

Mateus Mário Montibeller

**REMOÇÃO DE FENOL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS  
UTILIZANDO MÉTODO DE POLIMERIZAÇÃO E  
PRECIPITAÇÃO COM ENZIMA HORSERADISH  
PEROXIDASE (HRP)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Selene M. A. Guelli Ulson de Souza

Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares

Florianópolis  
2012

Montibeller, Mateus Mário

Remoção de fenol de águas residuárias utilizando método de polimerização e precipitação com enzima Horseradish peroxidase (HRP) [dissertação] / Mateus Mário Montibeller ; orientadora, Selene Maria Arruda Guelli Ulson de Souza ; co-orientador, Carlos Henrique Lemos Soares . - Florianópolis, SC, 2012.  
141 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Tratamento enzimático. 3. Poluentes aromáticos. 4. Fenol. I. Souza , Selene Maria Arruda Guelli Ulson de. II. Soares , Carlos Henrique Lemos. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Mateus Mário Montibeller

**REMOÇÃO DE FENOL DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS  
UTILIZANDO MÉTODO DE POLIMERIZAÇÃO E  
PRECIPITAÇÃO COM ENZIMA HORSERADISH  
PEROXIDASE (HRP)**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de junho de 2012.

---

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Selene M. A. Guelli Ulson de Souza  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares  
Coorientador



Este trabalho é dedicado a todos os meus amigos, colegas, entes queridos e principalmente aos meus pais.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e acima de tudo a Deus, pela vida e saúde que me foram dados e que foram essenciais para a conclusão deste trabalho acadêmico.

Ao Programa de Pós-graduação, CPGENQ, da UFSC.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, que foi fundamental para garantir o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, em especial à orientadora Selene M. A. Guelli Ulson de Souza e coorientadores Antônio Augusto Ulson de Souza e Carlos Henrique Lemos Soares, por terem me apoiado, pelos ensinamentos adquiridos, pela forma com a qual me orientaram e pelo carinho com o qual fui sempre tratado.

Aos meus pais: Neuri Jônatas Montibeller e Maria Elena Ruberti Montibeller, pelo esforço, dedicação, e apoio que me deram desde o início do mestrado até agora, para a conclusão de mais uma fase da minha vida.

Aos meus primos, que me incentivaram desde o início e me ajudaram a ter forças para passar por mais esta fase.

À Elaine Vosniak Takeshita, que desde o início me ajudou com seus fundamentos e aprendizagem os quais foram essenciais para a elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos, e a todos os colegas de sala de aula que sempre estiveram ao meu lado desde o início na faculdade nas piores e nas melhores situações.

E finalmente agradeço a todos que se envolveram e me ajudaram para que fosse realizado mais este trabalho acadêmico.



“Não existem saberes maiores nem saberes menores, somente saberes diferentes”.

Érico Veríssimo



## RESUMO

Poluentes aromáticos estão presentes em efluentes de diversos tipos de indústrias. Muitos destes poluentes são altamente tóxicos e carcinogênicos, motivando a realização de estudos visando viabilizar processos para a remoção dos mesmos. Uma das alternativas utilizadas na remoção de poluentes aromáticos é o emprego de reações enzimáticas. A reação enzimática tem-se mostrado eficaz, além de possuir vantagens em relação aos demais processos utilizados. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar a eficiência de remoção do fenol através de reação de polimerização e precipitação utilizando a enzima *Horseradish peroxidase* (HRP). Os reatores biológicos foram conduzidos em batelada, utilizando concentrações de fenol compreendidas entre 0,5 mM e 4 mM (47 mg/L a 376 mg/L) em pH 7,4 e temperatura ambiente de 25 °C, condições ótimas para reação de polimerização e simulação das condições nas quais se encontram os efluentes nas indústrias. O efluente sintético foi elaborado a partir de fenol sólido (> 99%) e as concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas nas reações foram 50% em excesso em relação às concentrações iniciais de fenol (1:1,5). O tempo de retenção utilizado foi de 3 horas, que foi suficiente para garantir o final da reação.

Em todos os experimentos conduzidos nas diferentes concentrações de fenol foi possível obter uma remoção igual ou superior a 90%. Além de avaliar a eficiência de remoção foi proposto um modelo matemático, construído a partir da interpolação linear e polinomial dos dados experimentais obtidos, para uma faixa de remoção compreendida de 30% a 90%. Ambas as interpolações demonstraram-se efetivas na representação dos dados experimentais. Um estudo cinético, o qual avaliou o decaimento da atividade enzimática com o tempo, demonstrou o efeito da concentração inicial de fenol na desativação da enzima HRP. A dosagem de proteína efetuada na mistura de reação após o término da reação comprovou que cerca de 90% da massa da enzima foram adsorvidas pelo precipitado. Testes de toxicidade utilizando alga *Scenedesmus subspicatus* foram efetuados no produto sobrenadante da reação. Os experimentos evidenciaram que a toxicidade dos produtos contidos na mistura de reação é pequena e que continua a diminuir com o passar o tempo após a reação finalizada, indicando juntamente com os demais resultados, a viabilidade do emprego da enzima HRP num processo de polimento para a remoção do fenol em águas residuárias.

**Palavras-chave:** Enzima, Fenol, *Horseradish peroxidase* (HRP), poluentes aromáticos, toxicidade.



## ABSTRACT

Aromatic pollutants are present in different types of effluents of industries. Many of these pollutants are highly toxic and carcinogenic and for these reasons studies are being conducted to enable these processes to remove pollutants. One of alternatives in the removal of aromatic pollutants is the application of enzymatic reactions. The enzymatic reaction has been shown to be effective, and has advantages over other procedures used. This work aimed to evaluate the efficiency of phenol removal through the polymerization reaction and precipitation using the enzyme Horseradish peroxidase (HRP). The biological reactors were conducted in batch using phenol concentrations between 0.5 mM and 4 mM (47 mg/L to 376 mg/L) at pH 7.4 and ambient temperature of 25°C, optimum conditions for the polymerization reaction and simulation of the conditions under which the effluents are in the industry. The effluent was elaborate in the laboratory using pure phenol (> 99%) and the concentrations of hydrogen peroxide used in the reactions were 50% in excess (1:1.5) about the stoichiometry of the reaction. The retention time used was 3 hours, which was sufficient to ensure the end of reaction.

In all the experiments conducted at different concentrations of phenol it was possible to achieve removal equal to or greater than 90%. In addition to evaluating the removal efficiency it has been proposed a mathematical model from the linear and polynomial interpolations of the experimental data obtained for a range of removal comprised of 30% to 90%. Both interpolations showed to be effective in representing the experimental data. A kinetic study which evaluated the decrease in enzymatic activity over time, demonstrated the effect of the initial concentration of phenol in the deactivation of the enzyme horseradish peroxidase. The protein level in the reaction mixture after the reaction showed that about 90% of enzyme mass was adsorbed by the precipitated. Toxicity tests using algae *Scenedesmus subspicatus* were conducted in the supernatant of the reaction. The experiments revealed that the toxicity of the products contained in reaction mixture is small and continues to decrease over time after the reaction finished, indicating the viability of the enzyme HRP in a polishing process for the phenol removal from wastewater.

**Keywords:** Enzyme, Phenol, Horseradish peroxidase (HRP), Aromatic pollutants, toxicity.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma das classes de tratamento de efluentes. ....	33
Figura 2 – Reações entre o ozônio e os compostos orgânicos presentes na água. ....	35
Figura 3 – Representação esquemática do aminoácido. ....	50
Figura 4 - Diagrama energético de reação catalisada e de reação não catalisada. ....	56
Figura 5 – Esquema demonstrando hipótese do modelo chave-fechadura desenvolvido por Fischer. ....	59
Figura 6 – Esquema demonstrando hipótese do modelo de ajuste induzido desenvolvido por Koshland. ....	59
Figura 7 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima. ....	61
Figura 8 – Efeito da concentração inicial de enzima $[E_0]$ na velocidade máxima $V_{máx}$ . ....	63
Figura 9 – Ilustração da raiz forte, fonte da enzima Horseradish peroxidase. ....	67
Figura 10 – Representação da estrutura física tridimensional cristalina da HRP. ....	68
Figura 11 – Representação estrutural do grupo prostético heme da enzima HRP. ....	69
Figura 12 - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e as diferentes formas possíveis de inativação da HRP. ....	71
Figura 13 – Esquema demonstrando reações catalisadas pela enzima peroxidase. ....	72
Figura 14 – Esquema demonstrando como foram conduzidas as reações enzimáticas para remoção do fenol. ....	77
Figura 15 – Reação utilizando AAP para determinação da atividade enzimática da HRP. ....	78
Figura 16 – Reação utilizando ABTS para determinação da atividade enzimática da HRP. ....	79
Figura 17 – Teste de toxicidade efetuado com <i>Scenedesmus subspicatus</i> para as misturas de reação enzimática do fenol. ....	82
Figura 18 – Medidor de pH Quimis. ....	82
Figura 19 – Espectrofotômetro Shimadzu UV mini – 1240. ....	83
Figura 20 – Espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR – S100. ....	84
Figura 21 – Evolução da PPCE ao longo do tempo. $[FOH]_0 = 4 \text{ mM}$ , $[H_2O_2] = 6 \text{ mM}$ , $E_0 = 9,248 \text{ U/mL}$ , pH 7,4 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . ....	87

Figura 22 – Espectro de Infravermelho do precipitado obtido através da PPCE.....	90
Figura 23 – Eficiência catalítica da enzima HRP ( <i>Turnover</i> ) versus atividade enzimática, em diferentes concentrações iniciais de fenol a pH 7,4 e 25 °C .....	92
Figura 24 – Concentração de Fenol residual após 3 h de reação obtidas para cada atividade enzimática, em diferentes concentrações iniciais de fenol a pH 7,4 e 25 °C.....	93
Figura 25 – Gráfico com interpolação linear dos dados experimentais obtidos.....	95
Figura 26 – Gráfico com interpolação polinomial cúbica dos dados experimentais obtidos. ....	95
Figura 27 – Gráfico obtido pela interpolação linear demonstrando relação entre concentração inicial de fenol e atividade enzimática para cada grau de conversão. ....	96
Figura 28 – Gráfico obtido pela interpolação polinomial cúbica demonstrando relação entre concentração inicial de fenol e atividade enzimática para cada grau de conversão. ....	97
Figura 29 – Correlação do coeficiente de atividade enzimática com o grau de conversão de fenol utilizando interpolação linear.....	98
Figura 30 – Correlação log-log do coeficiente de atividade enzimática com o grau de conversão de fenol utilizando interpolação polinomial cúbica. ....	99
Figura 31 – Sobreposição do modelo matemático obtido através da interpolação linear nos dados experimentais. $a = 1,665 U_{AAP}/(mL mM)$ e $b = 1$ . ....	101
Figura 32 – Sobreposição do modelo matemático obtido através da interpolação polinomial cúbica nos dados experimentais. $a = 1,722 U_{AAP}/(mL mM)$ e $b = 1,131$ . ....	101
Figura 33 – Sobreposição do modelo matemático de <i>Turnover</i> obtido através da interpolação polinomial cúbica nos dados experimentais. $a = 1,665 U_{AAP}/(mL mM)$ e $b = 1$ . ....	104
Figura 34 – Sobreposição do modelo matemático de <i>Turnover</i> obtido através da interpolação polinomial cúbica nos dados experimentais. $a = 1,722 U_{AAP}/(mL mM)$ e $b = 1,131$ . ....	104
Figura 35 – Pontos experimentais e sobreposição do modelo matemático de decaimento de primeira ordem para cada concentração inicial de fenol. ....	108
Figura 36 – Taxa de crescimento da alga <i>Scenedesmus subspicatus</i> nos diferentes meios avaliados: Controle, Efluente sem tratamento e	

produtos contidos na mistura de reação 3,6 e 24 h após término da PPCE. ....	113
Figura 37 – Teste de toxicidade com alga <i>Scenedesmus subspicatus</i> , 3 horas após término da reação enzimática. ....	115
Figura 38 – Espectro de varredura de comprimento de onda no intervalo de radiação UV realizada nas amostras dos diferentes meios utilizados: Controle, Efluente e Reação após 3,6 e 24 h. ....	116



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Processos de tratamento de efluentes líquidos.....	30
Tabela 2 – Compostos tóxicos normalmente encontrados nos despejos das refinarias de petróleo.....	31
Tabela 3 – Potencial de oxidação de diferentes substâncias oxidantes .	34
Tabela 4 – Enzimas e suas aplicações no tratamento de resíduos.....	45
Tabela 5 – Propriedades da enzima Horseradish Peroxidase .....	75
Tabela 6 – Valores de conversão obtidos após 3 horas de reação para cada atividade enzimática em cada uma das concentrações iniciais [FOH] <sub>0</sub> analisadas. ....	94
Tabela 7 – Coeficientes de atividade enzimática obtidos a partir do ajuste de curva dos dados oriundos das regressões linear e polinomial cúbica. ....	97
Tabela 8 – Valores de <i>Turnover</i> experimentais obtidos para cada atividade enzimática em cada uma das concentrações iniciais [FOH] <sub>0</sub> analisadas. ....	103
Tabela 9 – Valores da atividade enzimática mínima necessária para se alcançar o grau de conversão de 0,9 obtidos experimentalmente e através do modelo matemático. ....	106
Tabela 10 – Valores das constantes E <sub>0</sub> e k <sub>d</sub> com seus respectivos desvios padrão e coeficiente de correlação (R <sup>2</sup> ) obtidos pelo modelo de decaimento de primeira ordem. ....	108
Tabela 11 – Valores do tempo de meia vida calculados para cada concentração inicial de fenol.....	109
Tabela 12 – Valores de atividade enzimática, massa dos reagentes e produtos envolvidos na PPCE, medidos no início e após o término da reação. ....	111
Tabela 13 – Taxas de crescimento obtidas através do teste de toxicidade realizado com alga <i>Scenedesmus subspicatus</i> na mistura de reação 3 horas pós-reação de PPCE.....	114
Tabela 14 – Concentração de fenol na mistura de reação 3, 6 e 24 horas após término da PPCE.....	116



## SIMBOLOGIA E NOMENCLATURA

$a$  – Constante da regressão

ABTS -ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)

AAP-4-aminoantipirina

Asp – Aspartato

$b$  – Constante da regressão

$C$  = Coeficiente de atividade enzimática

$C_a$  = Constante que relaciona concentração enzimática com a atividade da enzima

$C_{ee}$  – Concentração de extrato enzimático na solução

$C_{pro}$  – Concentração de proteína na solução

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

EPA -Environmental Protection Agency ou Agência de Proteção Ambiental

$E_a$  – Energia de Ativação

EC: Enzyme commission ou Comissão de Enzimas

$E$ : Atividade enzimática relativa

$E_0$  = Atividade enzimática

$D_a$ : Unidade de massa atômica Dalton, equivalente à massa de um átomo de H

$\Delta G^0$  = Energia livre de formação padrão

$\Delta G^+$  = Energia livre de ativação

DQO – Demanda Química de Oxigênio

FATMA – Fundação do Meio Ambiente

$[\text{FOH}]_0$  = Concentração inicial de fenol

$[\text{FOH}]$  = Concentração residual de fenol

Hist - Histidina

HRP – Peroxidase de Raíz Forte ou Horseradish Peroxidase

IUB – Internacional Unión of Biochemistry ou União Internacional de Bioquímica

IR – Infrared ou Infravermelho

$k_d$  – Constante de decaimento

$K_m$  – Constante de Michaelis-Menten

UE – União Europeia

PEG - Polietilenoglicol

POA - Processos Oxidativos Avançados

PPCE - Polimerização e Precipitação por Catálise Enzimática

RZ - Reihetszahl

$[\text{S}]$  = Concentração de substrato

TP – Teor de proteína

$T_u$  = Número de *Turnover*

$U$  = Unidade de atividade enzimática

$U_{AAP}$  = Unidade de atividade de HRP medida por meio do ensaio com fenol e 4-aminoantipirina

$U_{ABTS}$  = Unidade de atividade de HRP medida por meio do ensaio com ABTS

$V_0$  = Velocidade inicial

$V_{m\acute{a}x}$  = Velocidade Maxima

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>25</b>
1.1	OBJETIVOS .....	27
1.1.1	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>27</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>29</b>
2.1	EFLUENTES PRESENTES NA INDÚSTRIA PETROQUÍMICA .....	29
2.2	LEIS E REGULAMENTOS PARA DESCARTE DE EFLUENTES .....	31
2.3	PROCESSOS DE REMOÇÃO DE FENOL.....	32
2.3.1	<b>Remoção de fenol por oxidação química.....</b>	<b>33</b>
2.3.2	<b>Remoção de fenol por adsorção .....</b>	<b>38</b>
2.3.3	<b>Remoção de fenol por processos biológicos.....</b>	<b>39</b>
2.3.4	<b>Remoção de fenol por processo enzimático.....</b>	<b>43</b>
2.4	ENZIMOLOGIA APLICADA AOS PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO .....	50
2.4.1	<b>Classificação das enzimas .....</b>	<b>52</b>
2.4.1.1	Classe 1 – Oxidorredutases .....	52
2.4.1.2	Classe 2 – Transferases .....	53
2.4.1.3	Classe 3 – Hidrolase.....	53
2.4.1.4	Classe 4 – Liases.....	54
2.4.1.5	Classe 5 – Isomerase .....	54
2.4.1.6	Classe 6 – Ligases.....	55
2.4.2	<b>Reações catalisadas por enzimas.....</b>	<b>55</b>
2.4.3	<b>Mecanismo e modelos de reação entre enzimas e substrato .....</b>	<b>58</b>
2.4.4	<b>Cinética aplicada às reações enzimáticas .....</b>	<b>60</b>
2.4.5	<b>Influência do pH na ação enzimática.....</b>	<b>63</b>
2.4.6	<b>Influência da temperatura na ação enzimática .....</b>	<b>64</b>
2.4.7	<b>Atividade enzimática .....</b>	<b>64</b>
2.4.8	<b>Peroxidase de raiz-forte (HRP).....</b>	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
3.1	LOCALIZAÇÃO .....	75
3.2	MATERIAIS.....	75
3.3	MÉTODOS .....	76
3.3.1	<b>Degradação de fenol através da precipitação e polimerização por catálise enzimática .....</b>	<b>76</b>
3.3.2	<b>Determinação da atividade da enzima HRP .....</b>	<b>77</b>
3.3.3	<b>Determinação do teor de proteínas da enzima HRP .....</b>	<b>79</b>
3.3.4	<b>Determinação da concentração de fenol.....</b>	<b>80</b>
3.3.5	<b>Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio.....</b>	<b>80</b>
3.3.6	<b>Cálculo do número de <i>Turnovers</i> .....</b>	<b>80</b>
3.3.7	<b>Cálculo do grau de conversão .....</b>	<b>81</b>
3.3.8	<b>Toxicidade do Fenol com alga <i>Scenedesmus subspicatus</i> .....</b>	<b>81</b>
3.3.9	<b>Determinação do pH.....</b>	<b>82</b>
3.3.10	<b>Leitura das absorvâncias e transmitâncias.....</b>	<b>83</b>

<b>3.3.11</b>	<b>Análise de infravermelho .....</b>	<b>83</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
4.1	CARACTERÍSTICA DA REAÇÃO DE PPCE E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO .....	86
4.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS NA REAÇÃO DA PPCE.....	90
4.3	DESENVOLVIMENTO DO MODELO MATEMÁTICO PARA REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE PPCE .....	98
4.4	FATORES ENVOLVIDOS NA PERDA DE ATIVIDADE CATALÍTICA DA HRP NA REAÇÃO DE PPCE .....	106
4.5	ANÁLISE DE TOXICIDADE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO ....	112
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>121</b>
	<b>ANEXO A .....</b>	<b>129</b>
	<b>ANEXO B .....</b>	<b>132</b>
	<b>ANEXO C .....</b>	<b>140</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e a expansão das atividades industriais em diversos setores ocorridos nas últimas décadas levaram a um grande aumento na geração de resíduos e produtos nocivos para o meio ambiente. A necessidade por buscas de processos para eliminação e/ou reaproveitamento destes resíduos tem levado os pesquisadores a procurarem novas alternativas visando com isto ocasionar um menor impacto ambiental, seja em termos de poluição ou em termos de remoção de matéria prima.

O problema da poluição ambiental é de nível mundial. Teve origem na revolução industrial, intensificando-se com a explosão demográfica e pelo método socioeconômico e cultural do século. Em muitas regiões brasileiras que abrigam pólos industriais e uma população densa, o meio ambiente vem sofrendo uma degradação efetiva causada pelos esgotos domésticos e industriais, principalmente o ecossistema aquático.

Entre os recursos naturais, a água tem sido destaque no que diz respeito a pesquisas nos últimos anos. Isto porque embora seja um recurso que possa ser reutilizado, sua disponibilidade é finita e restrita. Apesar de o planeta terra possuir 70% de sua superfície coberta por água, apenas 3% é água doce, dos quais 2,3% encontram-se congelado nos pólos restando somente 0,7% de água disponível para consumo humano.

A indústria petrolífera, que teve seu início no século XIX, hoje é uma das maiores responsáveis por constantes problemas ambientais. Derramamentos de óleo em plataformas marítimas influem de uma maneira negativa afetando todo um ecossistema de uma região. Tais acontecimentos não são fatos isolados e vem ocorrendo no decorrer de toda sua história, porém somente nos últimos anos houve um interesse maior em procurar aliar o interesse na preservação do meio ambiente e o desenvolvimento de tecnologias “limpas” com a eficiência e produtividade dos seus processos de produção.

Um dos contaminantes mais nocivos gerados pela indústria do petróleo são os fenóis. Na indústria petroquímica são encontrados em diferentes processos como no refino de óleo bruto, resinas e conversão de coque. Dentre os recursos naturais disponíveis, os recursos hídricos são os mais afetados pelo descarte de resíduos fenólicos. Vários são os processos conhecidos e aplicados na indústria para a remoção do fenol: degradação microbiana, extração por solvente, oxidação química e adsorção por carvão ativado. Porém, cada um destes métodos apresenta

desvantagens tais como alto custo, remoção incompleta, formação de produtos mais tóxicos que o fenol e a aplicabilidade somente numa faixa de concentração restrita. Desta forma se faz necessário buscar por um processo alternativo que possibilite minimizar e/ou eliminar estas desvantagens e ao mesmo tempo que possa atender uma maior demanda de poluentes tóxicos. O tratamento via reação enzimática tem aparecido como uma das alternativas com grande potencial de uso que atendem a essas necessidades, fator que serviu de motivação para a realização deste trabalho.

A enzima peroxidase possui aplicação conhecida em diversas áreas ligadas à remoção de poluentes, sendo utilizada em processos de remoção de grupamentos fenólicos, amins aromáticas e descoloração de efluentes da indústria têxtil. Com massa molar na região compreendida entre 38 kDa a 150 kDa e apresentando-se geralmente na forma de 3 a 15 isoenzimas, as peroxidases são encontradas em plantas (rabanetes, soja, batata, tomate etc.), microrganismos (leveduras) e em animais (plasma sanguíneo).

Dentre o grupo das peroxidases, a enzima Horseradish peroxidase (HRP) possui destaque se adequando de uma melhor forma para aplicação industrial, isto porque a HRP é uma enzima não específica se tratando em termos de substrato aromático, podendo ser utilizada numa grande variedade de poluentes aromáticos.

Assim, com a intenção de buscar um método que possa ser aplicado em uma faixa mais ampla de concentração de fenol, gerando produtos seletivos, com baixa toxicidade e aliando a todos estes fatores ao controle de custo e eficácia na remoção de poluentes, neste trabalho são apresentados valores de remoção para diversas condições simuladas de contaminação com fenol, aliado a um modelo matemático que pode ser utilizado para “prever” a remoção de fenol desejada de acordo com a contaminação e a quantidade de enzima utilizada. Também foram feitos ensaios de toxicidade com os produtos da reação e ensaios cinéticos para uma melhor avaliação das variáveis envolvidas na reação.

A dissertação está estruturada em capítulos. No capítulo 1 são demonstrados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho, no capítulo 2 é apresentada a revisão bibliográfica referente ao assunto de pesquisa, formas de remoção de poluentes aquosos, cinética enzimática, características físico-químicas da enzima Horseradish peroxidase e o mecanismo enzimático da peroxidase envolvido na reação de polimerização e precipitação de substratos aromáticos. No capítulo 3 são apresentados os materiais e a metodologia utilizada para a obtenção dos dados experimentais. No capítulo 4 são exibidos os resultados das

análises e as discussões dos resultados obtidos. No capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões a respeito dos resultados, bem como as sugestões para futuros trabalhos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o potencial da enzima Horseradish peroxidase em remover fenol num processo de complementação (polimento) aos tratamentos convencionais em águas residuárias e desenvolver um modelo matemático para avaliar e prever a quantidade de fenol removido de acordo com a contaminação existente e a quantidade de extrato enzimático utilizado.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade de remoção do fenol através da reação enzimática de acordo com a concentração inicial de fenol e atividade da enzima contidos na reação.
- Determinar a atividade enzimática mínima necessária para cada concentração inicial de fenol a fim de se obter o máximo índice de remoção.
- Estudar a influência da concentração inicial de fenol presente no meio reacional na desativação do ciclo catalítico da enzima HRP durante a reação.
- Determinar e comparar a toxicidade dos produtos da reação, efetuada com e sem a presença da enzima.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EFLUENTES PRESENTES NA INDÚSTRIA PETROQUÍMICA

Mais de um terço da água doce renovável e acessível do planeta é usado em atividades domésticas, industriais e agrícolas. A maioria dessas atividades leva à poluição das águas com a introdução de inúmeras substâncias presentes em produtos petroquímicos (MELO, 2010).

A fim de evitar problemas e garantir um descarte seguro foram impostos regulamentos restringindo a faixa de concentração dos poluentes que podem estar contidos nas águas (LIN e HUANG, 1999).

O petróleo bruto é uma complexa mistura de hidrocarbonetos, que apresenta contaminações variadas de enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais (PEDROZO *et al.*, 2002). A composição exata dessa mistura varia em função do seu reservatório de origem. No seu estado bruto, o petróleo tem pouquíssimas aplicações, sendo necessária a etapa de refino para aproveitar o máximo de seu rendimento. Do ponto de vista ambiental, as refinarias de petróleo são grandes geradoras de poluição. Elas consomem grandes quantidades de água e de energia, produzem grandes quantidades de despejos líquidos, liberam diversos gases nocivos para a atmosfera e produzem resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição (MARIANO, 2001).

Os efluentes industriais usualmente são caracterizados como sendo qualquer água ou vapor condensado que tenha entrado em contato com óleo, estando este último sob a forma líquida ou gasosa, e que pode, portanto, conter óleo ou outros contaminantes químicos.

Os principais contaminantes encontrados nos efluentes líquidos das indústrias petroquímicas podem ser classificados como: sólidos dissolvidos, sólidos suspensos e compostos orgânicos. Os metais pesados, gases dissolvidos, contaminantes biológicos e radioativos aparecem com menor intensidade nesses efluentes (SOUZA, 2009).

Na Tabela 1 estão relacionados alguns dos principais processos de tratamento de efluentes líquidos utilizados na indústria petroquímica.

Tabela 1 – Processos de tratamento de efluentes líquidos

<b>Composto Tóxico</b>	<b>Sólidos Dissolvidos</b>	<b>Sólidos Suspensos</b>	<b>Compostos Orgânicos</b>
Osmose Reversa	X		
Troca Iônica	X		
Eletrodialise Reversa	X		
Evaporação	X		
Macrofiltração		X	
Microfiltração		X	
Ultrafiltração		X	
Nanofiltração		X	
Clarificação		X	
Ozonização			X
Carvão Ativado			X
Destilação			X
Lodo Ativado			X

FONTES: MUSTAFA, 1998.

O fenol aparece nos efluentes resultantes das etapas de craqueamento catalítico, produção de lubrificantes e de solventes e nas águas de lavagem da gasolina, seguintes aos tratamentos cáusticos. É uma substância de alta toxicidade e sua presença pode causar danos à saúde humana e à vida aquática (MARIANO, 2001.). Segundo Mustafa (1998), nos efluentes industriais pode haver presença de até 0,1 mg/L de fenóis, sendo que ainda segundo o mesmo autor nos locais onde há contato direto da água com as correntes de processo o fenol pode chegar a concentrações de até 20 mg/L. Mariano (2001), cita que a concentração média de fenol que é encontrado normalmente nos efluentes das refinarias pode chegar a 154 mg/L, como pode ser observado na Tabela 2, a qual apresenta as substâncias tóxicas mais comuns e suas respectivas concentrações em efluentes de indústria petrolífera.

Tabela 2 – Compostos tóxicos normalmente encontrados nos despejos das refinarias de petróleo.

<b>Composto Tóxico</b>	<b>Concentração média (mg/L)</b>	<b>Limite de Toxicidade aos Peixes (mg/L)</b>
Cádmio	0,04	0,1
Cromo	0,28	0,7
Cobre	0,07	0,15
Chumbo	0,23	2,5
Níquel	0,11	1,5
Fenol	154	40
Sulfetos	24	4
Zinco	0,17	1

FONTE: MARIANO, 2001.

## 2.2 LEIS E REGULAMENTOS PARA DESCARTE DE EFLUENTES

Com a escassez cada vez maior de recursos naturais, seguida da necessidade constante de atendimento por uma maior demanda de produção, as leis ambientais vêm progredindo muito no sentido de minimizar os problemas gerados pelos contaminantes produzidos pelas indústrias. A contaminação de águas superficiais e subterrâneas com compostos aromáticos é um dos problemas ambientais mais graves enfrentados atualmente. Devido à sua toxicidade aguda e uma alta solubilidade, o fenol já é listado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos e pela União Europeia (EU) como um dos contaminantes prioritários e também o mais importante dos poluentes potencialmente cancerígenos, ocupando o décimo primeiro lugar numa lista de 126 substâncias nocivas (MING *et al.*, 2006).

Nos Estados Unidos e União Europeia a faixa de concentração de fenol permitida para descarte de efluentes compreende valores de 0,1 a 0,5 mg/L, faixa semelhante à imposta pelo CONAMA na Resolução 397/08, a qual estabelece que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições de 0,5 mg/L de fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina).

Nas águas naturais e potáveis, os padrões para os compostos fenólicos são bastante restritivos, tanto na Legislação Federal quanto na Legislação do Estado de Santa Catarina. Esse motivo deve-se ao fato que mesmo em concentrações muito pequenas (50 µg/L), o fenol reage com o cloro originando o Clorofenol, substância que é responsável por

gerar um gosto adstringente e cheiro desagradável (BRAILE e CAVALCANTI, 1993).

A legislação ambiental em vigor no estado de Santa Catarina impõe os limites máximos de compostos fenólicos presentes em águas naturais, classe 01 e 02 as quais são destinadas ao abastecimento doméstico, em  $1 \mu\text{g/L}$  e, em despejos industriais, em  $0,2 \text{ mg/L}$  (Decreto nº 14.250 de 1981, FATMA).

### 2.3 PROCESSOS DE REMOÇÃO DE FENOL

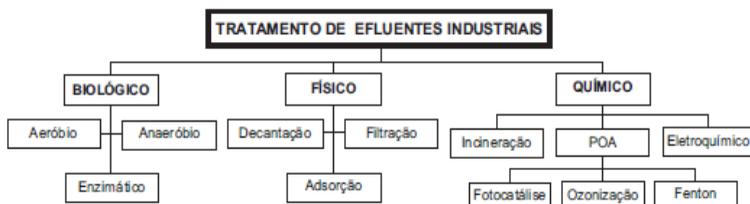
Os compostos fenólicos estão presentes nas águas residuárias de diversas indústrias, tais como na conversão do carvão, resinas e plásticos, têxteis, corantes e outros produtos químicos orgânicos, madeira, sabonetes e detergentes, ferro e aço e refino de petróleo. As concentrações de compostos fenólicos encontradas nestes efluentes podem alcançar desde valores muito baixos até dezenas de gramas por litro. Quase todos estes resíduos fenólicos são tóxicos e muitos deles têm sido classificados como poluentes perigosos devido à sua nocividade potencial na saúde humana (WU *et al.*, 1997).

Com a exigência dos limites de descarga cada vez mais rigorosa, há uma necessidade de desenvolvimento de métodos tecnológica e economicamente eficazes para reduções da quantidade de tais contaminantes liberados para o ambiente (NICELL *et al.*, 1995).

Métodos convencionais disponíveis para a remoção de fenol a partir de águas residuárias industriais incluem extração com solvente, a degradação microbiana, adsorção em carbono ativado e oxidação química. No entanto, estes métodos possuem sérias desvantagens como alto custo, remoção incompleta, a formação de subprodutos tóxicos e aplicabilidade a uma faixa de concentração de poluentes limitada (WU *et al.*, 1997).

A Figura 1 mostra um esquema geral a respeito dos principais métodos de tratamentos de efluentes industriais.

Figura 1 – Organograma das classes de tratamento de efluentes.



FONTE: FORGIARINI, 2006

\* POA – Processos Oxidativos Avançados.

Segundo Nicell *et al.* (1995), o alto custo agregado aos processos inorgânicos, tais como os sais de ferro, deve-se ao fato de que essas reações necessitam de condições de pH ácido para serem efetivas. Além disso, a corrosão causada nos equipamentos durante a reação e o ajuste do pH final na hora de ser efetuado descarte, também contribuem para um custo maior de processo.

Os processos biológicos, principalmente os enzimáticos correspondem a uma das mais recentes tecnologias para o tratamento biológico de efluentes. Dentro deste contexto, cabe às enzimas peroxidases (lignina peroxidase, manganês peroxidase e peroxidase de raiz forte) um papel de destaque, em função da sua capacidade para degradar um grande número de substâncias tóxicas e persistentes. Desta forma, as reações biológicas a partir de enzimas demonstram ser uma boa alternativa em relação aos demais processos, pois além de ser seletivo em relação ao substrato, podem trabalhar em temperatura ambiente (25°C) e em faixas de concentração de fenol e pH mais amplas (ERHAN, *et al.*, 2002).

### 2.3.1 Remoção de fenol por oxidação química

A oxidação química tem o potencial de remover de águas residuárias compostos orgânicos que são resistentes a outros tratamentos, porém o uso de oxidantes químicos não tem seu uso difundido, por enquanto, devido aos custos e à falta de demanda por tratamentos mais eficientes em diversos locais. As características desejáveis para um oxidante químico são: disponibilidade, baixo custo e que não contribua com poluentes secundários no curso d'água (MORAIS, 2006).

Na Tabela 3 é apresentada uma lista com os principais oxidantes e os seus respectivos potenciais de oxidação. Quanto maior o seu potencial, maior o poder de oxidação.

Tabela 3 – Potencial de oxidação de diferentes substâncias oxidantes

Oxidante	Potencial de Oxidação (V)
Flúor	3,0
Radical Hidroxila ( $\cdot OH$ )	2,80
Ozônio ( $O_3$ )	2,07
Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ )	1,78
Permanganato de Potássio ( $KMnO_4$ )	1,69
Dióxido de Cloro ( $ClO_2$ )	1,56
Cloro (Cl)	1,36
Oxigênio	1,23

FONTE: MORAIS, 2006.

O uso de ozônio para remoção de poluição foi amplamente investigado e é atualmente aplicado em casos onde os tratamentos convencionais são ineficientes ou insuficientes. O poder desinfetante do ozônio é conhecido desde o início do século XX, porém foi durante as últimas décadas que este agente químico adquiriu notoriedade em tratamento de água residuária (SILVEIRA, 2009).

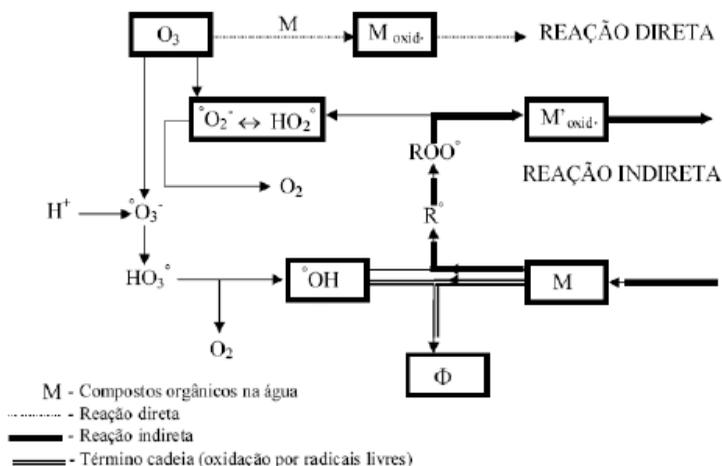
O ozônio é capaz de reagir com uma numerosa classe de compostos orgânicos, devido, principalmente, ao seu elevado potencial de oxidação ( $E_0 = 2,08 V$ ), superior ao de compostos reconhecidamente oxidantes, como  $H_2O_2$  e o próprio cloro. Ainda assim, muitos compostos orgânicos como os organoclorados reagem lentamente com o ozônio molecular. Contudo, em determinadas condições, o ozônio leva a formação de radicais hidroxilas ( $\cdot OH$ ), cujo potencial de oxidação é ainda mais elevado ( $E_0 = 2,80V$ ). Os processos que implicam na formação do radical hidroxila são suficientes para purificar a água e são denominados Processos Oxidativos Avançados (POA) (SOUZA, 2009). Ainda segundo Souza (2009), o ozônio utilizado no tratamento de efluente industrial reduz a DQO e destrói alguns compostos químicos como fenóis e cianetos. É considerado eficiente na remoção de cor por oxidar matéria orgânica dissolvida e formas coloidais presentes nos corantes, restabelecendo a coloração natural do efluente.

O processo de remoção de fenol a partir do ozônio em meio aquoso é caracterizado pela presença de dois mecanismos principais de

reação: reação direta e reação indireta. Na reação direta os compostos dissolvidos em solução reagem diretamente com o ozônio sendo oxidados. Na reação indireta, há formação de produtos secundários, ou seja, os compostos dissolvidos podem reagir com ozônio se decompondo em oxidantes secundários fortemente reativos, ou o próprio ozônio pode formar oxidantes secundários podendo ainda haver subsequente reação destes oxidantes secundários com soluto presente na solução.

A Figura 2 apresenta os mecanismos de reação do ozônio com os compostos orgânicos presentes na água.

Figura 2 – Reações entre o ozônio e os compostos orgânicos presentes na água. R = Radicais livres que catalisam a decomposição do ozônio;  $\Phi$  = produtos que não são catalisados pela decomposição do ozônio. Moxid = Compostos orgânicos oxidados



Fonte: SOUZA, 2009.

A reação direta é altamente seletiva e lenta, a reação indireta por ser radicalar reage mais rapidamente com os compostos presentes na água, porém no mecanismo indireto não há seletividade em relação aos produtos.

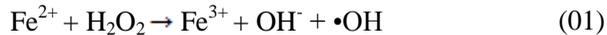
Algumas condições reacionais contribuem para que um dos mecanismos ocorra preferencialmente: pH, natureza do substrato, presença de sais dissociados. A presença de substratos facilmente oxidados, em meio ácido, favorece a via direta; já o ataque, em meio

alcalino, de solutos dificilmente oxidados, tem lugar principalmente por via do radical (LÓPEZ, 2004).

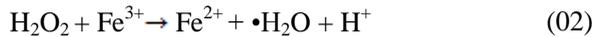
Silveira (2009) comenta em seu trabalho que o uso do ozônio no tratamento de efluentes visa principalmente à oxidação e dissociação de compostos orgânicos não biodegradáveis. Porém, por ser altamente reativo e instável, não pode ser transportado ou armazenado, exigindo que seja produzido no local de aplicação, ou seja, torna-se necessária sua geração *in situ*. Além deste problema, Silveira (2009) também relata que o custo da produção de ozônio torna o processo de remoção economicamente inviável, sendo necessário acoplá-lo a outros tratamentos para reduzir os custos.

Outra opção no que diz respeito a processos de POA é a utilização do reagente Fenton com peróxido de hidrogênio para remoção de poluentes. A oxidação através do reagente Fenton é altamente eficaz na quebra de grandes moléculas orgânicas, tornando-se assim um passo de pré-tratamento usual para melhorar a biodegradabilidade dos constituintes orgânicos (JIANG *et al.*, 2011).

O processo Fenton é baseado na transferência de elétron entre peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e um metal homogêneo catalítico ( $Fe^{2+}$ ). Assim, o peróxido de hidrogênio é catalisado pelo íon ferro para produzir radical hidroxila (BABUPONNUSAMI e MUTHUKUMAR, 2012).



Esta reação é propagada pela regeneração do íon ferro, o qual é gerado pela redução das espécies férricas com peróxido de hidrogênio.



Ainda de acordo com o mesmo autor, a taxa de produção do radical  $Fe^{3+}$  indicado na reação 01 é muito superior do que a taxa de regeneração do  $Fe^{2+}$  na reação 02, o que indica a formação de uma grande quantidade de lodo de hidróxido férrico durante o processo, sendo necessário um processo de separação adicional, o que implica em maiores custos de processo.

Da mesma maneira que a remoção química feita através de ozônio, a remoção utilizando Fenton e peróxido de hidrogênio possui uma série de fatores que implicam em problemas gerados no processo de remoção.

Jiang *et al.* (2011) explicam em seu trabalho que a remoção orgânica aumenta de acordo com as quantidades dos reagentes Fenton adicionados ( $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{FeSO}_4$ ), porém quando adicionado uma dose de  $\text{H}_2\text{O}_2$  maior do que a necessária há um consumo maior de  $\bullet\text{OH}$ , o que reduz o potencial de oxidação. Da mesma forma, o  $\text{Fe}^{2+}$  em excesso também consome  $\bullet\text{OH}$  para formar  $\text{Fe}^{3+}$ , o que resulta em uma grande quantidade de lama após neutralização do pH.

Outro problema do processo de remoção utilizando reagentes Fenton está ligado com o controle do pH. A faixa de pH ótimo para reação é de 3-5, o que implica num maior gasto de processo com reagentes para controle de pH, já que após a reação o pH deve estar em condições neutras para ser efetuado o descarte do efluente.

Alternativas para remoção utilizando reação fotocatalítica em tubos recobertos com nanopartículas de dióxido de titânio demonstraram uma forma de remoção promissora, porém um dos problemas deste processo é que o  $\text{TiO}_2$  somente tem uma “fotorresposta” na faixa do ultravioleta (UV), sendo que espectro solar possui somente uma pequena porção, cerca de 4% na região UV (CONG *et al.*, 2012). Kunz *et al.* (2002) citam que os principais inconvenientes de ordem prática que tem dificultado bastante a consolidação do sistema fotocatalítico como alternativa de tratamento em grande escala são a necessidade de fontes artificiais de radiação, dificuldades na penetração da radiação no meio de reação e dificuldades na separação dos fotocatalisadores, uma vez que estes são utilizados na forma de finas suspensões e dificuldades na implementação de sistemas contínuos em grande escala, principalmente em função dos inconvenientes anteriores.

Em busca de resultados mais efetivos, pesquisas estão sendo conduzidas atualmente de forma a acoplar o processo de remoção do fenol por oxidação química com outros processos. Souza (2009) promoveu a remoção de fenol através do sistema de ozonólise acoplado com adsorção com carvão ativado. O acoplamento foi capaz de tratar um volume maior de resíduo, além de gerar um aumento na remoção, chegando a patamares de 98,3% de fenol removido e 71,3% da demanda química de oxigênio (DQO).

Cong *et al.* (2012) visando uma otimização do processo fotocatalítico, adicionou hematita ( $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), que absorve e faz uso da luz visível, ao tubo recoberto de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  acoplando este sistema com o reagente Fenton. O acoplamento demonstrou ser bastante efetivo na remoção de poluentes removendo 100% de fenol em apenas 60 minutos de tratamento.

Jiang *et al.* (2011) promoveram também remoção de material orgânico acoplando o processo de oxidação Fenton com processo de sedimentação e floculação, demonstrando que as possibilidades de acoplamentos são variadas, sendo uma ótima solução para remoção de poluentes em geral.

### 2.3.2 Remoção de fenol por adsorção

Dentre os processos físicos mais utilizados no tratamento de efluentes industriais, a adsorção com carvão ativado vem sendo intensamente estudada. O estudo de alguns agentes alternativos utilizando-se de biomassa como adsorvente também tem despertado atenção. Alguns trabalhos foram publicados nos últimos anos utilizando carvão ativado de coco, casca de eucalipto e quitosana como materiais adsorventes (KUNZ *et al.*, 2002).

O carvão ativado pode ser produzido nas formas pulverizada ou granulada. O tamanho de partícula do carvão pulverizado é no máximo 0,18 mm e o do granulado varia de 0,25 a 5,0 mm. As aplicações dos dois tipos de carvão são bastante distintas. O carvão pulverizado é usado somente em adsorções em fase líquida, onde o carvão é misturado diretamente ao líquido a ser purificado. Após a adsorção, o carvão é separado do líquido por filtração, decantação ou centrifugação; este tipo de carvão não permite regenerações. Já o carvão granulado é empregado tanto nas adsorções em fase líquida quanto nas gasosas. Ele é produzido a partir de matérias-primas duras, por exemplo casca de coco, resultando em um produto de rígida estrutura. Isto proporciona alta dureza, permitindo regenerações sucessivas, que podem ser realizadas através de vapor, solventes ou ar comprimido (MUSTAFA, 1998).

O extenso uso do carvão ativado como adsorvente de poluentes inorgânicos e orgânicos na água deve se ao fato de possuir textura e as propriedades químicas da superfície adequadas. Estas características podem variar de acordo com os materiais de origem e com o método utilizado para preparar o sólido carbonáceo, que pode ser modificado com tratamentos físicos e químicos para melhorar as propriedades adsorventes (MARTÍNEZ, *et al.* 2009). Özkaya (2006), citando Haghseresht *et al.*(2002), indicou que a capacidade de adsorção de carvão ativado para compostos aromáticos depende de fatores, tais como a natureza física da estrutura do poro do adsorvente, os grupos funcionais, a natureza do adsorbato, peso molecular, tamanho e as condições de solução (pH, força iônica e concentração adsorbato).

O carvão ativado é o adsorvente mais eficaz porque possui uma área de superfície elevada, além de uma superfície química devido à polaridade, estrutura iônica e grupos funcionais. Estes fatores fazem com que ele tenha uma estrutura porosa constituída de uma rede de macroporos interligados, mesoporos, e microporos (BEKER, *et al.* 2010).

Devido ao custo relativamente elevado do carvão ativado, novos adsorventes naturais estão sendo estudados na tentativa de remover contaminantes orgânicos de águas residuárias com um menor custo de processo. Entre eles se encontram cinzas, o solo, casca de arroz e o lodo ativado. Particularmente, o lodo seco ativado pode ser utilizado como fonte abundante, natural e de baixo custo para a remoção de fenóis, mas a sua aplicação é limitada por águas residuárias com baixa concentração fenólica devido principalmente à baixa biodegradabilidade e efeito inibitório destes compostos (CALACE *et al.*, 2002).

A principal desvantagem da adsorção com carvão ativado granular é sua forma lenta de adsorção. Algumas vezes é necessário pré-tratar antes da adsorção já que concentrações de sólidos suspensos maiores que 50 mg/L podem se acumular nos leitos de carvão e reduzir a eficiência de remoção. A adsorção sobre o carvão ativado granular é aplicável em processos descontínuos e com baixas concentrações de poluentes (BRAILE e CAVALCANTI, 1993).

Vários trabalhos demonstrando a utilidade e estudos realizados com adsorção utilizando carvão ativado e outros adsorventes são reportados na literatura. Martínez *et al.* (2009) avaliaram o efeito do pH no processo de adsorção em fenóis monohidroxilados, demonstrando que a quantidade varia de acordo com o pH e com a adsorbato utilizado. Beker *et al.* (2010) analisaram a influência dos métodos de ativação do carvão e pH no processo de adsorção do fenol. Özkaya (2006), investigou o processo de adsorção e dessorção utilizando carvão ativado comercial, chegando a obter uma remoção de até 94% de fenol utilizando concentração de 5 g/L de carvão ativado num período de 60 minutos. Souza (2009), avaliando somente o processo de adsorção, concluiu que o tempo de retenção necessário é de 4 horas para que o carvão ativado utilizado atinja resultados satisfatórios de remoção.

### **2.3.3 Remoção de fenol por processos biológicos**

Os processos de remoção por meio biológico são mais frequentemente utilizados, pois permitem o tratamento de grandes volumes de efluentes, transformando-os em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O ou CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>,

dependendo do processo biológico utilizado. Em essência, o tratamento biológico fundamenta-se principalmente na utilização dos compostos tóxicos como substrato para o crescimento e manutenção dos organismos.

Dependendo da natureza do aceptor de elétrons, os processos podem ser divididos em aeróbios e anaeróbios. Nos processos aeróbios, o receptor de elétrons é o oxigênio molecular e os principais produtos finais são  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Nos processos anaeróbios, que degradam os compostos orgânicos tóxicos a  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ , o oxigênio está ausente, sendo que algumas formas de carbono, enxofre e nitrogênio participam como receptores de elétrons.

Freire *et al.* (2000) citando Orhon (1999) relataram que nos últimos anos, o grande desenvolvimento da microbiologia tem propiciado muitas alternativas que viabilizam o tratamento biológico de efluentes industriais. Trabalhos recentes têm reportado que uma gama de efluentes tratáveis por meio destes processos.

A grande motivação de todos os pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser expressa pela busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional, o que na prática torna-se muito difícil, principalmente em função da grande quantidade de variáveis envolvidas no processo como diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente (KUNZ *et al.*, 2002).

Embora processos físicos como osmose reversa, ultrafiltração e oxidação também tenham demonstrado uma boa capacidade de remoção no tratamento de efluentes contendo fenol, o tratamento biológico provou ser o método mais promissor e econômico para remoção de fenol em águas residuárias, alcançando a mineralização completa de compostos fenólicos, com a vantagem de poder ser utilizado numa ampla faixa de concentração. Os processos físicos requerem um investimento e manutenção de alto custo e seus efluentes frequentemente exigem tratamento secundário devido à presença de altos níveis de matéria orgânica remanescente tornando-o desta forma um processo com maior efeito adverso sobre o meio ambiente (RODRIGUES, 2006).

Muitos tipos de bactérias aeróbias são capazes de consumir compostos aromáticos como única fonte de carbono e energia. Um dos exemplos que pode ser citado é *Pseudomonas putida*, uma bactéria Gram negativa em forma de bastão, que possui a habilidade de degradar solventes orgânicos, especialmente o fenol, com alta eficiência de

remoção (EL-NAAS *et al.*, 2009). Outro grupo de bactéria com significativa importância no campo de remoção de produtos xenobióticos são as do gênero *Rhodococcus*. Estas bactérias possuem características fisiológicas e genéticas diversas, porque se encontram isoladas em vários habitats (solo e água do mar) sendo equipadas com grande número de atividade enzimática e parede com estrutura unicelular o que a torna conveniente na aplicação biotecnológica. A parede celular das bactérias do gênero *Rhodococcus* possuem ácidos micólicos. As cadeias alifáticas longas dos ácidos micólicos que envolvem a célula facilitam a absorção de substratos hidrófobos (MATÍNKOVÁ, 2008).

Segundo El-Naas *et al.* (2009), outros tipos de bactérias e biossorbentes são reportados no que diz respeito à biodegradação ou remoção de fenol, entre elas estão inclusas *Bacillus* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Nocardia hydrocarbonoxydans*, *Candida tropicalis* e lodo ativado.

Varma e Gaikwad (2009) estudaram remoção e tolerância ao fenol utilizando células recicladas de *Candida tropicalis*. Resultados promissores foram alcançados demonstrando que as células da bactéria utilizada poderiam ser recicladas até 11 vezes e ainda mantinham uma conversão de 50%. Os autores também compararam a remoção após cada reciclo das células recicladas com as células frescas. Após 9 reciclos, as células recicladas ainda possuíam capacidade de 60% de remoção contra apenas 24% de remoção oriundas das células frescas, comprovando assim a boa tolerância da *C. Tropicallis* em relação ao substrato fenólico.

Tsai e Juang (2006) pesquisaram a biodegradação do fenol em reator batelada utilizando a bactéria *Pseudomonas putida* com silicato de sódio. Como resultado foi comprovado que a bactéria cresceu melhor com o substrato fenol do que com o silicato de sódio e que total remoção de fenol acontece em 20 horas de processo na condição de maior concentração inicial de poluente aromático. El-Naas *et al.* (2009) avaliou a biodegradação do fenol com *Pseudomonas putida* imobilizada em álcool polivinílico (PVA) num reator batelada, demonstrando o efeito inibitório da concentração de fenol sobre a biodegradação da bactéria e relacionando o mesmo com o volume de PVA utilizado no experimento e com as dimensões do reator no experimento, obtendo para a pior condição de contaminação, uma remoção de 100% num período de 5 horas de reação.

Erhan *et al.* (2002) utilizaram AEK-1, uma espécie da bactéria *Pseudomonas syringae* para extração da enzima catecol 1,2-dioxygenase

que foi imobilizada numa membrana e utilizada em filtração convencional na remoção de fenol em águas residuárias.

Além das bactérias, os fungos também têm sido uma alternativa empregada nas pesquisas para remoção de componentes fenólicos.

Fungos são microrganismos eucarióticos e heterotróficos que podem ser unicelulares (leveduras) ou pluricelulares (fungos filamentosos ou bolores). Os filamentos fúngicos são denominados hifas e seu conjunto constitui o micélio fúngico. Embora a maior parte do conhecimento sobre rotas metabólicas da degradação dos compostos fenólicos encontre-se fundamentada em bactérias, há uma limitação intrínseca ao metabolismo bacteriano que faz com que muitos destes processos não sejam eficientes na remoção de compostos persistentes. Estudos têm mostrado que fungos atuam como decompositores importantes de compostos aromáticos na biosfera, entre eles, os fenóis (RODRIGUES, 2006).

Estes microrganismos são amplamente empregados em processos biológicos para remoção de compostos de difícil degradação, como os fenóis, pois são capazes de reciclar compostos como lignina, celulose, quitina, melanina e queratina, além de serem altamente versáteis no metabolismo de xenobióticos, produzindo enzimas extracelulares que quebram moléculas grandes e as tornam assimiláveis ao seu metabolismo. Portanto uma mesma espécie de fungo tem a capacidade de produzir diferentes tipos de enzimas, tornando-os microrganismos interessantes para este tipo de tratamento (DAMASCENO *et al.*, 2007) e (RODRIGUES, 2006).

Recentemente, pesquisadores têm aumentado o interesse no versátil fungo de decomposição *Phanerochaete chrysosporium*. Este fungo tem a capacidade de mineralizar, além da lignina, pelo menos parcialmente e em alguns casos completamente, uma variedade de poluentes resistentes à degradação. O sistema lignolítico deste fungo é representado principalmente pelas enzimas lignina e manganês peroxidase, as quais são produzidas em meios contendo fontes limitadas de carbono e nitrogênio. Estas enzimas têm a capacidade de despolimerizar a lignina e uma grande variedade de outros compostos (KUNZ *et al.*, 2002).

Ainda de acordo com Kunz *et al.* (2002) a utilização de outros fungos como por exemplo *Pleurotostreatus* e *Trametes versicolor* para degradação de compostos tóxicos também vem sendo estudada. Estes fungos caracterizam-se por serem bons produtores de lacase, uma fenoloxidase dependente de cobre. Esta enzima lignolítica tem a capacidade de catalisar reações de desmetilação, que é um inicial e

importante passo em processos de biodegradação de cadeias poliméricas, com subsequente decomposição de macromoléculas de lignina pelo rompimento de anéis aromáticos e ligações em estruturas fenólicas.

Também resultados promissores na remoção de fenol a partir de tratamento biológico com fungo *Aspergillus niger* foram alcançados por Damasceno *et al.* (2007). Em 25 dias de tratamento num biorreator batelada foi obtida remoção de 95% em termos de DQO. Pinheiro *et al.* (2010) utilizando *Aspergillus niger* inoculado em reator contínuo obtiveram remoção de 99% de fenol e 92% de matéria orgânica.

Santos e Linardi (2004) isolaram fungos provenientes de efluente da indústria de aço inox e estudaram sua tolerância ao fenol de 5 mg/L até 940 mg/L de fenol, conseguindo chegar a uma remoção de mais de 80% de fenol em menos de 72 horas para concentrações até 376 mg/L e 168 h para as demais concentrações superiores. Em sua pesquisa foi avaliada também a taxa de remoção de fenol que chegou a cerca de 20 mg/(L h).

#### **2.3.4 Remoção de fenol por processo enzimático**

Os processos enzimáticos correspondem a uma das mais recentes tecnologias para o tratamento biológico de efluentes. O uso das enzimas em aplicações para o tratamento de águas residuárias foi inicialmente proposto em 1930. No entanto, o conceito da utilização das enzimas para destruir poluentes individuais em misturas residuárias foi desenvolvido somente após a década de 70 (AITKEN, 1993).

Assim, várias pesquisas têm sido conduzidas durante as últimas duas décadas para investigar as novas possibilidades oferecidas pelas enzimas no tratamento de resíduos. As razões principais para este tipo de interesse são três: (1) A taxa de introdução de poluentes orgânicos xenobióticos e recalcitrantes no ambiente estão aumentando cada vez mais, sendo mais difícil de conseguir o grau de remoção necessário destes poluentes utilizando apenas os processos químicos e biológicos convencionais, existindo, portanto, uma necessidade para o desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento que possam ser mais rápidos, mais baratos, mais confiáveis e mais simples de implementar que os processos atuais; (2) Existe um crescente reconhecimento de que as enzimas podem ser utilizadas para um tipo específico de poluente num tratamento; (3) Os últimos avanços da biotecnologia têm propiciado uma produção mais barata e uma maior

gama de enzimas disponíveis devido a melhorias no isolamento e procedimentos de purificação (KARAM e NICELL, 1997).

Os processos enzimáticos possuem muitas vantagens sobre os métodos microbianos tradicionais, nos quais as enzimas são produzidas por organismos intactos (contendo uma variedade de enzimas), porque as enzimas isoladas atuam com grande especificidade e seletividade, mesmo em resíduos diluídos, permitindo que somente grupos desejáveis sofram reação no tratamento. São menos suscetíveis às inibições causadas por substâncias que podem ser tóxicas para os organismos vivos e o custo poderia ser eventualmente menor em relação aos outros métodos caso a enzima fosse produzida e disponível comercialmente em maiores quantidades (KARAM e NICELL, 1997). Outras vantagens da utilização da enzima em processo de remoção constituem a potencialidade que pode ser padronizada, a facilidade de estoque e manuseio, a concentração enzimática que independe do crescimento microbiano, aplicação em materiais recalcitrantes, baixo tempo de retenção, atuação em concentrações altas e baixas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil processo de controle. (NICELL *et al.*, 1995; DURÁN e ESPOSITO, 2000 e FREIRE *et al.*, 2000).

Ainda de acordo com Durán e Esposito (2000) e Ikehata *et al.* (2004), embora os processos que utilizam enzimas purificadas possuam custo elevado, diversos estudos têm sido apresentados com melhorias na produção de enzimas, como o uso de substratos de custos reduzidos (lodo, resíduos agrícolas e de alimentos, por exemplo), descoberta de novas cepas, modificações nas condições de crescimento dos microrganismos produtores de enzimas, uso de indutores, entre outros. As alternativas desenvolvidas nesses estudos podem melhorar a viabilidade econômica dos processos enzimáticos e tornar factível a sua aplicação em grande escala.

Abaixo, na Tabela 4, há exemplos de enzimas e suas respectivas aplicações no tratamento de resíduos

Tabela 4 – Enzimas e suas aplicações no tratamento de resíduos

<b>Enzima</b>	<b>Fonte</b>	<b>Aplicação</b>
Alquilsulfatase	<i>Pseudomonas</i> C12B	Degradação de surfactantes
Amilases: $\alpha$ -amilase Glicoamilase	Bactérias	Hidrólise do amido e produção de glicose
Enzimas celulolíticas Celulase Celobio-hidrolase Celobiase Exo-1,4- $\beta$ -D-Glicosidase	Várias fontes	Hidrólise de lodos celulósicos de papel e celulose para produção de açúcares e álcool, hidrólise de celulose em resíduos sólidos urbanos para produzir açúcar e outras fontes de energia.
Quitinase	<i>Serratia marcescens</i>	Bioconversão de resíduos de crustáceos em N-acetil glicosamina
Cloro-peroxidase	<i>Caldariomyces fumago</i>	Oxidação de compostos fenólicos
Cianidase	Isoladas de <i>Alcaligenes denitrificans</i>	Decomposição de cianetos
Cianeto Hidratase	Fungos tais como: <i>Gloeocercospora sorghi</i> , <i>Stemphylium loti</i>	Hidrólise de cianetos
Heme-oxidase	Sangue	Oxidação de fenóis e aminas aromáticas

L-Galactono-lactona oxidase	<i>Candida norvegensis</i>	Conversão da galactose da hidrólise do soro de leite em ácido ascórbico.
Lacase	Diversos fungos: <i>Rhizoctonia praticola</i> , <i>Fomus annosus</i> , <i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de fenóis, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft, ligação de fenóis e aminas com húmus
Lactases	Bactérias	Processamento de resíduos de laticínios e produtos de maior valor agregado
Lignina Peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Oxidação de fenóis e compostos aromáticos, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft
Lipase	Várias fontes	Melhora o desaguamento do lodo
Lisozima	Bactérias	Melhora o desaguamento do lodo
Manganês Peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Oxidação de fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos
Paration Hidrolase	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Flavobacterium</i> , <i>Streptomices</i>	Hidrólise de pesticidas organofosfatados

Pectina liase	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Degradação de pectina
Pectina esterase	<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	Degradação de pectina
Peroxidase	Raiz forte, tomate, soja, rabanete, <i>Coprinus macrorrhizus</i>	Oxidação de fenóis, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft, desaguamento de lodo
Fosfatase	<i>Citrobacter sp.</i>	Remoção de íons de metais pesados
Protease	Bactérias tais como: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas marinoglutinosa</i>	Solubilização de restos de peixe e carne melhorando o desaguamento de lodo
Tirosinase	Cogumelo	Oxidação de fenóis

FONTE: KARAM E NICELL, 1997.

Dentre as diversas aplicações de processos enzimáticos na remoção de poluentes, destaca-se a aplicação de enzimas oxidativas para a conversão de compostos fenólicos. Essas enzimas catalisam, com seletividade e eficiência elevadas, a conversão desses compostos em produtos com reduzida toxicidade ambiental. Dentre essas enzimas, as peroxidases e as fenoxidases são as que têm sido mais aplicadas para o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos (MELO, 2010).

A lacase e a tirosinase não necessitam de peróxido de hidrogênio para realizar a reação, pois aproveitam o oxigênio molecular contido no substrato, o que torna seu uso no processo mais barato em relação à peroxidase. A tirosinase é usada para converter fenol em ortoquinonas em duas reações consecutivas: (1) a hidroxilação de monofenóis com o oxigênio molecular formando ortodifenóis e (2) a dehidrogenação dos ortodifenóis com oxigênio para forma ortoquinonas. Estas quinonas são reativas e podem levar a subseqüentes conversões para formar outros intermediários, como bifenis hidroxilados. Embora não haja maiores

discussões sobre o assunto, o processo gera contaminações devido à enzima solúvel que permanece no processo e os produtos não precipitados contidos na solução aquosa após o tratamento enzimático (ERHAN *et al.* 2002).

A lacase é produzida por vários fungos e parece capaz de diminuir a toxicidade de compostos fenólicos por meio de um processo de polimerização. Além disso, devido à sua não especificidade, pode induzir o acoplamento cruzado de fenóis poluentes com os fenóis que ocorrem naturalmente. Na verdade, a lacase pode oxidar compostos fenólicos aos seus correspondentes aniônicos: os radicais livres, que são altamente reativos (KARAM e NICELL, 1997).

Ainda os mesmos autores, citando Bollag *et al.* (1994), relataram um estudo realizado em lacase do fungo *Rhizoctonia praticola*, no qual foi demonstrado a capacidade da enzima em desintoxicar alguns dos compostos fenólicos testados. A desintoxicação do fenol em particular pareceu ser dependente da capacidade da enzima em transformar o composto, o qual é demonstrado pelo desaparecimento do fenol progenitor. No entanto, os produtos de reação não foram identificados, concluindo-se que a capacidade de lacase para desintoxicar uma solução contendo fenóis parece ser função do composto a ser tratado, da fonte da enzima e outros fatores ambientais.

Em contraste com muitas outras enzimas, a HRP tem um grande destaque, pois possui características particulares que a tornam mais aplicável no meio industrial, além de possuir uma não-especificidade em termos de substratos orgânicos, podendo catalisar a oxidação de mais de 40 diferentes compostos aromáticos incluindo fenóis, bifenóis, anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos relacionados (NICELL *et al.*, 1995 e KLIBANOV *et al.*, 1983).

Klibanov *et al.* (1983) propuseram pela primeira vez um método de remoção de fenol utilizando enzima HRP em águas residuárias. Neste método, HRP catalisa a oxidação de fenóis com peróxido de hidrogênio gerando radicais fenóxi. Estes radicais então reagem entre si formando dímeros, trímeros, etc., eventualmente resultando em maiores oligômeros e polímeros os quais possuem baixa solubilidade e podem ser facilmente removidos das águas residuárias (ERHAN *et al.*, 2002). Este processo, Polimerização e Precipitação por Catálise Enzimática (PPCE), possui um grande potencial para remoção de compostos aromáticos de águas residuárias oriundas da indústria os quais não são removidos efetivamente por métodos tradicionais de tratamentos químicos, físicos ou biológicos (NICELL *et al.*, 1995 e DURÁN e ESPOSITO, 2000).

A principal desvantagem da utilização do processo enzimático através das peroxidases para remoção de poluentes é a necessidade de uma grande quantidade de enzima para alcançar alta eficiência de remoção. Além deste fator há também a desativação enzimática que ocorre durante a reação de polimerização (ERHAN *et al.*, 2002).

Visando eliminar ou reduzir estes problemas que limitam a utilização da aplicação das enzimas nas indústrias e aperfeiçoar ainda mais o processo de PPCE, muitos estudos foram conduzidos nos últimos 20 anos. Wu *et al.* (1997) demonstraram que a adição de polietilenoglicol (PEG) tem um efeito protetor significativo na atividade enzimática da HRP. Esse efeito protetor foi comparado com outros aditivos como gelatina e polietileno. O polietilenoglicol teve o melhor efeito em relação aos outros aditivos. Quando adicionada na reação a quantidade de enzima necessária para se obter a mesma remoção caiu para 1/100 da quantidade sem utilizar PEG. O custo deste método com aditivos é comparável com o tratamento de peróxido de hidrogênio que é usado atualmente na indústria de tratamento de efluentes. A utilização da hemoglobina, que também possui atividade de peroxidase é proposta como alternativa por ser mais abundante e uma fonte mais barata de obtenção de proteína. Nicell *et al.* (1995) também realizaram trabalho semelhante utilizando PEG como aditivo. Foram comparadas concentração de enzima necessária e valores de *Turnovers*. Como resultado obteve-se uma redução na quantidade de enzima em até 22 vezes com uso de PEG para uma remoção de 90% de fenol.

Ainda com intuito de melhorar o processo de remoção utilizando enzima HRP, Siddique *et al.* (1993) imobilizaram a enzima HRP em 3 diferentes meios: Disco de celulose, bolas e tubos de Nylon. Os resultados indicaram que mais de 80% de eficiência de remoção pode ser obtido desde que a atividade enzimática não fosse limitante no reator.

Bayramoglu e Arica (2008) imobilizaram HRP em esferas magnéticas via acoplamento com glutaraldeído, para remoção de fenol e paraclorofenol em sistema contínuo. O método de imobilização reteve até 79% da atividade da HRP livre usada na imobilização e aumentou a resistência à inativação por temperatura. As concentrações de enzima imobilizada necessárias para se alcançar altas remoções de fenol formam idênticas à enzima livre, porém a estabilidade obtida com a imobilização da HRP teve um aumento significativo, indicando a possibilidade de a HRP poder ser utilizada em um sistema de larga escala para degradação de fenol.

Lai e Lin (2005) investigaram a remoção de paraclorofenol utilizando enzima HRP imobilizada em esferas de vidro poroso de aminopropil com glutaraldeído. Com a imobilização foi possível aumentar estabilidade da enzima bem como a faixa de pH ótima e temperatura para reação de remoção de paraclorofenol.

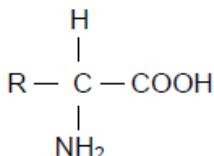
Zhang *et al.* (2007) imobilizaram HRP em gel de poliacrilamida e compararam valores com a enzima livre no processo de remoção de pentaclorofenol. Como resultado, na enzima imobilizada foi obtida a manutenção da atividade enzimática da HRP num período maior de tempo, maior resistência ao calor, além de possibilitar a reutilização da enzima, o que torna o processo de remoção do ponto de vista industrial muito atrativo e mais rentável.

#### 2.4 ENZIMOLOGIA APLICADA AOS PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO

Neste capítulo será tratado o embasamento puramente teórico sobre enzimas, nomenclatura, cinética e funcionamento. Todas as informações contidas neste capítulo foram extraídas de quatro fontes principais: LEHNINGER (2008), BLANCH e CLARK (1997), SHULER e KARGI (2002) e BORZANI (2001).

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica sendo a parte fundamental de todos os processos bioquímicos o que a torna um componente essencial em todos os sistemas vivos. As proteínas por sua vez são moléculas compostas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Os aminoácidos apresentam em sua fórmula química um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino (-NH<sub>2</sub>) e um radical R, conforme apresentado no esquema da Figura 3 abaixo:

Figura 3 – Representação esquemática do aminoácido.



Os aminoácidos são diferenciados de acordo com o grupo R ligado ao carbono assimétrico. Na natureza, são encontrados 20 aminoácidos, podendo-se citar como exemplos Glicina, Alanina e

Valina (R alifático não polar); Fenilalanina, Tirosina e Triptofano (R aromático).

Atuando em seqüências ordenadas, as enzimas catalisam centenas de reações que degradam as moléculas de nutrientes, conservam e transformam energia química. Através da ação de enzimas reguladoras, vias metabólicas são coordenadas para produzir uma interação de harmonia entre as diversas atividades necessária para a sobrevivência. A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por uma parte proteica, porém a ela podem estar integradas outras moléculas como carboidratos e lipídeos. A atividade catalítica da enzima depende da integridade e conformação da sua proteína nativa. A natureza e especificidade de sua atividade catalítica são determinadas pela estrutura tridimensional da proteína, originada da seqüência de aminoácidos no qual a enzima é constituída. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em suas subunidades, a atividade catalítica é normalmente perdida. Se uma enzima é dividida nos seus componentes aminoácidos, a sua atividade catalítica é sempre destruída. Assim, as estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias das enzimas proteicas são essenciais para a sua atividade catalítica.

A atividade de proteínas globulares pode ser regulada por uma ou mais moléculas pequenas de natureza não proteica, as quais causam mudanças na conformidade da estrutura enzimática. Estes componentes são denominados de cofatores. Os cofatores podem ser íons ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $K^+$  etc.), um complexo orgânico ou ainda uma molécula metalorgânica chamada de coenzima. Exemplos de coenzimas são os dinucleotídeos (NAD, NADP, FAD), Tiamina Pirofosfato e a coenzima A, entre outros. Algumas enzimas ainda necessitam a coenzima e um ou mais íons metálicos para atividade. A coenzima ou íon metálico que é fortemente ou mesmo covalentemente ligado à proteína da enzima é chamado de grupo prostético. A enzima cataliticamente ativa ligada com a coenzima e/ou íons metálicos são chamados de holoenzimas. A parte proteica de cada enzima é chamada de apoenzima ou apoproteína.

Há uma grande variedade de enzimas, a maioria delas são encontradas em pequena quantidade. Algumas são produzidas em grandes quantidades por certos microrganismos que a excretam para o meio externo. As enzimas extracelulares são capazes de digerir materiais nutritivos insolúveis, como celulose, proteínas e amido. Algumas dessas enzimas são usadas em alimentos, bebidas, laticínios, nas indústrias farmacêuticas, têxtil e de detergentes. Sua utilização é feita em processos biotecnológicos industriais, ajudando a reduzir a poluição,

muitas vezes substituindo processos químicos nefastos ao meio ambiente.

Enzimas apresentam alta especificidade por seus substratos e produtos bem maior do que os catalisadores químicos, de forma que em uma reação catalisada por enzimas há formação de apenas um tipo de produto.

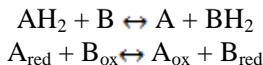
A atividade catalítica de muitas enzimas pode ser variada em resposta à alteração de substâncias chamadas de moduladores, que diferem em sua natureza dos substratos e produtos da reação. Na maioria das vias metabólicas, é comum que o produto final atue como modulador alostérico negativo da enzima que catalisa as primeiras reações da via. Portanto, quando a concentração deste produto fica aumentada ele vai agir como um inibidor alostérico, diminuindo a velocidade da via e a sua própria produção. Este mecanismo é denominado inibição por retroalimentação ou *feedback*. Caso o produto final comece a ser consumido e conseqüentemente sua concentração diminua ele vai deixar de inibir a via, fazendo com isso que a via tenha sua velocidade aumentada.

### **2.4.1 Classificação das enzimas**

Enzimas são classificadas em seis principais grupos, dependendo da natureza da reação catalisada. Um esquema numérico para enzimas foi desenvolvido pela comissão de enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB), no qual as principais classes são distinguidas pelo primeiro dos quatro dígitos. O segundo e o terceiro dígitos descrevem o tipo de reação catalisada, e o quarto dígito é empregado na distinção entre enzimas de mesma função com base no substrato catalisado na reação.

#### **2.4.1.1 Classe 1 – Oxidorredutases**

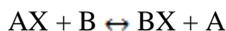
Estas enzimas catalisam a transferência de átomos de hidrogênio e oxigênio ou elétrons de um substrato para outro. Elas são chamadas geralmente de oxidases ou dehidrogenases com referência do que acontece com o substrato na reação como, por exemplo, a lactate dehidrogenase. O primeiro dígito (1.) desta classificação portanto indica a classe oxidorredutase; o segundo dígito indica o doador de átomo de hidrogênio ou elétron envolvido. O terceiro dígito descreve o aceptor de átomo de hidrogênio ou elétron.



<b>Primeiro dígito</b>	<b>Segundo dígito</b>	<b>Terceiro dígito</b>
1. (Oxidorreductase)	1 álcool CH-OH	1 NAD <sup>+</sup> ou NADP <sup>+</sup>
	2 aldeído ou cetona C=O	2 Fe <sup>3+</sup>
	3 alceno C=C	3 O <sub>2</sub>
	4 amina primeira R-NH <sub>2</sub>	4 outros
	5 amina secundária R <sub>1</sub> -NH-R <sub>2</sub>	
	6 NADH ou NADPH	

#### 2.4.1.2 Classe 2 – Transferases

Transferases catalisam reação de transferência de grupamentos, da forma geral apresentada abaixo. No entanto, reações de hidrolase e oxidorreductase estão excluídas, pois já foram classificadas acima.

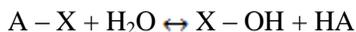


O segundo dígito indica o tipo geral de grupo transferido e o terceiro dígito fornece detalhes da natureza exata do grupo transferido.

<b>Primeiro dígito</b>	<b>Segundo dígito</b>	<b>Terceiro dígito</b>
2. (Transferases)	1 grupo com um carbono	Natureza do grupo transferido
	2 aldeído ou cetona C=O	
	3 grupo acil (-CO-R)	
	4 grupo glicosil	
	5 grupo fosfato	
	6 enxofre contendo grupos	

#### 2.4.1.3 Classe 3 – Hidrolase

Hidrolases catalisam reações de hidrólise, com o segundo dígito indicando tipo de ligação hidrolisada.



<b>Primeiro dígito</b>	<b>Segundo dígito</b>
3. (Hidrolases)	1 éster
	2 ligações glicosídicas
	4 ligações peptídicas
	5 Outras ligações C-N exceto peptídeos
	6 Anidridos ácidos

#### 2.4.1.4 Classe 4 – Liases

Liases catalisam a remoção de grupos não hidrolíticos dos substratos. Na maioria das vezes o produto possui dupla ligação. O segundo dígito se refere ao tipo de ligação quebrada. O terceiro dígito descreve o grupo removido. Também estão incluídas nesta classe as enzimas que agem na direção reversa do grupo de remoção. Estas são normalmente conhecidas como *sintetases* ou *hidratases*, ou seja, reações na qual grupos são adicionados através da ligação dupla.

<b>Primeiro dígito</b>	<b>Segundo dígito</b>	<b>Terceiro dígito</b>
4. (Liases)	1 C-C	1 Carboxil
	2 C-O	2 Aldeído
	3 C-N	3 Ácido acético
	4 C-S	

#### 2.4.1.5 Classe 5 – Isomerase

As Isomerases catalisam a transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros. O segundo dígito da

classificação descreve o tipo de reação envolvida. O terceiro dígito descreve o tipo de molécula que esta sofrendo isomerização

<b>Primeiro dígito</b>	<b>Segundo dígito</b>	<b>Terceiro dígito</b>
5. (Isomerases)	1 Racemização ou epimerização	1 aminoácido
	2 cis-trans isomerização	2 Hidroxiácidos
	3 oxidorredutase intramolecular	3 Carboidratos
	4 reações de transferência intramolecular	

#### 2.4.1.6 Classe 6 – Ligases

Ligases catalisam a síntese de vários tipos de ligação, onde as reações são acopladas com a utilização da energia contida nos materiais, como a ATP ou nucleotídeo trifosfato, ou seja, as Liases acabam formando duas novas moléculas a partir da ligação de duas pré-existentes, sempre à custa de energia. O segundo dígito indica o tipo de ligação formada.



ou



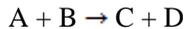
<b>Primeiro dígito</b>	<b>Segundo dígito</b>
6. (Ligases)	1 C-O
	2 C-S
	4 C-N
	5 C-C

#### 2.4.2 Reações catalisadas por enzimas

Para reagirem, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e com a quantidade de energia que

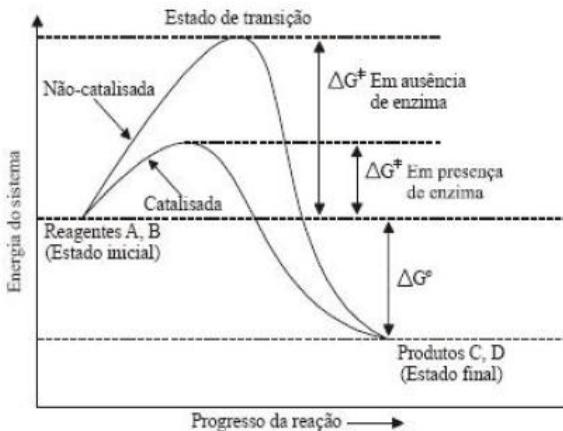
lhes permitam formar o complexo ativado, denominado estado de transição que representa os reagentes em seu estado ativado.

Para atingir o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como energia de ativação ( $E_a$ ) ou mais comum em bioquímica energia livre de ativação,  $\Delta G^\ddagger$  (o símbolo ( $\ddagger$ ) indica o processo de ativação). Sob condições adequadas, a velocidade das reações pode ser aumentada pela redução da energia livre de ativação conseguida pela ação de enzimas. A comparação do perfil energético das reações catalisadas e não catalisadas é mostrada através no gráfico da Figura 4 para uma reação hipotética:



O estado de transição no gráfico corresponde ao ponto de mais alta energia da reação não-catalisada e é a medida da energia livre de ativação,  $\Delta G^\ddagger$ . Ou ainda,  $\Delta G^\ddagger$  pode ser expresso como sendo a energia livre do estado de transição subtraída da energia livre dos reagentes. No estado de transição do sistema (complexo ativado), os reagentes estão em forma intermediária de alta energia e não podem ser identificados nem como reagentes nem como produtos. O complexo do estado de transição pode ser decomposto em produtos ou voltar aos reagentes.

Figura 4 - Diagrama energético de reação catalisada e de reação não catalisada.  $\Delta G^\ddagger$  = energia livre de ativação.  $\Delta G^0$  = Energia livre de formação padrão. A diferença entre os valores da energia de ativação de uma reação catalisada e de uma reação não-catalisada indica a eficiência do catalisador.



A velocidade de uma reação é inversamente proporcional ao valor de sua energia livre de ativação, ou seja, quanto maior o valor de  $\Delta G^+$ , menor será a velocidade da reação. Os catalisadores aumentam a velocidade da reação reduzindo a energia livre de ativação. A velocidade de uma reação pode aumentar na ordem de  $10^6$  a  $10^{12}$  vezes mais do que a reação correspondente não-catalisada. Embora a enzima participe da sequência da reação, ela não sofre nenhuma transformação. Portanto, poucas moléculas de enzima são capazes de catalisar a conversão de milhares de moléculas de substrato a produto.

O motivo das enzimas conseguirem diminuir drasticamente a energia de ativação pode ser explicada por dois fatos: O primeiro é o rearranjo das ligações covalentes ocorridas durante uma reação enzimática. Reações químicas diversas ocorrem entre substratos e grupos funcionais das enzimas (cadeias laterais de aminoácido, íons metálicos e coenzimas). Grupos funcionais catalíticos na enzima podem formar uma ligação covalente transiente com o substrato e ativar a reação, ou um grupo pode ser transferido do substrato para enzima. Em muitos casos, estas reações ocorrem somente no sítio ativo da enzima. Interações covalentes entre enzimas e substrato diminuem a energia de ativação, fornecendo como alternativa uma forma de reação de baixa energia.

A segunda parte da explicação está nas interações não covalentes entre enzima e substrato. Grande parte da energia necessária para se diminuir a energia de ativação é derivada das interações fracas e não covalentes entre o substrato e a enzima. O que realmente diferencia as enzimas dos outros catalisadores inorgânicos é a formação do complexo específico enzima-substrato ou [ES]. A interação entre substrato e enzima no complexo é mediada pelas mesmas forças que estabilizam a estrutura proteica, incluindo pontes de hidrogênio e ligações hidrófobas e iônicas. A formação de cada interação fraca no complexo [ES] é acompanhada pela liberação de uma pequena quantidade de energia livre que fornece um grau de estabilidade para a interação.

A energia derivada da interação enzima-substrato é chamada de energia de ligação. Esta, por sua vez, é a maior fonte de energia livre usada pelas enzimas para baixar a energia de ativação das ligações. Dois princípios fundamentais e inter-relacionados fornecer uma explicação geral de como as enzimas utilizam a energia de ligação não covalente: (1) Muito do poder catalítico das enzimas é derivado da energia livre liberada na formação de muitas ligações fracas e interações entre a enzima e seu substrato. Esta energia de ligação contribui tanto para a especificidade como para a catálise. (2) Interações fracas são otimizadas

no estado de transição de reação; os sítios ativos enzimáticos são complementares não só aos substratos, mas também aos estados de transição através do qual passam os substratos e como eles são convertidos em produtos durante uma reação enzimática.

### **2.4.3 Mecanismo e modelos de reação entre enzimas e substrato**

Há uma correlação entre a estrutura das proteínas que fazem parte da molécula enzimática e suas propriedades biológicas, e esta propriedade leva a uma especificidade extraordinariamente alta e reproduzível.

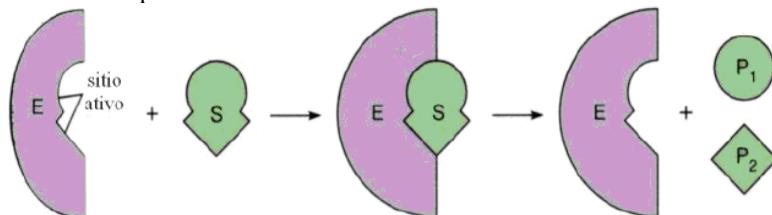
Esta especificidade pode ser relativa a somente um substrato ou a vários substratos ao mesmo tempo. Sua existência deve-se à presença, na molécula da enzima, de um local denominado sítio ativo de ligação. O sítio ativo de ligação de uma enzima é dado por um arranjo tridimensional especial dos aminoácidos de uma determinada região da cadeia polipeptídica, geralmente complementar à molécula do substrato.

A especificidade varia de uma enzima em relação à outra, podendo ser de especificidade baixa, quando a mesma está ligada apenas a tipos deligação, como certas peptidases (ligações peptídicas), fosfatases (ligações fosfato-éster) e estearases (ligações carboxi-éster, podendo-se citar a lípase que hidrolisa as ligações ácido-álcool de quase todos os ésteres orgânicos) ou de especificidade absoluta, quando a enzima atua somente em um único composto, como a urease que hidrolisa a ureia, mas nenhum de seus derivados e a tripsina que hidrolisa apenas ligações peptídicas formadas por grupos carboxílicos dos aminoácidos básicos.

Outro aspecto importante em termos da especificidade enzimática é a sua estéreo-especificidade com relação ao substrato, ou seja, a especificidade ótica em relação aos isômeros D e L dos aminoácidos. Como as proteínas enzimáticas são formadas basicamente por L-aminoácidos, as enzimas hidrolisam apenas ligações peptídicas de L-aminoácidos.

Observando a todas estas características relativas à especificidade da enzima com o substrato foram desenvolvidas algumas hipóteses para explicar o funcionamento da reação enzimática. Emil Fischer propôs em 1894 um modelo “template” ou da analogia “chave-fechadura” o qual considera que as enzimas possuem uma região denominada de sítio ativo que por sua vez é complementar a molécula de substrato em tamanho, forma e natureza química, como demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Esquema demonstrando hipótese do modelo chave-fechadura desenvolvido por Fischer.

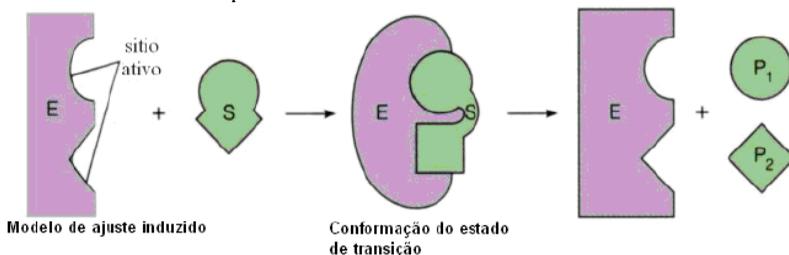


Modelo Chave / fechadura

FONTE: FORGIARINI, 2006.

A noção moderna de catálise enzimática, inicialmente proposta por Michael Polanyi (1921) e Haldane (1930), foi elaborada por Linus Pauling em 1946: para catalisar reações, uma enzima deve ser complementar ao estado de transição da reação. Isto significa que as ótimas interações entre substrato e enzima ocorrem apenas no estado de transição. Em 1958, Koshland propôs o modelo do ajuste induzido para explicar o poder catalítico e especificidade apresentada por enzimas. Segundo esta teoria, em alguns casos, o sítio ativo adota a conformação adequada somente na presença do substrato e a união do substrato ao sítio ativo da enzima desencadeia uma troca conformacional (arranjo espacial dos grupamentos R dos aminoácidos) que dá lugar a formação de produto, ou seja, o modelo do ajuste induzido prevê um sítio de ligação não totalmente rígido na sua estereoquímica, mas sim moldável à molécula do substrato.

Figura 6 – Esquema demonstrando hipótese do modelo de ajuste induzido desenvolvido por Koshland.



Modelo de ajuste induzido

Conformação do estado de transição

FONTE: FORGIARINI, 2006.

#### 2.4.4 Cinética aplicada às reações enzimáticas

A cinética procura, através do estudo do mecanismo da reação catalisada por enzima, determinar a taxa de reação e como ela responde a mudanças efetuadas nos parâmetros experimentais. É um dos mais antigos e importantes estudos realizados para se entender o mecanismo da reação enzimática, sendo possível através deste estudo determinar os seguintes parâmetros importantes para um projeto:

- Medir as velocidades das transformações (consumo de reagente, ou produção de produto) que acontecem com o decorrer do tempo;
- Estudar a influência das principais variáveis de processo (pH, temperatura, concentração de substratos, enzima e demais reagentes, concentrações de inibidores ou ativadores) na taxa de reação;
- Correlacionar através de modelos matemáticos ou equações empíricas, as velocidades de transformações com fatores que a afetam;
- Otimização de processo, através da determinação das melhores condições para ser efetuada a reação;
- Geometria e melhor adequação do reator e do espaço físico necessário para realizar a reação enzimática bem como os principais critérios e requisitos necessários para o controle do processo.

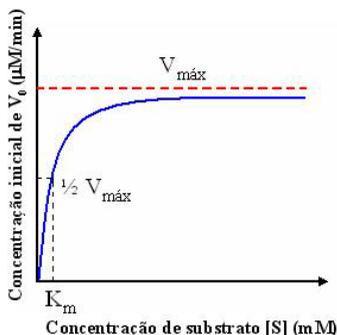
Um dos fatores chaves que alteram a taxa de reação catalisada por uma enzima é a concentração de substrato,  $[S]$ . No entanto, o estudo dos efeitos da concentração de substrato é complicado pelo fato de que  $[S]$  varia durante o curso de uma reação à medida que o substrato é convertido em produto. Uma forma de simplificar esta abordagem nos experimentos cinéticos é medir a velocidade inicial da reação ( $V_0$ ), quando  $[S]$  for muito maior do que a concentração de enzima.

Se o começo do experimento cinético for monitorado num tempo de reação suficientemente curto (60 segundos ou menos), as mudanças da  $[S]$  serão negligenciáveis, podendo ser considerada como uma constante.

O efeito provocado em  $V_0$  pela variação da  $[S]$ , quando a concentração de enzima é mantida constante está mostrado na Figura 7. Em concentrações pequenas do substrato,  $V_0$  aumenta de forma quase linear com os aumentos de  $[S]$ , sendo a reação de primeira ordem em relação ao substrato. Em concentrações maiores de substrato  $V_0$  aumenta por incrementos menores em respostas aos aumentos da  $[S]$ , neste momento não há uma ordem de reação definida. Finalmente, é alcançado um ponto acima do qual ocorrem apenas aumentos

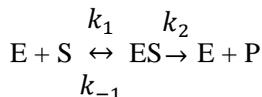
insignificantes em  $V_0$ , mesmo diante de aumentos em  $[S]$ , sendo este ponto chamado de velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), neste momento a reação passa a ser de ordem zero já que o não há mais aumento aparente da velocidade com o incremento de  $[S]$ .

Figura 7 – Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima.



FONTE: LEHNINGER, 2008.

O perfil da cinética de reação apresentado na Figura 7 levou Victor Henri a propor, em 1903 que uma enzima se combina à molécula de seu substrato para formar o complexo ES, sendo este um passo obrigatório no processo catalítico enzimático. Esta ideia foi expandida em uma teoria geral da ação das enzimas, especialmente por Leonor Michaelis e Maud Menten, em 1913. Eles propuseram que a enzima primeiramente combina-se reversivelmente com o substrato, para formar o complexo enzima-substrato, em um passo reversível relativamente rápido, seguindo logo após para um passo mais lento, no qual o complexo ES se rompe com o reaparecimento da enzima livre e formação do produto da reação P:



A segunda etapa da reação onde há formação de produto é mais lenta e, portanto, limita a velocidade da transformação global do reagente em produto. Disto resulta que a velocidade da reação enzimática deve ser proporcional à concentração do complexo ES. Em qualquer instante de uma reação, a enzima existe em duas formas, a não

ligada ao substrato, ou a forma livre E, e a forma ligada ES. A velocidade máxima da reação ( $V_{\max}$ ) será atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na formado complexo ES, e a concentração da enzima livre E for insignificante. Neste caso, diz-se que a enzima está “saturada” com o substrato e a velocidade da reação não aumenta mais com os aumentos de [S]. Em solução contendo um excesso de substrato, haverá um período cinético inicial chamado de estado pré-estacionário, ocorrendo o crescimento da concentração de ES. O estado pré-estacionário é, usualmente, de duração muito curta. A reação atinge o estado estacionário muito rapidamente e a concentração do complexo [ES] permanecerá praticamente constante durante o decorrer do tempo.

A partir do modelo de reação enzimática proposto por estes pesquisadores, seguindo a ideia de que nas reações enzimáticas, o passo limitante da velocidade é a quebra do complexo ES para formar o produto e a enzima livre, foi desenvolvida por Michaelis e Menten uma equação que permite demonstrar como a velocidade de reação varia em função da concentração do substrato:

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

$$\text{Onde: } V_{\max} = k_2[E_0] \text{ e } K_m = \frac{k_2+k_{-1}}{k_1}$$

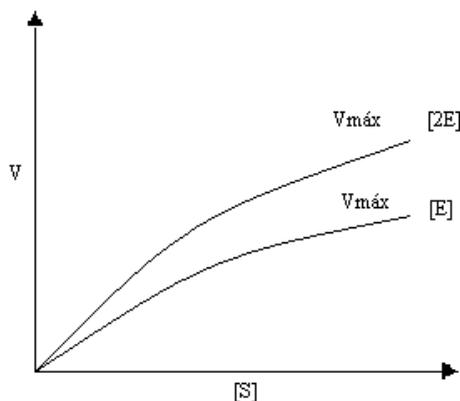
Uma relação numérica importante é obtida da Equação de Michaelis-Menten num caso especial, quando  $V_0$  é exatamente metade de  $V_{\max}$  (Figura 7). Então:

$$K_m = [S] \rightarrow V_0 = \frac{1}{2}V_{\max}$$

Ou seja,  $K_m$  é equivalente à concentração de substrato na qual  $V_0$  é igual à metade de  $V_{\max}$ , e indica a “afinidade” de uma enzima pelo seu substrato. Quanto menor for o valor de  $K_m$ , maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

$V_{\max}$  é proporcional à concentração enzimática [E] e dependente da constante  $k_2$ . Esta constante por sua vez é o limitante da velocidade para a reação do tipo Michaelis-Menten. A dependência de  $V_{\max}$  com a concentração enzimática inicial  $[E_0]$  é demonstrada no gráfico da Figura 8.

Figura 8 – Efeito da concentração inicial de enzima  $[E_0]$  na velocidade máxima  $V_{m\acute{a}x}$ .



FONTE: LEHNINGER, 2008.

### 2.4.5 Influência do pH na ação enzimática

As enzimas possuem um pH ótimo para qual sua atividade é máxima. Valores maiores ou menores podem afetar a enzima fazendo com que a sua atividade diminua. Isto se deve ao fato de que basicamente as cadeias laterais de aminoácidos que compõem a enzima, necessitam estar num certo estado de ionização para desempenhar funções essenciais de manutenção da proteína e manter sua estrutura.

Algumas enzimas ainda possuem grupos iônicos nos seus sítios ativos, e estes grupos iônicos devem estar numa forma adequada (ácido ou base) para realizarem sua função. Grandes perturbações do pH do meio resultam em grandes mudanças na forma iônica do sítio ativo o que acaba impactando em alterações na atividade enzimática e, conseqüentemente, na velocidade da reação. Por estas razões, as enzimas são ativas somente num certo intervalo de pH. O pH do meio pode afetar além da velocidade máxima de reação,  $K_m$ , e a estabilidade da enzima.

Em alguns casos, o substrato ainda pode conter grupos iônicos, e o pH do meio acaba afetando também a afinidade do substrato com a enzima.

### **2.4.6 Influência da temperatura na ação enzimática**

Semelhante aos catalisadores químicos, a atividade das enzimas também variam com a temperatura, porém diferentemente dos catalisadores químicos a faixa de temperatura no qual as enzimas demonstram atividade é mais limitada. À medida que se eleva a temperatura, dois efeitos ocorrem simultaneamente: a taxa de reação aumenta, como se observa na maioria das reações químicas, por aumentar a energia cinética das moléculas e a estabilidade da proteína decresce devido à desativação térmica. Temperaturas mais altas levam à desnaturação da enzima por alterarem as ligações químicas que mantêm sua estrutura. Ligações como as pontes de hidrogênio, são extremamente afetadas gerando grande quantidade de alterações estruturais na enzima, o que leva a uma nova conformação ou a um estado de estrutura indefinida.

Enzimas de baixo peso molecular compostas de uma única cadeia polipeptídica e possuindo pontes dissulfetos são geralmente mais estáveis ao calor do que enzimas oligoméricas, de alto peso molecular. Somente uma pequena quantidade de enzimas exibe atividade em temperaturas maiores que 100 °C. Enzimas obtidas de termófilos possuem uma estabilidade térmica diferenciada podendo operar em altas temperaturas (acima de 100 °C se o sistema for pressurizado). Neste caso a desnaturação térmica resulta numa ótima temperatura para a função enzimática.

### **2.4.7 Atividade enzimática**

A atividade é a quantidade de substrato que em uma dada reação enzimática é convertida em produto por unidade de tempo em condições determinadas. A atividade pode ser avaliada tanto em relação ao consumo de substrato quanto à produção de produto.

Devido à grande variedade existente de enzimas a dosagem de atividade catalítica é imprescindível tanto para monitorar a purificação quanto para controle de um determinado processo. Isto se deve principalmente ao fato de que o monitoramento da concentração de proteínas por si só não garante que a enzima seja útil para ser utilizada em uma reação catalítica já que numa solução de enzima desnaturada, por exemplo, não há nenhuma atividade enzimática, mas a massa proteica é conservada. Além disso, desnaturações parciais podem levar duas soluções de mesma concentração enzimática a ter atividades muito diferentes.

Devido à especificidade das enzimas em relação a um determinado substrato a medida da atividade é possível de ser efetuada mesmo em presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substrato o que garante a velocidade máxima (ordem zero) impedindo que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas realizadas.

No processo de medida de atividade enzimática, a concentração, seja de produto produzido ou de substrato consumido, tende a variar linearmente somente num dado intervalo de tempo no qual a velocidade é constante. Neste intervalo onde a velocidade varia linearmente com o tempo é definida a atividade enzimática, pois transcorrido este intervalo, a velocidade começa a decrescer devido a vários fatores que podem afetar a reação (inativação da enzima diminuição da quantidade de substrato disponível, inibição ocorrida pelo produto formado na reação, deslocamento do equilíbrio no caso da reação ser reversível) influenciando a medida da atividade catalítica em relação à velocidade da reação.

A atividade enzimática é expressa em Unidades Internacionais. Segundo a *Enzyme Commission*, “uma unidade de atividade (U) é definida como sendo a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato ou a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de produto por minuto”, nas estabelecidas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato).

A atividade enzimática de uma preparação impura é expressa em termos de U/mL. A atividade específica é o número de unidades de atividades da enzima por miligramas de proteína (U/mg). A atividade específica é utilizada no processo de purificação para avaliar se o procedimento adotado eliminou as substâncias indesejáveis.

#### **2.4.8 Peroxidase de raiz-forte (HRP)**

A raiz forte (*Armoracia rusticana*) é uma erva perene forte cultivada em regiões temperadas do mundo, principalmente pelo valor culinário de suas raízes (Figura 9). É também uma fonte rica de peroxidase, uma enzima contendo grupo heme que utiliza peróxido de hidrogênio para oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. A produção de peroxidase de raiz forte ocorre numa escala relativamente grande devido às utilizações comerciais da enzima, por exemplo, como um componente de kits de diagnóstico clínicos e para imunoenaios. Embora o termo peroxidase de raiz forte seja pouco

usado genericamente, a raiz da planta contém um número de isoenzimas (enzimas semelhantes que possuem diferentes formas moleculares mas que catalisam a mesma reação) de peroxidase distintos do qual se destaca a isoenzima C (HRP C) por ser a mais abundante (VEITCH, 2004).

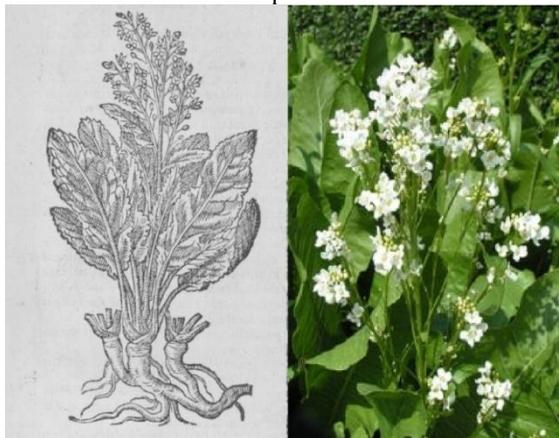
As peroxidases podem ser englobadas em dois grupos principais: as ferropoteínas e as flavonóides. As enzimas englobadas no primeiro grupo (ferropoteínas) podem ainda ser subdivididas em dois grupos distintos nomeados de peroxidases ferriprotoporfirinas e verdoperoxidases (PINTO, 2008).

No grupo que engloba as ferriprotoporfirinas, encontram-se as peroxidases de plantas superiores, estas se caracterizam por possuírem a ferriporfirina IX, e por isso quando purificadas, apresentam cor castanha. A ferriporfirina IX gera a estas peroxidases picos de absorção máxima em diversos comprimentos de onda, 403, 497, 641,5 nm e a 208 e 275 nm devido a resíduos de tirosina, triptofano e fenilalamina. O RZ (Reinhetszahl) é o valor da razão entre a absorção a 403 e 208 nm, este valor é utilizado para indicar a pureza de uma preparação de peroxidase. O valor de RZ tem desvantagens, tais como, o fato de ser diferente para peroxidases provenientes de fontes distintas, este valor varia entre 2,50 e 4,19 para as diversas formas da raiz forte, este mesmo valor refere-se à pureza da enzima como proteína e não à sua atividade. (PINTO, 2008).

O grupo prostético das verdoperoxidases é também constituído por um núcleo porfirínico contendo um íon ferro III, no entanto, este grupo difere da ferriprotoporfirina IX. As verdoperoxidases podem ser encontradas nos animais e no leite, quando purificadas apresentam cor verde, devido à sua absorbância máxima se encontrar entre 570 e 690 nm. As flavoproteínas podem ser encontradas em microrganismos, em diferentes bactérias do gênero *Streptococcus* e em tecidos animais, e têm como grupo prostético o dinucleótido de adenina e flavina (FAD). (PINTO, 2008).

Mais de 15 isoenzimas de HRP foram detectadas e classificadas em três grupos como enzimas ácidas, neutras ou básicas. Pouco se sabe sobre suas atividades relativas e, apesar de catalisarem as mesmas reações, diferem entre si profundamente quanto às propriedades cinéticas e físico-químicas. Considera-se que as enzimas utilizadas comercialmente são constituídas por apenas uma isoenzima, ou que as atividades das principais isoenzimas presentes são basicamente as mesmas, e que as demais não interferem na atividade total. (FORGIARINI, 2006) e (VEITCH, 2004).

Figura 9 – Ilustração da raiz forte, fonte da enzima Horseradish peroxidase. Esta planta é caracterizada principalmente por ter raiz longa e espessa, de cor branca e sabor picante. As mesmas raízes também são uma das fontes mais importantes da enzima heme contendo peroxidase.



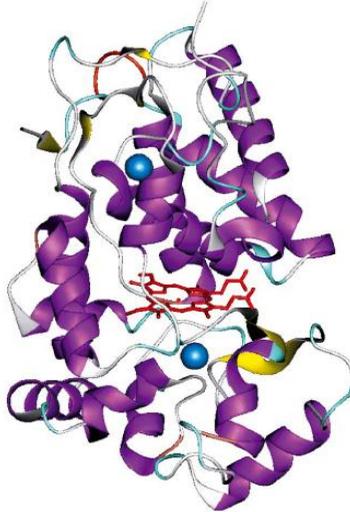
FONTE: VEITCH, 2004.

A peroxidase de raiz forte (EC 1.11.1.7) faz parte do grupo das peroxidases. É uma glicoproteína heme que contém ferro (III) protoporfirina IX como o grupo prostético. Esta é uma oxidorreductase que possui massa molecular de 40000 g/mol com uma parte proteica (apoenzima) de aproximadamente 34000 g/mol, que catalisa a redução de peróxidos, tais como peróxido de hidrogênio e a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. A atividade de peroxidase foi identificada em plantas, microrganismos e animais, onde exerce papel importante, podendo ser classificada com base na superfamília a que pertencem. Esta divisão tem como base a origem da peroxidase, origem animal ou origem vegetal. Existem três classes distintas de peroxidases, classe I que engloba as peroxidases intracelulares, classe II que é constituída por peroxidases fúngicas extracelulares, classe III onde pertencem as peroxidases vegetais extracelulares. A distinção entre as classes foi inicialmente baseada na comparação de sequências de aminoácidos, sendo atualmente baseada em dados da estrutura tridimensional. A HRP faz parte da classe III. Nas plantas ela participa no processo de lignificação e no mecanismo de defesa em tecidos danificados fisicamente ou infectado. (HAMID e REHMAN, 2009; FORGIARINI, 2006 e PINTO, 2008).

A HRP contém dois tipos diferentes de centro metálico, sendo um o “grupo prostético heme” e outro constituído por 2 átomos de cálcio

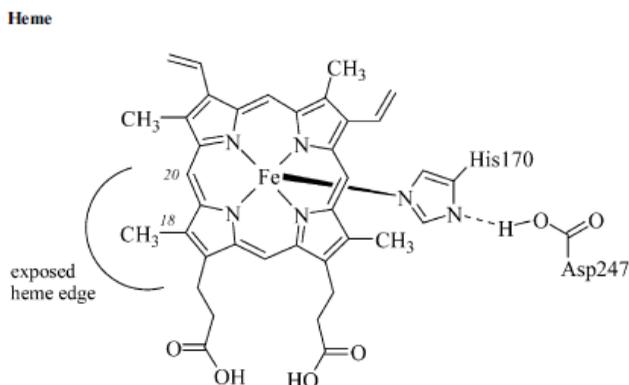
(Figura 10). Ambos são essenciais para a integridade estrutural e funcional da enzima. A perda de cálcio resulta em uma queda de atividade e estabilidade térmica. Os sítios de ligação do átomo de cálcio são localizados nas posições próximas e afastadas do plano heme e são ligados a ele por uma rede de pontes de hidrogênio. O grupo Heme por sua vez é associado à enzima pelo resíduo de Hist170 através de ligações coordenadas entre a cadeia lateral da histidina e o átomo de ferro heme (5° ligante), o grupamento carboxilato da cadeia lateral do resíduo de (Asp247) ajuda a controlar o caráter imidazolato do anel Hist170 (Figura 11) (VEITCH, 2004).

Figura 10 – Representação da estrutura física tridimensional cristalina da HRP. O grupo heme (vermelho) está localizado entre os domínios próximos e distantes no qual cada um dos átomos de cálcio está contido (esferas azuis).  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha são representadas em amarelo e roxo respectivamente.



FONTE: VEITCH, 2004.

Figura 11 – Representação estrutural do grupo prostético heme da enzima HRP. Hist170 liga o grupo heme ao restante da enzima e o Asp247 controla o caráter imidazolato do anel Hist170.



FONTE: VEITCH, 2004.

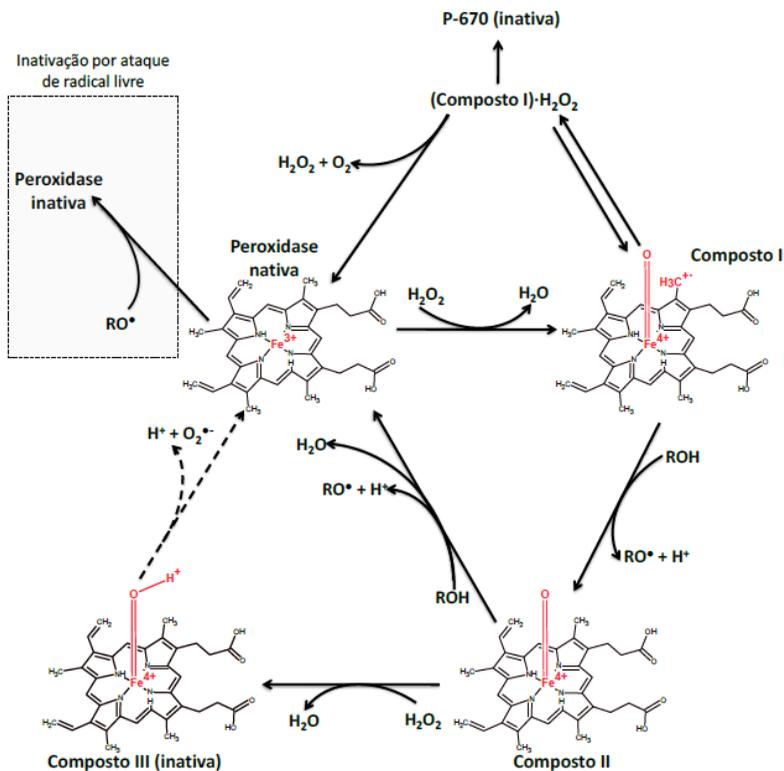
Forgiarini (2006) citando Adler *et al.* (1994) relata que o papel das peroxidases de origem microbiológica na polimerização de ácidos fenólicos é reconhecidamente o de transformação de substâncias aleloquímicas (substâncias que inibem ou estimulam o crescimento da planta) em substâncias estáveis e não tóxicas. Na superfície das raízes de diversas plantas, inclusive da raiz forte, as enzimas atuam como primeira linha de defesa contra o ataque por organismos e aleloquímicos secretados por outras plantas vizinhas. O mecanismo proposto foi o de minimização da absorção de compostos tóxicos (como fenóis e aminas aromáticas) para o interior da planta, através da sua precipitação na interface das raízes com o solo.

Estas reações envolvidas na remoção de poluentes pela HRP foram estudadas por Dunford (1991), o qual representou o modelo da cinética de reação como sendo uma cinética estilo ping-pong modificado (WU *et al.*, 1998). A HRP catalisa a oxidação de muitos compostos aromáticos utilizando peróxido de hidrogênio através de um processo que envolve um ciclo de mudanças no estado de oxidação do átomo de ferro localizado no sítio catalítico da enzima. (NICELL *et al.*, 1995). O mecanismo de reação ping-pong proposto por Dunford (1991) está representado pela Figura 12.

O ciclo catalítico da enzima consiste nas seguintes etapas: (i) a enzima férrica nativa é inicialmente oxidada por  $H_2O_2$ , gerando o composto I, deficiente em dois elétrons, sendo um elétron abstraído do

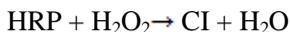
íon  $\text{Fe}^{3+}$  e outro do anel porfirínico, gerando, respectivamente,  $\text{Fe}^{4+}$  e radical cátion porfirínico; (ii) em seguida, o composto I oxida um substrato doador de elétron, formando o composto II, um intermediário deficiente em um elétron, ambos o composto I e o composto II são oxidantes fortes, com potencial de redução próximos a +1 V; (iii) o composto II pode oxidar outra molécula de substrato e, com isso, a enzima retorna ao seu estado nativo. As moléculas de substrato oxidadas (radicais fenóxi) podem por via não enzimática reagirem entre si, com proteínas e com formaldeído formado durante a reação para formar estruturas poliméricas insolúveis. As duas primeiras reações (enzima férrica com peróxido de hidrogênio e composto I com substrato redutor) são cerca de 10 vezes mais rápidas que a reação do composto II; (iv) o composto II ainda pode reagir com  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultando no composto III, uma forma de peroxidase com atividade reduzida. A peroxidase também pode ser irreversivelmente inativada por meio do ataque de radicais livres e pela reação do composto I com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando proteínas verdo-heme (P-670) (MESTER e TIEN, 2000; VEITCH, 2004 e NICELL *et al.*, 1995).

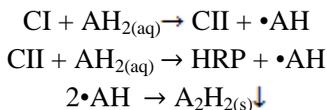
Figura 12 - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e as diferentes formas possíveis de inativação da HRP. A enzima é inicialmente oxidada por  $H_2O_2$ , gerando o composto I, que oxida um substrato fenólico. O composto II formado oxida outro substrato, e com isso a enzima retorna ao seu estado nativo. A peroxidase pode ser convertida em formas inativas por meio da reação do composto I com  $H_2O_2$ , formando proteínas verdoheme (P-670) ou por meio do ataque de radicais livres resultando no composto III.



FONTE: MELO, 2010.

Uma representação geral das reações químicas envolvidas no mecanismo catalítico da reação da HRP com compostos aromáticos podem ser apresentadas abaixo conforme demonstrado por Nicell *et al.* (1995):





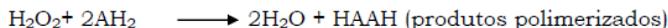
Onde CI, CII são os compostos I, II respectivamente,  $\bullet\text{AH}$  representa o composto aromático oxidado e  $\text{A}_2\text{H}_{2(\text{s})}$  é o composto aromático na forma polimerizada (dímero).

Os polímeros que permanecem solúveis na reação podem ser oxidados novamente, resultando na formação de cadeias poliméricas mais longas ( $\text{A}_3\text{H}_3$ ,  $\text{A}_4\text{H}_4$  etc.) o que gera um aumento na redução da solubilidade (NICELL *et al.*, 1995).

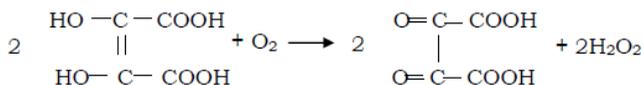
A peroxidase basicamente catalisa quatro diferentes tipos de reações, a peroxidativa, a oxidativa, a catalática e a de hidroxilação (PINTO, 2008). As reações estão demonstradas na Figura 13.

Figura 13 – Esquema demonstrando reações catalisadas pela enzima peroxidase.

**Peroxidativa:**



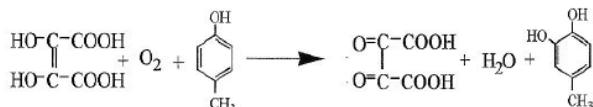
**Oxidativa:**



**Catalática:**



**Hidroxilação:**



FONTE: (PINTO, 2008).

A reação peroxidativa é normalmente considerada a mais importante, onde diferentes compostos podem atuar como doadores de hidrogênio, incluindo fenóis e aminas aromáticas entre outros. A reação oxidativa pode ocorrer na ausência do peróxido de hidrogênio, no

entanto, necessita da presença de oxigênio e cofatores (mangânês e fenol). A hidroquinona, o ácido dihidroxifumárico e o ácido ascórbico, são os substratos possíveis de serem tratados neste tipo de reação. A reação catalática é caracterizada pela ausência de substrato doador de hidrogênio, obrigando assim a peroxidase a funcionar como catalase, catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, esta reação é pelo menos 1000 vezes mais lenta que as reações anteriores. A reação de hidroxilação produz derivados do catecol a partir de derivados do fenol e oxigênio, sendo necessário para tal um doador de hidrogênio. A peroxidase hidroxila vários compostos aromáticos, entre eles a tirosina, a fenilalanina, o p-cresol e os ácidos benzóicos e salicílico. (PINTO, 2008).

A natureza desses produtos solúveis e insolúveis formado pelo processo de polimerização deve ser analisada, pois segundo Aitken *et al.* (1994), a característica destes produtos (peso molecular e toxicidade) variam dependendo da natureza do fenol contido no poluente, da fonte da enzima e do pH da reação. Os autores chegaram à conclusão que de modo geral a natureza dos produtos que foram produzidos no tratamento de uma água residual específica não pode ser prevista. Wagner e Nicell (2002) compararam a toxicidade existente nos produtos de reação da PPCE com vários aditivos diferentes. Em sua pesquisa foi reportado que a adição de alguns aditivos pode tornar os produtos da reação mais tóxicos, e que o grau de toxicidade além de outras variáveis depende também da forma que a reação é conduzida (batelada, contínua ou semi-contínua).

Neste trabalho de pesquisa, é apresentada a influência da atividade enzimática na remoção de fenol utilizando enzima HRP de baixa pureza, de uma fonte ainda não presente na literatura (Toyobo do Brasil). Tal fato acaba por impactar diretamente nos parâmetros envolvidos na reação de PPCE, bem como nos resultados de remoção de fenol obtidos. Além disso, o trabalho contribui com resultados de testes de toxicidade nos produtos do meio reacional, efetuados com alga *Scenedesmus subspicatus* e varredura de espectro IR para caracterização do precipitado formado durante a reação enzimática, testes os quais ainda não são reportados na literatura.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os reagentes, acessórios e equipamentos utilizados nos experimentos, as condições experimentais do estudo realizado da PPCE e as técnicas analíticas que foram empregadas para determinação de fenol, proteína e da atividade enzimática.

Todos os experimentos e calibrações foram realizados em triplicatas de modo a estimar o erro experimental associado a cada medida.

#### 3.1 LOCALIZAÇÃO

O trabalho foi realizado no LABMASSA - Laboratório de Transferência de Massa – do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### 3.2 MATERIAIS

Os reagentes fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico dihidratado, fenol sólido ( $\geq 99\%$ ), 4-aminoantipirina (AAP), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS), ferricianeto de potássio ( $K_3Fe[CN]_6$ ), bicarbonato de sódio foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Peróxido de hidrogênio a 30% (v/v) e carbonato de sódio foram adquiridos da VETEC.

A enzima HRP de baixa pureza empregada nos experimentos foi doada pela empresa Toyobo do Brasil. As principais propriedades da enzima são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades da enzima Horseradish Peroxidase

RZ	0,6
Estabilidade	Estável a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ , por pelo menos um ano
Massa Molecular	Aproximadamente 40 kDa
pH Ótimo	6 – 7
Temperatura Ótima	$45\text{ }^\circ\text{C}$

Estabilidade em pH 5 – 10

Estabilidade Térmica Abaixo de 50 °C

---

FONTE: TOYOBO DO BRASIL, 2011.

Mais dados sobre a enzima podem ser encontrados no Anexo A.

A enzima foi utilizada em solução aquosa com tampão fosfato pH 7,4 e estocada em temperatura de 4 °C. Antes de cada experimento a enzima foi homogeneizada e foram realizados ensaios para medir a atividade enzimática.

O efluente sintético foi elaborado utilizando fenol sólido (pureza  $\geq 99\%$ ) dissolvido em solução tampão de fosfato em pH 7,4.

Foram feitas soluções estoque de todos os reagentes envolvidos diretamente na reação (enzima, fenol e peróxido de hidrogênio). Todas as soluções foram dissolvidas com tampão fosfato pH 7,4 e estocadas em ambiente refrigerado a 4 °C.

No preparo das demais soluções aquosas, foi utilizada água ultrapura (com resistividade superior a 18,2 M $\Omega$ .cm) obtida a partir do sistema Direct-Q3 da Millipore.

### 3.3 MÉTODOS

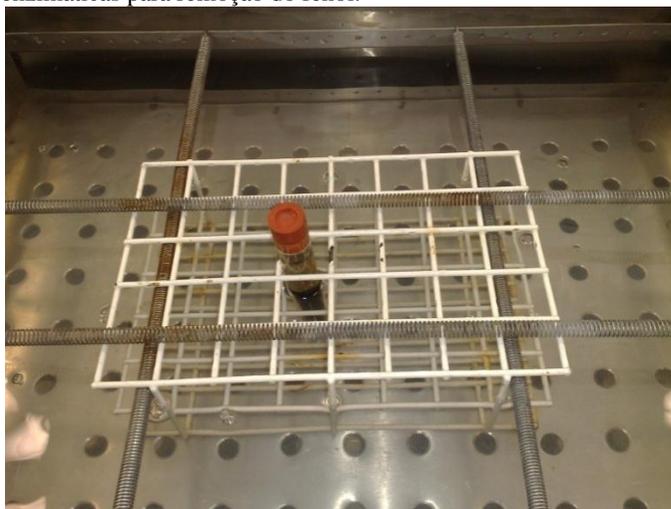
#### **3.3.1 Degradação de fenol através da precipitação e polimerização por catálise enzimática**

O estudo da eficiência da degradação do fenol utilizando efluente sintético foi conduzido em batelada numa faixa de concentração que compreende valores de 0,5 mM a 4 mM (47 mg/L a 376 mg/L) em tubos de ensaio de 10 mL os quais foram mantidos a temperatura de 25 °C e pH 7,4. O volume de reação utilizado foi de 10 mL e a proporção de peróxido em relação ao fenol foi de 50% em excesso, ou seja, para cada 1 mM de fenol foram utilizados 1,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para garantir que as condições reacionais (pH, temperatura, concentração dos reagentes) fossem seguidas, as soluções contendo fenol, tampão fosfato, peróxido de hidrogênio e enzima foram mantidas em um shaker sob agitação constante de 120 rpm e temperatura de 25 °C  $\pm 1$  °C (Figura 14). As reações foram iniciadas com a adição de peróxido de hidrogênio ao tubo de ensaio contendo os demais reagentes (tampão fosfato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e fenol). A adição de peróxido de hidrogênio foi efetuada somente após os reagentes atingirem o equilíbrio térmico com o shaker.

Todos os tubos de ensaio foram selados com tampa de borracha para evitar a volatilização do fenol e da água oxigenada.

Figura 14 – Esquema demonstrando como foram conduzidas as reações enzimáticas para remoção do fenol.



Pré-experimentos efetuados indicaram que as reações conduzidas nas concentrações deste estudo (0,5 mM a 4 mM) foram completadas em menos de 3 horas com base nas leituras de fenol residual efetuadas. No entanto, o tempo de retenção estipulado para as todas as reações experimentais foi de 3 horas a fim de garantir que o fenol residual fosse medido somente após o término da reação. Decorrido o tempo de retenção de 3 horas, a solução foi filtrada com papel filtro comum a fim de separar o sobrenadante do produto precipitado para serem feitas as devidas análises experimentais.

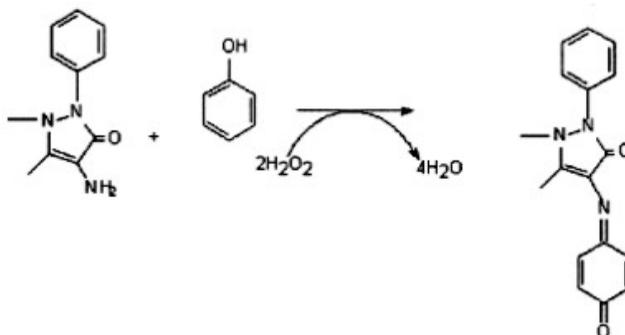
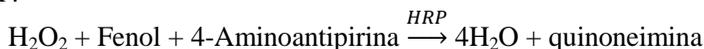
### 3.3.2 Determinação da atividade da enzima HRP

Para a determinação da atividade da HRP, foram utilizados dois ensaios colorimétricos. O primeiro método utilizando 4-Aminoantipirina (AAP) e fenol e o segundo com ABTS seguindo metodologias de Wu *et al.* (1997) e Melo (2010), respectivamente. As duas metodologias utilizadas para leitura foram necessárias porque de acordo com os autores Zhang e Nicell (1999), a metodologia que utiliza AAP e fenol não é indicada para medir a atividade enzimática durante a reação de

fenol, devido à interferência causada por produtos oriundos da reação enzimática.

No primeiro ensaio, o fenol atua como substrato redutor, AAP como substrato cromogênico e a enzima HRP como catalisadora da conversão de moléculas de fenol a radicais fenóxi. Esses radicais reagem com AAP e  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando o corante quinoneimina, conforme reação demonstrada na Figura 15. O ensaio consistiu em utilizar uma mistura reacional de volume total de 2,1 mL composta por: 500  $\mu\text{L}$  de AAP 9,6 mM, 200  $\mu\text{L}$  de Fenol 100 mM, 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2 mM, 1 mL de tampão fosfato pH 7,4 (0,1 M) e solução de extrato enzimático contendo HRP em um volume de 200  $\mu\text{L}$ . Uma unidade de atividade foi definida como o número de micromoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por minuto a pH 7,4 e 25°C, que é proporcional à taxa de formação de quinoneimina ( $\epsilon_{510 \text{ nm}} = 7.100 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). A absorbância a 510 nm foi lida e monitorada a cada segundo durante 1 minuto após o início da reação.

Figura 15 – Reação utilizando AAP para determinação da atividade enzimática da HRP.

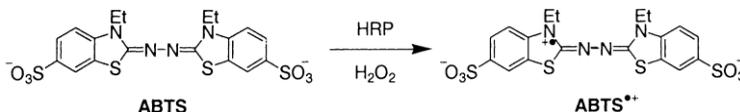


FONTE: MARTINS, 2006.

No segundo ensaio, o substrato colorimétrico ABTS é oxidado por HRP na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando o radical cátion ABTS ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) conforme demonstrado na Figura 16. A taxa de formação deste cátion é proporcional à atividade enzimática sendo que a mesma foi monitorada na absorbância em 405 nm ( $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 18600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). O volume reacional total foi de 3 mL dos quais: 2,190 mL de tampão fosfato pH 6,0 (0,1 M), 255  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de ABTS 20 mM, 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de extrato enzimático contendo a enzima HRP

em tampão pH 6,0 e 255  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS em seu radical cátion por minuto em pH 6,0 e 25  $^\circ\text{C}$ .

Figura 16 – Reação utilizando ABTS para determinação da atividade enzimática da HRP.



FONTE: KADNIKOVA e KOSTIC, 2002.

### 3.3.3 Determinação do teor de proteínas da enzima HRP

O teor de proteína da solução de extrato enzimático foi determinado pelo método de Bradford (1976). Este método consiste basicamente na interação entre o corante azul brilhante de Coomassie com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de extrato enzimático de 1 g/L foi misturada com 5 mL de solução de corante mediante agitação. Após 10 minutos, foi medida a absorbância a 595 nm em uma cubeta de 3 mL. A concentração de proteína na solução de preparado enzimático foi determinada através da interpolação em uma curva de calibração formada por padrões de albumina de soro bovino com concentrações variando de 0,05 a 1 g/L. O teor de proteínas no preparado enzimático foi determinado de acordo com a seguinte equação:

$$TP(\%) = \frac{C_{pro}}{C_{ee}} \cdot 100\% \quad (01)$$

Onde: TP é o teor de proteínas dado em (%) da solução de extrato enzimático,  $C_{pro}$  é a concentração de proteínas da solução de extrato enzimático em g/L, que foi determinada utilizando método de Bradford e  $C_{ee}$  é a concentração em g/L de extrato enzimático na solução.

### 3.3.4 Determinação da concentração de fenol

Para a determinação da concentração de fenol existente nas soluções foi utilizado método colorimétrico seguindo a metodologia de Wu *et al.* (1997). O volume total da reação é 2 mL dos quais são constituídos: 200  $\mu\text{L}$  de ferricianeto de potássio 83,4 mM diluído com tampão carbonato (0,25 M, pH 10) e 200  $\mu\text{L}$  de AAP também diluído com tampão carbonato (0,25 M, pH 10). Estes dois reagentes são adicionados a 1600  $\mu\text{L}$  da amostra ou da amostra diluída com água deionizada. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 510 nm. A concentração de fenol foi determinada através da interpolação em uma curva de calibração formada por padrões de fenol a partir do fenol mãe.

### 3.3.5 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

A determinação semiquantitativa da concentração de peróxido de hidrogênio foi realizada com fitas teste (Peroxide 1000) Quantofix<sup>®</sup>

### 3.3.6 Cálculo do número de *Turnovers*

A eficiência catalítica da enzima foi calculada de através do número de *Turnovers* de acordo com a equação 02 descrita por Nicell *et al.* (1995).

$$T_u = \frac{[FOH]_0 - [FOH]}{E_0 \cdot C_a} \quad (02)$$

Onde:

$T_u$  = Número de *Turnover* (adimensional)

$[FOH]_0$  = Concentração inicial de fenol (mM)

$[FOH]$  = Concentração residual de fenol (mM)

$E_0$  = Atividade de enzima (U/mL) contida na solução

$C_a$  = Constante que relaciona concentração de proteínas (mM) com a atividade da enzima (U/mL). A unidade de  $C_a$  é dada em (mL mM) / U.

### 3.3.7 Cálculo do grau de conversão

Para quantificar os níveis de remoção alcançados pelo processo de PPCE, foi utilizado o conceito de grau de conversão o qual foi definido e calculado conforme a equação 03:

$$X = \frac{[FOH]_0 - [FOH]}{[FOH]_0} \quad (03)$$

Onde:

X = Grau de conversão (adimensional)

[FOH]<sub>0</sub> = Concentração inicial de fenol (mM)

[FOH] = Concentração residual de fenol (mM)

### 3.3.8 Toxicidade do Fenol com alga *Scenedesmus subspicatus*

Os ensaios de toxicidade aguda com *Scenedesmus subspicatus* foram realizados de acordo com metodologia descrita pelo protocolo presente no Anexo C.

Para avaliação da toxicidade, a mistura da reação foi filtrada em papel filtro comum, sendo somente utilizado o sobrenadante para análise. O objetivo foi verificar a toxicidade da mistura de reação, antes e após o tratamento da enzima, incluindo o efeito do tempo de reação. Para fins de comparação, foram utilizadas soluções que foram constituídas das mesmas concentrações iniciais presente na mistura da reação, porém a estas soluções não foi adicionado enzima HRP.

Os testes de crescimento de alga foram realizados em duplicatas para cada tempo, em balões de 100 mL, mantidos a temperatura ambiente de 25 °C ± 2 °C com iluminação (2500 lux) e aeração constante por 48 horas conforme demonstrado na Figura 17. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para ser efetuada a leitura de transmitância, visando determinar a densidade de células. Com base nestes dados, foi determinada a taxa de crescimento de alga através da subtração das transmitâncias obtidas em cada intervalo de tempo (24 e 48 h), pela transmitância obtida como referência no tempo inicial. A toxicidade foi avaliada e expressa como o percentual de redução do crescimento algal em relação à taxa de crescimento de alga em meio ideal de nutrientes (Controle), também avaliada concomitantemente com as demais amostras.

Figura 17 – Teste de toxicidade efetuado com *Scenedesmus subspicatus* para as misturas de reação enzimática do fenol.



### 3.3.9 Determinação do pH

As medidas de pH foram determinadas através da utilização de um pHmetro marca Quimis, Modelo Q-400 M2 calibrado com soluções tampão padrões de pH 4 e 7.

Figura 18 – Medidor de pH Quimis.



### 3.3.10 Leitura das absorbâncias e transmitâncias

A leitura das absorbâncias envolvidas nos métodos colorimétricos utilizados para leitura de fenol, determinação atividade enzimática bem como as transmitâncias e varreduras no espectro UV envolvidas na medida de toxicidade foram feitas utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV mini – 1240 (faixa de leitura de comprimento de onda - 190 nm a 1100 nm), como demonstrado na Figura 19.

Figura 19 – Espectrofotômetro Shimadzu UV mini – 1240.



### 3.3.11 Análise de infravermelho

O procedimento de análise de IR foi utilizado para caracterização do produto polimerizado gerado pela reação enzimática. Inicialmente foi necessário submeter todas as amostras do produto polimerizado, obtido por filtração, à secagem por um período de 24 horas em temperatura constante de 50 °C com objetivo de remover a umidade do material. Transcorrido o tempo de secagem, as amostras foram misturadas com KBr e transformadas em pastilha, através de pressurizador manual.

O equipamento utilizado para análise de infravermelho do produto precipitado foi realizada num espectrofotômetro IR Perkin Elmer modelo FTIR – S100, conforme demonstrado na Figura 20.

Figura 20 – Espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR – S100.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando a otimização dos parâmetros de reação, aliada a um menor custo e melhores condições de adaptação do processo de PPCE à possível utilização em escala piloto, algumas escolhas foram previamente realizadas baseadas em resultados obtidos na literatura. Neste sentido as condições escolhidas foram: (i) Utilização de enzima HRP com baixa pureza; (ii) realização da PPCE em pH e temperatura constante de 7,4 e 25 °C, respectivamente; (iii) 50% em excesso da concentração de peróxido de hidrogênio em relação à concentração de fenol (1:1,5).

Um dos primeiros fatores a serem considerados foi a utilização de uma enzima comercial de baixa pureza, como é o caso do extrato enzimático utilizado neste estudo, já que o custo da proteína é o maior impactante no que diz respeito ao custo de processo total. Alberti e Klibanov (1982) reportaram que a eficiência de remoção no processo de PPCE não está diretamente ligada à pureza da enzima. Nicell *et al.* (1995) relataram que quando a extrato bruto de enzima é utilizado no processo de PPCE, o custo de processo pode ser comparado, por exemplo, com o do processo utilizando peróxido de hidrogênio e reagente Fenton. Cooper e Nicell (1996) também chegaram à mesma conclusão quando compararam enzimas HRP de baixa e alta pureza. Os autores ainda relataram que a enzima de baixa pureza, que não sofreu nenhuma técnica de separação, possui uma quantidade de matéria proteica elevada, a qual é responsável por uma maior proteção da atividade catalítica da enzima. Assim, a utilização da enzima HRP de baixa pureza acabou sendo a escolha mais promissora, pois, além de possuir menor custo em relação à enzima purificada foi mais eficaz no processo de remoção do fenol, fatores que acabaram representando um grande impacto no custo do processo.

A concentração de  $H_2O_2$  é um fator crítico em reações catalisadas por HRP, visto que um excesso de  $H_2O_2$  pode aumentar a taxa de conversão de substrato, porém, ao mesmo tempo pode reduzir a atividade da enzima por mecanismos de inativação (MELO, 2010). Embora a reação de remoção do fenol conforme citado no item 2.4.8 deixe evidente que a estequiometria da reação é de 2 mM de fenol para cada 1 mM de  $H_2O_2$ , vários autores reportaram diferentes valores de estequiometria para reação de polimerização e precipitação via catálise enzimática. Cooper e Nicell (1996) demonstraram em seu trabalho utilizando água residual provinda de indústria de fundição que a estequiometria da reação que apresentou os melhores resultados de

remoção obtida através de testes experimentais foi 1 mM de fenol para cada 0,85 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (1:0,85). De acordo com os mesmos autores, os quais citaram os trabalhos de Nicell *et al.* (1992) e Wu *et al.* (1993), testes preliminares realizados com fenol aquoso puro e seus derivados apresentaram melhores resultados de remoção com a estequiometria de 1 mM de fenol para cada 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1). No presente trabalho, a estequiometria utilizada foi de 1 mM de fenol para cada 1,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:1,5) com o objetivo principal de reduzir a possibilidade de eventuais erros experimentais, já que o peróxido de hidrogênio é instável. Nicell *et al.* (1995) também utilizaram a mesma razão estequiométrica de 1:1,5, demonstrando que mesmo em excesso de 50%, o peróxido de hidrogênio não foi capaz de desativar a enzima HRP.

Ainda buscando uma melhor adaptação da PPCE à possível aplicação em escala piloto ou industrial, buscou-se realizar o processo de reação enzimática preferencialmente nas condições pré-estabelecidas de pH 7,4 e temperatura de 25 °C. Vários foram os motivos determinantes desta proposição. Primeiramente Nicell *et al.* (1995) e Klibanov *et al.* (1983) reportaram em seus trabalhos que a vida catalítica da enzima HRP foi significativamente maior quando a reação de PPCE foi conduzida na faixa de pH compreendida entre 6 a 9 e temperatura abaixo de 35 °C, para substratos aromáticos. Ou seja, uma maior vida catalítica implica em melhores condições de reaproveitamento da enzima e maior remoção de fenol, o que contribui para a viabilização do processo de PPCE. Reações em temperaturas mais extremas necessitam de aquecimento e/ou refrigeração, o que fatalmente implica num maior custo de processo. A temperatura em torno de 25°C também representa uma faixa segura de trabalho para a enzima HRP tanto em termos de desativação térmica como de estabilidade.

Outro fator decorrente da escolha do valor do pH e temperatura está diretamente ligado às condições de descarte de efluentes exigidas pelo CONAMA (pH 5-9 e temperatura inferior a 40°C). O pH 7,4, além de se encontrar no meio da faixa ótima de reação enzimática é o valor de maior capacidade tamponante do tampão fosfato, o que acarreta em resultados experimentais com menores erros e de maior confiança.

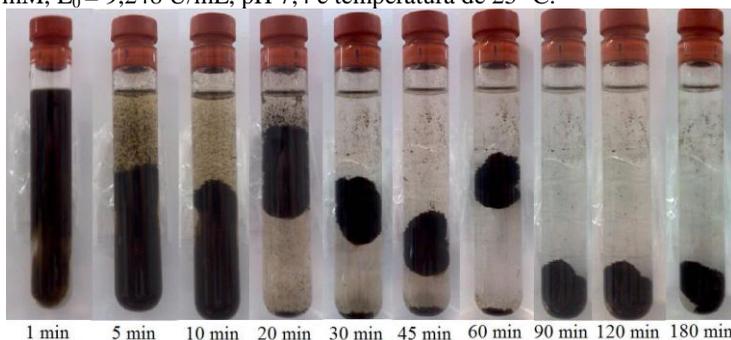
#### 4.1 CARACTERÍSTICA DA REAÇÃO DE PPCE E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO

Desde o início da reação, foi possível verificar indícios de fenol polimerizado caracterizados pela mudança de cor aparente do meio reacional. Depois de adicionados a enzima HRP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na solução

contendo fenol, esta imediatamente tornava-se de cor marrom iniciando a formação de precipitado de forma gradual (Figura 21). Foram testados os reagentes aos pares: enzima com fenol, fenol com peróxido de hidrogênio e enzima com peróxido de hidrogênio e nenhuma das combinações apresentou geração de coloração marrom.

Em toda a faixa de concentração de fenol que foi utilizada nos experimentos (0,5 mM a 4 mM de fenol), foi possível observar através da medida da atividade residual que a reação de PPCE acontecia em duas etapas. A primeira via reação enzimática é a etapa rápida, onde a enzima HRP reagiu com o fenol mãe formando radicais fenóxi (tempo de 1 min, Figura 21) e a segunda etapa via reação radicalar, etapa mais lenta, no qual os radicais fenóxi reagiram entre si formando o precipitado (tempo de 5 a 180 min, Figura 21). Nesta etapa da reação já não havia nenhuma atividade catalítica presente no meio reacional.

Figura 21 – Evolução da PPCE ao longo do tempo.  $[\text{FOH}]_0 = 4 \text{ mM}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 6 \text{ mM}$ ,  $E_0 = 9,248 \text{ U/mL}$ , pH 7,4 e temperatura de 25 °C.



No seu ciclo catalítico, a enzima nativa HRP é oxidada por peróxido de hidrogênio, passando por 2 estados intermediários (HRP-I e HRP-II) antes de retornar a forma nativa, como indicado na seção 2.4.8, através da Figura 12. Durante este processo, a forma intermediária da enzima reage com os substratos aromáticos aquosos, resultando na formação de radicais fenóxi que podem, por via não enzimática, reagir com proteínas, com formaldeído formado durante a reação ou se combinar de forma espontânea para formar polímeros com solubilidade reduzida (NICELL *et al.*, 1995).

Devido à formação da coloração marrom, a leitura do fenol somente foi possível de ser feita no final da reação ( $t = 3 \text{ h}$ ) mediante a filtração para separação dos produtos precipitados. Todas as tentativas

efetuadas para se determinar a velocidade de reação através da leitura do fenol nos instantes iniciais ( $t \leq 1$  min) resultaram em interferências. Isto se deve ao fato de que o método de dosagem de fenol total (método da AAP) quantifica tanto fenol sem grupamentos substituintes como também pequenas cadeias fenólicas as quais são formadas já no início da reação. Nicell *et al.* (1995) explicaram que o método de análise UV tem a vantagem de ser rápido e de fácil utilização, no entanto alguns produtos polimerizados da reação podem permanecer solúveis na solução em pequenos traços e absorver luz UV, no mesmo comprimento de onda do fenol original, causando interferência.

A fim de caracterizar e obter maiores informações sobre o comportamento da enzima HRP e sobre o produto polimerizado, foi realizado o espectro de varredura de comprimento de onda no intervalo de radiação do infravermelho (IR). As informações obtidas através do espectro infravermelho da Figura 22 evidenciaram os principais tipos de grupamentos funcionais presentes no material precipitado, os quais podem ser descritos como sendo estruturas aromáticas monossustituídas que possuem éter aromático e íon carboxilato.

Através da tabela presente no anexo C obtida em Silverstein *et al.* (2007), que apresenta as faixas de comprimento de onda de absorção para cada grupamento químico, foi possível atribuir os principais constituintes do material precipitado.

Comparando espectro IR da Figura 22 com o espectro do fenol puro obtido em Silverstein *et al.* (2007), percebe-se que existem algumas diferenças nas bandas observadas e nas respectivas ligações no que diz respeito à estrutura das substâncias. As principais diferenças podem ser percebidas nas bandas possivelmente atribuídas à deformação axial de C=C do anel, na deformação axial de C-O, na deformação angular fora do plano C-H e deformação angular fora do plano de C=C do anel, onde comprimentos de onda das bandas observadas se apresentam inferiores ao do fenol puro ( $1589\text{ cm}^{-1}$ ,  $1489\text{ cm}^{-1}$ ,  $1208\text{ cm}^{-1}$ ,  $834\text{ cm}^{-1}$ ,  $755\text{ cm}^{-1}$ ,  $693\text{ cm}^{-1}$  respectivamente). Nota-se o aparecimento de uma banda na faixa de  $1099\text{ cm}^{-1}$  que, possivelmente, é relativa às estruturas aromáticas monossustituídas, resultantes de estruturas fenólicas modificadas pela polimerização.

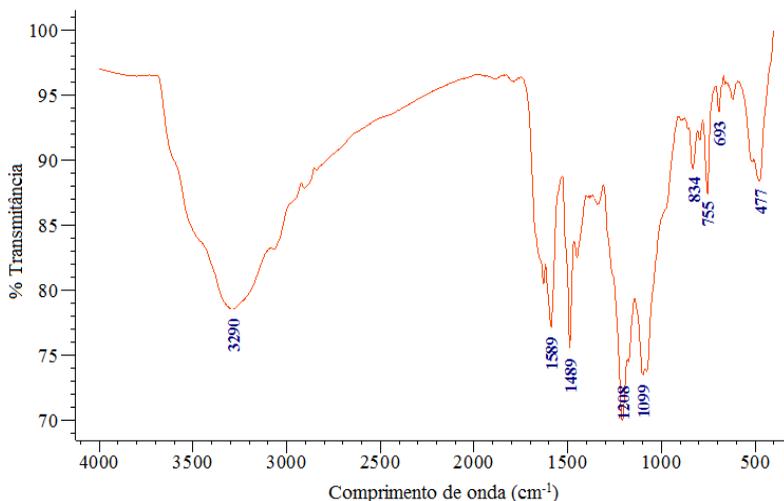
A banda  $\lambda$  máx de  $3290\text{ cm}^{-1}$  presente no espectro demonstra que no precipitado ainda havia possíveis vestígios de umidade adsorvida mesmo sendo submetido anteriormente a um processo de secagem. Esta banda não representa estrutura fenólica, pois a banda de comprimento de onda máximo de  $1378\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação angular causada por O-H presente espectro do fenol puro não é encontrado no espectro do

precipitado. Lu *et al.* (2009) reportam em seu trabalho a capacidade de adsorção de umidade em três resinas fenólicas, comparando-as. Os autores demonstraram, através do espectro de IR na faixa de  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $3700\text{ cm}^{-1}$ , a presença de traços de fenol mãe e umidade nas resinas representados por uma banda em  $3525\text{ cm}^{-1}$ , afirmando que os materiais possuem grande capacidade de adsorção e que as moléculas de água adsorvidas se encontraram principalmente em duas formas estruturais: água em forma livre e em forma de pontes de hidrogênio com grupos polares, como éter, amina e grupos hidroxil.

As bandas na faixa do comprimento de onda de  $1208\text{ cm}^{-1}$  e  $1099\text{ cm}^{-1}$  (ligação C-O) indicam presença de éter aromático e as bandas referentes a  $1589\text{ cm}^{-1}$  e  $1489\text{ cm}^{-1}$  representam a presença do íon carboxilato resultante da oxidação do formaldeído que, como relatado anteriormente, é um dos possíveis produtos secundários oriundo da reação enzimática do fenol.

As informações obtidas através da análise do material por IR demonstraram que o precipitado não é formado por uma única substância, mas sim que o produto é resultado de um conjunto de reações enzimáticas e não enzimáticas que ocorreram durante o processo de PPCE. O espectro IR também deixa evidente que o precipitado é uma substância com características físicas e químicas bem diferentes do fenol mãe.

Figura 22 – Espectro de Infravermelho do precipitado obtido através da PPCE. Deformação axial de O-H, larga, em ligação hidrogênio intermolecular  $3290\text{ cm}^{-1}$ . Deformação axial de C-H de aromáticos  $3052\text{ cm}^{-1}$ . Deformação axial de C=C do anel  $1589\text{ cm}^{-1}$ ,  $1489\text{ cm}^{-1}$ . Deformação axial de C-O  $1208\text{ cm}^{-1}$ ,  $1099\text{ cm}^{-1}$ . Deformação angular fora do plano de C-H  $834\text{ cm}^{-1}$ ,  $753\text{ cm}^{-1}$ . Deformação angular fora do plano de C=C do anel,  $693\text{ cm}^{-1}$ .



Wilberg (2003) realizou uma caracterização geral dos polímeros fenólicos, identificando-os como resinas polifenólicas de alta resistência térmica com potencial aplicação como material moldável para uso em elevadas temperaturas. Os polímeros apresentaram, ainda, características de colóides com área superficial de  $100\text{ m}^2/\text{g}$ , massa específica de  $1,6\text{ g/cm}^3$  e caráter hidrofóbico.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VARIAÇÃO DOS PARÂMETROS ENVOLVIDOS NA REAÇÃO DA PPCE

Inicialmente são apresentados os resultados que demonstraram qual o comportamento da remoção do fenol com o aumento da atividade enzimática. A atividade da enzima (U/mL) estudada inclui valor acima do qual não haveria maior remoção de fenol, ou até que um alto nível de tratamento (90% ou mais de remoção) fosse alcançado.

Com intuito de avaliar a eficiência catalítica da enzima, foi calculado o número de *Turnovers* e verificada a sua variação em relação

à atividade enzimática de acordo com a equação 02 descrita no item 3.3.6.

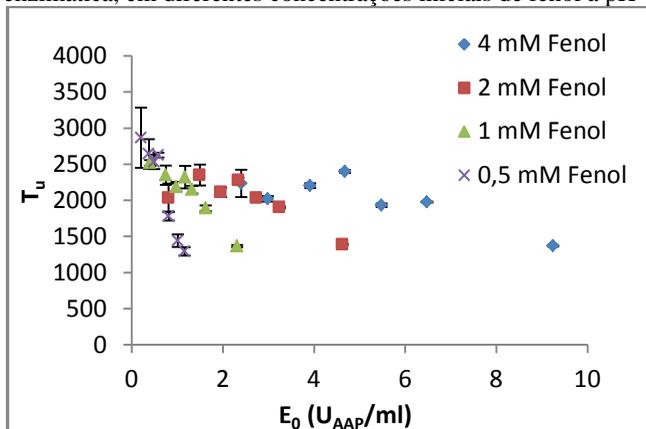
O valor  $C_a$  foi obtido através da dosagem da atividade de uma solução com uma dada concentração de extrato enzimático e sua respectiva concentração de proteínas obtida pelo método de Bradford. O valor de TP encontrado foi de 10%, ou seja, em 1 mg de extrato bruto enzimático há 0,1 mg de proteína. Para efeito de cálculo, foi considerado que toda proteína contida no extrato enzimático era composta por HRP com massa molecular de 40000 g/mol sendo definido, portanto o valor de  $C_a = 2,96 \times 10^{-4} \text{ (mL mM)}/U_{AAP}$ .

A definição de *Turnover* utilizada neste trabalho foi diferente da apresentada na literatura por Blanch e Clark (1997) e Shuler e Kargi (2002) a qual define *Turnover* como sendo quantidade de fenol removido por tempo e por sítio ativo da enzima. Os resultados obtidos estão descritos na Figura 23.

Em quantidades mais baixas de atividade enzimática o *Turnover* assume valores maiores. Estes valores de  $T_u$  tendem a aumentar cada vez mais à medida que a atividade enzimática se aproxima de zero, como pode ser observado nas curvas de 0,5 mM e 1 mM de fenol inicial da Figura 23.

Os altos desvios padrão para este parâmetro, observados principalmente para as concentrações iniciais de 0,5 mM e 1 mM de fenol na Figura 23, são decorrentes do fato de que pequenas variações nas leituras de fenol residual acabaram por gerar uma grande mudança no número de *Turnover*. Os valores menores de concentração de fenol acarretam em erros maiores em função, principalmente, da diluição efetuada no momento da leitura da absorbância.

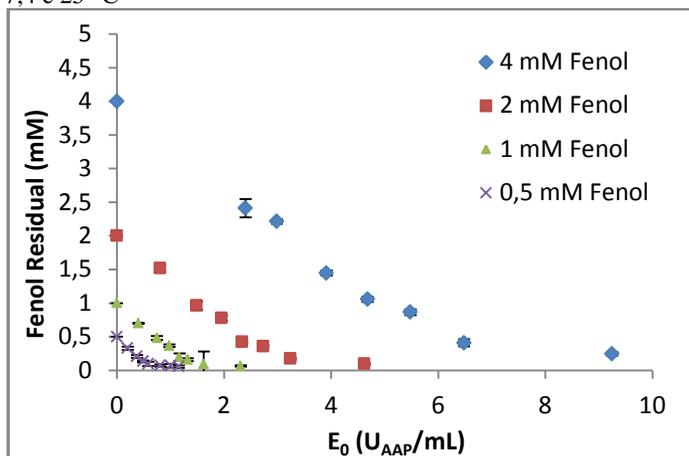
Figura 23 – Eficiência catalítica da enzima HRP (*Turnover*) versus atividade enzimática, em diferentes concentrações iniciais de fenol a pH 7,4 e 25 °C



Na Figura 24 são apresentadas as curvas que demonstram o comportamento da concentração do fenol residual após a reação, para cada concentração inicial de fenol de acordo com a atividade enzimática utilizada. O aumento da atividade da enzima causou um aumento na quantidade de fenol removido, no entanto, a partir de um determinado valor de atividade enzimática, ocorreu redução da quantidade relativa de fenol removido, o que pode ser correlacionado pela tendência da eficiência catalítica enzimática (*Turnover*) demonstrada na Figura 23. Klibanov *et al.* (1983) afirmaram que a remoção incompleta acontece devido ao processo de inativação enzimática que ocorre durante a reação, demonstrando que a remoção de fenol na reação termina no instante em que a atividade enzimática da HRP desaparece.

A quantidade de moléculas de fenol biotransformadas por molécula de enzima decresce mais acentuadamente a partir do momento que a quantidade de fenol disponível é mais reduzida. Tal resultado poderia ser explicado pelo fato de que o aumento da atividade enzimática acaba gerando um aumento na velocidade da reação e conseqüentemente na quantidade de radical fenóxi produzido por unidade de tempo, o que também de certa forma influencia nos valores do *Turnover*, já que o radical fenóxi é o principal responsável pela desativação da enzima.

Figura 24 – Concentração de Fenol residual após 3 h de reação obtidas para cada atividade enzimática, em diferentes concentrações iniciais de fenol a pH 7,4 e 25 °C



Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos publicados por Klivanov *et al.* (1893) e Nicell *et al.* (1995). Nicell (1995) utilizando enzima HRP purificada ( $RZ = 1,1$ ) com valor de  $C_a = 1,53 \times 10^{-4}$  (mL mM)/U obtém valores maiores de *Turnover* na faixa de 10000 a 25000, conseguindo um incremento de até 300% nesse valor quando em presença de PEG. Neste caso, atribui-se o valor de *Turnover* elevado a uma possível proteção da enzima por PEG.

Buscando quantificar os níveis de remoção alcançados pelo processo de PPCE nas concentrações iniciais de fenol analisadas, foi utilizado o conceito de grau de conversão de fenol após o término de cada da reação conforme equação 03 descrita no item 3.3.7

Na Tabela 06, são apresentados os valores de X encontrados para cada atividade enzimática e em diferentes concentrações iniciais de fenol, onde se observa que a concentração inicial de fenol e da enzima afetaram o grau de conversão.

Em todas as concentrações iniciais de fenol analisadas, para valores de  $X \leq 0,9$ , os resultados demonstraram que, respectivamente, os parâmetros  $[FOH]_0$  e  $E_0$  apresentaram uma forte relação linear com o grau de conversão do fenol, como demonstrado pelas Figuras 25 e 26. Os resultados também mostraram que para uma mesma atividade enzimática, o grau de conversão foi maior quanto menor fosse a concentração inicial, ou seja, maiores concentrações iniciais de fenol

acabam gerando mais radical fenóxi, o que aumenta a inibição da reação tornando a conversão menor.

Tabela 6 – Valores de conversão obtidos após 3 horas de reação para cada atividade enzimática em cada uma das concentrações iniciais  $[\text{FOH}]_0$  analisadas.

$[\text{FOH}]_0 = 4 \text{ mM}$			$[\text{FOH}]_0 = 2 \text{ mM}$		
$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	X	Desvio Padrão	$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	X	Desvio Padrão
0	0	0	0	0	0
2,401	0,397	0,034	0,806	0,243	0,024
2,984	0,447	0,008	1,492	0,519	0,032
3,915	0,638	0,010	1,956	0,612	0,019
4,681	0,736	0,009	2,339	0,790	0,010
5,481	0,784	0,010	2,732	0,822	0,010
6,482	0,897	0,013	3,242	0,914	0,007
9,248	0,938	0,007	4,624	0,952	0,007

$[\text{FOH}]_0 = 1 \text{ mM}$			$[\text{FOH}]_0 = 0,5 \text{ mM}$		
$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	X	Desvio Padrão	$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	X	Desvio Padrão
0	0	0	0	0	0
0,403	0,300	0,005	0,201	0,341	0,05
0,746	0,519	0,03	0,374	0,585	0,046
0,978	0,634	0,019	0,489	0,734	0,03
1,17	0,804	0,054	0,585	0,806	0,06
1,324	0,843	0,021	0,809	0,854	0,03
1,621	0,908	0,019	1,009	0,862	0,052
2,312	0,935	0,011	1,157	0,887	0,040

Para poder determinar a influência da quantidade inicial de fenol na quantidade de enzima necessária para se alcançar o grau de remoção desejado, foram realizadas interpolações dos dados da Tabela 6. As interpolações que melhor se adaptaram aos dados experimentais foram a linear para faixa de  $X \leq 0,9$  (Figura 25) e a polinomial cúbica para todos os valores de graus de conversões (Figura 26). Valores de  $X > 0,9$  foram

descartados, pois nesta faixa, aumentos na atividade da enzima HRP não acarretaram um aumento significativo no grau de conversão, o que não é desejável em termos de custo de processo.

Figura 25 – Gráfico com interpolação linear dos dados experimentais obtidos.

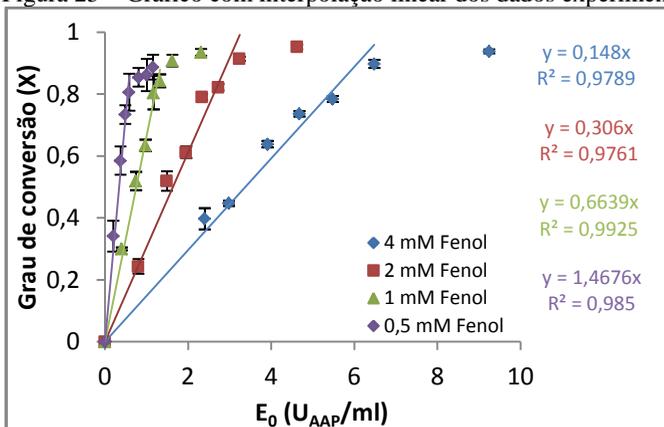
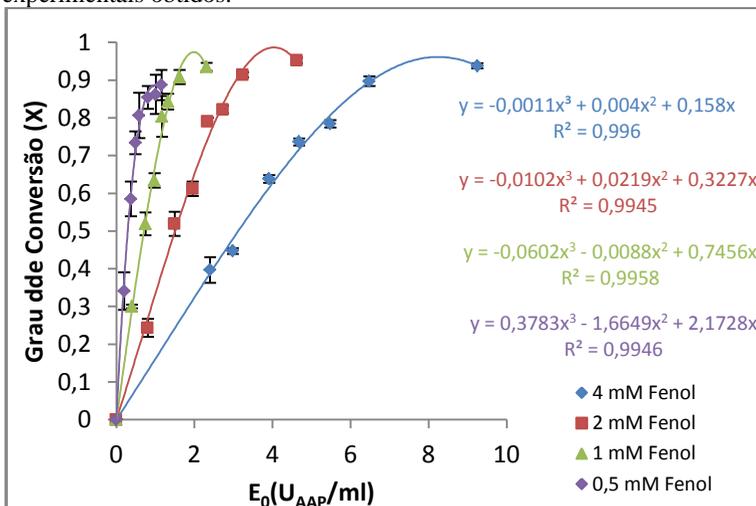


Figura 26 – Gráfico com interpolação polinomial cúbica dos dados experimentais obtidos.



Com os dados experimentais interpolados na forma linear e cúbica, as atividades enzimáticas necessárias para se alcançar um grau de conversão na faixa de 30% a 90% em cada uma das concentrações

iniciais de fenol, foram obtidas a partir de cada um dos modelos como demonstrado nas Figuras 27 e 28.

Para cada uma das interpolações realizadas, ficou evidenciado que a relação entre a concentração inicial de fenol e a atividade enzimática para um dado grau de conversão, compreendido dentro da faixa de 0,3 a 0,9, é extremamente linear podendo, desta forma, ser expressa da seguinte maneira:

$$E_0 = C [FOH]_0 \quad (04)$$

Onde  $[FOH]_0$  é a concentração inicial de fenol a ser tratada (mM),  $E_0$  é a atividade enzimática requerida para alcançar a remoção desejada (U/mL) e  $C$  é o coeficiente de atividade enzimática, uma constante que correlaciona as duas variáveis anteriores (U/(mL mM)).

Na Tabela 7 são apresentados os valores da constante  $C$  obtidos para cada grau de conversão com seus respectivos desvios padrão e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Figura 27 – Gráfico obtido pela interpolação linear demonstrando relação entre concentração inicial de fenol e atividade enzimática para cada grau de conversão.

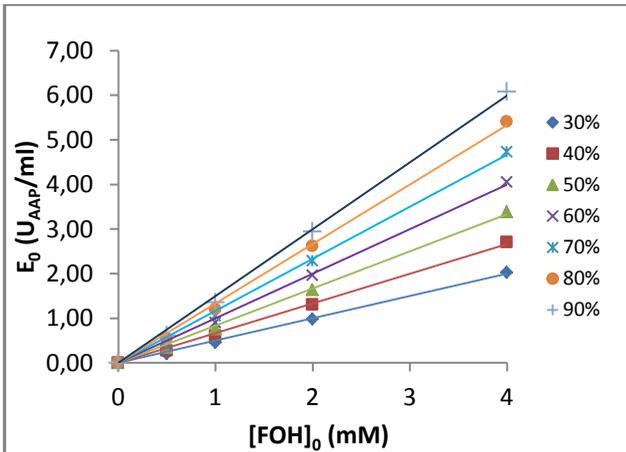
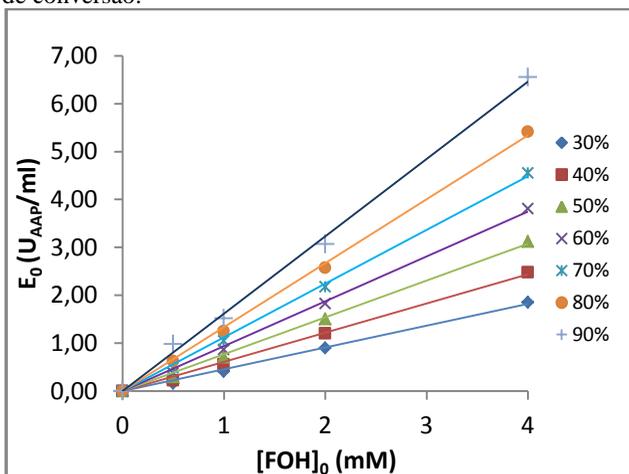


Figura 28 – Gráfico obtido pela interpolação polinomial cúbica demonstrando relação entre concentração inicial de fenol e atividade enzimática para cada grau de conversão.



Os desvios padrão obtidos para as duas regressões feitas, apresentaram valores extremamente baixos (cerca de 1% a 2% do valor do coeficiente de atividade enzimática) e os coeficientes de correlação corroboram a hipótese de que os dados possuem uma forte relação linear.

Tabela 7 – Coeficientes de atividade enzimática obtidos a partir do ajuste de curva dos dados oriundos das regressões linear e polinomial cúbica.

Fração molar de fenol removido (X)	Coefficiente de atividade enzimática ( $U_{AAP}/(mL \cdot mM)$ )	Desvio Padrão do Coeficiente	Coefficiente de Correlação ( $R^2$ )
<b>Regressão Linear</b>			
0,3	0,499	0,008	0,997
0,4	0,666	0,010	0,997
0,5	0,833	0,013	0,997
0,6	0,999	0,016	0,997
0,7	1,160	0,018	0,997
0,8	1,333	0,021	0,997
0,9	1,499	0,024	0,997

### Regressão Polinomial Cúbica

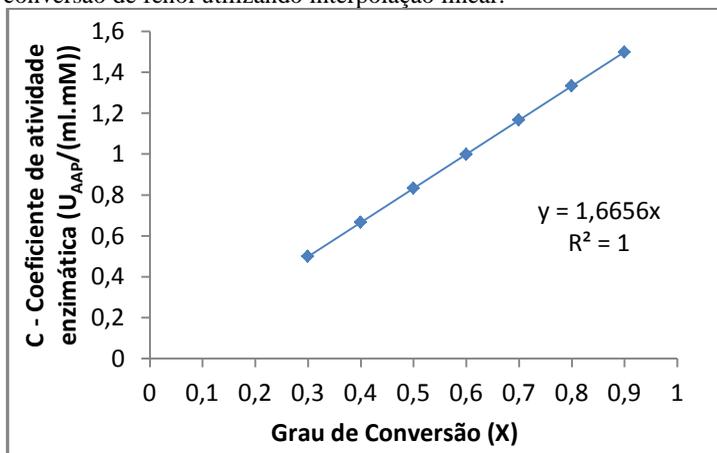
0,3	0,456	0,009	0,996
0,4	0,609	0,012	0,996
0,5	0,769	0,013	0,997
0,6	0,937	0,015	0,997
0,7	1,121	0,016	0,998
0,8	1,334	0,017	0,998
0,9	1,615	0,029	0,997

### 4.3 DESENVOLVIMENTO DO MODELO MATEMÁTICO PARA REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO DE PPCE

Para elaborar um modelo matemático que representasse adequadamente a remoção de fenol de acordo com a quantidade inicial de fenol presente na mistura de reação e a quantidade de enzima utilizada, foi necessário avaliar inicialmente como os coeficientes de atividade enzimática variam com o grau de conversão, em cada uma das interpolações utilizadas.

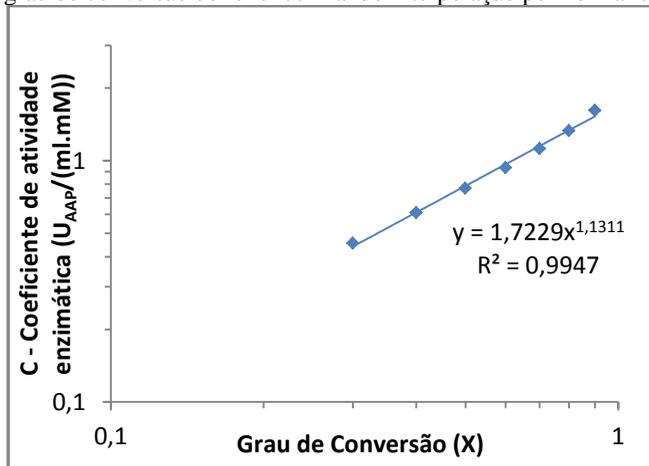
Na interpolação linear, os coeficientes de atividade enzimática (C) também tiveram uma variação linear com o grau de conversão (X), como pode ser observado na Figura 29.

Figura 29 – Correlação do coeficiente de atividade enzimática com o grau de conversão de fenol utilizando interpolação linear.



Para os dados experimentais obtidos através da interpolação cúbica, o comportamento foi diferente. A regressão dos dados de grau de conversão com o coeficiente de atividade enzimática demonstrou uma tendência logarítmica entre as duas variáveis como apresentado na Figura 30.

Figura 30 – Correlação log-log do coeficiente de atividade enzimática com o grau de conversão de fenol utilizando interpolação polinomial cúbica.



O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) encontrado para a relação log-log e linear foram respectivamente de 0,994 e 1 o que indica que os modelos representam um bom ajuste dos dados.

Nicell *et al.* (1995) também encontraram semelhante correlação log-log entre o coeficiente de atividade enzimática e a conversão utilizando enzima HRP purificada. A equação apresentada pelos autores que predefine o comportamento do coeficiente de atividade enzimática com a conversão desejada foi  $y = 1,478X^{0,989}$  com coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,994, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho de pesquisa.

Definidas as correlações existentes entre C e X para as duas interpolações efetuadas, foi efetuado tratamento matemático para ser determinada a equação geral que representa o modelo da PPCE. A equação 04 demonstra que, para um determinado grau de conversão desejado, a quantidade inicial de fenol é diretamente proporcional a atividade enzimática inicial.

$$E_0 = C [FOH]_0 \quad (04)$$

Onde  $C$  é o coeficiente de atividade enzimática, uma constante dada em  $(U/(mL \text{ mM}))$ , tanto para a interpolação linear quanto para a cúbica. Consequentemente, as correlações existentes entre  $C$  e  $X$  para as duas interpolações podem ser representadas em uma forma geral da seguinte maneira:

$$C = aX^b \quad (05)$$

Onde  $a$  é expresso em  $U/(mL \text{ mM})$ , e  $b$  é adimensional sendo que  $b = 1$  para a interpolação linear e  $b \neq 1$  para a interpolação polinomial cúbica.

Substituindo a equação 03 na equação 05 obtêm-se:

$$C = a \left( \frac{[FOH]_0 - [FOH]}{[FOH]_0} \right)^b \quad (06)$$

Finalmente substituindo a equação 06 na equação 04 chega-se ao modelo matemático que envolve a concentração residual de fenol com a atividade enzimática e a concentração inicial de fenol:

$$E_0 = a [FOH]_0 \left( \frac{[FOH]_0 - [FOH]}{[FOH]_0} \right)^b \quad (07)$$

A equação 07 ainda pode ser rearranjada de forma a produzir uma expressão matemática de interesse, que relaciona o fenol residual em função da concentração inicial de fenol e atividade enzimática:

$$[FOH] = [FOH]_0 \left( 1 - \frac{[E]_0}{a[FOH]_0} \right)^{\frac{1}{b}} \quad (08)$$

Os valores de  $a$  e  $b$  obtidos a partir da regressão dos dados de  $C$  e  $X$  para cada interpolação foram substituídos na equação 08 e resultaram em modelos matemáticos que foram utilizados para prever valores de concentrações residuais de fenol como função de  $[FOH]_0$  e  $E_0$ . O modelo obtido é válido para faixa de grau de conversão de 0,3 a 0,9, concentração inicial de fenol de 0,5 mM a 4 mM e para o tempo de 3 horas.

As curvas obtidas através das duas formas de interpolação e sua comparação com os dados experimentais são demonstradas na Figura 31 e 32.

Figura 31 – Sobreposição do modelo matemático obtido através da interpolação linear nos dados experimentais.  $a = 1,665 U_{AAP}/(\text{mL mM})$  e  $b = 1$ .

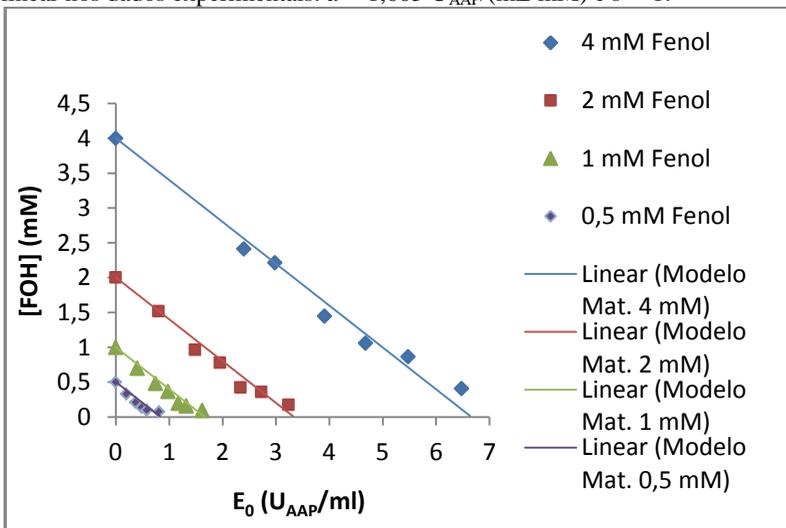
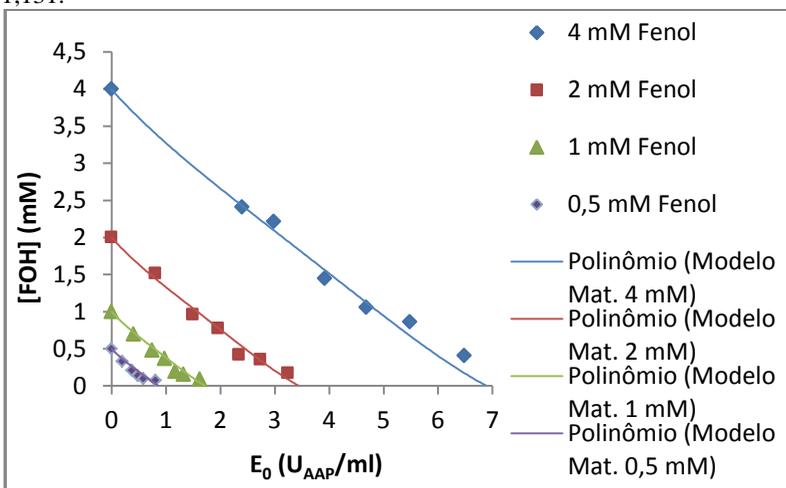


Figura 32 – Sobreposição do modelo matemático obtido através da interpolação polinomial cúbica nos dados experimentais.  $a = 1,722 U_{AAP}/(\text{mL mM})$  e  $b = 1,131$ .



Analisando os gráficos presentes nas Figuras 31 e 32, percebe-se que a equação encontrada representa com fidelidade os dados experimentais tanto para o modelo obtido por interpolação linear quanto pelo modelo obtido por interpolação cúbica. Nicell *et al.* (1995) apresentaram o mesmo modelo matemático, representado pela equação 08, para uma faixa de concentração inicial de fenol compreendida de 0,5 mM até 16 mM e também obtiveram resultados promissores, demonstrando que o modelo matemático pode ser aplicado com precisão também em maiores concentrações iniciais de fenol.

De maneira análoga, foi desenvolvido um modelo para pré-determinar e comparar com valores experimentais o número de *Turnover* da enzima HRP ( $T_u$ ), sendo substituída a equação 07 na equação 02.

$$T_u = \frac{1}{aC_a} \left( \frac{[FOH]_0 - [FOH]}{[FOH]_0} \right)^{1-b} \quad (09)$$

Como para o modelo obtido por interpolação linear,  $b = 1$  a equação do *Turnover* é simplificada podendo sendo expressa da seguinte forma:

$$T_u = \frac{1}{aC_a} \quad (10)$$

A equação 10 demonstra que o *Turnover* para o modelo obtido por interpolação linear é invariável e independe do grau de remoção uma vez que é constituído por duas constantes,  $a$  que é o coeficiente angular dado em U/(mL mM) gerado através da regressão de X versus C (Figuras 29 e 30) e  $C_a$  que é a constante que relaciona concentração enzimática com a atividade da enzima, dada em (mL mM)/U. Os valores de *Turnover* obtidos experimentalmente são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de *Turnover* experimentais obtidos para cada atividade enzimática em cada uma das concentrações iniciais  $[\text{FOH}]_0$  analisadas.

$[\text{FOH}]_0 = 4 \text{ mM}$			$[\text{FOH}]_0 = 2 \text{ mM}$		
$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	$T_u$	Desvio Padrão	$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	$T_u$	Desvio Padrão
0	-	-	0	-	-
2,401	2233,43	189,4	0,806	2031,83	198,4
2,984	2020,83	37,7	1,492	2348,31	144,1
3,915	2201,45	34,0	1,956	2112,19	66,2
4,681	2399,1	20,2	2,339	2280,17	30,2
5,481	1930,94	25,6	2,732	2032,16	23,8
6,482	1976,19	7,33	3,242	1903,56	13,9
9,248	1370,35	9,538	4,624	1389,72	10,3

$[\text{FOH}]_0 = 1 \text{ mM}$			$[\text{FOH}]_0 = 0,5 \text{ mM}$		
$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	$T_u$	Desvio Padrão	$E_0$ ( $U_{\text{AAP}}/\text{mL}$ )	$T_u$	Desvio Padrão
0	-	-	0	-	-
0,403	2518,72	40,3	0,201	2685,87	415,6
0,746	2348,15	134,7	0,374	2641,94	205,8
0,978	2186,83	65,1	0,489	2532,78	101,8
1,17	2320,29	155,6	0,585	2625,96	34,5
1,324	2148,02	53,6	0,809	1781,81	63,4
1,621	1889,57	38,9	1,009	1441,97	86,4
2,312	1364,88	16,3	1,157	1293,05	58,1

Os dados obtidos através do modelo matemático para as duas interpolações utilizadas bem como a comparação com os dados experimentais são encontrados na Figura 33 e 34.

Como comentado anteriormente, os altos desvios padrão assim como as oscilações dos valores de *Turnover* podem ser atribuídos a erros ocorridos no momento da diluição. A diluição das amostras se fez necessária porque a faixa analítica para leitura da concentração de fenóis totais na metodologia utilizada (de 0,03 a 0,12 mM), foi muito inferior às concentrações residuais de fenol encontradas nas amostras.

Figura 33 – Sobreposição do modelo matemático de *Turnover* obtido através da interpolação polinomial cúbica nos dados experimentais.  $a = 1,665 U_{AAP}/(mL\ mM)$  e  $b = 1$ .

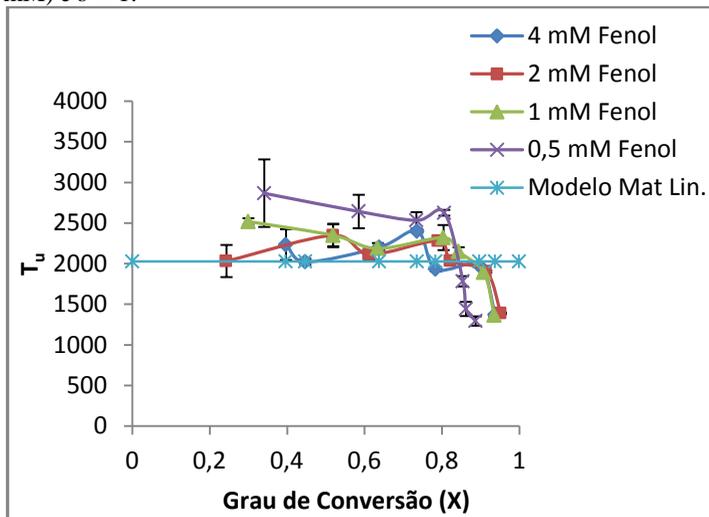
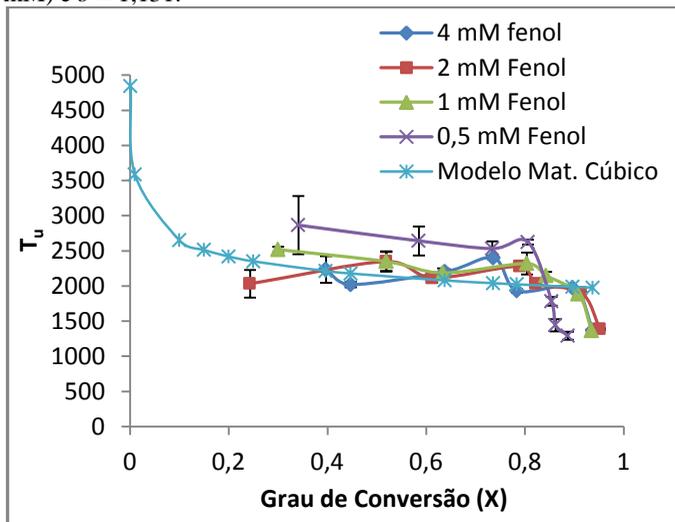


Figura 34 – Sobreposição do modelo matemático de *Turnover* obtido através da interpolação polinomial cúbica nos dados experimentais.  $a = 1,722 U_{AAP}/(mL\ mM)$  e  $b = 1,131$ .



Embora ambas as interpolações demonstrem ter um bom ajuste em relação aos dados de remoção de fenol, a representação dos dados gerados pelos modelos de *Turnover* deixam claro que a escolha da interpolação acaba sendo essencial para determinação do modelo matemático que se adequa melhor a reação de PPCE. Na Figura 33, os valores de *Turnover* obtidos através da equação 10 aparecem destacados em azul claro, e demonstraram que o modelo não representa bem a situação física quando comparado aos resultados experimentais principalmente nos valores extremos de grau de conversão ( $X = 0,3$  e  $X = 0,9$ ).

Nicell *et al.* (1993) citaram que a atividade enzimática necessária para se alcançar a máxima remoção pode variar para diferentes derivados de fenol. Nicell (1994) reportou valores de  $T_u$  igual a 9000 em relação ao grau de conversão, em pH 7,0 e 25°C para o tratamento de 4-clorofenol com HRP, obtendo valores de  $a = 1,665 \text{ U}/(\text{mL mM})$  e  $b = 1$ .

A representação gráfica (Figura 34) dos dados de  $T_u$  obtidos a partir da equação 09 apresentou uma boa correlação com a representação dos dados experimentais obtidos na reação de PPCE. Para todas as  $[\text{FOH}]_0$  analisadas há uma discreta tendência de crescimento no valor de  $T_u$  a medida que o valor de  $X$  diminui. Valores de  $X < 0,24$  não foram avaliados, porém de acordo com a reta gerada pela equação 09, para valores de grau de remoção próximo de zero, o valor de  $T_u$  tende a ser muito grande, fato que também foi descrito e demonstrado por Nicell *et al.* (1995) para reação enzimática com HRP utilizando fenol como substrato.

Assim, definido o modelo matemático, através do ajuste que melhor representa as condições da PPCE, foram calculados os valores mínimos de atividade enzimática necessária para se obter um grau de conversão de 0,9 para todas as concentrações iniciais de fenol, comparando com os valores experimentais obtidos. Os valores são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores da atividade enzimática mínima necessária para se alcançar o grau de conversão de 0,9 obtidos experimentalmente e através do modelo matemático.

[FOH] <sub>0</sub> (mM)	E <sub>0</sub> (U <sub>AAP</sub> /mL)	E <sub>0</sub> (U <sub>AAP</sub> /mL)	Desvio Padrão
	Experimental	Analítico	
0,5	0,98	0,77	0,15
1	1,51	1,53	0,01
2	3,06	3,06	0
4	6,55	6,11	0,31

A comparação dos dados e o respectivo desvio padrão para cada valor de [FOH]<sub>0</sub> corroboram a boa representação do modelo, demonstrando num tempo de retenção de 3 horas, a atividade enzimática necessária para o grau de conversão de 0,9 é diretamente proporcional a quantidade inicial de fenol contida no efluente, como apresentado anteriormente através da equação 04.

Nicell *et al.* (1995), Erhan *et al.* (2002) e Wu *et al.* (1997), comentaram que os principais fatores limitantes do uso da enzima HRP em batelada são a grande quantidade de enzima necessária para se alcançar alto grau de conversão e o fato de a enzima sofrer desativação, seja através de processos químicos, mecânicos ou térmicos. Desta forma, buscando entender os mecanismos envolvidos no processo de desativação da enzima HRP foram efetuados experimentos para avaliação das principais variáveis que poderiam estar envolvidas direta ou indiretamente no processo de desativação da enzima.

#### 4.4 FATORES ENVOLVIDOS NA PERDA DE ATIVIDADE CATALÍTICA DA HRP NA REAÇÃO DE PPCE

Em um primeiro momento, visando verificar a possibilidade de reuso da enzima HRP, depois de finalizada a PPCE, foram realizadas três reações. Em cada uma delas foi adicionado novamente fenol e posteriormente peróxido de hidrogênio à mistura final de reação, sendo testadas concentrações de fenol e enzimas diferentes. Nestas condições, nenhuma das reações apresentou qualquer mudança.

Assim, com a finalidade de analisar o efeito da queda da atividade enzimática no decorrer da reação, se proporcional ou não a concentração inicial de fenol, foram realizados experimentos fixando a quantidade de enzima e variando a quantidade de substrato. A mistura

reacional consistiu em 0,08 mg/mL de solução de extrato enzimático, concentração inicial de fenol compreendida entre 0,5 a 4 mM, concentração de peróxido de hidrogênio 50% de excesso em relação a concentração inicial de fenol ( $[H_2O_2]_0 = 1,5 [FOH]_0$ ) e tampão fosfato pH 7,4 0,1 M. Os resultados experimentais e a comparação com dados do modelo utilizado para cada  $[FOH]_0$  são apresentados na Figura 35. As cinéticas foram ajustadas conforme modelo de decaimento de primeira ordem descrito na equação 11.

$$E = E_0 \cdot e^{-k_d t} \quad (11)$$

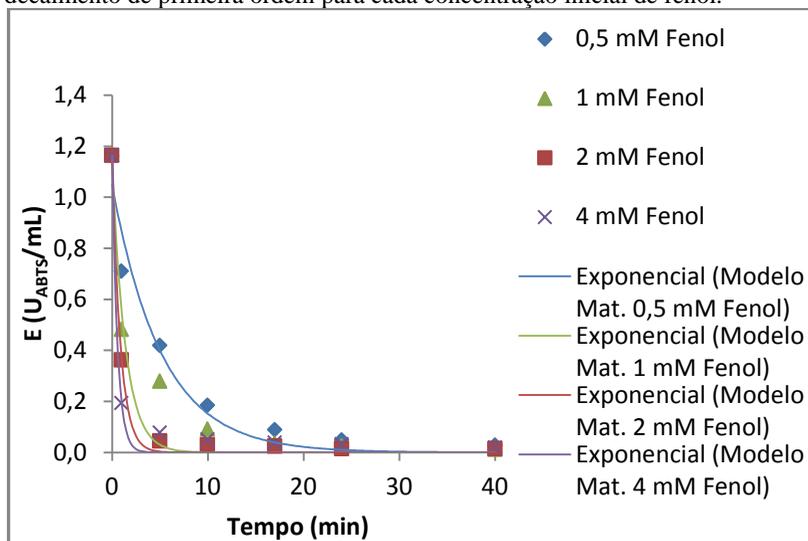
Onde E é a atividade enzimática relativa (U/mL),  $E_0$  é a atividade inicial de enzima (U/mL),  $k_d$  é a constante de cinética de decaimento ( $\text{min}^{-1}$ ) e t é o tempo em minutos.

Com o progresso da reação, em cada uma das concentrações iniciais de fenol, houve uma redução gradual da atividade catalítica da enzima HRP. Quanto maior a concentração inicial de fenol menor foi o tempo de vida catalítica ou seja, a concentração inicial de fenol foi diretamente proporcional ao grau de desativação da enzima.

O aumento da concentração de peróxido não influenciou diretamente na desativação da enzima HRP visto que a proporção estequiométrica de fenol em relação ao  $H_2O_2$  nas reações foi mantida em (1:1,5). Tal afirmação pode ser comprovada através dos resultados reportados de Cooper e Nicell (1996). Os autores compararam a remoção de fenol em proporções estequiométricas de (1:1) até (1:2) em várias atividades enzimáticas e obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que a remoção de fenol no processo PPCE não foi influenciada pela variação da concentração de peróxido de hidrogênio dentro das proporções estequiométricas analisadas.

Resultados e conclusões semelhantes foram obtidos por Wu *et al.* (1998). Em seu trabalho os autores reportaram que na concentração inicial de fenol de 1 mM e concentração de peróxido de 1 mM foram necessários cerca de 5 minutos para que quase toda a atividade catalítica da enzima fosse perdida enquanto que para a concentração de fenol de 0,5 mM e concentração de peróxido de 1 mM o tempo de vida catalítica da enzima foi duas vezes maior.

Figura 35 – Pontos experimentais e sobreposição do modelo matemático de decaimento de primeira ordem para cada concentração inicial de fenol.



Os ajustes realizados para cada uma das concentrações iniciais de fenol avaliadas são apresentados na Tabela 10. Os coeficientes de correlação altos ( $R^2 > 0,93$ ) demonstraram que o modelo de cinética de primeira ordem representou bem os pontos experimentais com desvios ficando entre 4% a 23% do valor calculado de  $k_d$ .

Tabela 10 – Valores das constantes  $E_0$  e  $k_d$  com seus respectivos desvios padrão e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) obtidos pelo modelo de decaimento de primeira ordem.

[FOH] <sub>0</sub> (mM)	$E_0$ (U <sub>ABTS</sub> /mL)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão	Coefficiente de Correlação ( $R^2$ )
0,5	1,163	0,193	0,027	0,967
1	1,163	0,727	0,170	0,934
2	1,163	1,160	0,055	0,996
4	1,163	1,796	0,184	0,988

Para uma melhor avaliação do efeito da concentração inicial de fenol sob a desativação da enzima, foi calculado o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima, a partir da equação 11, que foi definido como o tempo

que leva para que a enzima diminua metade do valor da sua atividade inicial:

$$E = E_0 \cdot e^{-k_d t} \quad (11)$$

Para o tempo de meia vida:

$$\frac{E_0}{2} = E_0 \cdot e^{-k_d t_{1/2}} \quad (12)$$

Realizando tratamento matemático adequado chega-se a:

$$t_{1/2} = -\frac{1}{k_d} \ln \frac{1}{2} \quad (13)$$

Onde  $t_{1/2}$  é o tempo de meia vida e  $k_d$  é a constante de decaimento. Os valores de  $t_{1/2}$  são encontrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Valores do tempo de meia vida calculados para cada concentração inicial de fenol.

<b>[FOH]<sub>0</sub></b> <b>(mM)</b>	<b>E<sub>0</sub></b> <b>(U<sub>ABTS</sub>/mL)</b>	<b>k<sub>d</sub></b> <b>(min<sup>-1</sup>)</b>	<b>t<sub>1/2</sub></b> <b>(min)</b>
0,5	1,163	0,193	3,590
1	1,163	0,727	0,950
2	1,163	1,160	0,597
4	1,163	1,796	0,386

Os dados da Tabela 11 demonstraram que há uma redução no tempo de meia vida da enzima conforme aumenta a concentração inicial de fenol. A cada aumento de [FOH]<sub>0</sub> efetuado, maior foi a redução observada no tempo de meia vida, o que deixa claro que a desativação catalítica da enzima HRP no processo de PPCE está diretamente ligada à concentração inicial de fenol utilizado.

Nicell *et al.* (1995) relataram que a desativação enzimática pode resultar dos processos: (i) da oxidação da enzima originando formas inativas; (ii) da reação entre radical fenóxi e HRP e (iii) do processo de adsorção e/ou oclusão da enzima pelos precipitados poliméricos. Klibanov *et al.* (1983) indicaram que os radicais fenóxi gerados durante o processo de PPCE atacam o sítio ativo da enzima eliminando sua habilidade catalítica. Nakamoto e Machida (1992) postularam que o

principal mecanismo de inativação ocorre devido à adsorção e/ou oclusão da enzima causada pelos polímeros formados durante a reação, porém não apresentaram nem a cinética de desativação nem as constantes em seu trabalho. Ainda investigando o mesmo processo de desativação por adsorção dos produtos poliméricos, Wu *et al.* (1998) analisaram a perda de atividade causada durante a reação de PPCE demonstrando que, em curto período de tempo, cerca de 30% da atividade da HRP fica adsorvida no sólido. De forma a descartar a hipótese de desativação causada somente por radical fenóxi, os autores utilizaram as precipitados obtidos pós-reação de PPCE em uma solução contendo somente enzima HRP e observaram que a atividade catalítica no sobrenadante sofreu redução, concluindo assim, que o precipitado foi capaz de absorver a enzima.

De fato, conforme mecanismo de reação enzimática apresentado na Figura 12, a enzima HRP pode sofrer várias reações secundárias que a levam à sua forma inativa. O excesso de peróxido de hidrogênio, por exemplo, pode ser responsável pela formação da proteína verde-heme e pela formação do composto III, porém esses dois tipos de desativação ocorrem principalmente em condições reacionais de baixa concentração de substrato e excesso de  $H_2O_2$ . Melo (2010), por exemplo, utilizando como substrato Triclosan, relata em seu trabalho de pesquisa que a principal via de desativação da enzima HRP foi causada via geração do composto III e formação de P-670, por ser utilizada baixa concentração de substrato (cerca de 20  $\mu M$ ) e pelo fato de ainda haver, após o termino da reação, uma concentração de  $H_2O_2$  remanescente de 14  $\mu M$ .

Neste trabalho de pesquisa, como foram utilizadas altas concentrações de fenol e não foi detectada qualquer quantidade de  $H_2O_2$  presente após o final da reação, foi descartada a hipótese de desativação por composto III e P-670. Zhang e Nicell (1999), citando Nicell (1994) e Wu *et al.* (1998) relataram que o tipo de inativação gerado por excesso de peróxido de hidrogênio à enzima HRP é somente significante quando não há presença de substrato.

Avaliando os resultados obtidos após análise dos dados experimentais contidos na Figura 25 e Figura 35, pôde-se inferir que a principal forma de inativação ocorrida na reação de PPCE foi à oxidação da enzima causada pelos radicais fenóxi e pela adsorção e/ou oclusão da enzima no precipitado. Várias são as evidências que corroboram esta afirmação: A desativação por radicais fenóxi ficou clara já nos instantes iniciais da reação quando, antes mesmo de serem formados os primeiros polímeros, houve queda aparente da atividade catalítica da HRP. Wu *et al.* (1998) afirmam que os pequenos oligômeros formados no início da

reação influenciam pouco na desativação, servindo ainda como substratos para a enzima HRP. Estes por sua vez são posteriormente processados e transformados em oligômeros insolúveis de maior cadeia os quais são responsáveis pela desativação. Ou seja, no processo de PPCE a etapa de reação enzimática é muito mais rápida que etapa de formação de polímeros.

Algumas das explicações para a desativação causada no processo de formação precipitados são reportadas em Wu *et al.* (1998): (i) Associações multisítios do oligômero com a enzima, com um dos grupos fenólicos do oligômero no sítio ativo da enzima além de outras interações do oligômero através de ligações não covalentes com a proteína, (ii) Formação de um radical oligômero tipo fenoxil no sítio ativo da enzima durante o ciclo catalítico normal da enzima; (iii) Anexação deste radical fenoxil por ligação covalente com o sítio ativo.

Assim, buscando verificar os efeitos causados pelos radicais fenóxi e pelo precipitado presente na reação enzimática, foi medida a concentração de proteína pelo método de Bradford no início e final da PPCE e as respectivas massas de fenol, enzima e precipitado. O meio reacional foi constituído de  $[FOH]_0 = 8 \text{ mM}$ ,  $[H_2O_2]_0 = 12 \text{ mM}$ ,  $C_{ee} = 2,126 \text{ mg/mL}$  e tampão fosfato pH 7,4 0,1 M. Os resultados apresentados são encontrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores de atividade enzimática, massa dos reagentes e produtos envolvidos na PPCE, medidos no início e após o término da reação.

	Início	Final	Desvio Padrão
Fenol (mg)	7,52	1,80*	0,045
Peróxido de Hidrogênio (mg)	4,08	0,00	0,00
Precipitado (mg)	-	22,60**	0,21
Extrato Enzimático (mg)	21,26	-	-
Proteína (mg)	2,12	0,211*	0,02
Atividade Enzimática ( $U_{ABTS}/\text{mL}$ )	15,4	0,00	0,00

\* Medidas realizadas no sobrenadante

\*\* Previamente à medida da massa, o precipitado foi submetido ao processo de secagem em 50 °C por 24 horas.

Os valores obtidos demonstraram que além da grande quantidade de fenol polimerizado que se encontra no precipitado (5,72 mg) parte da massa de extrato enzimático, e conseqüentemente de proteína, estão presentes no fenol polimerizado. Admitindo-se que o peróxido de

hidrogênio e demais produtos que poderiam ser encontrados no precipitado estejam em quantidade muito pequenas, pode-se afirmar que dos 2,126 mg de proteína contidas no extrato bruto enzimático, aproximadamente 0,21 mg são remanescentes no sobrenadante. Como o valor da atividade enzimática no final da reação foi nula tanto no precipitado como no sobrenadante ficou evidente através da análise da Figura 25 e dos valores da Tabela 12, que na reação de PPCE tanto o radical fenóxi quanto o precipitado oligômero foram os principais responsáveis pela desativação da enzima HRP.

#### 4.5 ANÁLISE DE TOXICIDADE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO

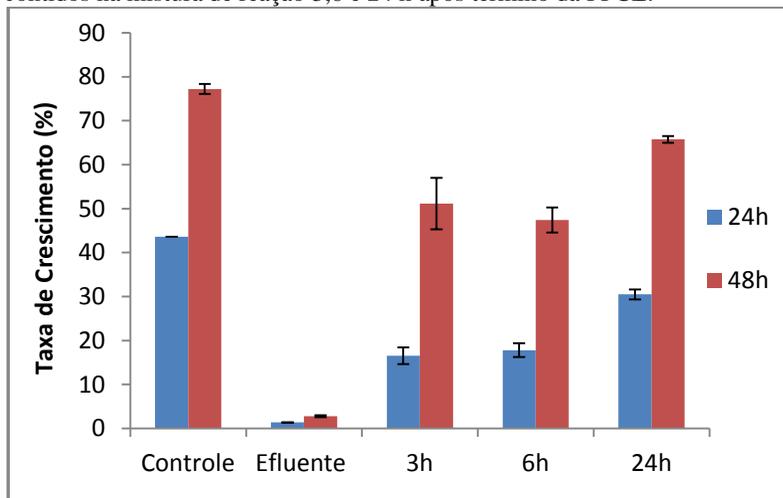
No tratamento de águas residuárias a avaliação e redução da toxicidade são tão importantes quanto à própria remoção de resíduos. Como foi demonstrado nos resultados apresentados no item 4.3, parte dos produtos oriundos da reação enzimática ainda pode permanecer na fase aquosa, após o tratamento, e reagirem entre si elevando os níveis toxicidade. Desta forma, a completa remoção do substrato não significa necessariamente a total eliminação da toxicidade.

Com intuito de avaliar a variação da toxicidade ligada aos produtos da reação enzimática, foram realizados testes comparando o efluente inicial com os produtos contidos na mistura de reação após o término da PPCE e com um meio de controle (meio ótimo de crescimento para alga). Os resultados são encontrados na Figura 36. Em cada um dos testes, a enzima e o peróxido de hidrogênio foram utilizados em excesso levando a valores de remoção maiores ou iguais a 90% após 3 horas de reação. O efluente foi constituído das mesmas concentrações iniciais dos reagentes utilizados na reação enzimática, porém, sem presença da enzima HRP. As taxas de crescimento da alga foram calculadas conforme descrito no item 3.3.8 e realizadas em três diferentes tempos: 3, 6 e 24 horas após o término da reação enzimática, com o objetivo de avaliar a variação da toxicidade com o tempo em cada uma das amostras.

Os gráficos apresentados na Figura 36 demonstraram através da taxa de crescimento da alga, que à medida que o tempo passa a toxicidade do meio diminuiu, aproximando-se, após 24 horas, da taxa de crescimento do controle. A taxa de crescimento algal no efluente sem tratamento não variou com o tempo e foi bem inferior, quando comparado com as outras condições avaliadas, o que deixa evidente que os produtos da reação contidos no sobrenadante da mistura de reação

possuem uma toxicidade muito menor do que a do efluente em questão, em todos os tempos avaliados.

Figura 36 – Taxa de crescimento da alga *Scenedesmus subspicatus* nos diferentes meios avaliados: Controle, Efluente sem tratamento e produtos contidos na mistura de reação 3,6 e 24 h após término da PPCE.



Wagner e Nicell (2002) citam que os dímeros fenólicos solúveis não são os principais responsáveis pela toxicidade presente na reação enzimática, mas sim que a toxicidade foi decorrente de compostos presentes em pequenas quantidades ou ainda que a toxicidade presente no meio reacional foi resultante da ação sinérgica de várias espécies.

A Tabela 13 apresenta a influência da concentração da mistura de reação sobre a taxa de crescimento algal, na pior condição de toxicidade (3 h após a reação). Foram realizadas cinco diluições com o objetivo de calcular a concentração letal que causa 50% de redução na taxa de crescimento da alga.

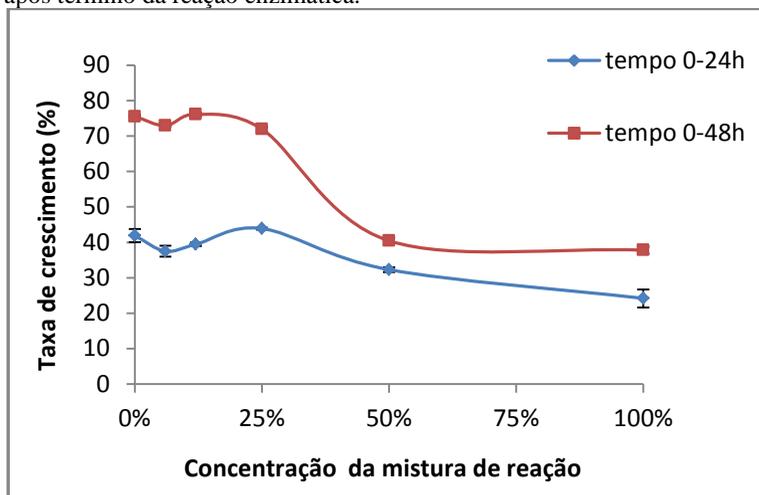
Tabela 13 – Taxas de crescimento obtidas através do teste de toxicidade realizado com alga *Scenedesmus subspicatus* na mistura de reação 3 horas pós-reação de PPCE.

<b>Concentração da mistura de reação (%)</b>	<b>Tempo 0-24h</b>	<b>Tempo 0-48h</b>
0 (Controle)	41,90	75,55
6	37,50	72,95
12	39,45	76,15
25	43,90	71,95
50	32,30	40,45
100	24,20	37,80

A maior queda da taxa de crescimento foi encontrada no período de 48 h. Em nenhuma das concentrações analisadas no experimento houve redução superior a 50% em relação à taxa de crescimento do controle, como pode ser observado pela Figura 37. Embora o sobrenadante não diluído (100%) tenha apresentado uma redução na taxa de crescimento considerável no tempo de 48 h (próxima de 50%), esta é ainda pequena quando comparada com os resultados obtidos para o efluente.

Desta forma, mesmo a pior condição de crescimento da alga *Scenedesmus subspicatus*, demonstrou que a PPCE é viável para utilização num processo de complementação (polimento) de tratamentos convencionais, pois reduz drasticamente os níveis de toxicidade presente inicialmente no efluente, tornando-o apto para ser utilizado, por exemplo, num processo de tratamento biológico posterior.

Figura 37 – Teste de toxicidade com alga *Scenedesmus subspicatus*, 3 horas após término da reação enzimática.



Wagner e Nicell (2002) relataram que os dados obtidos para toxicidade, relativo aos parâmetros utilizados a partir do uso do fenol sintético como efluente, não necessariamente se reproduzem para o tratamento de águas residuais nas indústrias, citando como exemplos resultados de pesquisas realizadas com efluente de indústria de papel e refinaria de petróleo. Tal comportamento se deve ao fato de que estes efluentes constituem misturas complexas de substâncias, para as quais é necessária a realização de um novo processo de análise.

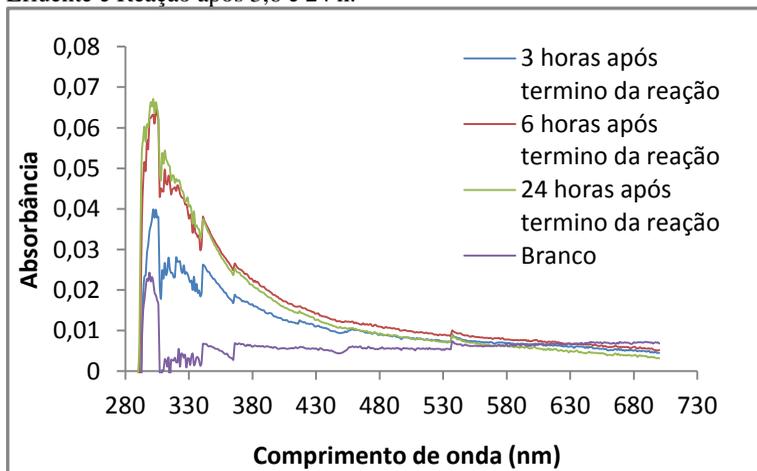
Dois testes adicionais foram efetuados com o objetivo de se verificar a causa da redução (demonstrada pela taxa de crescimento da alga) da toxicidade com o tempo. Inicialmente foi dosada a concentração de fenol em cada uma das alíquotas 3, 6 e 24 horas, a fim de verificar se havia alguma correlação da concentração de fenol residual presente com o aumento da taxa de crescimento. A concentração de fenol encontrada no sobrenadante para cada um dos tempos pós-reação PPCE são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 – Concentração de fenol na mistura de reação 3, 6 e 24 horas após término da PPCE.

[FOH] <sub>0</sub> (mM)	[FOH] (mM) t = 3 h	[FOH] (mM) t = 6 h	[FOH] (mM) t = 24 h
4	0,397	0,387	0,404
4	0,418	0,401	0,389
4	0,409	0,394	0,417

Os resultados demonstraram que o fenol residual não foi o principal responsável pela variação da taxa de crescimento com o decorrer do tempo, já que as concentrações encontradas foram semelhantes em todos os momentos. Após a dosagem de fenol, visando buscar maiores informações, foram realizados espectros de varredura na faixa de comprimento de onda de radiação UV, em cada uma das amostras utilizadas para realização do experimento (Figura 38). Para comparação, foi elaborada uma amostra “Branco” sem a presença da enzima HRP, contendo a mesma concentração dos reagentes no sobrenadante.

Figura 38 – Espectro de varredura de comprimento de onda no intervalo de radiação UV realizada nas amostras dos diferentes meios utilizados: Controle, Efluente e Reação após 3,6 e 24 h.



Os espectros de varreduras UV obtidos demonstraram que com o passar do tempo há um aumento da absorvância numa faixa de

comprimento de onda compreendido entre 280 nm a 430 nm, fato observado principalmente pelas absorvâncias em 304 nm e 341 nm. Ou seja, no período de tempo compreendido entre 3 h e 24 h de reação, especialmente entre 3 h e 6 h, pelas mudanças espectrais observadas, depreende-se que importantes reações ainda estão ocorrendo. Levando-se em consideração a baixa atividade de HRP detectada neste período (Figura 35), é possível considerar que as reações observadas ocorreram via não enzimática. Portanto, como consequência, a evolução das absorvâncias evidenciou que a queda da toxicidade (Figura 36) com o passar do tempo está fortemente ligada ao mesmo grupo de reações. Assim, tais reações secundárias não enzimáticas resultaram na formação de substâncias menos tóxicas.

Resultados semelhantes foram reportados por Wagner e Nicell (2002) que demonstraram através de sua pesquisa que a queda da toxicidade na reação de PPCE depende fortemente do tempo pós-reação. Os mesmos autores relatam que duas considerações principais podem ser levadas para a explicação da queda da toxicidade: (i) espécies tóxicas podem se combinar através de reação não enzimática para formar compostos que tem baixa solubilidade e eventualmente precipitar na solução ou (ii) eles podem reagir durante o passar do tempo formando produtos de reação solúveis não tóxicos.



## 5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O processo de polimerização e precipitação catalisado por enzima demonstrou ser um método efetivo na remoção do fenol em águas residuárias. Os experimentos realizados comprovam que a PPCE é um método promissor para utilização em um processo de complementação (polimento) de tratamentos convencionais, pois mesmo em condições extremas, excesso de peróxido de hidrogênio e concentrações altas de fenol, a enzima HRP foi capaz de alcançar altos índices de remoção ( $X > 0,9$ ).

Foram desenvolvidos dois modelos matemáticos válidos para o intervalo de  $0,3 \leq X \leq 0,9$  e concentração inicial de fenol de 0,5 a 4 mM a partir de dois diferentes métodos de interpolação: O primeiro correlacionando a concentração residual de fenol com sua concentração inicial e com a atividade enzimática e o segundo correlacionando o número de *Turnover* com concentração inicial de fenol e a atividade de enzima necessária. Através do uso destas equações, será possível quantificar, prever e reduzir custos no processo de produção, assim como avaliar as melhores condições para ser efetuada a remoção, de acordo com as características do efluente a ser tratado e da quantidade de poluente a ser removido.

As atividades enzimáticas mínimas necessárias para se alcançar o valor de  $X = 0,9$  nas concentrações iniciais de fenol 0,5 mM, 1 mM, 2 mM e 4 mM de acordo com o modelo gerado foram 6,11  $U_{AAP}/mL$ , 3,06  $U_{AAP}/mL$ , 1,53  $U_{AAP}/mL$  e 0,77  $U_{AAP}/mL$  respectivamente. Através da análise da variação do tempo de meia vida da enzima HRP ocasionado pelo aumento da concentração inicial de fenol e/ou da atividade enzimática, bem como da quantidade de enzima necessária para se obter altos índices de grau de remoção, constatou-se que ainda há necessidade de explorar diferentes técnicas de utilização da enzima antes de aplicar este processo de tratamento diretamente na indústria como, por exemplo, imobilização e uso de aditivos que aumentam a vida catalítica visando desta forma reduziros custos de processo com a reutilização e redução da quantidade de enzima.

O nível de toxicidade dos produtos da reação de PPCE foi relativamente baixo, fato que pode ser observado comparando as diferenças nas taxas de crescimento das algas obtidas pelos produtos da reação e pelo efluente inicial. Os tratamentos convencionais de efluentes utilizados garantem a redução da carga orgânica e outros parâmetros, porém nem sempre reduzem a toxicidade do efluente. Assim, o tratamento realizado via reação enzimática demonstrou ser uma boa

alternativa em relação aos demais métodos, já que, devido a sua especificidade, atua pontualmente na eliminação de substâncias que são responsáveis por gerar altos níveis de toxicidade.

A análise de IR demonstrou que o precipitado formado pela reação enzimática é heterogêneo e constituído não só por fenol polimerizado, mas por diferentes substâncias que são formadas via reação radicalar e que acabam por lhe fornecer características totalmente diferentes das do fenol mãe. Tal comportamento torna o processo enzimático interessante, pois estas características acabam facilitando a identificação dos produtos removidos no processo, além de possibilitar a exploração destes na utilização em outros processos de natureza física, química ou biológica.

A seguir são apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros com base nos dados experimentais obtidos.

- Determinar os dados e modelos de remoção do fenol para PPCE com enzima livre em reator contínuo, comparando com os dados encontrados para reação em batelada.
- Efetuar reação de PPCE com enzima HRP imobilizada em presença de aditivos (Polietilenoglicol, Polietileno, Gelatina, etc.)
- Promover estudos que avaliem a viabilidade de utilização do precipitado da reação de PPCE como adsorvente ou como substrato em reatores biológicos.
- Verificar a eficiência da degradação de fenol e toxicidade dos produtos utilizando efluentes reais.
- Avaliar impacto na desativação da enzima HRP causado pela formação de radicais fenóxi através da utilização de sequestrantes de radicais livres (Sorbato, Ácido Ascórbico, etc.).
- Avaliar a viabilidade da utilização de enzimas peroxidases oriundas de outras fontes (soja, rabanete, gengibre, nabo, etc.) para remoção de fenol através da reação de PPCE.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AITKEN, M. D. Waste Treatment Applications of Enzymes: Opportunities and Obstacles**, Chemical Engineering Journal, v. 52, p. 49-58, 1993.
- AITKEN, M. D.; MASSEY, J.; CHEN, T.; HECK, P. E. Characterization of Reaction Products From the Enzyme Catalyzed Oxidation of Phenolic Pollutants**, Water Research, v. 28, p. 1879-1889, 1994.
- ALBERTI, B. N.; KLIBANOV, A. M. Peroxidase for Removal of Hazardous aromatics from industrial Waste Waters**. Detoxification of Hazardous Wastes, p. 349-56, 1982.
- BABUPONNUSAMI, A.; MUTHUKUMAR, K. Advanced Oxidation of Phenol: A Comparison Between Fenton, Electro-Fenton, Sono-electro-Fenton and Photo-Electro-Fenton Processes**, Chemical Engineering Journal, v. 183, p. 1-9, 2012.
- BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Enzymatic Removal of Phenol and Biodegradation of Phenol and *p*-chlorophenol in Enzyme Reactor: Horseradish Peroxidase Immobilized on Magnetic Beads**, Journal of Hazardous Material, v. 156, p. 148-155, 2008.
- BEKER, U.; GANBOLD, B.; DERTLI, H.; GÜİBAYIR, D. D. Adsorption of Phenol by Activated Carbon: Influence of Activation Methods and Solution pH**, Energy Conversion and Management, v. 51, p. 235-240, 2010.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S.; Biochemical Engineering**. New York: M. Dekker, c1997. 702p.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial**. São Paulo (SP): Edgard Blucher, 2001. 4v.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**, Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAILE, P. M., CAVALCANTI, A. W. E. J. **Manual de Tratamento de águas Residuárias industriais**, CETESB, 1993.

CALACE, N.; NARDI, E.; PETRONIO, M. B.; PIETROLETTI, M. **Adsorption of phenols by paper mill sludges**, Environmental Pollution, v. 118, p. 315-319, 2002.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução do CONAMA nº 397. IBAMA, Brasília, 2008.

CONG, Y.; LI, Z.; ZHANG, Y.; WANG, Q.; XU, Q. **Synthesis of  $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{TIO}_2$  Nanotube Arrays for Photoelectro-Fenton Degradation of Phenol**, Chemical Engineering Journal, v. 191, p. 356-363, 2012.

COOPER, V. A.; NICELL, J. A. **Removal of Phenols From a Foundry Wastewater using Horseradish Peroxidase**, Water Research, v. 30, p. 954-964, 1996.

DAMASCENO, E. P.; PINHEIRO, Z. B.; ARAÚJO, R. S.; SILVA, G. M. M.; RODRIGUES, K.; SAMPAIO, G. M. M. S. **Tratamento Biológico de Efluentes de Indústria Petroquímica em Reatores em Batelada com Biomassa Dispersa e Imobilizada de *Aspergillus niger* AN 400**, VII Encontro de Pesquisa e Pós-Graduação (VII ENPPG), Fortaleza, 2007.

DUNFORD, H. B. **Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties**, Peroxidases in Chemistry and Biology, v. 02, p. 1-25, 225-227, 1991.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. **Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: A Review**, Applied Catalysis B: Environmental, v. 28, p. 83-99, 2000.

EL-NAAS, M. H.; AL-MUHTASEB, S. A.; MAKHLOUF, S. **Biodegradation of Phenol by *Pseudomonas putida* Immobilized in Polyvinyl Alcohol (PVA) gel**, Journal of Hazardous Material, v. 164, p. 720-725, 2009.

ERHAN, E.; KESKINLER, B.; AKAY, G.; ALGUR, O. F. **Removal of Phenol from Water by Membrane-Immobilized Enzymes Part I. Dead-end Filtration**, Journal Membrane Science, v. 206, p. 361-373, 2002.

**FATMA** – Decreto nº 14.250, de 5 de junho de 1981 – Regulamenta os dispositivos da lei nº 5.793, de 15 de outubro de 1980 referentes à proteção e melhoria da Qualidade Ambiental.

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; ZAMORRA, P. P. **Novas Tendências para o Tratamento de Resíduos Industriais contendo Espécies Organocloradas**, Química Nova, v. 23, p.504-511, 2000.

HAMID, M.; REHMAN, K. U. **Potential applications of peroxidases**, Food Chemistry, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. **Recent Developments in the Production of Extracellular Fungal Peroxidases and Laccases for Waste Treatment**, Journal of Environmental Engineering and Science, v. 03, p. 1-19, 2004.

JIANG, W.; ZHANG, W.; LI, B.; DUAN, J.; LV, Y.; LIU, W.; YING, W. **Combined Fenton Oxidation and Biological Activated Carbon Process for Recycling of Coking Plant Effluent**, Journal of Hazardous Material, v. 189, p. 308-314, 2011.

KADNIKOVA, E. N.; KOSTIC, N. M. **Oxidation of ABTS by Hydrogen Peroxide Catalyzed by Horseradish Peroxidase Encapsulated into Sol-Gel Glass. Effects of Glass Matrix on Reactivity**, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 18, p. 39-48, 2002.

KARAM, J.; NICELL, J. A. **Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment**, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 69, p. 141-153, 1997.

KLIBANOV, A. M.; TU, T. M.; SCOTT, K. P. **Peroxidase-Catalyzed Removal of Phenols from Coal-Conversion Waste Waters**, Science, v. 221, p. 259-261, 1983.

KUNZ, A.; ZAMORRA, P. P.; MORAES S. G.; DURÁN N.; **Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis**, Química Nova, v. 25, p.78-82, 2002.

LAI, Y. C.; LIN, S. C. **Application of Immobilized Horseradish Peroxidase for the Removal of *p*-chlorophenol From Aqueous Solution**, Process Biochemistry, v. 40, p. 1167-1174, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th. ed. New York: W. H. Freeman, 2008. xxix, 1158.

LIN, H. S.; HUANG, C. Y. **Adsorption of BTEX from Aqueous Solution by Macroreticular Resins**, Journal of Hazardous Material, v. 70, p. 21-37, 1999.

LÓPEZ, A. **Etude du Transfert et de la reactive de l'ozone appliques au traitement dès eaux residuaires de l'industrie textile**, Ph.D. Dissertation, INSA, Toulouse, France, 2004.

LU, X.; HAN, J.; SHEPHARD, N.; RHODES, S.; MARTIN, A. D.; LI, D.; XUE, G.; CHEN, Z. **Phenolic Resin Surface Restructuring upon Exposure to Humid Air: A Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopic Study**, The Journal of Physical Chemistry B, v. 113, p. 12944-12951, 2009.

MARIANO, J. B. **Impactos Ambientais do Refino de Petróleo**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MARTÍNEZ, D. A B.; GIRALDO, A.; PIRAJÁN, J. C. M. **Effect of the pH in the Adsorption and in the Immersion Enthalpy of Monohydroxylated Phenols from Aqueous Solutions on Activated Carbons**, Journal of Hazardous Material, v. 169, p. 291-296, 2009.

MARTÍNKOVÁ, L.; UHNÁKOVÁ, B.; PÁTEK, M.; NESVERA, J.; KREN, V. **Biodegradation Potential of the genus *Rhodococcus***, Environment International, v. 35, p. 162-177, 2009.

MARTINS, M. **Biossensores de Colesterol Baseados no Sistema Poli (Álcool Vinílico)/ Ftalocianina**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Itajubá. Itajubá, 2006.

MELO, C. F. **Conversão de Biocida Tricolsan Catalisada Por Enzimas Oxidativas e Avaliação Da Remoção Da Atividade Antibacteriana**, Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MESTER, T.; TIEN, M. **Oxidation Mechanism of Ligninolytic Enzymes Involved in the Degradation of Environmental Pollutants**, International Biodeterioration & Biodegradation, v. 26, p. 51-59, 2000.

MING, Z. W.; LONG, C.J.; CAI, P. B.; XING, Z.Q.; ZHANG, B. **Synergistic adsorption of phenol from aqueous solution onto polymeric adsorbents**, Journal of Hazardous Material, v. 128, p. 123-129, 2006.

MORAIS, A. A. **Uso de Ozônio como Pré e Pós Tratamento de Efluentes da Indústria de Celulose Kraft Branqueada**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MUSTAFA, G. S. **Reutilização de Efluentes Líquidos em Indústria Petroquímica**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Bahia. Salvador, 1998.

NAKAMOTO, S.; MACHIDA, N. **Phenol Removal from Aqueous solutions by peroxidase catalysed reactions using additives**, Water Research, v. 26, p. 49-54, 1992.

NICELL, J. A. **Kinetics of Horseradish Peroxidase Catalyzed Polymerization and Precipitation of Aqueous 4-Chlorophenol**, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 60, p. 203-215, 1994.

NICELL, J. A.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; PIERRE, C. C.; TAYLOR, K. E. **Enzyme Catalyzed Polymerization and Precipitation of Aromatic Compounds from Aqueous Solution**, Canadian Journal of Civil Engineering, v. 20, p. 725-735, 1993.

NICELL, J. A.; SAADI, K. W.; BUCHANAN, I. D. **Phenol Polymerization and Precipitation by Horseradish Peroxidase Enzyme and an Additive**, Bioresource Technology, v. 54, p. 5-16, 1995.

ÖZKAYA, B. **Adsorption and Desorption of Phenols on Activated Carbon and a Comparison of Isotherm models**, Journal of Hazardous Material, v. 129, p. 158-163, 2006.

PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; CORSEUIL, H. X.; SCHNEIDER, M. R.; LINHARES, M. M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**, Centro de Recursos Ambientais – CRA, Série de Cadernos de Referência Ambiental, v. 12, 2002.

PINTO, A. M. A. **Efeito da Alta Pressão na Actividade da Enzima Peroxidase**, Dissertação de Mestrado – Universidade de Aveiro. Aveiro, 2008.

RODRIGUES, A. K. **Uso de Reatores Biológicos com Fungos para Remoção de Fenol de Água Residuária Sintética**, Dissertação de Doutorado – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R.. **Biodegradation of Phenol by a Filamentous Fungi Isolated from Industrial Effluents – Identification and Degradation Potential**, Process Biochemistry, v. 39, p. 1001-1006, 2004.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2nd. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, c2002. xx,553p.

SIDDIQUE, M. H.; PIERRE, C. C.; BISWAS, N.; BEWTRA, J.; TAYLOR, K. E. **Immobilized Enzyme Catalyzed Removal of 4-Chlorophenol from Aqueous Solution**, Water Research, v. 05, p. 883-890, 1993.

SILVEIRA, D. S. A. **Avaliação da Eficiência da Ozonização Combinada com o Tratamento de Lodos Ativados de Efluentes de Fábricas de Celulose Kraft Branqueada**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro (RJ): LTC, 2007. xiv,490p.

SOUZA, F. B. **Remoção de Compostos Fenólicos de Efluentes Petroquímicos com Tratamentos Sequenciais e Simultâneos de Ozonização e Adsorção**, Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TSAI, S. Y.; JUANG, R. S. **Biodegradation of Phenol and sodium salicylate mixtures by suspended *Pseudomonas putida* CCRC 14365**, Journal of Hazardous Material, v. 138, p. 125-132, 2006.

VARMA, R. J.; GAIKWAD, B. G. **Biodegradation and Phenol tolerance by recycled cells of *Candida tropicallis* NCIM 3556**, International Biodeterioration & Biodegradation, v. 63, p. 539-542, 2009.

VEITCH, N. C. **Horseradish Peroxidase: a modern view of a classic enzyme**, Phytochemistry, v. 65, p. 249-259, 2004.

WAGNER, M.; NICELL, J. A. **Detoxification of Phenolic Solutions With Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide**. Water Research, v. 36, p. 4041-4052, 2002.

WILBERG, K. Q. **Oxidação de Compostos Fenólicos em Solução Aquosa com Enzima Peroxidases de Extrato Vegetais**, Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

WU, Y.; TAYLOR, K. E.; BISWAS, N.; BEWTRA, J. K. **Comparison of Additives in the Removal of Phenolic Compounds by Peroxidase Catalyzed Polymerization**, Water Research, v. 31, p. 2699-2704, 1997.

WU, Y.; TAYLOR, K. E.; BISWAS, N.; BEWTRA, J. K. **A Model for the Protective Effect of Additives on the Activity of Horseradish Peroxidase in the Removal of Phenol**, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 315-322, 1998.

ZHANG G.; NICELL J.A. **Treatment of Aqueous Pentachlorophenol by Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide**, *Water Research*, v. 34, p. 1629-1637, 1999.

ZHANG, J.; YE, P.; CHEN, S.; WANG, W. **Removal of Pentachlorophenol by Immobilized Horseradish Peroxidase**, *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 59, p. 307-314, 2007.

## ANEXO A

### Dados Físico-Químicos da enzima Horseradish Peroxidase

PEO-131-301-302

#### ● TOYOBO ENZYMES ●

(Diagnostic Reagent Grade)

# PEROXIDASE

*from Horseradish*

Donor:hydrogen-peroxidase oxidoreductase (EC 1. 11. 1. 7)



#### PREPARATION and SPECIFICATION

PEO-301/302 are isolated from horseradish root in our own method. PEO-131 is chromatographically separated from the other isoenzymes using SP Sephadex C-50 by the modified method of Paul et al.<sup>1)</sup> The peroxidase fractions having equal RZ values (ca.3.3) are combined to generate the preparation. This preparation has an RZ value of ca.3.3 and is electrophoretically homogeneous. On the other hand, Grade III is partially purified preparation.

Appearance	: Reddish-brown amorphous powder, lyophilized
Activity	Grade I 250 Purpurogallin U/mg-solid or more (-131) (RZ ≥ 3.0, salt free)
	Grade III 110 Purpurogallin U/mg-solid or more (-301) (RZ ≥ 2.0, containing approx. 30% of stabilizers)
	Grade III 180 Purpurogallin U/mg-solid or more (-302) (RZ ≥ 2.0, salt free)
	Contaminant : Phosphatase ≤1.0×10 <sup>-2</sup> % (Grade III)

#### PROPERTIES

Stability	: Stable at -20°C for at least one year	(Fig.1,2)
Molecular weight	: approx. 40,000	
Structure	: Glycoprotein with one mole of protohaemin IX <sup>2)</sup>	
Inhibitors	: Cyanide, sulfide, fluoride, azide <sup>3)</sup>	
Optimum pH	: 6.0-7.0	(Fig.3)
Optimum temperature	: 45°C	(Fig.4)
pH Stability	: pH 5.0-10.0 (25°C, 20hr)	(Fig.5)
Thermal stability	: below 50°C (pH 6.0, 10min)	(Fig.6)
Effect of various chemicals	: (Table 1)	

#### APPLICATIONS<sup>4-11)</sup>

This enzyme is useful for enzymatic determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in clinical analysis. Especially, the highly purified preparation (Grade I) is useful as a protein tracer in histo-and cyto-chemistry and as a valuable experimental tool in hodological neurography. Also, the enzyme preparation has been used as an enzyme label in enzyme immunoassay. Grade III (-302) is suitable for dry chemistry. On the other hand, the enzymes contribute for the reduction of phehol in waste water.

### ASSAY

#### Principle:



The appearance of Purpurogallin is measured at 420nm by spectrophotometry.

#### Unit definition:

One purpurogallin unit causes the formation of one milligram of purpurogallin in 20 seconds under the conditions described below.

#### Method:

##### Reagents

- A. Pyrogallol solution : 5% (WV)(Should be prepared fresh).  
 B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution : 0.147M [Dilute 1.67ml of 30% (WV) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to 100ml with H<sub>2</sub>O] (Should be prepared fresh)  
 C. Phosphate buffer, pH6.0 : 0.1M  
 D. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution : 2.0N

##### Procedure

- Prepare the following reaction mixture in a test tube (32 φ × 200mm) and equilibrate at 20°C for about 5 minutes.
 

14.0ml	H <sub>2</sub> O	
2.0ml	Pyrogallol solution	(A)
1.0ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solution	(B)
2.0ml	Phosphate buffer, pH6.0	(C)

Concentration in assay mixture	
Phosphate buffer	15 mM
Pyrogallol	40 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.4mM

- Add 1.0ml of the enzyme solution\* and mix.
- After exactly 20 seconds at 20°C, add 1.0ml of 2.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (D) to stop the reaction.
- Extract the produced purpurogallin from the above stopped reaction mixture in five times with 15ml portions of ether and fill up the combined ether extracts to 100ml with fresh ether.
- Measure the optical density at 420nm against water (OD test).

At the same time, prepare the blank by first mixing the reaction mixture with 1.0ml of 2.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (D) after 20 a sec-incubation at 20°C, followed by the addition of the enzyme solution and extracting with ether by the same procedure as the test (OD blank).

- \* Dissolve the enzyme preparation in ice-cold 0.1M phosphate buffer, pH 6.0 (C), dilute to 3.0–6.0 purpurogallin U/ml with the same buffer and store on ice.

##### Calculation

Activity\*\* can be calculated by using the following formula.

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{\Delta \text{OD}(\text{OD test} - \text{OD blank}) \times \text{df}}{0.117 \times \text{Vs}} = \Delta \text{OD} \times 8.547 \times \text{df}$$

Weight activity (U/mg) = (U/ml) × 1/C

Vs : Sample volume (1.0ml)

0.117 : Optical density at 420 nm corresponding to 1mg% of Purpurogallin in ether.

df : Dilution factor

C : Enzyme concentration in dissolution (c mg/ml)

\*\*One purpurogallin unit is equivalent to 13.5 international units determined with o-dianisidine at 25°C.

### REFERENCES

- 1) K.G.Paul and T.Stigbrand; *Acta Chem.Scand.*, **24**, 3607 (1970).
- 2) L.M.Shannon et al.; *J.Biol.Chem.*, **241**, 2166 (1966).
- 3) E.Kay et al.; *J.Biol.Chem.*, **242**, 2470 (1967).
- 4) R.Lasek et al.; *Brain Res.*, **8**, 319 (1968).
- 5) W.M.Cowan et al.; *Brain Res.*, **37**, 21 (1972).
- 6) J.H.La Vail et al.; *Brain Res.*, **58**, 470 (1973).
- 7) A.M.Graybiel and M.Devor; *Brain Res.*, **68**, 167 (1974).
- 8) A.H.Bunt et al.; *Brain Res.*, **102**, 152 (1976).
- 9) D.R.Colman et al.; *Brain Res.*, **102**, 156 (1976).
- 10) M.Dubois-Dalq et al.; *J.Histochem.Cytochem.*, **25**, 1201 (1977).
- 11) M.Sato et al.; *Brain Res.*, **140**, 149 (1978).

Table 1. Effect of Various Chemicals on Peroxidase

[The enzyme dissolved in 0.1M phosphate buffer, pH 6.0 (50U/ml) was incubated with each chemical at 25°C for 1hr.]

Chemical	Concn.(mM)	*Residual activity	Chemical	Concn.(mM)	*Residual activity
None	—	100%	MIA	2.0	99
Metal salt	2.0		NEM	2.0	97
MgCl <sub>2</sub>		102	IAA	2.0	99
CaCl <sub>2</sub>		102	Hydroxylamine	2.0	98
Ba(OAc) <sub>2</sub>		105	EDTA	5.0	95
FeCl <sub>3</sub>		98	o-Phenanthroline	2.0	98
CoCl <sub>2</sub>		97	α,α'-Dipyridyl	1.0	96
MnCl <sub>2</sub>		97	Borate	50	98
ZnCl <sub>2</sub>		99	NaF	2.0	98
CdCl <sub>2</sub>		99	NaN <sub>3</sub>	2.0	75
NiCl <sub>2</sub>		96	Triton X-100	0.10%	98
CuSO <sub>4</sub>		98	Brij 35	0.10%	80
Pb(OAc) <sub>2</sub>		96	Tween 20	0.10%	89
AgNO <sub>3</sub>		91	Span 20	0.10%	98
HgCl <sub>2</sub>		92	Na-cholate	0.10%	97
2-Mercaptoethanol	2.0	94	SDS	0.05%	98
PCMB	1.0	98	DAC	0.05%	102

\*Residual activity was measured by 4AA-DEA method

4AA, 4-Aminoantipyrine; DEA, Diethylaniline

Ac<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>CO; PCMB, p-Chloromercuribenzoate; MIA, Monoiodoacetate; NEM, N-Ethylmaleimide; IAA, Iodoacetamide; EDTA, Ethylenediaminetetraacetate; SDS, Sodium dodecyl sulfate; DAC, Dimethyl-benzyl-alkyl-ammonium chloride.

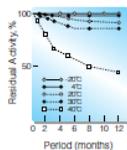


Fig. 1. Stability (Powder form)  
(kept under dry conditions)

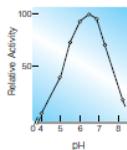


Fig. 3. pH-Activity  
[20°C, 20sec-reaction in 0.1M  
buffer solution: pH4.0-6.0, acetate;  
pH6.0-8.0, phosphate]

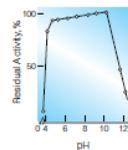


Fig. 5. pH-Stability  
[25°C, 20hr-treatment with 50mM  
buffer solution: pH3.5-6.0, acetate;  
pH6.0-8.0, phosphate; pH9.0-11.0,  
borate]

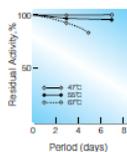


Fig. 2. Stability (Powder form)  
(kept under dry conditions)

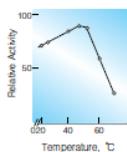


Fig. 4. Temperature activity  
[20sec-reaction in 0.1M phosphate  
buffer, pH6.0]

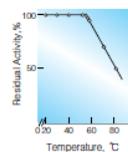


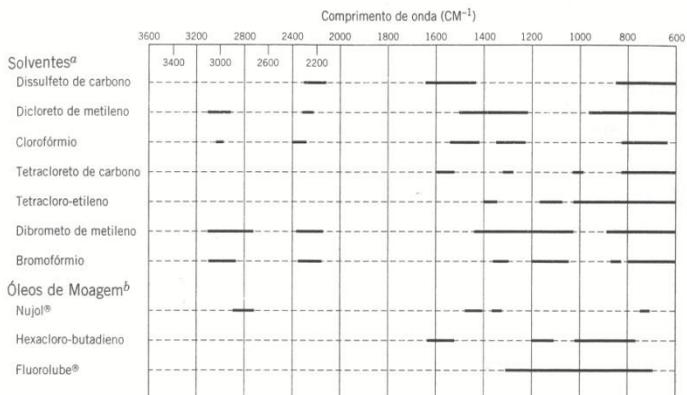
Fig. 6. Thermal stability  
[10min-treatment with 50mM  
phosphate buffer, pH6.0]

## ANEXO B

## Faixa de absorção e espectros de diferentes substâncias

**FAIXAS DE ABSORÇÃO E ESPECTROS DE SOLVENTES ORGÂNICOS, ÓLEOS DE MOAGEM E OUTRAS SUBSTÂNCIAS COMUNS DE LABORATÓRIO**

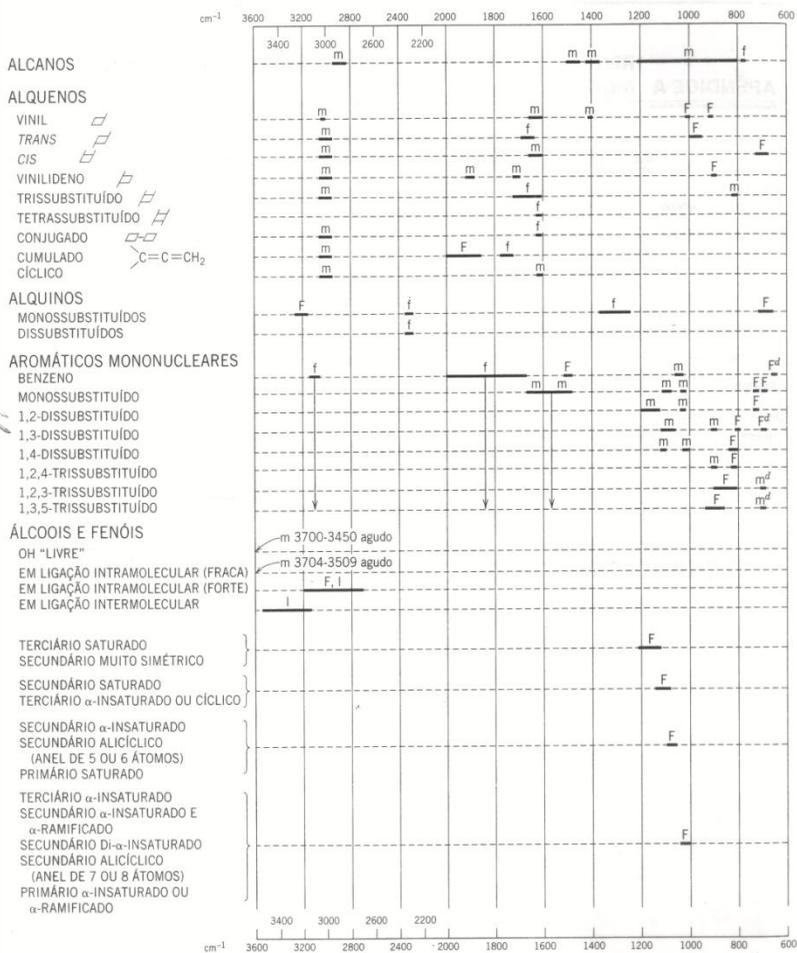
**REGIÕES TRANSPARENTES DE SOLVENTES E ÓLEOS DE MOAGEM**  
**APÊNDICE A**



\*As regiões abertas são aquelas em que o solvente transmite mais do que 25% da luz incidente na espessura de 1 mm.

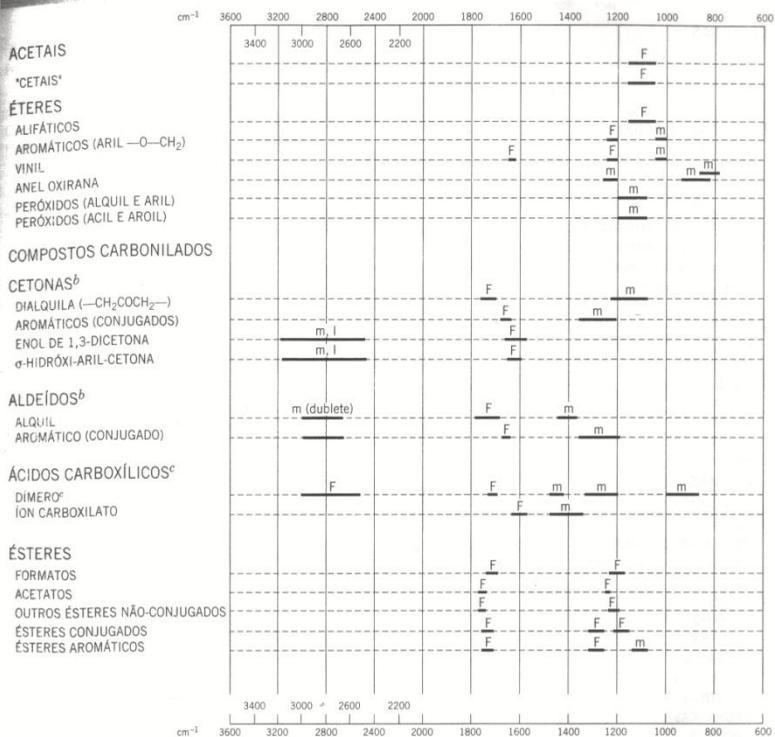
ªAs regiões abertas dos óleos de moagem indicam a transparência de filmes finos.

## APÊNDICE B ABSORÇÕES CARACTERÍSTICAS DE GRUPOS\*



\*As absorções correspondem às barras em negro. F = forte, m = médio, f = fraco, l = largo. Duas letras sobre uma barra significa que duas bandas podem estar presentes.  
 †Pode estar ausente.

## APÊNDICE B (Continuação)

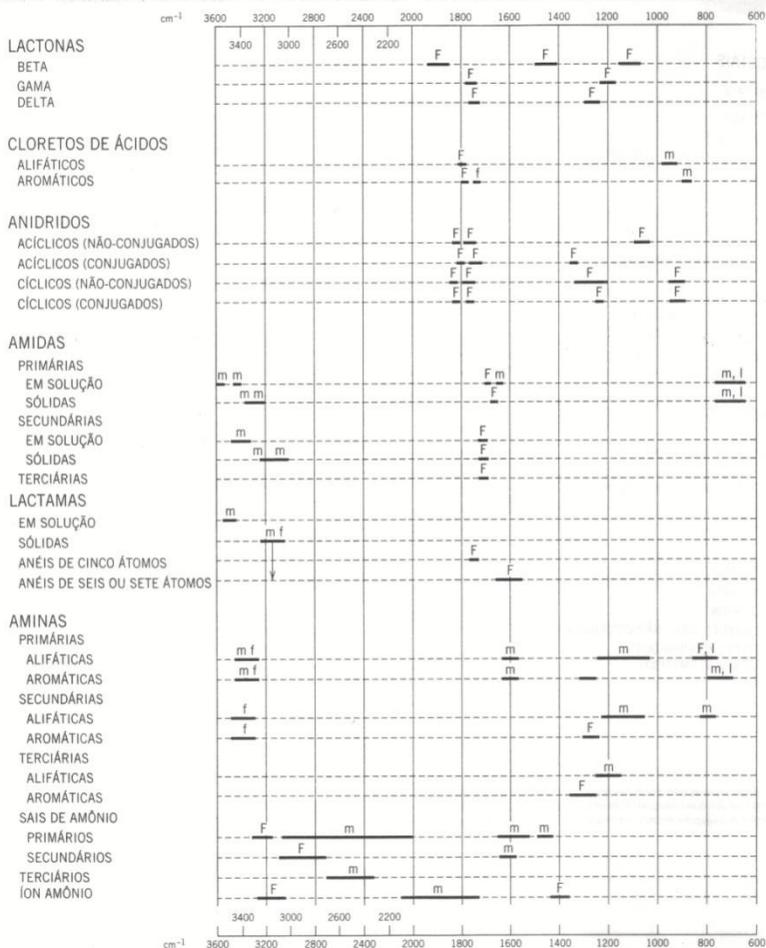


<sup>a</sup>Três bandas, algumas vezes quatro para cetals e uma quinta banda para acetals.

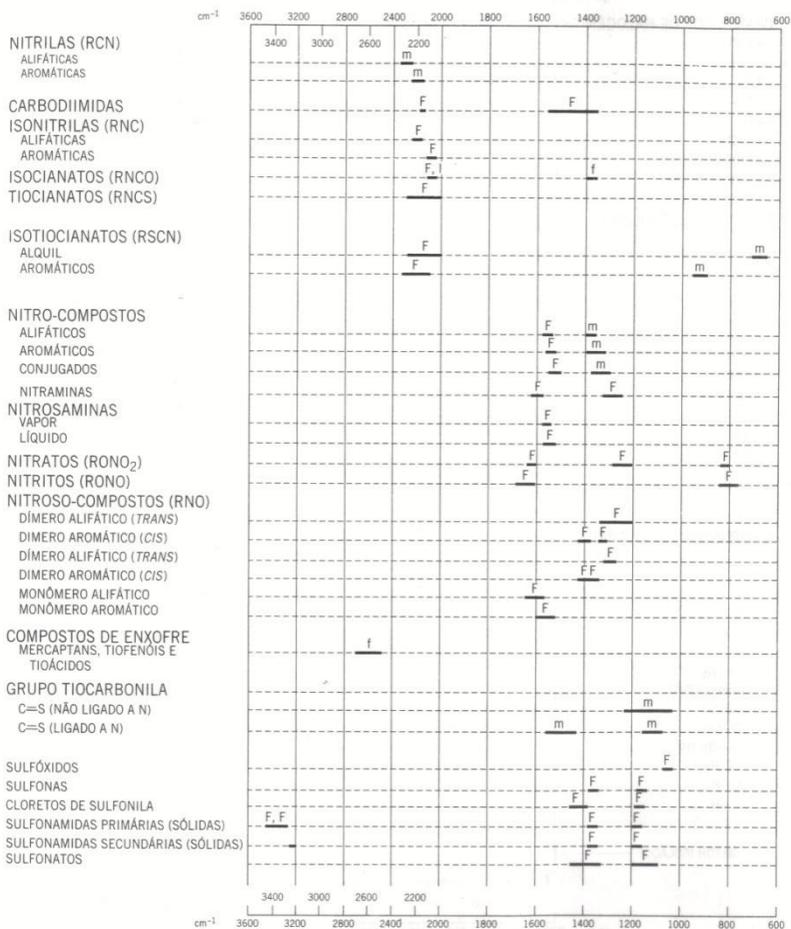
<sup>b</sup>Exemplos de alifáticos conjugados mostram deformação axial C=O virtualmente na mesma posição das estruturas aromáticas.

<sup>c</sup>Exemplos de conjugados mostram deformação axial C=O em números de onda mais baixos (1710 - 1680 cm<sup>-1</sup>). A deformação axial de O-H (3300 - 2600 cm<sup>-1</sup>) é muito larga.

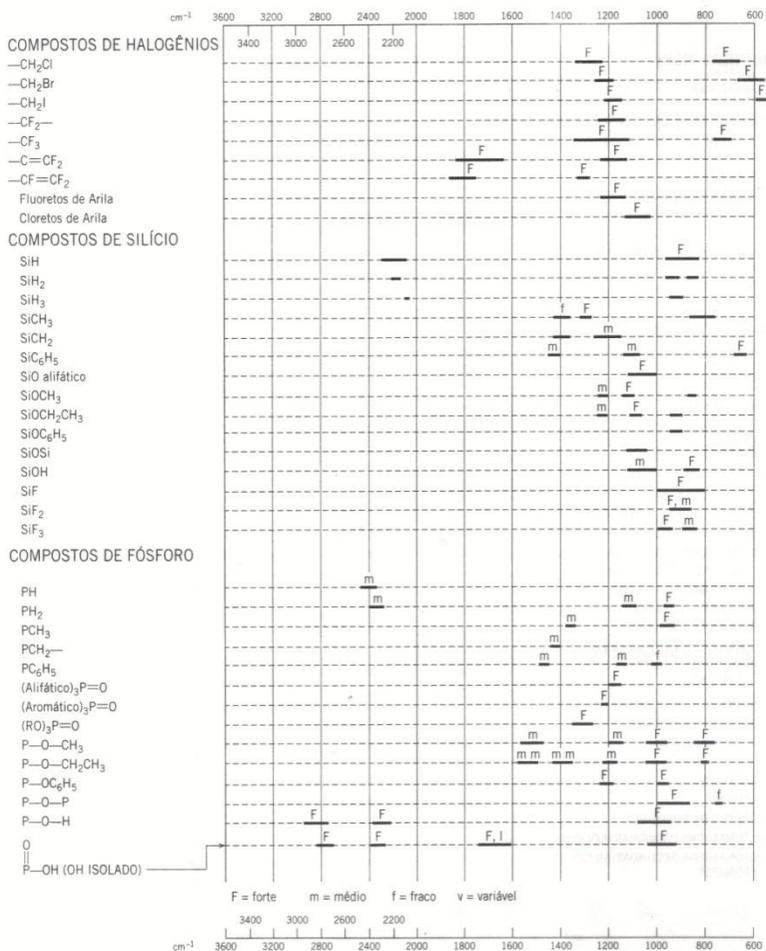
## APÊNDICE B



### APÊNDICE B (Continuação)



### APÊNDICE B (Continuação)



## APÊNDICE D ABSORÇÕES DE COMPOSTOS DE FÓSFORO

**TABELA D-1** Vibrações de Deformação Axial de P=O e P—O.

Grupo	Posição em $\text{cm}^{-1}$	Intensidade <sup>a</sup>	$\nu_{\text{P-O}}$ Bandas <sup>b</sup> ( $\text{cm}^{-1}$ )
Deformação axial de P=O			
Óxidos de fosfina			
Alifáticos	~1150		
Aromáticos	~1190		
Ésteres fosfato <sup>b</sup>	1299–1250		
P—OH	1040–910 (F)		
P—O—P	1000–870 (F)		~700 (f)
P—O—C (alifáticos)	1050–970 (F) <sup>c</sup>		830–740 (F) <sup>d</sup>
P—O—C (aromáticos)	1260–1160 (F)		994–855 (F)

<sup>a</sup>F = forte; f = fraco.

<sup>b</sup>O aumento de frequência de deformação axial de P=O do éster em relação aos óxidos é consequência da eletro-negatividade dos grupos alcoxila a ele ligados.

<sup>c</sup>Pode ser um díbitere.

<sup>d</sup>Pode estar ausente.

## APÊNDICE E ABSORÇÕES DE HETEROAROMÁTICOS

**TABELA E-1** Bandas de  $\gamma$ -CH e Deformações Angulares do Anel ( $\beta$ -Anel) de Piridinas<sup>a</sup>.

Substituição	Número de Átomos		$\gamma$ -CH ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\beta$ -Anel
	H-Adjacentes			
2-	4		781–740	752–746
3-	3		810–789	715–712
4-	2		820–794	775–709

<sup>a</sup>As notações  $\gamma$  e  $\beta$  são explicadas no texto (Seção 2.6.30.4) e no livro de Katritzky (1963).

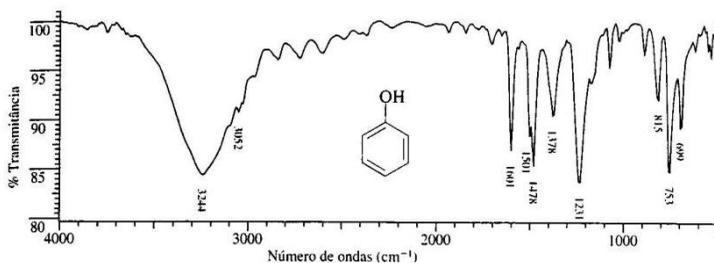
**TABELA E-2** Bandas Características de  $\gamma$ -CH ou  $\beta$ -Anel de Furanos, Tiofenos e Pirróis.

Anel	Posição de Substituição	Fase	Modos de $\gamma$ -CH ou $\beta$ -Anel <sup>a</sup>		
			$\text{cm}^{-1}$	$\text{cm}^{-1}$	$\text{cm}^{-1}$
Furano	2-	CHCl <sub>3</sub>	~925	~884	835–780
	2-	Líquido	960–915	890–875	780–725
	2-	Sólido	955–906	887–860	821–793
Tiofeno	3-	Líquido		885–870	741
	2-	CHCl <sub>3</sub>	~925	~853	843–803
Pirrol	3-	Líquido			755
	2-Acila	Sólido			774–740
					~755

<sup>a</sup>As notações  $\gamma$  e  $\beta$  são explicadas no texto (Seção 2.6.30.4) e no livro de Katritzky (1963).

## Espectro IR do Fenol puro

ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO 87



**FIGURA 2.17** Fenol (fundido). Deformação axial de O—H, larga, em ligação hidrogênio intermolecular, 3244  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação axial de C—H de aromáticos, 3052  $\text{cm}^{-1}$ . Harmônicas ou bandas de combinação, 2000–1667  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação axial de C=C do anel, 1601  $\text{cm}^{-1}$ , 1501  $\text{cm}^{-1}$ , 1478  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação angular no plano de O—H, 1378  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação axial de C—O, 1231  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação angular fora do plano de C—H, 815  $\text{cm}^{-1}$ , 753  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação angular fora do plano de C=C do anel, 699  $\text{cm}^{-1}$ . Deformação angular fora do plano de O—H em ligação hidrogênio (larga), cerca de 650  $\text{cm}^{-1}$ .

## ANEXO C

### Experimento para avaliação de toxicidade utilizando *Scenedesmus subspicatus*

Avaliação da toxicidade dos produtos da reação do fenol com peróxido de hidrogênio, catalisada pela enzima HRP.

Preparar o meio de cultivo para solução com as amostras de água

1. Meio CHU: Colocar 1 mL das soluções I a VI; colocar 0,1 mL das soluções VII a X
2. Completar até 80 mL com as amostras dos produtos da reação
3. Colocar 20 mL de solução de algas (Item 01), nos balões – volume final: 100 mL
4. Verificar se as transmitâncias das amostras estão com valores iguais, de forma a garantir que a concentração inicial de alga é a mesma em todas as amostras.
5. Deixar os balões em aeração constante por 72 horas e/ou 96 horas
6. Fazer as respectivas análises, retirando amostras (cerca de 1 mL), de cada balão, a cada 24h, 48h, 72h e 96h

➤ **Item 01: Solução mãe de algas (500 mL)**

1. Preparar uma solução de algas com o inóculo, em que a transmitância esteja em cerca de 80 %.
2. A solução deve ser preparada com o meio CHU, para um volume final de 500 mL:
  - Soluções I a VI – 5 mL
  - Soluções VII a X – 0,5 mL
  - Colocar cerca de 20 mL de inóculo de algas
  - Completar com água destilada até 500 mL
  - **OBS.:** verificar o valor de transmitância que deve ser de 50%; se a mesma estiver muito alta, adicionar mais inóculo; ao contrário, se estiver muito baixa, diluir mais a solução com meio de cultivo, até chegar ao valor de transmitância desejado.

Soluções do MEIO CHU

Solução	Substância	Concentração (g/L)
I	NaNO <sub>3</sub>	25
II	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5
III	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5
IV	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5
V	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5
VI	NaCl	2,5

VII	Tritriples KOH	31
VII	FeSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,98*
IX	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42
X	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,82
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44
	MoO <sub>3</sub>	0,71
	CaSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,49

**Obs.:**\* Acidificar a solução VIII com 1 mL de HCL 1 N