas em comparação com a enzima livre enfatiza as vantagens da imobilização para melhorar a estabilidade enzimática. Esta melhoria na estabilidade térmica é de extrema importância para aplicações biotecnológicas e industriais, pois permite que a enzima suporte as condições rigorosas de diversos processos (HAKAMADA; TAKAHASHI; MABUCHI, 2012; PATEL et al.,

2014; YANG et al., 2017). Os resultados indicam que a lacase imobilizada, quando submetida a uma temperatura de 40 °C por 1 hora, mostrou o maior nível de atividade entre todas as condições testadas ($109,8 \pm 2,88\%$).

Quando o teste de estabilidade térmica foi prolongado para 2 horas a 40 °C, a atividade enzimática diminuiu em comparação com o teste de 1 hora. No entanto, a redução na atividade foi menos expressiva (33% para 2 horas a 40 °C), mas ainda significativamente maior do que a enzima livre. Uma possível explicação é que a exposição prolongada a temperaturas elevadas pode levar à inativação ou danos à enzima. No entanto, o processo de imobilização induz efeitos estabilizadores, que ajudam a manter a conformação ativa da enzima.

A lacase imobilizada apresentou baixos valores de atividade em temperaturas mais baixas, como 25 °C. Apesar disso, a enzima imobilizada mostrou notável estabilidade térmica, com níveis de atividade acima de 40% após 1 e 2 horas. Isso sugere que, embora o processo de imobilização possa apresentar atividade ligeiramente inferior em temperaturas mais baixas – comparado a temperatura ótima –, ele oferece um efeito protetor, prevenindo um declínio mais significativo, que é observado na enzima livre. À medida que a temperatura aumentou, a tendência se reverteu, com a enzima imobilizada mostrando um aumento contínuo na atividade até certo limite, indicando um desempenho melhorado em condições de temperatura moderada, em acordo com os resultados apresentados em estudos anteriores (CHEN et al., 2020; HAKAMADA; TAKAHASHI; MABUCHI, 2012; HU; ZHAO; HWANG, 2007; YAVAŞER; KARAGÖZLER, 2021; ZOFAIR et al., 2020). No entanto, em temperaturas significativamente mais altas, sinais de desnaturação enzimática se tornaram aparentes; a 50 °C, a lacase imobilizada apresentou uma diminuição na atividade em comparação com a condição de 40 °C. Esta redução na atividade pode indicar os limites de estabilidade térmica apresentados pela

enzima. Em temperaturas mais elevadas, a entrada de energia se torna mais substancial, potencialmente causando danos térmicos à enzima, o que se reflete na redução observada na atividade.

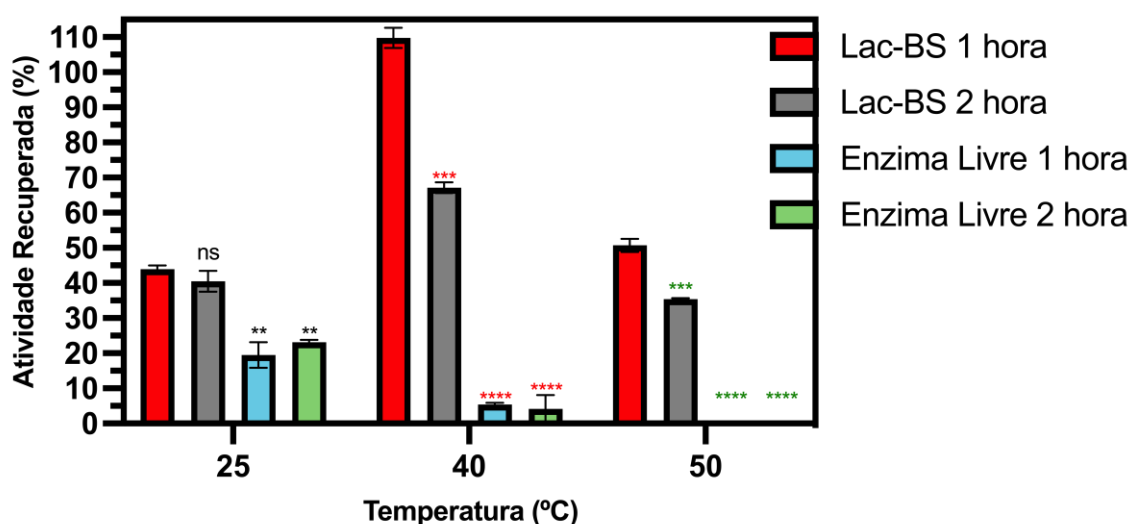


Figura 40 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima imobilizada Lac-BS (barras vermelhas e cinzas) e da enzima livre (barras azul claro e verde) ao longo do tempo (uma hora e duas horas). Cada ponto representa o erro padrão de três experimentos. ns: $p > 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$ em comparação com Lac-BS 1 hora.

Fonte: Autoria Própria.

6.5.2. Reutilização

A enzima imobilizada poderia ser empregada ao longo de numerosos ciclos, embora uma redução gradual em sua atividade inevitavelmente ocorresse (Figura 41). Após dez ciclos, a atividade da enzima apresentou uma diminuição total de 29,45%, um resultado significativo comparado aos obtidos na literatura (ALMULAIKY et al., 2021). Utilizando α -amilase imobilizada em nano compósitos de HA-ZrO₂, alcançaram uma perda de 46% e 70% após dez ciclos (ZHANG et al., 2020). Estudaram a reutilização da lacase de *Rhus verniciflua* imobilizada em nanopartículas de Fe₃O₄, observando uma diminuição de 34% após dez ciclos (ALSAIARI et al., 2021). Além disso, investigaram a reutilização de enzimas lacase de *Trametes versicolor* imobilizadas em nanopartículas

de Fe_3O_4 e CuFe_2O_4 , concluindo que as nanopartículas de cobre são um suporte melhor do que as de ferro, com perda de atividade enzimática de 30% após seis ciclos em ambos os suportes.

Em um estudo recente conduzido por (AMERI et al., 2021), foi investigada a imobilização de *Trametes versicolor* utilizando vários zeólitos (NaY e ZSM-5) e zeólitos hierárquicos (HR-Y e HR-Z). O estudo também examinou a reutilização dos suportes após dez ciclos de oxidação de ABTS. Os resultados mostraram que os suportes apresentaram diferentes taxas de retenção de sua atividade inicial, com taxas de retenção de 5,6%, 6%, 92% e 68%, respectivamente. Os pesquisadores concluíram que o uso de zeólitos hierárquicos melhorou a reutilização do biocatalisador, e foi possível assumir uma conexão com Lac-BS empregado neste estudo, sugerindo que as propriedades hierárquicas do material, evidenciadas pelas análises de fisissorção de N_2 podem ter efeitos sinérgicos para proteger a enzima, mantendo sua atividade.

Apesar da ligação covalente ser uma das formas mais potentes de imobilização para uma enzima, após ciclos sucessivos, a enzima pode sofrer desprendimento do material de suporte, levando à sua perda e consequente diminuição da atividade geral, como relatado em muitos estudos (ALMULAIKY et al., 2021; LAU; YEE, 2015; MARIÑO; FULAZ; TASIC, 2021; PATEL et al., 2014; SANJAY; SUGUNAN, 2005; YANG et al., 2018). Estresses operacionais podem representar outro fator influente contribuindo para o declínio observado. Cada ciclo de uso inflige condições operacionais específicas.

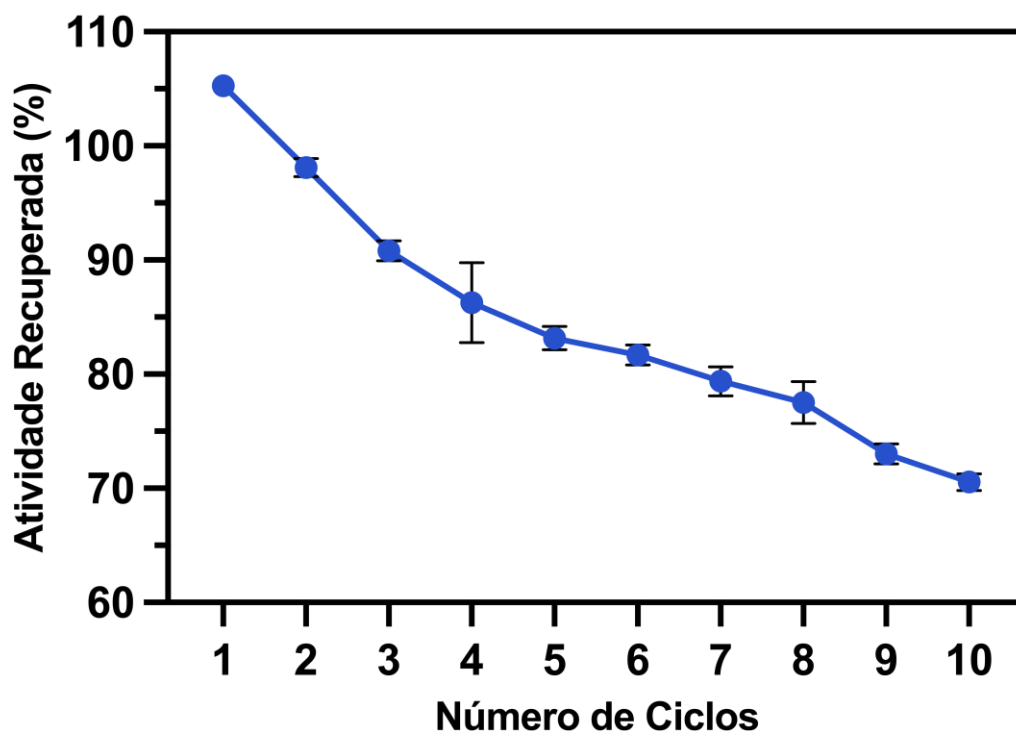


Figura 41 Reutilização da lacase imobilizada. Cada ponto representa o erro padrão de três experimentos. **Fonte:** Autoria Própria.

6.6. Remoção de corante têxtil

Um método prático para tratar e descolorir efluentes industriais envolve técnicas de descoloração baseadas em enzimas. Foi feita uma comparação com a enzima livre, Func-BS e Lac-BS. Os resultados da descoloração do Tectilon Blue 4R-01 200% são mostrados na Figura 42.

A análise comparativa da eficiência de descoloração neste estudo revela insights intrigantes sobre o desempenho da lacase livre versus Lac-BS e como isso se relaciona com a literatura existente. Conforme observado na Figura 42, o Lac-BS demonstrou uma eficiência de descoloração significativamente maior quando comparado à lacase livre. Após o tratamento com a lacase livre e imobilizada, o teor residual de corante foi de aproximadamente 0% (10 mg/L removidos) e $26,44\% \pm 0,01\%$ (7,36 mg/L removidos), respectivamente. De acordo com (SALAMI et al., 2018; SIGURDARDÓTTIR et al.,

2018), a atividade operacional aprimorada da enzima livre é frequentemente descrita, e é comumente esperada uma diminuição na atividade enzimática após a imobilização. No entanto, os resultados deste estudo diferem dessa tendência típica, indicando uma diferença potencialmente significativa em relação ao conhecimento estabelecido na área.

Além disso, a Figura 42 fornece uma compreensão dos experimentos de descoloração. Func-BS, sozinho, alcançou um resultado mais significativo do que a enzima livre através do método de adsorção, com um corante residual de $11,54\% \pm 4,22\%$ (8,65 mg/L removidos). No entanto, este método não resultou na biodegradação simultânea do corante, como demonstrado pela cor vermelho escuro do material, que converteu para a cor do corante após o procedimento. Este efeito de coloração da matriz inorgânica só foi observado quando a enzima estava ausente do processo (Fig. 42).

Estes resultados indicam uma sinergia entre a enzima, matriz de imobilização e descoloração do substrato de corante. Através de análise bioinformática, foi possível verificar que o volume calculado do sítio ativo da lacase imobilizada é de $423 \text{ \AA}^3$, e utilizando o ChemDoodle (TODSEN, 2014), o volume do corante usado é de $468,2 \text{ \AA}^3$. Estes resultados destacam o papel importante que o suporte desempenha na biodegradação, onde o corante está ligado à superfície do material, permitindo que a enzima atue sobre a molécula, possivelmente seguindo o mecanismo mostrado na Figura 43 e 44, que foi detectado utilizando a técnica de LC-MS [96]. Primeiramente, a hipótese é que o grupo sulfanilamida sofre hidrólise, deixando o núcleo cromóforo para a degradação oxidativa subsequente. A estrutura obtida possui vários grupos oxidáveis como, aminas primárias e secundárias, e grupos metila do xileno sulfonato de sódio. Como a degradação do corante foi confirmada através dos experimentos espectroscópicos, também se propôs que o núcleo de antraquinona fosse oxidado.

O possível caminho de degradação é apresentado na Figura 43. A forma protonada do corante (4) é inicialmente atacada pela enzima no grupo amina primária (o cátion protonado da estrutura 5 foi observado por LC-MS como "cmpd 9"), seguido pela clivagem oxidativa do sistema de antraquinona. A clivagem oxidativa de antraquinona já foi descrita anteriormente por (ALAM et al., 2021; OSMA; TOCA-HERRERA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2010; PENG et al., 2021; PERLATTI et al., 2012), incluindo uma possível hidroxilação concomitante do anel oposto (FAN et al., 2008). O derivado do ácido hidroxibenzilbenzóico obtido foi observado por HPLC-MS (em forma duplamente desprotonada, como "cmpd 10"). A esterificação intermolecular leva à formação do intermediário 8, que foi observado como um fragmento de "cmpd 10". Em seguida, a oxidação do grupo amina secundária leva à formação do intermediário 9. A clivagem oxidativa do derivado hidroxilamina (9) leva à formação de ácido nitroxilenosulfônico (15), que, após oxidação metílica, é transformado em um derivado de ácido ftálico (16). Este derivado apareceu no espectro de HPLC-MS como um cátion bis-sódio. Outro intermediário (10), observado como um cátion de sódio ("cmpd 6" na análise HPLC-MS), passa por desoxigenação oxidativa via intermediário 11 até o intermediário 12, que foi observado como um fragmento de cátion de sódio de "cmpd 6" na análise HPLC-MS. O último intermediário de ácido benzilbenzóico então se decompõe ainda mais por clivagem alfa (LI; CHEN, 2015). O rearranjo subsequente do sulfonato (IUPAC, 2014) leva aos intermediários 14 e 17, sendo o último observado na análise de HPLC-MS como um fragmento desprotonado de "cmpd 18-19, 23-25".

Lacases têm sido empregadas na descoloração de vários corantes. Investigações anteriores feitas por (BIRHANLI et al., 2022; DAÂSSI et al., 2014; MAKAS et al., 2010; PERALTA-ZAMORA et al., 2003) consistentemente documentaram resultados favoráveis em processos de imobilização utilizando diversas matrizes para descoloração

de corantes. Ainda assim, é necessário mencionar que a eficiência de descoloração observada neste estudo supera a relatada em estudos anteriores, apesar do desafio de comparar resultados diretamente devido ao uso de diferentes corantes (Tabela 9).

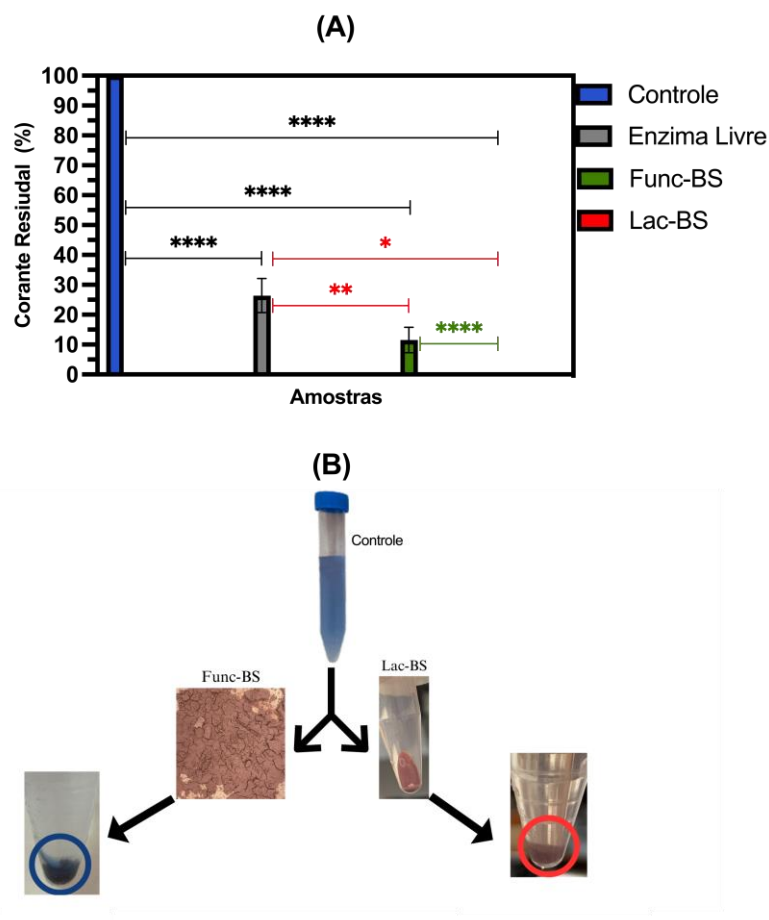


Figura 42 (A) Impacto da lacase imobilizada (25 mg; 0,5 U/mL) no processo de descoloração do Tectilon 4R-01 200% do controle (barra azul escuro); enzima livre (barra cinza); apenas Func-BS (barra verde); Lac-BS (barra vermelha). *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$. (B) Ilustração esquemática da adsorção e biodegradação dos experimentos com Tectilon Blue 4R 200%, comparando Func-BS e Lac-BS. **Fonte:** Autoria Própria.

Tabela 9 Resultados de testes de biodegradação realizados em corantes comuns usando vários biocatalisadores. **Fonte:** Autoria Própria.

Lacase	Suporte	Mediador	Corante	Eficiência de Remoção	Tempo de Remoção	Referência
<i>T. trogii</i>	Co-MOF	Não	Reactive Blue (RB) 171 and RB 198	88% e 77%	1 hora	(BIRHANLI et al., 2022)
<i>Coriolopsis gallica</i>	Ca-alginato pérolas	1-hydroxybenzotriazole (HBT)	Remazol Brilliant Blue R (RBBR)	50% sem mediador e 80% com mediador	24 horas	(DAÂSSI et al., 2014)
<i>Trametes versicolor</i>	Amberlite IRA-400	HBT	RBBR	80%	90 min	(PERALTA-ZAMORA et al., 2003)
<i>Trametes versicolor</i>	NaY zeólita	Não	Bromothymol blue (BTB) e Trypan blue	93% e 80%	2 horas	(AMERI et al., 2023)
<i>Polyporus durus</i>	Zeólita-X nano porosa	Não	RB 19	100%	45 min	(WEHAIDY et al., 2019b)
<i>Trametes versicolor</i>	ZnO/SiO ₂ nano-compositado	Não	RBBR	93%	1 hora	(LI; SUN; ZHANG, 2015)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	BS	Não	TB4R	100%	2 horas	Esse trabalho

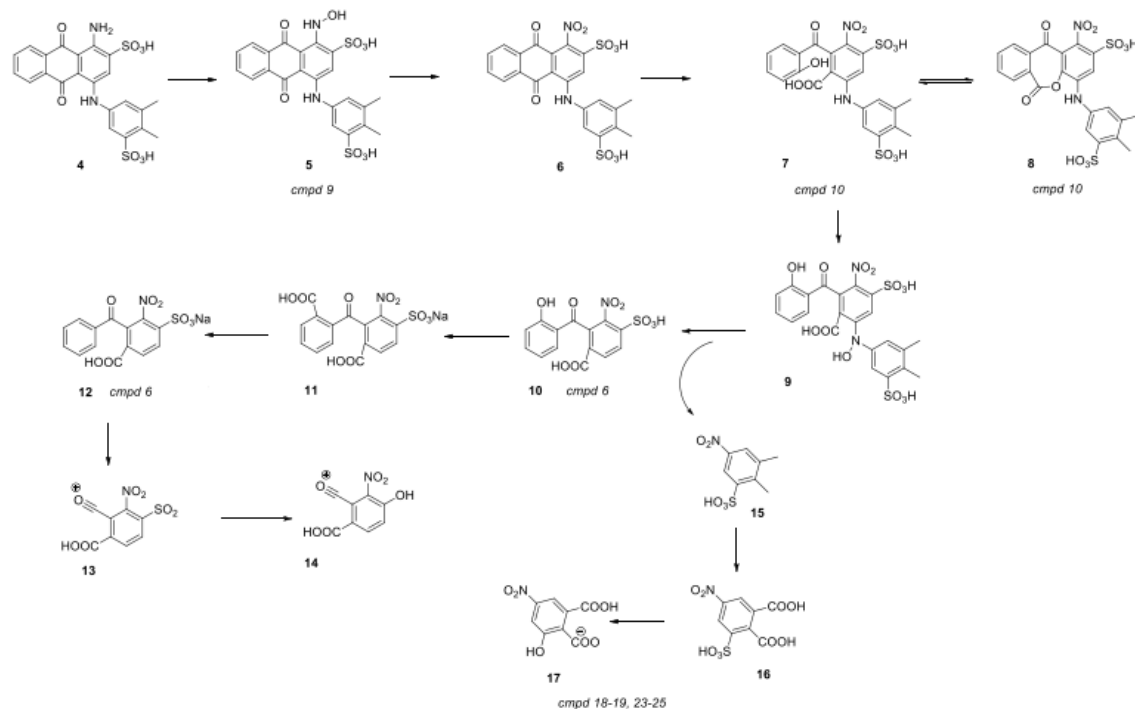
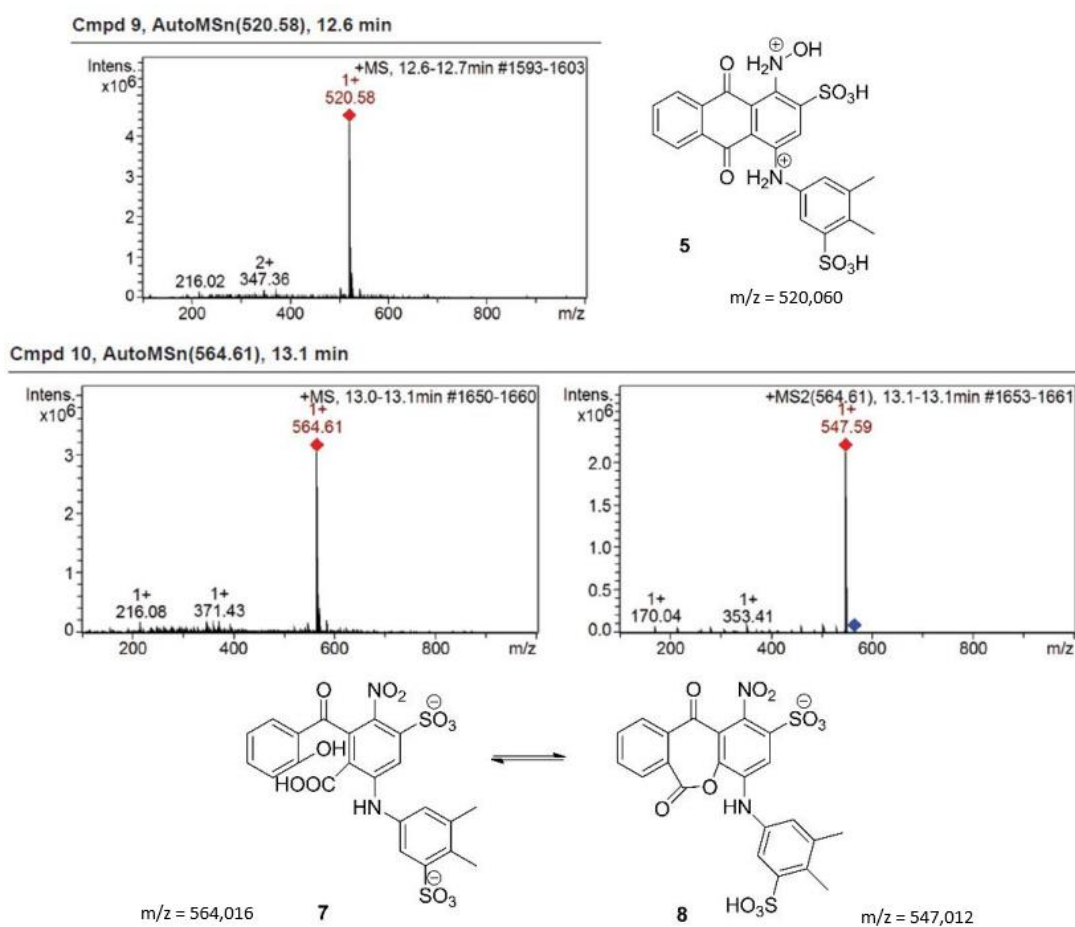


Figura 43 Caminho de reação possível para a transformação do Tectilon Blue 4R em produtos secundários, de acordo com os resultados obtidos de LC-MS. **Fonte:** Autoria Própria



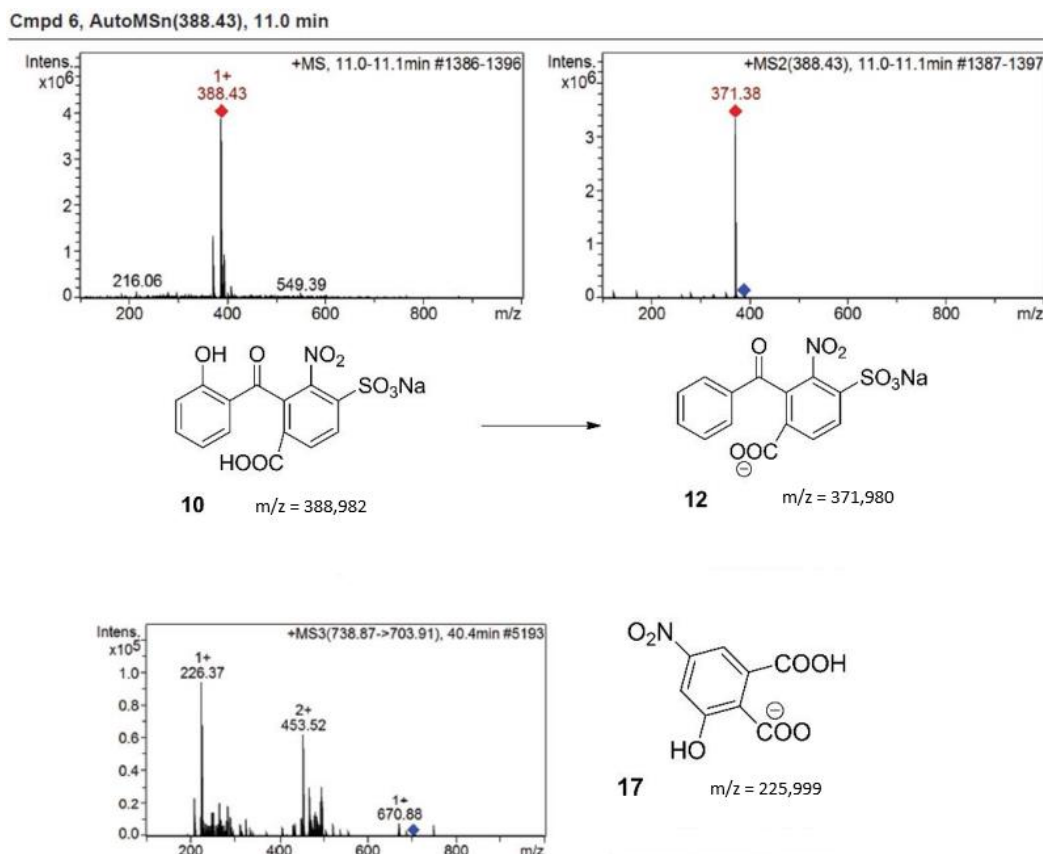


Figura 44 Espécies geradas detectadas por LC-MS, de acordo com o mecanismo proposto para a degradação do Tectilon Blue 4R-01.

6.7. Remoção de Ibuprofeno

Nesta investigação, comparamos o desempenho de três métodos distintos de remoção: Lac-BS, enzima livre e Func-BS para remover ibuprofeno de soluções aquosas (Figura 45). Nossos achados revelam que Lac-BS apresentou a maior eficiência, removendo aproximadamente $72,58 \pm 6,64\%$ do IBU dentro de duas horas de reação a 40 °C. As propriedades enzimáticas da lacase facilitaram a biodegradação do IBU, ampliadas pelo processo de adsorção do substrato, considerando os volumes envolvidos na reação (Ibuprofeno vdW 187,2 Å³ e sítio ativo da lacase vdW 423 Å³). O suporte Func-BS oferece uma área superficial extensa e porosidade para facilitar o processo, garantindo uma adsorção eficiente. Além disso, o suporte sem enzima, baseado apenas na adsorção física, demonstrou uma eficiência de remoção de aproximadamente $52,43 \pm 2,36\%$. No entanto, sua dependência exclusiva da adsorção física torna-o menos atraente na remoção

de produtos farmacêuticos em matrizes complexas de águas residuais ou sob diversas condições ambientais, principalmente devido à sua incapacidade de converter o fármaco primário em metabólitos mais simples.

Por outro lado, o uso da enzima livre na remoção de IBU apresentou eficiência inferior, sendo capaz de biodegradar apenas cerca de $49,83 \pm 7,82\%$ do fármaco nas mesmas condições. As limitações das enzimas livres em aplicações ambientais são evidentes, incluindo susceptibilidade a fatores ambientais, limitações de difusão que dificultam o processo de biodegradação e inativação no processo catalítico.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram um desempenho convincente do Lac-BS em comparação com as descobertas da literatura. (BHARDWAJ et al., 2023) utilizaram lacases de *Alcaligenes faecalis* XF1 imobilizadas em estrutura metálica orgânica (MOF) baseada em cobre e alcançaram cerca de 70% de remoção do IBU em solução. Seguindo a mesma tendência, (JI; HOU; CHEN, 2016; ZHANG et al., 2022b) obtiveram uma remoção de 76% após 6,5 horas e 60% após 48 horas, respectivamente. Esses achados sugerem que o material examinado neste estudo pode representar uma alternativa significativa para a remediação do IBU, estabelecendo um desempenho de biodegradação superior em um período mais curto.

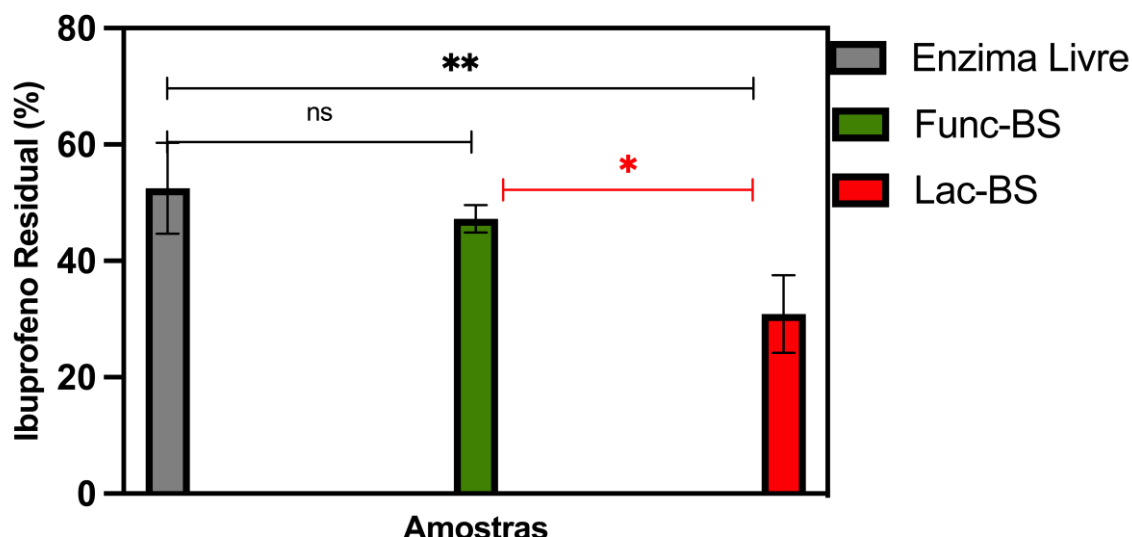


Figura 45 Impacto da lacase imobilizada (25 mg; 0,5 U/mL) no processo de remoção de Ibuprofeno com enzima livre (barra cinza); Func-BS (barra verde); Lac-BS (barra vermelha). **ns:** $p > 0,05$; *****: $p \leq 0,05$; ******: $p \leq 0,01$. **Fonte:** Autoria Própria.

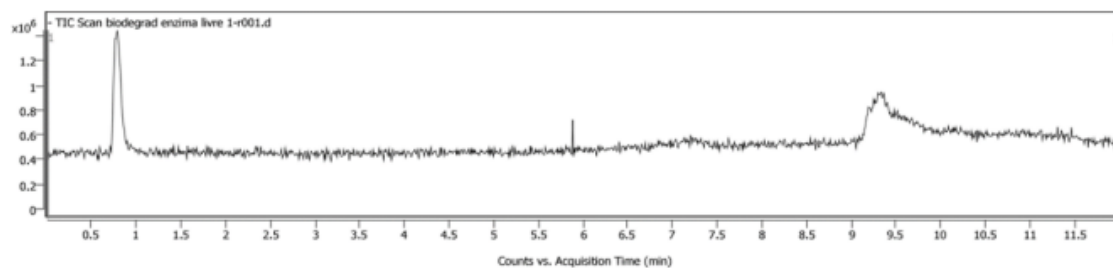
O produto da reação foi analisado por HPLC-MS. O cromatograma e a varredura completa da amostra estão representados na Figura 46. No cromatograma, observamos um pico distinto por volta de 0,75 minutos, que pode ser atribuído à formação de um metabólito do IBU. Um pico mais amplo começa aproximadamente aos 8 minutos, associado ao IBU. Nos espectros de espectrometria de massa, notamos picos além de 209 m/z, sugerindo que o metabólito resultante da biodegradação do IBU é provavelmente o hidroxi-ibuprofeno (OH IBU). A dissolução do suporte da enzima e a formação de polímeros pode explicar a presença de picos mais pesados após o experimento. Não foi possível determinar o isômero exato que foi produzido pela reação catalítica devido ao fato de o valor de m/z ser o mesmo para os dois produtos e análises posteriores não foram realizadas.

Essa transformação do IBU para OH IBU é reconhecida por estudos existentes na literatura que empregam fungos endofíticos estudados por (BORGES et al., 2011), fungos de podridão branca analisados por (CRUZ-MORATÓ et al., 2013; MARCO-URREA et

al., 2009), e por plantas, especificamente *Vigna unguiculata* L., por (PICÓ et al., 2018). A Figura 46 mostra um possível caminho de mecanismo para a biotransformação do IBU inicial em metabólitos (1-hidroxi-ibuprofeno, 2-hidroxi-ibuprofeno e 1,2-dihidroxi-ibuprofeno) através da oxidação enzimática. Vários caminhos para a biodegradação do ibuprofeno foram descritos recentemente (JAN-ROBLERO; CRUZ-MAYA, 2023). Processos de oxidação mediados por lacase foram relatados como ocorrendo pela ação de radicais (RIVA, 2006b), sugerindo que a degradação do Ibuprofeno induzida pela lacase também pode ocorrer por oxidação envolvendo radicais. Não está completamente claro onde essa oxidação começa, mas, considerando a distribuição de densidade eletrônica, o grupo isobutil mais eletronegativo parece mais atrativo para a hidroxilação inicial (GUZIK; WOJCIESZYŃSKA, 2019; MARCHLEWICZ et al., 2017; NEUNZIG et al., 2012). No entanto, o ataque oposto (na posição benzílica ativada) também foi sugerido (ZHANG et al., 2022a).

No mecanismo proposto (Figura 46), a oxidação inicial leva à formação de um radical terciário mais estável (17a). O apagamento dessa espécie por água gera um álcool terciário (18) e um radical de hidrogênio. Este radical então divide outra molécula de água em um radical hidroxila e um radical de hidrogênio, que após a recombinação forma hidrogênio molecular. O radical hidroxila, por sua vez, recombina-se com outro radical, resultando em um álcool (18). O mesmo processo pode se repetir, levando à formação de um diol (19). Nos passos subsequentes da degradação do ibuprofeno (Figura 47), o diol pode sofrer clivagem alfa, gerando o cátion isopropóxido observado no espectro de massa. Em seguida, o diol (19) é oxidado ainda mais para uma hidroxiketona (20), que pode sofrer clivagem alfa, com a expulsão concomitante de um cátion isopropóxido ou a formação de um cátion acílio (21). Este último expulsa monóxido de carbono e então passa por oxidação benzílica, resultando em ácido benzóico (24).

Sample Chromatograms



Sample Spectra

- Scan (rt: 0.786 min)

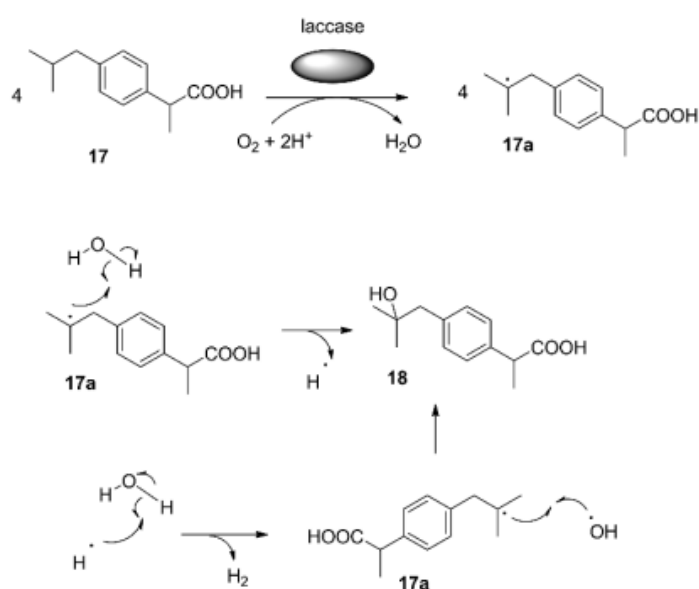
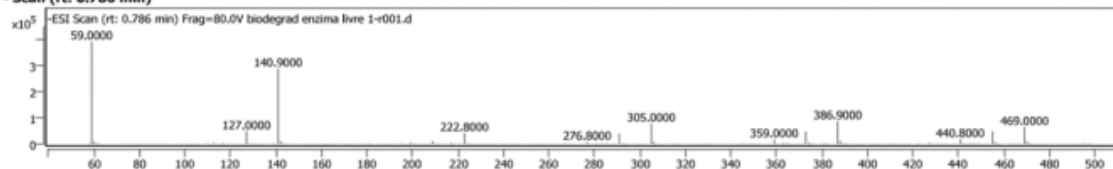


Figura 46 Possível via de reação para a transformação do Ibuprofeno em metabólitos (1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno e 1,2-dihidroxiibuprofeno). **Fonte:** Autoria Própria.

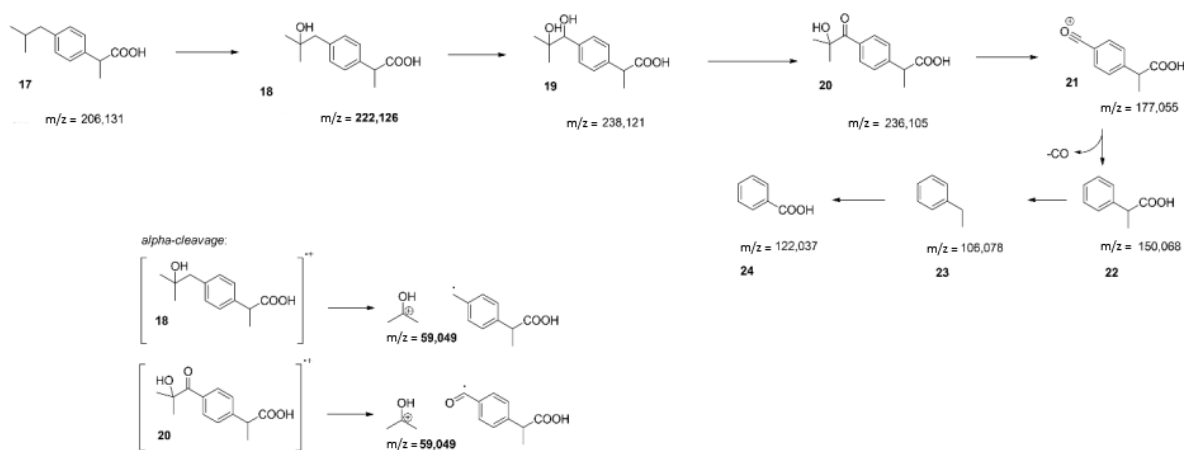


Figura 47 Mecanismo plausível para a degradação do Ibuprofeno através da catálise enzimática. **Fonte:** Autoria Própria.

7. Considerações finais e conclusões

Considerando que o objetivo deste trabalho foi a síntese e caracterização de um novo material hierárquico de bismuto, além da modulação de sua superfície para imobilização de lacases provenientes de *Myceliophthora thermophila* e a aplicação do biocatalisador em reações de biodegradação do corante Tectilon 4R e do fármaco ibuprofeno, os dados experimentais obtidos permitiram chegar às seguintes conclusões:

7.1. Caracterização Físico-Química do Bismuto Silicato

Inicialmente, foi estudada a importância da utilização de diferentes SDAs e a influência do envelhecimento na síntese. As análises de caracterização (DRX, FTIR, MEV, MET, BET, RMN e XANES) permitiram identificar que o material sintetizado é inédito, com uma estrutura hierárquica que apresenta poros em escalas micro e meso. Durante os estudos, os métodos de extração do SDA precisaram ser otimizados, pois o método convencional de calcinação resultou em mudanças estruturais no material, destruindo os picos de difração desejáveis em $2\theta = 3-8^\circ$. Para solucionar isso, foi utilizado o método de extração Soxhlet, que permitiu a remoção do SDA sem a alteração irreversível da estrutura cristalográfica.

Nas análises de RMN, o espectro de CPMAS de ^1H - ^{29}Si com tempos de polarização cruzada de 1 ms e 5 ms identificou três picos em 113,2 ppm, 102,5 ppm e 92 ppm, correspondendo aos grupos terminais de silanol Q4, Q3 e Q2, respectivamente. O espectro de SPEMAS, com um tempo de reciclagem de 20 s, mostrou que as quantidades relativas dos grupos terminais de silanol Q4, Q3 e Q2 são 77%, 11% e 12%, respectivamente, revelando um excesso considerável de grupos Q4 na amostra. Os espectros de ^1H MAS indicaram a presença de solventes orgânicos e grupos terminais Si-OH em troca com água adsorvida, além de umidade na amostra, sugerindo a presença de SDA no produto recém-sintetizado. Os espectros de ^{29}Si NMR das amostras envelhecidas

por 12 e 24 horas mostraram um aumento na ordem estrutural local na amostra envelhecida por 24 horas, relacionado ao aumento da fase cristalina observado nos resultados de DRX. A calcinação das amostras resultou em uma diminuição progressiva na relação sinal/ruído dos espectros de ^1H - ^{29}Si CPMAS com temperaturas mais elevadas, sendo que a 750 °C nenhum sinal de ^1H - ^{29}Si CPMAS foi detectado, indicando a ausência de hidrogênio próximo ao ^{29}Si . Os espectros de ^{29}Si SPEMAS mostraram mudanças drásticas na estrutura local dos grupos ^{29}Si a 750 °C, confirmando a necessidade de outro método para extração do SDA, corroborando com os resultados de DRX e FTIR.

Nas análises de XANES, concluiu-se que a otimização bayesiana para ajustar os espectros teóricos aos experimentais é eficaz, e que Bi_2O_3 é a melhor correspondência para as medições experimentais de XANES das espécies de bismuto analisadas.

Finalmente, concluiu-se através de todas as análises realizadas, que o material utilizando TPABr como SDA e com tempo de envelhecimento de 24 horas possuía a melhor estrutura, sendo escolhido para todos os experimentos futuros.

7.2. Caracterização Físico-Química da Modulação do Suporte

A partir dos experimentos para modular a superfície do suporte, foi possível concluir que os dados de XRD mostraram que tanto a silanização quanto a funcionalização do suporte resultaram em padrões quase idênticos, com uma perda de cristalinidade. Isso sugere que o tratamento químico foi bem-sucedido em modificar a superfície sem alterar a fase ou a natureza do material. No entanto, a imobilização da lacase na superfície do BS reduziu a intensidade dos picos de difração, o que pode indicar uma cobertura bem-sucedida da superfície. Os dados de FTIR sustentam essa afirmação pela presença de bandas que comprovam a existência dos grupos funcionais desejados. A funcionalização com glutaraldeído foi confirmada pela presença de uma banda de absorção em torno de 1640 cm^{-1} , atribuída ao grupo $\text{C}=\text{N}$. Essa banda aparece nas

amostras Func-BS e Lac-BS, indicando a formação de grupos amida II e confirmando tanto a modificação química da superfície quanto a imobilização da lacase.

7.3. Delineamento Experimental

A imobilização da lacase no suporte BS atingiu 100% de rendimento, demonstrando alta eficiência no processo. Esta eficiência foi mantida mesmo com a variação da massa do suporte de 15 mg a 25 mg, indicando que o suporte possui uma área de superfície e locais de ligação suficientes para a enzima. A variação das concentrações de enzima (0,5, 1 e 1,5 U/mL) também mostrou altos rendimentos de imobilização. No entanto, em concentrações mais altas, o rendimento diminuiu para um mínimo de $55,47 \pm 3,51\%$, sugerindo a saturação dos sítios de ligação do suporte. Isso indica uma faixa ótima de atividade de enzima para máxima eficiência.

A atividade recuperada da lacase imobilizada (Lac-BS) apresentou uma relação com a concentração inicial de enzima. Observou-se hiperativação enzimática, com a atividade da enzima imobilizada superando a da enzima livre em 0,5 U/mL ($109,78 \pm 2,88\%$). Isso pode ser devido a mudanças conformacionais durante a imobilização, tornando os sítios ativos mais acessíveis ou eficientes.

Em concentrações mais altas de enzima (1 U/mL e 1,5 U/mL), a atividade recuperada diminuiu, possivelmente devido à superlotação da superfície do suporte, causando interferência estérica e dificultando o acesso dos substratos aos sítios ativos. Além disso, altas concentrações podem levar a interações intermoleculares, resultando em agregados enzimáticos menos ativos.

7.4. Modelagem de Bioinformática

As trajetórias de dinâmica molecular convergiram, conforme indicado pelo raio de giração da proteína, sugerindo que as simulações alcançaram um estado estável. Não

foram observadas mudanças conformacionais significativas que resultassem na exposição completa do sítio ativo da lacase. No entanto, o íon cobre, inicialmente enterrado na estrutura cristalográfica, foi observado na superfície molecular durante as simulações.

A simulação revelou que o loop contendo os resíduos Lys188 - Pro193 adotou uma conformação diferente, aumentando o volume do bolso ao redor do sítio ativo. Esse aumento de volume foi quantificado, mostrando um crescimento de 342 Å³ na estrutura cristalográfica para até 423 Å³ na simulação. Esse aumento de volume do bolso do sítio ativo após a imobilização poderia proporcionar maior acesso ao substrato, potencializando a atividade enzimática.

Como a imobilização da enzima ocorre em resíduos de lisina, o resíduo Lys188 pode ser um local potencial para estabilizar a lacase de *Myceliophthora thermophila* em uma conformação aberta, facilitando uma maior eficiência catalítica.

7.5. Caracterização Bioquímica do Biocatalisador

Com os testes realizados para determinar o funcionamento do biocatalisador em condições importantes para a aplicação em processos catalíticos, foi possível concluir que a maior atividade da lacase imobilizada foi observada a 40 °C. Essa temperatura promove um equilíbrio ótimo entre a dinâmica molecular e a estabilidade enzimática, facilitando reações mais frequentes e eficientes. A atividade da lacase imobilizada é reduzida a 25 °C devido à diminuição do movimento molecular, mas ainda mostra uma atividade recuperada significativamente maior do que a da enzima livre.

Quando utilizada a 50 °C, a enzima pode sofrer desnaturação, levando à perda de sua função catalítica. No entanto, o suporte BS protege parcialmente a enzima, preservando sua atividade. Assim, a lacase imobilizada exibe uma estabilidade térmica superior em comparação com a enzima livre. Após 1 hora a 40 °C, a atividade foi mantida

em $109,8 \pm 2,88\%$. Quando exposta por 2 horas, a atividade diminuiu, mas ainda foi significativamente maior do que a da enzima livre, pois a imobilização parece estabilizar a enzima, mantendo sua conformação ativa e protegendo-a de danos térmicos. Mesmo a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, a enzima imobilizada mostra notável estabilidade térmica, com níveis de atividade acima de 40% após 1 e 2 horas.

No desempenho de ciclos consecutivos em atividades catalíticas, a lacase imobilizada pode ser reutilizada por até dez vezes, apresentando uma redução total de 29,45% na atividade. Este resultado é melhor do que muitos encontrados na literatura, indicando uma boa retenção de atividade, provavelmente devido às propriedades hierárquicas do suporte BS, que podem ter efeitos sinérgicos que protegem a enzima e mantêm sua atividade.

7.6. Remoção de Corante

Nos experimentos de descoloração, o biocatalisador apresentou uma eficácia de remoção de 100% após 2 horas, enquanto a enzima livre demonstrou menor eficiência entre os três métodos empregados. O suporte Func-BS sozinho, através do método de adsorção, mostrou uma eficiência de descoloração de 88,46% (8,65 mg/L removidos), superior à da enzima livre, mas inferior ao Lac-BS, devido à sua alta área superficial. No entanto, não houve biodegradação do corante devido à ausência de enzimas no material.

A combinação da enzima e do suporte mostrou uma sinergia potente, com o suporte ajudando na adsorção do corante e a enzima promovendo a degradação. A eficiência de descoloração observada no estudo atual é comparável ou superior aos resultados documentados em investigações anteriores, mesmo com o emprego de diferentes corantes.

7.7. Remoção de Ibuprofeno

Lac-BS apresentou a maior eficiência de remoção de ibuprofeno (IBU), com aproximadamente 72,58% em duas horas a 40 °C. Essa alta eficiência é atribuída tanto à atividade enzimática da lacase quanto ao processo de adsorção do suporte Func-BS. O Func-BS sem enzima, utilizando apenas adsorção física, conseguiu remover cerca de 52,43% do IBU. Embora eficiente, sua dependência exclusiva da adsorção física limita sua eficácia na conversão do fármaco em metabólitos mais simples, tornando-o menos adequado para aplicações em águas residuais complexas.

A enzima livre demonstrou uma eficiência de remoção inferior, biodegradando aproximadamente 49,83% do IBU nas mesmas condições. Suas limitações incluem susceptibilidade a fatores ambientais, limitações de difusão e inativação durante o processo catalítico. A combinação da lacase com o suporte Func-BS oferece uma alternativa eficaz para a remediação do IBU, mostrando um desempenho de biodegradação superior em um período mais curto em comparação com os métodos relatados na literatura. Isso indica que o Lac-BS pode ser uma solução promissora para a remoção eficiente de fármacos de matrizes aquosas.

8. Perspectivas Futuras

Com base nas conclusões desta tese, diversas oportunidades de pesquisa e desenvolvimento podem ser exploradas para avançar no campo de biocatalisadores e materiais hierárquicos de bismuto, especificamente voltados para aplicações ambientais e biotecnológicas. As perspectivas futuras incluem:

- i. Realização de novos estudos estruturais tendo como objetivo resolver a estrutura e indexar a célula unitária;
- ii. Otimização dos parâmetros de síntese e escalonamento da produção. A investigação de métodos de síntese contínua ou em maior escala, além da exploração de diferentes agentes direcionadores de estrutura (SDAs), visando aumentar a viabilidade comercial do material;
- iii. Estudos futuros poderiam se concentrar na remoção de uma gama mais ampla de contaminantes emergentes e na integração do biocatalisador em sistemas de tratamento em larga escala;
- iv. Condução de novos experimentos de biodegradação para aprimorar a investigação dos mecanismos de transformação dos poluentes, otimizando o processo de preparo das amostras para análises cromatográficas e de espectrometria de massa (incluindo métodos como extração dupla e concentração);
- v. A combinação do biocatalisador com outros processos de tratamento, como foto catálise ou oxidação avançada, pode resultar em abordagens mais eficientes e sinérgicas para a degradação de poluentes. A exploração dessas combinações pode levar ao desenvolvimento de sistemas híbridos de tratamento com desempenho superior.

Referências

- A. IBRAHIM; MUHAMMAD ABDULLAHI IBRAHIM; ALI GAMBO YUSUF. Implications of industrial effluents on surface water and ground water. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 09, n. 03, p. 330–336, 30 mar. 2021.
- AI, Z. et al. Monoclinic α -Bi₂O₃ photocatalyst for efficient removal of gaseous NO and HCHO under visible light irradiation. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, n. 5, p. 2044–2049, fev. 2011.
- ALAM, R. et al. Biodegradation and metabolic pathway of anthraquinone dyes by *Trametes hirsuta* D7 immobilized in light expanded clay aggregate and cytotoxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 405, p. 124176, mar. 2021.
- ALI, M. et al. **Laccase Engineering: Redox Potential Is Not the Only Activity-Determining Feature in the Metalloproteins**. *Molecules* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 set. 2023.
- AL-MAQDI, K. A. et al. Challenges and Recent Advances in Enzyme-Mediated Wastewater Remediation—A Review. **Nanomaterials**, v. 11, n. 11, p. 3124, 19 nov. 2021.
- ALMULAIKY, Y. Q. et al. Hydroxyapatite-decorated ZrO₂ for α -amylase immobilization: Toward the enhancement of enzyme stability and reusability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 299–308, 15 jan. 2021.
- ALSAIARI, N. S. et al. The biocatalytic degradation of organic dyes using laccase immobilized magnetic nanoparticles. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 17, 1 set. 2021.
- AMERI, A. et al. Bio-removal of phenol by the immobilized laccase on the fabricated parent and hierarchical NaY and ZSM-5 zeolites. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 120, p. 300–312, 1 mar. 2021.
- AMERI, A. et al. Removal of dyes by *Trametes versicolor* laccase immobilized on NaY-zeolite. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 197, p. 240–253, 1 set. 2023.
- ANDERSON, M. W. et al. Structure of the microporous titanosilicate ETS-10. **Nature**, v. 367, n. 6461, p. 347–351, jan. 1994.
- ASGAR POUR, Z.; SEBAKHY, K. O. A Review on the Effects of Organic Structure-Directing Agents on the Hydrothermal Synthesis and Physicochemical Properties of Zeolites. **Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 431–446, 13 maio 2022a.
- ASGAR POUR, Z.; SEBAKHY, K. O. **A Review on the Effects of Organic Structure-Directing Agents on the Hydrothermal Synthesis and Physicochemical Properties of Zeolites**. *Chemistry (Switzerland)* MDPI, , 1 jun. 2022b.

AZIZI, S. N.; YOUSEFPOUR, M. Static and Ultrasonic-assisted Aging Effects on the Synthesis of Analcime Zeolite. **Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie**, v. 636, n. 5, p. 886–890, 7 abr. 2010.

BAI, R. et al. **Simple Quaternary Ammonium Cations-Templated Syntheses of Extra-Large Pore Germanosilicate Zeolites**. **Chemistry of Materials**American Chemical Society, , 27 set. 2016.

BAI, Z. et al. Preparation and characterization of bismuth silicate nanopowders. **Frontiers of Chemistry in China**, v. 2, n. 2, p. 131–134, abr. 2007.

BALCI, M. et al. The synthesis of Eu–Tb–Ho co-doped Bi₂O₃-based ceramic powders for use in intermediate temperature–SOFCs. **Solid State Ionics**, v. 387, p. 116060, dez. 2022.

BARRER, R. M. 435. Syntheses and reactions of mordenite. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 2158, 1948.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 373–380, 1 jan. 1951.

BARTLETT, N. Low temperature preparation and uses of potent oxidizers. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 127, n. 10, p. 1285–1288, out. 2006.

BEGUM, G. et al. Influence of silica architecture on the catalytic activity of immobilized glucose oxidase. **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials**, v. 8, n. 1, p. 72–80, 20 mar. 2019.

BELL, A. T. Insights into the mechanism and kinetics of propene oxidation and ammoxidation over bismuth molybdate catalysts derived from experiments and theory. **Journal of Catalysis**, v. 408, p. 436–452, abr. 2022.

BENSAFI, B.; CHOUAT, N.; DJAFRI, F. The universal zeolite ZSM-5: Structure and synthesis strategies. A review. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 496, p. 215397, dez. 2023.

BERENDSEN, H. J. C.; GRIGERA, J. R.; STRAATSMA, T. P. **The Missing Term in Effective Pair Potentials****1J. Phys. Chem.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

BERMAN, H. M. et al. **The Protein Data Bank****Nucleic Acids Research**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/status.html>.

BERRADI, M. et al. **Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs**. **Heliyon**Elsevier Ltd, , 1 nov. 2019.

- BHARDWAJ, P. et al. Eradication of ibuprofen and diclofenac via in situ synthesized and immobilized bacterial laccase to Cu-based metal organic framework. **Journal of Water Process Engineering**, v. 54, 1 ago. 2023.
- BIERER, D. WS. Bismuth Subsalicylate: History, Chemistry, and Safety. **Clinical Infectious Diseases**, v. 12, n. Supplement_1, p. S3–S8, 1 jan. 1990.
- BILAL, M. et al. **Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review**. **Journal of Environmental Management** Academic Press, , 15 mar. 2019.
- BINNIG, G. et al. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. **Physical Review Letters**, v. 49, n. 1, p. 57–61, 5 jul. 1982.
- BIRHANLI, E. et al. Design of laccase–metal–organic framework hybrid constructs for biocatalytic removal of textile dyes. **Chemosphere**, v. 292, 1 abr. 2022.
- BOLES, J. R. Review of Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Applications. **The Canadian Mineralogist**, v. 40, n. 5, p. 1521–1522, 1 out. 2002.
- BORGES, K. B. et al. LC-MS-MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 2, p. 915–925, jan. 2011.
- BRECK, D. W. Zeolite Chemistry and Reactions. Em: **Sintering and Catalysis**. Boston, MA: Springer US, 1975. p. 211–227.
- BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The biomolecular simulation program. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 30 jul. 2009.
- BRUM, J. M. et al. Systematic Review and Meta-Analyses Assessment of the Clinical Efficacy of Bismuth Subsalicylate for Prevention and Treatment of Infectious Diarrhea. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 66, n. 7, p. 2323–2335, 8 jul. 2021.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. **Adsorption of Gases in Multimolecular Layers**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- BRYJAK, J.; SZYMAŃSKA, K.; JARZEBSKI, A. B. Laccase immobilisation on mesostructured silicas. **Chemical and Process Engineering - Inżynieria Chemiczna i Procesowa**, v. 33, n. 4, p. 611–620, dez. 2012.
- BUSER, H. R.; POIGER, T.; MULLER, M. D. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 15, p. 2529–2535, 1 ago. 1999.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 2007.

BYRAPPA, K.; KUMAR, S. Characterization of Zeolites by Infrared Spectroscopy. **Asian Journal of Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 4933–4935, 2007.

CARDOSO, C. L. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 175–187, 2009.

CARROLL, S. A. et al. Evaluation of silica-water surface chemistry using NMR spectroscopy. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 66, n. 6, p. 913–926, mar. 2002.

CEDERQUIST, K. B.; KEATING, C. D. Curvature Effects in DNA: Au Nanoparticle Conjugates. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 256–260, 24 fev. 2009.

CHAN, J. C. et al. Structural studies of Myceliophthora Thermophila Laccase in the presence of deep eutectic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 150, p. 109890, out. 2021.

CHANDRAWANSHI, E.; BISEN, D. P.; BRAHME, N. Photoluminescence studies of Eu³⁺ doped bismuth silicate based phosphor for plant grow LEDs. **Materials Letters: X**, v. 20, 1 dez. 2023.

CHAVAN, S. et al. Bioconversion of organic wastes into value-added products: A review. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126398, jan. 2022.

CHEN, C. C. et al. Synthesis and characterization of Bi₄Si₃O₁₂, Bi₂SiO₅, and Bi₁₂SiO₂₀ by controlled hydrothermal method and their photocatalytic activity. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 78, p. 157–167, 1 set. 2017.

CHEN, L. H. et al. Hierarchically structured zeolites: Synthesis, mass transport properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 34, p. 17381–17403, 14 set. 2012.

CHEN, X. et al. Immobilized laccase on magnetic nanoparticles for enhanced lignin model compounds degradation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 8, p. 2152–2159, 1 ago. 2020.

CHOUKE, P. B. et al. Biosynthesized δ -Bi₂O₃ Nanoparticles from Crinum viviparum Flower Extract for Photocatalytic Dye Degradation and Molecular Docking. **ACS Omega**, v. 7, n. 24, p. 20983–20993, 21 jun. 2022.

CLEUVERS, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 3, p. 309–315, nov. 2004.

CONAMA. **Resolução CONAMA nº 357. Governo Brasileiro** Brazil, 2005.

CORIA-ORIUNDO, L. L.; BATTAGLINI, F.; WIRTH, S. A. Efficient decolorization of recalcitrant dyes at neutral/alkaline pH by a new bacterial laccase-mediator system. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 217, p. 112237, jul. 2021.

COSTA, L. et al. Enhancing the thermal stability of lipases through mutagenesis and immobilization on zeolites. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 53–61, 29 jan. 2009.

CREA, F. et al. **Synthesis of silicalite 1 from systems with different TPABr/SiO* ratios**. [s.l.: s.n.].

CRESTINI, C.; JURASEK, L.; ARGYROPOULOS, D. S. On the Mechanism of the Laccase–Mediator System in the Oxidation of Lignin. **Chemistry – A European Journal**, v. 9, n. 21, p. 5371–5378, 7 nov. 2003.

CRUZ-MORATÓ, C. et al. Biodegradation of Pharmaceuticals by Fungi and Metabolites Identification. Em: **Handbook of Environmental Chemistry**. [s.l.] Springer Verlag, 2013. v. 24p. 165–213.

CUNDY, C. S.; COX, P. A. The Hydrothermal Synthesis of Zeolites: History and Development from the Earliest Days to the Present Time. **Chemical Reviews**, v. 103, n. 3, p. 663–702, 1 mar. 2003.

DA SILVA, D. A. et al. Metallo-stannosilicate heterogeneous catalyst for biodiesel production using edible, non-edible and waste oils as feedstock. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 5488–5497, ago. 2018.

DA SILVA, D. A.; DE VASCONCELLOS, A.; NERY, J. G. Metallo-stannosilicates as inorganic supports to immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* for biodiesel production. **Ecletica Quimica**, v. 46, p. 75–89, 1 abr. 2021.

DAÂSSI, D. et al. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriopsis gallica* into Ca-alginate beads. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 71–78, 2014.

DAVIS, M. E. Ordered porous materials for emerging applications. **Nature**, v. 417, n. 6891, p. 813–821, jun. 2002.

DE VASCONCELLOS, A. et al. Potential new biocatalysts for biofuel production: The fungal lipases of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolitic supports ion exchanged with transition metals. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 214, p. 166–180, set. 2015.

DEBECKER, D. P. et al. Hybrid chemoenzymatic heterogeneous catalysts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 28, p. 100437, abr. 2021.

DERBE, T.; TEMESGEN, S.; BITEW, M. A Short Review on Synthesis, Characterization, and Applications of Zeolites. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2021, p. 1–17, 28 set. 2021.

DESAI, S. S.; NITYANAND, C. Microbial Laccases and their Applications: A Review. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 98–124, 15 fev. 2011.

DOUGNIER, F.; GUTH, J. L. **Possible recovery of crown ethers occluded in FAU- and EMT-type zeolites** *Microporous Materials*. [s.l.: s.n.].

DRISCOLL, W. C. Robustness of the ANOVA and Tukey-Kramer statistical tests. **Computers & Industrial Engineering**, v. 31, n. 1–2, p. 265–268, out. 1996.

ENGELHARDT, G.; KOLLER, H. ²⁹Si NMR of Inorganic Solids. Em: [s.l.: s.n.]. p. 1–29.

ERICKSON, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. **Biological Procedures Online**, v. 11, n. 1, p. 32–51, 15 dez. 2009.

ERNST, H. A. et al. A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018a.

ERNST, H. A. et al. A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. **PLOS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206589, 5 nov. 2018b.

ESSMANN, U. et al. A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995.

EVERETT, D. H.; POWL, J. C. Adsorption in slit-like and cylindrical micropores in the henry's law region. A model for the microporosity of carbons. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases**, v. 72, n. 0, p. 619, 1976.

FABBRINI, M. et al. An oxidation of alcohols by oxygen with the enzyme laccase and mediation by TEMPO. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 43, p. 7551–7553, out. 2001.

FABBRINI, M.; GALLI, C.; GENTILI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 5–6, p. 231–240, fev. 2002.

FAN, H. T. et al. Optical properties of δ -Bi₂O₃ thin films grown by reactive sputtering. **Applied Physics Letters**, v. 87, n. 23, 5 dez. 2005.

FAN, L. et al. Decolorization mechanism of 1-amino-4-bromoanthraquinone-2-sulfonic acid using *Sphingomonas herbicidovorans* FL. **Dyes and Pigments**, v. 78, n. 1, p. 34–38, jan. 2008.

FARSANA, O. P.; KUMARI, P. **Hierarchical Assembly of Zeolites: A Present Scenario**. **Engineered Science** Engineered Science Publisher, , 1 fev. 2023.

FLANIGEN, E. M. Chapter 2 Zeolites and Molecular Sieves an Historical Perspective. Em: [s.l.: s.n.]. p. 13–34.

FLANIGEN, E. M.; KHATAMI, H. Infrared Structural Studies of Zeolite Frameworks. **Molecular Sieve Zeolites I**, v. 36, n. 5, p. 99–123, 1974.

FLANIGEN, E. M.; KHATAMI, H.; SZYMANSKI, H. A. Infrared Structural Studies of Zeolite Frameworks. *Em: [s.l: s.n.].* p. 201–229.

FORTES, C. C. S. et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 117, p. 1–8, 2017.

FULLER, R. et al. Pollution and health: a progress update. **The Lancet Planetary Health**, v. 6, n. 6, p. e535–e547, jun. 2022.

GABDULKHAKOV, A. et al. Investigations of Accessibility of T2/T3 Copper Center of Two-Domain Laccase from *Streptomyces griseoflavus* Ac-993. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3184, 28 jun. 2019.

GEOR MALAR, C. et al. Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect. **Biochemical Engineering Journal**, v. 158, p. 107574, 15 jun. 2020.

GEORGE, J. et al. Insolubilization of *Trametes versicolor* laccase as cross-linked enzyme aggregates for the remediation of trace organic contaminants from municipal wastewater. **Environmental Research**, v. 209, 1 jun. 2022.

GHOBARAKAR, H.; GUTH, U. **Zeolites-from kitchen to spaceProg. Solid St. Chem.** [s.l: s.n.].

GINTER, D. M. et al. A physicochemical study of the ageing of colloidal silica gels used in zeolite Y synthesis. **Zeolites**, v. 12, n. 6, p. 733–741, jul. 1992.

GINTING, S. B. et al. Synthesis and Characterization of Zeolite Lynde Type A (LTA): Effect of Aging Time. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1376, n. 1, p. 012041, 1 nov. 2019.

GIRSOVA, M. A. et al. Infrared Spectroscopy of Bismuth-Containing Composites Based on Porous High-Silica Glass. **Glass Physics and Chemistry**, v. 46, n. 2, p. 138–145, 2020.

GOMEZ, C. L. et al. Stabilization of the delta-phase in Bi₂O₃ thin films. **Solid State Ionics**, v. 255, p. 147–152, fev. 2014.

GRABMAIER, B. C.; HAUSSÜHL, S.; KLÜFERS, P. **Crystal growth, structure, and physical properties of Bi₂Ge₃O₉***Zeitschrift für Kristallographie*. [s.l: s.n.].

GU, Y. et al. Recent developments of a co-immobilized laccase–mediator system: a review. **RSC Advances**, v. 11, n. 47, p. 29498–29506, 2021.

GUILHERME BUZANICH, A. et al. BAMline-A real-life sample materials research beamline. **The Journal of Chemical Physics**, v. 158, n. 24, 28 jun. 2023.

GUO, X. et al. **Synthesis of titanium silicalite- I from TPABr system**. [s.l: s.n.].

- GUO, X. et al. **The utility of the template effect in metal-organic frameworks.** *Coordination Chemistry Reviews* Elsevier B.V., , 15 jul. 2019.
- GUZIK, U.; WOJCIESZYŃSKA, D. Biodegradation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Their Influence on Soil Microorganisms. *Em: [s.l: s.n.].* p. 379–401.
- HAKAMADA, M.; TAKAHASHI, M.; MABUCHI, M. Enhanced thermal stability of laccase immobilized on monolayer-modified nanoporous Au. **Materials Letters**, v. 66, n. 1, p. 4–6, 1 jan. 2012.
- HAO, J. et al. n-Heptane catalytic cracking on ZSM-5 zeolite nanosheets: Effect of nanosheet thickness. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 310, p. 110647, jan. 2021.
- HAWTHORNE, S. B. et al. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 892, n. 1–2, p. 421–433, set. 2000.
- HESS, B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 1, p. 116–122, jan. 2008.
- HESS, B. et al. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, mar. 2008.
- HIKICHI, N. et al. Role of sodium cation during aging process in the synthesis of LEV-type zeolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 284, p. 82–89, ago. 2019.
- HONG, M.; CHEN, Z.-G.; ZOU, J. Fundamental and progress of Bi₂Te₃ -based thermoelectric materials. **Chinese Physics B**, v. 27, n. 4, p. 048403, abr. 2018.
- HONG, S. et al. Understanding formation thermodynamics of structurally diverse zeolite oligomers with first principles calculations. **Dalton Transactions**, v. 52, n. 5, p. 1301–1315, 2023.
- HORVÁTH, G.; KAWAZOE, K. Method for the calculation of effective pore size distribution in molecular sieve carbon. **JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN**, v. 16, n. 6, p. 470–475, 1983.
- HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 30 jul. 2004.
- HU, C. et al. Facet-selective charge separation in two-dimensional bismuth-based photocatalysts. **Catalysis Science and Technology**, v. 11, n. 11, p. 3659–3675, 2021.

- HU, J. et al. Immobilization of laccase on magnetic silica nanoparticles and its application in the oxidation of guaiacol, a phenolic lignin model compound. **RSC Advances**, v. 5, n. 120, p. 99439–99447, 2015.
- HU, X.; ZHAO, X.; HWANG, H. MIN. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1618–1626, 2007.
- IQHRAMMULLAH, M. et al. Laccase Immobilization Using Polymeric Supports for Wastewater Treatment: A Critical Review. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 224, n. 9, 23 maio 2023.
- ISHIIB, M.; HARADAB, K. Bismuth silicate $\text{Bi}_2\text{Si}_2\text{O}_7$, a faster scintillator germanate $\text{Bi}_2\text{Ge}_2\text{O}_7$. v. 372, p. 45–50, 1996.
- ISLAM, M. R.; MOSTAFA, M. G. Textile Dyeing Effluents and Environment Concerns-A Review. **J. Environ. Sci. & Natural Resources**, v. 11, n. 2, p. 131–144, 2018.
- ISLAM, T. et al. **Impact of textile dyes on health and ecosystem: a review of structure, causes, and potential solutions. Environmental Science and Pollution Research** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 jan. 2023.
- ISLAS-FLORES, H. et al. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 7, p. 5157–5166, 2014.
- IUPAC. α -cleavage. Em: **The IUPAC Compendium of Chemical Terminology**. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014.
- JACOBSEN, C. J. H. et al. **Mesoporous zeolite single crystals. Journal of the American Chemical Society**, 26 jul. 2000.
- JAEGER, C.; HEMMANN, F. EASY: A simple tool for simultaneously removing background, deadtime and acoustic ringing in quantitative NMR spectroscopy—Part I: Basic principle and applications. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 57–58, p. 22–28, fev. 2014.
- JALE, S. R.; OJO, A.; FITCH, F. R. Synthesis of microporous zirconosilicates containing ZrO_6 octahedra and SiO_4 tetrahedra. **Chemical Communications**, n. 5, p. 411–412, 1999.
- JAN-ROBLERO, J.; CRUZ-MAYA, J. A. Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2097, 23 fev. 2023.
- JANUSZ, G. et al. Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 966, 31 jan. 2020.

JEYABALAN, J. et al. A review on the laccase assisted decolourization of dyes: Recent trends and research progress. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 151, p. 105081, out. 2023.

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**, v. 520, p. 869–880, 15 dez. 2016.

Jl, Y. et al. Synthesis of isomorphous MFI nanosheet zeolites for supercritical catalytic cracking of n-dodecane. **Applied Catalysis A: General**, v. 533, p. 90–98, mar. 2017.

JIA, C.-J. et al. Small-sized HZSM-5 zeolite as highly active catalyst for gas phase dehydration of glycerol to acrolein. **Journal of Catalysis**, v. 269, n. 1, p. 71–79, jan. 2010.

JIANG, B. et al. Mesoporous Metallic Iridium Nanosheets. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 39, p. 12434–12441, 3 out. 2018.

JO, D.; HONG, S. B. Charge distribution and conformational stability effects of organic structure-directing agents on zeolite synthesis. **Chemical Communications**, v. 54, n. 5, p. 487–490, 2018.

JOYNER, L. G.; BARRETT, E. P.; SKOLD, R. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. II. Comparison between Nitrogen Isotherm and Mercury Porosimeter Methods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 7, p. 3155–3158, 1 jul. 1951.

KANG, S. W.; YANG, J. H.; YIM, M. S. Examining Practical Application Feasibility of Bismuth-Embedded SBA-15 for Gaseous Iodine Adsorption. **Nuclear Technology**, v. 206, n. 10, p. 1593–1606, 2020.

KARTHIK, K. et al. Photocatalytic activity of bismuth silicate heterostructures synthesized via surfactant mediated sol-gel method. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 102, n. May, p. 104589, 2019.

KERSTENS, D. et al. **State of the Art and Perspectives of Hierarchical Zeolites: Practical Overview of Synthesis Methods and Use in Catalysis. Advanced Materials**Wiley-VCH Verlag, , 1 nov. 2020.

KHALEQUE, A. et al. Zeolite synthesis from low-cost materials and environmental applications: A review. **Environmental Advances**, v. 2, p. 100019, dez. 2020.

KHATAMI, S. H. et al. Laccase: Various types and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 2658–2672, 18 dez. 2022.

KIM, W. J. et al. Study on the rapid crystallization of ETS-4 and ETS-10. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 41, n. 1–3, p. 79–88, dez. 2000.

KIM, Y. T.; JUNG, K.-D.; PARK, E. D. Gas-phase dehydration of glycerol over silica–alumina catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 107, n. 1–2, p. 177–187, ago. 2011.

KLUNK, M. A. et al. Comparative study using different external sources of aluminum on the zeolites synthesis from rice husk ash. **Materials Research Express**, v. 7, n. 1, p. 015023, 1 jan. 2020.

KOBAYASHI, M. et al. Large-size bismuth silicate ($\text{Bi}_4\text{Si}_3\text{O}_{12}$) scintillating crystals of good quality. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 400, n. 2–3, p. 392–400, 1997.

KOKH, D. B. et al. TRAPP: A tool for analysis of Transient binding Pockets in Proteins. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 5, p. 1235–1252, 24 maio 2013.

KOTASTHANE, A. N.; SHIRALKAR, V. P. Thermoanalytical studies of high silica ZSM-5 zeolites containing organic templateS. **Thermochimica Acta**, v. 102, p. 37–45, jun. 1986.

KOVO, A. S.; HOLMES, S. M. Effect of Aging on the Synthesis of Kaolin-Based Zeolite Y from Ahoko Nigeria Using a Novel Metakaolinization Technique. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 4, p. 442–448, 23 mar. 2010.

KRACHUAMRAM, S.; CHANAPATTHARAPOL, K. C.; KAMONSUTTHIPAIJIT, N. Synthesis and characterization of NaX-type zeolites prepared by different silica and alumina sources and their CO_2 adsorption properties. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 310, p. 110632, jan. 2021.

KRISNANDI, Y. K.; LACHOWSKI, E. E.; HOWE, R. F. Effects of Ion Exchange on the Structure of ETS-10. **ChemInform**, v. 37, n. 17, 25 abr. 2006.

KRÓL, M. Natural vs. Synthetic Zeolites. **Crystals**, v. 10, n. 7, p. 622, 17 jul. 2020.

KUSZ, B.; TRZEBIATOWSKI, K.; BARCZYNSKI, R. J. Ionic conductivity of bismuth silicate and bismuth germanate glasses. **Solid State Ionics**, v. 159, n. 3–4, p. 293–299, 2003.

LAN, K. et al. Uniform Ordered Two-Dimensional Mesoporous TiO_2 Nanosheets from Hydrothermal-Induced Solvent-Confined Monomicelle Assembly. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 11, p. 4135–4143, 21 mar. 2018.

LAU, C.; YEE, C. **REUSABILITY AND LEAKAGE OF IMMOBILIZED LACCASE ENZYME**. [s.l.] UNIVERSITI MALAYSIA PAHANG, 2015.

LECHERT, H. The pH-value and its importance for the crystallization of zeolites. Em: **Verified Syntheses of Zeolitic Materials**. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 33–38.

LEI, Y. et al. Enhanced catalytic performance in the gas-phase epoxidation of propylene over Ti-modified MoO₃-Bi₂SiO₅/SiO₂ catalysts. **Journal of Catalysis**, v. 321, p. 100–112, 1 jan. 2015.

LENG, Y. J.; CHAN, S. H. Anode-Supported SOFCs with Y₂O₃-Doped Bi₂O₃ / Gd₂O₃-Doped CeO₂ Composite Electrolyte Film. **Electrochemical and Solid-State Letters**, v. 9, n. 2, p. A56–A59, 1 fev. 2006.

LI, F. et al. Z-scheme bismuth-rich bismuth oxide iodide/bismuth oxide bromide hybrids with novel spatial structure: Efficient photocatalytic degradation of phenolic contaminants accelerated by in situ generated redox mediators. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 614, p. 233–246, 15 maio 2022.

LI, H. et al. Synthesis of ZSM-5 Zeolite Nanosheets with Tunable Silanol Nest Contents across an Ultra-wide pH Range and Their Catalytic Validation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 63, n. 24, 10 jun. 2024.

LI, J.; CORMA, A.; YU, J. Synthesis of new zeolite structures. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 20, p. 7112–7127, 2015.

LI, M.; CHEN, Y. Analysis of Sulfonated Anthraquinone Dyes by Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-flight Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Textile Science & Engineering**, v. 06, n. 01, 2015.

LI, W. X.; SUN, H. Y.; ZHANG, R. F. **Immobilization of laccase on a novel ZnO/SiO₂ nano-composited support for dye decolorization**. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. **Anais...**Institute of Physics Publishing, 16 jul. 2015.

LI, Y.; LI, L.; YU, J. Applications of Zeolites in Sustainable Chemistry. **Chem**, v. 3, n. 6, p. 928–949, dez. 2017.

LI, Y.; YU, J. New Stories of Zeolite Structures: Their Descriptions, Determinations, Predictions, and Evaluations. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 14, p. 7268–7316, 23 jul. 2014.

LITRENTA MEDEIROS, V. et al. Synthesis and physicochemical characterization of a novel adsorbent based on yttrium silicate: A potential material for removal of lead and cadmium from aqueous media. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 4, 1 ago. 2020.

LIU, D.-M.; DONG, C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 464–475, 1 maio 2020.

LIU, S. et al. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 396–408, nov. 2021.

LIU, X. et al. Influence of synthesis parameters on NaA zeolite crystals. **Powder Technology**, v. 243, p. 184–193, jul. 2013.

LIU, Y. et al. Regulating acidity, porosity, and morphology of hierarchical SAPO-11 zeolite by aging treatment. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 55–63, out. 2016.

LLORET, L. et al. On the use of a high-redox potential laccase as an alternative for the transformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 233–242, 2013.

LOBO, R. F.; ZONES, S. I.; DAVIS, M. E. Structure-direction in zeolite synthesis. **Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry**, v. 21, n. 1–4, p. 47–78, mar. 1995.

LUIZON FILHO, R. A. et al. Synthesis and characterization of chromium silicate catalyst and its application in the gas phase glycerol transformation into acetaldehyde. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 112, p. 107710, fev. 2020.

LUTZ, W. Zeolite Y: Synthesis, Modification, and Properties—A Case Revisited. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2014, p. 1–20, 2014.

MAGALHÃES, F. F. et al. **Recent Developments and Challenges in the Application of Fungal Laccase for the Biodegradation of Textile Dye Pollutants**. [s.l.: s.n.].

MAGHRABY, Y. R. et al. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 14 fev. 2023.

MAHMOODI, N. M.; SAFFAR-DASTGERDI, M. H. Clean Laccase immobilized nanobiocatalysts (graphene oxide - zeolite nanocomposites): From production to detailed biocatalytic degradation of organic pollutant. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 268, p. 118443, jul. 2020a.

MAHMOODI, N. M.; SAFFAR-DASTGERDI, M. H. Clean Laccase immobilized nanobiocatalysts (graphene oxide - zeolite nanocomposites): From production to detailed biocatalytic degradation of organic pollutant. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 268, 5 jul. 2020b.

MAHMOODI, N. M.; SAFFAR-DASTGERDI, M. H.; HAYATI, B. Environmentally friendly novel covalently immobilized enzyme bionanocomposite: From synthesis to the destruction of pollutant. **Composites Part B: Engineering**, v. 184, p. 107666, mar. 2020.

MAHURI, M.; PAUL, M.; THATOI, H. A review of microbial laccase production and activity toward different biotechnological applications. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 3, n. 4, p. 533–551, 15 out. 2023.

MAKAS, Y. G. et al. Immobilization of laccase in κ -carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 4, p. 216–220, ago. 2010.

- MARCHLEWICZ, A. et al. Exploring the Degradation of Ibuprofen by *Bacillus thuringiensis* B1(2015b): The New Pathway and Factors Affecting Degradation. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1676, 9 out. 2017.
- MARCO-URREA, E. et al. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 74, n. 6, p. 765–772, 2009.
- MARGETA, K. et al. Natural Zeolites in Water Treatment – How Effective is Their Use. Em: **Water Treatment**. [s.l.] InTech, 2013.
- MARINA, E. A. et al. Synthesis of eulytite ($\text{Bi}_4\text{Si}_3\text{O}_{12}$) crystals in the hydrothermal solutions with different compositions. **Vestnik Otdelenia nauk o Zemle RAN**, v. 3, n. Special Issue, p. 1–7, 17 jun. 2011.
- MARIÑO, M. A.; FULAZ, S.; TASIC, L. **Magnetic nanomaterials as biocatalyst carriers for biomass processing: Immobilization strategies, reusability, and applications**. **Magnetochemistry** MDPI, , 1 out. 2021.
- MELANINGTYAS, G. S. A.; KRISNANDI, Y. K.; EKANANDA, R. Synthesis and characterization of NaY zeolite from Bayat natural zeolite: effect of pH on synthesis. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 496, p. 012042, 7 maio 2019.
- MER'KOV, A. N. et al. Raite and zorite, new minerals from the Lovozero Tundra. **International Geology Review**, v. 15, n. 9, p. 1087–1094, 10 set. 1973.
- MERLINO, S.; BONACCORSI, E.; ARMBRUSTER, T. Tobermorites; their real structure and order-disorder (OD) character. **American Mineralogist**, v. 84, n. 10, p. 1613–1621, 1 out. 1999.
- MERLINO, S.; BONACCORSI, E.; ARMBRUSTER, T. The real structure of tobermorite 11A: normal and anomalous forms, OD character and polytypic modifications. **European Journal of Mineralogy**, v. 13, n. 3, p. 577–590, 29 maio 2001.
- MISHRA, S.; MAITI, A. **Applicability of enzymes produced from different biotic species for biodegradation of textile dyes**. **Clean Technologies and Environmental Policy** Springer Verlag, , 15 maio 2019.
- MITCHELL, S.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. Mesoporous zeolites as enzyme carriers: Synthesis, characterization, and application in biocatalysis. **Catalysis Today**, v. 168, n. 1, p. 28–37, jun. 2011.
- MÖBS, M. et al. Further Insights into the Chemical Synthesis of F2 and on Drying moist HF. **Inorganic Chemistry**, v. 63, n. 16, p. 7105–7112, 22 abr. 2024.
- MODKOVSKI, T. A. et al. Simultaneous Removal of Textile Dyes by Adsorption and Biodegradation Using *Trametes villosa* Laccase Immobilized on Magnetic Particles. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 232, n. 12, 1 dez. 2021.

MOHAMED, M. M.; ZIDAN, F. I.; FODAIL, M. H. Synthesis of ZSM-5 zeolite of improved bulk and surface properties via mixed templates. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 11, p. 4066–4075, 1 jun. 2007.

MOHAMED, R. M. et al. Effect of the silica sources on the crystallinity of nanosized ZSM-5 zeolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 79, n. 1–3, p. 7–12, abr. 2005.

MOJISOV, K. D. et al. The Application of Enzymes for the Removal of Dyes from Textile Effluents. 2016.

MOLINER, M. et al. A New Aluminosilicate Molecular Sieve with a System of Pores between Those of ZSM-5 and Beta Zeolite. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 24, p. 9497–9505, 22 jun. 2011.

MOUSAVI, S. F. et al. Template free crystallization of zeolite Rho via Hydrothermal synthesis: Effects of synthesis time, synthesis temperature, water content and alkalinity. **Ceramics International**, v. 39, n. 6, p. 7149–7158, ago. 2013.

MUMTAZ, F.; IRFAN, M. F.; USMAN, M. R. Synthesis methods and recent advances in hierarchical zeolites: a brief review. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 18, n. 9, p. 2215–2229, 24 set. 2021.

MUSYOKA, N. M. et al. Thermal stability studies of zeolites A and X synthesized from South African coal fly ash. **Research on Chemical Intermediates**, v. 41, n. 2, p. 575–582, 10 fev. 2015.

NAKHAEI POUR, A.; MOHAMMADI, A. Effects of Synthesis Parameters on Organic Template-Free Preparation of Zeolite Y. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 31, n. 6, p. 2501–2510, 18 jun. 2021.

NEUNZIG, I. et al. Production and NMR analysis of the human ibuprofen metabolite 3-hydroxyibuprofen. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 3, p. 417–420, fev. 2012.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 30 nov. 2017.

OBA, S. N. et al. **Removal of ibuprofen from aqueous media by adsorption: A comprehensive review.** *Science of the Total Environment* Elsevier B.V., , 1 ago. 2021.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Transformation pathway of Remazol Brilliant Blue R by immobilised laccase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22, p. 8509–8514, nov. 2010.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. New York, NY: Springer New York, 2006.

PARK, S. et al. Laccase-Mediator System Using a Natural Mediator as a Whitening Agent for the Decolorization of Melanin. **Polymers**, v. 13, n. 21, p. 3671, 25 out. 2021.

PATEL, S. K. S. et al. Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 639–647, 2014.

PATEL, S. K. S.; KALIA, V. C.; LEE, J. K. Laccase Immobilization on Copper-Magnetic Nanoparticles for Efficient Bisphenol Degradation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 127–134, 1 jan. 2023.

PAULA, A. S. et al. One-step oxidehydration of glycerol to acrylic acid using ETS-10-like vanadosilicates. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 232, p. 151–160, set. 2016.

PELLENS, N. et al. A zeolite crystallisation model confirmed by in situ observation. **Faraday Discussions**, v. 235, p. 162–182, 2022.

PENG, J. et al. Anthraquinone removal by a metal-organic framework/polyvinyl alcohol cryogel-immobilized laccase: Effect and mechanism exploration. **Chemical Engineering Journal**, v. 418, p. 129473, ago. 2021.

PERALTA-ZAMORA, P. et al. **Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase** *Applied Catalysis B: Environmental*. [s.l: s.n.].

PEREZ-PARIENTE, J.; A. MARTENS, J.; A. JACOBS, P. Crystallization mechanism of zeolite beta from (TEA)₂O, Na₂O and K₂O containing aluminosilicate gels. **Applied Catalysis**, v. 31, n. 1, p. 35–64, jan. 1987.

PERLATTI, B. et al. Validation and application of HPLC–ESI-MS/MS method for the quantification of RBBR decolorization, a model for highly toxic molecules, using several fungi strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 37–44, nov. 2012.

PEZZELLA, C. et al. Immobilization of a pleurotus ostreatus laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

PHILIPPOU, A.; ANDERSON, M. W. Structural investigation of ETS-4. **Zeolites**, v. 16, n. 2–3, p. 98–107, fev. 1996.

PICÓ, Y. et al. Analysis of ibuprofen and its main metabolites in roots, shoots, and seeds of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry: uptake, metabolism, and translocation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 3, p. 1163–1176, 1 jan. 2018.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305, jun. 1946.

POOJA, D.; KUMAR, P.; SINGH, P. **Sensors in Water Pollutants Monitoring: Role of Material Advanced Functional Materials and Sensors**. [s.l: s.n.].

QI, F. et al. Crystallization behavior of calcium silicate hydrate in highly alkaline system: Structure and kinetics. **Journal of Crystal Growth**, v. 584, p. 126578, abr. 2022.

QIU, P. et al. Pushing the Limit of Ordered Mesoporous Materials via 2D Self-Assembly for Energy Conversion and Storage. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 7, 26 fev. 2021.

QIU, X. et al. Laccase immobilized on magnetic nanoparticles modified by amino-functionalized ionic liquid via dialdehyde starch for phenolic compounds biodegradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 391, p. 123564, 1 jul. 2020.

RAGUGNETTI, M. et al. Ibuprofen genotoxicity in aquatic environment: An experimental model using *Oreochromis niloticus*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 218, n. 1–4, p. 361–364, jun. 2011.

REINHAMMAR, B. Laccase. Em: **Copper Proteins and Copper Enzymes**. [s.l.] CRC Press, 2018. p. 1–36.

RIESEMEIER, H. et al. Layout and first XRF applications of the BAMline at BESSY II. **X-Ray Spectrometry**, v. 34, n. 2, p. 160–163, 13 mar. 2005.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219–226, maio 2006a.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219–226, maio 2006b.

ROCCARO, P. **Treatment processes for municipal wastewater reclamation: The challenges of emerging contaminants and direct potable reuse**. **Current Opinion in Environmental Science and Health** Elsevier B.V., , 1 abr. 2018.

ROCHA, J. et al. Synthesis and characterisation of a novel microporous niobium silicate catalyst. **Chemical Communications**, n. 24, p. 2687–2688, 1998.

ROCHA, J. Microporous Mixed Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral Framework Silicates. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 57, n. 1, p. 173–201, 1 jan. 2005.

ROCHA, J.; ANDERSON, M. W. Microporous Titanosilicates and other Novel Mixed Octahedral-Tetrahedral Framework Oxides. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2000, n. 5, p. 801–818, maio 2000.

ROUND, C. I. et al. The crystal morphology of zeolite A. The effects of the source of the reagents. **Microporous Materials**, v. 11, n. 3–4, p. 213–225, set. 1997.

SALAMI, F. et al. Covalent immobilization of laccase by one pot three component reaction and its application in the decolorization of textile dyes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 144–151, 1 dez. 2018.

SANJAY, G.; SUGUNAN, S. Invertase immobilised on montmorillonite: Reusability enhancement and reduction in leaching. **Catalysis Communications**, v. 6, n. 1, p. 81–86, jan. 2005.

SCHMIDT-WINKEL, P. et al. **Mesocellular siliceous foams with uniformly sized cells and windows** [5]. **Journal of the American Chemical Society**, 13 jan. 1999.
SEGAL, D. J.; SANTOROAND, " R P; NEWNHA1U, R. E. **Neutron-diffraction study of Bi4Si3O12Bd**. [s.l: s.n.].

SELVIN, R. et al. Effect of Aging on the Precursor Sol for the Synthesis of Nanocrystalline ZSM-5. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1028–1032, 1 set. 2011.

SHAMSUDIN, M. I.; TAN, L. S.; TSUJI, T. Enzyme Immobilization Technology in Biofuel Production: A Review. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1051, n. 1, p. 012056, 1 fev. 2021.

SHARMA, K. K. et al. Middle-redox potential laccase from *Ganoderma* sp.: Its application in improvement of feed for monogastric animals. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.

SHETU, S. A. et al. Medicinal bismuth: Bismuth-organic frameworks as pharmaceutically privileged compounds. **Tetrahedron**, v. 129, p. 133117, dez. 2022.

SIGURDARDÓTTIR, S. B. et al. **Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials**. **Advanced Synthesis and Catalysis**Wiley-VCH Verlag, , 16 jul. 2018.

SKJÆRVEN, L.; REUTER, N.; MARTINEZ, A. **Dynamics, flexibility and ligand-induced conformational changes in biological macromolecules: A computational approach**. **Future Medicinal Chemistry**, dez. 2011.

SOLDATKINA, O. V. et al. Development of electrochemical biosensors with various types of zeolites. **Applied Nanoscience**, v. 9, n. 5, p. 737–747, 21 jul. 2019.

SONG, S. et al. Recent advances in bismuth-based photocatalysts: Environment and energy applications. **Green Energy and Environment**, n. xxxx, 2022.

SUN, H. et al. Strong Ultra-Broadband Near-Infrared Photoluminescence from Bismuth-Embedded Zeolites and Their Derivatives. **Advanced Materials**, v. 21, n. 36, p. 3694–3698, 25 set. 2009a.

SUN, H. T. et al. Strong ultra-broadband near-infrared photoluminescence from bismuth-embedded zeolites and their derivatives. **Advanced Materials**, v. 21, n. 36, p. 3694–3698, 2009b.

SUN, H. T. et al. Synchrotron X-ray, photoluminescence, and quantum chemistry studies of bismuth-embedded dehydrated zeolite y. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 6, p. 2918–2921, 2012a.

SUN, H. T. et al. Synchrotron X-ray, photoluminescence, and quantum chemistry studies of bismuth-embedded dehydrated zeolite y. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 6, p. 2918–2921, 15 fev. 2012b.

TAO, Y. et al. **Mesopore-modified zeolites: Preparation, characterization, and applications**. **Chemical Reviews**, mar. 2006.

THOMPSON, R. W. Recent Advances in the Understanding of Zeolite Synthesis. Em: **Synthesis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, [s.d.]. p. 1–33.

TOCCO, D. et al. Immobilization of *Aspergillus* sp. laccase on hierarchical silica MFI zeolite with embedded macropores. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 226, 1 jun. 2023.

TODSEN, W. L. ChemDoodle 6.0. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 8, p. 2391–2393, 25 ago. 2014.

ULSON DE SOUZA, S. M. A. G.; FORGIARINI, E.; ULSON DE SOUZA, A. A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 3, p. 1073–1078, 25 ago. 2007.

VALTCHEV, V. P.; BOZHILOV, K. N. Transmission electron microscopy study of the formation of FAU-type zeolite at room temperature. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, n. 40, p. 15587–15598, 7 out. 2004.

VAN DER GAAG, F. J.; JANSEN, J. C.; VAN BEKKUM, H. Template Variation in the Synthesis of Zeolite ZSM-5. **Applied Catalysis**, v. 17, p. 261–271, 1985.

VAN DER SPOEL, D. et al. **GROMACS: Fast, flexible, and free**. **Journal of Computational Chemistry**, dez. 2005.

VAN DONK, S. et al. **Generation, characterization, and impact of mesopores in zeolite catalysts**. **Catalysis Reviews - Science and Engineering**, maio 2003.

VEGERE, K. et al. Comparative study of hydrothermal synthesis routes of zeolite A. **Materials Today: Proceedings**, v. 33, p. 1984–1987, 2020.

VIEIRA, I. H. P. et al. Visual dynamics: a WEB application for molecular dynamics simulation using GROMACS. **BMC Bioinformatics**, v. 24, n. 1, 1 dez. 2023.

VINU, A.; MORI, T.; ARIGA, K. New families of mesoporous materials. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 7, n. 8, p. 753–771, 12 jan. 2006.

WANG, J.; LI, Y. Synthesis of single-crystalline nanobelts of ternary bismuth oxide bromide with different compositions. **Chemical Communications**, v. 3, n. 18, p. 2320–2321, 2003.

- WANG, L. et al. Hierarchical mesoporous zeolites with controllable mesoporosity templated from cationic polymers. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 131, n. 1–3, p. 58–67, jun. 2010.
- WANG, Q. et al. **Laccase on magnetic support**BioResources. [s.l: s.n.].
- WANG, Y.-J. et al. Synthesis of ZSM-5 using different silicon and aluminum sources nature for catalytic conversion of lignite pyrolysis volatiles to light aromatics. **Fuel**, v. 268, p. 117286, maio 2020.
- WEHAIDY, H. R. et al. Nanoporous Zeolite-X as a new carrier for laccase immobilization and its application in dyes decolorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101135, maio 2019a.
- WEHAIDY, H. R. et al. Nanoporous Zeolite-X as a new carrier for laccase immobilization and its application in dyes decolorization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 1 maio 2019b.
- WILLIAMSON, P. R. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 3, p. 656–664, fev. 1994.
- WU, E. et al. Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. **Chemosphere**, v. 233, p. 327–335, 1 out. 2019.
- WU, Y. et al. Crystallization and morphology of zeolite MCM-22 influenced by various conditions in the static hydrothermal synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 112, n. 1–3, p. 138–146, jul. 2008.
- XIAO, F. S. et al. Catalytic properties of hierarchical mesoporous zeolites templated with a mixture of small organic ammonium salts and mesoscale cationic polymers. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 45, n. 19, p. 3090–3093, 5 maio 2006.
- XING, G.-W. et al. Enzymatic Peptide Synthesis in Organic Solvent with Different Zeolites as Immobilization Matrixes. **Tetrahedron**, v. 56, n. 22, p. 3517–3522, maio 2000.
- XU, F. et al. **Site-directed mutations in fungal laccase : effect on redox potential, activity and pH profile**Biochem. J. [s.l: s.n.].
- XU, M. et al. Improvement of Luminescence Properties of Eulytite Single-Phase White Emitting $\text{Ca}_3\text{Bi}(\text{PO}_4)_3: \text{Ce}^{3+}/\text{Dy}^{3+}$ Phosphor. **Molecules**, v. 28, n. 13, 1 jul. 2023.
- YANG, J. et al. Immobilized *Cerrena* sp. laccase: Preparation, thermal inactivation, and operational stability in malachite green decolorization. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

YANG, J. H. et al. Bismuth-embedded SBA-15 mesoporous silica for radioactive iodine capture and stable storage. **Journal of Nuclear Materials**, v. 465, p. 556–564, 4 jul. 2015.

YANG, N.; SUN, H. Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 17–20, p. 2354–2366, set. 2007.

YANG, S.; VLESSIDIS, A. G.; EVMIRIDIS, N. P. Influence of Gel Composition and Crystallization Conditions on the Conventional Synthesis of Zeolites. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, n. 5, p. 1622–1631, 1 maio 1997.

YANG, Y. et al. Enhanced reusability and activity: DNA directed immobilization of enzyme on polydopamine modified magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 137, p. 108–115, 15 set. 2018.

YAVAŞER, R.; KARAGÖZLER, A. A. Laccase immobilized polyacrylamide-alginate cryogel: A candidate for treatment of effluents. **Process Biochemistry**, v. 101, p. 137–146, 1 fev. 2021.

YOO, Y. S. et al. The Effect of Aging on Synthesis of Zeolite at High Temperature. **Materials Science Forum**, v. 620–622, p. 225–228, abr. 2009.

YU, J. Synthesis of Zeolites. Em: [s.l: s.n.]. p. 39–103.

ZANARDI, S. et al. Synthesis, characterization and crystal structure of new microporous bismuth silicates. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 97, n. 1–3, p. 34–41, 2006.

ZARUBIN, D. P. Compositional effects on Si-OH bond length in hydrous silicates with implications for trends in the SiOH acidity. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 212, p. 30–36, abr. 2014.

ZDARTA, J. et al. Enhanced Wastewater Treatment by Immobilized Enzymes. **Current Pollution Reports**, v. 7, n. 2, p. 167–179, 20 jun. 2021.

ZHANG, J. et al. Enhanced removal of ibuprofen in water using dynamic dialysis of laccase catalysis. **Journal of Water Process Engineering**, v. 47, p. 102791, jun. 2022a.

ZHANG, J. et al. Enhanced removal of ibuprofen in water using dynamic dialysis of laccase catalysis. **Journal of Water Process Engineering**, v. 47, 1 jun. 2022b.

ZHANG, K. et al. Laccase immobilized on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles as reusable biocatalyst for degradation of chlorophenol. **Journal of Molecular Structure**, v. 1220, 15 nov. 2020.

ZHANG, N. et al. Evaluation of ibuprofen contamination in local urban rivers and its effects on immune parameters of juvenile grass carp. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 1405–1413, 1 out. 2021.

ZHANG, X.; TANG, D.; JIANG, G. Synthesis of zeolite NaA at room temperature: The effect of synthesis parameters on crystal size and its size distribution. **Advanced Powder Technology**, v. 24, n. 3, p. 689–696, maio 2013.

ZHANG, Z.; ZAWOROTKO, M. J. **Template-directed synthesis of metal-organic materials**. **Chemical Society Reviews** Royal Society of Chemistry, , 21 ago. 2014.

ZHAO, B. et al. Hollow Hierarchical Porous and Antihydrolytic Spherical Zeolitic Imidazolate Frameworks for Enzyme Encapsulation and Biocatalysis. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 16, n. 7, p. 9466–9482, 21 fev. 2024.

ZHAO, Y. et al. High-pressure, high temperature insertion of bismuth in the siliceous zeolite silicalite-1. **Solid State Sciences**, v. 97, n. June, p. 106001, 2019a.

ZHAO, Y. et al. High-pressure, high temperature insertion of bismuth in the siliceous zeolite silicalite-1. **Solid State Sciences**, v. 97, p. 106001, nov. 2019b.

ZHAO, Z.; KOBAYASHI, T. **Partial oxidation of ethane into acetaldehyde and acrolein by oxygen over silica-supported bismuth catalysts** **Applied Catalysis A: General**. [s.l: s.n.].

ZOFAIR, S. F. F. et al. Immobilization of laccase on Sepharose-linked antibody support for decolourization of phenol red. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 78–87, 15 out. 2020.

ZONES, S.; DAVIS, M. E. Zeolite materials: recent discoveries and future prospects. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v. 1, n. 1, p. 107–117, 1996.