



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Ilha Solteira

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**LEVEDURAS QUIMICAMENTE MODIFICADAS COM  
SILSESQUIOXANOS CÚBICOS: AVALIAÇÃO COMO  
BIOSSORVENTE E SENSOR ELETROQUÍMICO**

**BIANCA TRAMA FREITAS**

Ilha Solteira - SP

Janeiro/2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Ilha Solteira

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**“Leveduras quimicamente modificadas com silsesquioxanos  
cúbicos: avaliação como bioissorvente e sensor eletroquímico”**

**BIANCA TRAMA FREITAS**

*Orientador: Prof. Dr. Devaney Ribeiro do Carmo*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia -  
UNESP – Campus de Ilha Solteira, para obtenção do  
título de Doutor em Ciência dos Materiais.  
Área de conhecimento: Química dos Materiais.

Ilha Solteira - SP

Janeiro/2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

F866l Freitas, Bianca Trama.  
Leveduras quimicamente modificadas com silsesquioxanos cúbicos:  
avaliação como bioissorvente e sensor eletroquímico / Bianca Trama Freitas. --  
Ilha Solteira: [s.n.], 2019  
80 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia  
de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais, 2019

Orientador: Devaney Ribeiro do Carmo  
Inclui bibliografia

1. Levedura. 2. Silsesquioxano. 3. Chumbo. 4. Níquel. 5. Bioissorção. 6.  
Toxicidade.

  
Raiane da Silva Santos

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Leveduras quimicamente modificadas com silsesquioxanos cúbicos; Avaliação como biosorvente e sensor eletroquímico

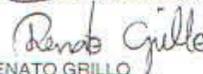
AUTORA: BIANCA TRAMA FREITAS

ORIENTADOR: DEVANEY RIBEIRO DO CARMO

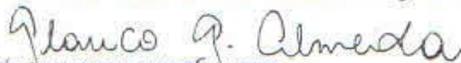
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA DOS MATERIAIS, área: Química dos Materiais pela Comissão Examinadora:



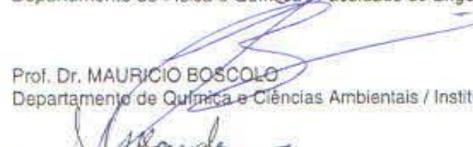
Prof. Dr. DEVANEY RIBEIRO DO CARMO  
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. RENATO GRILLO  
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. GLAUCO GARRIDO ALMEIDA  
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. MAURICIO BOSCOLO  
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas



Dr. ALEXANDRE BORGES  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Ilha Solteira, 12 de março de 2019

Aos meus pais, Paulo e Eliane, por todo amor, dedicação e paciência durante esses tantos anos  
de estudos.

À minha avó Iolanda que dedicou sua vida a nós.

À minha irmã Paola, ao Luciano e às crianças, que me acolheram no início dessa caminhada.

Ao meu marido Johnattan pelo companheirismo que ultrapassou o oceano. Por me amar,  
incentivar e me ensinar a ser alguém melhor todos os dias.

Amo vocês!

## **Agradecimentos**

Ao CNPq pela bolsa concedida (Processo 205379/2014-1) para os estudos em Portugal.

Ao meu orientador Prof. Dr. Devaney Ribeiro do Carmo pela orientação e ensinamentos.

À Profa. Dra. Rosa Maria Quinta-Ferreira e Profa Dra. Maria Emília Quinta-Ferreira, que fizeram de Portugal nossa segunda casa enquanto lá estivemos. Foi um privilégio e um presente tê-las em nossas vidas. A saudade e o carinho são imensos e as levarei sempre em meu coração. Ao Prof. Dr. Licínio Gando Ferreira e ao Dr. Rui Martins por toda assistência e auxílio. Aos colegas do Departamento de Física e do Departamento de Engenharia Química da UC por todo companheirismo e ajuda no período que lá estive.

À Universidade de Coimbra pela excelência e acolhida fraternal.

Ao Departamento de Física e Química da UNESP de Ilha Solteira e todos os funcionários que de alguma forma contribuíram para este projeto.

Aos amigos do GAMN pela paciência e auxílio em tantos momentos. Em especial, obrigada, Mariana, Maiara e Vitor por me socorrerem (e ouvirem) tanto na eletroquímica.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho.

## Resumo

A detecção, especiação e remoção de contaminantes orgânicos e inorgânicos é uma das maiores preocupações ambientais atualmente. Assim, a busca por tecnologias eficientes envolvendo materiais de baixo custo para a resolução de tal problema tem aumentado, e se tornou de extrema importância. Dentro deste contexto, o presente trabalho atuou na produção de um novo material nanoestruturado bioinorgânico híbrido com grandes potencialidades na área de nanotecnologia. O objetivo principal consistiu em modificar quimicamente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com silsesquioxanos cúbicos. Após devidas modificações, o material preparado (LevS) bem como seus precursores, foram caracterizados por técnicas espectroscópicas tais como infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O material híbrido formado (LevS) foi aplicado como biossorvente de chumbo (Pb) e níquel (Ni), obtendo-se uma capacidade máxima de sorção de 248 mg g<sup>-1</sup> e 64,6 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente, e porcentagem de sorção chegando a 100% para 500 ppm de Pb<sup>2+</sup> em 250mLg<sup>-1</sup> de razão líquido/sólido em pH 4, e 77,7% para 100 ppm de Ni<sup>2+</sup> em 100 mLg<sup>-1</sup> de razão líquido/sólido em pH 6. Adicionalmente com intuito de avaliar a toxicidade neuronal dos metais em questão, foram efetuados testes de toxicidade em fatias de hipocampo de ratos que comprovaram que, uma vez submetidos à concentrações de 1 e 3 µM (0,2 e 0,6 ppm) Pb<sup>2+</sup> e 10 e 30 µM (0,5 e 1,5 ppm) de Ni<sup>2+</sup>, as alterações neuronais causadas são irreversíveis.

O material híbrido também foi testado na adsorção do corante catiônico, o azul de metileno, e em seguida o material obtido (LevSA) foi caracterizado por voltametria cíclica empregando um eletrodo de pasta de grafite.

Para os testes voltamétricos, a levedura modificada com silsesquioxano foi submetida ao azul de metileno (LevSA), sendo observada alta capacidade de adsorção de tal corante. O novo material foi aplicado em eletrodo de pasta de grafite e suas características eletroquímicas foram avaliadas e descritas.

**Palavras-chave:** Levedura, Silsesquioxano, Chumbo, Níquel, Biossorção, Toxicidade, Voltametria.

## **Abstract**

The detection, speciation and organic and inorganic contaminants removal is one of the biggest environmental concerns today. Thus, the search for efficient technologies involving low-cost materials for solving such a problem has increased, and became extremely important. Within this context, the present work was focused in the production of a new nanostructured hybrid material bioinorganic with great potential in the area of nanotechnology. The main objective was chemically modify the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with cubic silsesquioxane. After appropriate modifications, the prepared material (LevS) as well as its precursors was characterized by spectroscopic techniques such as infrared (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive x-ray (EDS) and Diffuse Reflectance UV/Vis.

The hybrid material formed (LevS) was applied as biosorbent of lead (Pb) and nickel (Ni), with a maximum capacity of sorption of 248 mg g<sup>-1</sup> and 64.6 mg g<sup>-1</sup>, respectively, and percentage of reaching 100% sorption to 500 ppm of Pb<sup>2+</sup> on 250 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> liquid/solid ratio and 4 pH, and 77.7% to 100 ppm of Ni<sup>2+</sup> on 100 cm<sup>3</sup> g<sup>-1</sup> liquid/solid ratio at pH 6.

In addition, in order to evaluate the neuronal toxicity of the metals in question, toxicity tests were performed on hippocampal slices of mice that proved that, once submitted to concentrations of 1 and 3 μ M (0.2 and 0.6 ppm) Pb<sup>2+</sup> and 10 and 30 μ M (0.5 and 1.5 ppm) of Ni<sup>2+</sup>, neuronal changes caused are irreversible.

The hybrid material was also tested on adsorption of the cationic dye, methylene blue, and then the material obtained (LevSA) was characterized by cyclic voltammetry using a graphite paste electrode.

For the voltammetric tests, the modified yeast with silsesquioxane was subjected to methylene blue (LevSA), being observed adsorption capacity of such a dye. The new material applied in graphite paste electrode and their electrochemical characteristics were evaluated and described.

**Keywords:** Yeast, Silsesquioxane, Lead, Nickel, Biosorption, Toxicity, Voltammetry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas Silsesquioxanos ( $\text{RSiO}_{1,5}\text{n}$ ): (a) Estrutura Parcial de Gaiola (b) Estrutura de Escada, (c) Estrutura Aleatória, (d) Estrutura de gaiola fechada ( $\text{T}_8$ ), (e) Estrutura de gaiola fechada ( $\text{T}_{10}$ ) e (f) Estrutura de gaiola fechada ( $\text{T}_{12}$ ) (Adaptado de Zhou, Ye, & Xu, 2017).....	18
Figura 2. Cérebro e visão frontal do cérebro pós-corte central (Adaptado de BERNE & LEVY, 2009). .....	23
Figura 3. Estrutura do corante azul de metileno. (Adaptado de LONGHINOTTI, FURLAN, et al., 1996) .....	26
Figura 4. Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a $\text{Pb}^{2+}$ 1 $\mu\text{M}$ . Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de chumbo (1 $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados $\pm$ S.E.M. ....	36
Figura 5. Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a $\text{Pb}^{2+}$ 3 $\mu\text{M}$ . Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de chumbo (3 $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados $\pm$ S.E.M. ....	36
Figura 6. Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a $\text{Ni}^{2+}$ 10 $\mu\text{M}$ . Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de níquel (10 $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados $\pm$ S.E.M. ....	37
Figura 7. Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a $\text{Ni}^{2+}$ (30 $\mu\text{M}$ ). Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de níquel (30 $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados $\pm$ S.E.M. ....	38
Figura 8. Imagens da MEV do Silsesquioxano (SS) com aumento de: (A) 3.000X, (B) 10.000X. ....	40
Figura 9. Imagens da MEV da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Lev) com aumento de: (A) 2.000X, (B) 2.500X. ....	41
Figura 10. Imagens da MEV da levedura modificada com silsesquioxano (LevS) com aumento de: (A) 1.000X, (B) 10.000X. ....	42
Figura 11. Espectro do EDS da amostra de SS. ....	43
Figura 12. Espectro de EDS da amostra Lev. ....	44
Figura 13. Espectro do EDS da amostra LevS. ....	44
Figura 14. Espectros vibracionais na região do infravermelho: SS (A), Lev (B), LevS(C). ....	46
Figura 15. Imagens da MEV do material Levedura adsorvida com Azul de Metileno (LevA) com aumento de: (A) 135X, (B) 2.000X e (C) 10.000X. ....	47

Figura 16. Imagens da MEV do material Levedura modificada com Silsesquioxano e Azul de Metileno (LevSA) com aumento de: (A) 135X, (B) 1.000X, (C) 2.000X e (D) 10.000X.....	48
Figura 17. Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras Azul de Metileno (A) e LevA (B). .....	49
Figura 18. Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras LevS(A), Azul de Metileno (B) e LevSA (C).....	50
Figura 19. Capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e porcentagem de remoção (%) de Chumbo diferentes materiais: SS (Silsesquioxano), Lev (Levedura), LevS(Levedura modificada com SS), LevW (Levedura encapsulada proveniente da vinícola) e LevWF (Levedura encapsulada proveniente da vinícola após fermentação). Solução inicial de Chumbo: 100 ppm. Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min; pH = 4. ....	51
Figura 20. Capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e porcentagem de remoção (%) de Níquel diferentes materiais: SS (silsesquioxano), Lev (Levedura), LevS(Levedura modificada com SS), LevW (Levedura encapsulada proveniente da vinícola) e LevWF (Levedura encapsulada proveniente da vinícola após fermentação). Solução inicial de Níquel: 100 ppm. Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min, pH = 6. ....	52
Figura 21. Cinética de sorção de chumbo com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de chumbo: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ , pH = 4.....	53
Figura 22. Cinética de sorção de níquel com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ , pH = 6.....	54
Figura 23. Sorção de chumbo em diferentes concentrações com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min, pH = 4. ....	55
Figura 24. Sorção de níquel em diferentes concentrações com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min, pH = 6. ....	56
Figura 25. Sorção de chumbo em diferentes pHs com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de chumbo: 500 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min. ....	57
Figura 26. Sorção de níquel em diferentes pHs com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min. ....	58
Figura 27. Sorção de chumbo em diferentes temperaturas com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de chumbo: 500 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min, pH = 4.....	59
Figura 28. Sorção de níquel em diferentes temperaturas com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min, pH = 6.....	59

<b>Figura 29. Sorção de Chumbo (A) e Níquel (B) para diferentes razões de líquido/adsorvente (mL g<sup>-1</sup>) com Lev (levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de chumbo: 500 ppm; Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Tempo de contato: 15 min, pH = 4 para chumbo e pH = 6 para o níquel. ....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 30. Curva de calibração da Absorbância do Azul de metileno (<math>\lambda_{max} = 666nm</math>).....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 31. Capacidade de sorção de azul de metileno por Lev e LevS. m=0,1g, V=50mL, Tempo=4 horas. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 32. Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de pasta de grafite modificada: (a) com LevSA e com (b) LevA; (10% m/m; Tampão BR; pH 2; <math>v = 20 \text{ mVs}^{-1}</math>). ....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 33. Voltamogramas cíclicos do LevSA em eletrodo de pasta de grafite em solução de tampão BR em diferentes valores de pH.Eletrodo de pasta de grafite (10% m/m; Tampão BR; <math>v = 20 \text{ mVs}^{-1}</math>). ....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 34. Influência do pH no potencial médio (<math>E^0</math>) de LevSA.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 35. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de grafite contendo LevSA em diferentes velocidades de varredura (10-100 <math>\text{mVs}^{-1}</math>); Gráfico inserido: Dependência da intensidade de corrente do pico anódico e catódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura. (10% m/m; Tampão BR pH2).....</b>	<b>68</b>

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1. Métodos utilizados para detecção de contaminantes ambientais (adaptado de JARQUE, BITTNER, <i>et al.</i>, 2016) .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabela 2. Parâmetros eletroquímicos da pasta de grafite contendo LevSA nas diferentes velocidades de varreduras. (10% m/m; Tampão BR pH2).....</b>	<b>69</b>

## **Lista de abreviaturas e siglas**

- EDS** – Espectroscopia de energia dispersiva de Raios-X.
- FTIR** – Espectroscopia na região do infravermelho.
- MEV** – Microscopia eletrônica de varredura.
- POSS** - Poliedro oligosilsesquioxanos.
- LOD** – Limite de detecção.
- Sa** – Sensibilidade amperométrica.
- ppm** – Parte por milhão
- ppb**–Parte por bilhão.
- AEC** – Antes da Era Comum
- DNA**–Ácidodesoxirribonucleico
- S.E.M.** -Standard Error of Mean
- EQMs** – Eletrodos quimicamente modificados.
- ACSF**–Fluido cerebrospinal artificial.
- VC** – Voltametria cíclica.
- E** –Potencial elétrico.
- E<sup>0'</sup>** – Potencial elétrico médio.
- $\Delta E_p$** – Diferença entre os potenciais dos picos anódico e catódico.
- v**–Velocidade de varredura
- v<sup>1/2</sup>** – Raiz quadrada da velocidade de varredura.
- I**– Corrente.
- I<sub>pa</sub>**– Corrente no pico anódico.
- I<sub>pc</sub>** – Corrente no pico catódico.
- SD**–Desvio padrão.
- |B|** – Módulo da inclinação da reta.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. LEVEDURA.....</b>	<b>15</b>
1.1.1. <i>Aplicação como biossorvente.....</i>	<i>15</i>
<b>1.2. SILSESQUIOXANOS .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. CONTAMINANTES.....</b>	<b>20</b>
1.3.1. <i>Chumbo.....</i>	<i>21</i>
1.3.2. <i>Níquel.....</i>	<i>22</i>
<b>1.4. TOXICIDADE NEURONAL.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5. BIOSSENSORES .....</b>	<b>24</b>
1.5.1. <i>Corante Azul de metileno.....</i>	<i>26</i>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. TOXICIDADE.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS .....</b>	<b>28</b>
3.2.1. <i>Síntese do clorohidrato de silsesquioxano <math>Cl[H_3N(CH_2)_3]_8Si_8O_{12}</math> .....</i>	<i>28</i>
3.2.2. <i>Modificação da levedura com silsesquioxano (LevS).....</i>	<i>29</i>
3.2.3. <i>Modificação da Levedura com o corante azul de metileno por adsorção .....</i>	<i>29</i>
3.2.3.1. <i>Curva de calibração para o azul de metileno.....</i>	<i>29</i>
3.2.3.2. <i>Adsorção do Azul de metileno.....</i>	<i>29</i>
<b>3.3. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO E TÉCNICAS UTILIZADA.....</b>	<b>30</b>
3.3.1. <i>Microscopia eletrônica de varredura acoplada com Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDS) .....</i>	<i>30</i>
3.3.2. <i>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....</i>	<i>30</i>
<b>3.4. ESTUDOS DE SORÇÃO EM BATELADA.....</b>	<b>31</b>
3.4.1. <i>Determinação do tempo de equilíbrio de adsorção: Cinética de adsorção.....</i>	<i>32</i>
3.4.2. <i>Capacidade adsorvente do material: Curva de adsorção.....</i>	<i>32</i>
3.4.3. <i>Estudo sobre o efeito do pH no processo de adsorção dos íons metálicos .....</i>	<i>32</i>
3.4.4. <i>Estudo sobre o efeito da concentração do adsorvente (razão Líquido/Adsorvente) no processo de adsorção dos íons metálicos.....</i>	<i>32</i>
<b>3.5. ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS.....</b>	<b>33</b>
3.5.1. <i>Voltametria Cíclica.....</i>	<i>33</i>
3.5.2. <i>Preparação do material para os estudos voltamétricos .....</i>	<i>33</i>
3.5.3. <i>Tampão Britton-Robinson (Tampão BR).....</i>	<i>33</i>

3.5.4.	<i>Estudo do comportamento voltamétrico da pasta de grafite modificada com LevA e LevSA</i> .....	34
3.5.5.	<i>Estudos sobre a influência da concentração hidrogeniônica e velocidade de varredura</i> .....	34
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1.</b>	<b>TOXICIDADE</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2.</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL</b> .....	<b>39</b>
4.2.1.	<i>Levedura modificada com silsesquioxano</i> .....	39
4.2.2.	<i>Adsorção de Azul de Metileno pela Levedura Modificada com o silsesquioxano cúbico (LevB)</i> .....	46
<b>4.3.</b>	<b>APLICAÇÕES ANALÍTICAS: BIOSORÇÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>4.4.</b>	<b>ADSORÇÃO DO CORANTE CATIONICO AZUL DE METILENO POR LEV E LEVS</b> .....	<b>62</b>
<b>4.5.</b>	<b>COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DO LEVSA</b> .....	<b>64</b>
4.5.1.	<i>Influência das diferentes concentrações hidrogeniônicas</i> .....	65
4.5.2.	<i>Influência da velocidade de varredura</i> .....	67
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Levedura

Dentro do grande grupo dos fungos, três tipos de organismos têm grande importância prática: os bolores, as leveduras e os cogumelos. Os fungos filamentosos e leveduras têm sido destacados por sua capacidade de interação com os íons metálicos em processos como a biossorção (para revisão veja WANG *et al.*, 2009).

A levedura é uma célula eucariota que pode ser facilmente manipulada. Há cerca de 350 espécies de leveduras, divididas em 39 gêneros. Dentro do gênero *Saccharomyces*, pertencente à classe Ascomycetes, *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo com maior investimento em desenvolvimento de ferramentas. Possui genoma inteiramente seqüenciado e inúmeros dados de perfil de expressão gênica global sob diferentes condições ambientais e, por esta razão, possui o genoma mais bem anotado dentre os eucariotos, apresentando incontáveis ferramentas de genética (PELCZAR, REID e CHAN, 1980; GOFFEAU, BARRELL, *et al.*, 1996; GUTHRIE e FINK, 2004).

As leveduras variam de 1 a 5µm de largura e 5 a 30µm de comprimento. São capazes de usar diferentes fontes de carbono e nitrogênio, resistem a grandes variações de concentração osmótica e pH, são capazes de crescer em uma faixa ampla de temperatura (até 50°C). A sua parede celular, formada principalmente de glucanas (30 a 34%), mananas (30%), quitinas (1 a 2%), proteínas (6 a 8%) e lipídeos (8,5 a 13,5%), tem grande potencial para ser usada como biossorvente: grupos acetamido de quitina, polissacarídeos estruturais de fungos, grupos amino e de fosfato nos ácidos nucleicos, os grupos amino, amido, sulfidrilo, carboxilatos em proteínas e hidroxilas em polissacarídeos são os grupos químicos que podem sequestrar e pré-concentrar os metais (PELCZAR, REID e CHAN, 1980; DRAKE e RAYSON, 1996; KORDIALIK-BOGACKA, 2011; ANGELIS, 1987; TORTORA, *et al.*, 2005; VOLESKY, 2003).

As leveduras são muito utilizadas para processos industriais que utilizam a fermentação, além de ser um organismo modelo útil para diversos estudos, incluindo os que avaliam o metabolismo celular na presença de metais. Muitas das vias e os seus genes são altamente conservados em eucariontes superiores, incluindo os seres humanos (BEACKLEY, *et al.*, 2011).

#### 1.1.1. Aplicação como biossorvente

A Levedura é frequentemente aplicada em sistemas industriais de fermentação e processos de biossorção (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1995; WU, *et al.*, 2012; ZHANG, *et al.*, 2009). Também, as leveduras têm sido amplamente utilizadas para fins biotecnológicos, tais como biorremediação de efluentes contaminados com metais e compostos orgânicos, e para a geração de bioenergia como um resultado da seu grande desempenho em processos de fermentação (para revisão ver Ostergaard, *et al.*, 2000). Além disso, várias aplicações biomédicas, incluindo ações sobre o sistema imunológico, adsorção de substâncias tóxicas, o enriquecimento de nutrientes e portadoras de moléculas bio-ativos são apontados como aplicações relevantes (JENABIAN, *et al.*, 2010).

Kordialik-Bogacka (2011) avaliou as propriedades superficiais da levedura, bem como sua eficácia na remoção de cádmio, chumbo e cobre. Após a sorção foram constatadas alterações à superfície de carga e hidrofobicidade das células, além de uma capacidade de adsorção de metais mais elevada para as células de levedura carregadas negativamente.

A avaliação da capacidade de sorção de microrganismos isolados de água residuais de áreas urbanas e industriais foi realizada por Muñoz *et al.* (2012). Este estudo constatou que o comportamento destes microrganismos frente aos metais é influenciado pelo ambiente onde estes se encontram, sendo que os que foram isolados de ambientes com maior concentração de metais apresentaram maior resistência, sendo assim classificados como potenciais biossorbentes.

Amirnia *et al.* (2015), aplicaram *S. cerevisiae* para remoção de Cu(II) e Pb(II) em um sistema de biorreator contínuo, obtendo uma capacidade máxima de retenção de 29,9 mg g<sup>-1</sup> e 72,5 mg g<sup>-1</sup> para os respectivos metais.

Zhang *et al.* (2009) demonstraram a capacidade de adsorção de Pb<sup>2+</sup> por *S. cerevisiae*. Para isso, foram aplicadas duas formas do biomaterial: imobilizado e não imobilizado. Os ensaios com o material não imobilizado revelaram que a capacidade e taxa de adsorção foram de 6,52 mg g<sup>-1</sup> e 52,94%, respectivamente. Após a imobilização, esses valores chegaram a 10 mg g<sup>-1</sup> e 80%.

Kapoor *et al.* (1995) verificaram que a capacidade de biossorção de cádmio por *S. cerevisiae* foi maior em comparação a adsorbentes como o óxido de alumínio e carvão ativado, destacando a importância e a viabilidade do processo de biossorção por leveduras.

Já Wu *et al.* (2012) aplicaram *S. cerevisiae* na retenção de arsênio, obtendo uma capacidade máxima de sorção de 62.908 µgg<sup>-1</sup>, e 75% de sucesso na regeneração de biomassa aplicada.

Outras espécies de leveduras também podem ser aplicadas para biossorventes.

Mata *et al.* (2013) aplicaram leveduras isoladas do Rio San Pedro (*Issatchenkia orientalis* e *Candida tropicalis*) em reatores para a biossorção de 4 metais (Cu, Fe, Mn e Zn). Os resultados apontaram que as leveduras selecionadas foram capazes de reter 81,5% do zinco, 76,5% do cobre, 95,5% do manganês e 99,8% do ferro sob as condições do sistema de fluxo contínuo dos reatores, após 40 dias.

Trama *et al.* (2014) aplicaram uma coleção de leveduras isoladas a partir da compostagem do Parque Zoológico de São Paulo em teste de tolerância e sorção de Mn e Pb. Apesar da baixa taxa na remoção de Mn, o trabalho destaca um isolado: o *Trichosporon montevidense*; na remoção de Pb. Esse isolado é capaz de se desenvolver em alta concentração de chumbo (5000 $\mu\text{g}$ ), além de apresentar uma capacidade de sorção de 26 mg g<sup>-1</sup>. Através de estudos estatísticos, foi possível constatar a relação direta entre a tolerância e a capacidade de sorção.

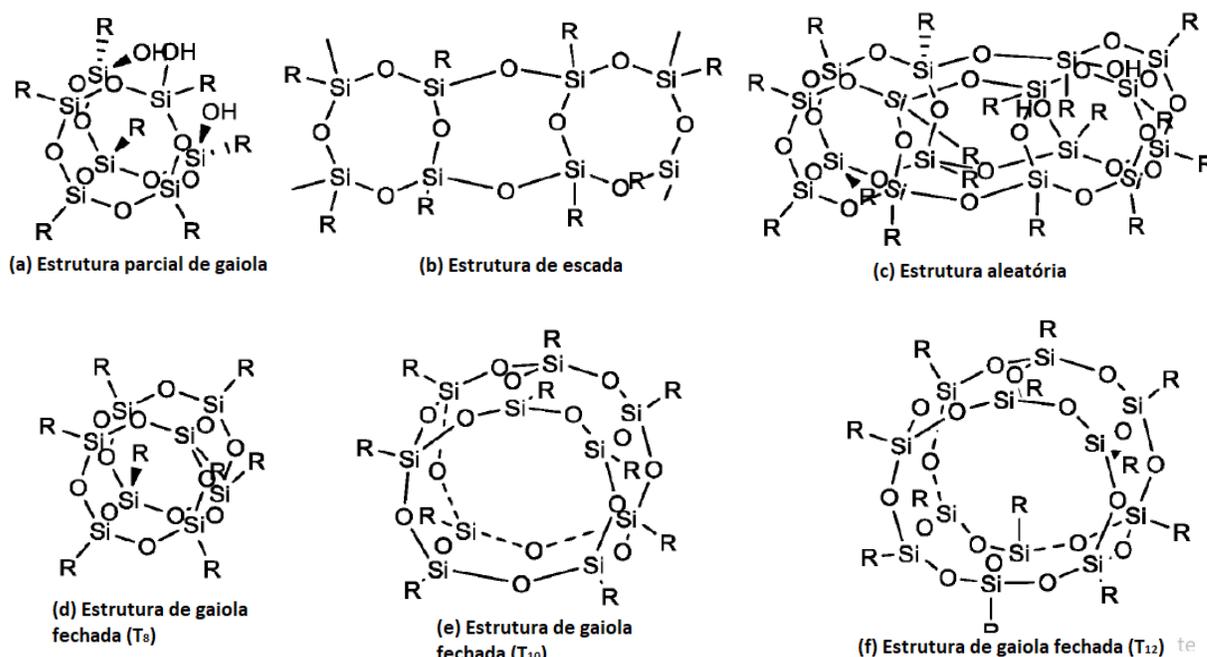
Os biossorventes (adsorventes de origem biológica que realizam o processo de sorção) podem reduzir a concentração de íons metálicos na solução de ppm (mg L<sup>-1</sup>) para o nível de ppb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de forma eficaz, sequestrando íons metálicos dissolvidos em solução de forma rápida. Por isso o processo de biossorção é um candidato ideal para o tratamento de águas residuais de alto volume e baixa concentração de íons (WANG, *et al.*, 2009).

## 1.2. Silsesquioxanos

Nanotecnologia, uma tecnologia emergente, tende a ser aplicada no esforço para reduzir custos e melhorar a eficácia global dos métodos de remediação ambiental, e tem aplicações biomédicas importantes (KARN, *et al.*, 2009; KANNAN, *et al.*, 2005). Neste contexto, uma importante classe de materiais nanoestruturados tem atraído interesse em diferentes áreas do conhecimento: os silsesquioxanos. Os silsesquioxanos são compostos que têm a fórmula empírica (RSiO 1,5)<sub>n</sub>, em que R pode ser um átomo de hidrogênio ou um grupo orgânico de metila, vinila, fenila, alquila, alquilenos, arila, arileno ou organofuncional ou seus derivados (BANEY, *et al.*, 1995; LIM, *et al.*, 2012) e n é um número que pode variar entre 4 e 30 e o composto resultante é denominado Poliedro Oligosilsesquioxano (POSS), mas quando n representa um número indefinido o composto resultante é chamado de polisilsesquioxano (VORONKOV e LAVRENTYEV, 1982; DO CARMO, *et al.*, 2010). A reatividade e a funcionalidade do composto pode ser alterada por modificação do grupo funcional R, com uma variedade de

substituintes orgânicos e inorgânicos (BANEY, *et al.*, 1995; VORONKOV e LAVRENTYEV, 1982). Existem numerosas aplicações deste composto quando utilizado como precursor na formação de compostos híbridos orgânicos (FERNANDES, MARALDI, *et al.*, 2018; DO CARMO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2013) inorgânicos (DO CARMO *et al.*, 2012), em catálise (WADA, *et al.*, 2009), como aditivos (BOURBIGOT, *et al.*, 2009), tal como polímero (SOH, *et al.*, 2007), de cristal líquido (MEHL e GOODBY, 1996), filmes electroactivos (LUCHO, *et al.*, 2004), como materiais precursores de dendrímeros (DO CARMO, PAIM, *et al.*, 2007) à entrega direccionada de genes terapêuticos (KANESHIRO, WANG, e LU, 2007), entre outros.

Os silsesquioxanos podem formar estruturas do tipo aleatórias, escada, gaiola aberta e gaiola fechada, assim como ilustra a Figura 1.



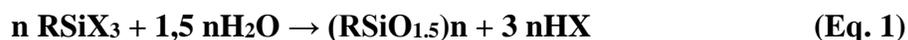
**Figura 1.** Estruturas Silsesquioxanos (RSiO<sub>1,5</sub>)<sub>n</sub>: (a) Estrutura Parcial de Gaiola (b) Estrutura de Escada, (c) Estrutura Aleatória, (d) Estrutura de gaiola fechada (T<sub>8</sub>), (e) Estrutura de gaiola fechada (T<sub>10</sub>) e (f) Estrutura de gaiola fechada (T<sub>12</sub>) (Adaptado de Zhou, Ye, & Xu, 2017).

De acordo com Baney *et al.* (1995) os silsesquioxanos podem ser divididos em dois grupos principais, os incompletamente condensados e os completamente condensados. Os incompletamente condensados apresentam grupos silanóis (SiOH) em sua estrutura, referentes à algumas ligações (Si-O-Si) rompidas. Por outro lado, os completamente condensados, apresentam

uma estrutura poliédrica regular e simétrica com todas as ligações Si-O-Si completamente ligadas umas às outras, onde o oxigênio atuará como “ponte” entre os dois átomos de silício e nenhum grupo hidroxila está presente (QUADRELLI e BASSET, 2010; CORDES, LICKISS, e RATABOUL, 2010).

O interesse pelos silsesquioxanos é devido à habilidade em mimetizar a reatividade dos grupos silanóis na superfície da sílica e também aos grupos orgânicos volumosos e ramificados presentes em sua extremidade (PROVATAS *et al.*, 1998).

Polisilsesquioxanos são geralmente sintetizados por condensação hidrolítica do monômero  $\text{RSiX}_3$  onde R é um grupo orgânico e X pode ser um halogênio, -OH, -OR (alcóxido), ou OAc (acetóxido). Os grupos X hidrolisam e condensam para formar a estrutura Si-O-Si (BANEY *et al.*, 1995). A Equação 1 ilustra a reação hidrolítica do monômero para a formação de um silsesquioxano constituído por ligações cruzadas.



A síntese de derivados POSS monofuncionais normalmente começa com a condensação hidrolítica de organotriclorossilanos resultando em uma mistura de gaiolas de siloxano. A reação subsequente é chamada de corner-capping: é a reação de trisilanóis com agentes de acoplamento de silano do tipo  $\text{R}'\text{SiX}_3$ , onde R' carrega um sítio reativo (vinil, metacrilato, isocianeto, epoxi, etc.) e  $\text{X}=\text{Cl}$  ou um alcóxido, resultando em moléculas POSS contendo o grupo funcional solicitado (KICKELBICK, 2013).

Derivados de POSS monofuncionais são incorporados como monômeros por copolimerização em diversos polímeros lineares. Isso leva à incorporação de unidades em nanoescala em uma cadeia de polímero. O POSS também reage com uma variedade de elementos do grupo principal, metais de transição e lantanídeos para gerar metalosilsesquioxanos totalmente condensados (KICKELBICK, 2013).

A formação de um material híbrido é de grande interesse, uma vez que possui propriedades e características que variam das originais. Dentre essas propriedades está a capacidade de aumentar a adsorção de íons metálicos em solução (SILVEIRA, *et al.*, 2013), se tornando assim um material propício para a modificação química das leveduras, visando aumentar a sua capacidade biossorbitiva de analitos orgânicos com interesse biológico e ambiental

(disruptores orgânicos). Este silsesquioxano cúbico possui oito vértices, grupos periféricos  $-NH_2$ , que são susceptíveis de entrar em reações químicas de substituição nucleófila, que pode ocorrer nos grupos hidroxil, amina/tiol e carboxílicos, presentes na superfície (paredes) das leveduras (LABUTO, *et al.*, 2015). Desta forma, o silsesquioxano cúbico pode funcionar com um agente modificador das leveduras, com o intuito de incrementar ou potencializar as propriedades adsorptivas de espécies inorgânicas (íons metálicos) como também espécies orgânicas (corantes orgânicos) impactantes do meio ambiente.

### **1.3. Contaminantes**

A chamada “contaminação química” da água é considerada uma das maiores ameaças à saúde humana e à biodiversidade nos próximos séculos (TUNDISI e TUNDISI, 2011). Poluentes antropogênicos (como os metais, fármacos e hidrocarbonetos) no ambiente e seus efeitos sobre os organismos vivos têm sido relatados como uma das 40 prioridades políticas de gestão de conservação estabelecidas por cientistas em todo o mundo (FLEISHMAN, BLOCKSTEIN, *et al.*, 2011).

Alguns desses compostos são classificados como disruptores endócrinos, uma vez que, quando concentrados no organismo, afetam o sistema endócrino que é responsável pela síntese de hormônios que regulam o organismo atuando em vias de crescimento, mecanismos homeostáticos e reprodutivos, provocando, por fim, doenças relacionadas ao sistema nervoso, má formação fetal e alguns tipos de câncer (CRISP, 1998; BIRKETT e LESTER, 2003; COLBORN, DUMANOSKI e MYERS, 2002; BIRNBAUM e FENTON, 2003).

Os metais pesados estão dentre os disruptores endócrinos de origem inorgânica. Estes, uma vez inseridos no ambiente principalmente através do despejo de resíduos industriais, não se degradam e acabam por contaminar seres vivos (DERÍSIO, 2012; WANG, 2006). Na verdade, a atividade industrial converte metais em formas químicas dentro de produtos finais que podem ser mais tóxicos para o homem. O chumbo, por exemplo, é um metal importante com muitas utilizações industriais. Esta aplicação industrial generalizada resulta em descarte, e a consequente exposição humana por fontes de alimentos e presença na água potável (GOYER, 1991).

Vertebrados contaminados com metais tais como o chumbo (Pb), apresentam disfunções no sistema nervoso, medula óssea e nos rins, e diretamente afeta o desenvolvimento fetal devido à sua capacidade para atravessar a placenta (MOREIRA e MOREIRA, 2004).

Tendo em vista os danos causados pela presença desses compostos no meio ambiente, diversos métodos para sua remoção tem sido pesquisados, dentre elas temos a biorremediação, que atua no ambiente contaminado através de agente biológicos, visando sua restauração. Esse processo realizado pelos biorremediadores pode ocorrer por degradação ou sorção (absorção ou adsorção) dos contaminantes de interesse (KUMAR, BISHT, *et al.*, 2011).

A intoxicação do homem por metais pesados está vinculada à dois componentes celulares: as enzimas e as membranas. As enzimas, uma vez complexadas com íons metálicos, tem sua função bloqueada, impedindo assim muitos processos metabólicos. Já a membrana celular pode ter sua estrutura alterada em decorrência da ligação de metais pesados, o que interfere no transporte de íons vitais à sua manutenção, como  $K^+$  e  $Na^+$ , por exemplo (FELLENBERG, 1980).

Esses metais pesados podem ser liberados nas águas de forma direta (despejo de resíduos industriais que contenham os metais pesados) ou indireta, onde os metais já presentes nas águas na forma de sedimentos (combinados na forma de carbonato, sulfetos, sulfatos, etc.) são liberados quando resíduos ácidos são lançados ou em águas eutrofizadas, que tendem ao pH ácidos por conta da baixa concentração de oxigênio e aumento do  $CO_2$  (FELLENBERG, 1980).

### 1.3.1. *Chumbo*

O chumbo é um metal do Grupo IV da tabela periódica, sendo seu principal estado de oxidação +2, formando o chamado íon plumboso ( $Pb^{2+}$ ). Possui número atômico 82, ponto de fusão de 327,5 °C e ponto de ebulição de 1750 °C (MAHAN e MYERS, 1995).

A aplicação do chumbo pela humanidade data-se do período de 4.000 AEC. E em períodos posteriores, início da era atual, já há descritos relacionando problemas de saúde com a exposição ao chumbo (uma vez que o metal era usado na fabricação de utensílios como garrafas para fabricação e estocagem de vinho, por exemplo). Já entre os anos de 1490 e 1580, mortes associadas ao uso do chamado “açúcar de chumbo” (acetato de chumbo) foram descritas. Essa substância era aplicada para adoçar vinhos. Nos séculos posteriores, mais estudos sobre a posologia do chumbo surgiram (HERNBERG, 2000).

Atualmente, o chumbo é aplicado no processo industrial de manufatura de baterias, vidros, cerâmicas, mineração, indústria de tintas e petróleo, e chega ao ser humano por contaminação do ar, solo e água, resultante dos processos industriais e descarte irregular de

resíduos (TONG, VON SCHIRNDING e PRAPAMONTOL, 2000; DEMAYO, TAYLOR, *et al.*, 1982).

Um organismo contaminado com chumbo apresenta concentrações diferentes do metal distribuídos por todos os órgãos. A maior concentração de chumbo, no homem, é encontrada nos ossos, seguido pelos rins. O sistema nervoso apresenta menores concentrações mas é considerado um sítio crítico, por conta dos efeitos que sua danificação pode causar (BARRY, 1975; MOREIRA e MOREIRA, 2004).

De forma direta, a contaminação de chumbo afeta desde o início do ciclo de vida humano, através da passagem do metal pela placenta entre a 12<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semanas, gerando dano ao cérebro do feto, prematuridade, redução no crescimento pós-natal e possíveis malformações, além de ser acumulado no leite materno, pode levar à diminuição do desenvolvimento intelectual da criança, mesmo após o controle de outras medidas de chumbo pré-natal e pós-natal. Em crianças e adultos, pode acarretar hipotireoidismo decorrente de alterações funcionais da hipófise e seu acúmulo na tireoide, atrofia testicular, aborto espontâneo e interferência na qualidade e quantidade de esperma. Além disso, a intoxicação por chumbo, também chamada de Saturnismo, também está relacionada às alterações neurocomportamentais como agressividade e delinquência, (para revisão veja GUIMARÃES, 2018; OLYMPIO, GONÇALVES, *et al.*, 2009; SCHNAAS, ROTHENBERG, *et al.*, 2006).

### 1.3.2. *Níquel*

O Níquel é um metal de transição do Grupo VIII B da tabela periódica, sendo seu principal estado de oxidação +2: os estados +3 e +4 só aparecem em alguns compostos. Possui número atômico 28, ponto de fusão de 1455 °C e ponto de ebulição de 2913 °C (MAHAN e MYERS, 1995).

A crosta terrestre contém cerca de 50 mg L<sup>-1</sup> de níquel, principalmente em rochas ígneas, e as plantas acabam por reter quantidades de níquel (MERIAN, 1984). Na indústria, é aplicado na produção de papel, fertilizantes, usinas siderúrgicas e refinarias de petróleo (FELLENBERG, 1980). Ele é considerado um micronutriente, uma vez que é requerido pelo organismo em baixas concentrações, mas é tóxico em concentrações elevadas (YEGANEHA, AFYUNI, *et al.*, 2012).

O contato com o níquel pode ser por via oral, dermal ou por inalação e pode acarretar danos dermatológicos, imunológicos, neurológicos, reprodutivos e de desenvolvimento, além de

câncer, sendo estes danos relacionados ao tempo de exposição ao metal (DAS, DAS e DHUNDASI, 2008).

#### 1.4. Toxicidade neuronal

Sendo conhecido que metais como chumbo e níquel causam danos neurológicos, estudos específicos sobre tais efeitos se mostram de grande importância. E apesar do grande conhecimento da nocividade desses compostos, muitos efeitos e vias de contaminação e distribuição desses metais nos organismos ainda não são totalmente conhecidos. Estudar as seções do cérebro é uma forma de avaliar danos dos metais na saúde humana, porque os metais como o níquel e o chumbo, atuam diretamente no sistema nervoso central, induzindo encefalopatia aguda ou mudança no comportamento e cognição (CLARKSON, 1987).

Chumbo e níquel, uma vez inseridos num organismo, são alocados em diversos locais. O cérebro é um dos locais onde são observadas as maiores concentrações desses metais (GRANDJEAN, 1978; OSKARSSON e TJALVE, 1979).

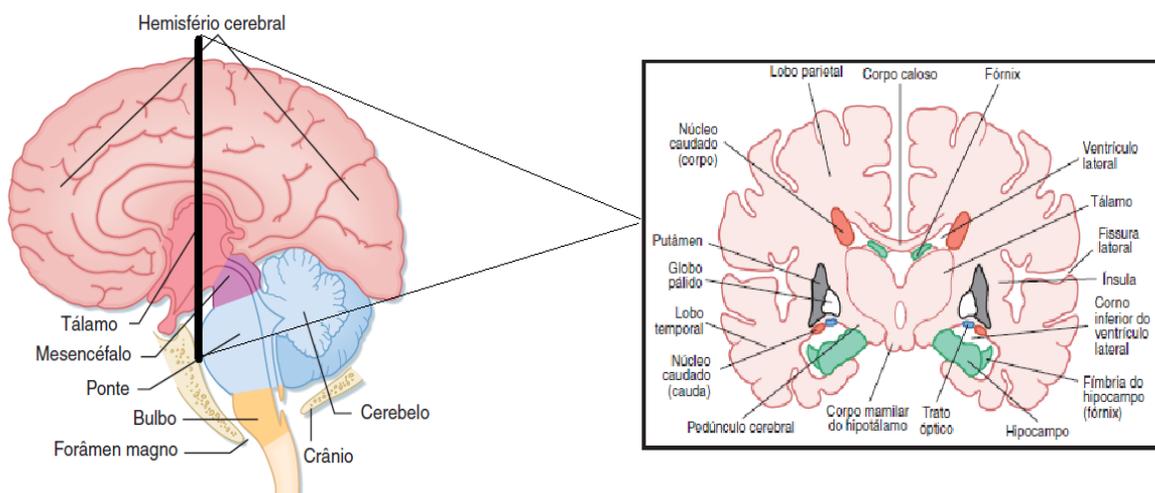


Figura 2. Cérebro e visão frontal do cérebro pós-corte central (Adaptado de BERNE & LEVY, 2009).

O hipocampo é uma importante região de estudos, pois é a região vinculada à memória de curto prazo e sua conseqüente conversão em memória de longo prazo (BERNE e LEVY, 2009). Além disso, o hipocampo pode estar vinculado às doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (LAAKSO, PARTANEN, *et al.*, 1996).

Diversos estudos apontam que concentrações de chumbo e níquel são encontradas no hipocampo afetando, de forma simplificada, canais de cálcio, que são fundamentais para a

ocorrência das sinapses (SADIQ, GHAZALA, *et al.*, 2012; BRAGA, PEREIRA e ALBUQUERQUE, 1999; GORJI, SCHELLER, *et al.*, 2000; NEAL e GUILARTE, 2012).

Técnicas ópticas são muito aplicadas para avaliar os impactos de substâncias nos neurônios (COHEN, SALZBERG e GRINVALD, 1978). Dentre elas a avaliação da autofluorescência das fatias de hipocampo foi a aplicada neste trabalho.

Essa técnica parte do princípio de que alguns componentes celulares, quando excitados por radiação UV/Vis emitem fluorescência. Esta pode ser emitida por marcadores (fluoróforos) ou pode ser intrínseca da célula ou de seus componentes, sendo esta última definida como autofluorescência. Componentes endógenos das células como NADH, flavoproteínas e a atividade mitocondrial são associadas à autofluorescência neuronal, sendo que quando a fluorescência de NAD<sup>+</sup> aumenta, a de FAD<sup>+</sup> diminui, sendo ambos os compostos as formas reduzidas de NADH e FADH<sub>2</sub>, respectivamente (SHUTTLEWORTH, 2010; DUCHEN, SURIN e JACOBSON, 2003). Estes dados são então colhidos por um microscópio de fluorescência equipado com um fotodiodo, que faz a conversão disso em sinal elétrico, sendo assim possível avaliar as alterações apresentadas (CRESPI, CROCE, *et al.*, 2004; MONICI, 2005).

### **1.5. Biossensores**

Biossensores são componentes analíticos que apresentam um sinal elétrico frente a uma resposta biológica. Estes podem ser baseados em enzimas, tecidos e DNA, por exemplo, sendo amplamente aplicados para usos médicos, industriais e ambientais (MEHROTRA, 2016).

Os elementos biológicos atuam como modificadores nos Eletrodos Quimicamente Modificados (EQMs), que são constituídos de um eletrodo base (platina, carbono vítreo e pasta de carbono, por exemplo) e uma camada do modificador químico e/ou biológico, sendo que essa modificação pode ocorrer por adsorção, ligação covalente ou formação de filme polimérico na base do eletrodo (PEREIRA, SANTOS e KUBOTA, 2002).

As leveduras também têm sido muito aplicadas como biossensores porque, entre outras vantagens, tem baixo custo, pode ser armazenada por longo tempo sem perder sua atividade, é um importante modelo de células eucariontes e é tolerante a condições ambientais severas (ADENIRAN, SHERER e TYO, 2015).

A Tabela 1 apresenta os métodos de detecção de contaminantes ambientais mais aplicados, demonstrando a importância dos estudos e da aplicação das leveduras como biossensores.

**Tabela 1. Métodos utilizados para detecção de contaminantes ambientais (adaptado de JARQUE, BITTNER, et al., 2016)**

<b>Método de detecção</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<i>Análise Química</i>	Identificação de compostos específicos; Detecção de baixas concentrações; Não possui implicações éticas.	Não fornece informações de atividade biológica;
<i>Enzimas</i>	Interação específica enzima-substrato; Detecção de baixas concentrações; Não possui implicações éticas.	Baixa relevância para células ou organismos.
<i>Bactérias</i>	Baixo custo e simples; Resultados rápidos; Adaptabilidade.	Baixa relevância para organismos eucariontes; Possíveis implicações éticas por modificações genéticas.
<i>Leveduras</i>	Organismo eucarionte; Baixo custo e simples; Transferência de genes de vertebrados com funcionamento completo; Resultado rápido; Adaptabilidade.	Organismo unicelular; Possíveis implicações éticas por modificações genéticas.
<i>Células de vertebrados in vitro</i>	Estudos de vias de sinalização separadamente, sem possíveis interferentes; Grande número de tipos de células; Resultado rápido; Menos implicações éticas comparado com o <i>in vivo</i> .	Condições celulares não são precisamente replicáveis; Possíveis implicações éticas por modificações genéticas; Custo laboratorial mais elevado do que para bactérias e leveduras.
<i>Animais in vivo</i>	Avaliação de modelos invertebrados e vertebrados; Reflete fatores sistêmicos; Maior precisão para tradução dos resultados para humanos.	Implicações éticas; Alto custo; Maior tempo de duração dos experimentos; Não aplicável como biossensor.

### 1.5.1. Corante Azul de metileno

O Azul de metileno ( $C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$ ), ou cloreto de tetrametilitionina, representado na Figura 3, é um corante catiônico pertencente a classe das tioazinas, aromático heterocíclico e solúvel em água, utilizado no tingimento de algodão, lã e papel, podendo também ser aplicado como identificador de águas contaminadas e do nível de bactérias no leite. No mais, é conhecido por ser um composto orgânico com afinidade celular, com propriedades fotoquímicas, podendo ser aplicado na inativação de bactérias e vírus. É um composto eletroativo e pode atuar como mediador de elétrons acelerando processos de transferência de elétrons entre o analito de interesse e a superfície do eletrodo (OLIVEIRA, SILVA e VIANA, 2013; LONGHINOTTI, FURLAN, *et al.*, 1996; SCOTTI, LIMA, *et al.*, 2006).

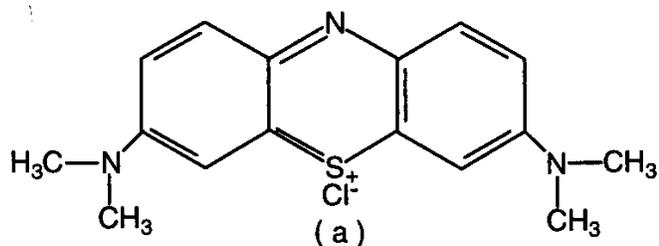


Figura 3. Estrutura do corante azul de metileno. (Adaptado de LONGHINOTTI, FURLAN, *et al.*, 1996)

Apesar de ser conhecido principalmente como um corante, o azul de metileno está entrando no campo da cirurgia cardíaca e cuidados críticos como um agente terapêutico muito importante, além de afetar positivamente o resultado clínico de dificuldades de retenção de memória em distúrbios neurodegenerativos associados à disfunção mitocondrial. Entretanto, pode ter vários efeitos nocivos, caso inalado ou ingerido em excesso. Alguns sintomas são: respiração rápida ou difícil, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal e no peito, dor de cabeça, sudorese profusa e confusão mental (GINIMUGE e JYOTHI, 2010; CALLAWAY, RIHA, *et al.*, 2002; BHATTACHARYYA e SHARMA, 2005).

## 2. OBJETIVOS

Modificar quimicamente a levedura *S. cerevisiae* com o octa(aminopropil)silsesquioxano  
Obter novos dados sobre a toxicidade do chumbo e do níquel através de testes de toxicidade neuronal.

Caracterizar o material híbrido preparado bem como seus precursores, por técnicas espectroscópicas tais como infravermelho (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDS).

Avaliar comparativamente a capacidade de sorção do material para chumbo e níquel, bem como a toxicidade desses metais.

Promover a adsorção de um corante orgânico, o Azul de metileno, e estudar seu comportamento voltamétrico, utilizando para isso um eletrodo de pasta de carbono.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Toxicidade

Testes de toxicidade foram realizados com fatias do hipocampo (400  $\mu\text{m}$  de espessura), a partir de camundongos machos C57BL/6 (9 semanas de idade). As fatias, obtidas a partir dos animais sacrificados por deslocamento cervical, foram submersas em solução oxigenada (95%  $\text{O}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$ ) de fluido cerebrospinal artificial (ACSF), durante cerca de 1 hora. Em seguida, as fatias foram transferidas para a câmara de registro com perfusão de solução em 1,5 mL/min, com ACSF oxigenado. A câmara de registro está inserida em um *setup* contendo um microscópio de fluorescência (Zeiss - Axioscop) equipado com uma lente de imersão em água (40x, 0,75W, distância de trabalho 1,6 mm). Os sinais ópticos foram registrados na área CA3 do hipocampo, nas fibras musgosas-células piramidais CA3-sistema sináptico, utilizando uma lâmpada de tungstênio (12V, 75W) e os comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 nm (largura de banda de 10 nm) e acima de 500 nm, respectivamente. Os sinais foram adquiridos utilizando um fotodiodo (Hamamatsu K2G 1336 e processados por meio de um sistema de aquisição de dados da National Instruments™, com o software de análise da Signal Express. O meio extracelular (ACSF) tem a seguinte composição e condições (em mM; pH 7,4, 32°C): NaCl 124,0; KCl 3,5;  $\text{NaHCO}_3$  24,0;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,25;  $\text{MgCl}_2$  2,0;  $\text{CaCl}_2$  2,0 e D-glucose 10,0. A solução de chumbo foi preparada a partir de  $\text{PbCl}_2$  e a solução de níquel a partir de  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ambos na concentração estoque de 1 mM. Para os ensaios, as concentrações de 0,2 e 0,6  $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Pb}^{2+}$  (1 e 3  $\mu\text{M}$ ) e 0,6, 1,2 e 1,8  $\text{mg L}^{-1}$  (10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{Ni}^{2+}$  foram usadas. Estes testes foram realizados sob orientação da Profa. Dra. Maria Emília Quinta-Ferreira, no laboratório de Biofísica, no Departamento de Física da Universidade de Coimbra.

#### 3.2. Métodos de Preparação dos Materiais

##### 3.2.1. Síntese do clorohidrato de silsesquioxano $\text{Cl}[\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3]_8\text{Si}_8\text{O}_{12}$

O cloridrato de silsesquioxano  $\text{Cl}[\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3]_8\text{Si}_8\text{O}_{12}$  foi preparado de acordo com o método proposto por Feher *et al.* (1999): em um balão de fundo chato de 6000 mL, contendo 150 mL de  $\gamma$ -aminopropiltrióxido de silício ( $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OEt})_3$ , Sigma-Aldrich) dissolvido em 3,6 L de metanol (MeOH), adicionou-se lentamente 200 mL de HCl concentrado. A mistura

homogênea foi mantida a temperatura ambiente por 6 semanas e o produto obtido foi lavado em funil de placa sinterizada com metanol gelado, e seco à 100°C. Esse material foi denominado SS.

### 3.2.2. *Modificação da levedura com silsesquioxano (LevS)*

A primeira etapa consiste na neutralização do clorohidrato de silsesquioxano formado (aminocubo). Nesta etapa 5,0 g do clorohidrato foi adicionado a 100mL de água deionizada, seguido da adição de 11,57 g de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). A solução foi mantida sob agitação por 60 horas à temperatura ambiente. Após este período de agitação, adicionou-se 5 g de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* tipo II, Sigma-Aldrich) e o sistema foi mantido sob rigorosa agitação por mais 24 horas. Em seguida a suspensão foi centrifugada e separou-se a fase sólida, que foi lavada exaustivamente com água deionizada. O produto obtido foi descrito como LevS e adequadamente estocado em um dessecador à vácuo.

### 3.2.3. *Modificação da Levedura com o corante azul de metileno por adsorção*

#### 3.2.3.1. *Curva de calibração para o azul de metileno*

Soluções de Azul de metileno (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>SCl.3H<sub>2</sub>O, Dinâmica) foram preparadas a partir de uma solução-mãe 1,0×10<sup>-1</sup>M nas concentrações de 1,0×10<sup>-5</sup>M, 5,0×10<sup>-5</sup>M, 1,0×10<sup>-4</sup>M e 5,0×10<sup>-4</sup>M.

As absorbâncias foram lidas utilizando um espectrofotômetro (Varian) em uma faixa de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 200 a 800 nm. O espectro eletrônico apresentou um  $\lambda_{\text{máx}}$  em 666nm e este comprimento de onda foi empregado para elaborar uma curva de calibração.

#### 3.2.3.2. *Adsorção do Azul de metileno*

Afim de determinar a capacidade adsorptiva do material, 500 mg de LevS e Lev foram adicionados a 50 mL de diferentes concentrações de azul de metileno em soluções aquosas: a saber, 1,0×10<sup>-5</sup>M, 5,0×10<sup>-5</sup>M, 1,0×10<sup>-4</sup>M e 5,0×10<sup>-4</sup>M, 1,0×10<sup>-3</sup>M, 5,0×10<sup>-3</sup>M; por 4 horas sob agitação magnética e temperatura ambiente. Todas as soluções foram preparadas a partir de solução estoque 1,0×10<sup>-1</sup>M.

Após o tempo de contato estabelecido, alíquotas de cada solução foram centrifugadas a fim de se obter um sobrenadante límpido, que foi analisado por espectrofotometria.

### **3.3. Métodos de Caracterização e técnicas utilizada**

#### *3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura acoplada com Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (MEV-EDS)*

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) consiste em uma análise superficial da amostra de interesse através de uma varredura por feixe de elétrons, sendo este refletido e coletado por um tubo de raio catódico, gerando assim uma imagem que pode ser registrada e que representa as características superficiais da amostra (CALLISTER JR., 2008).

Desta forma, a caracterização por MEV se faz de fundamental importância por produzir imagens que transmitem as informações morfológicas e topográficas da superfície do material de estudo.

Já a Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS ou EDX) é uma técnica aplicada para obter uma análise elementar qualitativa da amostra de interesse. A análise baseia-se nas interações entre a radiação eletromagnética e a matéria, analisando os raios-X emitidos pela matéria em resposta à incidência de partículas carregadas, levando em consideração o princípio fundamental de que cada elemento tem uma estrutura atômica única (CALLISTER JR., 2008). As micrografias e os espectros foram obtidos por um equipamento modelo EVO LS15 da marca Carl Zeiss.

#### *3.3.2. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)*

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) é uma técnica baseada no aumento da energia de vibração ou de rotação associado com uma ligação covalente, onde esse aumento resulta numa variação do momento dipolar da molécula. A absorção de radiação no infravermelho é um processo quantizado, ou seja, uma molécula absorve apenas frequências selecionadas de radiação do infravermelho (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2006; EWING, 1972; PAVIA, LAMPMAN, *et al.*, 2012).

As vibrações das ligações são divididas em: vibração de estiramento ( $\nu_s$ ), que consiste em alongamentos periódicos da ligação ao longo do seu eixo, e vibração de deformação ( $\delta_s$ ), que são deslocamentos ocorridos em ângulo reto como eixo da ligação (VOGEL, 2005).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos através de um espectrômetro Nicolet 5DXB FT-IR (Nicolet Instruments, Madison, WI). As pastilhas utilizadas na análise foram feitas a partir da mistura de aproximadamente 150 mg de Brometo de Potássio seco (KBr, cristalino, grau espectroscópico da Synth) e amostra suficiente para compor 1,0 % (m/m) da

mistura, que foi macerada exaustivamente em um gral com pistilo até se obter a homogeneidade. Para a obtenção dos espectros de FTIR foi empregado, para cada amostra, um mínimo de 64 varreduras numa resolução de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ , na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4. Estudos de sorção em batelada

Os ensaios de adsorção foram realizados com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em soluções de diferentes concentrações: 100, 500 e 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (ppm) de  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ . As suspensões (25 mL), constituídas de solução metálica e adsorvente, foram mantidas sob agitação de 90 rpm, centrifugação de 2 min, a 4000 rpm, e os sobrenadantes foram cuidadosamente recolhidos. Para efeito comparativo cinco adsorventes foram aplicados nestes ensaios: levedura *Saccharomyces cerevisiae* do tipo II (Sigma-Aldrich) (Lev), silsesquioxano (SS), Lev modificado com silsesquioxano (LevS), levedura *Saccharomyces cerevisiae* seca e encapsulada obtida em vinícola (LevW; ProElif<sup>®</sup>) e levedura *Saccharomyces cerevisiae* encapsulada obtida em vinícola após processo de fermentação (LevWF; ProElif<sup>®</sup>). LevW e LevWF foram obtidas na Adega Cooperativa de Cantanhede (Cantanhede-Portugal). Todos os ensaios de sorção com os íons metálicos foram realizados no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra sob orientação da Profa. Dra. Rosa Maria Quinta-Ferreira, sendo que os ensaios de adsorção do corante foram realizados em nosso laboratório no Departamento de Física e Química da UNESP em Ilha Solteira.

Em todos os testes (metais e corantes), a capacidade de sorção foi calculada com base na Equação 2.

$$q = \frac{(C_i - C_f) V}{m} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo,

q = capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ );

$C_i$  = concentração inicial da solução metálica ( $\text{mg L}^{-1}$ );

$C_f$  = concentração final da solução metálica ( $\text{mg L}^{-1}$ );

V = volume da solução metálica (L);

m = massa do adsorvente (g)

#### *3.4.1. Determinação do tempo de equilíbrio de adsorção: Cinética de adsorção*

Em frascos termostatizados a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , foram adicionados 50 mg do material de estudo. Pipetou-se alíquotas de 25mL da solução contendo o cátion metálico, transferindo para os frascos termostatizados. As suspensões foram agitadas em diferentes intervalos de tempo (5, 15, 30, 60 e 120 minutos;  $n=3$ ). Após a agitação foram recolhidas alíquotas do sobrenadante contendo os íons metálicos não adsorvidos, para serem quantificados por espectrometria por absorção atômica por chama (FAAS).

#### *3.4.2. Capacidade adsorvente do material: Curva de adsorção*

Estes experimentos foram efetuados empregando-se técnicas de bateladas, em frascos termostatizados a  $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Nestes frascos foram adicionados 50mg do material de estudo e 25mL dos disruptores a serem testados em concentrações finais de 100, 500 e 1000  $\text{mg L}^{-1}$  (ppm) de  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ . O sistema foi submetido à agitação no tempo determinado no estudo anterior. Os sobrenadantes foram quantificados por FAAS.

#### *3.4.3. Estudo sobre o efeito do pH no processo de adsorção dos íons metálicos*

Preparam-se soluções padrões diluídas dos sais de nitratos dos metais em estudo, em concentrações de 500 ppm para  $\text{Pb}^{2+}$  e 100 ppm de  $\text{Ni}^{2+}$ . O efeito do pH sobre a biossorção foi investigado através do ajuste e manutenção do pH do efluente em valores de 4, 5, 6 e 7. Para o ajuste de pH foi utilizado HCl a 0,1 M e de NaOH 0,1 M. Pesaram-se exatamente 50 mg de cada material adsorvente e adicionou-se a 25mL de uma solução padronizada do contaminante a diferentes valores de pH. O tempo de adsorção foi aquele encontrado no experimento anterior para a solução neutra. Após a agitação os íons metálicos não adsorvidos foram determinados por absorção atômica.

#### *3.4.4. Estudo sobre o efeito da concentração do adsorvente (razão Líquido/Adsorvente) no processo de adsorção dos íons metálicos*

O efeito da razão líquido/adsorvente foi avaliado para diferentes concentrações: 50, 100, 250 e 500  $\text{mL g}^{-1}$ . O tempo de adsorção foi aquele encontrado no experimento anterior para a

solução em pH inicial. Após a agitação os íons metálicos não adsorvidos foram determinados por absorção atômica.

### **3.5. Estudos Voltamétricos**

#### *3.5.1. Voltametria Cíclica*

A Voltametria Cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica comumente utilizada para adquirir informações qualitativas em processos eletroquímicos porque fornece informações sobre a termodinâmica de processos redox, sobre a cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos difusionais ou adsorptivos (BRETT e BRETT, 1996). Esta técnica consiste, de forma simplificada, na aplicação de potencial com uma variação linear no tempo na forma de uma onda triangular a um eletrodo de trabalho, ocasionando reações de oxidação e redução de espécies presentes na superfície do eletrodo ou de espécies eletroativas na solução (WANG, 2006; BRETT e BRETT, 1996).

Uma vez obtido o voltamograma cíclico, pode-se calcular parâmetros eletroquímicos tais como: potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ); potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ); potencial médio ( $E^{\theta}$ ) (média aritmética dos potenciais dos picos anódico e catódico) e a variação dos potenciais  $E_{pa}$ - $E_{pc}$  ( $\Delta E_p$ ). A corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e a corrente do pico catódico ( $I_{pc}$ ) são obtidas pela medida da distância tomada verticalmente do máximo da corrente ao prolongamento da linha base (GOSSER, 1993; WANG, 2006).

#### *3.5.2. Preparação do material para os estudos voltamétricos*

Foram pesadas 500 mg de Lev e LevS e adicionadas a 50 ml do corante azul de metileno  $5,0 \times 10^{-3} M$ , sob agitação magnética por 4 horas. Os materiais após adsorção com o corante, foram guardados em dessecador e descritos por LevA (levedura modificada com azul de metileno) e LevSA (levedura modificada com silsesquioxano e azul de metileno).

#### *3.5.3. Tampão Britton-Robinson (Tampão BR)*

A solução tampão Britton-Robinson (BR)  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ , a qual consiste de uma mistura dos ácidos ortofosfórico ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ), acético ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ), e bórico ( $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ), foi preparada e utilizada em todo o estudo eletroquímico. Uma solução de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio e outra  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico foram utilizadas para ajustar o pH da solução, empregando-se

um medidor de pH (pHmetro) acoplado com um eletrodo combinado de vidro, previamente calibrado com tampões pH 4,0 e 7,0.

#### *3.5.4. Estudo do comportamento voltamétrico da pasta de grafite modificada com LevA e LevSA*

As medidas eletroquímicas foram efetuadas utilizando-se o sistema eletroquímico da MicroQuímica. Para isso foi empregado um sistema constituído por três eletrodos: um eletrodo de referência (Ag/AgCl<sub>(s)</sub>), um eletrodo auxiliar de platina, e o terceiro de trabalho (eletrodo de pasta de grafite). O eletrodo de pasta de grafite foi preparado misturando-se grafite com material na proporção de 1:10 (m/m), e uma gota de Nujol (óleo mineral).

#### *3.5.5. Estudos sobre a influência da concentração hidrogeniônica e velocidade de varredura*

Para os estudos sobre a influência da concentração hidrogeniônica no comportamento voltamétrico dos materiais, foram preparadas soluções 1,0 mol L<sup>-1</sup> do eletrólito de suporte a diferentes valores de pH (2,0 a 6,0). O pH das soluções foi ajustado com hidróxido de sódio e ácido clorídrico, empregando-se um medidor de pH (pHmetro) acoplado com um eletrodo combinado de vidro, previamente calibrado com tampões pH 4,0 e 7,0.

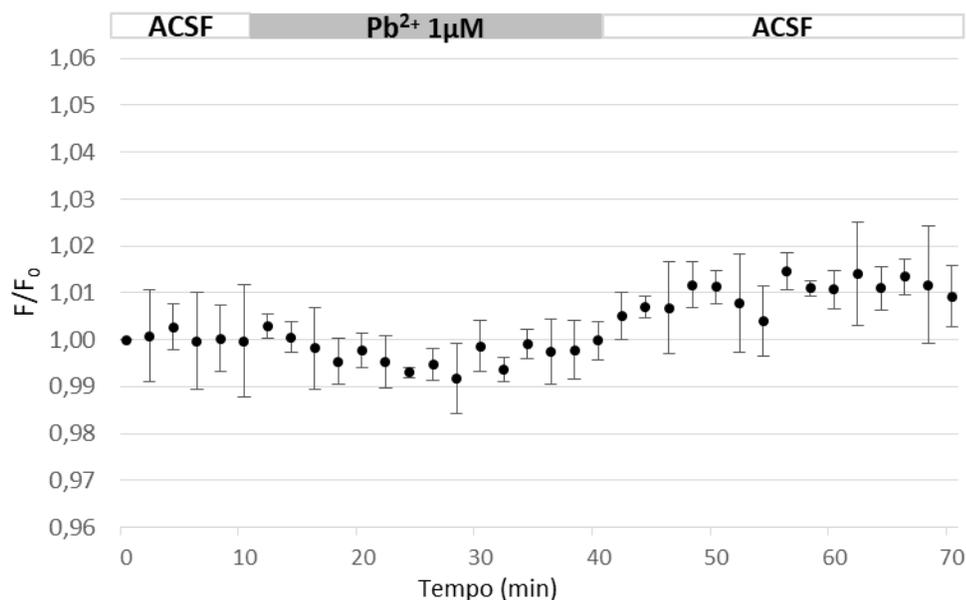
Após o estudo da influência hidrogeniônica, realizou-se um estudo de variação da velocidade de varredura (10-100 mVs<sup>-1</sup>) para determinar se o processo redox é adsorptivo ou difusional.

## 4. Resultados e Discussão

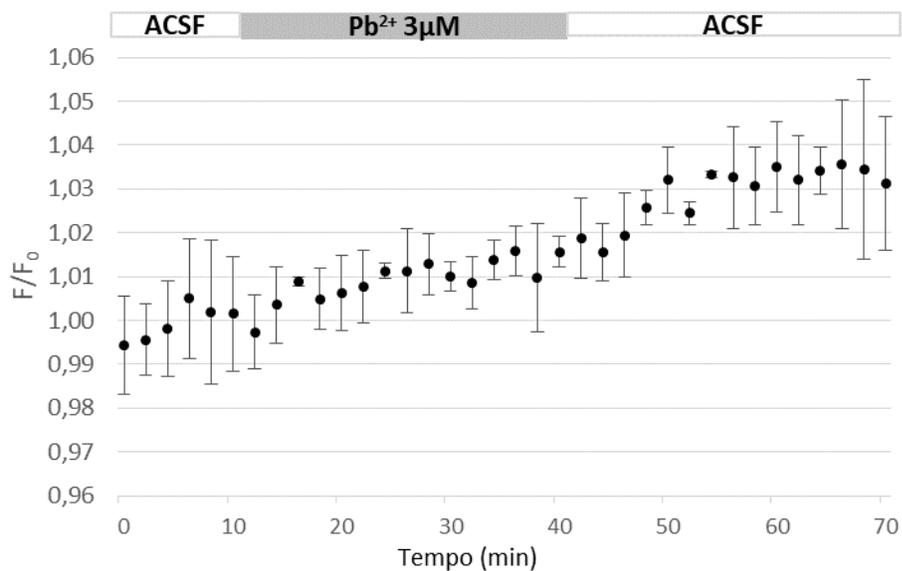
### 4.1. Toxicidade

O efeito do chumbo e do níquel na atividade neuronal foi avaliado em fatias de cérebro, na região sináptica (área CA3), fibras musgosas do hipocampo. Estudos de autofluorescência, realizados por diferentes concentrações de  $Pb^{2+}$  (1 e 3  $\mu M$ ) e  $Ni^{2+}$  (10, 20 e 30  $\mu M$ ), foram realizadas utilizando luz de excitação visível (480 nm) para detectar flavoproteínas, responsáveis pelas alterações de fluorescência. Os valores de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) foram calculados a partir do quociente resultante dos dados originais (F) pela média dos primeiros 10 min em ACSF ( $F_0$ ). Na presença de 1  $\mu M$  (0,2 ppm)  $Pb^{2+}$ , aplicado durante 30 minutos, os sinais de autofluorescência tiveram uma diminuição transitória, seguida por um aumento de cerca de 2% em relação à linha de base, como mostrado na Figura 4. O efeito do  $Pb^{2+}$  não é reversível, uma vez que o sinal permanece alterado mesmo após o retorno para a solução do meio extracelular normal (ACSF).

Na Figura 5, a concentração de chumbo foi de 3  $\mu M$  (0,6ppm) e o aumento da autofluorescência durante a aplicação de chumbo também alcançou cerca de 2% no final do período de 30 min. No entanto, para esta concentração de chumbo, o sinal continuou a aumentar após a remoção da solução de chumbo atingindo, cerca de 10 minutos mais tarde, um valor estável de cerca de 4% mais elevado do que a linha de base.



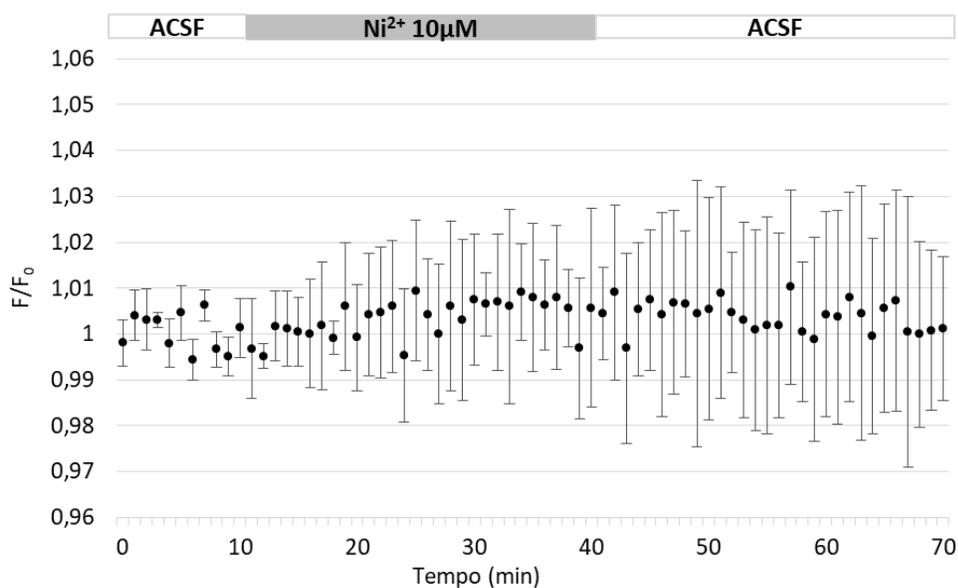
**Figura 4.** Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a  $Pb^{2+}$  1  $\mu M$ . Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de chumbo (1  $\mu M$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados  $\pm$  S.E.M.



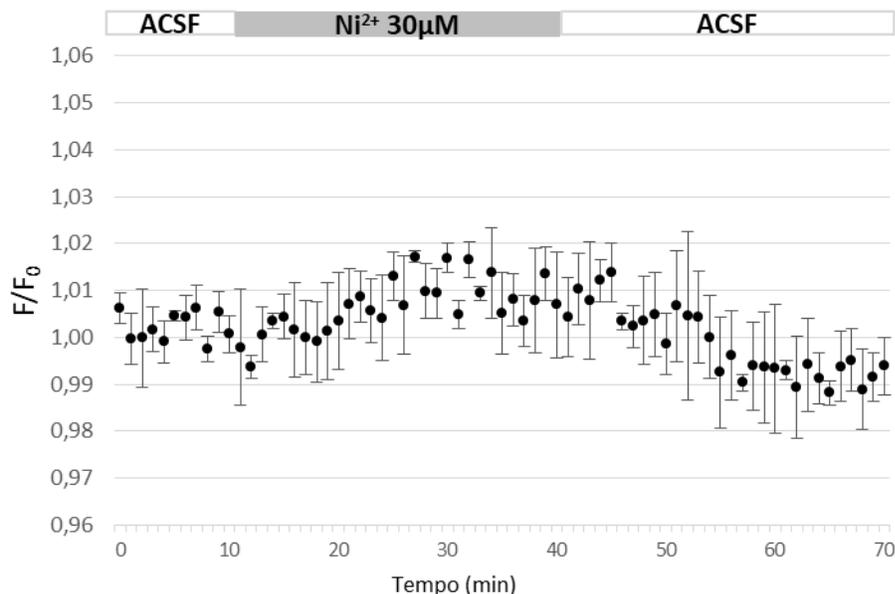
**Figura 5.** Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a  $Pb^{2+}$  3  $\mu M$ . Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de chumbo (3  $\mu M$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados  $\pm$  S.E.M.

As fatias cerebrais expostas ao níquel não apresentaram variação quando submetidas à concentração de 10  $\mu\text{M}$  (0,5 ppm), como observa-se na Figura 6.

Na Figura 7, onde as fatias cerebrais foram submetidas à solução de níquel de 30 $\mu\text{M}$  (1,5 ppm), foi possível confirmar a irreversibilidade da alteração causada pelo níquel às células. Em contato com a solução dos íons de níquel observou-se um aumento de 2% e, após a troca para a solução de ACSF, o sinal não volta ao seu referencial inicial, finalizando com queda de cerca de 1%.



**Figura 6.** Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a  $\text{Ni}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ . Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de níquel (10  $\mu\text{M}$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados  $\pm$  S.E.M.



**Figura 7. Sinais de autofluorescência normalizados ( $F/F_0$ ) a partir de fatias de cérebro exposta a  $Ni^{2+}$  ( $30 \mu M$ ). Após 10 minutos em ACSF foi aplicada a solução de níquel ( $30 \mu M$ ) durante 30 minutos, seguido por um período igual em ACSF. ( $N = 3$ ), tal como indicado nas barras acima dos sinais. Os dados foram normalizados para a média dos primeiros 10 pontos de dados. Todos os pontos representam os dados  $\pm$  S.E.M.**

Braga (1999) descreveu que, em neurônios hipocampais cultivados, concentrações nanomolares de chumbo bloqueiam a liberação de neurotransmissores.

Outro processo associado aos danos é a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Yin et al. (2008) indicou em seus estudos que cultura de neurônios do hipocampo mostraram uma diminuição na sua viabilidade quando submetidas a  $20 \text{ mM Pb}^{2+}$  e um aumento do valor da formação de ROS.

Gorji (2000) retratou a relação do Níquel ( $NiCl_2$ ) como bloqueador de canais de cálcio, estando assim relacionado com o desenvolvimento de isquemia, epilepsia e enxaqueca. Além disso, é reportado o aumento de alterações neuronais quando estes são submetidos à concentrações de 10, 25 e  $50 \mu M$ .

Desta forma, estes experimentos demonstraram as alterações na fluorescência celular em decorrência da exposição aos metais estudados e a irreversibilidade do efeito de chumbo e níquel em fatias cerebrais (hipocampo), sendo de extrema importância para comprovar a necessidade de investimento em materiais eficientes na remoção desses metais.

## **4.2.Caracterização do material**

### **4.2.1. *Levedura modificada com silsesquioxano***

As Figuras 8, 9 e 10 apresentam os resultados da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do silsesquioxano, da levedura e do material modificado (levedura com silsesquioxano), respectivamente, sendo que na Figura 8 (A e B) está detalhada a micrografia do silsesquioxano, sendo possível observar estruturas poliédricas de tamanhos que variam de 0,5 a mais de 3 micrômetros.

As leveduras, observadas na Figura 9 (A e B), apresentam-se em um aglomerado de células esféricas de, em média, 4 micrômetros. E após a modificação química da levedura com o SS (Figura 10A), observou-se que os cubos se aglomeraram em macropartículas maiores (~ 140 micrômetros) e foram revestidos por leveduras com dimensões de ~ 4 micrômetros (B).

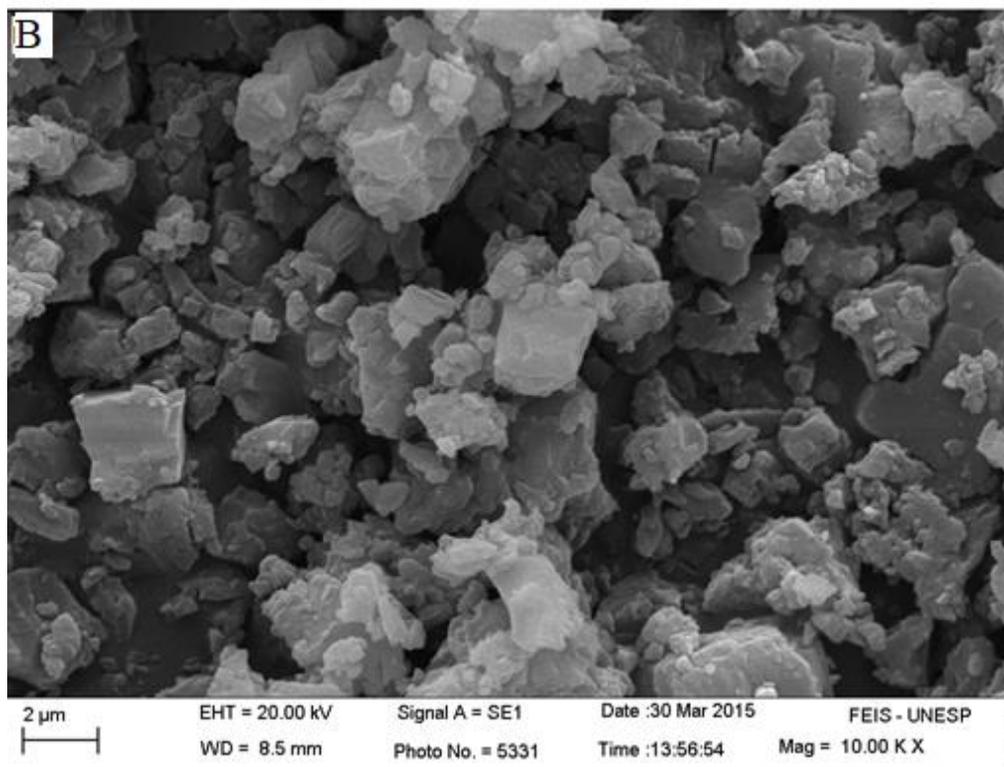
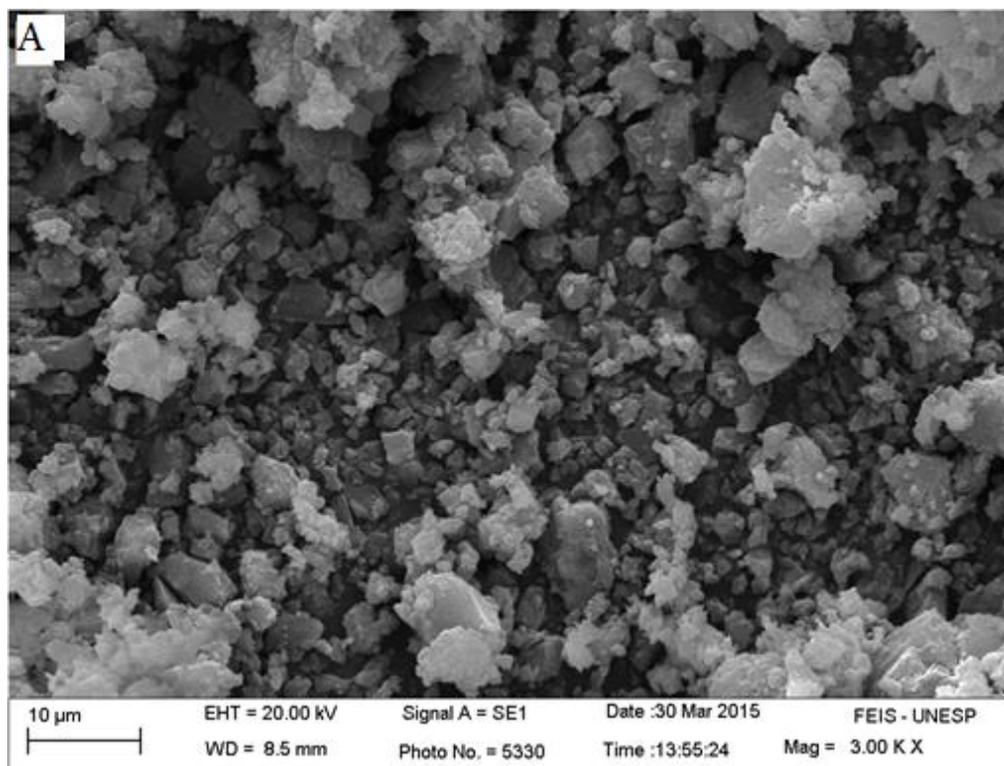


Figura 8. Imagens da MEV do Silsesquioxano (SS) com aumento de: (A) 3.000X, (B) 10.000X.

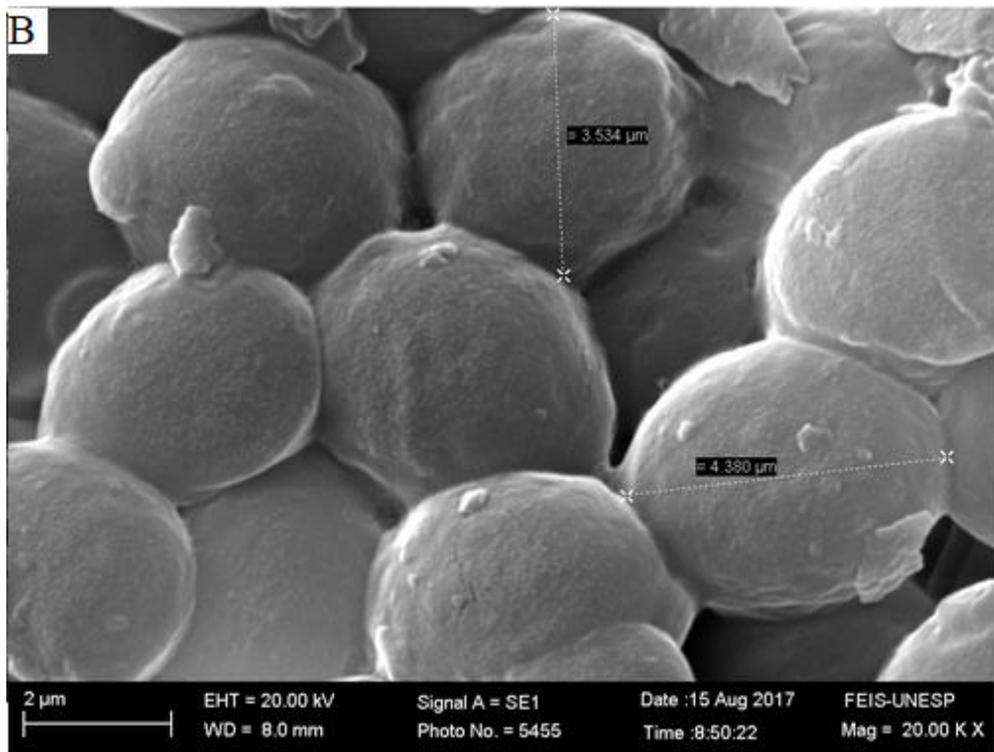
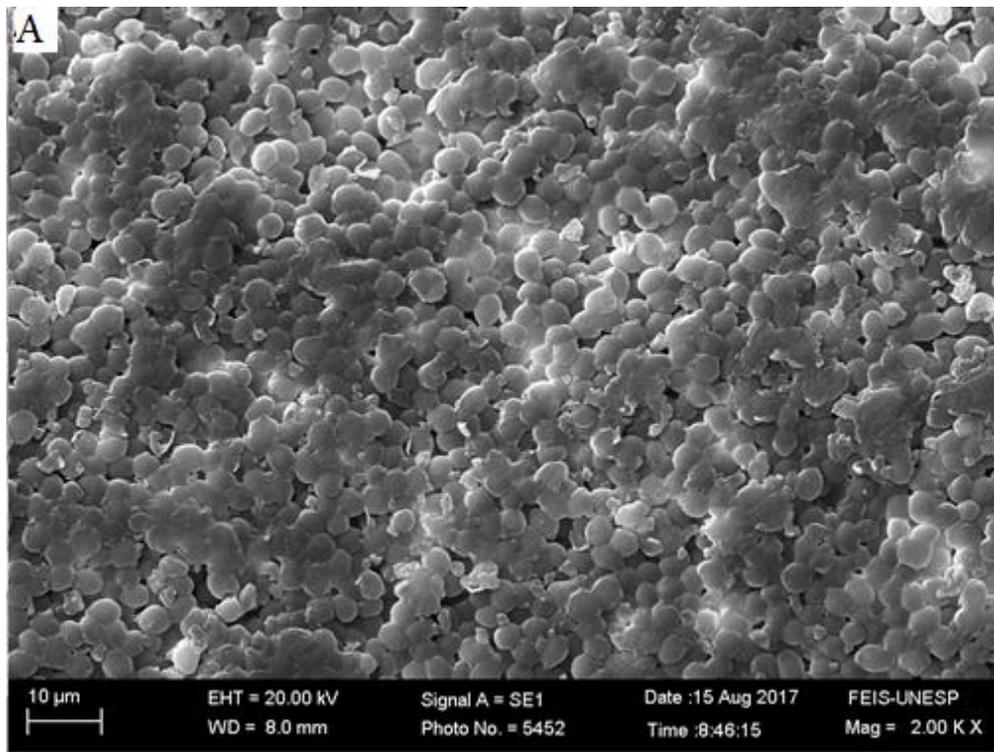


Figura 9. Imagens da MEV da Levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Lev) com aumento de: (A) 2.000X, (B) 2.500X.

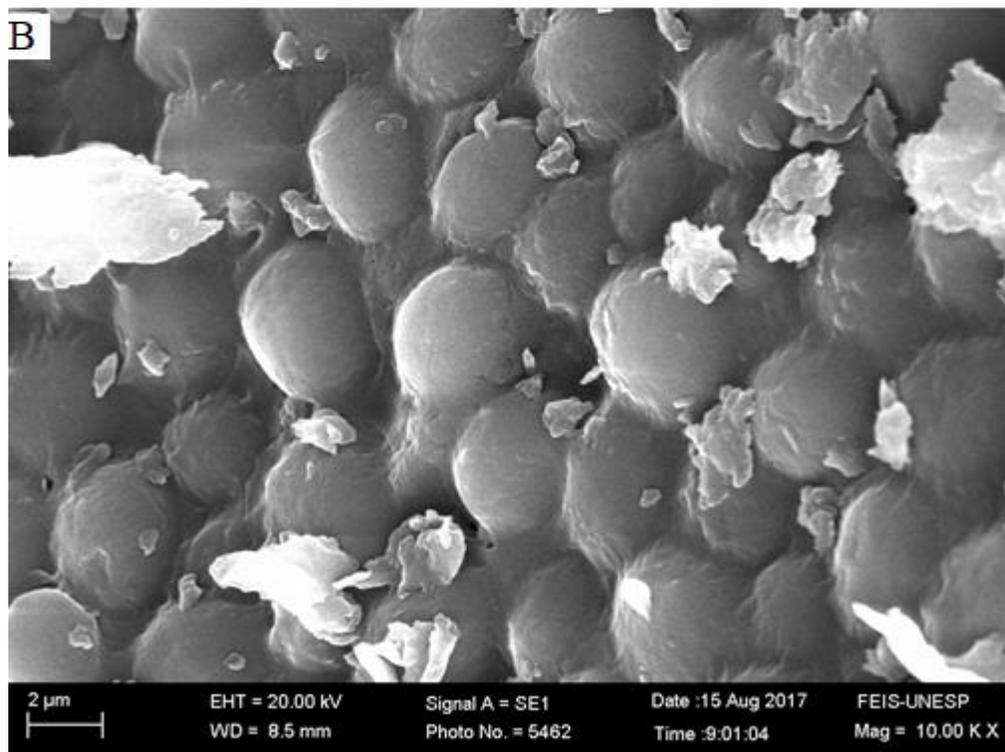
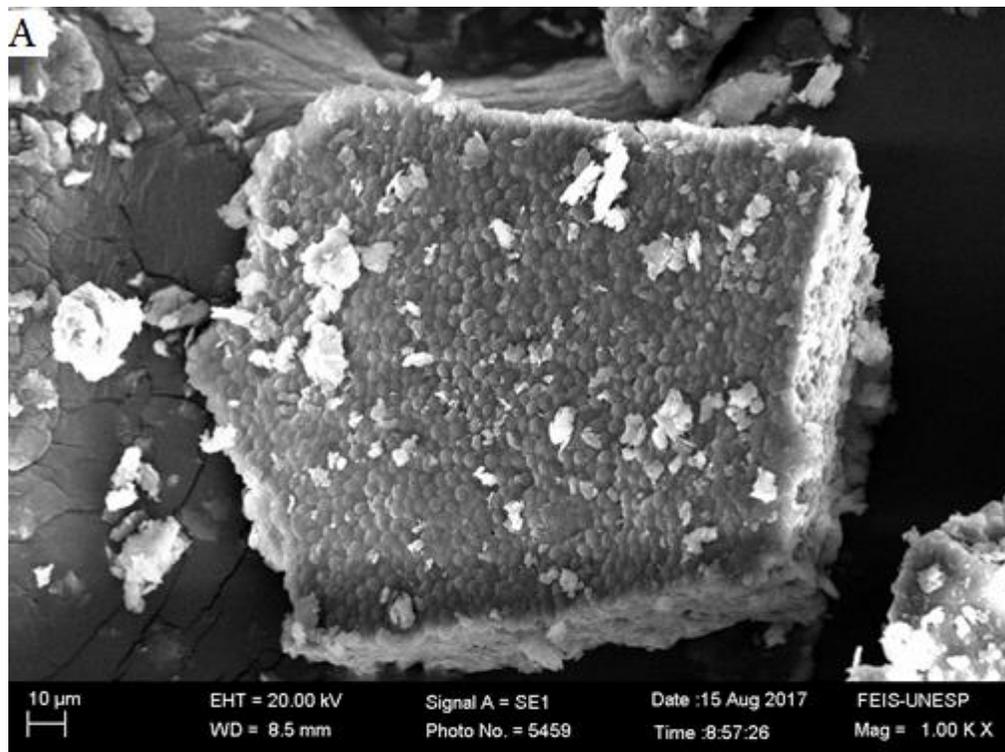


Figura 10. Imagens da MEV da levedura modificada com silsesquioxano (LevS) com aumento de: (A) 1.000X, (B) 10.000X.

A Energia Dispersiva de raios-X (EDS) apresentada nas Figuras 11 a 13 apresenta distribuição química dos elementos em cada amostra. Sendo que na Figura 11 temos o EDS da amostra de silsesquioxano, onde nota-se a presença de Silício, Oxigênio e Cloro.

A Figura 12, apresenta o EDS da levedura, onde observou-se a presença dos elementos químicos: Carbono, Enxofre, Fósforo, Nitrogênio, Oxigênio e Potássio enquanto que no EDS do material híbrido (Levedura modificada com Silsesquioxano) ilustrado pela Figura 13, constatou-se a presença de elementos dos dois materiais precursores, a saber: Carbono, Cloro, Fósforo, Oxigênio, Silício.

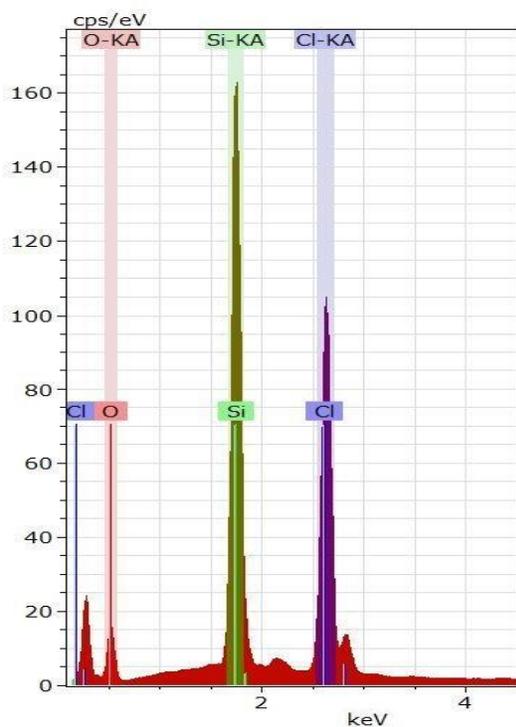


Figura 11. Espectro do EDS da amostra de SS.

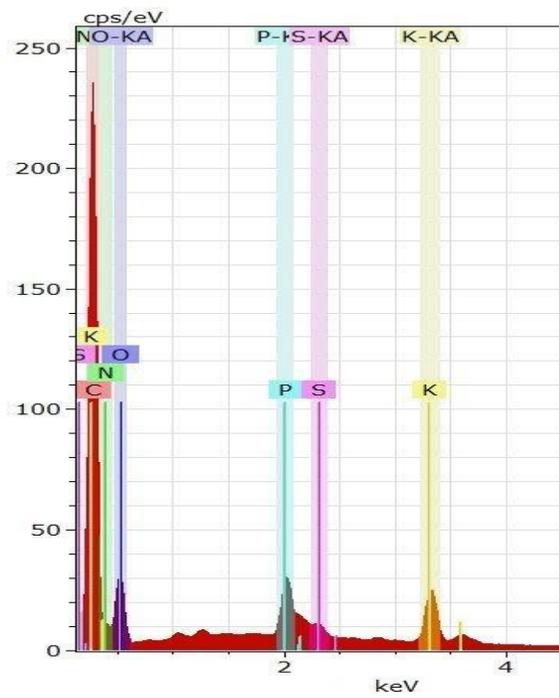


Figura 12. Espectro de EDS da amostra Lev.

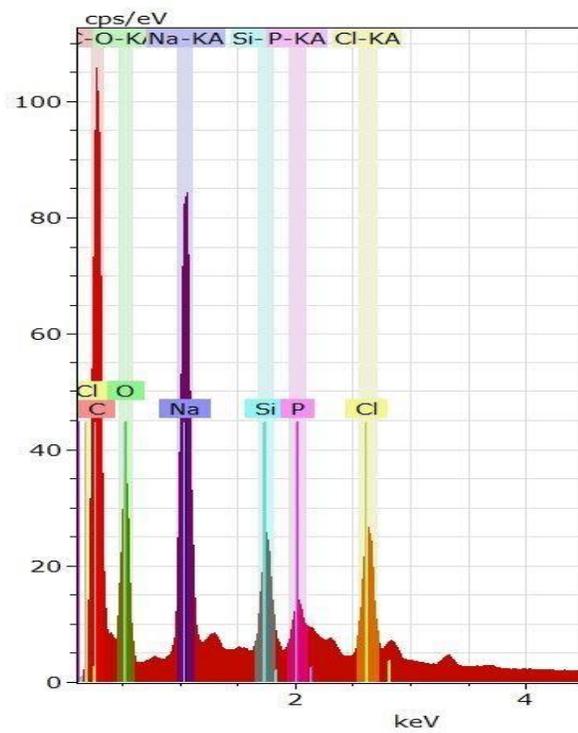


Figura 13. Espectro do EDS da amostra LevS.

A Figura 14, ilustra o espectro vibracional dos três materiais: Silsesquioxano (A), Levedura (B) e Levedura modificada com silsesquioxano (C). O Silsesquioxano apresentou as seguintes bandas de absorções: 3428  $\text{cm}^{-1}$  e 3137  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao estiramento N-H ( $\nu$ N-H); 2903  $\text{cm}^{-1}$  C-H( $\nu$ C-H); 1610 e 1583  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação N-H( $\delta$ N-H), 1106  $\text{cm}^{-1}$  do estiramento axial simétrico (Si-O-Si) ( $\nu$  Si-O-Si) e 706  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento Si-C( $\nu$ Si-C) é atribuído a ligação Si-C em  $\text{SiCH}_2$ (MAGOSSI, 2015;FEHER e WYNDHAM, 1998).Para a levedura, temos: as seguintes atribuições: bandas de absorção entre 3030 e 2800  $\text{cm}^{-1}$ , e 1500 e 1350  $\text{cm}^{-1}$  das cadeias acil dos lipídeos; 1740  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C=O de ésteres; 1500  $\text{cm}^{-1}$  da deformação N-H( $\delta$ N-H) das ligações peptídicas; e entre 1250 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  devido à contribuição de grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos e fosfolípidos, além da absorção de C-O de hidratos de carbono(AMI, POSTERI, *et al.*, 2014).

Para o material modificado destacamos a presença das seguintes bandas: 3030 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  das cadeias acil das leveduras; 1740  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C=O de ésteres das leveduras; 1500  $\text{cm}^{-1}$  da deformação N-H( $\delta$ N-H) das ligações peptídicas também das leveduras; 1106  $\text{cm}^{-1}$  do estiramento axial simétrico (Si-O-Si) ( $\nu$  Si-O-Si) e 706  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento Si-C ( $\nu$ Si-C), ambos do silsesquioxano. Assim, constatou-se que a modificação química entre a Levedura e o SS foi conduzida com sucesso pois o material híbrido apresentou absorções características de seus precursores.

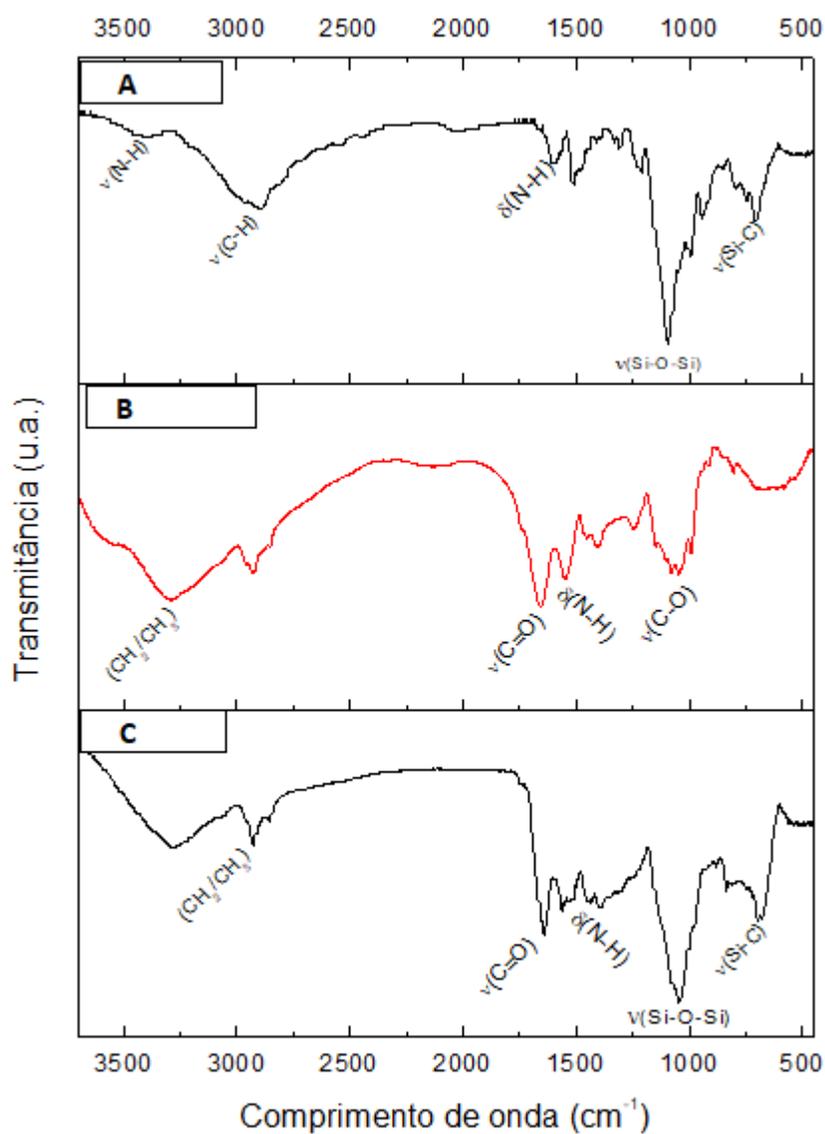
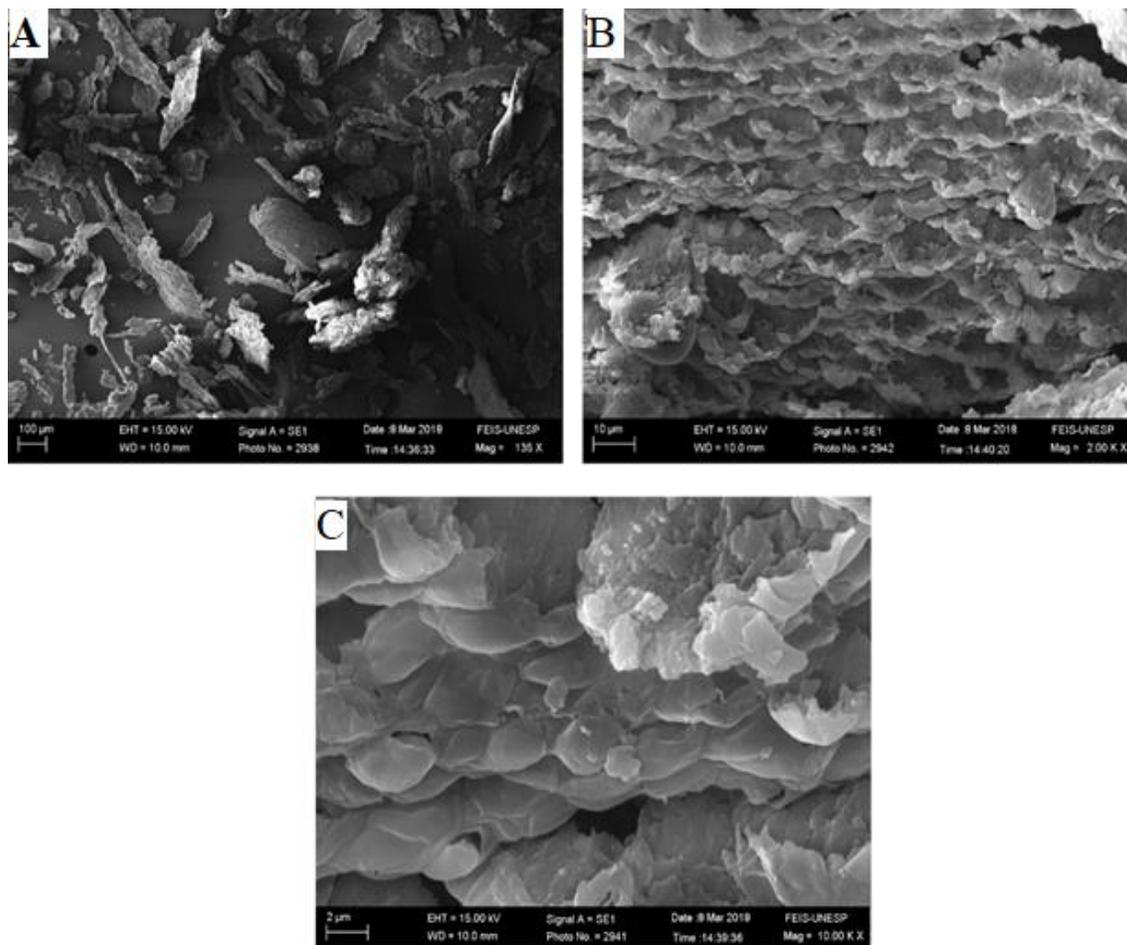


Figura 14. Espectros vibracionais na região do infravermelho: SS (A), Lev (B), LevS(C).

#### 4.2.2. Adsorção de Azul de Metileno pela Levedura Modificada com o silsesquioxano cúbico (LevB)

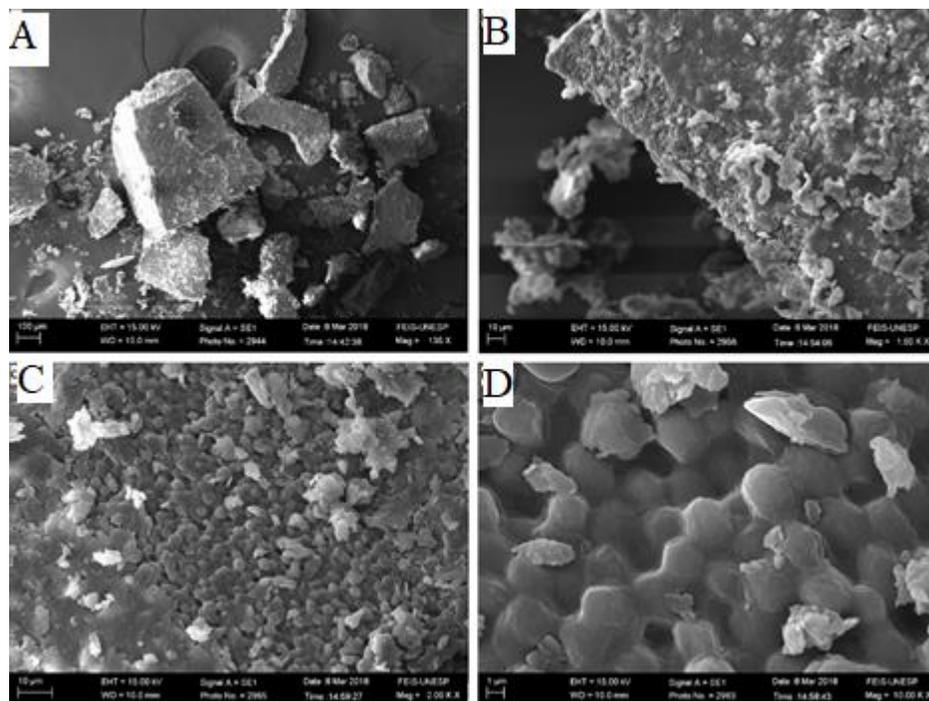
As Figuras 15 e 16 ilustram as imagens de MEV das amostras de LevA e LevSA, onde observou-se que a adsorção praticamente não modificou a forma das partículas, sugerindo uma alta dispersão do corante na superfície do material híbrido (LevSA).

Quando comparada a Figura 15 à Figura 9, é possível notar que não há aglomerados celulares organizados, como na amostra de Levedura pré-modificação. Mas na Figura 15C é possível observar a manutenção parcial de estruturas esféricas características das células de leveduras.



**Figura 15.** Imagens da MEV do material Levedura adsorvida com Azul de Metileno (LevA) com aumento de: (A) 135X, (B) 2.000X e (C) 10.000X.

Em outra comparação, entre Figura 16 e Figura 10, podemos notar que a estrutura do cubo, bem como o invólucro celular que o reveste, é totalmente preservada, notando-se na Figura 16D uma pequena perda da definição da estrutura esférica das células da levedura.



**Figura 16.** Imagens da MEV do material Levadura modificada com Silsesquioxano e Azul de Metileno (LevSA) com aumento de: (A) 135X, (B) 1.000X, (C) 2.000X e (D) 10.000X.

Os espectros vibracionais do Azul de metileno (Figura 17A) apresentam várias absorções na região de  $664$  a  $1241\text{ cm}^{-1}$ , que foram atribuídas as vibrações das ligações C-H, próximos a  $1488\text{ cm}^{-1}$  correspondentes às vibrações C-N. As vibrações do anel aromático estão localizados entre  $1591$  a  $1661\text{ cm}^{-1}$  e as vibrações do grupo  $\text{CH}_3$  foram atribuídas às regiões de  $1322$  a  $1348\text{ cm}^{-1}$  (XIONG, YANG, *et al.*, 2010).

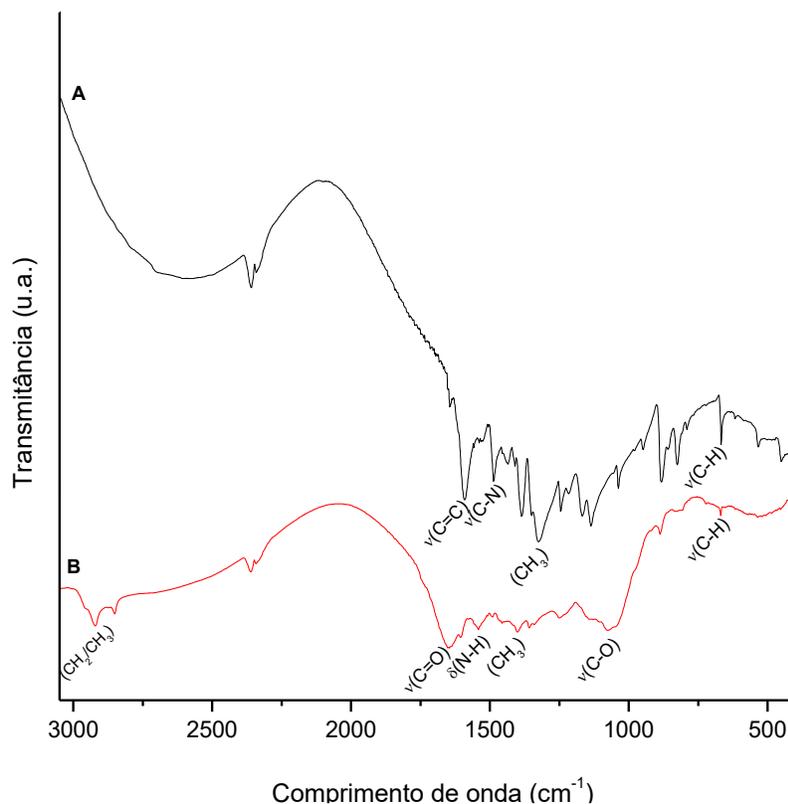


Figura 17. Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras Azul de Metileno (A) e LevA (B).

Para o material LevA (Figura 17B), destacamos as seguintes bandas: 3030 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  das cadeias acil das leveduras; 1740  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C=O de ésteres das leveduras; 1500  $\text{cm}^{-1}$  da deformação N-H( $\delta$ N-H) das ligações peptídicas também das leveduras; 1488  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes às vibrações C-N; 1250 a 1000  $\text{cm}^{-1}$  devido à contribuição de grupos fosfodiéster de ácidos nucleicos e fosfolípidos, além da absorção de C-O de hidratos de carbono e 664  $\text{cm}^{-1}$  das vibrações das ligações C-H .

Em uma análise na Figura 18, com foco no espectro C é possível afirmar que algumas bandas dos itens A e B são mantidas, unificando-se em um novo composto. As bandas mantidas são: 3030 a 2800  $\text{cm}^{-1}$  das cadeias acil das leveduras, 1740  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento de C=O de ésteres das leveduras, 1500  $\text{cm}^{-1}$  da deformação N-H( $\delta$ N-H) das ligações peptídicas também das leveduras, 1106  $\text{cm}^{-1}$  do estiramento axial simétrico (Si-O-Si) ( $\nu$  Si-O-Si) do silsesquioxano e 664  $\text{cm}^{-1}$  das vibrações das ligações C-H do azul de metileno.

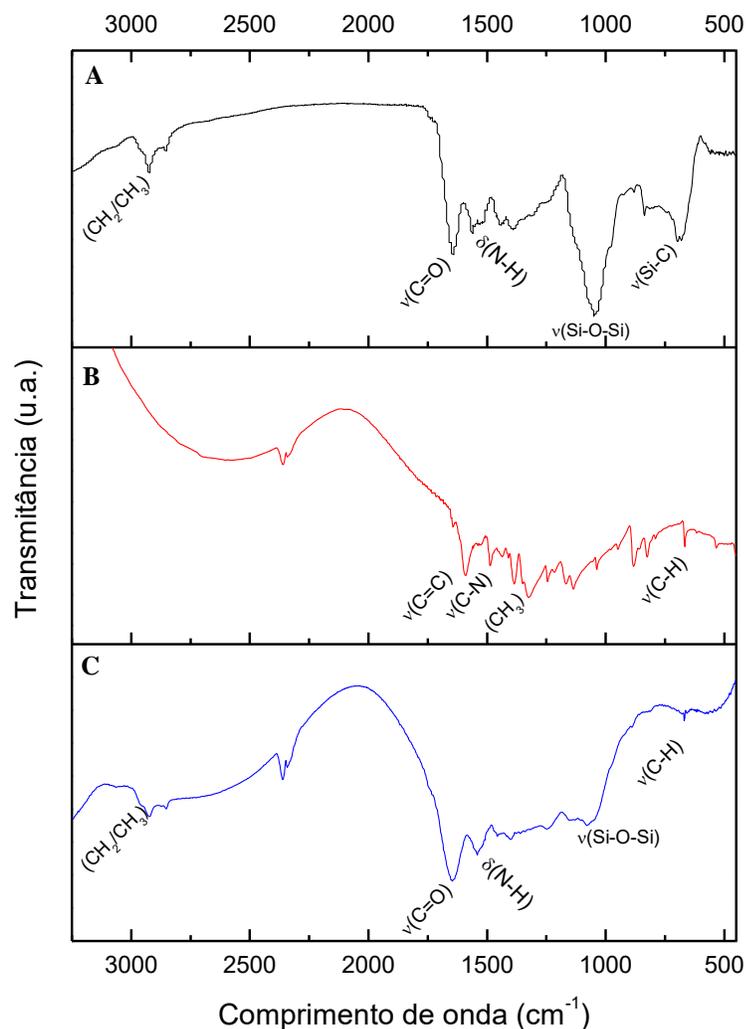


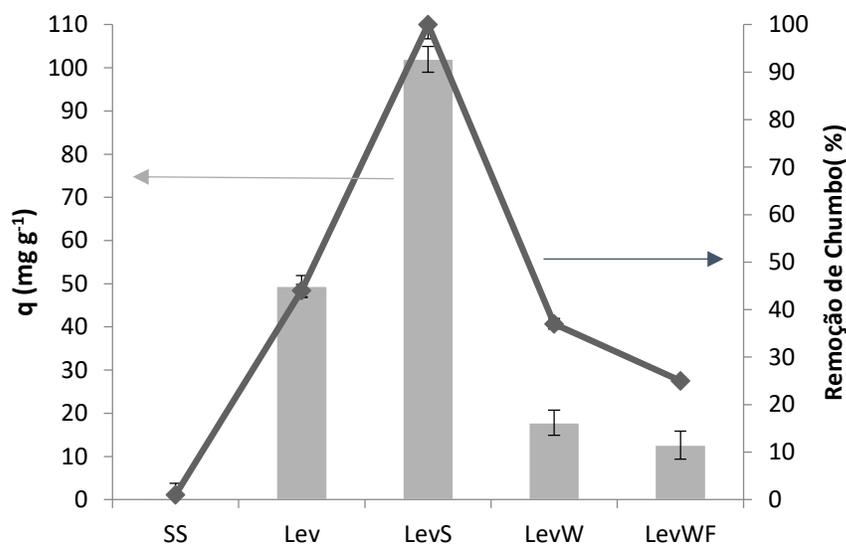
Figura 18. Espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras LevS(A), Azul de Metileno (B) e LevSA (C).

### 4.3. Aplicações analíticas: Biossorção

A Figura 19 ilustra o comportamento da biossorção de chumbo pelos materiais. Constatou-se que a modificação da levedura com silsesquioxano (LevS) apresenta potencial máximo de remoção de chumbo de 97%, o que corresponde a capacidade de sorção de 102 mg g<sup>-1</sup>

Assim, o LevS é o melhor adsorvente para chumbo em comparação à Levedura proveniente da vinícola (LevW - 37% de remoção, 17,8 mg g<sup>-1</sup> de capacidade de sorção),

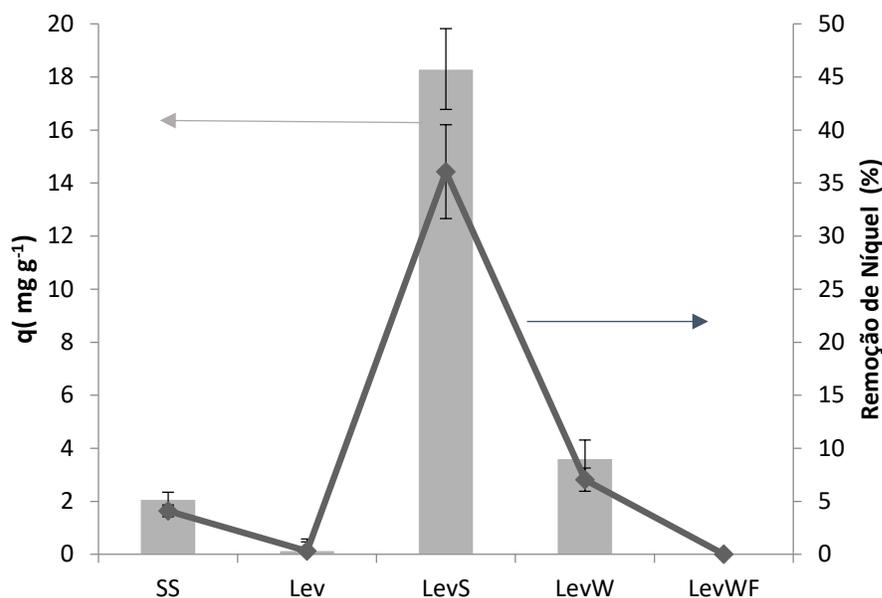
levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Lev - 44% de remoção, 49,4mg g<sup>-1</sup> de capacidade de sorção), Levedura proveniente da vinícola após fermentação (LevWF - 25% de remoção, 12,6 mg g<sup>-1</sup> de capacidade de sorção) e Silsesquioxano (SS - 1% de remoção, 0,3mg g<sup>-1</sup>de capacidade de sorção). Este experimento foi conduzido com 25 ml de solução de chumbo (100 ppm), 15 minutos de contato, 25°C, pH 4 (pH original da solução) e 90 min de agitação.



**Figura 19.** Capacidade de sorção (mg g<sup>-1</sup>) e porcentagem de remoção (%) de Chumbo diferentes materiais: SS (Silsesquioxano), Lev (Levedura), LevS (Levedura modificada com SS), LevW (Levedura encapsulada proveniente da vinícola) e LevWF (Levedura encapsulada proveniente da vinícola após fermentação). Solução inicial de Chumbo: 100 ppm. Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>; Tempo de contato: 15 min; pH = 4.

Para a sorção de níquel (Figura 20) obteve-se as seguintes porcentagens de remoção e capacidade de sorção, respectivamente: LevS (36%, 18,3 mg g<sup>-1</sup>), LevW (7%, 3,6 mg g<sup>-1</sup>), SS (4%, 2,8 mg g<sup>-1</sup>), Lev e LevWF com 0% de remoção e, conseqüentemente, sem valores de capacidade de sorção. Assim, a levedura modificada com silsesquioxano também aparece como melhor adsorvente para o níquel, frente aos demais. Para este teste foram aplicados 25 ml de solução de níquel (100 ppm), 15 minutos de contato, 25°C, pH 6 (pH original da solução) e 90 u/min de agitação.

Os materiais LevW e LevWF foram utilizados a critério de comparação, uma vez que são utilizados em processos industriais, especialmente LevWF, que é um resíduo do processo de fermentação e pode ser obtido a baixo custo.



**Figura 20.** Capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ) e porcentagem de remoção (%) de Níquel diferentes materiais: SS (silsesquioxano), Lev (Levedura), LevS (Levedura modificada com SS), LevW (Levedura encapsulada proveniente da vinícola) e LevWF (Levedura encapsulada proveniente da vinícola após fermentação). Solução inicial de Níquel: 100 ppm. Relação Líquido/Adsorvente:  $500 \text{ mL g}^{-1}$ ; Tempo de contato: 15 min,  $\text{pH} = 6$ .

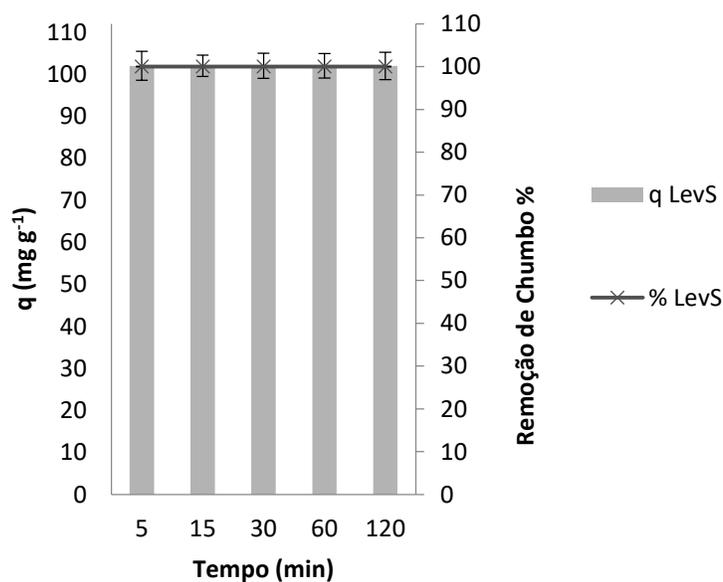
A partir dos resultados obtidos, dois materiais foram selecionados para o prosseguimento do trabalho: LevS e Lev.

Uma análise mais detalhada do comportamento da levedura modificada com silsesquioxano (LevS) foi então avaliada através do estudo do efeito de vários parâmetros sobre a sua capacidade de remoção, incluindo o período de tempo de sorção, a concentração de chumbo e níquel,  $\text{pH}$ , temperatura e relação líquido/adsorvente na suspensão, com o objetivo de atingir as condições ideais para biossorção dos metais.

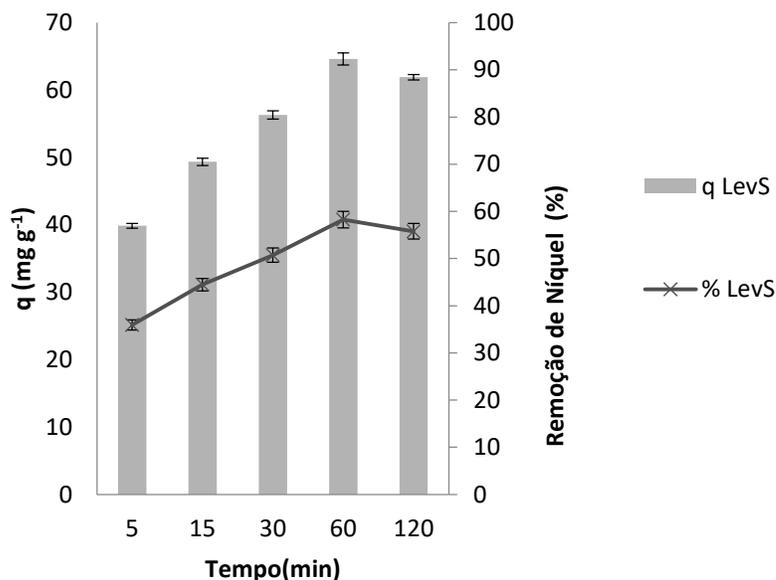
Com relação à influência do tempo, a Figura 21 mostra que LevS atinge a capacidade de adsorção máxima em 5 minutos de contato ( $100\%$ ,  $102 \text{ mg g}^{-1}$ ). A porcentagem de remoção LevS e a capacidade de sorção foram mantidos constantes para os estudos posteriores.

Dados da literatura apontam que a capacidade de sorção de chumbo de leveduras de cervejaria chega a  $5,74 \text{ mg g}^{-1}$  em 30 minutos de contato, só obtendo maiores valores em tempos superiores a 60 minutos (HAN, LI, *et al.*, 2006). Desta forma, este novo material híbrido (LevS) se destaca pela rápida adsorção de quantidades elevadas do metal.

Na sorção de níquel (Figura 22) observa-se que, para o LevS, a maior capacidade de sorção é obtida aos 60 minutos de contato (58%, 64,63 mg g<sup>-1</sup>) e, no tempo mínimo (5 minutos) o material híbrido apresentou 36% de remoção do metal, o equivalente a 39,87 mg g<sup>-1</sup>. Segundo Padmavathy *et al.*(2003), em testes de sorção que atingem o equilíbrio entre 20 e 60 minutos, as leveduras de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) apresentam capacidade máxima de 11,4 mg g<sup>-1</sup>, o que comprova a alta eficiência do material modificado neste trabalho.

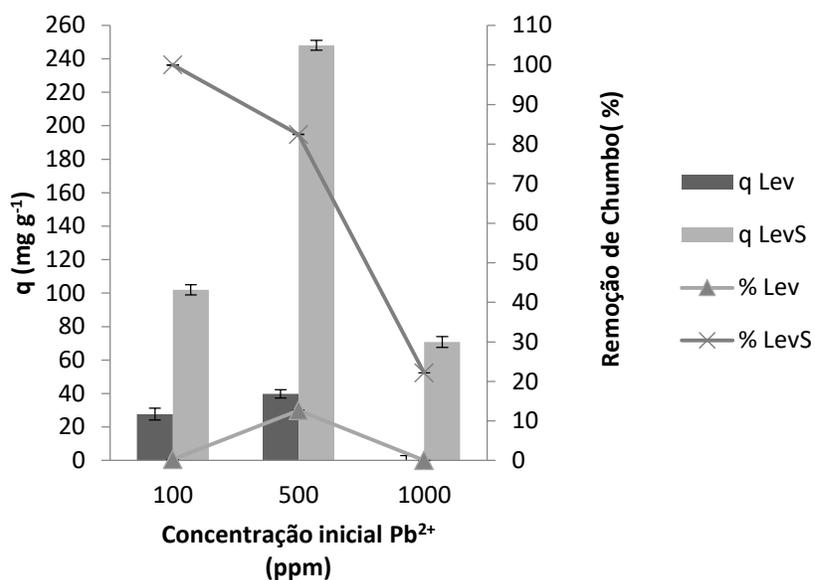


**Figura 21. Cinética de sorção de chumbo com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS).  
Concentração inicial de chumbo: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>, pH = 4.**



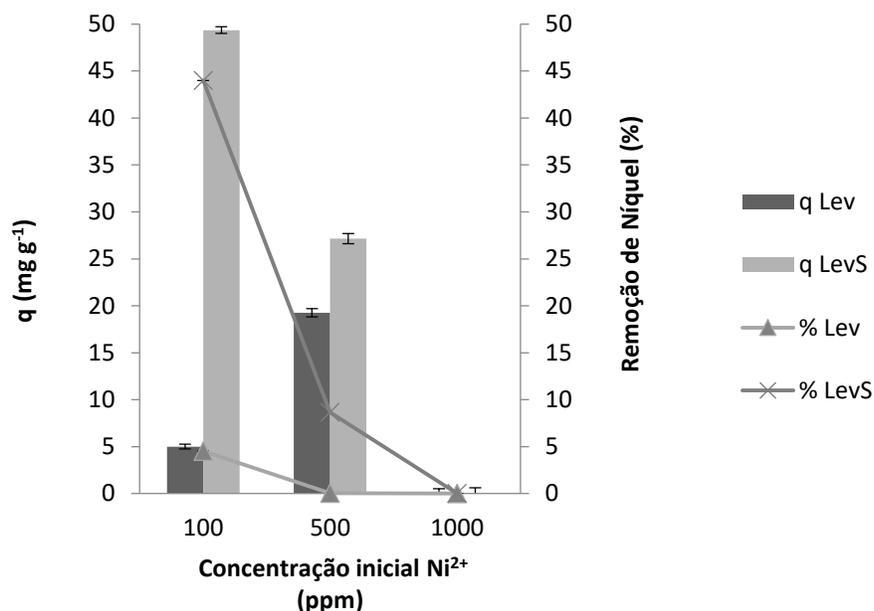
**Figura 22. Cinética de sorção de níquel com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS).  
Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>, pH = 6.**

Na Figura 23, são apresentados os resultados referentes ao experimento com 3 diferentes concentrações iniciais de chumbo e, na Figura 24, de níquel: 100, 500 e 1.000 ppm. Conforme observado, a levedura modificada, LevS, removeu 100% (102 mg g<sup>-1</sup>), de chumbo, para Pb<sup>2+</sup> 100 ppm, 82%, (248,04 mg g<sup>-1</sup>) com 500 ppm de chumbo e diminuiu para 22% (70,83 mg g<sup>-1</sup>) quando Pb<sup>2+</sup> foi de 1000 ppm. Em concentrações maiores do que 100 ppm, a literatura relata sorção de 144 mg g<sup>-1</sup> em 200 ppm de chumbo, pH 5, aplicando levedura seca como adsorvente(ÖZER e ÖZER, 2003), valor de sorção menor em comparação com este trabalho. O adsorvente Lev, removeu apenas 27% (27,75 mg g<sup>-1</sup>), de chumbo em soluções contendo 100 ppm deste íon metálico, 13% (39,8 mg g<sup>-1</sup>) em 500 ppm e 0% em 1,000 ppm. Estes resultados revelam que a capacidade de sorção diminuiu com o aumento da concentração de metal, em ambos os testes. Isso se dá porque, uma vez saturados os sítios de sorção, a quantidade de metal ainda disponível em solução torna, proporcionalmente, a quantidade de sorção menor(ISKANDAR, ZAINUDIN e TAN, 2011).



**Figura 23. Sorção de chumbo em diferentes concentrações com Lev (Levedura) e LevS (Levedura modificada com SS). Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>; Tempo de contato: 15 min, pH = 4.**

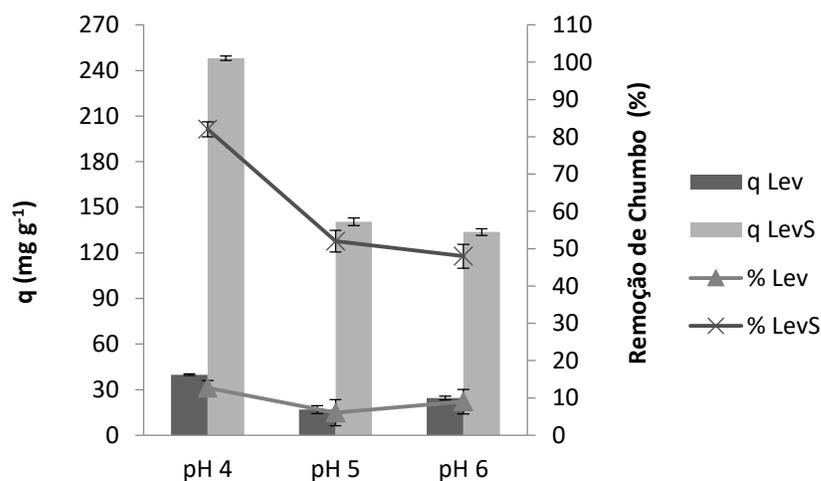
Com relação ao níquel (Figura 24), o material sintetizado neste trabalho (LevS) apresentou sorção de 44% (49,36 mg g<sup>-1</sup>) com 100 ppm de Ni<sup>2+</sup>, 9% (27,14 mg g<sup>-1</sup>) com 500 ppm e 0% com 1000 ppm de Ni<sup>2+</sup>. Quando aplicado o Lev, a percentagem de sorção com 100 ppm foi de 5% (5 mg g<sup>-1</sup>), 6% (19,27 mg g<sup>-1</sup>) em solução de 500 ppm de Ni<sup>2+</sup> e 0% em 1000 ppm. Özer & Özer (2003) obtiveram 44.4 mg g<sup>-1</sup> de sorção de níquel em solução de 200 ppm do metal, solução duas vezes mais concentrada do que a aplicada inicialmente neste estudo.



**Figura 24. Sorção de níquel em diferentes concentrações com Lev (Levedura) e LevS (Levedura modificada com SS). Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>; Tempo de contato: 15 min, pH = 6.**

Com base nos estudos cinético e de sorção dos íons metálicos, foram escolhidas as concentrações de 500 e 100 ppm para chumbo e níquel respectivamente, para as próximas etapas do trabalho. A concentração de chumbo escolhida se deve ao fato de que, com 100 ppm, já temos a adsorção máxima, sendo necessário uma concentração onde não haja sorção máxima para que se possa avaliar efetivamente o efeitos dos parâmetros a serem analisados sob a capacidade e porcentagem de sorção.

A Figura 25, ilustra a influência do pH na capacidade de sorção, onde se observa que o pH ideal para LevS na remoção de chumbo é o pH 4, sendo este o pH original da solução. Neste caso, a capacidade de sorção foi de 248,04  $\text{mg g}^{-1}$  com 82% de remoção de chumbo, e o valor é menor em pH 6, com 48% de remoção de chumbo, 133,7  $\text{mg g}^{-1}$  de capacidade de sorção. Para Lev o pH 4 foi o ideal, com uma capacidade de sorção de 39,8  $\text{mg g}^{-1}$  (12%), sendo no pH 5 o menor valor de sorção: 16,8  $\text{mg g}^{-1}$  (6% de remoção).



**Figura 25. Sorção de chumbo em diferentes pHs com Lev (Levedura) e LevS (Levedura modificada com SS). Concentração inicial de chumbo: 500 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>; Tempo de contato: 15 min.**

O pH ideal para teste de sorção de níquel empregando LevS, segundo os dados apresentados na Figura 26 foi de pH 6, com 44% de remoção (49,36 mg g<sup>-1</sup>). Para o pH 4 e 5, não houve remoção de níquel. Vale destacar que o pH 6 é o pH inicial da solução e que o mesmo material teve seu maior ponto de sorção de Pb<sup>2+</sup> em pH 4, o que significa que em uma solução com os dois metais, não haverá interferência de níquel na remoção de chumbo. Ou seja, na presença de chumbo e níquel, em pH 4, haverá somente sorção de Pb<sup>2+</sup>. Já em pH 6 ambos metais são retidos, o que resultará numa menor capacidade de sorção para cada metal, uma vez que estes competirão pelos sítios de sorção. Aplicando o Lev, temos que o pH 7 foi o ideal de trabalho, onde a percentagem de remoção foi de 22% (22,45 mg g<sup>-1</sup>). Com o pH 6, a capacidade de sorção cai para 5 mg g<sup>-1</sup> ou 5% de remoção, e para 0% em pH 5 e pH 4.

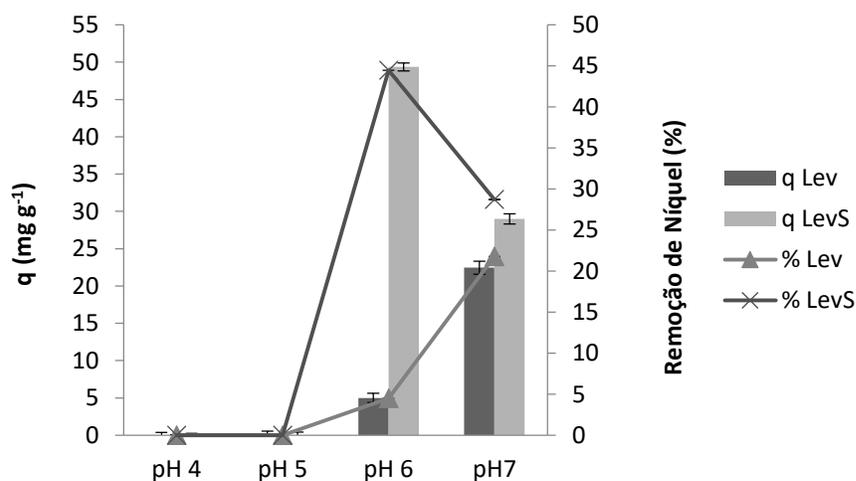


Figura 26. Sorção de níquel em diferentes pHs com Lev (Levedura) e LevS (Levedura modificada com SS). Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>; Tempo de contato: 15 min.

O efeito da temperatura na sorção de chumbo está representada na Figura 27. Para 40 ° C, a bio-sorção de chumbo por LevS foi ligeiramente maior (3%) do que a observada à temperatura ambiente (25°C). Para a Lev, a elevação da temperatura reduz em 2% a percentagem de remoção de chumbo. Assim, tendo em conta o custo do aquecimento, o aumento de temperatura, neste caso não é muito viável. No caso do níquel, conforme observado na Figura 28 há redução de 28% na sorção do metal com o aumento da temperatura em ambos sorventes. Desta forma, a temperatura ambiente é mantida nos demais testes.

A faixa de temperatura foi selecionada com base no trabalho de Han *et al.* (2006), que verificou a redução da capacidade de sorção de chumbo em temperatura superiores a 25 ° C. Além disso, o aumento da temperatura modifica os locais de sorção da levedura, alterando suas interações e capacidade de sorção. Desta forma, a pequena variação da capacidade de sorção nas temperaturas de trabalho é justificada por que modificações estruturais ocorrem em temperaturas maiores de 60°C, temperaturas estas que causam desnaturação das proteínas das leveduras, alterando os sítios de sorção (LABUTO, TRAMA, *et al.*, 2015).

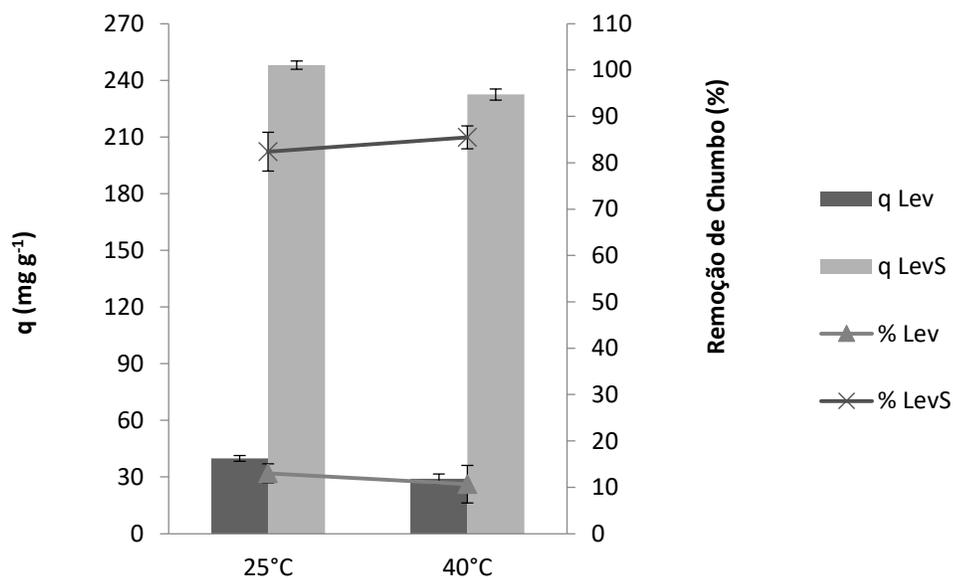


Figura 27. Sorção de chumbo em diferentes temperaturas com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de chumbo: 500 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: 500 mL g<sup>-1</sup>; Tempo de contato: 15 min, pH = 4.

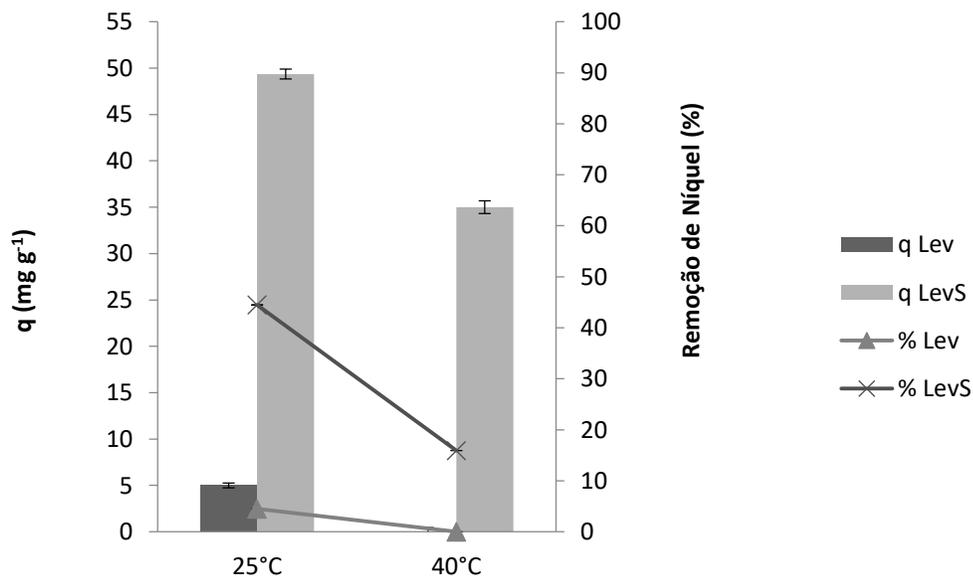
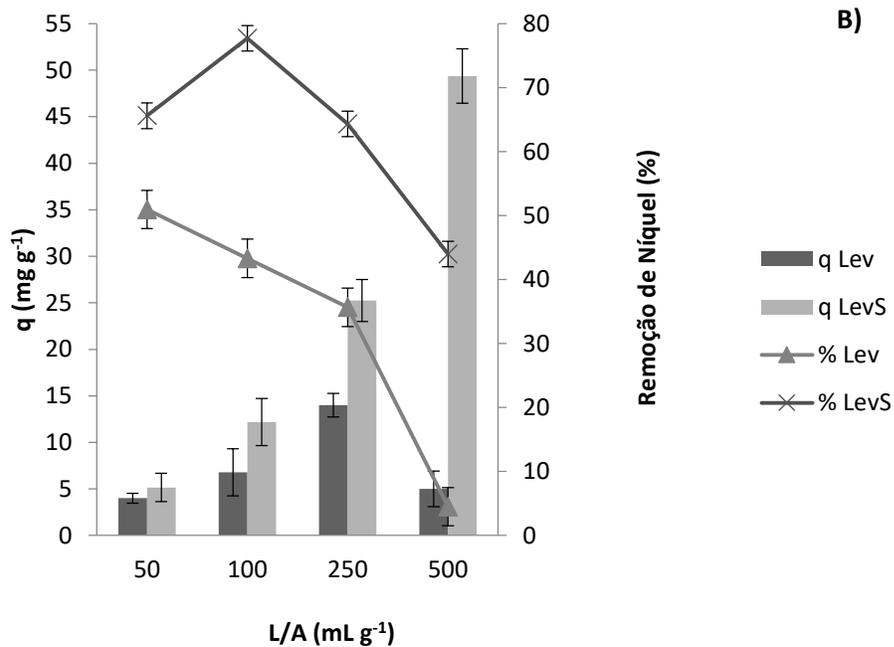
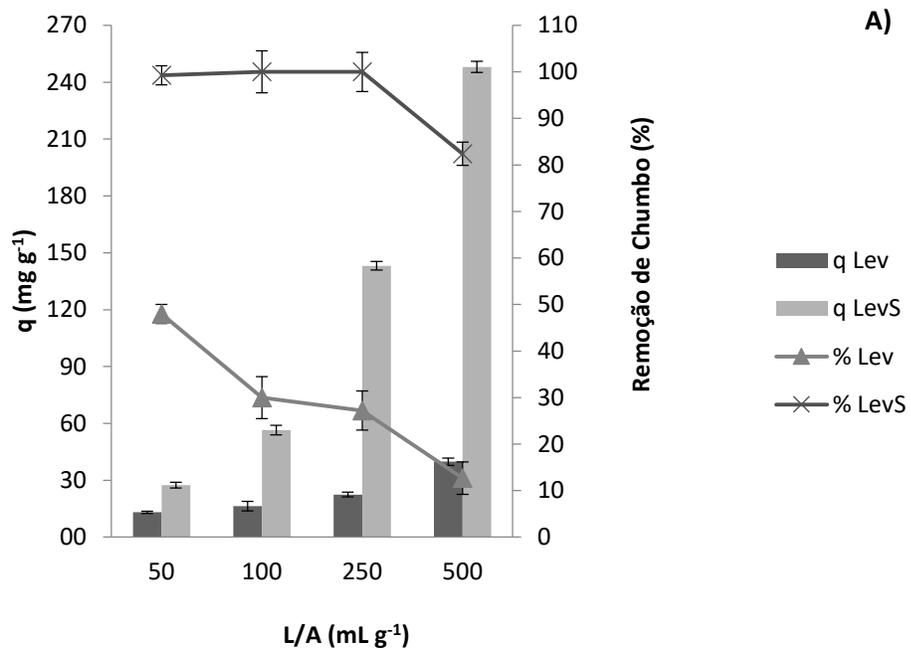


Figura 28. Sorção de níquel em diferentes temperaturas com Lev (Levedura) e LevS(Levedura modificada com SS). Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Relação Líquido/Adsorvente: 500 mLg<sup>-1</sup>; Tempo de contato: 15 min, pH = 6.

Assumindo 500 ppm de chumbo da solução inicial, pH 4 e temperatura de 25 °C, e 100 ppm de níquel, pH 6 e mesma temperatura, a influência da concentração de sorvente na capacidade de sorção foi estudada conforme ilustra a Figura 29, onde demonstrou-se que o aumento da massa de adsorvente (diminuição da razão líquido/adsorvente – L/A), aumenta a percentagem de remoção e diminui a capacidade de sorção ( $\text{mg g}^{-1}$ ): mais massa, mais sorção, menos metal disponível em proporção ao adsorvente.

No caso do LevS em chumbo (Figura 29A) para a proporção líquido/adsorvente (mL/g) de 50, 100 e 250, a percentagem de sorção de chumbo foi de 100% (27,5, 56,4 e 143,2  $\text{mg g}^{-1}$ , respectivamente), mas a melhor capacidade de sorção é com 500  $\text{mL g}^{-1}$ , em que o peso de LS foi 0,05 g em 25 mL de solução, e a capacidade de sorção foi de 248  $\text{mg g}^{-1}$  (82%). Isto ocorre porque, quanto maior L/A, mais massa de sorvente é aplicada. Assim, a quantidade de chumbo por grama de adsorvente é menor. Considerando o mesmo material na remoção de níquel (Figura 29B), temos que para as proporções líquido/adsorvente ( $\text{mL g}^{-1}$ ) de 50, 100 e 250, a percentagem de sorção de níquel foi de 66%, 78% e 64% (5,15  $\text{mg g}^{-1}$ , 12,2  $\text{mg g}^{-1}$  e 25,25  $\text{mg g}^{-1}$ , respectivamente), mas a melhor capacidade de sorção é com 500  $\text{mL g}^{-1}$ , em que o peso de LevS foi 0,05 g em 25 mL de solução, e a capacidade de sorção foi de 49,36  $\text{mg g}^{-1}$  (44%). Maiores capacidades de sorção com menores percentagens de remoção acontecem porque, menor massa adsorve alta quantidade do metal. Assim, em proporção, temos maiores valores de metal sorvido por grama de adsorvente.



**Figura 29. Sorção de Chumbo (A) e Níquel (B) para diferentes razões de líquido/adsorvente (mL g<sup>-1</sup>) com Lev (levedura) e LevS (Levedura modificada com SS). Concentração inicial de chumbo: 500 ppm; Concentração inicial de níquel: 100 ppm; Tempo de contato: 15 min, pH = 4 para chumbo e pH = 6 para o níquel.**

O adsorvente Lev, apresentou as seguintes percentagem de remoção de chumbo: 48%, 30%, 27% e 13% com as proporções de líquido/adsorvente de 50, 100, 250 e 500 mL/ g,

respectivamente. Para a capacidade de sorção os valores encontrados foram: 13,1 mg g<sup>-1</sup>, 16,4 mg g<sup>-1</sup>, 22,4 mg g<sup>-1</sup> e 39,8 mg g<sup>-1</sup>; apresentando desta forma um comportamento semelhante ao sorvente LevS: a percentagem de adsorção e capacidade de sorção (mg g<sup>-1</sup>) diminuem. Já em níquel há diminuição da percentagem de remoção com o aumento do L/A: 51%, 43% 36% e 5%, respectivamente. Isso representa, em mg g<sup>-1</sup>: 4 mg g<sup>-1</sup>, 6,8 mg g<sup>-1</sup>, 14 mg g<sup>-1</sup> e 5 mg g<sup>-1</sup>.

A literatura retrata valores elevados de capacidade de sorção (160 mg g<sup>-1</sup> e 144 mg g<sup>-1</sup> para o chumbo e 44,4 mg g<sup>-1</sup> para o níquel) com mais de 500 mL g<sup>-1</sup> (2,000mL g<sup>-1</sup> no primeiro e 1,000 mL g<sup>-1</sup> nos dois últimos) (CHENG, YANG, *et al.*, 2015; ÖZER e ÖZER, 2003), o que demonstra a eficácia da levedura modificada como adsorvente, podendo ser aplicada em pequenas quantidades.

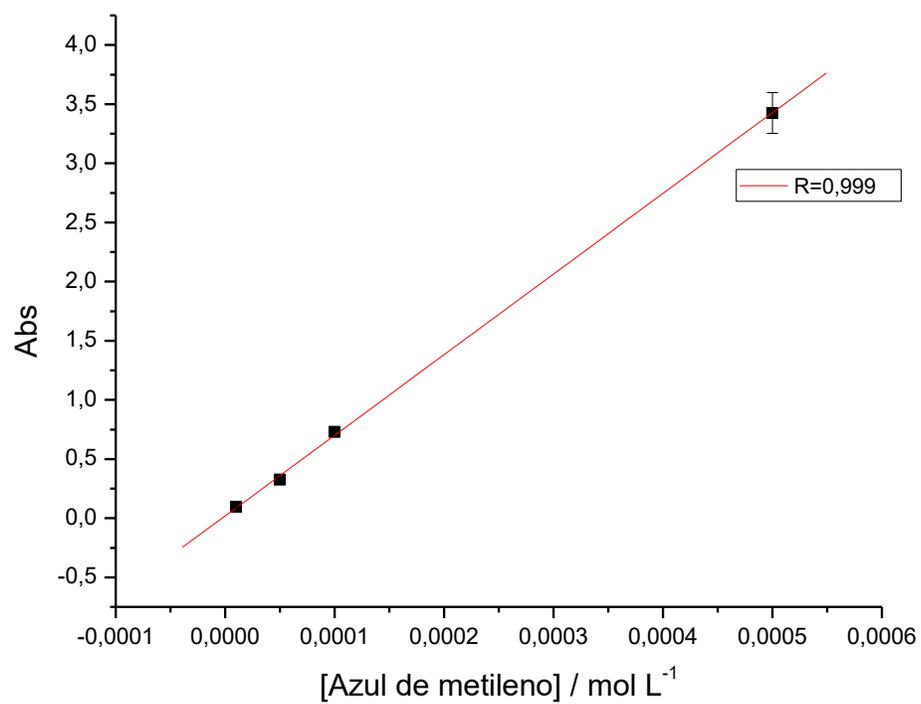
Desta forma, para o novo material adsorvente, LevS, a melhor proporção líquido/adsorvente é de 250 mL g<sup>-1</sup>, em que a sorção é completa (100%) numa solução com 500 ppm de chumbo. A utilização de 500 mL g<sup>-1</sup> foi indicada em concentrações de chumbo inferiores porque, nesta razão, a sorção de chumbo é de 100%.

Para o níquel a razão ideal é de 100 mL g<sup>-1</sup>, com remoção de 78% do metal.

#### **4.4. Adsorção do corante catiônico Azul de metileno por Lev e LevS**

Os materiais Lev e LevS foram modificados com azul de metileno. Este corante foi escolhido por ser eletroativo e pela possibilidade do mesmo, quando adsorvido, funcionar como um mediador de elétrons.

Elaborou-se um estudo prévio sobre a capacidade de adsorção de azul de metileno pelos materiais supramencionados, seguindo procedimento descrito no item 3.2.3.



**Figura 30. Curva de calibração da Absorbância do Azul de metileno ( $\lambda_{\text{max}} = 666\text{nm}$ ).**

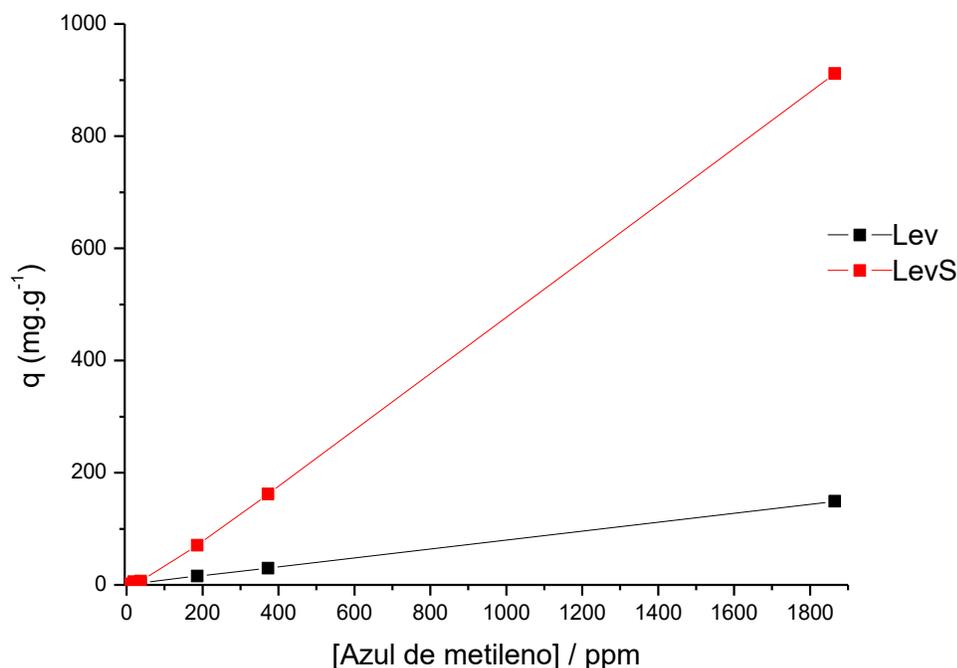


Figura 31. Capacidade de sorção de azul de metileno por Lev e LevS.  $m=0,1g$ ,  $V=50mL$ , Tempo=4 horas.

A curva de calibração do azul de metileno está ilustrada na Figura 30, e para os cálculos da capacidade de sorção empregou-se a Equação 2, descrita no item 3.3.

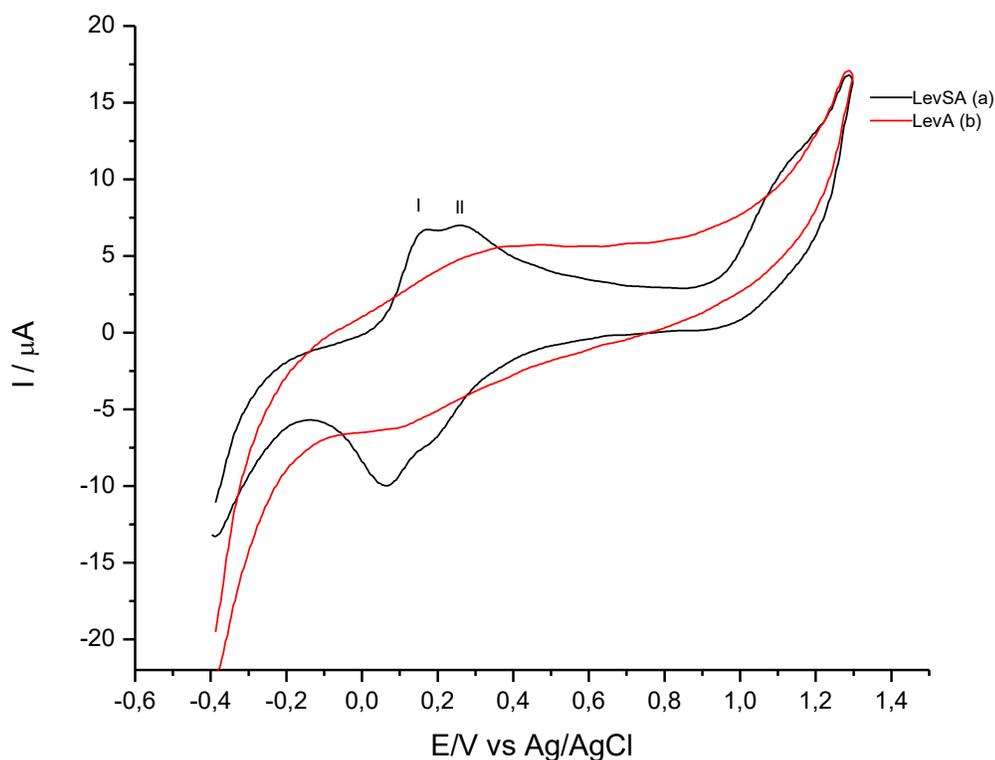
A análise da Figura 31 nos mostra que mesmo em concentrações elevadas de azul de metileno, não foi possível chegar ao ponto de equilíbrio da sorção, sendo que o material híbrido (LevS) tem uma capacidade muito elevada de sorção ( $911 \text{ mg g}^{-1}$ ) em comparação com sua matriz, a Lev ( $149 \text{ mg g}^{-1}$ ).

Desta forma, para os testes eletroquímicos, o material de trabalho foi aquele obtido após a suspensão da Lev e LevS por 4 horas em presença de uma solução de  $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  ( $1870 \text{ ppm}$ ) do corante, originado assim os materiais LevA e LevSA.

#### 4.5. Comportamento Voltamétrico do LevSA

A técnica eletroquímica empregada para estes estudos foi a voltametria cíclica (VC). A Figura 32 (a) ilustra o voltamograma cíclico do eletrodo de pasta de grafite contendo LevSA. O voltamograma cíclico apresentou dois pares redox com potencial médio ( $E^{0'}$ ) de  $0,11$  e  $0,21 \text{ V}$

( $v=20 \text{ mVs}^{-1}$ ; tampão BR  $\text{pH}=2$ ), sendo o primeiro mais bem definido. Esses picos seguem em conformidade com a literatura, onde Karyakin *et al.* (1993) apontaram a existência de dois pares redox no processo de eletropolimerização do azul de metileno, sendo o mais negativo relativo a eletroatividade do monômero do corante, e o segundo referente ao comportamento redox do nitrogênio ligantes existentes entre os monômeros (PIPI, 2010). É importante destacar que o eletrodo de pasta de grafite modificada com o material LevA não apresentou uma boa performance voltamétrica, ou seja, um par redox bem definido (Fig. 32 (b)), o que impediu que o mesmo fosse estudado também.



**Figura 32.** Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de pasta de grafite modificada: (a) com LevSA e com (b) LevA; (10% m/m; Tampão BR;  $\text{pH} 2$ ;  $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$ ).

#### 4.5.1. Influência das diferentes concentrações hidrogeniônicas

Os voltamogramas obtidos em diferentes concentrações hidrogeniônicas ( $\text{pH} 2,0$  a  $7,0$ ) para o eletrodo de pasta de grafite contendo LevSA está ilustrado na Figura 33. Observou-se

através destes voltamogramas que com o aumento do pH, o par redox referente ao pico I se deslocam levemente para potenciais mais negativos e os picos vão se tornando menos pronunciados. Para  $\text{pH} > 5$ , os pares redox dos dois processos são afetados, bloqueando a resposta eletroquímica, pois a eletropolimerização de compostos do grupo das tiazinas é favorecida geralmente por oxidação anódica do monômero em meio ácido (KARYAKIN, STRAKHOVA, *et al.*, 1993).

A Figura 34 apresenta um gráfico onde se tem o potencial médio da pasta de grafite modificada com LevSA em função do pH para o pico I. Observou-se que com o aumento da concentração hidrogeniônica ocorre uma diminuição do potencial médio de 48,6 mV. Neste caso pode-se afirmar que o potencial hidrogeniônico afeta diretamente no processo eletroquímico do LevSA.

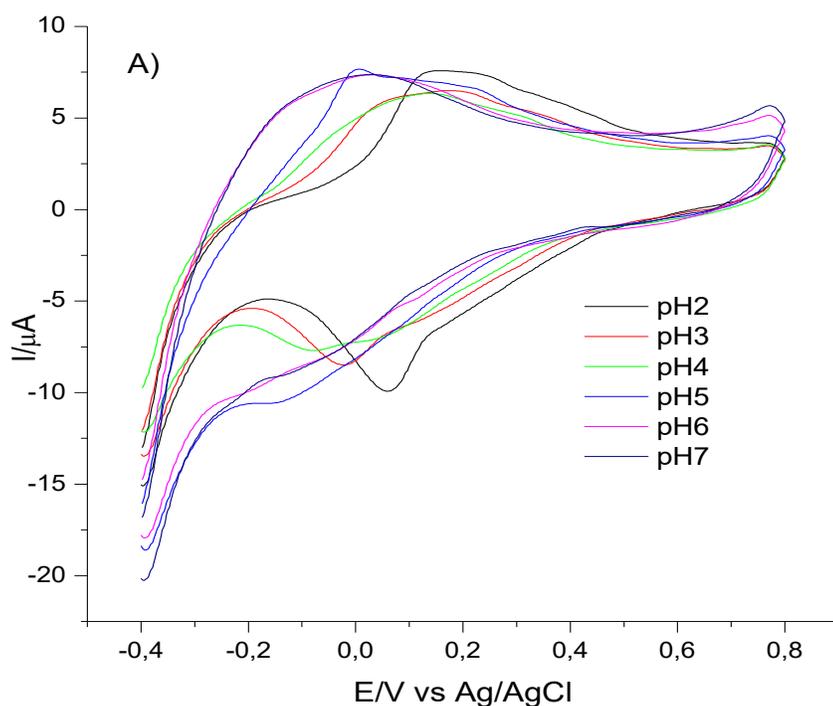
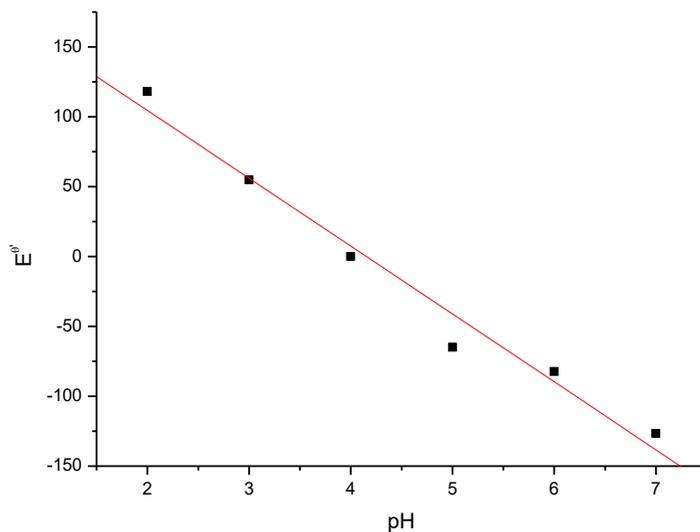


Figura 33. Voltamogramas cíclicos do LevSA em eletrodo de pasta de grafite em solução de tampão BR em diferentes valores de pH. Eletrodo de pasta de grafite (10% m/m; Tampão BR;  $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$ ).



**Figura 34. Influência do pH no potencial médio ( $E^0$ ) de LevSA.**

#### 4.5.2. *Influência da velocidade de varredura*

A Figura 35 ilustra o voltamograma cíclico do eletrodo de pasta de grafite modificada com LevSA em diferentes velocidades de varreduras entre 10 e 100  $\text{mVs}^{-1}$ . Observou-se que com o aumento de velocidade os dois picos se sobrepõem, culminando num só processo. Os valores de potencial formal deslocam-se lentamente para regiões de potenciais anódicos com o aumento da velocidade de varredura. A separação entre os picos anódico e catódico ( $\Delta E_p$ ) nesta faixa de velocidade, variou de 77 a 157 mV em tampão B-R pH 2. Os parâmetros eletroquímicos destes estudos estão listados na Tabela 2.

O gráfico inserido na Figura 35 indica que as intensidades de corrente anódica e catódica foram proporcionais à raiz quadrada da velocidade de varredura na faixa de velocidade estudada (10 a 100  $\text{mV s}^{-1}$ ), indicando um processo controlado por difusão (BARD e FAULKNER, 1980).

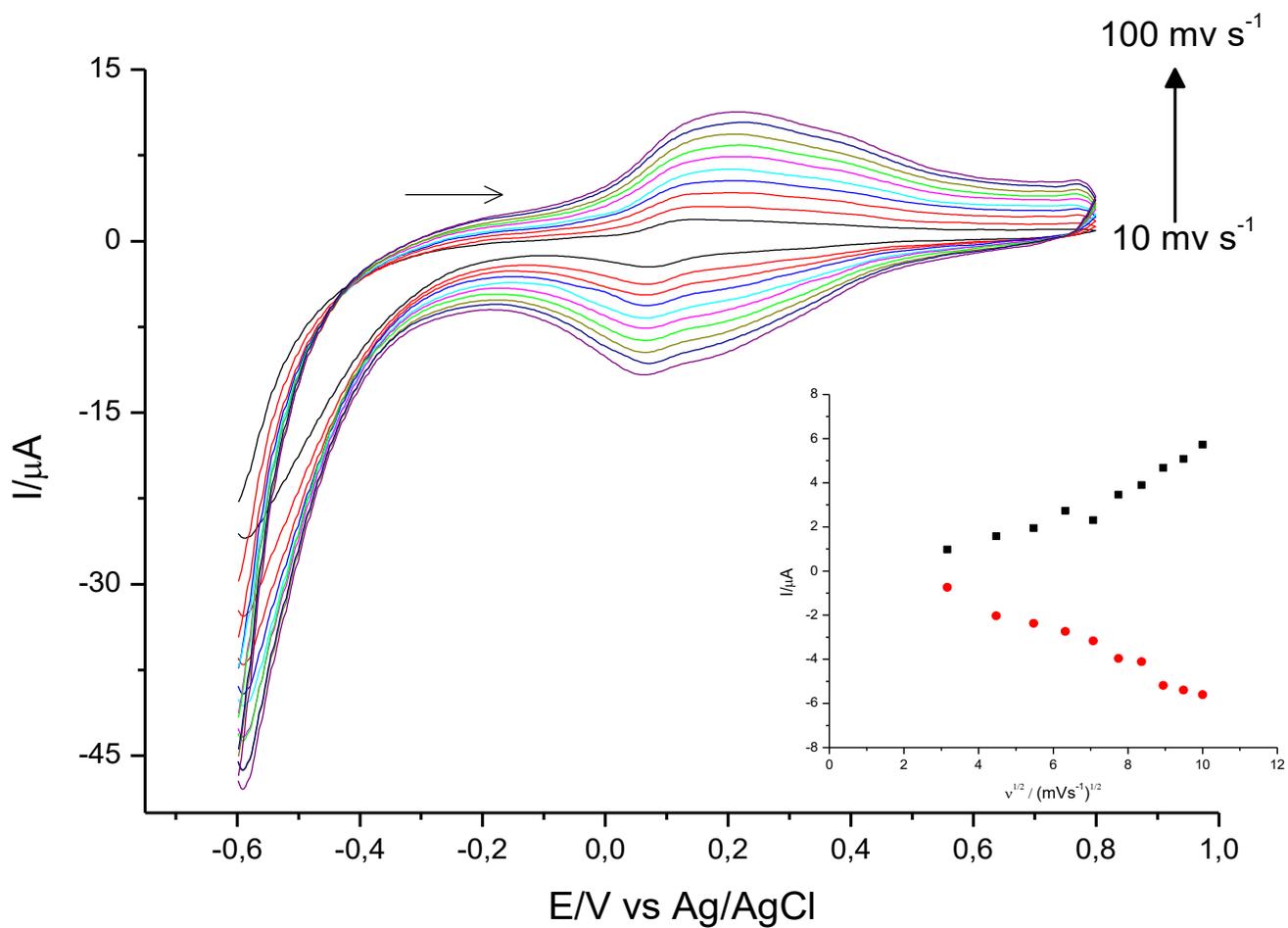


Figura 35. Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de grafite contendo LevSA em diferentes velocidades de varredura (10-100  $\text{mVs}^{-1}$ ); Gráfico inserido: Dependência da intensidade de corrente do pico anódico e catódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura. (10% m/m; Tampão BR pH2)

**Tabela 2. Parâmetros eletroquímicos da pasta de grafite contendo LevSA nas diferentes velocidades de varreduras. (10% m/m; Tampão BR pH2)**

<i>Velocidade de varredura (mV s<sup>-1</sup>)</i>	<i>E<sub>pa</sub> (V)</i>	<i>E<sub>pc</sub> (V)</i>	<i>ΔE<sub>p</sub> (mV)</i>	<i>E<sup>0'</sup> (V)</i>	<i>I<sub>pa</sub> (μA)</i>	<i>I<sub>pc</sub> (μA)</i>	<i> I<sub>pa</sub>/I<sub>pc</sub> </i>
10	0,15	0,076	77	0,11	0,97	-0,74	1,31
20	0,18	0,071	109	0,12	1,58	-2,03	0,78
30	0,21	0,065	143	0,13	1,94	-2,37	0,82
40	0,21	0,067	142	0,14	2,73	-2,74	1,00
50	0,21	0,063	143	0,13	2,3	-3,17	0,73
60	0,21	0,062	150	0,14	3,46	-3,96	0,87
70	0,22	0,064	153	0,14	3,89	-4,11	0,95
80	0,22	0,066	154	0,14	4,68	-5,19	0,90
90	0,22	0,071	154	0,15	5,08	-5,4	0,94
100	0,22	0,062	157	0,14	5,73	-5,61	1,02

## 5. Conclusões

As caracterizações por infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e energia dispersiva de raios-X (EDS), revelaram que o material híbrido foi preparado com sucesso.

O material híbrido, foi aplicado como adsorvente de chumbo (Pb) e níquel (Ni), onde pode-se observar uma elevada capacidade na retenção destes metais, obtendo-se uma capacidade máxima de sorção de  $248 \text{ mg g}^{-1}$  e  $64,6 \text{ mg g}^{-1}$ , respectivamente, e porcentagem de sorção chegando a 100% para 500 ppm de  $\text{Pb}^{2+}$  em 250mL/g de razão líquido/sólido em pH 4, e 77,7% para 100 ppm de  $\text{Ni}^{2+}$  em 100 mL/g de razão líquido/sólido em pH 6.

Com relação aos metais estudados, os testes de toxicidade em fatias de hipocampo de ratos comprovaram que concentrações de 1 e 3  $\mu\text{M}$  (0,2 e 0,6 ppm)  $\text{Pb}^{2+}$  e 10 e 30  $\mu\text{M}$  (0,5 e 1,5 ppm) de  $\text{Ni}^{2+}$ , causam alterações neuronais irreversíveis, mesmo após a remoção completa da solução de metais.

O adsorvente também apresentou uma alta capacidade de adsorção para o corante catiônico azul de metileno e o mesmo pode ser eletroquimicamente estudado empregando a técnica de voltametria cíclica, empregando um eletrodo de pasta de grafite. As análises voltamétricas preliminares sugerem que o eletrodo modificado possui características importantes, que permitem seu possível uso como um biossensor eletroquímico.

De forma conclusiva, o material é altamente promissor, indicado para processo de biossorção de Chumbo e Níquel, ambos em altas concentrações e aplicando-se um baixo tempo de contato. Além disso, apresenta propriedades eletroquímicas e mecanismos de interação ainda pouco explorados a serem estudados posteriormente.

## 6. Referências Bibliográficas

1. ADENIRAN, A.; SHERER, M.; TYO, K. E. J. Yeast-based biosensors: design and applications. **FEMS Yeast Research**, v. 15, p. 1-15, 2015.
2. AMI, D. et al. Fourier transform infrared spectroscopy as a method to study lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 12, p. 1-14, 2014.
3. AMIRNIA, S.; RAY, M. B.; MARGARITIS, A. Heavy metals removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae* in a novel continuous bioreactor–biosorption system. **Chemical Engineering Journal**, v. 264, p. 863-872, 2015.
4. ANGELIS, D. F. **Leveduras**. Primeiro Seminário sobre Microbiologia - Fermentação Etanólica. Rio Claro: [s.n.]. 1987. p. 41-62.
5. BANEY, R. H. et al. Silsesquioxanes. **Chem. Rev.**, v. 95, p. 1409-1430, 1995.
6. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 1980.
7. BARRY, P. S. I. A comparison of concentrations of lead in human tissues. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 32, p. 119-139, 1975.
8. BEACKLEY, M. R. et al. High density array screening to identify the genetic requirements for transition metal tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metallomics**, v. 3, p. 195-205, 2011.
9. BERNE; LEVY. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
10. BHATTACHARYYA, K. G.; SHARMA, A. Kinetics and thermodynamics of Methylene Blue adsorption on Neem (*Azadirachta indica*) leaf powder. **Dyes and Pigments**, v. 65, p. 51-59, 2005.
11. BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**. 1. ed. USA: Lewis Publishers, 2003.
12. BIRNBAUM, L. S.; FENTON, S. E. Cancer and Developmental Exposure to Endocrine Disruptors. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 389-394, 2003.
13. BOURBIGOT, S. et al. Polyhedral oligomeric silsesquioxane as flame retardant for thermoplastic polyurethane. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 94, p. 1230-1237, 2009.
14. BRAGA, M. F. M.; PEREIRA, E. F. R.; ALBUQUERQUE, E. X. Nanomolar concentrations of lead inhibit glutamatergic and GABAergic transmission in hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 826, p. 22-34, 1999.

15. BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações.** Coimbra: Almedina, 1996.
16. CALLAWAY, N. L.; RIHA, P. D.; WRUBEL, K. M.; MCCOLLUM, D.; GONZALEZ-LIMA, F. Methylene blue restores spatial memory retention impaired by an inhibitor of cytochrome oxidase in rats. **Neuroscience Letters**, v. 332, n. 2, p. 83–86, 2002.
17. CALLISTER JR., W. D. **Ciência e Engenharia de materiais: uma introdução.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.
18. CHENG, Y. et al. Biosorption of Pb(II) Ions from Aqueous Solutions by Waste Biomass from Biotrickling Filters: Kinetics, Isotherms, and Thermodynamics. **J. Environ. Eng.**, 2015.
19. CLARKSON, T. W. Metal Toxicity in the central nervous system. **Environmental Health Perspectives**, v. 75, p. 59-64, 1987.
20. COHEN, L. B.; SALZBERG, B. M.; GRINVALD, A. Optical methods for monitoring neuron activity. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 1, p. 171-182, 1978.
21. COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O futuro roubado.** Porto Alegre: L&PM Editores, 2002.
22. CORDES, D. B.; LICKISS, P. D.; RATABOUL, F. Recent Developments in the Chemistry of Cubic Polyhedral Oligosilsesquioxanes. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 4, p. 2081-2173, 2010.
23. CRESPI, F. et al. In vivo autofluorescence spectrofluorometry of central serotonin. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 140, p. 67-73, 2004.
24. CRISP, T. M. . C. E. D. . C. R. L. . E. A. Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. **Environmental Health Perspectives**, p. 106, 1998.
25. DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. **Indian J Med Res**, v. 128, p. 412-425, 2008.
26. DEMAYO, A. et al. Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock. **C R C Critical Reviews in Environmental Control**, v. 12, n. 4, p. 257-305, 1982.
27. DERISIO, J. C. **Introdução ao controle de poluição ambiental.** São Paulo: Oficina de Textos, 2012.
28. DO CARMO, D. R. et al. Preparation, characterization and application of a nanostructured composite: Octakis(cyanopropyl dimethylsiloxy) octasilsesquioxane. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 7, p. 3683-3689, 2007.

29. DO CARMO, D. R. et al. A novel nanostructured composite formed by interaction of copper octa(3-aminopropyl)octasilsesquioxane with azide ligands: preparation, characterization and a voltammetric application. **Mater. Res. Bull.**, v. 45, p. 1263-1270, 2010.
30. DO CARMO, D. R. et al. A silsesquioxane organically modified with 4-amino-5-(4-pyridyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol: Thermal Behavior and its electrochemical detection of sulfhydryl compounds. **Journal of Nanomaterials**, v. 2014, p. 1-11, 2014.
31. DO CARMO, D. R.; PAIM, L. L.; STRADIOTTO, N. R. Ferrocene adsorbed into the porous octakis(hydridodimethylsiloxy)silsesquioxane after thermolysis in tetrahydrofuran media: An applied surface for ascorbic acid determination. **Materials Research Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 1028-1033, 2012.
32. DRAKE, L. R.; RAYSON, G. D. Plant-derived materials for metal ion-selective binding and preconcentration. **Analytical Chemistry News and Feat**, v. 1, p. 22-27, 1996.
33. DUCHEN, M. R.; SURIN, A.; JACOBSON, J. Imaging mitochondrial function in intact cells. **Methods Enzymology**, v. 361, p. 353-389, 2003.
34. EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blucher, 1972.
35. FEHER, F. J. et al. Syntheses of highly functionalized cube-octameric polyhedral oligosilsesquioxanes (R<sub>8</sub>Si<sub>8</sub>O<sub>12</sub>). **Journal of the Chemical Society Dalton Transactions**, v. 2, p. 1491-1497, 1999.
36. FEHER, F.; WYNDHAM, K. D. Amine and ester-substituted silsesquioxane: synthesis, characterization and use as a core for starburst dendrimers. **Chemical Communications**, v. 3, p. 2323-2324, 1998.
37. FELLEBERG, G. **Introdução aos problemas da poluição ambiental**. São Paulo: EPU - Springer - EDUSP, 1980.
38. FERNANDES, D. S. et al. Reactivity of a Silsesquioxane Organofunctionalized with 4-Amino-5-Phenyl-4H-[1,2,4]-Triazole-3-thiol: Complementary Characterization and an Application to Chronoamperometric Detection of L-Dopamine. **Silicon**, p. 1-12, 2018.
39. FLEISHMAN, E. et al. Top 40 Priorities for Science to Inform US Conservation and Management Policy. **BioScience**, v. 61, p. 290-300, 2011.
40. GINIMUGE, P. R.; JYOTHI, S. D. Methylene blue: revisited. **J AnaesthesiolClinPharmacol.**, v. 26, n. 4, p. 517-20, 2010.
41. GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, p. 546-567, 1996.

42. GORJI, A. et al. NiCl<sub>2</sub> and amiloride induce spreading depression in guinea pig hippocampal slices. **Cephalalgia**, v. 20, p. 740-747, 2000.
43. GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: Wiley, 1993.
44. GOYER, R. A. Toxic effects of metals. In: AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons**. 4. ed. New York: Pergamon Press, 1991. p. 623-680.
45. GRANDJEAN, P. Regional distribution of Lead in human brains. **Toxicology Letters**, v. 2, p. 65-69, 1978.
46. GUTHRIE, C.; FINK, G. R. **Guide to yeast genetics and molecular and cell biology**. San Diego: Elsevier Academic Press., 2004. 350-B p.
47. HAN, R. et al. Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast. **Journal of Hazardous Materials**, v. B137, p. 1569-1576, 2006.
48. HERNBERG, S. Lead Poisoning in a Historical Perspective. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 38, p. 244-254, 2000.
49. ISKANDAR, N. L.; ZAINUDIN, N. A. I. M.; TAN, S. G. Tolerance and biosorption of copper (Cu) and lead (Pb) by filamentous fungi isolated from a freshwater ecosystem, v. 23, n. 5, p. 824-830, 2011.
50. JARQUE, S. et al. Yeast Biosensors for Detection of Environmental Pollutants: Current State and Limitations. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 408-419, 2016.
51. JENABIAN, S. M.; PEDERSEN, L. L.; JESPERSEN, L. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. **Nutrients**, v. 2, p. 449-473, 2010.
52. KANESHIRO, T. L.; WANG, X.; LU, Z. R. Synthesis, characterization, and gene delivery of poly-L-lysine octa(3-aminopropyl)silsesquioxane dendrimers: nanoglobular drug carriers with precisely defined molecular architectures. **Mol. Pharm.**, v. 4, p. 759-768, 2007.
53. KANNAN, R. Y. et al. Polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposites: the next generation material for biomedical applications. **Acc. Chem. Res.**, v. 38, p. 879-884, 2005.
54. KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Biores. Technol.**, v. 53, p. 195-206, 1995.

55. KARN, B.; KUIKEN, T.; OTTO, M. Nanotechnology and in situ remediation: a review of benefits and potential risks. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, p. 1823-1831, 2009.
56. KARYAKIN, A. A. et al. The electrochemical polymerization of methylene blue and bioelectrochemical activity of the resulting film. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 32, p. 35-43, 1993.
57. KICKELBICK, G. Silsesquioxanes. **Structure and Bonding**, v. 155, p. 1-28, 2013.
58. KORDIALIK-BOGACKA, E. Surface properties of yeast cells during heavy metal biosorption. **Central European Journal of Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 348-351, 2011.
59. KUMAR, A. et al. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management tool. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES**, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.
60. LAAKSO, M. P. et al. Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: An MRI study. **Neurology**, v. 46, n. 3, p. 678-681, 1996.
61. LABUTO, G. et al. Metals uptake by live yeast and heat-modified yeast residue. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 3, p. 510-519, 2015.
62. LIM, S.-K. et al. Thermodynamic interaction and mechanical characteristics of Nylon 6 and polyhedral oligomeric silsesquioxane nanohybrids. **J Mater Sci**, v. 47, p. 308-314, 2012.
63. LONGHINOTTI, E. et al. Adsorção de Azul de Metileno e Croconato amarelo pelo biopolímero quitina. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 221-224, 1996.
64. LUCHO, A. M. S.; PISSETTI, F. L.; GUSHIKEM, Y. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-coated 3-N-propylpyridinium chloride silsesquioxane polymer film; preparation and electrochemical property study of adsorbed cobalt tetrasulfophthalocyanine. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 275, p. 251-256, 2004.
65. MAGOSSI, M. S. **Preparação e modificação química de nanoestruturas de octa(aminopropil)silsesquioxano para aplicações analíticas**. Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira. 2015.
66. MAHAN, B. M.; MYERS, R. J. **Química: um curso universitário**. São Paulo: Edgard Blucher, 1995.

67. MATA, K. M. H. et al. Metallic Biosorption Using Yeasts in Continuous Systems. **International Journal of Photoenergy**, p. 1- 4, 2013.
68. MEHL, G. H.; GOODBY, J. W. Liquid-crystalline, substituted octakis-(dimethylsiloxy)octasilsesquioxanes, oligomeric supermolecular materials with defined topology. **Angw. Chem.**, v. 35, p. 2641-2643, 1996.
69. MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Cranofacial Research**, v. 6, p. 153-159, 2016.
70. MERIAN, E. Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt beryllium, arsenic, cadmium and selenium, and their derivatives. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 9-38, 1984.
71. MONICI, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. **Biotechnology Annual Review**, v. 11, p. 227-256, 2005.
72. MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Rev Panam Salud Publica**, v. 15, n. 2, p. 119-129, 2004.
73. MUÑOZ, A. J. et al. Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters: Identification and evaluation of its potential for biosorption. **Chemical Engineering Journal**, v. 210, p. 325-332, 2012.
74. NEAL, A. P.; GUILARTE, T. R. Mechanisms of Heavy Metal Neurotoxicity: Lead and Manganese. **Drug Metabolism & Toxicology**, v. 85, p. 1-13, 2012.
75. OLIVEIRA, P. S.; SILVA, W. L. L.; VIANA, R. R. Evaluation of the capacity of adsorption of methylene blue die in aqueous solutions in natural kaolinite and intercalated with potassium acetate. **Cerâmica**, v. 59, p. 338-344, 2013.
76. OLYMPIO, K. P. K. et al. Neurotoxicity and aggressiveness triggered by low-level lead in children. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 29, n. 3, 2009.
77. OSKARSSON, A.; TJALVE, H. The distribution and metabolism of nickel carbonyl in mice. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 36, p. 326-335, 1979.
78. OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 34-50, 2000.
79. ÖZER, A.; ÖZER, D. Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. **Journal of Hazardous Materials**, v. B100, p. 219–229, 2003.
80. PADMAVATHY, V.; VASUDEVAN, P.; DHINGRA, S. C. Biosorption of nickel(II) ions on Baker's yeast. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1389-1395, 2003.

81. PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
82. PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, v. I, 1980.
83. PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. D. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.
84. PIPI, A. R. F. **Propriedades analíticas de materiais a base de sílica e óxido de titânio modificados**. Ilha Solteira, p. 110. 2010.
85. PROVATAS, A. et al. Silsesquioxanes: Part I: A key intermediate in the building of molecular composite materials. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 565, p. 159-164, 1998.
86. QUADRELLI, E. A.; BASSET, J.-M. On silsesquioxanes accuracy as molecular models for silica-grafted complexes in heterogeneous catalysis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 707-728, 2010.
87. SADIQ, S. et al. Metal Toxicity at the Synapse: Presynaptic, Postsynaptic, and Long-Term Effects. **Journal of Toxicology**, p. 1-42, 2012.
88. SCHNAAS, L. et al. Reduced Intellectual Development in Children with Prenatal Lead Exposure. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 5, p. 791-797, 2006.
89. SCOTTI, R. et al. Azul de metileno imobilizado na celulose/TiO<sub>2</sub> e SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>: propriedades eletroquímicas e planejamento fatorial. **Quim. Nova**, v. 29, p. 208-212, 2006.
90. SHUTTLEWORTH, C. W. Use of NAD(P)H and Flavoprotein Autofluorescence transients to probe neuron and astrocyte responses to synaptic activation. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 379-386, 2010.
91. SILVEIRA, T. F. S. D. et al. Voltammetric Study of a Cubic Silsesquioxane Organically Modified with Imidazole and their Subsequent Reaction with Cadmium and Hexacyanoferrate (III). **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 8, p. 872-886, 2013.
92. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
93. SOARES, L. A. et al. Use of a Silsesquioxane Organically Modified with 4-amino-5-(4-pyridyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (APTT) for Adsorption of Metal Ions. **International Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 39-48, 2013.

94. SOH, M. S.; YAP, A. U. J.; SELLINGER, A. Methacrylate and epoxy functionalized nanocomposites based on silsesquioxane cores for use in dental applications. **Eur. Polym. J.**, v. 43, p. 315-327, 2007.
95. TONG, S.; VON SCHIRNDING, Y. E.; PRAPAMONTOL, T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 9, p. 1068-1077, 2000.
96. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005.
97. TRAMA, B. et al. The Evaluation of Bioremediation Potential of a Yeast Collection Isolated from Composting. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 796-807, 2014.
98. TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Recursos Hídricos no Século XXI**. São Paulo: Oficina de Textos, 2011.
99. VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.
100. VOLESKY, B. **Sorption and Biosorption**. Montreal: BV Sorbex, 2003. 97-100 p.
101. VORONKOV, M. G.; LAVRENT'YEV, V. I. Polyhedral Oligosilsesquioxanes and Their Homo Derivatives. **Top. Curr. Chem**, v. 102, p. 199-236, 1982.
102. WADA, K. et al. Preparation of porous ruthenium catalysts utilizing a silsesquioxane ligand; catalytic activity towards hydroformylation of 1-octene. **Appl. Catal. A:Gen.**, v. 356, p. 72-79, 2009.
103. WANG, J. L. . C. C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 427-451, 2006.
104. WANG, J. L. . C. C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 195-226, 2009.
105. WU, Y.; WEN, Y.; ZHOU, J. . E. A. The characteristics of waste *Saccharomyces cerevisiae* biosorption of arsenic(III). **Environ. Sci. Pollut. Res. Int.**, v. 19, p. 3371-3379, 2012.
106. XIONG, L. et al. Adsorption behavior of methylene blue onto titanate nanotubes. **Chemical Engineering London**, v. 156, n. 2, p. 313-320, 2010.
107. YEGANEHA, M. et al. Mapping of human health risks arising from soil nickel and mercury contamination. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244-245, p. 225-239, 2012.
108. YIN, S.-T. et al. Effects of Epigallocatechin-3-gallate on lead-induced oxidative damage. **Toxicology**, v. 249, n. 1, p. 45-54, 2008.

109. ZHANG, Y. et al. Biosorption of Pb<sup>2+</sup> by *Saccharomyces cerevisiae* in static and dynamic adsorption tests. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 83, p. 708-712, 2009.
110. ZHOU, H.; YE, Q.; XU, J. Polyhedral oligomeric silsesquioxane-based hybrid materials and their applications. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 1, p. 212-230, 2017.