UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Estudo da aplicação da tirosinase vegetal no tratamento de efluentes e verificação da genotoxicidade do efluente tratado em células vegetais

Gisele Pigatto

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Mauri Sergio Alves Palma

> Co-Orientador: Prof. Dr. Attilio Converti

São Paulo 2013 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte. Versão corrigida.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e

Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

```
Pigatto, Gisele
P628g
          Estudo da aplicação da tirosinase vegetal no tratamento de
       efluentes e verificação da genotoxicidade do efluente tratado em
       células vegetais / Gisele Pigatto. -- São Paulo, 2013.
          239p.
          Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
       Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-
       Farmacêutica.
          Orientador: Palma, Mauri Sergio Alves
          Co-orientador: Converti, Attilio
          1. Enzimologia industrial 2. Efluentes : Tratamento I. T. II.
       Palma, Mauri Sergio Alves, orientador. III. Converti, Attilio co-
       orientador.
                                                         CDD
                                             660.63e
```

Gisele Pigatto

Estudo da aplicação da tirosinase vegetal no tratamento de efluentes e verificação da genotoxicidade do efluente tratado em células vegetais

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Mauri Sergio Alves Palma orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

3°. examinador

4°. Examinador

São Paulo, _____ de ____.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmão e filho.

Por todo apoio, confiança, dedicação e amor nesse longo período.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato e Teresa, irmão Bruno e filho Renato pela compreensão, paciência, amor e primordial apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauri Sergio Alves Palma, por ter aberto a porta inicial me aceitando como orientanda e permitindo um maior amadurecimento e conhecimento como pesquisadora.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Attilio Converti pelo tamanho profissionalismo, pela confiança em meus esforços, pelo apoio, e orientação segura durante todo o curso de doutorado, além de ser um grande amigo, tenho muito orgulho, carinho, admiração e respeito por sua pessoa.

A Prof. Dra. Alessandra Lodi, pela determinação, profissionalismo, compreensão, orientação, dedicação,, além de grande amizade, troca de experiências a quem tenho muito carinho, admiração e saudade. Estas palavras com certeza não serão suficientes para agradecer o que ela me proporionou.

Ao meu amigo e Prof. Dr. Regildo Silva por tamanho profissionalismo, determinação, pelo grande e imensurável apoio, pelos conselhos, pela experiência, dedicação e amor no que faz, tenho muito orgulho, admiração, carinho e respeito.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Silva Costa Teixeira, Prof. Dra. Patricia Perego, Prof. Dr. Pedro de Alcântara Pessôa Filho, o Prof. Dr. Sunao Sato, Prof. Dr Adalberto Pessoa Junior e o Prof. Dr.Michele Vitolo pela contribuição do meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus amigos Dante Moraes, Fernando Sassano, Kátia Ribeiro, Bruno Rosso, Ana Paula Espirito Santo, Erika Ortiz, Bahar Aliakbarian, Alberto Casazza, Marco Paini, Pierfrancesco, Davide Frumento e Francesco pela grande amizade e troca de conhecimentos durante esse longo tempo.

Aos funcionários, Ivani, Juarez, Elza, Míriam, Jorge, Elaine e Edilson Feitosa.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de doutorado,

E a todos os que não foram citados, mas que estão cientes de sua participação direta ou indireta na realização deste trabalho.

RESUMO

PIGATTO,G. Estudo da aplicação da tirosinase vegetal no tratamento de efluentes e verificação da genotoxicidade do efluente tratado em células vegetais. 2013. 206f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

Os problemas ambientais relacionados à crescente atividade industrial têm gerado preocupações aos órgãos governamentais e entidades de proteção ambientais, sendo necessários estudos de base que busquem novas alternativas para a recuperação de áreas poluídas e a solução de problemas operacionais relacionados com as técnicas empregadas. Um dos compostos mais encontrados em diversos efluentes industriais, principalmente de indústrias bioquímico-farmacêuticas, é o fenol que provoca um impacto danoso no ambiente devido ao fato de ser um poluente tóxico. O presente trabalho propõe, portanto, avaliar a oxidação e destruição do fenol através da utilização da enzima tirosinase extraída de vegetais, cujos resultados podem ser úteis para o tratamento de outros compostos fenólicos como o hormônio 17β-estradiol ou os que se encontram nos efluentes procedentes da produção de azeite ("águas de vegetação") após a recuperação dos polifenóis importantes como antioxidantes. A tirosinase tem a capacidade de transformar fenóis em produtos menos solúveis em água e menos danosos, permitindo assim uma agressão menor ao ambiente. Outro método de remoção do fenol também foi avaliado utilizando queratina extraída de penas de galinha, quitina e quitosana como bioadsorventes. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente com soluções de fosfato de potássio e L-tirosina. Para determinar a concentração de fenol após a oxidação foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Para estudar a adsorção do fenol aplicou-se o método colorimétrico a partir das soluções de tampão borato, 4 aminoantipirina e ferricianeto de potássio e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro UV-Vis a 546nm, enquanto a determinação de polifenóis presentes na "água de vegetação" foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu. A quantidade de tirosinase nas batatas das variedades Ágata e Galette di Bologna apresentou-se muito baixa a ponto de modificarmos a matéria prima para testes em maçã, kiwi, banana e cogumelo, mas apenas o último mostrou uma atividade bastante considerável. Assim, esta matéria-prima foi usada em ensaios a diferentes temperaturas para a estimativa dos parâmetros termodinâmicos durante da oxidação do fenol e da inativação térmica da enzima. As melhores condições da oxidação do fenol com a enzima contida no extrato de cogumelo foram: 30°C, pH 6,6, concentração de enzima 328U/mL e de fenol 100mg/L. A queratina revelou-se o melhor adsorvente para a degradação do fenol tendo mostrado remoção de 98% do mesmo em condições ótimas.

PALAVRAS-CHAVE: Tratamento de efluentes; polifenoloxidase; tirosinase, remoção do fenol.

RIASSUNTO

PIGATTO,G. Studio sull'applicazione tirosinasi nell trattamenti di effluenti e verifica della genotocissità dell' efluente trattato nelle cellule vegetale. 2013. 206f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

I problemi ambientali legati all'aumento dell'attività industriale hanno generato preoccupazioni negli organi di governo e nelle istituzioni in materia di tutela ambientale, essendo necessaria una ricerca di base al fine di trovare nuove alternative per il recupero delle aree colpite e soluzioni legate ai problemi operativi delle tecniche ormai impiegate. Uno dei composti più frequentemente presenti nei vari effluenti industriali, specialmente quelli provenienti dalle industrie di biochimica e farmaceutica, è il fenolo. Il fenolo provoca un impatto negativo sull'ambiente a causa della sua tossicità. Questo studio propone quindi di valutare l'ossidazione e la distruzione del fenolo utilizzando l'enzima tirosinasi, estratto dalle piante, i cui risultati possono essere utili per il trattamento di altri composti fenolici come l'ormone 17β-estradiol oppure quelli trovati negli effluenti della produzione di olio d'oliva ("acque di vegetazione") dopo il recupero di polifenoli, importanti per la sua attività antiossidante. La tirosinasi ha la capacità di trasformare i fenoli in prodotti che sono meno solubili in acqua e quindi meno aggressivi per l'ambiente. Un altro metodo di degradazione del fenolo è stato valutato utilizzando cheratina estratta di piume di pollo, chitina e chitosano come adsorbenti di fenolo. L'attività enzimatica è stata determinata spettrofotometricamente mediante soluzioni di fosfato di potassio e L-tirosina. Per determinare la concentrazione di fenolo dopo l'ossidazione è stato utilizzata l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Per l'adsorbimento del fenolo è stato utilizzato il metodo colorimetrico usando tamponi borato, 4 amminoantipirina e ferrocianuro di potássio, e le assorbanze sono state lette a 546nm. La determinazione di polifenoli presenti nel "acqua di vegetazione" è stata eseguita col metodo Folin-Ciocalteu. La quantità di tirosinasi trovata in patate di varietà Agata e Galette di Bologna è stata molto bassa, al punto di decidere di cambiare la materia prima per fare prove sulle mele, kiwi, banane e funghi, dove solo questi ultimi hanno presentato un'attività molto rilevante per iniziare gli sperimenti di termodinamica durante l'ossidazione del fenolo. Le migliori condizioni per l'enzima ossidante di fenolo sono state: 30°C, pH 6,6, la concentrazione di enzima 328U/mL e di fenolo 100mg/L. La cheratina ha dimostrato di essere la migliore adsorbente per la degradazione del fenolo con una rimozione del 98%.

Parole chiave: Trattamento degli effluenti; polifenolossidasi; tirosinasi, rimozione del fenolo.

ABSTRACT

PIGATTO, G. Study on tyrosinase application in the treatment of plant effluent and verification of genotoxicity of the treated effluent into plant cells. 2013. 206f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

Environmental problems related to growing industrial activity have generated concerns among government entities and environmental protection, being necessary more baseline studies that seek new alternatives for the recovery of polluted areas and solution of problems related to the operational techniques employed. One of the compounds most commonly found in many industrial effluents, mainly from biochemical and pharmaceutical industries, is phenol, which causes a detrimental impact on the environment due to its toxicity. Therefore, this work proposes the oxidation and destruction of phenol using the enzyme tyrosinase, extracted from plants, whose results could be useful in the future for the treatment of other phenolic compounds such as 17β-estradiol hormone or those found in the effluent coming from the production for olive oil ("vegetation water") after polyphenols recovery. Such an enzyme has the ability of transforming phenols into products less soluble in water and less dangerous, thereby allowing for a minor impact on the environment. Another method of phenol removal was also evaluated using keratin extracted from chicken feathers, chitin and chitosan as phenol biosorbents. Potassium phosphate buffer and L-tyrosine solutions were used for the determination of enzymatic activity, the high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of phenol concentration after oxidation, and a colorimetric method making use of solutions of borate buffer, 4-aminoantipyrine and potassium ferricyanide as well as reading of the absorbance at 546nm to investigate phenol biosorption, while the presence of polyphenols in "vegetation water" was determined by the Folin-Ciocalteu method. The presence of the tyrosinase in potato varieties Agata and Galette di Bologna was shown to be very low, thus suggesting to change the biosorbent material. So, additional tests were done on apples, kiwi, banana and mushroom, but only the last showed a considerable activity. Therefore, only such a raw material was used in tests at variable temperature to estimate the thermodynamic parameters of both phenol oxidation and thermsal inactivation of the enzyme. The optimum conditions for the phenol oxidation by tyrosinase were: 30°C, pH 6,6, enzyme concentration 328U/mL and of phenol 100mg/L. Keratin was

shown to be the best adsorbent, exhibiting under optimum conditions no less than 98% phenol removal.

KEY-WORDS: Wastewater treatment; polyphenol oxidase; tyrosinase, removal of phenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Reação de oxidação de compostos fenólicos por PPO, (a) atividade monofenol	ásica,
(b) atividade catecolásica.	23
Figura 2- Estrutura do fenol	25
Figura 3- Estruturas químicas das principais classes dos compostos fenólicos	29
Figura 4- Estrutura química dos flavonóides	30
Figura 5- Ácido clorogênico	31
Figura 6- Ácidos fenólicos. Hidrólise ácida liberando ácido gálico e ácido protecateci	iico a
partir de frutas	37
Figura 7- Fases da divisão celular com a presença e ausência de aberrações cromossô	micas
	48
Figura 8- CA observada em células meristemáticas de A. cepa expostas a agentes químic	os 49
Figura 9- AN observado em células meristemáticas de A. cepa expostas a agentes quími	co 50
Figura 10- Células meristemáticas de A. cepa com MN	51
Figura 11- Células meristemáticas de A. cepa com MN	52
Figura 12- Equipamento experimental usado para a extração líquido-líquido de fer	ol da
solução aquosa	53
Figura 13- Curva de calibração para determinação da concentração de fenol ($T = 25^{\circ}$ C)	65
Figura 14- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da ativ	idade
da tirosinase no extrato de batata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de a	cordo
com o método descrito por Worthington (2006). Substrato: L-tirosina 1mM; temper	atura:
25°C; comprimento de onda: 280nm.	69
Figura 15- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da ativ	idade
da tirosinase no extrato de batata não diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos duras	nte 12
minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: c	atecol
1mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.	70
Figura 16- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da ativ	idade
da tirosinase na amostra de controle, medida a cada 30 segundos durante 12 minuto	os, de
acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2	2mM;
temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.	72

Figura 17- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata 5 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos

durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm. 74

Figura 18- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata 5 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm. 75

Figura 19- Avaliação da atividade da tirosinase da vegetal de 0,5 a 12 minutos com tendência logarítmica. A amostra foi analisada sem diluição e sem filtração e o substrato utilizado foi catecol 2mM. 77

Figura 20- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata não diluído e não filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm. 78

Figura 21- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase comercial (50U), medida durante 32 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM em meio contendo sulfato de amônio 33%; temperatura: 26°C; comprimento de onda:400 nm. 81

Figura 22- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 82

Figura 23 - Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 83

Figura 24- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 84

Figura 25- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm 85

Figura 26-Avaliação da atividade da tirosinase presente a batata variedade Galette diBologna nos tempos de 0,5 a 12 minutos. A amostra foi analisada com oxigenação, diluida de1:5 em tampão fosfato e o substrato utilizado foi a L tirosina à 1mM.86

Figura 27- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:5 em tampão fosfato; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 87

Figura 28- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:10 em tampão fosfato; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm 88

Figura 29- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de kiwi, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Figura 30- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 90

Figura 31 - Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 91

Figura 32- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de maçã, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 92

Figura 33- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de *Agaricus bisporus*, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 94

Figura 34- Atividade residual da tirosinase contida em extratos de A. bisporus expostos adiversas temperaturas durante 8 horas.95

Figura 35- Influência do pH na oxidação do fenol desfrutando da atividade tirosinásica doextrato de A. bisporus ($T=30^{\circ}$ C, $C_T=328$ U/mL, $C_{Fenol.in}=100$ mg/L).96

Figura 36- Influência da concentração inicial de fenol ($C_{Fenol.in}$) na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (T=30°C, C_T =100U/mL, pH =6,6). 98

Figura 37- Influência da concentração da enzima (C_T) (U/mL) na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (T=30°C, pH =6,6, $C_{Fenol.in}$ =100mg/L). 100

Figura 38- Influência da temperatura na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (pH =6,6, C_T =328U/mL, $C_{Fenol.in}$ =100mg/L). 101

Figura 39- Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" mediante dois extratos de *A. bisporus* com atividade tirosinásica de 295 e 884U/mL, respectivamente.

103

 Figura 40- Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" durante 100

 minutos utilizando tirosinase comercial (90U/mL) e o extrato de *A. bisporus* (295U/mL). 104

 Figura 41- Influência da temperatura na remoção de fenol usando queratina extraída de pena

 de galinha como adsorvente durante 24 horas a pH 8,0.

 106

 Figura 42- Influência da temperatura na remoção de fenol usando queratina extraída de pena

Figura 42- Influência da temperatura na adsorção do fenol usando quitosana como adsorventedurante 24 horas a pH 8,0.108

Figura 43- Influência da temperatura na adsorção de fenol usando quitina como adsorventedurante 24 horas a pH 2,0.109

Figura 44- Influência do pH na adsorção de fenol usando quitina como adsorvente durante 24 horas.

Figura 45- Influência da concentração do fenol na adsorção de fenol usando quitina comoadsorvente durante 24 horas a pH 2,0.111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades do fenol e compostos relacionados

26 27

Tabela 2- Compostos fenólicos industriais

Tabela 3- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de batata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordocom o método descrito por Worthington (2006). Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura:25°C; comprimento de onda: 280nm.

Tabela 4- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de batata não diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol1mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.70

Tabela 5- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase na amostra de controle, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, deacordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM;temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.72

Tabela 6- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata 5 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundosdurante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985).Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.73

Tabela 7- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata 20 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundosdurante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985).Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.75

Tabela 8- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata não diluído, medida a cada 30 segundos durante 12minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.77

Tabela 9- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata não diluído e não filtrado, medida a cada 30 segundosdurante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985).Substrato: catecol 6mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.78

Tabela 10- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase comercial (50 U), medida durante 32 minutos, de acordo com o método descritopor Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM em meio contendo sulfato de amônio33%; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm80

Tabela 11- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação.Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.82

Tabela 12- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação.Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm83

Tabela 13- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação.Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.84

Tabela 14- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundosdurante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) semoxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm 85**Tabela 15-** Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundosdurante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) soboxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:5 em tampão fosfato; temperatura: 25°C;comprimento de onda: 280nm.

Tabela 16- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundosdurante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) soboxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: nenhuma; temperatura: 25°C; comprimentode onda: 280nm.87

Tabela 17- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sem

oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:10 em tampão fosfato; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm. 88

Tabela 18- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de kiwi, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordocom o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM;temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.89

Tabela 19- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordocom o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM;temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.90

Tabela 20- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordocom o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM;temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.91

Tabela 21- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de maçã, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordocom o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM;temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.92

Tabela 22- Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de Agaricus bisporus, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos,de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.94

Tabela 23- Resultados da atividade residual da tirosinase contida em extratos de A. bisporusexpostos a diversas temperaturas durante 8 horas.95

Tabela 24– Influência do pH na oxidação do fenol desfrutando da atividade tirosinasica doextrato de A. bisporus ($T=30^{\circ}$ C, $C_T=328$ U/mL, $C_{Fenol.in}=100$ mg/L).96

Tabela 25- Influência da concentração inicial de fenol ($C_{Fenol.in}$) na oxidação do fenolmediante extrato de A. bisporus ($T=30^{\circ}$ C, $C_{T}=100$ U/mL, pH =6,6).98

Tabela 26- Influência da concentração da enzima (C_T) (U/mL) na oxidação do fenolmediante extrato de A. *bisporus* (T=30°C, pH =6,6, $C_{Fenol.in}$ =100 mg/L).99

Tabela 27- Influência da temperatura na oxidação do fenol mediante extrato de A. bisporus $(pH = 6, 6, C_T = 328 \text{ U/mL}, C_{Fenol.in} = 100 \text{ mg/L}).$ 101

Tabela 28- Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" mediantedois extratos de A. bisporus com atividade tirosinásica de 295 e 884U/mL, respectivamente.102

Tabela 29- Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" durante 100minutos utilizando tirosinase comercial (90U/mL) e o extrato de *A. bisporus* (295U/mL). 104Tabela 30- Influência da temperatura na remoção de fenol usando queratina extraída de penade galinha como adsorvente durante 24 horas a pH 8,0106

Tabela 31- Influência da temperatura na adsorção do fenol usando quitosana comoadsorvente durante 24 horas a pH 8,0.107

Tabela 32- Influência da temperatura na adsorção de fenol usando quitina como adsorventedurante 24 horas a pH 2,0.109

Tabela 33- Influência do pH na adsorção do fenol usando quitina como adsorvente durante 24horas.110

Tabela 34- A influência da concentração de fenol sob a quitina utilizada como adsorvente defenol durante 24 horas.111

Tabela 35- % de Índice Mitótico, Aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célulaAberrantes e % da Média de Células Aberrantes em A. cepa com a presença de fenol emconcentrações de 0,01; 0,5 e 1mg/L, grupos experimentais, controle negativo (CN) e positivo(CP).113

Tabela 36– Frequência de micronúcleos nas raízes de *A. cepa* resultantes do tratamento com fenol em diferentes concentrações (0,01; 0.5 e 1mg/L). Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L 115

Tabela 37- % de Índice Mitótico, Aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célulaAberrantes e % da Média de Células Aberrantes em A. cepa com a presença de fenol emconcentrações de 12, 36, 60 e 150mg/L, grupos experimentais, controle negativo (CN) epositivo (CP).116

Tabela 38– Frequência de micronúcleos nas raízes de A. cepa resultantes do tratamento comfenol em diferentes concentrações (12, 36, 60 e 150mg/L). Controle negativo (CN) tratadocom Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a10mg/L117

Tabela 39- % de Índice Mitótico, Aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célula Aberrantes e % da Média de Células Aberrantes em *Allium cepa* com a presença de polifenóis

contidos na "água de vegetação"em concentrações de 1,4 e 4,4g/L, grupos experimentais, controle negativo (CN) e positivo (CP) 118

Tabela 40– Frequência de micronúcleos nas raízes de *A. cepa* resultantes do tratamento compolifenóis contidos na "água de vegetação" em diferentes concentrações (1,4 e 4,4g/L).Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado comMetilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L118

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22			
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA				
2.1. Estrutura e aplicação dos fenóis e polifenóis				
2.2 Fontes de fenóis e polifenóis	30			
2.3 Toxicidade dos fenóis				
2.4 Extração de compostos fenólicos				
3. Tratamento enzimático de fenóis presente nos efluentes				
3.1 Outros métodos de tratamento de fenóis presente nos efluentes				
4. Água de vegetação	43			
5. Toxicologia genética e monitoramento ambiental baseado na utilização o	le plantas			
superiores	45			
5.1 Avaliação da genotoxicidade de águas residuais empregando o teste de Allium c	epa 46			
5.2. Índice mitótico	47			
5.3. Aberrações cromossômicas	47			
5.4. Anormalidades nucleares	50			
5.5. Micronúcleos	51			
6. MATERIAIS E MÉTODOS	52			
6.1 Materiais e Equipamentos	52			
7. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	54			
7.1 Preparo dos extratos enzimáticos	54			
7.2 Quantificação da Atividade da Tirosinase				
7.3 Preparo de soluções e reagentes para oxidação enzimática				
7.4 Ensaios de oxidação enzimática com tirosinase extraída de Agaricus bisporus				
7.4.1 Procedimento de Análise				
7.5. Oxidação enzimática com tirosinase comercial	57			
7.5.1 Procedimento de Análise	57			
7.6 Preparo de soluções e reagentes para a remoção de polifenóis presentes nos	s efluentes			
residuais da produção de azeite	57			
7.6.1 Características e tratamento dos efluentes residuais de azeite	58			
7.6.2 Experimentos de adsorção de polifenóis contidos na "água de vegetação" por carbono				
ativado	58			
7.6.3 Experimentos de adsorção de fenol por queratina, quitina e quitosana	59			

8. Planejamentos dos Ensaios	59	
8.1 Procedimento Experimental	60	
9. Cinética e modelagem termodinâmica	60	
9.1. Isotermas de biosorção	62	
9.2. Cinética da biosorção	64	
9.3 Termodinâmica da biossorção	64	
10. Concentração de Fenol Aquoso Residual	65	
11. Análise da Mutagenicidade dos Efluentes Tratados e não Tratados	66	
12. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67	
12.1. Atividade da tirosinase	67	
12.2 Ensaios realizados na Universidade de Gênova	81	
13. Oxidação Enzimática do Fenol por Meio de Extratos de Agaricus bisporus	96	
14. Remoção dos polifenóis contidos na água de vegetação mediante extratos de .	Agaricus	
bisporus	102	
15. Adsorção do fenol com queratina, quitina e quitosana	105	
16. Tratamento de genotoxicidade em Allium cepa	112	
17. CONCLUSÕES	118	
18. ARTIGO SUBMETIDO (Anexo)	120	
19. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121	
ANEXO	157	
CAPÍTULO 1- A New enzymatic process for the treatment of phenolics pollutants.	158	
CAPÍTULO 2- Genotoxic effect of phenol on the roots of anion Allium cepa.	177	
CAPÍTULO 3- A New kinetic and thermodynamic approach to phenol biosor	ption by	
chitosan and keratin.	190	
CAPÍTULO 4- Chitin as biosorbent for phenol removal from aqueous solution: equilibrium,		
kinetic and themodynamic studies.	217	

1. INTRODUÇÃO

Toda enzima possui um centro ativo, local onde ocorrem as reações com determinados substratos. Esse centro ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína e um grupo não protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem somente da sua própria estrutura protéica (apoenzima) para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não protéicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas de coenzimas, e muitas enzimas dependem de ambos. Algumas possuem um grupo prostético que é similar ao cofator, mas está firmemente ligado à apoenzima. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de haloenzima (DEVLIN, 1997), enquanto a principal desvantagem é seu alto custo. Por este motivo foi avaliada e explorada a atividade enzimática de resíduos vegetais de origem industrial.

As enzimas são, portanto, catalisadores biológicos e seu uso no tratamento de efluentes apresenta várias vantagens potenciais, tais como: a) simplicidade e facilidade no controle do processo; b) não há necessidade de aclimatação da biomassa; c) não há efeitos de choque por carga de poluentes; d) podem ser aplicadas em processos com baixa ou alta concentração de poluentes e e) operam em amplas faixas de *pH*, temperatura e salinidade (KARAN; NICELL, 1997).

Os biocatalisadores podem ser de grande utilidade para o tratamento de efluentes gerados por uma ampla variedade de indústrias, sendo elas de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, pesticidas, detergentes, petrolífera, têxtil, de produção de azeite e alimentícias em geral e principalmente de papel e celulose. Contribui para o uso de enzimas em biocatálise ambiental a forte tendência dos governos em minimizar a poluição ambiental. O controle ambiental torna-se ainda mais relevante na preservação dos ecossistemas no Brasil, que em função da sua extensão e biodiversidade, constituem um ativo de valor incalculável, além de garantir a representatividade nacional no cenário mundial (MENDES et al., 2005).

A determinação de fenóis é de importância ambiental, uma vez que um número considerável de poluentes orgânicos, possui estrutura fenólica. Fenóis e seus derivados, como clorofenóis e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos devido a sua elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais. Um exemplo potencial é a oxidação do fenol mediante a enzima tirosinase ou PPO, polifenoloxidase (DURÁN;

ESPOSITO, 2000), que catalisa a oxidação tanto de monofenóis (tirosina, fenol, p-cresol), mostrado na Eq. (a), (Figura 1), como de difenóis (catecol, L-dopa, dopamina, adrenalina), mostrado na Eq. (b) (PÉREZ-GILABERT e CARMONA, 2000).



Figura 1. Reação de oxidação de compostos fenólicos por PPO, (a) atividade monofenolásica, (b) atividade catecolásica.

Contudo, deve-se ressaltar que muitos polifenóis como os contidos na chamada "água de vegetação", resíduos da extração industrial do azeite de oliva, apresentam importante atividade antioxidante e antirradicálica, a qual acrescenta grande valor em alguns alimentos. O uso adequado de azeite de oliva pode não só melhorar a condição econômica dos seus produtores, mas também reduzir o problema ambiental. Assim, é de grande importância a preocupação com a possibilidade de recuperar o extrato enriquecido por compostos fenólicos obtidos a partir de um subproduto de baixo custo amplamente disponível especialmente no Mediterrâneo (ALIAKBARIAN; DEHGHANI; PEREGO, 2009). No entanto, vale ressaltar que o Brasil é atualmente importador de azeite e que sua produção *in loco* seria esperada para melhorar a balança comercial.

Até o presente momento, análises tanto de fenol como de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo *in situ*, pois são caras, lentas e necessitam de operadores treinados. No monitoramento contínuo *in situ* são muito utilizadas matrizes orgânicas naturais vegetais (LIMA et al., 1997 e 1998).

Visando a proteção do meio ambiente e vista a dualidade representada acima relacionada com homem e ambiente, uma parte do trabalho desenvolvido na Universidade de

Gênova (UNIGE) teve em vista a recuperação destes polifenóis a partir dos resíduos de indústrias de azeite da região Ligúria, limitando o tratamento de polifenóis com a PPO apenas ao resíduo resultante dessa recuperação. Após esta etapa, os compostos que ainda permanecem nos resíduos, mesmo em baixa concentração, podem ocasionar danos ao ambiente. Por este motivo, foram realizados os ensaios de oxidação do fenol e dos polifenóis residuais contidos num resíduo industrial real (água de vegetação) mediante a enzima tirosinase tanto comercial como contida em extrato de cogumelo (*Agaricus bisporus*). Os resultados poderão serem úteis para minimizar o impacto ambiental decorrente de um auspicável aumento na produção de azeite no Brasil.

A escolha da enzima tirosinase que foi estudada neste trabalho baseou-se também na consideração de que outras enzimas como as peroxidases apresentam como desvantagem a utilização de peróxido de hidrogênio como substrato, enquanto as polifenoloxidases utilizam apenas o oxigênio livre como oxidante (IKEHATA; NICELL, 2000 a e b).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura e aplicação dos fenóis e polifenóis

O fenol foi isolado pela primeira vez do alcatrão do carvão em 1834 pelo químico alemão Runge. Em pressão e temperatura ambiente ele é um sólido cristalino higroscópio (BUSCA et al., 2008). Algumas propriedades físicas e químicas do fenol estão mostradas na Tabela 1, enquanto sua estrutura é mostrada na Figura 2. Ele é composto por um anel aromático ligado a um grupo hidroxila, podendo seus derivados variar de uma simples molécula fenólica à um polímero complexo de alta massa molecular (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAM, 2006).



Figura 2. Estrutura do fenol Fonte: Balasundram et al. (2006)

Propriedades			
Fórmula molecular	C ₈ H₅OH		
Massa molar	94.11 g/mol		
Aparência	Sólido cristalino branco		
Densidade	1,07 g·cm ^{-3 [1]}		
Ponto de fusão	41 °C ^[1]		
Ponto de ebulição	182 °C ^[1]		
Solubilidade em água	84 g·l ⁻¹ a 20 °C) ^[1]		
Pressão de vapor	0,2 hPa (20 °C) ^[1]		
Acidez (pK _a)	9,99 ^[2]		
Momento dipolar	1.7 D ^[carece de fontes]		
Compostos relacionados			
Outros aniões/ânions	Anilina (aminobenzeno) Benzenotiol Clorobenzeno		
Outros	Cicloexanol		
catiões/cátions	2-Naftol		
Fenóis relacionados	Hidroquinona (duas hidroxilas Cresol (+ um metil)		
Compostos	Benzeno		
relacionados	Anisol (metoxibenzeno)		

Tabela 1. Propriedades do fenol e compostos relacionados.

Fonte: Balasundram et al. (2006)

O fenol puro é um sólido branco, mas se torna colorido principalmente quando há presença de impurezas. É solúvel em álcool etílico, éter e vários solventes polares, além de hidrocarbonetos como o benzeno. Apresenta solubilidade limitada na água e se comporta como um ácido fraco, e na forma líquida ataca borrachas e também alguns plásticos (AMORE; HAUTALA, 1983; BUSCA et al., 2008).

De acordo com Popa et al. (2008), os fenóis podem agir como: fitoalexinas (um tipo de proteína enzimática chamada de endoglicanase presente na parede celular vegetal que tem a capacidade de manter a parede livre de microrganismos), atrativos para polinizadores, contribuintes para a pigmentação da planta, agentes de proteção contra a luz ultravioleta, entre outros (NACZK; SHAHIDI, 2006).

Os derivados dos fenóis e seus polímeros são amplamente utilizados nas indústrias de plásticos termofixos, resinas fenólicas, indústria de madeira, construção civil, indústria aeroespacial, automotiva, de abrasivos, plastificantes, produtos de limpeza, fabricação de pesticidas, de detergentes, entre outros (<u>website.lineone.net/~mwarhurst/apc.html</u>; The Society of the Plastic Industry, 1997).

De acordo com Meulenberg et al. (2009), os alquilfenóis, nitrofenóis, alcoxifenóis, fenóis halogenados, nonoxinol-9, ácido nonilfenoxiacético, hidroxitolueno butilado, alquiletoxilados, compostos bifenólicos, Triton X-100, p-cresol, pirocatecol, metilcatecol, ácidos clorofenoxis, entre outros, são alguns exemplos de compostos fenólicos industriais presentes no ambiente (Tabela 2).

Alquilfenoletoxilatos	Alquilfenóis
Bisfenólicos	Bromofenóis
Hidróxido de tolueno butilado	Clorofenóis
Ácidos Acético Clorofenóxico	Dialquilfenóis
Fluorofenol	Hidroxitolueno
Hidroxianisola	Metilcatecol
Metoxifenol	Ácido Acético Nonilfenóvico
Nitrofenóis	p-Cresol
Nonilfenóis	Triclorofenol

Tabela 2. Compostos fenólicos industriais

Croteau, Kutchan e Lewis (2000) definiram os ácidos fenólicos como sendo a subclasse de uma categoria de metabólitos comumente referidos como "fenólicos". Este termo "fenólicos" abrange cerca de 8000 compostos naturais, os quais possuem uma característica estrutural comum, um fenol (anel aromático tendo pelo menos uma hidroxila substituinte). Constituem cerca de um terço dos fenóis alimentares e podem estar presentes em plantas como antioxidantes naturais em forma livre e ligada (ROBBINS, 2003). A forma ligada pode se dar com vários compostos presentes nas plantas através de ligações de éter, éster e acetato (ZADERNOWSKI; CZAPLICKI; NACZK, 2009). Em consequência, os antioxidantes têm sido uma parte essencial da tecnologia de preservação e dos cuidados da saúde

contemporânea. A potencial toxicidade de alguns antioxidantes sintéticos, entretanto, tem intensificado as pesquisas para explorar e utilizar antioxidantes de origem natural, tais como, frutas e vegetais (POPA et al., 2008).

A classificação atual divide a categoria mais ampla de compostos fenólicos em polifenóis e fenóis simples, baseada unicamente sobre o número de subunidades de fenol presentes (CLIFFORD, 1999). Os polifenóis são mais complexos, divididos em classes de acordo com o número dos anéis presentes no fenol que eles contêm e os elementos estruturais que ligam estes anéis uns aos outros, no entanto apresentam a mesma estrutura básica dos compostos fenólicos (CARTEA et al., 2011). Os polifenóis que possuem pelo menos duas subunidades de fenol incluem os flavonóides, e os compostos que possuem três ou mais subunidades são referidos como os taninos (hidrolisáveis e não hidrolisáveis). As estruturas químicas das principais classes fenólicas podem ser vistas na Figura 3.

Os polifenóis são derivados naturais do fenol, que podem ser classificados baseados no número e arranjos dos seus átomos de carbono em flavonóides (Figura 4) (flavonas, antocianidinas, flavanonas e isoflavonas entre outras) e não flavonóides (ácidos fenólicos e hidroxicinâmicos, os estilbenos, compostos fenólicos presentes no vinho, entre outros), e que são comumente ligados a açúcares e ácidos orgânicos conjugados. O mais amplo e diversificado grupo de polifenóis contidos nos membros da família *Brassicassea (Cruciferae)* são os flavonóides (principalmente flavonóis), mas também antocianinas e os ácidos hidroxicinâmicos (CARTEA et al., 2011).

A importante função dos polifenóis naturais está voltada na proteção contra um número de distúrbios patológicos, tais como, aterosclerose, disfunção cerebral e câncer além de agirem como neurossedativos, antiflamatórios, antivirais e anticancerígenos (OHNO et al., 2002). Além disso, são aplicados na indústria como corantes naturais e apresentam a finalidade de preservação dos alimentos. Por esta razão, algumas pesquisas estão sendo realizadas para a caracterização dos polifenóis em diferentes tecidos de plantas de acordo com sua aplicabilidade (PINELO et al., 2005).



Ácido Hidroxibenzóico



R₁=R₂=R₃=OH:Ácido Gálico R₁=R₂=OH, R₃=Ácido Protocatecuico



Gallotannins (e.g pentagalloyigiucose)





R₁=OH: Ácido Cumárico R₁=R₂=OH: Ácido Caféico



Proantocianidinas (R₁,R₂= H,OH) e.g. dímero procianidina R₁=OH,R₂=H





Estilbenos

Figura 3. Estruturas químicas das principais classes dos compostos fenólicos Fonte: D'Archivio et al. (2007)



Figura 4. Estrutura química dos flavónoides Fonte: Cartea, et al. (2011)

2.2 Fontes de fenóis e polifenóis

O vinho é uma das fontes mais importantes de antioxidantes polifenólicos incluindo uma larga variedade de flavonóides (flavonóides, flavan-3-ol e antocianina) e não flavonóides (ácidos fenólicos, alcoóis fenólicos e ácido hidroxicinâmico) (MAKRIS; BOSKOU; ANDRIKOPOULOS, 2007). O vinho tinto é considerado a bebida alcoólica menos danosa à saúde (GRONBAEK; HENRIKSEN; BECKER, 1995; ALEN-RUIZ et al., 2009), possivelmente porque os polifenóis ajudam a prevenir doenças relacionadas ao stress oxidativo (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

O café também é uma fonte importante de antioxidantes alimentares. O teor de compostos fenólicos no café torrado atinge cerca de 8%, no qual, a presença do ácido clorogênico (Figura 5) é dominante. A infusão de 5g do café torrado pode conter aproximadamente 140mg deste composto, o qual também pode ser responsável pelo possível efeito ardente desta bebida. Os pesquisadores constataram uma correlação significativa entre o consumo de café como fonte alimentar de compostos polifenólicos e a redução aparente nos riscos de doenças como Alzheimer, Parkinson, doenças cardíacas, diabetes mellitus tipo 2 e cirrose hepática (SIKORA et al., 2008).



Figura 5. Ácido clorogênico

Os sucos de frutas naturais como uva, laranja e maçã são também considerados como importantes fontes de compostos fenólicos além de vitamina C e de fitonutrientes. A maioria dos dados analisados nos conteúdos fenólicos destes sucos comumente consumidos vem principalmente de amostras comerciais (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

Nas refinarias de petróleo as concentrações de fenóis variam de 6 a 500mg/L, no processamento de carvão de 9 a 6800mg/L e na fabricação de produtos petroquímicos de 3 a 1220mg/L. São os principais constituintes orgânicos presentes em efluentes procedentes dos processos de gaseificação e liquefação do carvão, além de outras fontes como indústrias farmacêuticas, de plástico, produtos de madeiras, pintura e indústria de celulose e papel (0,1–1600mg/L). Além disso, o fenol também é emitido a partir da queima de combustível fóssil. É também presente nos dejetos animais e na decomposição de matéria orgânica e pode ser formado no ar como um produto da foto-oxidação do benzeno (BUSCA et al., 2008).

A oliveira, *Olea europaea* L. (Oleaceae), é cultivada em várias regiões do mundo, no entanto, sua maior concentração se dá em países da União Europeia. O preparo do azeite é o principal fator da importância comercial das oliveiras. Em 2007, a produção mundial de azeite atingiu cerca de 3 milhões de toneladas, movimentando aproximadamente 7,3 bilhões de dólares (IOOC, 2007). O Brasil é o sétimo maior importador mundial de azeite de oliva, principalmente de países como Argentina, Peru, Chile, Espanha e Portugal. No Brasil tem havido um grande aumento no consumo, no entanto, este ainda é considerado baixo quando comparado ao consumo mundial devido ao preço elevado (EPAMIG, 2005).

Existe um alto investimento anual pelos importadores em média de 600 milhões de reais para abastecer o mercado nacional com 50 mil toneladas de azeite e 35 mil toneladas de azeitonas. Sendo crescente o mercado local e por tratar-se de uma *commodity* (matéria-prima), a oliveira deverá agregar mais valor ao agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2005). O desenvolvimento de pesquisas em relação a cultura da oliveira no Sul de Minas Gerais é um empenho realizado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), que obteve resultados positivos com algumas variedades de oliveira, apontando a viabilidade de sua exploração comercial na região da Serra da Mantiqueira (EMBRAPA, 2005).

Existem 49 genótipos de diferentes origens de uma coleção iniciada em 1955 que apresentam respostas diferenciadas às condições locais de solo e clima. Além de uma boa produção, os produtos de excelente qualidade sendo estes azeites classificados como Extra Virgem, isto é, aqueles em que a acidez não ultrapassa 0,8%. Esse teor somente é obtido através da primeira prensagem a frio, menos que 24 horas após a colheita, segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Os produtores e empresários brasileiros têm dado maior atenção a este cenário e, diante da possibilidade de cultivo da oliveira em território nacional, os plantios comerciais vêm sendo implantados na região da Serra da Mantiqueira desde 2005, com 65 mil mudas plantadas em uma área de cerca de 130ha, além de outros plantios experimentais nas regiões Sul, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do país (EPAMIG, 2007). No entanto, estas indústrias de azeite geram resíduos de grande preocupação ambiental devido ao seu alto impacto (MULINACCI et al., 2001).

A presença de substâncias orgânicas na extração do óleo de oliva particularmente os polifenóis, tem sido relatada por seus efeitos negativos em todos os principais ecossistemas: solo, água e ar (ROIG et al., 2006). Para este objetivo também direcionam-se os resultados

desta tese obtidos através de ensaios de oxidação em resíduos da extração do azeite, a assimchamada "água de vegetação", utilizando a enzima tirosinase contida no extrato de cogumelo.

2.3 Toxicidade dos fenóis

Nas últimas décadas a poluição ambiental tem aumentado significativamente devido à introdução no meio ambiente de grandes quantidades de produtos químicos sintéticos, como solventes, plastificantes, inseticidas, herbicidas, fármacos e fungicidas, provenientes das atividades industriais, agrícolas, hospitalares e domésticas (FURUKAWA, 2006). Estas substâncias incluem fenóis, dos quais vários são classificados como poluentes prioritários pela EPA (Environmental Protection Agency) (ATSDR, 2007).

Os fenóis estão geralmente entre os mais perigosos poluentes orgânicos em águas residuais de refinarias de petróleo e são altamente tóxicos mesmo em baixas concentrações. Além disso, a presença do fenol nas águas naturais pode levar a formação de outros compostos altamente nocivos durante o processo de desinfecção e oxidação; por isso as águas residuais contendo fenol devem ser tratadas devido a sua alta toxicidade. O fenol também contribui para o sabor desagradável em água potável e alimentos processados com esta água (BUSCA et al., 2008).

Devido a toxicidade natural de muitos fenóis a EPA estabeleceu o limite de 1ppb para a concentração de fenol em águas superficiais. Na Itália, de acordo com as recomendações da União Europeia, o limite de fenol em águas superficiais é de 0,5ppb (BUSCA et al., 2008). Os compostos fenólicos industriais são inerentemente tóxicos e alguns bioacumulam-se na cadeia alimentar. Na avaliação da sua toxidade utilizam-se organismos, tecidos, células, receptores, DNA e enzimas (MEULEMBERG, 2009).

Pelo fato de ser solúvel em água, mesmo que parcialmente, o fenol é altamente móvel, e é provável que alcançe fontes de água potável a jusante de descargas, onde, mesmo em baixas concentrações pode causar problemas graves de odor e sabor apresentando altos riscos para as populações. Gera assim preocupações devido a sua toxidade e possível acumulação no meio ambiente (LIN; JUANG, 2009), além de haver indícios de ser carcinogênico (WANG et al., 2006). Portanto, a concentração máxima permitida em efluentes tratados é de 0.5mg/L (SANTOS et al., 2006). Um de seus derivados, o cresol (fenol metilado), tem sido detectado em águas subterrâneas (LIN; JUANG, 2009) e também em efluentes industriais (HUSSAIN et al, 2008; SARAVANAN et al., 2008). Ainda não foi elucidado o comportamento tóxico e antioxidante dos fenóis, ou seja, como os mesmos compostos polifenólicos podem se comportar tanto como antioxidantes quanto como pro-oxidantes dependendo da concentração e da fonte de radical livre (SERGEDIENE et al., 1999; CAO; SOFIC; PRIOR, 1997; DAY et al., 1999; FILIPE et al., 2004). No entanto, sabe-se que o mecanismo de compreensão de toxicidade dos fenóis está principalmente relacionado com os efeitos de lipofilicidade e eletrofílicidade (HANSCH et al., 2000; MEKAPATI; HANSCH, 2002; APTULA et al., 2005).

2.4 Extração de compostos fenólicos

Nos últimos anos, várias pesquisas com foco em extração de compostos fenólicos têm atraído atenção especial (PINELO et al., 2005). A extração é uma etapa importante no isolamento, na identificação e no uso dos compostos fenólicos. Existem várias metodologias de extração padrão: extração por solventes (BAYDAR; OZKAN; SAGDIC, 2004; BUCIC-KOJIC; PLANINIC; TOMAS; BILIC; VELIC, 2007), e extração com fluído super crítico (BLEVE et al., 2008; FREDJ; FRANCOIS, 1990; NAHAR; SARKER, 2005; PALMA; TAYLOR, 1999) sendo estas as técnicas mais utilizadas para a isolação dos compostos fenólicos. Há também uma vasta bibliografia em relação a extração e análises de polifenóis de materiais derivados de plantas incluindo: frutas, vegetais, vinhos, cafés, chás, ervas e cereais e culturas como feijão (BALASUNDRAM et al., 2006; LUTHRIA; PASTOR-CORRALES, 2006; NACZK; SHAHIDI, 2006).

Vários métodos podem ser utilizados para a extração de compostos fenólicos como: moagem, secagem e liofilização, a partir de frutas, vegetais e ervas ou somente por imersão de plantas frescas com posterior extração com solventes (MERKEN; BEECHER, 2000). De acordo com Castnaneda-Ovando et al. (2009), estas metodologias implicam na coextração de substâncias tais como açúcares, ácidos orgânicos, e proteínas, requerendo um processo de purificação subsequente, por exemplo, a extração em fase sólida (SPE). A extração por solvente, dependendo do estado da biomassa, pode consistir em extração líquido-líquido ou extração sólido-líquido.

A extração líquido-líquido é uma operação de transferência de massa, na qual a solução líquida (alimentação) contendo inicialmente um ou mais solutos é misturada com um líquido imiscível ou praticamnete imiscível (solvente). O solvente exibe afinidade preferencial ou seletividade para um ou mais dos componentes na alimentação e com diversas

densidades. O resultado desse contato apresenta duas fases: o extrato, que é uma solução rica em solvente contendo o soluto desejado extraído, e o refinado, onde a solução de alimentação residual contém pouco soluto (MULLER; BERGER; BLASS; SLUYTS; PFENNING, 2008). A extração torna-se uma ferramenta muito útil quando for escolhido um solvente de extração adequado. A extração líquido-líquido é frequentemente usada para a separação dos compostos fenólicos contidos em subprodutos industriais líquidos, tais como aqueles resultantes das indústrias de bebidas (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

A extração sólido-líquido, ou lixiviação, pode ser definida como um fenômeno de transporte de massa, no qual os sólidos contidos em uma matriz sólida migram para um solvente através do contato com a matriz. O fenômeno do transporte de massa pode ser reforçado pela mudança na concentração de gradientes, coeficientes de difusão ou na camada limite (CORRALES; FERNANDEZ GARCIA; BUTZ; TAUSCHER, 2009). É uma operação extensivelmente usada para recuperar muitos componentes alimentares de grande importância: sacarose em cana ou beterraba, lipídeos de sementes oleaginosas, fitoquímicos das plantas, hidrocolóides funcionais das algas e compostos polifenólicos de plantas, frutas, vegetais etc. (IGNAT; VOLF; POPA, 2011).

A eficiência da extração é conhecida ser função de várias condições de processo, tais como temperatura, razão de líquido-sólido, vazão e tamanho da partícula, que influenciam a concentração dos componentes desejados no extrato. Um exemplo é o conteúdo fenólico do extrato da casca da amêndoa, o qual foi visto ser três vezes maior em um lote de extração líquido-sólido que foi realizado a 50°C do que aquele a 25°C. O tempo de contato e a razão líquido-sólido foram também relatados serem variáveis significantes (HAYOUNI; ABEDRABBA; BOUIX; HAMDI, 2007; PINELO; RUBILAR; SINEIRO; NUNEZ, 2004; RUBILAR; PINELO; FRANCO; SINEIRO; NUNEZ, 2003).

Os mais comuns métodos de extração por solventes são aqueles que utilizam metanol acidificado ou etanol como extratores (AMR; AL-TAMINI, 2007; AWIKA; ROONEY; WANISKA, 2005; CARIDI et al., 2007; LAPORNIK et al., 2005). Em comparação com todos os métodos discutidos a extração com metanol é a mais eficiente (KAPASAKALIDIS; RASTALL; GORDON, 2006). De fato verificou-se que em extrações de antocianinas a partir
de bagaço de uva, a extração com metanol é 20% mais efetiva que aquela com etanol e 73% mais efetiva que aquela com água. No entanto, em indústrias alimentares o etanol é preferido devido à toxicidade do metanol (CASTANEDA- OVANDO et al., 2009).

Usualmente o procedimento de extração é sequencial e libera sistematicamente os compostos fenólicos das suas respectivas matrizes. A primeira etapa do procedimento envolve o uso de um solvente orgânico aquoso para extrair os ácidos fenólicos (ácidos livres ou ligados) que podem ser extraíveis/solúveis (ésteres solúveis e livres, e glicosídeos solúveis) (ESCARPA; MORALES; GONZALEZ, 2002; MATTILA; KUMPULAINEN, 2002; RUSSELL; SCOBBIE; LABAT; DUNCAN; DUTHIE, 2008).

Os ácidos fenólicos também existem como complexos ligados insolúveis que são acoplados aos polímeros da parede celular através de ligações éster e glicosídicas e não são capazes de serem extraídos por solventes orgânicos. Estas ligações são tipicamente rompidas pela hidrólise básica, ácida, ou ambas (MATTILA; KUMPULAINEN, 2002). A principal etapa na maioria dos procedimentos envolve a hidrólise básica com NaOH variando de 2 a 10M, usando um tempo de incubação acima de 16h e as vezes sob nitrogênio (POPA et al., 2008; NARDINI et al., 2002).

Seguindo a hidrólise básica, a hidrólise ácida é as vezes realizada para liberar as ligações fenólicas que não têm sido previamente hidrolisadas (ROSS et al., 2009). Mattila e Kumpulainen (2002) observaram que a hidrólise ácida libera quantidades significativas de ácido gálico a partir de framboesa, morango vermelho, cenoura, batata frita, pão, juntamente com quantidades significativas de ácido protecatecuico (Figura 6).



Figura 6. Ácidos fenólicos. Hidrólise ácida liberando ácido gálico e ácido protecatecuico a partir de frutas . Fonte: Mattila and Kumpulainen (2002).

De acordo com os estudos de Soong e Barlow (2006), quantidades substanciais de ácidos gálicos e elágico são liberadas pela hidrólise ácida a partir de sementes de manga. Em outros casos, maçãs, suco de maçã e batatas, a hidrólise ácida foi desnecessária uma vez que a hidrólise básica foi suficientemente agressiva (LUTHRIA; PASTOR-CORRALES, 2006; MATTILA; KUMPULAINEN, 2002). A hidrólise ácida e a hidrólise básica foram também testadas em frutos de magostão (*Garcinia Mangostana, Linn*).

3. Tratamento enzimático de fenóis presente nos efluentes

Várias enzimas podem ser empregadas em muitos processos de tratamento das águas contendo poluentes específicos (DURAN; ESPOSITO, 2000; HUSAIN; JAN, 2000). Dentre eles, a oxidação de fenóis residuais catalizada pela tirosinase ou polifenoloxidase (PPO), a qual constitui um novo método desenvolvido para a remoção do fenol em água com a ligação dos compostos oxidados pela quitosana (PAYNE; SUN; SOHRABI, 1992; WADA; ICHIKAWA; TATSUMI, 1993; WADA; ICHIKAWA; TATSUMI, 1995; SUN; PAYNE, 1996; IKEHATA; NICELL, 2000; YAMADA et al., 2005; YAMADA et al., 2006; NADAVALA et al., 2009; BHATNAGAR; SILLANPA et al., 2009; SAITOH et al., 2009).

A ideia de usar oxidoredutases no tratamento de efluentes surgiu antes do ano de 1980. Uma grande vantagem dessa abordagem enzimática é que essas enzimas podem reagir com uma ampla gama de compostos aromáticos sob diversas concentrações. Sua principal vantagem é de ser rápida e pouco sensível a perturbações operacionais em comparação com a flora microbiana (HUSAIN; JAN, 2000; DURAN; ESPOSITO, 2000; TORRES et al., 2003).

O aparecimento de um composto escuro no cogumelo na presença de tirosina foi observado por Bourquelot e Bertrand (1895) e então foi atribuído o nome de tirosinase à enzima presente no cogumelo em 1896. O escurecimento enzimático de vegetais e frutas, quando cortados e expostos ao ar, ocorre devido à polimerização das o-quinonas, produtos da oxidação, originando as melanoidinas (FATIBELLO-FILHO; VIEIRA, 2002). A tirosinase é uma enzima que contém cobre melanogênico que catalisa a hidroxilação da tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) e sua subsequente oxidação em dopaquinona (KORNER, 1982; XIE et al., 2003). Esta enzima é responsável pela melanização em plantas e animais, os quais levam ao escurecimento indesejável, nas peles, olhos, ouvido interno e cabelos (ALVARO; NEPTUNO; FRANCISCO, 1995; LORENA et al., 2003).

De acordo com Santos Primo (2006) a nomenclatura confusa surgiu em grande parte devido à ocorrência de duas atividades catalíticas distintas. A dupla atividade catalítica da tirosinase conduziu à discordância sobre se ambas as reações acontecem no mesmo local ativo ou não (MAYER; HAREL, 1991). Porém, ambas utilizam-se do mesmo substrato para um único sítio ativo, embora os monofenóis se liguem a um único dos dois íons cobre presentes neste local (LERCH, 1981).

A IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) redefiniu as duas atividades catalíticas da enzima tirosinase: (I) E.C. 1.14.18.1 (monofenol mono-oxigenase; também chamada de atividade monofelase ou cresolase) que catalisa a o-hidroxilação de monofenóis para o-difenol; e a (II) E.C. 1.10.3.1 (oxidação do o-difenol para o-quinona, também chamada de atividade catecolase ou difenolase), ambas envolvendo oxigênio molecular seguido por uma série de etapas não enzimáticas resultando na formação de melanina (PÉREZ-GILABERT; GARCIA-CARMONA, 2000).

Embora a função fisiológica da tirosinase em fungos não esteja bem esclarecida, a síntese de melanina está correlacionada com a diferenciação dos órgãos reprodutivos e formação de esporos, a virulência dos fungos patogênicos e a proteção do tecido após o dano (PEREZ-GILABERT; GARCIA, 2001; GADD, 1980; BELL; WHEELER, 1986; ZIMMERMAN, 1995).

A PPO é largamente distribuída na natureza sendo encontrada nos tecidos de: kiwi, cogumelo, arroz, abacate, pera, maçã, morango, uva, folha de espinafre, palmito, banana, batata inglesa, batata doce, pêssego, manga, berinjela, inhame, entre outros (HYODO; URITANI, 1965; PARK; LUH, 1985; MONTGOMERY; SGARBIERI, 1975; VIEIRA; FATIBELLO-FILHO, 2000). Nos tecidos vegetais, esta enzima está localizada nos cloroplastos (VAN GELDER et al., 1997) e sua atividade depende do local do plantio, período da colheita, de espécie e do estado de amadurecimento deste, sendo menor em frutos ou vegetais não amadurecidos (DAWSON; TARPLEY, 1951; DAWSON; MAGEE, 1955).

O peróxido de hidrogênio também pode ser utilizado para a degradação do fenol por ser o agente oxidante com menor potencial poluente (SHYLESH et al., 2005; YU et al., 2006) e devido ao seu alto conteúdo de oxigênio e ao fato de ser a água o único subproduto da reação (SAMANTA, 2008; BALLISTRELI; TOMASELLI; TOSANO, 2008). A enzima peroxidase também tem sido utilizada em muitos estudos para a remoção de compostos fenólicos em meio aquoso. Catalisa a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos pelo peróxido de hidrogênio através da transferência de dois elétrons (NAZARI et al., 2007), é mais lenta em termos de inativação e pode agir em uma grande variedade de substratos em relação aos processos convencionais. No entanto, sua utilização é baixa por apresentar alto custo (NICELL, 1994; SINGH et al., 2006; PERALTA-ZAMORA et al., 1998; ARICA; BAYRAMOGLU, 2004; BAYRAMOGLU; ARICA, 2008). Várias peroxidases e lacases têm sido usadas para o tratamento de águas residuais contendo corantes. O procedimento de descoloração do corante pelas peroxidases acrescenta, porém, um custo adicional para os processos devido o peróxido de hidrogênio ser caro e utilizado como co-substrato (AKHTAR et al., 2005 a e b). A escassa disponibilidade e o alto custo da purificação da lacase limitam seu uso para este estudo. A polifenoloxidase extraída de plantas é uma alternativa simples para a descolorização de poluentes aromáticos graças à utilização de oxigênio molecular livre como oxidante em vez de peróxido de hidrogênio (WADA et al., 1995; DURAN; ESPOSITO, 2000; IKEHATA; NICELL, 2000 a e b).

O custo do tratamento é importante não só devido ao preço da enzima purificada, mas também pelo fato de a peroxidase ser susceptível a inativação permanente por várias reações colaterais indesejáveis do processo de tratamento (GÓMEZ et al., 2007). Por ser uma enzima cara, vários estudos estão focados em fontes alternativas e de baixo custo da enzima, como raízes de tomate (GONZÁLEZ; AGOSTINI; MILRAD, 2008), no uso de peroxidase de soja imobilizada e em leito fluidizado além de outras fontes (GÓMEZ et al., 2007).

De acordo com Busch (1999), Lee (2000), Marshall, Kim e Wei (2005), e Martinez e Witaker (1995), as PPOs agem após a ocorrência de danos mecânicos e cortes celulares, que ocasionam o rompimento de paredes e membranas, comprometendo a separação física entre a enzima e os substratos fenólicos favorecendo a reação de escurecimento. Os principais fatores determinantes para a reação são: a concentração da enzima e dos compostos fenólicos, o pH, a temperatura e a disponibilidade de oxigênio (ROBBINS, 2003).

As PPOs e lacases catalisam duas diferentes reações com oxigênio molecular: a hidroxilação de monofenóis para formar o-difenóis e a desidrogenação de o-difenóis para formar o-quinonas. A maioria das o-quinonas é instável e passa por uma polimerização não enzimática gerando pigmentos insolúveis em água (KLIBANOV et al., 1980; SHUTTLEWORTH; BOLLAG, 1986; WADA; ICHIKAEA; TATSUMI, 1993). Estes compostos são posteriormente convertidos em espécies oligoméricas mais pesadas e podem se facilmente filtrados e/ou adsorvidos em um sólido (DURAN; ESPOSITO, 2000). A quitosana é particularmente ativa e útil na adsorção destes compostos (ERHAN et al., 2002, CHEDEVILLE et al., 2010).

Devido à remoção incompleta durante os processos de tratamento primários e secundários, as o-quinonas persistem nos efluentes de águas residuais em baixa concentração. Mesmo em baixa concentração, estes contaminantes levantam preocupações nos órgãos públicos de monitoramento ambiental e de regulamentação devido a sua capacidade potencial de disrupção endócrina e sua genotoxidade (ARQUES et al., 2007).

3.1 Outros métodos de tratamento de fenóis presente nos efluentes

A eliminação dos fenóis contidos em águas pode ser realizada também a partir de vários processos como oxidação química (KORBAHTI; TANYOLAÇ, 2003; YAVUZ; KOPARAL 2006; RA et al., 2008; WANG; GU; XU, 2009), extração por solventes (YANG et al., 2006), filtração com membranas (GONCHARUK et al., 2002; BUSCA et al., 2008), tratamentos biológicos (RAO; VIRARAGHAVAN, 2002; SHOURIAN et al., 2009; NAAS; AL-MUHTASEB; MAKHLOUF, 2009; EL-NAAS; AL-ZUHAIR; MAKHLOUF, 2010) além de coagulação e precipitação, sedimentação, osmose, degradação fotocatalítica (AGRIOS; GRAY; WEITZ, 2003), ultrasônica (PANDIT; GOGATE; MUJUMDAR, 2001),

polimerização enzimática, entre outros (BUCHANAN; MICELL, 1997; LIN; JUANG, 2009). A sonicação (SCHUELLER; YANG, 2001; NANZAI et al., 2008) e a cavitação hidrodinâmica (CHAKINALA et al., 2008) também realizam a degradação, mas ambos são considerados pouco eficientes se forem realizados sem a presença de oxidantes químicos.

Nos últimos anos, os biomateriais têm sido cada vez mais usados como alternativa promissora, sendo largamente disponíveis como matérias primas de baixo custo, ou mesmo como resíduos industriais, tais como casca de arroz e penas de galinha (BANAT; AL-ASHEH, 2000). Em particular, a quitosana (LI et al., 2009; NADAVALA, 2009) e queratina (BANAT; AL-ASHEH, 2000) revelaram-se biosorventes eficazes para a remoção de fenol ou seus derivados.

Biosorventes efetivos alternativos podem ser a quitina, a queratina e a quitoana. Este método de tratamento é principalmente aplicado na remoção de compostos orgânicos e metais pesados (CRISAFULLY et al, 2008; AHMARUZZAMAN; SHARMA, 2005; DIN; HAMEED; AHMAD 2009; SINGH et al., 2008; LIN et al., 2009; GIRODS et al., 2009; ZENG et al., 2009; CHERIFI; HANINI; BENTAHAR, 2009; ALHAMED, 2009; LUE; JIA, 2009; VALENTE NABAIS, 2009).

De acordo com Bhatnagar e Sillanpaa (2009), a quitosana foi descoberta pelo professor C. Rouget, em 1859. É constituída por 2-acetamido-2-deoxi-β-D-glicose e resíduos de 2-amino-2-deoxi-β-D-glicose e obtida a partir da quitina pela desatilação de seus grupos acetamida com uma forte solução alcalina. A quitosana possui uma vasta aplicabilidade ambiental incluindo o tratamento de efluentes, papel e resíduos agrícolas. Também é utilizada em várias atividades industriais para a formação de produtos alimentares, biotecnológicos, medicinais e farmacêuticos, cosméticos, textêis e membranas (STRUSZCZYK, 2002).

A quitina é constituída por 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicose através de uma ligação β (1 \rightarrow 4). Foi inicialmente encontrada em cogumelos pelo professor French, Henrni Braconnot em 1811, no entanto, em 1820 já pôde ser isolada a partir de insetos. A quitina depois da celulose é considerada a fibra natural mais abundante e apresenta muita similaridade com a celulose em vários aspectos (BHATNAGAR; SILLANPAA, 2009). A casca, ou o exoesqueleto do carangueijo e camarão são as fontes mais abundantes da quitina mas também está presente nas paredes celulares de alguns fungos (BERKELEY, 1979).

A queratina também é utilizada como adsorvente de fenóis. É uma proteína fibrosa que apresenta uma forma tridimensional sendo α -queratina ou β -queratina, constituída de

aproximadamente 15 aminoácidos, particularmente a cisteína. Estas estruturas ocorrem devido aos aminoácidos da queratina interagirem através das ligações de hidrogênio e ligações covalentes de dissulfeto (-S-S-). A queratina é presente em abundância na natureza, e principalmente em cabelos e penas resultantes dos processos de produção de alimentos (BANAT; AL-ASHEH, 2000; BANAT; AL-ASHEH, 2001). Padilha, Silva e Sampaio (2006) relataram que cerca de 21% do total dos resíduos líquidos dos processos industriais de frango é constituído por penas.

Ainda existem poucos relatos sobre o uso da queratina para a remoção de metais pesados (TOUAIBIA; BENAYADA, 2005) dos efluentes industriais e até mesmo na recuperação dos íons de metais preciosos (SYAMA; FUKAZAUA; SUZUMURA, 1996). A alta afinidade da queratina para íons de metais, mesmo o mercúrio (TOUAIBIA; BENAYADA, 2005), sugeriu ser o resultado da polaridade de sua cadeia, portanto, o seu uso na remoção de poluentes como o fenol parece ser um desafio.

Processos químicos específicos são também necessários para converter o fenol em produtos menos tóxicos, tais como os difenóis. Os difenóis, como os catecóis e a hidroquinona, têm diversas aplicações, como por exemplo, a síntese de produtos químicos para fotografia (RAY; MAPOLIE; DARKWA, 2007), de inibidores para polimerização de antioxidantes e agentes aromatizantes (RIVES et al., 2003; KANNAN; DUBEY; KNOZINGER, 2005).

Além disso, resíduos industriais podem ser utilizados como potenciais adsorventes alternativos e de baixo custo para a remoção de fenol e seus derivados. Geralmente resíduos industriais são gerados como subprodutos. Quando estes materiais estão disponíveis em grande quantidade, apresentam um custo acessível. Nos países como Índia e Austrália, há um grande depósito de lodo, cinzas, borracha, carvão, os quais têm sido utilizados para remover fenóis e seus derivados de água contaminada. O carvão tem uma microporosidade e uma grande área superficial além de ser um ótimo exemplo de adsorvente para fenóis (LIN; JUANG, 2009).

Os métodos físico-químicos têm provado serem caros e apresentam as desvantagens inerentes de causar uma poluição secundária. Por isto, a biodegradação é mais interessante por ser uma alternativa ambientalmente favorável (ARIANA; ELKE; THOMAS, 2004). Biologicamente é difícil decompor o fenol devido ao fato de ser tóxico para plantas,

microorganismos, animais e seres humanos, ocasionando graves danos ambientais (LIU; ZHANG; WANG, 2009).

A oxidação fotocatalítica heterogênea que emprega os catalisadores tais como TiO₂ ou ZnO além de luz ultravioleta tem mostrado resultados promissores para a degradação de poluentes orgânicos persistentes, gerando substâncias biologicamente degradáveis e menos tóxicas (GARCIA et al., 2006; GARCYA et al., 2007; GARCIA et al., 2008; HINCAPIE et al., 2006; MALDONADO et al., 2007; MALATO et al., 2002 e OLLER et al., 2006). Além disso este tipo de degradação fotocatalítica de fenóis e corantes é largamente dependente também do pH da solução, composição do meio, catalisador, tipo de substrato orgânico e concentração, intensidade luminosa, força iônica das águas residuais, entre outros (SHAKTHIVEL et al., 2004; BYRAPPA et al., 2006). Entender os impactos dos vários parâmetros que regem a eficiência da degradação fotocatalítica é de fundamental importância para o tratamento de águas residuais (AHMED et al., 2011).

A degradação do fenol em diferentes sistemas metanogênicos está relacionada com a temperatura (FANG et al., 2006; KARLSSON et al.,1999; LEVÉN; SCHNURER, 2005), o que pode explicar as diferentes eficiências observadas na degradação de fenóis durante a digestão anaeróbica de resíduos sólidos orgânicos (LEVÉN; SCHNURER, 2005). No intervalo mesofílico, o ácido benzóico é comumente um intermediário na degradação do fenol (FANG et al., 2006; KARLSSON et al., 1999; LEVÉN et al., 2006).

A temperatura no processo de digestão anaeróbica de resíduos sólidos orgânicos mostra ser importante na degradação de vários fenóis, com grande eficiência em condições mesofílicas quando comparadas com as termofílicas. Como consequência, digestores termofílicos geralmente contêm níveis mais altos de fenóis se estiverem presentes no processo de digestão anaeróbica. Uma explicação para a degradação limitada de fenóis em processos de temperatura elevada é a presença de diferentes fenóis, os quais apresentam diferentes ótimos para degradação (LEVÉN; NYBERG; SCHNURER, 2010).

4. Água de vegetação

O processo de extração do azeite é relacionado com um dos principais problemas de tratamento dos efluentes agroindustriais produzidos na região do Mediterrâneo, onde sua produção é avaliada entre 7 a 30 milhões de m³ por ano (PHAM MINH et al., 2008). Estes efluentes, chamados de "água de vegetação", exigem um tratamento de reciclagem ou

descarga e têm características similares às de outros efluentes agroindustriais como por exemplo os que provêm do processamento de vegetais (BARANSI; DUBOWSKI; SABBAH, 2012) e são responsáveis por grande impacto ambiental (MULINACCI et al., 2001).

A preocupação com os compostos fenólicos tem sido crescente nestes últimos anos devido a sua possível contribuição a atividade antibacteriana e tóxica das águas residuais em geral. Por este motivo, vários estudos estão sendo realizados sobre o tratamento efetivo dos compostos neles contidos, sobre a sua descarga correta (SILVA et al., 2007) e sobre os sistemas de tratamento relacionados (SABBAH et al., 2004).

O resíduo da extração do azeite é um líquido ácido com pH 5 a 5,5 costituído por uma pasta de azeitona, pectinas e óleo. Os efeitos negativos observados nos solos, nas águas e no ar são associados com a presença dos polifenóis e de outras substâncias orgânicas neles presentes (ROIG et al., 2006). Os sais inorgânicos, os ácidos graxos livres e principalmente os compostos fenólicos são as principais causas da alta fitotoxicidade e a baixa biodegradabilidade desses efluentes (ZAFRA et al., 2006). Em consequência, os pesquisadores têm demonstrado um aumento na atenção avaliando novas metodologias que visam minimizar seu impacto ambiental. Estudos, tais como o tratamento com fermentação por microrganismos ou hidróxido de cálcio, têm sido direcionados para este objetivo (GALIATSATOU et al., 2002).

Atualmente, tem se aumentado o número de pesquisas voltadas à adsorção para a remoção de espécies orgânicas, entre elas os fenóis substituídos e não substituídos, usando o carbono ativado como adsorvente (KHAN et al., 1997; RENGARAJ et al., 2002; ÖZKAYA, 2006). O carbono ativado apresenta uma alta habilidade de adsorção para compostos orgânicos com baixo peso molecular, como os fenóis. É considerada uma adsorção com processo químico e/ou fisico, em que a substância a ser adsorvida é acumulada na interface entre duas fases.

Nos últimos anos, por outro lado, a importância dos polifenóis como compostos bioativos foi muito discutida (TUCK; HAYBALL, 2002). Os compostos fenólicos apresentam uma ampla aplicabilidade, podendo agir como antioxidantes alimentares (ALIAKABARIAN et al., 2009), antivirais, neurossedativos, agentes anticancerígenos, anti-inflamatórios (OHNO et al., 2002), entre outros. Portanto, em consequência dessas potenciais aplicações, o uso adequado destes resíduos da produção de azeite pode beneficiar o ecossistema reduzindo os problemas ambientais além de melhorar a situação econômica dos produtores de azeite. Com

essas vantagens apresentadas é de grande importância recuperar os extratos enriquecidos com compostos fenólicos, onde o subproduto é amplamente acessível e é obtido a baixo custo (ALIAKABARIAN et al., 2011).

O tratamento por carbono ativado é de grande interesse uma vez que tem sido considerado um excelente sorvente para a remoção de odores, recuperação de solventes, descloração, descoloração, aniquilação, recuperação de ouro (WALKER, 1996), H₂S/CS₂, filtração, tratamento de efluentes industriais, condicionamento da água potável, etc. (SINGH et al., 2008).

5. Toxicologia genética e monitoramento ambiental baseado na utilização de plantas superiores

O aumento da descarga de produtos químicos tem afetado o equilíbrio do ecossistema natural e consequentemente chamado a atenção de vários pesquisadores e agências governamentais para a saúde e a vida dos organismos (MARIN-MORALES, LEME 2009).

Entre os danos causados por agentes químicos para organismos expostos, os efeitos genotóxicos, entre este o mutagênico, têm demonstrado ser preocupante devido a sua capacidade de induzir danos genéticos, podendo levar a vários problemas de saúde além de afetar gerações futuras, se estes forem herdados (RIBEIRO, 2003). Com isso, surgiu a necessidade de identificar os compostos que reagem com o DNA, a fim de assegurar a qualidade ambiental com estudos levando ao desenvolvimento de vários testes de mutagenicidade e toxicidade em uma ampla gama de organismos (MARIN-MORALES; LEME, 2009).

Diante do exposto, sabe-se que plantas superiores apresentam características que as tornam excelentes modelos genéticos para avaliar os poluentes ambientais, sendo frequentemente utilizadas em estudos de monitoramento. No entanto, este recurso não é devido somente a sua sensibilidade para detectar mutagênicos em diferentes ambientes, mas também para a possibilidade de avaliar mecanismos genéticos que variam de mutações pontuais em aberrações cromossômicas (CA) em células de diferentes órgãos e tecidos tais como folhas, raízes e pólen (GRANT, 1994).

Atualmente Allium cepa, Vicia faba, Zea mays, Tradescantia sp., Nicotiana tabacum, Crepis capillaris e Hordeum vulgare são as espécies de plantas mais frequentemente utilizadas para avaliar a contaminação ambiental (GRANT, 1994). De acordo com o autor Fiskesj (1985), *A. cepa* além desta função tem sido utilizada para avaliar danos no cromossomo e distúrbio no ciclo mitótico, devido a presença de grandes cromossomos em um número reduzido (2n=16). Além disso, esse sistema de teste também demonstrou alta sensibilidade na detecção de substâncias químicas no meio ambiente.

5.1. Avaliação da genotoxicidade de águas residuais empregando o teste de *Allium cepa*

A poluição dos recursos hídricos é considerada um potencial de risco à saúde humana e ao ambiente por todas as nações (VARGAS et al., 2001; OHE et al., 2003; MONTE EGITO et al., 2007). Além de afetar a saúde, os poluentes também apresentam capacidade genotóxica, entre elas a mutagênica, que pode ocorrer devido à exposição crônica aos compostos genobióticos, podendo ocasionar e favorecer o aparecimento de câncer, esclerose, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce. Para avaliar os riscos tóxicos e genotóxicos de tais misturas complexas, testes de genotoxidade e toxicidade empregando microrganismos, células de mamíferos e plantas têm sido utilizados sozinhos ou em combinação com análises químicas (SMAKA-KINCL et al., 1996; OHE et al., 2003; ZEGURA et al., 2009).

Os vegetais têm várias vantagens em relação às células de mamíferos ou microbianas, incluindo a semelhança na morfologia cromossômica de plantas e mamíferos, bem como o fato de que eles têm uma resposta semelhante à dos agentes mutagênicos. Além disso, as plantas são mais baratas e consomem menos. Dentro deste contexto, a raíz de *A. cepa* destacase por possuir grande tamanho celular e pequeno número de cromossomos, tornando-se assim adequada para um bioensaio que possibilite a medição da variedade de parâmetros citogenéticos e morfológicos, e estes podem servir como indicadores de toxicidade, por meio da análise da indução e frequência de formação dos micronúcleos e aberrações cromossômicas (RANK; IELSEN, 1998; LEME; MJARIN-MORALES, 2009).

O teste de *Allium cepa* tem sido utilizado para o monitoramento do efeito potencial sinergístico de misturas de poluentes, incluindo metais pesados e compostos químicos lipofílicos e hidrofílicos (FISKEJO 1985; GROVER; KAUR 1999; RANK et al., 2002; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

5.2. Índice mitótico

O índice mitótico (MI) é caracterizado pelo total de células em divisão no ciclo celular e tem sido utilizado como um parâmetro para avaliar a citotoxidade de vários agentes. Os níveis de citotoxidade de um agente podem ser determinados pelo aumento ou diminuição dele (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2008).

Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2008) argumentam que tanto a redução como o aumento de MI são indicadores importantes no controle da poluição ambiental especialmente para a avaliação de contaminantes tóxicos que apresentam potencial tóxico e citotóxico. De acordo com Smaka-Kincl et al. (1996), a diminuição de MI em células meristemáticas de *A. cepa* podem ser considerada um método confiável para determinar agentes citotóxicos no ambiente e com uma grande sensibilidade para estimar os níveis de poluição.

5.3. Aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas (AC) são caracterizadas por alterações na estrutura do cromossomo e/ou no número total de cromossomos, que podem ocorrer seja de forma espontânea ou como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). As alterações na estrutura do cromossomo pode ser induzida por vários fatores, tais como a quebra do DNA, inibição da síntese de DNA e replicação do DNA alterado. O número de AC, por exemplo, aneuploidia e poliploidia, são consequências da segregação de cromossomos anormais (ALBERTINI et al., 2000).

Para avaliar as anormalidades cromossômicas pelo teste de *A. cepa* vários tipos de AC são considerados em diferentes fases de divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase) como podem ser vistas na Figura 7. Entretanto, esta análise não é simples de ser realizada, pois requer um conhecimento preciso das fases e suas possíveis anormalidades. Devido a esta anormalidade Rank e Nielsen (1993) adaptaram o teste de *A. cepa* a fim de facilitar as análises de AC para os pesquisadores que não trabalham na área de citologia. Assim, estes autores propuseram as análises de anormalidade somente na anáfase e telófase.



Anáfase Aberrante

Telófase Aberrante



Figura 7. Fases da divisão celular com a presença e ausência de aberrações cromossômicas.

Contudo, a análise de diferentes tipos de AC em todas as fases de ciclo celular, inicialmente proposta por Fiskesjo (1985), permite uma avaliação mais abrangente e precisa, uma vez que promove uma melhor investigação das ações dos agentes testados, sobre o seu efeito clastogênico e/ou aneugênico no DNA dos organismos testes e até mesmo o seu possível desenvolvimento (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES; 2008; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES; 2007; ATEEQ et al., 2002; BOLLE et al., 2004).

Em um caminho simples a aberração cromossômica como pontes e quebras cromossômicas são indicadores de ação clastogênica, enquanto as perdas cromossômicas, o atraso, a aderência, multipolaridade e a C-metáfase resultam de efeitos aneugênicos. A Figura 8 apresenta algumas das AC que podem ser observadas em testes de *A. cepa* após a exposição a agentes físicos e químicos.



Figura 8. AC observada em células meristemáticas de *A.cepa* expostas a agentes químicos: (A)
Metáfase normal; (A1) Metáfase com quebra cromossômica; (A2) C-metáfase; (A3) Metáfase com perdas cromossômicas, (A4) Células binucleadas em metáfase; (A5) Metáfase com adesão de cromossomos; (B) Anáfase normal; (B1) Anáfase com pontes cromossômicas; (B2) Anáfase com quebras cromossômicas; (B3) Anáfase com ponte e perda cromossômica; (B4) Anáfase com perda cromossômica; (B5) Anáfase multipolar; (C) Telófase normal; (C1) Telófase com quebra cromossômica; (C2) Telófase com ponte e perda cromossômica; (C3) Telófase com quebra cromossômica; (C4) Telófase multipolar; (C5) Telófase multipolar com ponte cromossômica.

5.4. Anormalidades nucleares

Alguns autores têm recentemente incluído na análise de AC de *A.cepa* as anormalidades nucleares (AN), caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico como resultado da ação dos agentes testados. Geralmente estas alterações são observadas em teste de *A. cepa* como núcleo lobulado, células polinucleares, minicélulas entre outras (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES; 2008; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; MIGID; AZAB; IBRAHIM, 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

A avaliação das AN apresentada na Figura 8 juntamente com a AC é considerada uma análise sensível para fazer a investigação das ações dos agentes, e é ainda mais precisa em relação aos efeitos no DNA expostos dos organismos. De acordo com Leme, Angelis e Marin-Morales (2008), a presença de núcleo lobulado e células polinucleares pode indicar um processo de morte celular uma vez que estas anormalidades não são observadas em células F1 nas raízes de *A.cepa*. Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2007) pesquisaram a ação do herbicida trifluralina pelo teste de *A.cepa* e observaram que as gemas nucleares podem surgir como um resultado da eliminação do excesso de material genético derivado do processo de poliploidização (dois ou mais conjuntos de cromossomos existentes no núcleo). A Figura 9 mostra algumas das AN que podem ser encontradas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a agentes físicos e químicos.



Figura 9. AN observadas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a agentes químicos. (A) Célula interfásica com broto (BUD) nuclear e micronúcleos(MN); (B) Núcleos interfásicos com broto nuclear; (C) Prófase com broto nuclear sincrônico; (D) Núcleos com pontos nucleares; (E) Núcleos lobulados com MN; (F–H) Núcleos lobulados; (I) Núcleos interfásicos interconectados pela ponte nuclear e MN.

5.5. Micronúcleos

Os micronúcleos (MN) têm sido considerados por muitos autores como um ponto final mais simples e efetivo para analisar o efeito mutagênico promovido por produtos químicos. Isto é devido ao fato que MN resultam de danos, não ou erroneamente reparados nas células parentais (RIBEIRO, 2003), sendo facilmente observados em células filhas, mas em tamanho reduzido.

A partir de MN surgem o desenvolvimento de algumas aberrações cromossômicas, por exemplo, quebras de cromossomos e perdas. Além disso, MN podem ainda derivar de outros processos como poliploidização, em que eliminam o excesso de DNA do núcleo principal na tentativa de restaurar a condição normal de ploidia (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

A avaliação de MN em testes de *A.cepa* pode ser realizada em células meristemáticas e em células de raízes F1 destas espécies. A análise de MN em células meristemáticas é geralmente realizada com uma AC, o que leva mais tempo. Entretanto, ambas as análises têm mostrado sensibilidade para detectar mutágenos ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2008). Leme, Angelis e Marin Morales (2008) relataram que o MN também permite uma investigação do mecanismo de ação de agentes químicos. O tamanho do MN pode ser um efetivo parâmetro para avaliar os efeitos aneugênicos e clastogênicos em *A.cepa*, uma vez que esta espécie apresenta um cariótipo simétrico, o qual é homogêneo em relação ao tamanho do cromossomo com grandes e poucos cromossomos (2n=16). Portanto, grandes MN podem indicar um efeito aneugênico resultante da perda de cromossomo, enquanto que os menores podem indicar uma ação clastogênica devido a quebra do cromossomo (Figuras 10 e 11).



Figura 10. Células meristemáticas de *A. cepa* com MN. (A) Intérfase normal; (A1) Célula micronucleada em intérfase; (B) Prófase normal; (B1) MN em prófase; (C) Metáfase normal; (C1) MN em metáfase; (D) Anáfase normal; (D1) Anáfase com MN; (E) Telófase normal; (E1) Telófase com MN e perda cromossômica.



Figura 11. Células meristemáticas de *A. cepa* com MN. (A–C) MN de pequeno tamanho em intérfase;
(D) MN de pequeno tamanho em prófase; (E–F) MN de grande tamanho em intérfase; (G–H) MN de grande tamanho em prófase.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Materiais e Equipamentos

O equipamento que foi utilizado nos ensaios de extração líquido-líquido do fenol é um vaso agitado padronizado Rushton e está esquematizado na Figura 12, o qual foi construído segundo informações contidas na literatura (QUADROS; BAPTISTA, 2003; PALMA et al., 2007; PALMA et al., 2010). O vaso de mistura (A) com um suporte para 5 L de volume foi feito de vidro e equipado com um revestimento externo para a recirculação de água aquecida. Ele foi equipado com uma placa de aço inoxidável superior com 5 furos para permitir a agitação mecânica (B), um sensor de temperatura (C), dois tubos para alimentação da solução de fenol aquosa (cerca de 1%w/w) e solvente, e uma seringa como dispositivo de amostragem (D). Na parte inferior do vaso há uma válvula (E) para amostragem de ambas as fases. A temperatura foi controlada por um banho termostático (F), o qual possibilita realizar testes sob diversas temperaturas (10-30+/-1°C). O agitador mecânico é movido por um motor, o qual permite variar a velocidade de rotação entre 100 e 1500rpm. Um sensor de pH (G) e um condutivímetro (H) foram posicionados na fase líquida uma vez que o coeficiente de distribuição de soluto é uma função de ambos, pH e condutividade elétrica do meio.



Figura 12. Equipamento experimental usado para a extração líquido-líquido de fenol da solução aquosa. A- vaso de extração, B- agitador mecânico, C- sensor de temperatura, D- dispositivo de amostragem, E- válvula, F- banho termostático, G- sensor de pH e H- condutivímetro.

Para a análise da atividade enzimática da tirosinase utilizou-se o espectrofotômetro (UV-Vis /Perkin Elmer, Wellesley, MA, EUA) comprimento de onda de 280nm e cubetas de quartzo. Para a determinação da oxidação enzimática do fenol foram utilizados HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e espectrofotômetro. O HPLC, (modelo 1100, HPLC Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipado com detector de UV (280nm), coluna de fase reversa C18 (modelo Eclipse Plus, 4.6*250mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e pré coluna HPLC (C18 Eclipse Plus, 4.6*12.5mm, Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). A separação foi atingida utilizando um gradiente linear de dois solventes: solvente A (50% metanol, 50% acetonitrila, v/v) e solvente B (ácido acético 1.0% em águav/v). Um gradiente linear a 30°C com a taxa de fluxo a 0.5 ml/min a partir de 0% a 35% A em 10 min, de 35% a 0% A em 5 min, de 0% a 65% A em 5 min, seguido por 25 min de 65% A. O volume injetado da amostra foi de 20μL. Para a determinação de adsorção de fenol utilizou-se o espectrofotômetro acima mencionado a um comprimento de onda de 546nm; os produtos químicos utilizados foram: 4-aminoantipirina, ferricianeto de potássio, ácido bórico e cloreto de potássio.

7. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

7.1 Preparo dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Batistuti e Lourenço (1985), conforme a qual 100g de *Solanum tuberosum*, variedades Ágata e Galette di Bologna, adquiridas em um mercado da região Liguria na cidade de Gênova, Itália, foram homogeneizados em um liquidificador comum (modelo Ri2009, Philips) com 100mL de uma solução de tampão fosfato (K₂HPO₄ 0.1M AnalytiCals Carlo Erba, Milão, Itália) + KH₂PO₄ 0,1M (Merck, Darmstdt, Germany) pH 7,0 a 5°C e 2,5g de agente protetor (Polivinilpirrolidona, P0930- Sigma Aldrich), por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, o homogeneizado passou por um processo de filtração, sendo utilizadas 3 camadas de gaze dispostas em um funil. O filtrado foi então armazenado em um congelador a aproximadamente -5°C para posterior utilização no processo de oxidação de fenol de soluções aquosas, sendo que 0,1 mL foram retirados para posterior análise de atividade enzimática. Além da batata, outras fontes de tirosinase também foram estudadas neste trabalho: maçã, banana e kiwi aplicando a mesma metodologia de extração (BATISTUTI; LOURENÇO, 1985).

Foi preparado também um extrato enzimático de *Agaricus bisporus*, vulgarmente conhecido como cogumelo. O mesmo foi adquirido em um mercado popular situado na Região Ligúria da cidade de Gênova na Itália e utilizado como fonte de tirosinase após no máximo 3 dias de sua compra e conservado sob refrigeração a 4°C até sua utilização.

A metodologia aplicada para a extração da tirosinase a partir do cogumelo seguiu o procedimento desenvolvido por Kameda (2003). Os corpos de frutificação de *A. bisporus* (60g) foram triturados em acetona gelada (220mL) e o preparado foi filtrado em papel filtro (Whatman n°1) a vácuo. Em seguida, a pasta resultante foi congelada por 24 horas a 0°C e posteriormente, esta ressuspensa em água destilada (25mL) e resfriada por 24 horas a 4°C, originando assim o extrato enzimático, cujo volume final era de 40mL. Alíquotas de 0,1mL destes extratos foram utilizadas para a determinação da atividade tirosinásica de acordo com o método citado por Worthington (2006) descrito a seguir.

7.2 Quantificação da Atividade da Tirosinase

A atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima responsável por uma variação da absorbância igual a 0,001 unidades de absorbância/min nas condições padrão de

 λ =280nm, *T*=25°C, numa solução líquida saturada de oxigênio. Para determinar a atividade enzimática nos extratos de batata das variedades Ágata e Galetto di Bologna, maçã, banana e kiwi foi aplicada a metodologia de Worthington (2006). No entanto, observou-se uma ausência de atividade nestes extratos aplicando-se então outras metodologias citadas por Campos et al. (1996) e Batistuti e Lourenço (1985) visando a confirmação deste resultado. Uma vez confirmado, utilizou-se outra fonte da enzima, isto é, o cogumelo *A. bisporus*. A atividade foi determinada a partir da metodologia de Worthington (2006) e foi observada uma alta atividade tirosinásica que possibilitou realizar todos os experimentos posteriores deste trabalho. Seguem-se os fundamentos destas três metodologias.

A medição da atividade enzimática por Worthington (2006) foi realizada através da oxigenação de uma "solução A" (1ml de tampão fosfato pH 6,5 a 0,5M + 1ml de solução de L-tirosina 0,001M + 0,9ml de água deionizada) por 5 minutos. Depois foi adicionada a "solução A" e 100 μ l do extrato enzimático e realizada a leitura espectrofotométrica em cubetas de quartzo a 280nm. A "solução A" pura foi utilizada para ser o "branco" desse ensaio de atividade. A leitura foi realizada a cada 30 segundos durante 12 minutos.

Para determinar a atividade enzimática da tirosinase de acordo com a metodologia descrita por Campos et al. (1996) foi utilizado um béquer de 10 mL contendo 5,5mL de solução tampão fosfato de sódio (0,2M), pH 6,0 e 1,5mL de solução 1mM de L-tirosina (Sigma), ao qual foi adicionado 1 mL do extrato enzimático, previamente diluído em uma proporção de 1:10 no mesmo tampão. A variação de absorbância foi observada ao comprimento de onda de 280 nm em intervalos de 30 segundos durante 15 min. Para o cálculo da atividade foi utilizada a fórmula:

$$A = \frac{(Abs_2 - Abs_1) \times 1000 \times D_E}{(t_2 - t_1) \times V_E} \quad (U/mL)$$

onde: Abs_1 e Abs_2 são as absorbâncias nos tempos t_1 e t_2 em sua fase de aumento linear, V_E é o volume da solução enzimática (mL) e D_E é a diluição da solução enzimática.

De acordo com Batistuti e Lourenço (1985) a atividade enzimática foi analisada adicionando: 0,4mL de substrato (pirogalol, ácido clorogênico, ácido caféico, catecol ou dL-Dopa), 0,9mL de sulfato de amônio (33%), 1,5mL de tampão fosfato 0,5M pH 7,5, não sendo necessária a oxigenação. A temperatura foi ajustada a 25°C e a leitura das amostras foi realizada a λ =400nm utilizando cubetas de quartzo. Depois adicionaram-se 0,2 mL de extrato enzimático filtrado em membrana (Millipore) de 0,45µm. A leituras de absorbância foram efetuadas a cada 30 segundos até se obter o valor constante (cerca de 10 a 15min).

7.3 Preparo de soluções e reagentes para oxidação enzimática

Os reagentes utilizados para a determinação espectrofotométrica do fenol foram preparados utilizando tampão borato pH9,0. Para a solução A foram dissolvidos 6,18 g de ácido bórico P.A. em solução de cloreto de potássio 0,1M e completando a 1000mL com a mesma solução. Para a solução B foram diluídos 2,0g de hidróxido de sódio P.A. em água destilada, completando o volume a 500 ml. O preparo do tampão pH9,0 para 1000mL da solução A, foi adicionado 420mL da solução B e verificado o pH. A solução de 4-aminoantipirina 0,1% (mínimo = 0,09%, máximo = 0,1%) foi preparada dissolvendo 0,1g de 4-aminoantipirina em tampão borato pH 9,0 e completando o volume a 100 ml e aquela de ferricianeto de potássio 5% dissolvendo 5g de ferricianeto de potássio P.A. em 100mL de água destilada.

7.4 Ensaios de oxidação enzimática com tirosinase extraída de Agaricus bisporus

7.4.1 Procedimento de Análise

Nos experimentos de oxidação, soluções de fenol (AnalytiCals, Carlo Erba, Milão, Itália) em tampão fosfato 0,05M foram misturadas com extratos de *A. bisporus* contendo a tirosinase sob diversas condições de temperatura (10, 20, 30, 40, 50, e 60°C), pH (4,6; 5,6; 6,6; 7,6 e 8,6), concentração de enzima (98, 197 e 328U) e concentração de fenol (50, 100, 200, 400 e 600mg/L). Estas soluções foram transferidas para o reator de 1L e colocadas em banho termostatizado para estudar o efeito da temperatura na atividade enzimática. Então foram agitadas com agitador mecânico, borbulhando O₂ com vazão de 2,3L/h (P = 700 mmHg), e o pH e a temperatura foram medidos on-line. Adotou-se a injeção de O₂ a baixa vazão com o intuito de se garantir a saturação do meio e, consequentemente, a atividade enzimática.

Após a estabilização da temperatura e em tempos pré-determinados (0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100minutos) com auxílio de um cronômetro (Oregon OG TR 118 Timer E) foram retirados 3mL da amostra e foi realizada uma filtração em membrana (Millipore) de 0,2μm. Então, foi coletada uma alíquota de 1200μL e devolvido o excesso ao vaso. As amostras foram transferidas para Ependorfs contendo 240μ L de H₃PO₄ 8,5% (m/v), usado para inibir a atividade enzimática, e posteriormente analisadas em HPLC visando determinar a concentração de fenol residual. A mesma metodologia foi aplicada quando se utilizou a enzima tirosinase comercial (T 3824 Sigma-Aldrich).

7.5. Oxidação enzimática com tirosinase comercial

7.5.1 Procedimento de Análise

Para a realização dos ensaios preparavam-se soluções aquosas de fenol de 50mL a 100mL em solução tampão de fosfato 0,05M. A solução tampão fosfato foi preparada através da adição de 38,2 mL de solução aquosa de K₂HPO₄ 0,1M com 61,9mL de solução aquosa de KH₂PO₄ 0,1M, diluindo-se a solução resultante a 200 mL com água destilada (cshprotocols, 2007), resultando uma solução com pH = 6,5.

Depois de atingida a temperatura do ensaio foram adicionados 3mL de solução de tirosinase, correspondendo a 90U de atividade enzimática, diluída com solução tampão de fosfato 0,05M e, então, iniciava-se o ensaio disparando-se o cronômetro.

A solução de tirosinase foi preparada a partir dos 4,7mg de tirosinase liofilizada, adicionando-se ao próprio frasco contendo a enzima 4,016g de solução tampão de fosfato 0,05M. As amostragens, de 100 μ L, eram feitas nos instantes 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 minutos. As amostras foram coletadas em frascos âmbar com tampa e batoque contendo 600 μ L de água destilada e 60 μ L de H₃PO₄ 5% (m/v) e mantidas a 2°C até o instante da determinação espectrofotométrica da concentração de fenol.

7.6 Preparo de soluções e reagentes para a remoção de polifenóis presentes nos efluentes residuais da produção de azeite

O trabalho de Aliakbarian, Casazza e Perego (2011), relatado no manuscrito intitulado "Kinetic and Isotherm Modeling of Phenolic Compounds Adsorption from Olive Mill Wastewater onto Activated Carbon", ainda não publicado, foi utilizado como referência para o adsorbimento de polifenóis por carbono ativado (AC). No entanto, a literatura apresenta outros tratamentos que poderão serem estudados de forma aprofundada para verificar a melhor metodologia a ser aplicada.

Os reagentes utilizados para verificar o adsorbimento dos polifenóis presentes no resíduo da extração de azeite, ou conhecido como "água de vegetação" foram: Folin-

Ciocalteu e padrão de ácido caféico (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). O ácido caféico foi usado para fazer a curva de calibração. As soluções padrão foram preparadas para estoque, envoltas em papel alumínio e armazenadas as -20° C. O carbono ativado comercial (Sigma) foi usado no experimento de adsorção sem qualquer pré-tratamento. O pó de carvão ativado utilizado neste trabalho tinha a densidade de 0,4 g/cm³ com distribuição de tamanho de partículas através peneiras com malha de 100Mesh \geq 90%.

7.6.1. Características e tratamento dos efluentes residuais da produção de azeite

Águas residuais obtidas a partir de três fases da extração de óleo decantado foram fornecidas por uma fábrica de azeite a partir da azeitona do cultivar Taggiasca (WW) em Imperia, região Ligúria (Itália). As quantidades adequadas de amostras foram colocadas em uma centrífuga (modeloPK 131ALC, Alberta, Canadá) a 7500rpm por 10min para separar os sólidos em suspensão. A concentração de polifenóis totais (TP) foi medida usando o ensaio Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959). Resumidamente, foram misturados 4,8mL de água destilada, 0,2mL da amostra e 0,5mL de reagente de Folin-Ciocalteu e em seguida foram adicionados 1mL da solução de carbonato de sódio 20% e 3,5mL de água destilada para atingir o volume final de 10mL. Após a adição de cada item, os tubos foram agitados para obter uma melhor mistura das soluções e permaneceram em temperatura ambiente e em condições de escuridão por 1h. Alíquotas de amostra foram utilizadas para a determinação da concentração de fenóis totais utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Perkin Elmer, Wellesley, MA, EUA) ao comprimento de onda de 725nm. Os TPs foram expressos como ácido caféico em microgramas de ácido caféico equivalente por mililitro de água residuária (MgCAE/mL). A resposta do método foi descrita usando a seguinte equação linear dentro da faixa de 100 -1000 μ g_{CAE}/mL com R² 0,9962:

$$ABS_{725} = 0,002TP - 0,004$$

7.6.2 Experimentos de adsorção de polifenóis contidos na "água de vegetação" por carbono ativado

Com a finalidade de simplificar o processo de adsorção, os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 100mL contendo 50±0,2mL de resíduo centrifugado e 4g de adsorvente (carvão ativado). O frasco foi exposto a 25°C usando um banho termostático

modelo SWB25 (Enco, Spinea, Veneza, Itália), e a solução agitada à rotação de 200rpm por um período de 30 minutos a fim de estudar o efeito da adsorção dos polifenóis por carbono ativado. O adsorvente foi separado das amostras usando uma membrana filtrante de 0,2µm (Millipore). A concentração residual dos polifenóis totais foi determinada usando o método Folin-Ciocalteu como descrito acima. Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata com porcentagem de erro de até 6%.

7.6.3 Experimentos de adsorção de fenol por queratina, quitina e quitosana

Foram realizados ensaios de adsorção de fenol utilizando queratina extraída de pena de galinha e de quitosana e quitina (Sigma-Aldrich Co., Milão, Itália). Em um Erlenmeyer de 250mL foram colocados 10g/L dos adsorventes e 50mg/L de fenol a diversas temperaturas (20 a 50°C) durante 24 horas e pH 8,0. Para os ensaios realizados com quitina foi avaliada também a influência do pH (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0) e da concentração inicial de fenol (10, 30, 50, 70 e 90mg/L). A extração da queratina foi realizada através da metodologia citada por Barone et al. (2006) a partir da adição de 0,05g de sulfito de sódio (com a finalidade de romper as ligações dissulfeto e manter essas pontes reduzidas até a sua dissolução no meio reacional) e 0,75mL de água destilada para cada g de pena de galinha. Foi utilizado apenas o haste, a parte mais rígida contida no centro das penas por apresentar maior quantidade de queratina, que foi cortado em pedaços bem pequenos. Após esta etapa, os pedaços foram transferidos em um becker de 80mL a 120°C e pressão ambiente, mexendo constantemente a mistura com um bastão de vidro para obter um aquecimento homogêneo durante 2 horas ou até obter uma massa branca e seca. Depois foram secos por 12 horas a temperatura ambiente e posteriormente levados a estufa a 70°C por 12 horas para a maceração da massa.

8. Planejamentos dos Ensaios

Foram realizados ensaios de oxidação de fenol com a enzima extraída de cogumelo, *Agaricus bisporus*. Para este ensaio as variáveis estudadas foram: pH, T°C, concentração de enzima e concentração inicial de fenol aquoso. No entanto, foi realizado também ensaios com a enzima tirosinase comercial para a degradação dos polifenóis contidos na "água de vegetação". Com base nas informações da literatura optou-se por estudar o processo a uma temperatura de 45°C e pH 6,6 para a enzima comercial (SUN et al., 1992; SUN; PAYNE, 1996; IKEHATA; NICELL, 2000; YAMADA et al., 2005). A concentração de tirosinase foi de 90U/mL e a de fenol aquoso de 100mg/L (YAMADA et al., 2005; ENSUNCHO et al., 2005) para as análises iniciais.

A influência da temperatura na adsorção de fenol foi avaliada também utilizando quitina, queratina extraída de penas de galinha e quitosana. Para quitina, outras variáveis também foram estudadas sendo a concentração inicial de fenol e o pH.

8.1 Procedimento Experimental

Foi introduzido no vaso agitado 1 L de solução aquosa de fenol à concentração de 100 mg/L. Então foi ligado o agitador a uma velocidade de rotação de 400rpm, o banho termostatizado foi ligado e a sua temperatura ajustada para 45°C quando utilizou tirosinase comercial e 30°C para tirosinase extraída de *A. bisporus*. Depois de acionada a bomba para a injeção de ar atmosférico, o ensaio teve início com a colocação da enzima comercial e foi acionado o cronômetro. Em tempos pré-determinados entre 1 e 60 minutos, foram retiradas amostras de cerca de 5mL de fase aquosa em frasco âmbar para análise cromatográfica do fenol residual.

9. Cinética e modelagem termodinâmica

Para investigar a influência da temperatura na cinética da atividade da tirosinase, supõe-se que a enzima esteja sujeita a um equilíbrio reversível de desdobramento responsável pela transformação de sua forma mais estável de alta atividade para uma forma inativa. De acordo com a conhecida "abordagem termodinâmica", que já foi aplicada com sucesso a outros sistemas enzimáticos (ROELS, 1983), o aumento da atividade enzimática inicial com a temperatura (T) é contrastado por esse "desdobramento reversível", isto é, pelo equilíbrio acima mencionado que leva a uma diminuição da atividade.

Aplicando a equação de Gibbs para esse equilíbrio, pode-se obter:

$$K_i = B^{\cdot} e^{-\Delta H^{\circ}_i / RT}$$

onde K_i é a constante de equilíbrio, ΔH°_i (kJ/mol) a variação de entalpia padrão, *B* um fator pré-exponencial e *R* a constante ideal dos gases.

Combinando esta equação com a equação de Michaelis-Menten adaptada para o desdobramento da enzima, obtém-se (ROELS, 1983):

$$k = \frac{A \cdot e^{-E^*/RT}}{1 + B \cdot e^{-\Delta H \circ_i/RT}}$$

onde k é constante específica de velocidade, E^* (kJ/mol) a energia de ativação e A o fator pré-exponencial de Arrhenius.

Em temperaturas menores que a temperatura ótima ($T < T_{opt}$), é razoável supor que o equilíbrio de desdobramento da enzima seja orientado fortemente para a esquerda e que, portanto, seu desobramento seja insignificante. Nessas condições o termo *B* e^{- Δ H°i/*RT*} no denominador da Equação torna-se desprezível em relação a unidade e, consequentemente, a dependência da constante específica de velocidade da temperatura acaba sendo descrita pela bem conhecida equação de Arrhenius (ROELS, 1983).

Sendo a atividade enzimática (A_c) diretamente proporcional a constante específica de velocidade, a energia de ativação do desdobramento da enzima pode ser estimada, de acordo com a equação de Arrhenius, a partir da inclinação da reta a ser obtida traçando $\ln A_c$ versus 1/T exclusivamente sob as condições de $T < T_{opt}$. Como descrito por Ariahu e Ogunsua (2000), a entalpia de ativação (ΔH^* , kJ/mol) pode ser estimada a partir da inclinação de outra reta a ser obtida traçando ln (A_c/T) versus 1/T, de acordo com a equação de Eyring (1935), derivada a partir da teoria do estado de transição.

Pelo contrário, em altas temperaturas ($T > T_{opt}$), a contribuição da forma inativada da enzima torna-se predominante, a unidade torna-se desprezível no denominador e a equação se simplifica para:

$$k = \frac{A}{B} e^{(\Delta H^{\circ}_{i} - E^{*})/RT}$$

Traçando de acordo com Arrhenius os valores de $\ln A_c$ coletados em $T > T_{opt}$, obtém-se uma nova linha reta de cuja inclinação pode se estimar ΔH°_{i} .

Quanto ao efeito em longo prazo da temperatura na estabilidade da enzima, é razoável supor que ela esteja simultaneamente sujeita a desnaturação irreversível responsável pela perda de atividade progressiva. Isto pode ser descrito como uma reação de primeira ordem dependente da temperatura, sendo k_d (h⁻¹) a constante específica de velocidade. Assim, a taxa de perda de atividade enzimática, devido a sua desnaturação, pode ser modelada pela equação:

$$\ln \psi = -k_d t$$

onde ψ é a razão da atividade residual enzimática no tempo t (A_t) e no início (t = 0) (A_o).

De forma similar ao visto anteriormente, a dependência de k_d da temperatura pode ser modelada através das equações de Arrhenius e de Eyring, tornando assim possível a estimativa das correspondentes energia de ativação (E^*_d) e entalpia de ativação (ΔH_d^*).

9.1. Isotermas de biosorção

O mais comum modelo isotérmico foi aplicado para descrever o equilibrio de adsorção. O modelo empírico de Freundlich (1906), descrevendo a adsorção reversível e em multicamadas em superficies heterogêneas, é o mais comumente utilizado para descrever a adsorção nos sorventes sólidos em equilíbrio:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$$

onde C_e é a concentração do sorbato na fase líquida em equilíbrio (mg L⁻¹), K_F a constante de Freundlich (mg^{1-1/n} L^{1/n} g⁻¹) e *n* (adimensional) um parâmetro empírico relacionado com a intensidade da biosorção, variando de acordo com a heterogeneidade do material.

Os dados de equilíbrio foram trabalhados pelo modelo de Langmuir (1918), o qual é baseado no pressuposto de adsorçao da monocamada na superfície com um número finito de siítios homogêneos e idênticos que podem serem descritos pela equação:

$$q_e = \frac{q_0 K_L C_e}{1 + K_L C_e}$$

onde $q_0 \,(\text{mg g}^{-1})$ é a capacidade de sorção da monocamada do biosorvente e $K_L \,(\text{L mg}^{-1})$ a constant de Langmuir.

Um modelo adicional frequentemente utilizado para descrever as isotermas de equilíbrio foi poposto por Dubinin e Radushkevich (1947), o qual é baseado na teoria do potencial Polanyi de adsorção e na teoria de enchimento Dubinin:

 $q_e = q_s \exp(-\beta \varepsilon^2)$

onde q_s é a capacidade maxima de adsorção em equilíbrio (mg g⁻¹), β o coeficiente da atividade (mol² kJ⁻²) e ε to potencial Polanyi (kJ mol⁻¹).

O ultimo parâmetro é definido como:

$$\varepsilon = RT \ln \left[1 + \frac{1}{c_{\varepsilon}}\right]$$

onde R (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹) é a constante de gás ideal e T (K) a temperature absoluta.

O coeficiente da atividade é relacionado com o significado de energia livre de sorção (*E*, kJ mol⁻¹), quando é transferido para a superfície do sólido na solução, pela equação:

$$E = \frac{1}{\sqrt{2\beta}}$$

E fornece informações sobre a natureza química ou física do mecanismo de adsorção.

Os dados do equilíbrio foram finalmente montados pelo modelo isotérmico de Temkin (1945), o qual assume que o calor de adsorção de todas as moléculas na camada diminui linearmente com superficies cobertas de adsorventes devido as interações sorbato/sorbente e que a adsorção é caracterizada pela distribuição uniforme de energias ligação, até o máximo de energia de ligação. Assim, o modelo é descrito pela equação:

$$q_{\rm e} = \frac{RT}{b_T} \ln \left(K_T C_{\rm e} \right)$$

onde K_T é a constante de ligação de equilíbrio correspondendo a máxima energia de ligação (L mg⁻¹) e b_T (g kJ mg⁻¹ mol⁻¹) a constante isoterma Temkin relacionada com o calor de adsorção.

9.2. Cinética da biosorção

Para investigar a cinética da biosorção de fenol nos biomateriais selecionados, tres modelos acessíveis na literature foram utilizados neste estudo, nomeando os modelos pseudoprimeira ordem, pseudo-segunda ordem e difusão intrapartícula, com o objetivo de selecionar aquele capaz de descrever a melhor descrição cinética do processo.

A forma linear do pseudo-primeira ordem expressa por Lagergren (1898) pode ser escrita como:

$$\ln\left(q_e - q_t\right) = \ln q_e - k_1 t$$

onde q_t é a quantidade de fenol adsorvido (mg g⁻¹) em tempo t (h), e k_1 a constant da razão da pseudo-primeira ordem (h⁻¹).

O modelo pseudo-segunda ordem proposto por Ho e McKay (1999) pode ser representado na sua forma linearizada pela equação:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$$

onde k_2 é a constante da razão da pseudo-segunda ordem (g mg⁻¹ h⁻¹). Os valores de k_2 e q_t para ambos os biosorventes foram obtidos a partir do declive e intercepção de t/q_t versus t.

Para elucidar a natureza da etapa da taxa de adsorção, a maioria dos pesquisadores tem usado o modelo de difusão intrapartícula (WEBER, MORRIS 1963), o qual é descrito pela equação:

$$q_t = k_{id} t^{1/2} + C$$

onde C é a interceptação (mg g⁻¹) e k_{id} (mg g⁻¹ h^{-0.5}) a taxa constant da difusão intrapartícula.

9.3. Termodinâmica da biossorção

A biossorção do fenol para os biossorventes selecionados foi também realizada em cinco diferentes temperaturas na razão de 15-50°C não somente para investigar a influência deste parâmetro na biossorção, mas também para avliar a sua espontaneidade eventual através de uma avaliação dos principais parâmetros termodinâmicos, especificamente as mudanças no padrão da energia livre de Gibbs (ΔG°), entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°).

Para este propósito, a energia livre da sorção pode estar relacionada com a constant de equilíbrio da sorção, $K_D = q_e/C_e$, também conhecida como coeficiente de distribuição, pela equação de Van't Hoff:

 $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_D$

ou pelas mudanças da entalpia e entropia de adsorção em temperatura constante pela equação de Gibbs:

 $\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ}$

10. Concentração de Fenol Aquoso Residual

O método de análise da concentração de fenol foi o colorimétrico utilizado por Yang e Humphrey (1975) e também aquele disponibilizado pela ANVISA (<u>www.anvisa.gov/legis/portarias/176_96.htm</u>). A curva de calibração típica para obtenção dos dados de concentração de fenol residual, $C_{Fenol,Res}$, a partir dos valores de absorvância (ABS) está mostrada na Figura 13, juntamente com a reta de regressão linear, que apresentou um coeficiente de correlação muito elevado ($R^2 = 0,99997$).



Figura 13– Curva de calibração para determinação da concentração de fenol ($T = 25^{\circ}$ C).

Com base na curva de calibração a concentração de fenol aquoso residual foi dada pela expressão:

 $C_{Fenol,Res} = ((ABS + 0,005)/0,0087)$ onde: $C_{Fenol,Res} =$ concentração de fenol aquoso residual (mg/L) ABS = absorbância da amostra

11. Análise da Mutagenicidade dos Efluentes Tratados e não Tratados

Para a análise da mutagenicidade dos efluentes tratados e não tratados, foram utilizados 48 bulbos de cebola saudáveis, de tamanhos uniformes (3,0-3,5cm de diâmetro) e massas equivalentes ($15g \pm 400mg$) obtidos de uma população comercial. As camadas mais externas da casca dos bulbos foram removidas cuidadosamente antes do tratamento. Os bulbos de *Allium cepa* foram adaptados em béqueres de vidro com suas extremidades inferiores imersas em água mineral, mantidas em estufa tipo BOD, (Buker/Nova Técnica, model NT 708) com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}C$) e fotoperíodo de 6/18 de escuro/luz. Após 48 horas novas raízes atingiram um comprimento médio esperado de 2,0cm as quais foram utilizadas no teste.

Trinta e seis bulbos foram expostos as amostras de efluentes tratados e não-tratados coletados, sendo 18 bulbos para cada amostra (P1, P2 e P3). Os 12 bulbos restantes foram destinados aos Grupos Controle Negativo e Controle Positivo, preparados utilizando-se água mineral e 10mg/L de metilmetansulfonato (MMS). As exposições realizaram-se por um período fixo de 48h para todos os tratamentos, exceto para o grupo Controle Positivo, o qual foi de 6h, procedimento este utilizado para evitar o surgimento de resultado falso negativo, de acordo com metodologia descrita por Mayer et al., (1991).

Todas as raízes passaram por um período de recuperação de 48 horas em solução de Hoagland (Solução de cultivo), preparada a partir de 7,7µl de MMS em 1000ml de água Milli-Q trocada a cada 24 horas, após as exposições. Após o período de recuperação, 0,5cm do ápice de 6 raízes foram separados e imediatamente fixados em solução de ácido acético e etanol (1:3) por 24h. As raízes foram lavadas em água destilada para remoção do fixador. Para a montagem das lâminas, utilizou-se a solução de ácido acético 45% (9 partes) e HCl 1N (1 parte) a 60°C num período de 3 a 8 minutos, promovendo a hidrólise e maceração das raízes. Estas foram então dispostas sobre uma lâmina e o primeiro milímetro do ápice das raízes removido, de forma que os 2mm correspondentes a região meristemática ou geração de células F1 foram isolados para análise em microscópio óptico (Zeiss KF-2 Binocular

Microscope 6/86, Freiburg, Alemanha). Os cortes foram corados com solução de Carmim 2% em ácido acético 45% (Acetocarmim), para identificação dos núcleos, micronúcleos e aberrações. Ao todo, foram contadas 1000 células para cada 5 lâminas analisadas por tratamento em um aumento de 400x determinando a frequência de micronúcleos. Para as análises estatísticas foi realizado o teste de Kruskall Wallis (p<0,05) para identificar uma resposta positiva entre os grupos experimentais e controle de acordo com análise proposta por Ribeiro et al. (2003).

12. RESULTADOS E DISCUSSÃO

12.1. Atividade da tirosinase

A atividade das enzimas é a função direta da sua estrutura terciária ou quaternária. Todo tratamento que modifique a conformação da enzima (aquecimento ou alteração do pH), alterando a fixação do substrato pela enzima ou ainda modificando a estrutura do sítio ativo, altera também as propriedades catalíticas e portanto, o seu funcionamento. Há uma faixa de temperatura, às vezes estreita, dentro da qual atividade enzimática é máxima. Essa variação da atividade enzimática em função da temperatura é determinada em condições de operação bem definidas (SCRIBAN, 1985).

São dois os efeitos antagônicos resultantes da variação da atividade enzimática: o aumento da agitação das moléculas com a elevação da temperatura, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima e a desnaturação da proteína enzimática. Esta desnaturação modifica a estrutura terciária e a quaternária da proteína e faz com que a enzima passe de uma conformação ativa a uma conformação desprovida de atividade. De fato, na desnaturação das enzimas pelo calor, o que conta, sobretudo, é o binômio tempo/temperatura, ou seja, a duração e a intensidade do tratamento térmico (SANTOS PRIMO, 2006).

A velocidade da reação enzimática permite a medida de sua atividade, determinada em condições experimentais estabelecidas. Geralmente, a atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (Internacional Union of Biochemistry) considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um µmol de substrato por minuto em condições de ensaio que são definidas (LIMA et al., 2001).

De acordo com a Tabela 3 e a Figura 14 pode-se observar que não houve um trecho linear representado pela curva de atividade, mostrando que a metodologia de Worthington (2006), a qual utiliza a L-tirosina como substrato, não foi sensível o suficiente para analisar a atividade da tirosinase extraída de vegetal, ou devido a baixa concentração de atividade preente. A Tabela 3 e a Figura 14 apresentam o andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de batata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006).

Tabela 3. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de batata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006). Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
Branco	0,1019	
0,5	0,1019	0
1	0,1345	0,0652
1,5	0,1577	0,0464
2	0,1757	0,036
2,5	0,1913	0,0312
3	0,2044	0,0262
3,5	0,2157	0,0226
4	0,2259	0,0204
4,5	0,2339	0,016
5	0,2413	0,0148
5,5	0,2491	0,6156
6	0,2539	0,0696
6,5	0,2600	0,0122
7	0,2651	0,0102
7,5	0,2700	0,0098
8	0,2749	0,0098
8,5	0,2792	0,0086
9	0,2837	0,009
9,5	0,2874	0,0074
10	0,2906	0,0064
10,5	0,2939	0,0066
11	0,2978	0,0078
11,5	0,3005	0,0054
12	0,3039	0,0068



Figura 14. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de batata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006). Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Ikehata e Nicell (2000) aplicaram a mesma metodologia de Worthington (2006) para analisar a atividade da tirosinase extraída do cogumelo e observaram um máximo da atividade catalítica em pH 7,0 e certa instabilidade em ambiente ácido ($2,0 \le pH \le 3,0$) e a temperatura elevada (> 50°C). A não reatividade da L-tirosina verificada em nossos experimentos sugere a princípio que a concentração da tirosinase no extrato de batata foi tão baixa a ponto de não permitir a detecção da mesma por este método, o que foi visto também no trabalho realizado por Batistuti e Lourenço (1985).

As Tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e as Figuras 15, 16, 17, 18, 19 e 20 apresentam o andamento da absorbância em função do tempo a cada 30 segundos durante 12 minutos usando a metodologia alternativa relatada por Batistuti e Lourenço (1985), empregando catecol como substrato em concentrações de 1 a 6mM e à temperatura fixa de 26°C. No entanto, nenhuma das análises realizadas mostrou a linearidade necessária para medir a atividade enzimática, o que pode ser explicado mais uma vez pela baixa concentração da enzima tirosinase neste vegetal.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempc
0	0	
0,5	0,192	0,384
1	0,231	0,078
1,5	0,262	0,062
2	0,288	0,052
2,5	0,308	0,04
3	0,329	0,042
3,5	0,344	0,03
4	0,359	0.03
4,5	0,372	0,026
5	0,384	0,024
5,5	0,396	0,024
6	0,406	0,02
6,5	0,415	0,018
7	0,424	0,018
7,5	0,431	0,014
8	0,438	0,014
8,5	0,445	0,014
9	0,450	0,01
9,5	0,457	0,014
10	0,461	0,008
10,5	0,467	0,012
11	0,471	0,008
11,5	0,475	0,008
12	0,479	0,078

Tabela 4. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de batata não diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 1mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.



Figura 15. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de batata não diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 1mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.

De acordo com Batistuti e Lourenço (1985), para a determinação de polifenoloxidase (PPO) é necessária a medição espectrofotométrica da o-quinona formada na reação entre o oxigênio molecular e o catecol 2mM como substrato, em meio constituído por sulfato de amônio 33% e tampão fosfato 0,5 M, pH 7,5 e temperatura de 25°C. O substrato mais indicado é o 4-metil catecol, porém, também são indicados: pirogalol, ácido clorogênico, ácido caféico, catecol e dL-Dopa na literatura. A Tabela 5 e a Figura 16 apresentam os resultados da absorbância em função do tempo na amostra de controle, após filtração com a utilização do substrato catecol 2mM para a avaliação da atividade enzimática do extrato de batata. De acordo com a figura não foi observada a linearidade, portanto o metodologia citada por Bastituti e Lourenço (1985) não mostrou ser sensível à concentração da enzima no extrato de batata.
t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
0	0	
0,5	0,192	0,384
1	0,273	0,162
1,5	0,301	0,056
2	0,336	0,07
2,5	0,366	0,06
3	0,391	0,05
3,5	0,411	0,04
4	0,429	0,036
4,5	0,445	0,032
5	0,458	0,026
5,5	0,471	0,026
6	0,481	0,02
6,5	0,489	0,016
7	0,496	0,014
7,5	0,502	0,012
8	0,506	0,008
8,5	0,509	0,006
9	0,511	0,004
9,5	0,513	0,004
10	0,514	0,002
10,5	0,516	0,004
11	0,517	0,002
11,5	0,517	0
12	0,517	0

Tabela 5. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase na amostra de controle, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.



Figura 16. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase na amostra de controle, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm

De acordo com as Tabelas 6 e 7 e as Figuras 17 a 18 observa-se que quanto mais diluída foi a amostra, maior a atividade apresentada. Com efeito, a amostra do extrato de batata diluída 20 vezes apresentou o dobro da atividade daquela diluída apenas 5 vezes. Estes resultados demostram que o método de Batistuti e Lourenço (1985) é eficiente para avaliar a atividade da enzima desde que o extrato enzimático da batata seja suficientemente diluído.

Tabela 6. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata 5 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
0	0	
0,5	0,043	0,086
1	0,064	0,042
1,5	0,081	0,034
2	0,097	0,032
2,5	0,109	0,024
3	0,121	0,024
3,5	0,132	0,022
4	0,141	0,018
4,5	0,151	0,02
5	0,159	0,016
5,5	0,167	0,016
6	0,175	0,016
6,5	0,181	0,012
7	0,187	0,012
7,5	0,193	0,012
8	0,199	0,012
8,5	0,204	0,01
9	0,209	0,01
9,5	0,215	0,012
10	0,219	0,008
10,5	0,223	0,008
11	0,228	0,01
11,5	0,232	0,008
12	0,236	0,008



Figura 17. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata 5 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm..

t (min)	absorbância	∆abs/tempo
0	0	
0,5	0,016	0,032
1	0,022	0,012
1,5	0,028	0,012
2	0,035	0,014
2,5	0,04	0,01
3	0,045	0,01
3,5	0,05	0,01
4	0,054	0,008
4,5	0,058	0,008
5	0,062	0,008
5,5	0,066	0,008
6	0,069	0,006
6,5	0,073	0,008
7	0,076	0,006
7,5	0,08	0,008
8	0,082	0,004
8,5	0,085	0,006
9	0,087	0,004
9,5	0,09	0,006
10	0,092	0,004
10,5	0,094	0,004
11	0,096	0,004
11,5	0,098	0,004
12	0.1	0.004

Tabela 7. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata 20 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.



Figura 18. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata 5 vezes diluído e filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.

Nas Tabelas 8 e 9 e as Figuras 19 a 20 estão apresentados os resultados insatisfatórios obtidos com extratos de batata à temperatura de 26°C, filtrados, e usando duas diferentes concentrações de catecol, nomeadamente 2 e 6mM. Mais uma vez, a metodologia de Batistuti e Lourenço (1985) mostrou-se inadequada para a concentração de tirosinase presente no extrato da batata utilizada neste trabalho por não apresentar linearidade.

Vários autores (ABUKHARAMA e WOOLHOUSE, 1966; ALBERGHINA, 1964; ANDERSON, 1968; GREEN, 1940; KHAN, 1977; KNAPP, 1965; LARDY, 1949) trabalharam usando 4 metil catecol, catecol e L-dopa na concentração de 2 mM, e catecol e o L-dopa deram os melhores resultados como substratos sendo menos ativos. A própria atividade observada por Batistuti e Lourenço (1985) usando catecol 2mM como substrato demonstrou ser linear, e a concentração de proteína até 300U/mL influenciou a velocidade de reação dentro de um intervalo de 3 minutos. No entanto, neste trabalho a atividade medida com catecol não apresentou o mesmo desempenho, provavelmente devido ao fator de competição, isto é, a enzima apresentava uma concentração incompatível com a do substrato, o que não permitiu obter um andamento linear da absorbância em função do tempo, impossibilitando assim a avaliação da atividade enzimática representada pelas Figuras 16,17, 18, 19 e Tabelas 5, 6, 7 e 8.

t (min)	Absor	bância	∆abs/tempo
	0,5	0,197	0,1080
	1	0,243	0,0920
	1,5	0,281	0,0760
	2	0,309	0,0560
	2,5	0,331	0,0440
	3	0,351	0,0400
	3,5	0,367	0,0320
	4	0,382	0,0300
	4,5	0,396	0,0280
	5	0,408	0,0240
	5,5	0,418	0,0200
	6	0,429	0,0220
	6,5	0,439	0,0200
	7	0,446	0,0140
	7,5	0,455	0,0180
	8	0,462	0,0140
	8,5	0,469	0,0140
	9	0,474	0,0100
(9,5	0,479	0,0100
	10	0,484	0,0100
1	10,5	0,489	0,0100
	11	0,493	0,0080
	11,5	0,499	0,0120
1	12	0 502	0.0060

Tabela 8. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata não diluído, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.



Figura 19. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata não diluído, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,284	
1	0,37	0,1720
1,5	0,417	0,0940
2	0,499	0,1640
2,5	0,476	0,0460
3	0,491	0,0300
3,5	0,506	0,0300
4	0,52	0,0280
4,5	0,532	0,0240
5	0,542	0,0200
5,5	0,558	0,0320
6	0,558	0,0000
6,5	0,564	0,0120
7	0,569	0,0100
7,5	0,575	0,0120
8	0,578	0,0060
8,5	0,582	0,0080
9	0,585	0,0060
9,5	0,587	0,0040
10	0,588	0,0020
10,5	0,59	0,0040
11	0,59	0,0000
11,5	0,592	0,0040
12	0.592	0.0000

Tabela 9. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata não diluído e não filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 6mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.



Figura 20. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata não diluído e não filtrado, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.

Para ter a certeza da hipótese formulada para justificar os escassos resultados obtidos com este método, a tirosinase comercial foi diluída até 50U e submetida à metodologia de Batistuti e Lourenço (1985) à temperatura fixa de 25°C, empregando catecol 2mM como substrato e fazendo as leituras a cada 30 segundos durante 32 minutos (Tabela10 e Figura 21). O método exibiu o mesmo comportamento apresentado em todos os outros ensaios representados nas tabelas e figuras acima, exibindo sempre curvas e não retas, o que impossibilitou a medição da atividade tirosinásica.

t (min)	Absorbância	Δ (abs/min)
0	0	
0,5	0,105	0,2100
1	0,164	0,1180
1,5	0,201	0,0740
2	0,227	0,0520
2,5	0,246	0,0380
3	0,264	0,0360
3,5	0,277	0,0260
4	0,29	0,0260
4,5	0,301	0,0220
5	0,311	0,0200
5,5	0,321	0,0200
6	0,328	0,0140
6,5	0,335	0,0140
7	0,342	0,0140
7,5	0,348	0,0120
8	0,354	0,0120
8,5	0,359	0,0100
9	0,364	0,0100
9,5	0,368	0,0080
10	0,371	0,0060
10,5	0,376	0,0100
11	0,379	0,0060
11,5	0,382	0,0060
12	0,385	0,0060
13	0,39	0,0040
13,5	0,393	0,0060
14	0,395	0,0040
14,5	0,398	0,0060
15	0,4	0,0040
15,5	0,402	0,0040
16	0,405	0,0060
16,5	0,406	0,0020
17	0,407	0,0020
17,5	0,409	0,0040
18	0,411	0,0040
18,5	0,412	0,0020
19	0,413	0,0020
19,5	0,415	0,0040
20	0,417	0,0040
32	0,437	0,0017

Tabela 10. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase comercial (50 U), medida durante 32 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM em meio contendo sulfato de amônio 33%; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.



Figura 21. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase comercial (50U), medida durante 32 minutos, de acordo com o método descrito por Batistuti e Lourenço (1985). Substrato: catecol 2mM em meio contendo sulfato de amônio 33%; temperatura: 26°C; comprimento de onda: 400nm.

12.2 Ensaios realizados na Universidade de Gênova

Foram avaliados diversos vegetais para analisar a presença da enzima tirosinase e posteriormente utilizá-la em ensaios de oxidação de fenol variando diversos parâmetros, tais como: pH, temperatura, concentração de enzima inicial e concentração de fenol. As batatas das variedades Ágata e Galette di Bologna, as frutas maçã, banana e kiwi, e o cogumelo *Agaricus bisporus* foram adquiridos de um mercado da cidade de Gênova na Região Ligúria, Itália.

Os vegetais foram analisados espectrofotometricamente em termos de absorbância a um comprimento de onda de 280nm aplicando a metodologia de Worthington (2006) e também de Campos et al. (1996), na presença e na ausência de oxigênio, e variando a concentração das amostras diluindo 1:10, 1:5 ou não diluindo com tampão fosfato de sódio 0,2M. De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 11 a 21 e Figuras 22 a 32 podese observar que a atividade da tirosinase presente nestes extratos vegetais foi praticamente nula, o que não permitiu a utilização destes para a continuidade do trabalho. No entanto, analisando o extrato de cogumelo pode-se observar a presença significativa da atividade enzimática da tirosinase (Tabela 22 e Figura 33), o qual foi utilizado nos ensaios posteriores de oxidação e adsorção do fenol.

t (Min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,623	
1	0,629	0,012
1,5	0,627	-0,004
2	0,629	0,004
2,5	0,63	0,002
3	0,63	0
3,5	0,633	0,006
4	0,63	-0,006
4,5	0,633	0,006
5	0,634	0,002
5,5	0,63	-0,008
6	0,629	-0,002
6,5	0,622	-0,014
7	0,629	0,014
7,5	0,632	0,006
8	0,626	-0,012
8,5	0,625	-0,002
9	0,631	0,012
9,5	0,634	0,006
10	0,627	-0,014
10,5	0,631	0,008
11	0,633	0,004
11,5	0,635	0,004
12	0,629	-0,012

Tabela11. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

-



Figura 22. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Minutos	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,818	
1	0,813	-0,010
1,5	0,817	0,008
2	0,804	-0,026
2,5	0,816	0,024
3	0,814	-0,004
3,5	0,811	-0,006
4	0,805	-0,012
4,5	0,802	-0,006
5	0,796	-0,012
5,5	0,795	-0,002
6	0,797	0,004
6,5	0,803	0,012
7	0,8	-0,006
7,5	0,785	-0,030
8	0,798	0,026
8,5	0,789	-0,018
9	0,792	0,006
9,5	0,792	0,000
10	0,795	0,006
10,5	0,79	-0,010
11	0,791	0,002
11,5	0,796	0,010
12	0,794	-0,004

Tabela12. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm



Figura 23. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t(min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,25	
1	0,261	0,022
1,5	0,26	-0,002
2	0,262	0,004
2,5	0,255	-0,014
3	0,252	-0,006
3,5	0,253	0,002
4	0,254	0,002
4,5	0,254	0
5	0,254	0
5,5	0,255	0,002
6	0,255	0
6,5	0,255	0
7	0,255	0
7,5	0,255	0
8	0,255	0
8,5	0,255	0
9	0,254	-0,002
9,5	0,254	0
10	0,255	0,002
10,5	0,255	0
11	0,253	-0,004
11,5	0,253	0
12	0.255	0.004

Tabela 13. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.



Figura 24. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Ágata, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t(min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,204	
1	0,204	0
1,5	0,204	0
2	0,205	0,002
2,5	0,204	-0,002
3	0,204	0
3,5	0,205	0,002
4	0,204	-0,002
4,5	0,202	-0,004
5	0,202	0
5,5	0,202	0
6	0,202	0
6,5	0,201	-0,002
7	0,201	0
7,5	0,201	0
8	0,201	0
8,5	0,2	-0,002
9	0,2	0
9,5	0,2	0
10	0,2	0
10,5	0,198	-0,004
11	0,198	0
11,5	0,198	0
12	0 198	0

Tabela 14. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm



Figura 25. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Tabela 15. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:5 em tampão fosfato; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t(min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,388	
1	0,381	-0,014
1,5	0,379	-0,004
2	0,378	-0,002
2,5	0,381	0.006
3	0,38	0
3,5	0,38	-0,002
4	0,381	0,002
4,5	0,382	0,002
5	0,381	-0,002
5,5	0,379	-0,004
6	0,374	-0,01
6,5	0,37	-0,008
7	0,369	-0,002
7,5	0,37	0,002
8	0,369	-0,002
8,5	0,364	-0,01
9	0,361	-0,006
9,5	0,359	-0,004
10	0,359	0
10,5	0,355	-0,008
11	0,355	0
11,5	0,352	-0,006
12	0,353	0,002



Figura 26. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:5 em tampão fosfato; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Tabela 16. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob

oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: nenhuma; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,746	· · ·
1	0,742	-0,008
1,5	0,739	-0,006
2	0,74	0,002
2,5	0,74	0
3	0,74	0
3,5	0,743	0,006
4	0,743	0
4,5	0,741	-0,004
5	0,742	0,002
5,5	0,744	0,004
6	0,742	-0,004
6,5	0,74	-0,004
7	0,738	-0,004
7,5	0,738	0
8	0,739	0,002
8,5	0,737	-0,004
9	0,735	-0,004
9,5	0,737	0,004
10	0,737	0
10,5	0,737	0
11	0,737	0
11,5	0,736	-0,002
12	0,738	0,004



Figura 27. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Tabela 17. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:10 em tampão fosfato; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,164	
1	0,164	0
1,5	0,166	0,004
2	0,165	-0,002
2,5	0,164	-0,002
3	0,165	0,002
3,5	0,164	-0,002
4	0,164	0
4,5	0,164	0
5	0,165	0,002
5,5	0,163	-0,004
6	0,164	0,002
6,5	0,163	-0,002
7	0,163	0
7,5	0,163	0
8	0,163	0
8,5	0,164	0,002
9	0,164	0
9,5	0,162	-0,004
10	0,162	0
10,5	0,163	0,002
11	0,164	0,002
11,5	0,164	0
12	0,164	0



Figura 28. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase em extrato de batata variedade Galette di Bologna, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Campos et al. (1996) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; diluição: 1:10 em tampão fosfato; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Tabela 18. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade
da tirosinase no extrato de kiwi, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo
com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM;
temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,191	
1	0,192	0,002
1,5	0,191	-0,002
2	0,192	0,002
2,5	0,192	0
3	0,191	-0,002
3,5	0,19	-0,002
4	0,19	0
4,5	0,191	0,002
5	0,191	0
5,5	0,191	0
6	0,190	-0,002
6,5	0,19	0
7	0,191	0,002
7,5	0,191	0
8	0,192	0,002
8,5	0,191	-0,00
9	0,191	0
9,5	0,191	0
10	0,19	-0,002
10,5	0,191	0,002
11	0,19	-0,002
11,5	0,191	0,002
12	0,19	-0,002



Figura 29. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de kiwi, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo
0.5	0.246	
0,5	0,240	0
1	0,246	0
1,5	0,246	0
2	0,246	0
2,5	0,247	0,002
3	0,247	0
3,5	0,244	-0,006
4	0,245	0,002
4,5	0,245	0
5	0,246	0,002
5,5	0,247	0,002
6	0,248	0,002
6,5	0,247	-0,002
7	0,248	0,002
7,5	0,248	0
8	0,249	0,002
8,5	0,248	-0,002
9	0,248	0
9,5	0,249	0,002
10	0,229	-0,04
10,5	0,227	-0,004
11	0,226	-0,002
11,5	0,226	0
12	0,227	0,002

Tabela 19. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.



Figura 30. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t(min)	Absorbância	∆abs/tempo
0,5	0,233	
1	0,234	0,002
1,5	0,234	0
2	0,234	0
2,5	0,22	-0,028
3	0,22	0
3,5	0,219	-0,002
4	0,219	0
4,5	0,219	0
5	0,22	0,002
5,5	0,22	0
6	0,22	0
6,5	0,219	-0,002
7	0,22	0,002
7,5	0,219	-0,002
8	0,219	0
8,5	0,22	0,002
9	0,221	0,002
9,5	0,22	-0,002
10	0,22	0
10,5	0,219	-0,002
11	0,219	0
11,5	0,22	0,002
12	0,22	0

Tabela 20. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividadeda tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordocom o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM;temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.



Figura 31. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de banana, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Tabela 21. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade datirosinase no extrato de maçã, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com ométodo descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura:25°C; comprimento de onda: 280nm.

t (min)	Absorbância	Aabs/tempo
0.5	0.97	p
1	0.99	0.04
1.5	0.95	-0.08
2	0,92	-0,06
2,5	0,93	0,02
3	0,91	-0,04
3,5	0,94	0,06
4	0,93	-0,02
4,5	0,9	-0,06
5	0,91	0,02
5,5	0,88	-0,06
6	0,88	0
6,5	0,88	0
7	0,88	0
7,5	0,86	-0,04
8	0,86	0
8,5	0,86	0
9	0,86	0
9,5	0,82	-0,08
10	0,83	0,02
10,5	0,83	0
11	0,83	0
11,5	0,81	-0,04
12	0,82	0,02



Figura 32. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de maçã, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sob oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Analisando-se o andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de *Agaricus bisporus* na Tabela 22 e na Figura 33, podese observar que se tratou de uma atividade tirosinasica significativa; no entanto, outros trabalhos apresentaram valores maiores que os encontrados neste trabalho, na ordem de 2400U/mL⁻¹ (PAPA et al., 1994; BEVILAQUA et al., 2000; KAMEDA, 2003; SILVA, 2008). Contudo, a atividade de 884U/mL representou ser ótima para realizar este trabalho, já que a variação da mesma foi de 98 a 328U/mL para os ensaios de oxidação enzimática do fenol e 295 a 884U/mL para os ensaios de oxidação dos polifenóis contidos na água de vegetação.

Bevilaqua (2000) mostrou que a variação presente nos extratos enzimáticos ocorreu quando se comparou cogumelos envelhecidos com o lote controle, onde se observou um aumento de 48% na atividade enzimática do primeiro em relação ao segundo. Ingebrigtsen et al. (1989) relataram que um fator que influencia a atividade da tirosinase no extrato é portanto o grau de maturação dos cogumelos. Sendo assim, provavelmente, apesar da aparência similar, os cogumelos deveriam estar em graus de maturação distintos.

Vale a pena ressaltar que o uso de uma enzima naturalmente presente num tecido vegetal torna a aplicação menos onerosa do que quando se trabalha com a enzima comercial, daí a importância de se continuar o trabalho aplicando esta enzima obtida experimentalmente em forma de extrato.

Tabela 22. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da
tirosinase no extrato de Agaricus bisporus, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo
com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM;
temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

t (min)	Absorbância	∆abs/tempo	
0.5	0.749		
1	0,774	0.05	
1.5	0,809	0.07	
2	0,849	0,08	
2,5	0,88	0,062	
3	0,906	0,052	
3,5	0,934	0,056	
4	0,956	0,044	
4,5	0,98	0,048	
5	1,001	0,042	
5,5	1,038	0,074	
6	1,061	0,046	
6,5	1,08	0,038	
7	1,1	0,04	
7,5	1,116	0,032	
8	1,132	0,032	
8,5	1,148	0,032	
9	1,163	0,03	
9,5	1,175	0,024	
10	1,19	0,03	
11,5	1,201	0,022	
11	1,213	0,024	
11,5	1,225	0,024	
12	1,235	0,02	



Figura 33. Andamento da absorbância em função do tempo para a determinação da atividade da tirosinase no extrato de *Agaricus bisporus*, medida a cada 30 segundos durante 12 minutos, de acordo com o método descrito por Worthington (2006) sem oxigenação. Substrato: L-tirosina 1mM; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 280nm.

Analisando os valores da atividade tirosinásica residual nos testes de estabilidade térmica da enzima após 8 horas de exposição a diferentes temperaturas (Tabela 23 e Figura 34), pode-se observar que o aumento da temperatura levou a uma dimuição significativa da atividade da tirosinase, como esperado pelo fato de que condições de altas temperaturas, assim como pH extremos ou altas concentrações salinas, desestabilizam a estrutura da proteína ocasionando sua desnaturação.

Estabilidade da tirosinase extraída de Agaricus bisporus						
		Atividade (U/mL)				
Tempo (h) 20°C 30°C 40°C 50°C						
0	707,4	707,4	707,4	707,4		
1	612,425	599,325	140,825	78,6		
2	612,425	468,325	121,175	60,26		
3	612,425	468,325	52,4	58,6225		
5	589,5	389,725	42,575	10,05425		
8	412,65	163,75	7,89275	6,2225		

 Tabela 23. Resultados da atividade residual da tirosinase contida em extratos de A. bisporus expostos a diversas temperaturas durante 8 horas.



Figura 34. Atividade residual da tirosinase contida em extratos de *A. bisporus* expostos a diversas temperaturas durante 8 horas.

13. Oxidação Enzimática do Fenol por Meio de Extratos de Agaricus bisporus

Foram realizados ensaios para a determinação da influência do pH, da temperatura (*T*), da concentração inicial de fenol ($C_{Fenol,in}$) e da concentração inicial de enzima (atividade inicial) (C_T) na concentração final residual de fenol em fase aquosas ($C_{Fenol,Res}$) após o processo de oxidação de fenol em reator de 1L utilizando a enzima tirosinase contida no extrato do cogumelo *A. bisporus*. A concentração do tampão foi mantida constante em 0,05 M, enquanto os valores das variáveis estudadas foram: pH=4,6; 5,6; 6,6; 7,6 e 8,6; *T*=10, 20, 30, 40, 50 e 60 °C; $C_{Fenol,in}$ =50, 100, 200, 400 e 600 mg/L e C_T = 98, 197 e 328U/mL. A Tabela 24 e a Figura 35 mostram a influência do pH na cinética da oxidação enzimática do fenol realizada utilizando 100mg/L de fenol, 328U/mL de extrato de cogumelo, 30°C e pH de 4,6 a 8,6.

Tabela 24 – Influência do pH na oxidação do fenol desfrutando da atividade tirosinasica do extrato de *A. bisporus (T*=30°C, *C*_T=328U/mL, *C*_{Fenol.in}=100mg/L).

$C_{Fenol.Res}$ (mg/L)					
t (min)	<i>pH</i> =4,6	<i>pH</i> =5,6	<i>pH</i> =6,6	<i>pH</i> =7,6	<i>pH</i> =8,6
0	100	100	100	100	100
10	75,0	78,8	63,0	75,3	75,3
20	57,8	48,6	46,0	55,6	51,3
30	36,9	39,1	33,2	35,0	40,3
40	32,6	23,1	24,7	25,8	38,3
60	22,1	13,2	12,8	12,3	32,9
80	16,3	6,9	7,3	7,6	29,3
100	15,9	5,5	3,5	4,1	29,3



Figura 35 – Influência do pH na oxidação do fenol desfrutando da atividade tirosinásica do extrato de *A. bisporus (T*=30°C, *C*_T=328U/mL, *C*_{Fenol.in}=100mg/L).

Observa-se que $C_{Fenol,Res}$ caiu de 15,9 para 3,5mg/L com o aumento do pH de 4,6 para 6,6 e aumentou para 29,3mg/L com o aumento do pH até 8,6. A cinética também foi afetada significativamente em pH=4,6, 7,6 e 8,6, enquanto a diminuição foi pequena para valores de pH de 5,6 e 6,6. Observa-se também que o tempo necessário para se atingir as concentrações finais foi de 100 minutos exceto a pH 8,6 em que foi menor (80 minutos).

Ikehata e Nicell (2000) observaram que a tirosinase catalizou a transformação do fenol efetivamente na faixa de pH entre 5 e 8 e que a menor transformação do mesmo ocorreu no intervalo entre 4 e 9. Os autores Kameda, Langone e Coelho (2006) também obtiveram o mesmo resultado demonstrando que o melhor pH para a oxidação enzimática do fenol está na faixa de pH entre 6 e 7. O estudo de Gayathri, Seetharam e Bradley (2003) sobre o efeito da degradação do fenol usando tirosinase imobilizada mostrou a atividade ótima para a enzima em pH 6,5.

Romanovskaya, Shesterenko e Sevast'yanov (2007) avaliaram a bioconversão do fenol (50 a 100mg/L) utilizando tirosinase (30-60U/cm³) extraída do cogumelo por 3 h no intervalo de pH de 3 a 10 e observaram que ela foi máxima (>90,2%) na faixa de pH de 5,5-7,0. O mesmo comportamento foi observado neste trabalho onde os melhores resultados foram obtidos a pH de 5,5; 6,6 e 7,6, obtendo-se 94,5; 96,5 e 95,9% respectivamente. No entanto, o pH ótimo da enzima é dependente altamente da fonte da mesma.

A Tabela 25 e a Figura 36 mostram os resultados da influência da concentração inicial de fenol na cinética da oxidação enzimática. Embora a concentração de fenol residual tivesse crescido de 4,0 para 404mg/L ao se aumentar $C_{Fenol,in}$ de 50 para 600mg/L, o valor máximo de remoção porcentual foi de 92% para $C_{Fenol,in} = 50$ mg/L. Observa-se ainda que o tempo necessário para se atingirem as concentrações finais variou de 40 min a 1h40.

<i>t</i> (min)			$C_{Fenol,Res}$ (mg/L)		
0	50	100	200	400	600
10	28,2	62,6	130,9	285,1	463,0
20	16,7	49,8	109,6	255,2	432,3
30	12,7	40,2	105,7	255,1	425,6
40	9,10	28,9	98,8	252,5	409,6
60	6,8	19,9	99,4	250,8	409,1
80	5,0	16,3	91,9	248,3	405,4
100	4,0	12,8	89,0	247,5	404,4

Tabela 25 – Influência da concentração inicial de fenol ($C_{Fenol.in}$) na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (T=30°C, C_T =100U/mL, pH =6,6).



Figura 36 – Influência da concentração inicial de fenol ($C_{Fenol.in}$) na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (T=30°C, C_T =100U/mL, pH =6,6).

Bevilaqua et al. (2002) avaliaram a eficiência do tratamento de degradação do fenol utilizando a enzima tirosinase extraída de *A. bisporus* juntamente com a quitosana. Este tratamento foi considerado eficiente obtendo 99% de degradação do fenol a 200mg/L nos primeiros 60 dias de operação. No entanto, quando houve um aumento de 200 a 400mg/L de fenol em um curto tempo pôde-se observar uma redução significativa na eficiência do tratamento para apenas 32%. Este comportamento também foi observado neste trabalho, pois

quando aumentou a concentração de fenol de 50 para 600mg/L houve uma diminuição expressiva na % de degradação do fenol, que caiu de 92 para 33%.

Os resultados listados na Tabela 26 e na Figura 37 mostram que $C_{Fenol.Res}$ final diminuiu de 43 para 8,5mg/L aumentando-se C_T de 98 para 328U/mL, enquanto a velocidade de oxidação cresceu. Observa-se ainda que o tempo necessário para se atingirem as concentrações finais foi de 80, 100 e 100 min para C_T =98, 197 e 328U/mL, respectivamente. A Tabela 26 e a Figura 37 mostram os resultados da influência de C_T (U/mL) na oxidação do fenol com a tirosinase contida no extrato de cogumelo (T=30°C, pH =6,6, $C_{Fenol.in}$ =100mg/L).

Tabela 26 – Influência da concentração da enzima (C_T) (U/mL) na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (T=30°C, pH =6,6, $C_{Fenol.in}$ =100mg/L).

	$C_{Fenol,Res}$ (U/mL)						
	t (min)	$C_T = 98 \text{ U/mL}$	$C_T = 197 \text{ U/mL}$	<i>C_T</i> =328 U/mL			
_	0	100	100	100			
	10	72,8	71,0	62,6			
	20	63,3	55,9	49,8			
	30	56,9	48,9	40,2			
	40	49,8	43,1	28,9			
	60	44,0	33,9	18,1			
	80	42,8	31,1	12,7			
	100	42,9	30,4	8,5			



Figura 37 - Influência da concentração da enzima (C_T) (U/mL) na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (T=30°C, pH =6,6, $C_{Fenol.in}$ =100mg/L).

Romanovskaya, Shesterenko e Sevast'yanov (2007) avaliaram a degradação de fenol (50 e 100mg/L) ao aumentar da atividade da tirosinase em extratos de *A. bisporus*. A maior capacidade de degradação foi atinginda após 1 hora de incubação utilizando 50U/cm³. No entanto, quando foram utilizadas concentrações menores da enzima (30 e 10U/cm³) o tempo necessário para completar a oxidação cresceu expressivamente (3 e 24 horas, respectivamente). Kameda, Langone e Coelho (2006) avaliaram quatro diferentes concentrações de tirosinase em extratos de *A. bisporus* para remoção do fenol (50, 100, 200 e 400U/mL) e observaram que as duas maiores (200 e 400U/mL) garantiram 90% de redução do fenol 100mg/L após 3 horas de tratamento. Com isso pôde-se observar que após esse tempo de reação ocorreu uma inativação da enzima que foi explicada pela formação do produto da reação.

De acordo com os resultados ilustrados na Tabela 27 e na Figura 38, a $C_{Fenol,Res}$ final parece ter sido influenciada pela temperatura na faixa estudada, embora ainda não tivesse chegado, aparentemente, ao equilíbrio. A eficiência da oxidação enzimática aumentou com o incremento da temperatura de 10 para 30°C, apresentou valor máximo de 91,5% a 30°C e caiu para 33% a 60°C, o que pode ter ocorrido como consequência do fato de que, aumentando a temperatura, ocorre a desnaturação da proteína fazendo com que haja uma diminuição da sua atividade até o ponto de deixa de funcionar.

		C	Fenol, Res (mg/I	L)		
<i>t</i> (min)	<i>T</i> =10°C	<i>T</i> =20°C	<i>T</i> =30°C	<i>T</i> =40°C	<i>T</i> =50°C	<i>T</i> =60°C
0	100	100	100	100	100	100
10	77,5	97,2	62,6	68,8	73,2	75,9
20	70,3	88,64	49,9	53,9	61,7	73,7
30	69,7	74,1	40,2	47,2	52,9	73,5
40	69,0	66,1	28,9	41,7	51,3	71,1
60	57,8	44,7	18,1	32,8	48,9	71,0
80	51,3	32,6	12,7	30,1	46,5	70,8
100	47,5	22,8	8,5	29,4	43,1	67,0

Tabela 27 - Influência da temperatura na oxidação do fenol mediante extrato de A. *bisporus* (pH =6,6; C_T =328U/mL, $C_{Fenol.in}$ =100mg/L).



Figura 38 - Influência da temperatura na oxidação do fenol mediante extrato de *A. bisporus* (pH =6,6, C_T =328U/mL, $C_{Fenol.in}$ =100mg/L).

Romanovskaya, Shesterenko e Sevast'yanov (2007) observaram as maiores eficiências (90,4-100%) de biodegradaçao do fenol (50 a 100mg/L) utilizando a tirosinase (30-60U/cm³) extraída do cogumelo por 3h no intervalo de temperatura entre 30 e 50°C.

14. Remoção dos polifenóis contidos na água de vegetação mediante extratos de *Agaricus bisporus*

Para realizar os ensaios de remação dos polifenóis contidos na água de vegetação, presentes inicialmente à concentração de 7,7g/L, foram aplicados o método enzimático explorando a atividade tirosinásica do extrato de *A. bisporus*, a adsorção com carbono ativado, ambos sem pré-tratamento, a adsorção com carbono ativado juntamente com o método enzimático, visando aumentar a porcentagem de redução final dos polifenóis. O tratamento mais eficaz foi observado quando aplicou-se o tratamento por carbono ativado durante 30 minutos, que conseguiu remover 84% dos polifenóis presentes. No entanto, não deve ser esquecido que este trabalho visa o tratamento de fenóis e polifenóis utilizando matéria-prima de baixo custo como adsorvente. A Tabela 28 e Figura 39 mostram os resultados do tratamento enzimático dos polifenóis contidos na "água de vegetação" utilizando duas concentrações da tirosinase, nomeadamente 295U e 884U/mL, contida no extrato de *A. bisporus*, a pH 6,6 e 30°C durante 100 minutos. Não foram observadas diferenças significativas na concentração residual de polifenóis, a qual caiu para 4,4g/L e 4,3g/L, respectivamente, correspondendo a 44% de remoção final para ambas concentrações avaliadas.

Tabela 28. Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" mediantedois extratos de *A. bisporus* com atividade tirosinásica de 295 e 884U/mL, respectivamente.

Oxidação enzimática dos polifenóis				
	295U/mL		884U	/mL
Tempo(min)	Abs	g/L	Abs	g/L
0	0,770	7,744	0,770	7,744
10	0,612	6,162	0,588	5,920
20	0,534	5,382	0,491	4,952
30	0,528	5,323	0,478	4,819
40	0,504	5,078	0,471	4,753
60	0,502	5,064	0,459	4,628
80	0,447	4,508	0,439	4,433
100	0,435	4,393	0,424	4,276



Figura 39 - Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" mediante dois extratos de *A. bisporus* com atividade tirosinásica de 295 e 884U/mL, respectivamente.

De acordo com Gupta e Suhas (2009) o carvão ativado é considerado um excelente adsorvente utilizado para a remoção de vários tipos de corantes, no entanto seu uso é considerado limitado, não por sua eficiência mas por razão do seu alto custo. Após seu uso em tratamento de águas residuais, o carvão ativado torna-se inativo e não é capaz de continuar a adsorção dos corantes. Quando isso ocorre tem de ser regenerado para uma possível utilização (TAIWO; ADESINA, 2005; ZHOU e LEI, 2005). É importante ressaltar que o carbono regenerado pode apresentar uma menor capacidade de adsorção em comparação ao carbono virgem, além de que realizar a regeneração para reutilizá-lo aumenta o seu custo.

A atenção dos pesquisadores tem sido direcionada cada vez mais para os métodos de preparação de adsorventes a baixo custo, considerados como uma alternativa ao carvão ativado no controle da poluição ambiental por meio do processo de adsorção (ALI; GUPTA, 2007). O tratamento pelo método de carbono ativado iniciou-se sem pré-tratamento a partir de uma concentração de 7,7g/L de polifenóis contidos na água de vegetação. Após 30 minutos este valor diminuiu para 1,4g/L, mostrando uma eficiência de remoção de polifenóis excelente (84%).

Aliakbarian, Casazza e Perego (2011), avaliaram o comportamento do carbono ativado comercial como adsorvente dos compostos fenólicos gerados pela produção de azeite em função de sua quantidade como adsorvente e da temperatura (10, 25 e 40°C) e observaram que a 8gAC/100mL este tratamento atingiu a máxima eficiência de remoção sendo 95,2%, 94,0% e 95,9%, respectivamente. No entanto, apesar de a adsorção por carbono ativado ser

considerada um excelente tratamento, sua utilização ainda é limitada devido o seu alto custo.

Após a degradação dos polifenóis contidos na "água de vegetação" por carbono ativado foi realizada também a oxidação enzimática destes utilizando a tirosinase comercial (90U/mL) e a tirosinase do extrato de *A. bisporus* (295U/mL) visando obter uma menor concentração residual destes compostos. No entanto, de acordo com a Tabela 29 e Figura 40 pode-se observar que a enzima comercial e a contida no extrato não apresentaram diferenças significativas obtendo 19,4 e 17% respectivamente de degradação dos polifenóis.

Oxidação enzimática dos polifenóis Tirosinase 90U/mL(comercial) Tirosinase 295U/mL (cogumelo)				
0	0,285	1,444	0,285	1,444
10	0,280	1,419	0,267	1,357
20	0,265	1,343	0,254	1,290
30	0,248	1,258	0,247	1,257
40	0,245	1,245	0,247	1,255
60	0,239	1,216	0,246	1,250
80	0,239	1,215	0,245	1,245
100	0,229	1,164	0,235	1,196

Tabela 29. Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" durante 100 minutos utilizando tirosinase comercial (90U/mL) e o extrato de *A. bisporus* (295U/mL).



Figura 40. Oxidação enzimática dos polifenóis contidos na "água de vegetação" durante 100 minutos utilizando tirosinase comercial (90U/mL) e o extrato de *A. bisporus* (295U/mL).

O tratamento realizado por carbono ativado durante 30 minutos providenciou uma remoção de 84% dos polifenóis contidos na agua de vegetação, cuja concentração diminuiu de 7,7 para 1,4g/L. A partir deste resultado foi realizada também a oxidação enzimática durante 100 minutos, a qual reduziu este valor para 1,2g/L, correspondendo a ulterior remoção de 14% tanto com a enzima comercial (90U/mL) quanto com o extrato do cogumelo (295U/mL).

15. Adsorção do fenol com queratina, quitina e quitosana

Os fenóis, entre os vários poluentes existentes, são os principais poluentes tóxicos encontrados em diversos efluentes industriais, principalmente nas indústrias de petróleo e por esse motivo são considerados poluentes prioritários. Nos diferentes processos biológicos os fenóis podem exercer efeitos negativos além de causarem gosto e odor desagradáveis na água potável. O fenol mesmo em baixa concentração na natureza disperta uma grande preocupação ambiental devido seus efeitos nocivos ao ambiente (ZHENG et al., 2004). Nos últimos anos, os biomateriais têm sido cada vez mais usados como alternativa promissora, sendo largamente disponíveis como matérias primas de baixo custo, ou mesmo como resíduos industriais, tais como casca de arroz e penas de galinha (BANAT; AL-ASHEH, 2000). Em particular, a quitosana (LI et al., 2009; NADAVALA, 2009) e a queratina (BANAT; AL-ASHEH, 2000) mostraram-se eficazes como biosorventes do fenol ou de seus derivados. Na Tabela 30 e Figura 41 pode se observar a influência da temperatura na capacidade da queratina (10g/L) extraída de pena de galinha de adsorver fenol 50mg/L a pH 8,0 durante 24 horas.

Adsorção de fenol com queratina extraída de pena de galinha					
$C_{Fenol,Res}$ (mg/L)					
Tempo (h)	20°C	30°C	40°C	50°C	
0	50	50	50	50	
2	16,322	13,333	7,126	10,345	
4	15,862	4,253	3,103	7,356	
6	13,678	2,299	2,989	4,598	
12	9,540	1,724	2,529	3,678	
24	7,586	0,690	1,724	3,448	

Tabela 30. Influência da temperatura na remoção de fenol usando queratina extraída de penade galinha como adsorvente durante 24 horas a pH 8,0.



Figura 41. Influência da temperatura na remoção de fenol usando queratina extraída de pena de galinha como adsorvente durante 24 horas a pH 8,0.

Banat e Al-Asheh (2000) utilizaram resíduos baseados em queratina como penas para a remoção do fenol contido em água, destacando os efeitos do pH, temperatura e concentração de sorvato e sorvente na cinética e nas isotermas de adsorção. A capacidade de sorção máxima de 5mg/g foi obtida após 25h a 20°C, pH=8,0, concentração inicial de fenol (C_0) = 50 mg/L utilizando uma dosagem de biosorvente de 10g/L. Dursun e Kalayci (2005) realizaram um estudo de adsorção de fenol em quitina sob diversas temperaturas (10, 25 e 40°C) e obtiveram 21,4; 23,7 e 29,1%, respectivamente, de degradação do fenol, observando a maior capacidade de adsorção do fenol usando 21,5mg/g de adsorvente para $C_0 = 300$ mg/L a 40°C. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 30 e na Figura 42, pode-se inferir que de todas as temperaturas estudadas, 30°C garantiu a maior eficiência de remoção do fenol (99%) após 24 horas.

A Tabela 31 e Figura 42 mostram o comportamento da quitosana (10g/L) utilizada como adsorvente do fenol (50mg/L) sob diversas temperaturas (20, 30, 40 e 50°C) a pH 8.0 durante 24 horas. Mais uma vez, a melhor temperatura foi de 30°C, à qual, porém, se obteve apenas 66% de remoção do fenol após o mesmo tempo de adsorção.

Adsorção de fenol com quitosana					
C _{Fenol,Res} (mg/L)					
Tempo (h)	20°C	30°C	40°C	50°C	
0	50	50	50	50	
2	37,8	34,0	30,23	28,16	
4	27,1	24,6	26,55	25,29	
6	22,2	18,7	25,75	24,25	
12	21,5	17,9	25,63	23,45	
24	19,0	17,1	20,50	21,61	

Tabela 31. Influência da temperatura na adsorção do fenol usando quitosana como adsorvente durante24 horas a pH 8,0.


Figura 42. Influência da temperatura na adsorção do fenol usando quitosana como adsorvente durante 24 horas a pH 8,0.

Yan (2006) estudou a adsorção do fenol utilizando quitosana com adsorvente sob diversos valores de pH (2-7), concentração de fenol ($C_0 = 20$ -80mg/L) e temperatura (T = 25-45°C), e apontou como condições ótimas pH 4,0 e 25°C. A eficiência de remoção (85%) a capacidade de biosorção ($q_e = 25$ mg/g) máximas foram obtida a $C_0 = 20$ e 80mg/L, respectivamente. Li et al. (2009) observaram um aumento na capacidade de biosorção da quitosana quando este biomaterial foi ativado utilizando aldeído salicílico, β -ciclodextrina, e um polímero de ligações cruzadas β -ciclodextrina, e que a adsorção dos fenóis a partir de soluções aquosas é dependente da temperatura. De acordo com Garcia-Araya et al. (2003), quanto maior a temperatura (30 a 60°C) menor a capacidade de adsorção do fenol. Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, no qual nas temperaturas de 30, 40 e 50°C foram observadas eficiências de remoção de fenol de 66, 59 e 56%, respectivamente, confirmando que, como bem se sabe, temperaturas mais baixas são mais favorãveis para a adsorção.

A Tabela 32 e Figura 43 mostram a influência da temperatura na adsorção de fenol utilizando quitina como adsorvente durante 24 horas a pH 2,0. Às temperaturas avaliadas (20, 25, 30, 40 e 50°C) a eficiência de adsorção foi de 59, 76, 66, 56 e 50%, respectivamente.

Adsorção de fenol com quitina					
C _{Fenol,Res} (mg/L)					
Tempo (h)	20°C	25°C	30°C	40°C	50°C
0	50,00	50,00	50	50	50
2	31,84	31,95	26,90	26,09	33,10
4	22,41	18,16	23,33	24,71	30,11
6	20,80	13,33	18,85	22,53	27,13
12	20,69	12,64	18,05	22,30	25,98
24	20,69	11,84	17,24	21,95	24,83

Tabela 32. Influência da temperatura na adsorção de fenol usando quitina como adsorvente
durante 24 horas a pH 2,0.



Figura 43. Influência da temperatura na adsorção de fenol usando quitina como adsorvente durante 24 horas a pH2,0.

De acordo com Bhatnagar e Mika Sillanpaa (2009), um aumento da temperatura também pode influenciar ocasionando a formação de grandes poros ou o aparecimento de novos sítios ativos na superfície do adsorvente devido a uma ruptura das ligações responsáveis pela adsorção. A maior capacidade de adsorção do fenol (21,5mg/g) foi observada para uma concentração de fenol inicial de 300mg/L a 40°C.

Adsorção de fenol com quitina					
$C_{Fenol,Res}$ (mg/L)					
Tempo (h)	<i>pH</i> 2,0	<i>pH</i> 4,0	<i>pH</i> 6,0	<i>pH</i> 8,0	<i>pH</i> 10
0	50	50	50	50	50
2	37,5	41,72	45,17	26,90	33,33
4	22,4	30,46	32,07	23,33	23,68
6	16,8	25,17	29,08	18,85	20,69
12	15,7	24,02	27,13	18,05	19,89
24	14,6	22,76	25,06	17,24	18,97

Tabela 33. Influência do pH na adsorção do fenol usando quitina como adsorvente durante 24horas.



Figura 44. Influência do pH na adsorção de fenol usando quitina como adsorvente durante 24 horas.

O uso da quitina como adsorvente do fenol já foi estudado em função do pH inicial, da concentração de fenol inicial e da temperatura por Dursun e Kalayci (2005). O grau de ionização do fenol e as propriedades superficiais da quitina foram afetados primeiramente pelo pH. Os grupos funcionais da quitina são protonados em valores baixos de pH e resultam em uma forte atração para íons negativamente carregados no meio de adsorção. Estes íons são diretamente atraídos devido à força eletrostática pelos grupos amino protonados da quitina. A

adsorção do fenol diminuiu quando ocorreu um aumento do pH o qual ocasiona uma modificação na superfície da quitina (BHATNAGAR; MIKA SILLANPAA, 2009). Este mesmo comportamento foi observado no nosso trabalho onde o pH ótimo foi 2,0 apresentando 71% de degradação do fenol.

A Tabela 34 e a Figura 45 mostram a influência da concentração do fenol (10, 30, 40, 50, 70 e 90mg/L) a pH 2,0 e 30°C na adsorção com quitina ao longo de 24 horas. Pode ser observado que quanto maior a concentração de fenol menor foi a degração do mesmo.

Adsorção de fenol com quitina					
$C_{Fenol,Res}$ (mg/L)					
Tempo (h)	10mg/L	30mg/L	50mg/L	70 mg/L	90mg/L
0	10,041	29,113	49,63	69,94	90,14
2	9,938	13,649	20,66	45,20	51,07
4	9,320	11,175	17,46	44,68	44,68
6	3,443	9,629	13,44	39,42	42,72
12	1,278	8,186	12,72	32,72	41,79
24	0,041	6,742	12,00	26,02	40,87

Tabela 34. Influência da concentração do fenol na adsorção de fenol usando quitina como
adsorvente durante 24 horas a pH2,0.



Figura 45. Influência da concentração do fenol na adsorção de fenol usando quitina como adsorvente durante 24 horas a pH 2,0.

Dunsun e Kalayci (2005) relataram que a capacidade de adsorção da quitina diminui com o aumento da concentração do fenol. De acordo com estes autores, a baixas concentrações de fenol, os íons presentes no meio de adsorção interagiriam com os locais de ligação fazendo assim aumentar a capacidade de adsorção do fenol pela quitina. No entanto, quando o fenol foi estudado em altas concentrações, a capacidade de adsorção da quitina diminuiu devido a saturação dos locais de adsorção.

16. Tratamento de genotoxicidade em Allium cepa

As Tabelas 35 e 36 apresentam os resultados da porcentagem do índice mitótico, aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célula Aberrantes, porcentagem da Média de Células Aberrantes empregando o teste de genotoxicidade com *Allium cepa* com a presença de fenol em concentrações de 0,01; 0,5 e 1mg/L, grupos experimentais, controle negativo (CN) e positivo (CP) e a frequência de micronúcleos. De acordo com a Tabela 35 pode-se observar que as células meristemáticas da raíz de *A. cepa* expostas a estas concentrações de fenol apresentaram um aumento na frequencia de células aberrantes tanto para anáfase quanto telófase. Este aumento pôde ser observado em comparação com a análise do controle negativo (exposto à água mineral). O aumento do número de células aberrantes foi observado descrevendo uma ação concentração-dependente de fenol, pois quanto maior a presença de fenol na solução de exposição das raízes maior foi o número de células aberrantes (0,001mg/L =25; 0,5mg/L =41; 1,0mg/L =62), comprovando assim a genotoxicidade do fenol sobre as células da raiz do *A. cepa*.

Em termos de estatística a Tabela 35 mostra também que em relação a porcentagem de índice mitótico os grupos experimentais em todas concentrações analisadas nao apresentaram diferenças significativas entre si, no entanto, mostraram ser diferentes significativamente em relação aos grupos controle positivo e negativo. Já em relação da porcentagem da média de células aberrantes o grupo experimental de 0,01mg/L apareceu ser diferente significativamente entre 0,5 e 1,0mg/L, no entanto, estes não apresentaram diferenças significativas entre si. Todos os grupos experimentais em relação aos grupos de controles positivo e negativo apresentaram diferenças significativas.

De acordo com Mazzeo, Fernandes e Marin-Morales (2011), o teste de *A. cepa* foi aplicado para analisar a presença com BTEX (mistura de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilênios), que apresentou um efeito potencialmente genotóxico e mutagênico para células meristemáticas, mesmo quando testado em baixas concentrações. Estes mesmos autores concluíram que a espécie *A. cepa* representa um eficiente teste para avaliar os efeitos tóxicos induzidos pelos hidrocarbonetos de petróleo, tal como o BTEX e enfatizaram também que ensaios de aberrações cromossômicas e o teste de determinação da frequencia de micronúcleos podem constituir uma sensível ferramenta para detectar os danos de DNA induzidos por diferentes compostos. Diante dos resultados e dados de genotoxicidade, principalmente no que se refere à ocorrência de aberrações cromossômicas, os resultados obtidos até o momento neste trabalho, demonstram que as diferentes concentrações de fenol (mg/L) analisadas apresentaram aumento de aberrações cromossômicas.

Tabela 35- % de Índice Mitótico, Aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célula Aberrantes e % da Média de Células Aberrantes em *A. cepa* com a presença de fenol em concentrações de 0,01; 0,5 e 1mg/L, grupos experimentais, controle negativo (CN) e positivo (CP).

Tratamento	%Índice Mitótico	Aberrações		Total de células	% Média de células
		Anáfase	Telófase	Aberrantes	Aberrantes
CN	13,92±1,90	19	19	38	0,76±0,19
0,01mg/L	2,10±0,79	22	03	25	$0,54\pm 2,40$
0,5 mg/L	1,57±1,07	37	04	41	$1,06\pm 5,60$
1 mg/L	1,64±0,62	46	16	62	$1,24\pm4,24$
СР	6,14±0,48	62	43	105	2,10±0,12

5000 células analisadas. Médias \pm Desvio padrão.

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis (p < 0.05).

Em continuidade ao Teste do *A. cepa*, foi avaliada também a frequencia de células micronucleadas, resultantes de danos na molécula de DNA que pode ser observada na Tabela 36. Sendo assim, foi observado também um aumento significativo da frequência de micronúcleos nos grupos experimentais. Este aumento torna-se visível quando comparado com o controle negativo. No entanto, entre as diferentes concentrações não houve grande variação entre o número de micronúcleos avaliados. O controle negativo deu um resultado menor em relação a todas as concentrações de fenol (0,0,1; 0,5 e 1mg/L) analisadas neste trabalho.

De acordo com diferentes autores (ATEEQ et al, 2002; MATSUMOTO e MARIN-MORALES, 2004; FERNANDES et al, 2007; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008), a avaliação e determinação da frequência de micronúcleos em células de *A. cepa* representa um dos testes mais utilizados nos estudos de biomonitoramento. Vários testes para identificar a presença de compostos químicos potencialmente genotóxicos e mutagênicos têm demonstrado sucesso quando realizados com esta planta. As células meristemáticas e F1 de *Allium cepa* apresentam algumas características que permitem o estudo citogenético, portanto são recomendados para avaliar aberrações cromossômicas e ensaios de micronúcleos para avaliação de poluentes ambientais.

Mazzeo et al. (2010) compararam a frequências de micronúcleos em diferentes concentrações de BTEX biodegradáveis e não biodegradáveis através do teste de *A. cepa* e observaram uma diminuição significativa na concentração de BTEX, assim demonstrando uma redução de efeitos mutagênicos causados pelo BTEX após o processo de biodegradação. Esse processo foi eficiente na redução de danos do material genético nas células de *A. cepa*.

De acordo com uma alta mortalidade incomum de peixes observada por Nunes et al. (2011), várias amostras de águas foram coletadas de 5 lugares do Rio Sinos utilizando o teste com *Allium cepa*, para avaliação da toxicidade e dos micronúcleos presentes nas células. As amostras eram contaminadas por efluentes domésticos, metalúrgicos, da indústria de calçados e curtumes (acima de 40). A resposta observada no teste de micronúcleos nas células analisadas foi a perda de cromossomos, ou a quebra ocasionada pelas substâncias geradas pelas diferentes atividades antrópicas que afetaram diretamente o DNA celular. A Tabela 36 mostra a frequência de micronúcleo nas raízes de *Allium cepa* expostas ao tratamento de fenol sob diversas concentrações (0,01, 0,5 e 1,0mg/L). Os três grupos experimentais avaliados não apresentaram diferenças significativas entre si, no entanto, em relação aos grupos controle positivo e negativo foram diferentes significativamente.

Micronúcleo das Ra	Micronúcleo das Raízes na Presença de Fenol		
Tratamento	Micronúcleos (X±DP)		
CN	1,0±0,25		
0,01mg/L	3,6±0,61		
0,5mg/L	$4,0\pm0,08$		
1mg/L	$5,2\pm0,84$		
СР	16,4±2,30		

Tabela 36– Frequência de micronúcleos nas raízes de *A. cepa* resultantes do tratamento com fenol em diferentes concentrações (0,01; 0,5 e 1mg/L). Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L.

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis (p < 0.05).

A Tabela 37 mostra a porcentagem de índice mitótico, aberrações nas fases de anáfase e telófase e a porcentagem da média de células aberrantes na presença de diversas concentrações de fenol 12, 36, 60 e 150mg/L. Pode-se observar que em termos de porcentagem de índice mitótico todos os tratamentos analisados não apresentaram diferenças significativativa entre si, no entanto, quando comparados com os grupos controle positivo e negativo a diferença significativa pode ser observada. Em relação a porcentagem da média de células aberrantes o grupo experimental 12mg/L apresentou uma diferença significativa entre todos os outros tratamentos analisados, os quais não foram diferentes significativamente entre si. No entanto, todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas entre o controle positivo e o controle negativo.

Tratamento	%Índice	Aberrações		Total de	%Média de
	Mitótico	Anáfase	Telófase	células	células
		7 marabe	reforase	Aberrantes	Aberrantes
CN*	4,06±1,50a	0	1	1	0,01±0,70a
12mg/L	7,58 ±1,93b	32	35	67	0,13±0,07b
36mg/L	$7{,}74 \pm 1{,}14b$	39	37	76	0,15±0,28bc
60mg/L	$7{,}92\pm0{,}40b$	40	43	83	0,17±0,42c
150mg/L	$\textbf{8,54} \pm \textbf{0,88b}$	45	44	89	$0,18\pm0,14c$
CP**	5,04± 1,13a	23	24	47	0,09±0,14d

Tabela 37- % de Índice Mitótico, Aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célula Aberrantes e % da Média de Células Aberrantes em *A. cepa* com a presença de fenol em concentrações de 12, 36, 60 e 150mg/L, grupos experimentais, controle negativo (CN) e positivo (CP).

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis (p < 0.05).

A Tabela 38 apresenta a frequência de micronúcleo das raízes de Allium cepa no tratamento de fenol sob diversas concentrações (12, 36, 60 e 150mg/L), além dos grupos controle negativo e positivo. O grupo experimental 36mg/L não pode ser analisado estatisticamente por não ter apresentado micronúcleo. No entanto, quando analisados os grupos experimentais 60 e 150mg/L pode observar uma diferença significativa em relação ao grupo experimental 12mg/L. No entanto, todos os grupos experimentais analisados mostraram ser diferentes significativamente em relação ao grupo controle negativo, além disso 12mg/L e o grupo controle positivo não foram diferentes significativamente.

Micronúcleo das Raízes na Presença de Fenol				
Tratamento	Micronúcleo (X±DP)			
CN	1,0±1,25a			
12mg/L	2,3±1,15b			
36mg/L	0,0			
60mg/L	4,0±2,16c			
150mg/L	4,2±0,84c			
СР	2,75±0,96b			

Tabela 38– Frequência de micronúcleos nas raízes de A. cepa resultantes do tratamento com fenol em diferentes concentrações (12, 36, 60 e 150mg/L). Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L.

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis (p < 0.05).

De acordo com a Tabela 39 pode se observar a porcentagem de Índice Mitótico, Aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célula Aberrantes e porcentagem da Média de Células Aberrantes em *Allium cepa* com a presença de polifenóis oriundos da produção de azeite. Os grupos experimentais analisados foram de 1,4 e 4,4g/L além dos grupos controles positivo e negativo. Pode-se observar que aumentando a concentração de polifenóis foi visto também um aumento na porcentagem da média de células aberrantes. Em relação a porcentagem do índice mitótico os grupos experimentais e os grupos controles não apresentaram diferenças significativas entre si. No entanto, analisando a porcentagem da média das células aberrantes pode-se que os grupos experimentais diferiram significativamente entre si quando aumentou-se a concentração de 1,4 para 4,4g/L e também que o grupo experimental de menor concentração (1,4g/L) juntamente com o grupo controle negativo e o grupo experimental de maior concentração (4,4g/L) juntamente com o grupo de controle positivo não apresentaram diferenças significativas.

positivo (CP).					
Tratamento	%Índice	Aberrações		Total de	%Média de
	Mitótico			células	células
		Anáfase	Telófase	Aberrantes	Aberrantes
CN*	4,06±1,50a	0	1	1	0,01±0,70a
1,4g/L	3,25 ±0,49a	1	0	1	0,01±0,71a
4,4g/L	5,70 ± 1,06a	9	0	9	0,09±6,36b
CP**	5,04± 1,13a	23	24	47	0,09±0,14b

Tabela 39- % de Índice Mitótico, Aberrações nas fases: Anáfase e Telófase, total de célula Aberrantes e % da Média de Células Aberrantes em *Allium cepa* com a presença de polifenois contidos na "água de vegetação"em concentrações de 1,4 e 4,4g/L, grupos experimentais, controle negativo (CN) e

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis (p < 0.05).

Tabela 40– Frequência de micronúcleos nas raízes de *A. cepa* resultantes do tratamento com polifenóis contidos na "água de vegetação" em diferentes concentrações (1,4 e 4,4g/L). Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L

(WIND) a Tome E.			
Micronúcleo das Raízes na Presença de Polifenóis			
Tratamento	Micronúcleo (X±DP)		
CN	-		
1,4g/L	-		
4,4g/L	6,0±1,41		
СР	$2,0\pm1,41$		

5000 células analisadas. Médias ± Desvio padrão.

17. CONCLUSÕES

Pelo motivo de que os compostos fenólicos estão caracterizados geralmente entre os mais perigosos poluentes orgânicos em águas residuais de refinarias de petróleo e são altamente tóxicos mesmo quando presentes em baixas concentrações, além de a presença do fenol nas águas naturais poder levar à formação de outros compostos tóxicos durante o processo de desinfecção e oxidação, este trabalho tem como objetivo estudar a oxidação deste composto com a utilização da enzima tirosinase comercial e contida em resíduo de cogumelo, buscando minimizar a toxicidade presente no ambiente.

A metodologia Worthington (2006) e a metodologia citada por Bastituti e Lourenço (1985) mostraram que as atividades enzimáticas não tiveram êxito quando aplicadas tanto na enzima comercial, quanto naquela presente no extrato de batata, sob diferentes condições de concentração do substrato e de concentração da enzima, devido à falta de linearidade observada nos gráficos, impossibilitando assim a avaliação da atividade.

A não reatividade do monofenol L-tirosina verificada no experimento pode indicar a princípio a ausência de atividade da tirosinase da batata, o que foi observado também no trabalho realizado por Batistuti e Lourenço (1985). Além disso, a atividade da tirosinase quando presente nos tecidos vegetais apresenta algumas exigências, as quais devem ser consideradas, sendo: local do plantio, período da colheita, de espécie e do estado de amadurecimento. Estes também podem ser fatores que explicam a ausência de atividade neste trabalho.

Pelo fato de a atividade enzimática ser praticamente nula em *Solanum tuberosum*, foi testado também *Agaricus bisporus* como fonte da enzima tirosinase, o qual demonstrou resultados interessantes em termo de atividade. Foi assim possível concluir este trabalho realizando ensaios de oxidação de fenol utilizando o extrato de cogumelo e os resíduos do mesmo como fonte de tirosinase.

As condições ótimas para os ensaios de oxidação com a tirosinase a partir do cogumelo foram: pH 6,6, temperatura de 30°C e concentração de enzima de 328U/mL. Todos estes parâmetros foram avaliados em duplicata.

Aplicando a tirosinase a 295U/mL e 884U/mL extraída de *Agaricus bisporus* sob os polifenóis contidos na "água de vegetação" sem pre-tratamento pode se observar que ambas obtiveram o mesmo resultado de concentração final de polifenóis, permitindo então a escolha da utilização da menor concentração de enzima. Quando os polifenóis com pré-tratamento (carbono ativado) foram submetidos a ensaios de oxidação com a tirosinase comercial (90U/mL) e a tirosinase extraída de *A. bisporus* (295U/mL), observou-se que não apresentaram diferenças significativas na concentração final dos polifenóis, permitindo então a utilização da matéria-prima de baixo custo, a qual apresentou a mesma eficiência da comercial.

A quitina, queratina extraída de penas de galinha e a quitosana mostraram eficácia na adsorção do fenol. As condições ótimas avaliadas foram pH 8,0 e 30°C para queratina e

quitosana, enquanto que para a quitina foi pH2,0 e 25°C. Dentre estes adsorventes o melhor foi a queratina, a qual apresentou 99% de adsorção do fenol (50mg/L).

Os micronúcleos têm sido como um ponto final mais simples e efetivo para analisar o efeito mutagênico promovido por produtos químicos e são resultantes de danos, não ou erroneamente reparados nas células parentais, sendo facilmente observados em células filhas, mas em tamanho reduzido. A presença de micronúcleos em *Allium cepa* não parece estar relacionada com a concentração do fenol. O controle negativo estudado neste trabalho mostrou-se menor em relação a todas as concentrações de fenol analisadas.

De acordo com os resultados de genotoxicidade, quanto maior a concentração de fenol maior também foi o número de células aberrantes presentes na raízes de *A. cepa* comprovando a genotoxicidade, em comparação aos controles negativo e positivo.

A partir de então foram executados ensaios de oxidação utilizando resíduos de indústrias de azeite da Região Ligúria, Itália, como fonte de polifenóis. O tratamento de fenol com tirosinase foi limitado apenas ao que sobrou após essa recuperação, pois mesmo em baixa concentração, os fenóis podem ocasionar danos ao ambiente. Por este motivo, foram realizados, utilizando a mesma metodologia, ensaios de oxidação de fenóis e polifenóis residuais contidos num resíduo industrial real (a assim chamada "água de vegetação"). Para este propósito foram utilizadas tanto a enzima tirosinase comercial como aquela contida no resíduo de cogumelo proveniente da indústria a custo zero.

18. ARTIGO SUBMETIDO (Anexo)

CAPÍTULO 1 - "A new enzymatic process for the treatment of phenolic pollutants" submetido à Brazilian Archives of Biology and Technology.

CAPÍTULO 2 - "Genotoxic Effect of Phenol on the Roots of Onion Allium cepa", submetido à Asian Journal of Ecotoxicology.

CAPÍTULO 3 - "A new kinetic and thermodynamic approach to phenol biosorption by chitosan and keratin" submetido à Environmental Enginnering and Management Jour

CAPÍTULO 4- "Chitin as biosorbent for phenol removal from aqueous solution: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies " submetido à Chemical Enginnering and Processing: Process Intensification.

19. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERGHINA, F.A.M. Chlorogenic acid oxidase from potato tuber slices; partial purification and properties. **Phytochemistry**, p.365-372, 1964.

ABUKHARAMA, D.A.; WOOLHOUSE, H.Y.W. The preparation and properties of odiphenol: oxygen oxidoredutase from potato tubers. **New Phytologist**, v.65, p. 477-487, 1966.

AGRIOS, A.; GRAY, K.; WEITZ, E. Photocatalytic transformation of 2,4,5- trichlorophenol on TiO2 under sub-band-gap illumination. **Langmuir**, v.19, p.1402–1409, 2003.

AHMARUZZAMAN, A. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: a review. Advances in Colloid and Interface Science, v.143, p. 48–67, 2008.

AHMED, S.; RASUL, M.G.; MARTENS, W.N.; BROWN, R.; HASHIB, MA. Advances in heterogeneous photocatalytic degradation of phenols and dyes in wasterwater: A Review. **Water Air Soil Pollut,** n.215, v.3, p. 29, 2011.

AKHTAR, S.; KHAN, A.A.; HUSAIN, Q. Partially purified bitter gourd (Momordica charantia) peroxidase catalyzed decolorization of textile and other industrially important dyes. **Bioresource Technology,** v. 96, p.1804–1811, 2005a.

AKHTAR, S.; KHAN, A.A.; HUSAIN, Q. Potential of immobilized bitter gourd (Momordica charantia) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. **Chemosphere** v.60, p.291–301, 2005b.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; Hemmink, k.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, p.111–172, 2000.

ALÉN-RUIZ, F.; GARCIA-FALCÓN, M.S.; PÉREZ-LAMELA, M.C.; MARTINEZ-CARBALLO, E.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. **Food Chemistry**, v. 113, p.53-60, 2009.

ALHAMED, A. Adsorption kinetics and performance of packed bed adsorber for phenol removal using activated carbon from date's stones. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p.763–770, 2009.

ALI, I.; GUPTA, V.K. Advances in water treatment by adsorption technology. **Nature Protocols**, v. 1, p.2661–2667, 2007.

ALIAKBARIAN, B.; CASAZZA, A.A.; PEREGO, P. Kinetic and Isotherm Modeling of Phenolic Compounds Adsorption from Olive Mill Wastewater onto Activated Carbon. International Journal of Food Engineering, 2011.

ALIAKBARIAN, B.; DEHGHANI, F.; PEREGO, P. The effect of citric acid on the phenolic contents of olive oil. **Food Chemistry**, v.116, p.617–623, 2009.

ALVARO, S. F.; NEPTUNO, J.R.L.; FRANCISCO G. C. Francisco. Biochimica et Biophysica. Acta, v.1, p.1247, 1995.

AMORE, J.E.; HAUTALA, E. Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. **Journal of Applied Toxicology**, v.3, p. 272–290, 1983.

AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of Ranunculus as_iaticus anthocyanins and their use as food colourants. **Journal of Food Science and Technology**, v.42, p.985–991, 2007.

ANDERSON, P.J.; D'IORO, A. Purification and properties of catechol-O-methyltransferase. **Biochemical Pharmacology**, v.17, n.9, p.1943–1949, 1968.

APTULA, A. O.; ROBERTS, D. W.; CRONIN, M. T. D.; SCHULTZ, T. W. Reactivity and aquatic toxicity of aromatic compounds transformable to quinone-type Michael acceptors. **Chemical Research Toxicological**, v. 18, p. 844, 2005.

ARQUES,A.; AMAT, A.M.; GARCIA-RIPOLL, A.; VICENTE, R. Detoxification and/or increase of the biodegradability of aqueous solutions of dimethoate by means of solar photocatalysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, p.447-452, 2007.

ATSDR. Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA). **Priority List of Hazardous Substances**, 2007.

ATEEQ, B.; ADUL FARRAH, M.; ALI, M.N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by Allium rot tip test. **Mutation Research**, v.514, p. 5–113, 2002.

ARIANA, F.; ELKE, B.; THOMAS, B. Rapid monitoring of the biodegradation of phenollike compounds by the yeast Candida maltosa using BOD measurements. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.54, p. 69–76, 2004.

ARIAHU, C.C.; OGUNSUA, A.O. Thermal degradation kinetics of thiamine in prewinkle based formulated low acidity foods. **International Journal of Food Science and Technology**, v.35, p.315–321, 2000.

ARICA, M.Y.; BAYRAMOGLU, G. Reversible immobilization of tyrosinase onto polyethyleneimine grafted and Cu (II) chelated poly (HEMA-co-GMA) reactive membrane. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.27, p.255-265, 2004.

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WANISKA, R. D. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.90, p.293–301, 2005.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191–203, 2006.

BALLISTRELI, F.P.; TOMASELLI, G.A.; TOSCANO, R.M. Selective and mild oxidation of thiols to sulfonic acids by hydrogen peroxide catalyzed by methyltrioxorhenium. **Tetrahedrons Letters** .v. 49, p. 3291–3293, 2008.

BANAT, F.A.; AL-ASHEH, S. Biosorption of phenol by chicken feathers. **Environmental Enginnering and Policy**, v. 2, p.85-90, 2000.

BANAT, F.A.; AL-ASHEH, S. The use of columns packed with chicken feathers for the removal of phenol from aqueous solutions. **Adsorption Science & Technology**, v. 19, p. 553-563, 2001.

BARANSI, K.; DUBOWSKI, Y.; SABBAH, I. Synergetic effect between photocatalytic degradation and adsorption processes on the removal of phenolic compounds from olive mill wastewater. **Water Research**, v.46, p. 789 e 798, 2012.

BARONE, J.R.; SCHMIDT, W. F.; GREGOIRE, N.T. Extrusion of feather keratin, Journal of Applied Polymer Science, v.100, p. 1432-1442, 2006.

BATISTUTI, J.P. Polifenoloxidase de batata (*Solanum tuberosum*). **Dissertação de Mestrado**, S. Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, 1984.

BATISTUTI, J. P.; LOURENÇO, E. J. Isolation and purification of polyphenoloxidase from a new variety of potato. **Food and Chemistry**, v. 18, p.251-263, 1985.

BAYDAR, N. G.; OZKAN, G.; SAGDIC, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (Vitis vinifera L.) extracts. **Food Chemistry**, v.15, p.335–339, 2004.

BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M.Y. Enzymatic removal of phenol and *p*-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. Journal of Hazardous Materials, v. 156, p. 148–155, 2008.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Annual Review of Phytopathology, v. 24, p.411, 1986.

BERKELEY, R.C.W. Chitin, Chitosan and their degradative enzymes, in: R.C.W. Berkeley, C.W. Gooday, D.C. Elwood (Eds.). **Microbial polysaccharides**, Academic Press, New York, p.205-236, 1979.

BEVILAQUA, J.V.; CAMMAROTA, M.C.; FREIRE, D.M.G.; SANT'ANNA JR, G.L. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. **Brazilian Journal of Chemical engineering**, v. 19, n. 2, p. 151-158, 2002.

BEVILAQUA, J. V. Utilização de Tirosinase de *Agaricus bispora* no Tratamento de Efluente Contendo Fenóis. Tese de Mestrado - COPPE –Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

BHATNAGAR, A.; SILLANPAA, N. Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater – a short review. Advances in Colloid and Interface Science, v.152, p. 26–38, 2009.

BLEVE, M.; CIURLIA, L.; ERROI, E.; LIONETTO, G.; LONGOC, L.; RESCIOA, L. An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. **Separation and Purification Technology**, v.64, p.192–197, 2008.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M.G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.43, p. 137–141, 2004.

BOURQUELOT, E.; BERTRAND, G. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. **Compte Rendus Society of Biology,** v. 47, p. 582, 1895.

BRITTO, J.M.; RANGEL, M.C. Advanced oxidation process of phenolic compounds in industrial wasterwater (in Portuguese). **Química Nova**, v.31, p.114-122, 2008.

BUCHANAN. D.; MICELL, J.A. Peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. **Biotechnology and Bioengineering,** v.54, p. 251–261, 1997.

BUCIC'-KOKIC', A.; PLANINIC', M.; TOMAS, S.; BILIC', M.; VELIC, D. Study of solidliquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. **Journal of Food Engineering**, v.81, p.236–242, 2007.

BUSCA, G.; BERARDINEI, S.; RESINI, C.; ARRIGHI, R. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments. Journal Hazardous Material, v.160, p. 265–288, 2008.

BUSCH, J.M. Enzymic browning in potatoes: a simple assay for a polyphenol oxidase catalysed reaction. **Biochemical Education**, v. 27, p.171-173, 1999.

BYRAPPA, K.; SUBRAMANI, A. K.; ANANDA, A; RAI, K. M. L.; DI.NESH, R.; YOSHIMURA, M. Photocatalytic degradation of Rhodamine B dye using hydrothermally synthesized ZnO. **Bulletin of Material Science**, v.29, p. 433–438, 2006.

CALDERBANK, P. H.; MOO-YOUNG, M. B. The continuous phase heat and masstransfer properties of dispersions. **Chemical Engineering Science**, v.16, p.39-54, 1961.

CAMPOS, C. F.; SOUZA, P. E. A.; COELHO, J. V. Chemical Composition, Enzyme Activity and Effect of Enzyme Inativation on Flavor Quality of Green Coconut Water. Journal of Food Processing and Preservation, v. 20, p. 487-500, 1996.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 749, 1997.

CARIDI, D.; TRENERRY, V. C.; ROCHFORT, S.; DUONG, S.; LAUGHER, D.; JONES, R. Profiling and quantifying quercetin glucos_ides in onion (Allium cepa L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.105, p.691–699, 2007.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p. 722-725, 2008.

CARTEA, M.E.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; VELASCO, P. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. **Molecules**, v.16, p.251-280, 2011.

CASTANEDA-OVANDO, A.; DE LOURDES PACHECO-HERNANDEZ, M.A.; ELENA, M.A.; PAEZ- HERNANDEZ, J. A.; RODRIGUEZ GALAN VIDAL, J. A.; GALAN VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v.113, p.859–871, 2009.

CHAKINALA, A.G.; BREMNER, D.H.; GOGATE, P.R.; NAMKUNG, K.-C.; BURGESS, A.E. Multivariate analysis of phenol mineralisation by combined hydrodynamic cavitation and heterogeneous advanced Fenton processing. **Applied Catalyses B: Environmental,** v.78, p.11-18, 2008.

CHAUHAN, L.K.S.; SAXENA, P.N.; SUNDARARAMAN, V.; GUPTA, S.K. Diuroninduced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.62, p.152-163, 1998.

CHERIFI,H.; HANINI, S.; BENTAHAR, F. Adsorption of phenol from wastewater using vegetal cords as a new adsorbent. **Desalination**, v. 244, p. 177-187, 2009.

CHLAMTAC, E.B. Enzimas no mate: polifenoloxidase. **Boletim do Instituto de Química Agrícola**, v.32, p. 7-12, 1955.

CLIFFORD, M. N. Appendix 1. A Nomenclature for Phenols with Special Reference to Tea, WASHINGTON, DC. **Supplement 5**, v.41, p 393- 397, 1999.

CONVERTI, A.; ZILLI, M.; ARNI, S.; DI FELICE, R.; DEL BORGHI, M. Estimation of viscosity of highly viscous fermentation media containing one or more solutes. **Journal Biochemical and Enginnering**, v.4, p. 81-85, 1999.

CONVERTI, A.; DEL BORGHI, A.; GANDOLFI, R.; LODI, A.; MOLINARI, F.; PALAZZI, E. Reactivity and stability of mycelium-bound carboxylesterase of Aspergillus oryzae. **Biotechnology and Bioenginnerging**., v. 77, p.232-237, 2002.

CORRALES, M.; FERNANDEZ GARCIA, A.; BUTZ, P.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. Journal of Food Engineering, v.90, p.415–421, 2009.

CRISAFULLY, R.; MILHOME, M. A. L.; CAVALCANTE, R. M.; SILVEIRA, E. R.; KEUKELEIRE, D.; NASCIMENTO, R. F. Removal of some polycyclic aromatic hydrocarbons from petrochemical wastewater using low-cost adsorbents of natural origin, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4515-4519, 2008.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**; Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds.; American Society of Plant Physiologists: p 1250-1318, 2000.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Phenols, polyphenols and tannins: An overview, **In Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet;** Crozier, A., Clifford, M., Ashihara, H., Eds.; Blackwell: Oxford, UK, p.1-24, 2006.

CSHPROTOCOLS,

http://cshprotocols.org/cgi/content/full/2006/7/pdb.tab19?text_only=true

DAY, B. W.; TYURIN, V. A.; TYURINA, Y. Y.; LIU, M.; FACEY, J. A.; CARTA, G.; KISIN, E. R.; DUBEY, R. K.; KAGAN, V. E. Peroxidase-catalyzed pro- versus antioxidant effects of 4-hydroxytamoxifen: enzyme specificity and biochemical sequeale. **Chemical Research in Toxicology**, v. 12, p.28, 1999.

DAWSON, C.R.; TARPLEY, W.B. Cooper oxidases. In the Enzymes Chemistry and Mechanism of Action, Summer, J.B.; Myrback, K. Eds. Academic Press, v.2, p.455-491, 1951.

DAWSON, C.R.; MAGEE, R.J. Plant Tyrosinase (Polyphenoloxidase). In Methods in Enzymology; Colowick, S.P.; Kaplan, N.O.; Eds. Academic Press, v.2, p.817-826, 1955.

DEVLIN, T. M. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática, **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**; John Wiley & Sons; New, p. 127, 1997.

DIN, A.M.; HAMEED, B.H.; AHMAD, A. L. Batch adsorption of phenol onto physicochemical-activated coconut shell, **Journal of Hazardours Materials**, v.161, p.1522-1529, 2009.

DUBININ, M.M.; RADUSHKEVICH, L.V. Equation of the characteristic curve of activated charcoal. **Chem. Zentr**, n.1, v.1, p. 875, 1947.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidaselike compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental,** v.28, p.83-89, 2000.

DURSUN, A.Y.; KALAYCI, C.S. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of phenol onto chitin. **Journal of Hazardous Materials**, n.1-3, v.123, p.151-157, 2005.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità,** n.43, v.4, p.348–361, 2007.

EL-NAAS, M.H.; AL-MUHTASEB, S.A.; MAKHLOUF, H. Biodegradation of phenol by pseudomonas putida immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. **Journal of Hazardous Material**, v.164, p.720-725, 2009.

EL-NAAS, E.H.; AL-ZUHAIR, S.; MAKHLOUF, S. Batch degradation of phenol in a spouted bed bioreactor system. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 16, p.267-272, 2010.

EL-NAAS, M.H.; AL-ZUHAIR, S.; ALHAIJA, M.A. Removal of phenol from petroleum refinery wastewater through adsorption on date-pit activated carbon. **Chemical Engineering Journal**, v.162, p. 997-1005, 2010.

EMBRAPA. Embrapa Semi-Árido e Codevasf avaliam oliveiras para produção de azeitonas e
azeite.Disponívelem:http://www21.sede.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2005/folder.

ENSUNCHO, L.; ALVAREZ-CUENCA, M.; LEGGE, R.L. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.27, p.185-191, 2005.

EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. Disponível em: <u>http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=18</u>.

ERHAN, E.; KEKINLER, B.; AKAY, G.; ALGUR, O.F. Removal of phenol from water by membrane-immobilized enzymes. **Journal of Membrane Science**, v. 206, p.361-373, 2002.

ESCARPA, A.; MORALES, M. D.; GONZALEZ, M. C. Analytical performance of commercially available and unavailable phenolic compounds using real samples by high-

performance liquid chromatography-diode array detection. **Analytica Chimica Acta**, v.460, p.61–72, 2002.

EYRING, H.J. The activated complex in chemical reactions. **Journal of Chemical Physics**, v.3, p.107-115, 1935.

FANG, H.H.P.; LIANG, D.W.; ZHANG, T.; LIU, Y. Anaerobic treatment of phenol in wastewater under thermophilic condition. **Water Research**, v.40, p.427 e 434, 2006.

FATIBELLO-FILHO, O. VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e extrato bruto vegetais como fonte enzimática. **Química nova**, v.25, p.455-464, 2002.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** v.88, p.252–259, 2008.

FILIPE, P.; HAIGLE, J.; SILVA, J. N.; FREITAS, J.; FERNANDES, A.; MAZIERE, J.C.; MAZIERE, C.; SANTUS, R.; MORLIERE, P.; FILIPE, P.; HAIGLE, J.; SILVA, J. N.; FREITAS, J.; FERNANDES, A.; MAZIERE, J.C.; MAZIERE, C.; SANTUS, R.; MORLIERE, P. Exploring predictive QSAR models for hepatocyte toxicity of phenols using QTMS descriptors. **The Journal of Biochemistry**, v.271, p.1991, 2004.

FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, **Hereditas**, v.102, p. 99–112, 1985.

FRANCK, H.G.; STADELHOFER, J.W. Industrial Aromatic Chemistry. Springer, p. 148–157, 1989.

FREDJ, D.; FRANCOIS, D. **Purification of colored substances, especially anthocyanosides, from berries.** Patent No. FR 2641283, 1990.

FREUNDLICH, H.M.F. Über die Adsorption in Lösungen. Zeitschrift für Physikalische Chemie | Oldenbourg Verlag, v. 57, p. 385-470, 1906.

FURUKAWA, K. Oxygenases and dehalogenases: molecular approaches to efficient degradation of chlorinated environmental pollutants. **BBB: Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,** v.70, p.2335–2348, 2006.

GADD, G.W. Escurecimento enzimático em frutos: Polifenoloxidase de atemóia (Annona cherimola Mill. X Annona squamosa L.). FEMS Microbiology Letters, v. 9, p.237-240, 1980.

GALIATSATOU, P.; METAXAS, M.; ARAPOGLOU, D.; KASSELOURI-RIGOPOULOU, V. Treatment of olive mill wastewater with activated carbons from agricultural by-products. **Waste Management**, v. 22, p.803–812, 2002.

GARCIA, A.; AMAT, A. M.; ARQUES, A.; SANCHIS, R.; GERNJAK, W.; MALDONADO, M. I. Detoxification of aqueous solution of herbicide "Sevnol" by solar photocatalysis. **Environmental Chemistry Letters**, v.3, p.169–172, 2006.

GARCIA, A.; ARQUES, A.; VICENTE, R.; DOMENECH, A.; AMAT, A. M. Treatment of aqueous solutions containing four commercial pesticides by means of TiO2 solar photocatalysis. **Journal of Solar Energy Engineering**, v.130, p.041011–041015, 2008.

GARCÝA, A.; AMAT, A. M.; ARQUES, A.; VICENTE, R.; LÓPEZ, M. F.; OLLER, I. Increased biodegradability of Ultracide in aqueous solutions with solar TiO2 photocatalysis. **Chemosphere**, v.68, p. 293–300, 2007.

GHANBARI, F.; ROWLAND-YEO, K.; BLOOMER, J.C.; CLARKE, S.E.; LENNARD, M.S.; TUCKER, G.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. A critical evaluation of the experimental

design of studies of mechanism based enzyme inhibition, with implications for in vitro-in vivo extrapolation. **Current Drug Metabolism**. v. 7, p.315–334, 2006.

GIRODS, P.; DUFOUR, A.; FIERRO, A.; ROGAUME, Y.; ROGAUME, C.; ZOULALIAN, A.; CELZARD, A. Activated carbons prepared from wood particleboard wastes: characterization and phenol adsorption capacities. **Journal of Hazardous Material**, v. 166, p. 491–501, 2009.

GRANT W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p. 175-185, 1994.

GÓMEZ, J.L.; BODALO, A.; GOMEZ, E.; HIDALGO, A.M.; GOMEZ, M.; MURCIA, M. Experimental behaviour and design model of a fluidized bed reactor with immobilized peroxidase for phenol removal. **Chemical Engineering Journal**, v.127, p. 47–57, 2007.

GONCHARUK, V. V.; KUCHERUK, D. D.; KOCHKODAN, V. M.; BADEKHA, V. P. Removal of organic substances from aqueous solutions by reagent enhanced reverse osmosis, **Desalination**, v.143, p. 45-51, 2002.

GONZÁLEZ, P.S.; AGOSTINI, E.; MILRAD, S.R. Comparison of the removal of 2,4 - dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. **Chemosphere**, v.70, p.982-989, 2008.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens, **Mutation Researches**, v.310, p.175–185, 1994.

GREEN, D.E. Mechanisms of biological oxidation, Cambridge, McMillan, p.1-181, 1940.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIM, H.;KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Genetics and Molecular Biology, v.28, p.334-338, 2005.

GRONBAEK, M.; HENRIKSEN, J.H.; BECKER, U. Carbohydrate-deficient transferrin: A valid marker of alcoholism in population studies. Results from the Copenhagen city heart study. Alcoholism: Clinical Experimental Research, v.19, p. 457–461, 1995.

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p.183-188, 1999.

GUPTA, V.K.; SUHAS. Application of low-cost adsorbents for dye removal--a review. **Journal of Environmental Management,** v.90, n.8, p.<u>2313-42</u>, 2009.

HANSCH, C.; MCKARNS, S. C.; SMITH, C. J.; DOOLITTLE, D. The Relative Toxicity of Substituted Phenols Reported in Cigarette Mainstream Smoke. **Chemico Biologycal Interation.** v. 127, p.61, 2000.

HASMANN, F.A.; GURPILHARES, D.B.; ROBERTO, I.C.; CONVERTI, A.; PESSOA JR. A. New combined kinetic and thermodynamic approach to model glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and stability. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.40, p.849-858, 2007.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDI, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. **Food Chemistry**, 105, 1126–1134, 2007.

HINCAPIE, M.; PENUELA, P. G.; MALDONADO, M. I.; MALATO, O.; FERNANDEZ-IBANEZ, P.; OLLER, I. Degradation of pesticides in water using solar advanced oxidation processes. **Applied Catalysis B: Environment**, v.64, p.272–281, 2006.

HO, Y.S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 451-465, 1999.

HUSAIN, Q.; JAN, U. Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenol oxidases. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.59, p. 286–293, 2000.

HUSSAIN, A.; KUMAR, P.; MEHROTRA, I. Treatment of phenolic wastewater in UASB reactor: Effect of nitrogen and phosphorous. **Bioresource Technology**, v.99, p. 8497–8503, 2008.

HYODO, H.; URITANI, I. Properties of polyphenol oxidases produced in sweet potato tissue after wounding. **The Journal of Biochemistry**, v.58, p.388, 1965.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p. 1821-1835, 2011.

INGEBRIGTSEN, J.; KANG, B.; FLURKEY, W. H. Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. Journal of Food Science, v. 54, n. 1, pp. 128-131, 1989.

IKEHATA, K.; NICELL, J. A. Characterization of tyrosinase for treatment of aqueous phenol. **Bioresource Tecnology**, v. 74, p.191-199, 2000.

IKEHATA, K.; NICELL, J.A. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. **Biotechnology Progress,** v. 16, p. 533-540, 2000b.

IOCC - INTERNATIONAL OLIVE OIL CONCIL. World olive oil figures: Production. 2007. Disponível em: <u>http://www.internationaloliveoil.org</u>, Acesso:25/11/2011.

KAMEDA, E. Estudo do processo de obtenção de extrato enzimático de *Agaricus bisporus* para remoção de fenol em efluente sintético. **Dissertação de Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2003.

KAMEDA, E.; LANGONE, M.A.P.; COELHO, M.A.Z. Tyrosinase extract from *Agaricus bisporus* mushroom and its in natura tissue for specific phenol removal. **Environmental and Technology**, v.27, p.1209-1215, 2006.

KANNAN, S.; DUBEY, A.; KNOZINGER, H. Synthesis and characterization of CuMgAl ternary hydrotalcites as catalysts for the hydroxylation of phenol. **Journal of Catalysis**, , v.231, p. 381-392, 2005.

KAPASAKALIDIS, P. G.; RASTALL, R. A.; GORDON, M. H. Extraction of polyphenols from processed black currant (Ribes nigrum L.) residues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, p.4016–4021, 2006.

KARAN, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in wastes treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.69, p. 141-153, 1997.

KARLSSON, A.; EJLERTSSON, J.; NEZIREVIC, D.; SVENSSON, B.H. Degradation of phenol under meso- and thermophilic, anaerobic conditions. **Anaerobe**, v.5, p. 25 e 35, 1999.

KEYES, M.; SEMERSKY, F.A. Quantitative Method for the Determination of the Activities of Mushroom Tyrosinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.148, p.258, 1972.

KHAN, A.R.; AL-BAHRI, T.A.; AL-HADDAD, A. Adsorption of phenol based organic pollutants on activated carbon from multicomponent dilute aqueous solutions. **Water Resource Bulletin**, v.31, p. 2102–2112, 1997.

KLATSKY, A.L.; MORTON, C.; UDALTSOVA, N.; FRIEDMAN, D. Coffee, cirrhosis, and transaminase enzymes. Archives of Internal Medicine, v. 166, p. 1190–1195, 2006.

KLIBANOV, A.M.; ALBERTI, B.N.; MORIS, E.D.; FELSHIN, L.M. Enzymatic removal of toxic phenol and anilines from waste waters. **Journal of Applied Biochemistry**, v.2, p.414–421, 1980.

KNAPP, F.W. Journal of Food Science, v.30, p.930, 1965.

KÖRBAHTI, B.I.; TANYOLAç, A.Continuous electrochemical treatment of simulated industrial textile wastewater from industrial components in a tubular reactor. **Journal of hazardous materials**, v.170, n.2-3, p. 771-778, 2009.

KÖRNER, A. M.; PAWELEK, J. M. Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in biosynthesis of melanin. **Science** v. 217, p.1163-1165, 1982.

LAGERGREN, S. Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar, v. 24. p. 1–39, 1898.

LANGMUIR, I.The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society,** v. 40, p. 1361–1403, 1918.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering,** v.71, p.214–222, 2005.

LARDY, H. A. Respiratory enzymes. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1949.

LEE, C. Y. Enzymatic browning reaction. In: FRANCIS, F. J. Encyclopedia of food science and technology, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, v. 1, p. 208-218, 2000.

LEME, D.M.; ANGELIS, D.; MARIN-MORALES, M.A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p. 214–219, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71–81, 2009.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80–86, 2008.

LERCH, K. Tyrosinase Kinetics: A Semi-quantitative Model of the Mechanism of Oxidation of Monohydric and Dihydric Phenolic Substrates, In **Metal Ions in Biological Systems** (Sigel, H., Ed). Marcel Dekker Inc., New York, v. 13, p. 143-186, 1981.

LEVÉN, L.; NYBERG, K.; SCHNURER, A. Conversion of phenols during anaerobic digestion of organic solid waste e A review of important microorganisms and impact of temperature. Journal of Environmental Management, p.1-5, 2010.

LEVÉN, L.; SCHNURER, A. Effects of temperature on biological degradation of phenols, benzoates and phthalates under methanogenic conditions. **International Biodegradation and Biodeteration**, v.55, p.153-160, 2005.

LEVÉN, L.; NYBERG, K.; KORKEA-AHO, L.; SCHNURER, A. Phenols in anaerobic digestion processes and inhibition of ammonia oxidising bacteria (AOB) in soil. Science of the Total Environmental, v.364, p.229 e 238, 2006.

LI, J.M.; MENG, X.G.; HU, C.W.; DU, J. Adsorption of phenol, *p*-chlorophenol and *p*nitrophenol onto functional chitosan. **Bioresource and Technology**, v.100, p.1168-1173, 2009.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial:** Processos fermentativos e enzimáticos, ed.1, v.3, São Paulo: Edgard Blucher Ltda, p.594, 2001.

LIMA, A.W.O.; NASCIMENTO, V.B.; PEDROTTI, J.J.; ANGNES, L. Coconut-based plant tissue reactor for biosensing of cathecol in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.354, n.1-3, p.325-331, 1997.

LIMA, A. W. O.; VIDSIUNAS, E. K.; NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Vegetable tissue from Latania sp.: an extraordinary source of naturally immobilized enzymes for the detection of phenolic compounds. **Analystic**, v.123, p. 2377, 1998.

LIN, S. H.; JUANG, R. S. Adsorption of phenol and its derivatives from water using synthetic resins and low-cost natural adsorbents: A review. **Journal of Environmental Management**, v.90, p. 1336–1349, 2009.

LIN, K., PAN, J.; CHEN, Y.; CHENG, R.; XU, X. Study the adsorption of phenol from aqueous solution on hydroxyapatite nanopowders. **Journal of Hazardours Materials,** v.161, p. 231–240, 2009.

LIU, Y.J.; ZHANG, A.N.; WANG, X.C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of Acinetobacter sp. XA05 and Sphingomonas sp. FG03. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p. 187–192, 2009.

LORENA,G. F.; PEDRO, A. G.; RAMÓN, V.; FRANCISCO, G. C. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 7781, 2003.

LUE, A.C.; JIA, Q. Adsorption of phenol by oil-palm-shell activated carbons in a fixed bed. **Chemical Engineering Journal,** v.150, p. 455–461, 2009.

LUTHRIA, D. L.; PASTOR-CORRALES, M. A. Phenolic acids content of 15 dry edible bean (Phaseolus vulgaris L.) varieties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.205–211, 2006.

MAKRIS, D. P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2963, 2007.

MALATO, S.; BLANCO, J.; CÁCERES, J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGUERA, A.; RODRIGUEZ, A. Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO2 using solar energy. **Catalysis Today**, v.76, p.209–220, 2002.

MALDONADO, M. I.; PASSARI8NHO, P. C.; OLLER, I.; GENJAK, W.; FERNÁNDEZ, P.; BLANCO, J. Photocatalytic degradation of EU priority substances: a comparison between

TiO2 and Fenton plus photo-Fenton in a solar pilot plant. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, v.185, p.354–363, 2007.

MARIN-MORALES, M.A.; MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C. Cellular damages in the *Alliun cepa* test system caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, 2011.

MARSHALL, M. R.; KIM, J.; WEI, C. I. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. FAO, 2000. Disponível em: <u>http://www.fao.org/ag/ags/agsi/</u>ENZYMEFINAL/Enzymatic%20Browning.htp. Acesso em: 20 June 2005.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends Food Science and Technology**, v.6, p.195-200, 1995.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v. 69, p. 399-408, 2004.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. J. Determination of free and total phenolic acids in plant derived foods by HPLC and diode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3660–3667, 2002.

MAYER, A.M; HARET, E. Polyphenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. In: Fox PF, editor. **Food enzymology**. London: Elsevier Applied Science. p.373–98, 1991.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Alliun cepa* test system caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, 2011.

MAZZEO, D.E.C.; LEVY, E.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. BTEX Biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. Science of the Total Environment, v.408, p. 4334-4340, 2010.

MEKAPATI, S. B.; HANSCH, C. Exploring predictive QSAR models for hepatocyte toxicity of phenols using QTMS descriptors. **Journal of Chemical Education**, v.42, p.956, 2002.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; JUNIOR, A.F.Aplicação de lipases no tratamento de aguas residuarias com elevados teores de lipideos. **Química Nova**, v.28, n.2, p.296-305, 2005.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.48, p.577–599, 2000.

MEULENBERG, E.P. Phenolics: Occurrence and Immunochemical Detection in Environment and Food, Review. **Molecules**, v.14, p.439-473, 2009.

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology Environmental Safety,** v.66, p.57-64, 2007.

MONTE EGITO, L.M; MEDEIROS, D.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **General Molecular Biology**, v.30, p.435-431, 2007.

MONTGOMERY, M. W.; SGARBIERI, V. C. Isoenzymes of banana polyphenoloxidase. **Phytochemistry**, v.14, p. 1245–1249, 1975.

MULLER, E.; BERGER, R.; BLASS E.; SLUYTS, D.; PFENNIG, A. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Liquid–Liquid Extraction, 2008.

MULLINACCI, N.; ROMANI, A.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; GIACCHERINI, C.; VINCIERI, F.F. Polyphenolic Content in Olive Oil Waste Waters and Related Olive Samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.49, p.3509-3514, 2001.

NABAIS, J.M.V.; SUHAS, J.A.G.; CARROTT, P.M.J.; LAGINHAS, C.; ROMAN, S. Phenol removal onto novel activated carbons made from lignocellulosic precursors: influence of surface properties. **Journal of Hazardous Materials,** v. 167, p. 904–910, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.41, p.1523–1542, 2006.

NADAVALA, S.K.; SWAYAMPAKULA, V.M.; BODDU, K. Biosorption of phenol and ochlorophenol from aqueous solutions on to chitosan–calcium alginate blended beads. **Journal of Hazardous Materials,** v.162, p. 482–489, 2009.

NAHAR, L.; SARKER, S. D. Supercritical fluid extraction. **Natural Products Isolation**, v.20, p.47–76, 2005.

NANZAI, B.; OKITSU, K.; TAKENAKA, N.; BANDOW, H.; MAEDA, Y. Sonochemical degradation of various monocyclic aromatic compounds: Relation between hydrophobicities of organic compounds and the decomposition rates. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p. 478–483, 2008.

NARDINI, M.; CIRILO, E.; NATELLA, F.; MENCARELLI, D.; COMISSO, A.; SCACCINI, C. Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid. **Food Chemistry**, v.79, p.119–124, 2002.

NAZARI, K.; ESMAIEILI, N.; MAHMOUDI, A.; RAHIMI, H.; MASSAVI-MOVAHEDI, A.A. Peroxidative phenol removal from aqueous solution using activated peroxidase biocatalyst. **Enzyme Microbiology and Technology,** v.41, p. 226–233, 2007.

NEVES, V.A; LOURENÇO, E.J. Extraction and activity of the peroxidase and polyphenoloxidase of sweet potatoes. (*Ipomea batatas Lam.*). Revista de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v.7, p. 101-107, 1985.

NICELL, J.A. Kinetics of horseradish peroxidase-catalyzed polymerization and precipitation of aqueous 4-clorophenol. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v.60, p.203–211, 199, 1994.

NUNES, E.A.; LEMOS, C.T.; GAVRONSKI, L.; MOREIRA, T.N., OLIVEIRA, N.C.D.; SILVA, J. Genotoxt assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v.84, p. 47-53, 2011.

OHE, T.; WHITE, P.A.; DE MARINI, D.M. Mutagenic characteristics of river waters flowingthrough large metropolitan areas in North America. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenisis,** v.534, p.101-112, 2003.

OHNO, T.; INOUE, M.; OGIHARA, Y.; SARACOGLU, I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**,v. 25, p. 666-668, 2002.

OLLER, I.; GERNJAK, W.; MALDONADO, M. I.; PÉREZ-ESTRADA, L. A.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A.; MALATO, S. Solar photocatalytic degradation of some hazardous watersoluble pesticides at pilot-plant scale. **Journal of Hazardous Materials B**, v.138, p.507–517, 2006.

ÖZKAYA, B. Adsorption and desorption of phenol on activated carbon and a comparison of isotherm models. **Journal of Hazardous Materials,** v.129, p.158–163, 2006.

OWEN, R.W.; HAUBNER, R.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HUL, W.E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoids compounds in brined olive drupes. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p. 703-717, 2003.
PADILHA, A.C.M.; SILVA, T.N.; SAMPAIO, A. **Desafios de adequação à questão ambiental no abate de frangos: o caso da perdigão agroindustrial-unidade industrial de Serafina Corrêa-RS**. Teoria e Evidência Econômica, Passo Fundo 14, p.109-125, 2006.

PALMA, M.S.A.; PAIVA, J.L.S.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Batch liquid-liquid extraction of phenol from aqueous solutions. **Chemical Engineering and Technology**, v.33, p.39-43, 2010.

PALMA, M.S.A.; PAIVA, J.L.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Batch phenol removal from methyl isobutyl ketone by liquid-liquid extraction with chemical reaction. **Chemical Engineering and Processing**, v.46, p.764-768, 2007.

PALMA, M.; TAYLOR, L. T. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. **Journal of Chromatography A**, v.849, p.117–124, 1999.

PAPA, G.; PESSIONE, E.; LEONE, V.; GIUNTA, C. *Agaricus bisporus* tyrosinase [monophenol monooxygenase] - I. Progress made in preparative methods. **International Journal of Biochemistry**, n.2, v. 26, p. 215-221, 1994.

PANDIT, A.B.; GOGATE, P.R.; MUJUMDAR, S. Ultrasonic degradation of 2:4:6 trichlorophenol in presence of TiO2 catalyst. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, p.227–231, 2001.

PARK, E.Y.; LUH, B.S. Polyphenol oxidase of kiwi fruit. Journal of Food Science, v.50, p. 678, 1985.

PASTORINO, L.; PIOLI, F.; ZILLI, M.; CONVERTI, A.; NICOLINI, C. Lipase-catalyzed degradation of poly(ɛ-caprolactone). **Enzyme Microbiology and Technology**, v.35, p.321-326, 2004.

PAYNE, G.F.; SUN, W. Q.; SOHRABI, A. Tyrosinase reaction chitosan adsorption for selectively removing phenols from aqueous mixtures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p.1011-1018, 1992.

PERALTA-ZAMORA, P.; ESPOSITO, E.; PELLEGRINI, R.; GROTO, R.; REYES, J.; DURAN, N. Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilized horseradish peroxidase. **Environmental Science & Technology**, v.19, p.55-63, 1998.

PEREZ-GILABERT, M.; GARCIA-CARMONA, F. Polifenoloxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.285, p.257, 2001.

PEREZ-GILABERT, M.; CARMONA, G. Characterization of catecholase activities of Egglant Polyphenol oxidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.48, p. 695-700, 2000.

PHAM MINH, D.; GALLEZOT, P.; AZABOU, S.; SAYADI, S.; BESSON, M. Catalytic wet air oxidation of olive oil mill effluents: treatment and detoxification of real effluents. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 84, p. 749 e 757, 2008.

PINELO, M.; DEL FABBRO, P.; MANZOCCO, L.; NUNEZ, M. J.; NICOLI, M.C. Optimization of continuous phenol extraction from Vitis vinifera byproducts. **Food Chemistry**, v.92, p.109–117, 2005.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). Food Chemistry, v.85, p.267–273, 2004.

POPA, V.I.; DANAILA, M.; VOLF, I.; POPA, M.I. Natural antioxidants from agroindustrial wastes sources, separation and practical implications. In: Proceedings of the 8th ILI Forum p. 67–70. **Rome**, p.10–12, 2007.

POPA, V. I.; DUMITRU, M.; VOLF, I.; ANGHEL, N. Lignin and polyphenols as allele chemicals. **Industrial Crops and Products**, v.27, p.144–149, 2008.

PORTO, T.S.; PORTO, C.S.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA FILHO, J.L.; PEREGO, P.; PORTO, A.L.F.; CONVERTI, A.; PESSOA JR, A. Kinetic and thermodynamic investigation on ascorbate oxidase activity and stability of a *Cucurbita maxima* extract. **Biotechnology Progress**, v.22, p.1637-1642, 2006.

QUADROS, P.A.; BAPTISTA, C.M.S.G. Effective interfacial area in agitated liquid–liquid continuous reactors. **Chemical Engineering Science**, v.58, p. 3935 – 3945, 2003.

RA, J.S.; OH, S.Y.; LEE, B.C.; KIM, S.D. The effect of suspended particles coated by humic acid on the toxicity of pharmaceuticals, estrogens, and phenolic compounds. **Environment International**, v. 34, 184–192, 2008.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in Allium cepa root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v.136, p. 13-18, 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.18, p.49-53, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater using the *Allium cepa* anaphasetelophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v.418, p.113-119, 1998.

RAO, J. R., VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of phenol from an aqueous solution by *Aspergillus niger* biomass. **Bioresource Technology**, v.85, p.165 – 171, 2002.

RAY, S.; MAPOLIE, S.F.; DARKWA, J. Catalytic hydroxylation of phenol using immobilized late transition metal salicylaldimine complexes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical,** v.267, p.143-148, 2007.

RENGARAJ, S.; MOON, S.H.; SIVABALA, R.; ARABINDOO, B.; MURUGESAN, V. Agricultural solid waste for the removal of organics: adsorption of phenol from water and wastewater by palm seed coat activated carbon. **Waste Management**, v.22, p.543–548, 2002.

RIBEIRO, P.; MORAIS, T.B. de; COLUGNATI, F.^aB.; SIGULEM, D.M. Tabelas de composição química de alimentos: análise comparativa com resultados laboratoriais. **Revista de Saúde Pública,** v.37, n.2, p.216-25, 2003.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo, in: L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, E.K. Marques (Eds.). **Mutagênese Ambiental**, Ulbra, Canoas, p. 201–219, 2003.

RIVES, V.; PRIETO, O.; DUBEY, A.; KANNAN, S. Synergistic effect in the hydroxylation of phenol over CoNiAl ternary hydrotalcites. **Journal of Catalysis**, v.220, p.161-171, 2003.

ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2866–2887, 2003.

ROELS, J. A. Energetics and Kinetics in Biotechnology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1983.

ROIG, A.; CAYUELA, M.L.; SANCHEZ-MONEDERO, M.A. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. **Waste Management**, v.26, p.960–969, 2006.

ROMANOVSKAYA, I.I.;SHESTERENKO, Y. A.; SEVAST'YANOV, O. V. Elimination of Phenol with the Use of Tyrosinase of Fungi. Journal of Water Chemistry and Technology, v.31, n.2, p.135-138, 2009.

ROSS, K. A.; BETA, T.; ARNTFIELD, S. D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. **Food Chemistry**, v.113, p.336–344, 2009.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; FRANCO, D.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M. J. Resíduos agroindustriales como fuente de antioxidants. **Afinidad**, v.60, p.153–160, 2003.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation, in: B. Cummings (Ed.). **Genetics**, Pearson Education Inc., San Francisco, p. 595–621, 2002.

RUSSELL, W. R.; SCOBBIE L.; LABAT, A.; DUNCAN, G. J.; DUTHIE, G. G. Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. **Food Chemistry**. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.086, 2008.

SABBAH, I.; MARSOOK, T.; BASHEER, S. The effect of pretreatment on anaerobic activity of olive mill wastewater using batch and continuous systems. **Process Biochemistry**, v. 39, n.12, p.1947 e 1951, 2004.

SADA, E.; KUMAZAWA, H.; BUTT, M. A. Mass Transfer with Chemical Reaction in Both Phases. **The Candian Journal of Chemical Engineering**, v. *55*, p.475, 1977.

SAITO, A.; OOYA, T.; MIYATSUCHI, D.; FUCHIGAMI, H.; TERAKADO, K.; NAKAYAMA, S.; WATANABE, T.; NAGATA, Y.; ANDO, A. Molecular characterization and antifungal activity of a family 46 chitosanase from *Amycolatopsis* sp. CsO-2. **Microbiology Letters**, v. 291, p. 79-84, 2009.

SAITOH, T.; ASANO, K.; HIRAIDE, M. Removal of phenols in water using chitosanconjugated thermo-responsive polymers. **Journal of Hazardous Materials**, v.185, p.1369-1373, 2011.

SAMANTA, C. Direct synthesis of hydrogen peroxide from hydrogen and oxygen: an overview of recent developements in the process. **Applied Catalysis**, v.350, p. 133–149, 2008.

SANTOS, A.; YUSTOS, P.; GOMIS, S.; RUIZ, G.; GARCIA-OCHOA, F. Reaction network and kinetic modeling of wet oxidation of phenol catalyzed by activated carbon. **Chemical Engineering Science**, v.61, p.2457-2467, 2006.

SANTOS PRIMO, M. Efeito do processamento do CO₂ comprimido sobre a atividade enzimática da peroxidase (POD) e da polifenoloxidase (PPO) do extrato bruto de erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. HILL). **Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos,** Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI-Campus de Erechim, 2006.

SARAVANAN, P.; PAKSHIRAJAN, K.; SAHA, P. Kinetics of phenol and *m*-cresol biodegradation by an indigenous mixed microbial culture isolated from a sewage treatment plant. Journal of Environmental Sciences, v.12, n.20p. 1508–1513, 2008.

SCHUELLER, B. S.; YANG, R.T. Ultrasound enhanced adsorption and desorption of phenol on activated carbon and polymeric resin. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.40, p. 4912–4918, 2001.

SCRIBAN, E. **Biotecnologia**, Editora Malone: São Paulo, p.498, 1985. SEETHARAM, G.B.; SAVILLE, B.A. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. **Water Research**, v.37, p436 - 440, 2002.

SERGEDIENE, E.; JONSSON, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; RIETJENS, I. M. C. M.; NARIMANTAS, C. FEBS. Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. **Biological Science**, v.462, p.392- 396,1999.

SHAKTHIVEL, S.; JANCZAREK, M.; KISCH, H. Visible light activity and photoelectrochemical properties of nitrogendoped TiO₂. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.50, n.108, p.19384–19387, 2004.

SHYLESH, S.; RADHIKA, T.; RANI, K.S.; SUGUNAN,S. Synthesis, characterization and catalytic activity of Nd₂O₃ supported V₂O₅ catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A:** Chemical, v.236, p. 253–259, 2005.

SHOURIAN, M.; NOGHABI, K.; ZAHIRI, H.; BAGHERI, T.; KARABALLAEI, G.; MOLLAEI, M.; RAD, I.; AHADI, S.; RAHED, J.; ABBASI, H. Efficient phenol degradation by a newly characterized Pseudomonas sp. SA01 isolated from pharmaceutical wastewaters. **Desalination**, v. 246, p. 577–594, 2009.

SHUTTLEWORTH, K.L.; BOLLAG, J.M. Soluble and immobilized laccase as catalyst for the transformation of substituted phenols. **Enzyme Microbiol Technology**, v.8, p.171-177, 1986.

SIKORA, E.; CIESLIK, E.; TOPOLSKA, K. The sources of natural antioxidants. Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria, v.75, p. 5–17, 2008.

SILVA, A.M.T.; NOULI, E.; CARMO-APOLINÁRIO, A.C.; XEKOUKOULOTAKIS, N.P.; MANTZAVINOS, D. Effect of key operating parameters on phenols degradation during H2O2- assisted TiO2 photocatalytic treatment of simulated and actual olive mill wastewaters. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.73, p. 11 e 22, 2007.

SILVA, R. L. L. **Remoção de cor de efluente sintético com cogumelos** *Agaricus bispora*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2008.

SILVERMAN, R.B. Mechanism-based enzyme inactivators. **Methods in Enzymology**, v.249, p. 240–283, 1995.

SINGH, K.P.; MALIK, A.; SINHA, S.; OJHA, P. Liquid-phase adsorption of phenols using activated carbons derived from agricultural waste material. **Journal of Hazardous Materials**, v.150, p. 626–641, 2008.

SINGH, S.; MELO, J.S.; EAPEN, S.; D'SOUZA, S.F. Phenol removal using *Brassica juncea* hairy roots: role of inherent peroxidase and H2O2. **Journal of Biotechnology**, v.123, p.43-49, 2006.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation ofwaste, surface and ground water quality using the *Allium cepa* test procedure. **Mutation Research**, v. 368, p.368:171–179, 1996.

SOONG, Y. Y.; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, v.88, p.411–417, 2006.

STRUSZCZYK, M. H. Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan, **Polimery**, v.47, p. 396-403, 2002.

SUN, W.Q.; PAYNE, G.F. Tyrosinase containing chitosan gels: A combinated catalyst and sorbent for select phenol removal. **Biotecnology Engine**, v.51, p. 79-86, 1996.

SUN, W.Q.; PAYNE, G.F. Tyrosinase containing chitosan gels: A combinated catalyst and sorbent for select phenol removal. **Biotecnology Engine**, v.51, p. 79-86, 1996.

SUN, W.; PAYNE, G.F.; MOAS, M.S.G.L. Tyrosinase reaction or chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.179–186, 1992.

The Society of the Plastic Industry, Inc. **The Phenolic Division**, **Phenolic Applications**, **Fall** 1997.

SYAMA, K.; FUKAZAUA, Y.; SUZUMURA, H. Biosorption of precious metal ions by chicken feather. **Applyed Biochemisry and Biotechnology**, v. 57, n.58, p.67-74, 1996.

SWAIN, T.; HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**., v.10, p,63-68, 1959.

TAIWO, E.A.; ADESINA, A. Electrochemical regeneration of a native activated carbon. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v.19, p. 269–273, 2005.

TEMKIN, M. Mixtures of fused salts as ionic solutions. Acta Physicochimica URSS, v.20, p. 411-420, 1945.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; FERRERES, F.; GIL, M. I. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. In: A. Rahman (Ed.) **Bioactive natural products**, p. 739–795, 2000.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 46, p.1-15, 2003.

TOUAIBA, D.; BENAYADA, B. Removal of mercury (II) from aqueous solution by adsorption on keratin powder prepared from Algerian sheep hooves. **Desalination**, v. 186, p. 75-80, 2005.

TUCK, K.L.; HAYBALL, P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, p.636-644, 2002.

USEPA, Technical Support Document for Water Quality Based Toxics Control, EPA/440/485032, United States. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 1985.

VAN GELDER, C. W. G.; FLURKEY, W. H.; WICHERS, H. J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. **Phytochemistry**, v.45, p.1309-1323, 1997.

VARGAS, V.M.F.; MIGLIAVACCA, S.B.; DE MELO, A.C.; HORN, R.C.; GUIDOBONO, R.R.; FERREIRA, I. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of

heavy metals and organic contaminants. Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenisis, v.490, p.141–58, 2001.

VIANA, D.A.; LIMA, C.A.; NEVES, R.P.; MOTA, C.S.; MOREIRA, K.A.; CAVALCANTI, M.T.H.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F. Production and stability of protease from *Candida buinensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnologia**, v.162, p.830-842, 2010.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Biosensor based on paraffin/graphite modified with sweet potato for the determination of hydroquinone in cosmetic cream in organic phase. **Talanta**, v.52, p.681-689, 2000.

XIE, L.P.; CHEN, Q.X.; HUANG, H.; LIU, X. D.; CHEN, H. T.; ZHANG, Q. Moecular design of tyrosinase inhibitors : A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. **International Journal of Biochemistr &. Cell Biology**. v.35, p.1658, 2003.

YAMADA, K.; AKIBA, Y.; SHIBUYA, T.; KASHIWADA, A.; MATSUDA, K.; HIRATA, M. Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads. **Biotechnology Progress**, v.21, p. 823–829, 2005.

YAMADA, M.; MIZUNO, Y.; MOCHIZUKI, H. Parkin gene therapy for α-synucleinopathy: a rat model of Parkinson's disease. **Human Gene Terapy**, v.16, p.262–270, 2005.

YAMADA, K.; INOUE, T.; AKIBA, Y.; KASHIWADA, A., MATSUDA, K., HIRATA, M. Removal of palkylphenols from aqueous solutions by combined use of mushroom tyrosinase and chitosan beads. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.70, p. 2467–2475, 2006.

YAN, J.L. Study on the adsorption of phenol by chitosan from aqueous solution. **Chinese Jorunal of Polymer Science**, p. 497-502, 2006.

YANG, R.D.; HUMPHREY, A.E. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. **BBB: Biotechnology and Bioengineering**, v.17, n.8, p. 1211-1235, 1975.

YANG, C.; QIAN, Y.; ZHANG, L.; FENG, J. Solvent extraction process development and on-site trial-plant for phenol removal from industrial coal-gasification wastewater. **Chemical Engineering Journal**, n. 117, v.2, p.179–185, 2006.

YANG, Z.; WU, FEGYIN. Catalytic Properties of Tyrosinase from Potato and Edible Fungi. **Biotechnology**, n.5, v.3, p. 344-348, 2006.

YAVUZ, Y.; KOPARAL, S. Electrochemical oxidation of phenol in a parallel plate reaction using ruthenium mixed metal oxide electrode. **Journal of Hazardours Materials,** v.136, p. 296–302, 2006.

YU, J.; YANG, P.; YANG, Y.; WU, T.; PARQUETTE, J.R. Hydroxylation of phenol with hydrogen peroxide over tungstovanadophosphates with Dawson structure. **Catalysis Communications,** v.7, p. 153–156, 2006.

WADA, S.; ICHIKAWA, H.; TATSUMI, H. Removal of phenols from waste-water by soluble and immobilized tyrosinase. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 42, p. 854–858, 1993.

WADA, S.; ICHIKAWA, H.; TATSUMI, H. Removal of phenols and aromatic-amines from waste-water by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. **Biotechnololy and Bioengineering**, v.45, p.304–309, 1995.

WALKER, P.L. Production of activated carbons: use of CO2 versus H2O as activating agents. **Carbon**, v.34, n.10, p.1297, 1996.

WANG, M.; TSAO, R.; ZHANG, S.; DONG, Z.; YANG, R.; GONG, J.; PEI, Y. Antioxidant activity, mutagenicity/ anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from

marigold flowers. Food and Chemical Toxicology, v. 44, p. 1522-1529, 2006.

WANG, Y.; GU, B.; XU, W. Electro-catalytic degradation of phenol on several metaloxide anodes. **Journal of Hazardours Materials,** v. 162, p.1159–1164, 2009.

WEBER, W.J.; MORRIS, J.C. Kinetics of adsorption on carbon from solutions. Journal of the Sanitary Engineering Division, American Society of Civil Engineers, v. 89, p. 31–60, 1963.

WORTHINGTONGENZYMEMANUAL,http://www.worthington-biochem.com/TY/default.html, 2006.

ZADERNOWSKI, R.; CZAPLICKI, S.; NACZK, M. Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (Garcinia mangostana). **Food Chemistry**, v.112, p.685–689, 2009.

ZAFRA, A.; JUÁREZ, M.J.B.; BLANC, R.; NAVALÓN, A.; GONZÁLEZ, J.; VÍLCHEZ, J.L. Determination of polyphenolic compounds in wastewater olive oil by gas chromatography– mass spectrometry. **Talanta**, v.70, p. 213–218, 2006.

ZEGURA, B.; HEATH, E.; ČERNOSA, A.; FILIPIC, M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v.75, p. 1453–60, 2009.

ZENG, X.; FAN, Y.; WU, G.; WANG, C.; Shi, R. Enhanced adsorption of phenol from water by a novel polar post-crosslinked polymeric adsorbent. **Journal of Hazardours Materials,** v. 169, p.1022–1028, 2009.

ZHANG, Z.; LIAO, L.; MOORE, J.; WUA, T.; WANG, Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (Juglans regia L.). **Food Chemistry**, v.113, p.160–165, 2009.

ZHENG, S.; YANG, Z.; JO, D.H.; PARK, Y.H. Removal of chlorophenols from groundwater by chitosan sorption. **Water Research**, v.38, p. 2315–2322, 2004.

ZHONG, J.; GROUTAS, W.C. Recent developments in the design of mechanism-based and alternate substrate inhibitors of serine proteases, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.4, p. 1203–1216, 2004.

ZHOU, M.H.; LEI, L.C. Electrochemical regeneration of activated carbon loaded with pnitrophenol in a fluidized electrochemical reactor. **Electrochimica Acta**, v.51, p. 4489–4496, 2005.

ZIMMERMAN, W.C.; BLANCHETTE, R.A.; BURNES, T.A.; FARREL, R.L. Melanina and perithecial development in Ophiostoma piliferum. **Mycologia**, v.87, p.857, 1995.

ANEXOS

CAPÍTULO 1 - A NEW ENZYMATIC PROCESS FOR THE TREATMENT OF PHENOLICS POLLUTANTS

Mauri Sergio Alves Palma¹, Harald Horn², Mario Zilli³, Gisele Pigatto^{1,3}, and Attilio Converti^{3,*}

¹Department of Biochemical Pharmaceutical Technology; Faculty of Pharmaceutical Sciences; University of São Paulo; 05508-000; São Paulo - SP - Brazil. ²Institute of Water Quality Control; Technical University of Munich; 85748; Garching - Germany. ³Department of Chemical and Process Engineering; University of Genoa; 16145; Genoa - Italy

Running title: Enzymatic Treatment of Phenolic Pollutants

ABSTRACT

Phenols are widely used in chemical industry for organic synthesis. To develop a new economic enzymatic process to treat these pollutants, phenol destruction was investigated using pure tyrosinase in stirred vessel and adopting temperature (T), pH, rotational speed (N), initial phenol ($C_{P,o}$) and enzyme (C_T) concentrations as independent variables. Experimental data of residual phenol concentration (C_P) were used to calculate oxidation efficiency (η), initial oxidation rate (- r_o) and time required to reach the end of reaction (t) that were selected as responses. Under optimal conditions ($T = 45^{\circ}C$, pH 6.6, N = 400 rpm, $C_{P,o} = 100$ ppm and $C_T = 50$ U/mL) we obtained $\eta = 88.1\%$, - $r_o = 10.2$ mg L⁻¹ min⁻¹, t = 40 min. These results suggest that tyrosynase-rich crude extracts from vegetable byproducts would be quite promising.

Keywords: phenols; tyrosinase; wastes; enzymatic treatment.

^{*}Author for correspondence: converti@unige.it

INTRODUCTION

Phenol and other phenolic compounds are common constituents of wastewaters from various activities in different industrial sectors, among which electrolytic strip tin coating, chemical (polymeric resins, bisphenol A, alkyl phenols, caprolactams, adipic acid, etc.), petrochemical (oil refining), metallurgical (smelting, iron, steel, and coke), pharmaceutical, textile, plastics, explosive, coffee, ceramic, paint, varnish and pesticide productions (Rosatto et al., 2001).

Phenols released into the environment may directly or indirectly cause serious health and odor problems. They can in fact inhibit the growth or exert lethal effects to aquatic organisms even at relatively low concentrations (5 to 25 mg/l, depending on temperature and state of maturity of the organism), and impart off flavors in drinking water and food processing wastewater (Theodore et al., 1997). Due to these constraints, the Brazilian legislation is very restrictive on phenols discharge, and the maximum concentration allowed in treated effluents is 0.5 ppm (Ministério do Meio Ambiente, 2010).

Eleven of these compounds are among the 129 major pollutants present in the list of the Environmental Protection Agency (Shibata & Palma, 2009). Most of the overall world production of phenol, which was $7.78 \cdot 10^6$ tons in 2001, is addressed to the syntheses of bisphenol A (39%), phenolic resins (27%), caprolactam (16%), alkylphenols (5%), 2,6-xylenol (3%) and anilines (2%), among others (8%) (Anonymous, 2002).

Various techniques are available for the treatment of phenolic effluents at different concentrations, but one should take into consideration that industrial effluents have very complex composition, and a specific treatment would be needed for each particular effluent (Freire et al., 2000). The treatment of phenolic effluents can be subdivided into two main categories, the destruction and the recovery methods (Britto & Rangel, 2008).

Among the destruction methods, there are biological treatments (Freire et al., 2000), incineration, ozonization in the presence of UV radiation, oxidation with wet air (Britto & Rangel, 2008) and electrochemical oxidation (Mojović et al., 2009). On the other hand, the recovery methods include liquid-liquid extraction (Jiang et al., 2003a, b; Palma et al., 2007, 2010), adsorption and electro-adsorption with activated charcoal (Ayranci & Conway, 2001; Jain et al., 2002), ionic exchange with resins, membrane processes such as a pervaporation,

and extraction with membrane, supported liquid membrane and liquid membrane in emulsion (Kujawski et al., 2004).

Taking into account these issues, there is the need to develop a new, ecological and auto-sustainable way for the treatment of phenolic effluents. A promising process appears to be the enzymatic oxidation (Durán & Esposito, 2000; Faria et al., 2007), particularly by polyphenol oxidase (PPO) that is more commonly referred to as tyrosinase (Martin et al., 2008; Romanovskaya et al., 2009; Yamada et al., 2009). Another enzyme equally efficient in the oxidation of phenols is the polyphenol peroxidase (Campeanu et al., 1999), but it has the disadvantage of requiring hydrogen peroxide instead of atmospheric oxygen as a substrate (Ikehata & Nicell, 2000a, b; López-Molina et al., 2003).

Tyrosinase, which is present in many fruits, vegetables, seafood and mushrooms, is responsible for browning of fruits when they have their internal tissue exposed to oxygen. It is a tetrameric enzyme with molecular weight of 120 kDa, two active sites each containing one copper, and highest activity at pH in the range 5-8, which is usually obtained from mushroom and used in biosensors for phenols detection (Faria et al., 2007; Ikehata & Nicell, 2000a, b).

Several fruits and vegetables have been used to obtain PPO, among which artichoke (López-Molina et al., 2003), wheat grain (Fuerst et al., 2006), apple (Eidhin et al., 2006), pawpaw (Fang et al., 2007), loquat fruit (Selles-Marchart et al., 2006) and banana (Wuyts et al., 2006). The reactions of phenols oxidation catalyzed by tyrosinase can be summarized as follows (Quan et al, 2004):

 $Phenol + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow Catechol + H_2O$ (1)

Catechol + $\frac{1}{2}O_2 \rightarrow o$ -Quinone + H₂O (2)

but similar mechanisms are followed for other phenols such as o-cresol and p-nitrophenol.

The use of this enzyme is of particular interest because it oxidizes phenols to oligomers similar to melanins and imparts a brown color to the reaction medium, making it possible to quantify in real time the degradation of phenolic compounds.

In the first part of this work, five sets of tests were carried out in a bench-scale mechanically-mixed reactor to check the influence of rotational speed, pH, temperature and initial concentrations of phenol and tyrosinase on the oxidation of phenol in aqueous solution,

using the dynamic behavior of residual phenol concentration to compare the results. Additional tests were then performed on *o*-cresol and *p*-nitrophenol that were selected as representative more complex phenolics. The aim of this study was to investigate the kinetics and efficiency of phenols oxidation as well as the time to reach the end of reaction, so as to apply this process to the treatment of polluted wastewaters. However, since the use of pure tyrosinase in the treatment of effluents would be uneconomical, further effort has to be made to obtain crude extracts of this enzyme from vegetables as cheap –albeit less active– catalysts (Kameda et al., 2006).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chemicals used in this study were tyrosinase T3824-25KU (5370 U/mg) and 4aminoantipyrine from Sigma-Aldrich (São Paulo, Brazil), and phenol, *o*-cresol, *p*-nitrophenol, K_2 HPO₄, KH₂PO₄ and H₃PO₄ of analytical grade from Labsynth Ltda (Diadema-SP, Brazil). Distilled water was used in the experiments.

Equipment

Figure 1 illustrates the experimental set-up used to study the oxidation of phenols in aqueous solution by tyrosinase. It was realized according to the suggestions of the literature (Quadros & Baptista, 2003) using a standard Rushton mixed vessel described in detail in previous work (Shibata & Palma, 2009; Palma et al., 2007, 2010).

Briefly, the mixed glass reactor (R) with 1.0 L-working volume was provided with an external jacket for temperature regulation by a water bath (B) ($0 < T < 60^{\circ}$ C) and four holes to host the mixing device (M) (100-1500 rpm), a thermometer (T), a syringe for sampling (S) and a funnel for feeding either phenol or enzyme buffer solution (F). It was also provided with a valve (V) located in the reactor bottom to allow aqueous phase discharge. An air pump (P) provided the oxygen necessary for the enzymatic reaction.

Phenols oxidation tests

Batch oxidation tests were performed by adding into the reactor, under mixing at given rotational speed, 0.5 L of 0.05 M phosphate buffer solution having the desired pH and

containing the selected phenolic pollutant. After reaching the selected temperature, 3.0 mL of 0.05 M phosphate buffer solution (pH = 6.6) containing 25,000 U tyrosinase were added in the shortest time as possible through a separation funnel, and a chronometer started measuring the reaction time.



Figure 1- Experimental set-up used to study the oxidation of phenols in aqueous solution by tyrosinase. M: mixer; B: thermostated bath; F: funnel; R: reactor; S: syringe; T: thermometer; V: valve; P: pump.

The experimental conditions under which the tests of phenols oxidation were carried out are listed in Table 1 together with the main results obtained at the end of reaction. The end of reaction was determined by linear fitting of the experimental data and, progressively, omitting the initial points. When the slope of the resulting straight line became lower than 10^{-2} , the time corresponding to the first remaining datum was assumed to be that needed to reach the end of reaction.

Run	<u>т</u> Т	рН	N	1000000000000000000000000000000000000	<i>C_{P,0}</i>	t	η	-r _o
	(°C) ^a		(rpm) [♭]	(U/mL) ^c	(ppm) ^d	(min) ^e	(%) ^f	(mg L ⁻¹ min ⁻¹) ^g
1	15	6.6	400	50	100	>500	~77	0.96
2	25	6.6	400	50	100	100	88.5	4.0
3	35	6.6	400	50	100	80	88.2	3.7
4 ^h	45	6.6	400	50	100	40	88.1	10.2
5	55	6.6	400	50	100	25	30.9	2.0
6	45	5.6	400	50	100	120	74.8	9.2
7	45	7.6	400	50	100	40	89.1	7.3
8	45	6.6	200	50	100	50	69.3	6.1
9	45	6.6	300	50	100	40	85.3	10.2
10	45	6.6	500	50	100	30	83.0	9.5
11	45	6.6	600	50	100	50	71.8	8.1
12	45	6.6	800	50	100	>200	~65	7.1
13	45	6.6	400	25	100	50	78.3	4.6
14	45	6.6	400	75	100	70	95.3	9.7
15	45	6.6	400	50	50	30	73.0	2.0
16	45	6.6	400	50	200	50	61.9	14.4
17	45	6.6	400	50	400	50	52.0	10.2
18 ⁱ	45	6.6	400	50	100	40	91.8	7.2
19 ^j	45	6.6	400	50	100	30	85.6	10.4

Table 1- Experimental conditions and results at equilibrium of phenols oxidation runs.

^aTemperature; ^bRotational speed; ^cEnzyme concentration; ^dInitial pollutant concentration; ^eTime to reach the end of reaction; ^fOxidation efficiency; ^gInitial reaction rate; ^hBest conditions determined in this study; ⁱTest performed using *o*-cresol; ^jTest performed using *p*-nitrophenol.

As regards the selection of phenolics (phenol, *o*-cresol and *p*-nitrophenol) and variation ranges of temperature, pH and initial phenols concentration, we selected those usually reported for the treatment of phenol emissions in Brazil ($15 \le T \le 55^{\circ}$ C; $5.6 \le pH \le$ 7.6; $50 \le C_{P,o} \le 400$ ppm) (Britto & Rangel, 2008; Palma et al., 2007), being *T* = 45°C and pH 6.6 the optimum values for tyrosinase activity (Worthington Enzyme Manual, 2010), while the range of enzyme concentration studied was that ($25 \le C_T \le 75$ U/mL) reported by Kameda et al. (Kameda et al., 2006). In addition, the range of rotational speed ($200 \le N \le 800$ rpm) was selected according to the literature (Jiang et al., 2003a, b), who demonstrated the importance of this variable as well as the reaction time ($1 \le t \le 30$ min) to reduce the operating costs of the treatment. Since at the start of the work a reaction time of 30 min was shown to be insufficient to reach the end of reaction, it was prolonged particularly at *T* < 45° C, at which the reaction was very slow.

The experimental data accuracy was checked by carrying out in quadruplicate the run (n. 4) that provided the best combination of results and supposing the same reproducibility (average standard deviation of 3 ppm) for all the other conditions. The remaining tests were done in duplicate, and the results were expressed as average values.

Analytical techniques

The aqueous samples were analyzed for phenol concentration using a UV-VIS spectrophotometer, model DU 640 (Beckman Coulter, Brea-CA, USA), having the following features: 10 mm path length cuvettes; wavelength range 190-1100 nm; -4.5 to +4.5 Abs reads out to eight places and displays out four places; UV and/or VIS lamps turned off independently.

At selected time intervals, 1.0 mL-liquid samples of phenol or *p*-nitrophenol solutions were collected from the reacting vessel by means of a syringe and filtered through cellulose acetate membranes with 0.45 μ m-pore diameter (Sartorius, Göttingen, Germany). 300 μ L of the filtered samples were transferred to capped flasks containing 600 μ L of distilled water and 60 μ L of 8.5% (w/v) phosphoric acid solution to inactivate the enzyme. For *o*-cresol analyses, sample and reactants volumes were twice those of the other two pollutants.

Phenol concentration was determined spectrophotometrically according to the literature (Eaton et al., 2005), as briefly described as follows. 960 μ L of each, borate (pH = 9.0), 0.1% (w/v) 4-aminoantipyrine and 5% (w/v) potassium ferricyanide solutions, were added to samples prepared

as above, and the absorbance of the resulting solution was recorded at $\lambda = 546$ nm exactly after 10 min.

p-Nitrophenol concentration was determined similarly to phenol after addition of 2 mL of 0.1 M NaOH solution to the samples (Toral et al., 2002). Since the *p*-nitrophenol produces yellow color in alkaline medium, the absorbance of the resulting solution was recorded at $\lambda = 405$ nm, but, unlike phenol, its absorbance did not vary with time.

o-Cresol concentration was determined according to Neufeld & Paladino (1985). For this purpose, samples were supplemented with 900 μ L of each, 5% (w/v) ammonium chloride, 2% (w/v) 4-aminoantipyrine and 29% (w/w) ammonium hydroxide solutions, the last in order to set the pH at 10. After vigorous shaking of the mixture, 900 μ L of 8% (w/v) potassium ferricyanide were added, and the absorbance of the resulting solution was recorded at $\lambda = 510$ nm exactly after 15 min.

The concentrations of phenol, *o*-cresol and *p*-nitrophenol were determined by using blank solutions without phenols as a reference and comparing the sample absorbances with those of calibration curves previously obtained using standard specimens with known concentrations.

The detection limits were 3, 0.05 and 1.25 ppm for phenol, *p*-nitrophenol and *o*-cresol, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows the results of phenol concentration (C_P) versus time at different temperature and pH values, where those of run 4 (carried out at $T = 45^{\circ}$ C and pH 6.6), which ensured the best performance, were taken as a reference.

The residual phenol concentration (C_P) and then the efficiency of phenol oxidation (η), defined as the percentage of phenol removed at the end of reaction with respect to its initial level, were not significantly influenced by temperature in the range 25-45°C (Fig. 2, panel A, and Table 1).



Figure 2 - Influence of (A) temperature (*T*) and (B) pH on phenol oxidation by tyrosinase. Conditions: (A) N = 400 rpm, pH = 6.6, $C_T = 50$ U/mL, $C_{P,o} = 100$ ppm. Temperature (°C): (•) 15, (×) 25, (△) 35, (-□-) 45, (○) 55. (B) N = 400 rpm, T = 45°C, $C_T = 50$ U/mL, $C_{P,o} = 100$ ppm. pH: (◇) 5.6, (-□-) 6.6, (×) 7.6. The line (-□-) represents the best conditions determined in this study (T = 45°C, $C_T = 50$ U/mL, $C_{P,o} = 100$ ppm, N = 400 rpm, pH = 6.6). The average standard deviation was about 3 ppm for all the experimental results.

On the other hand, as expected, at $T = 15^{\circ}$ C C_P reached the end of reaction only after a very long time (t > 500 min), and the initial reaction rate ($-r_o$), i.e. the slope of C_P vs. time for t = 0, was minimal (0.96 mg L⁻¹ min⁻¹). It progressively increased with temperature, reached a maximum value at $T = 45^{\circ}$ C (10.2 mg L⁻¹ min⁻¹) and then decreased markedly over this threshold, likely due to thermo-inactivation of the enzyme.

Such a bell-shaped behavior of enzyme activity vs. temperature was already observed for most enzymatic systems, the position of the optimum activity being directly related to the temperature of maximum stability of the enzyme tertiary structure in water. To give only a few examples, similar trends were observed for mycelium-bound carboxylesterases (Converti et al., 2002), lipases (Pastorino et al., 2004), dehydrogenases (Hasmann et al., 2007), proteases (Viana et al., 2010) and oxidases (Porto et al., 2006), among others.

The effect of temperature on the tyrosinase activity is confirmed by the behavior of the oxidation efficiency that, as expected, exhibited a minimum value (78.6%) at $T = 15^{\circ}$ C, increased with temperature up to a maximum (88.1-88.5%) in the range $25 \le T \le 45^{\circ}$ C and then decreased to only 30.9% at 55°C.

The time to reach the end of reaction progressively decreased from more than 500 to only 25 min with increasing temperature from 15 to 55°C, not only because of the above effects of temperature on enzyme activity and oxidation efficiency, but also of better mixing and medium homogeneity owing to the resulting decrease in medium viscosity (Converti et al., 1999). Thus, the minimum t value at the highest temperature was the likely result of the simultaneous occurrence of enzyme activity reduction, thermo-inactivation and enhanced fluid dynamics.

The pH influenced significantly the values of all the three responses, namely t, η and $-r_o$ (Fig. 2, panel B, and Table 1). In particular, $-r_o$ achieved its maximum (10.2 mg L⁻¹ min⁻¹) at intermediate pH (6.6), whereas the minimum value of t (40 min) and the maximum of η (89.9%) were obtained at pH \geq 6.6 and 7.6, respectively. These results suggest that the enzyme may have been partially inactivated in acidic environment and displayed high activity under neutral and alkaline conditions.

Even though the rotational speed had a significant impact on η and $-r_o$, its influence on t was small (Fig. 3, panel A, and Table 1).



Figure 3 - Influence of (A) the rotational speed (*N*) and (B) the enzyme concentration (*C_T*) on phenol oxidation by tyrosinase. Conditions: A) pH = 6.6, *T* = 45°C, *C_T* = 50 U/mL, *C_{P,o}* = 100 ppm. *N* (rpm): (\diamond) 200, (\triangle) 300, ($-\Box$ -) 400, (\times) 500, (\bigcirc) 600, (+) 800. B) *N* = 400 rpm, *T* = 45°C, pH = 6.6, *C_{P,o}* = 100 ppm. *C_T* (U/mL): (\diamond) 25, ($-\Box$ -) 50, (\times) 75. The line ($-\Box$ -) represents the best conditions determined in this study (*T* = 45°C, *C_T* = 50 U/mL, *C_{P,o}* = 100 ppm, *N* = 400 rpm, pH = 6.6). The average standard deviation is of about 3 ppm for all the experimental results.

In particular, $-r_o$ exhibited a minimum value (6.1 mg L⁻¹ min⁻¹) at the lowest rotational speed (N = 200 rpm), reached a maximum (9.5-10.2 mg L⁻¹ min⁻¹) at 300-500 rpm and then decreased beyond this threshold. On the other hand, the maximum of η (88.1%) and minimum of t (30-40 min) were observed at 400 and 300-500 rpm, respectively, i.e. at intermediate rotational speeds. These results confirm that an increase in N actually improved the oxidation because of improved mixing and homogeneity, but an excess agitation led to mechanical denaturation of the enzyme (Colombié et al., 2001). It is possible that the low efficiency (69.3%) and initial oxidation rate (6.1 mg L⁻¹ min⁻¹) detected at N = 200 rpm were also the result of increased 168

enzyme thermo-inactivation due to local superheating, but it is impossible to discriminate this effect from that of insufficient mixing.

Also the enzyme concentration (C_T) significantly influenced the values of t, η and $-r_o$ (Fig. 3, panel B, and Table 1). In particular, $-r_o$ reached a maximum value (10.2 mg L⁻¹ min⁻¹) using $C_T = 50$ U/mL and a minimum one (4.6 mg L⁻¹ min⁻¹) with $C_T = 25$ U/mL, whereas texhibited a minimum value for $C_T = 50$ U/mL, and η progressively increased with C_T . These results suggest that, for $C_T = 25$ U/mL the reaction was limited by the enzyme level, while the lowest efficiency was the likely consequence of enzyme inactivation caused by the relatively high level of o-quinones in relation to that of the enzyme. The highest oxidation efficiency was observed for $C_T = 75$ U/mL, but, surprisingly, $-r_o$ was lower than with $C_T = 50$ U/mL, likely due to self-aggregation of the enzyme molecules at the highest level, forming clusters (dimers, trimers, oligomers) that could have made them unavailable for the catalysis. This phenomenon could have been also the reason of the surprising behavior of t that exhibited a minimum with C_T = 50 U/mL.

The results reported in the panel A of Fig. 4 and Table 1 demonstrate that $C_{P,o}$ significantly impacted on the oxidation efficiency and the initial oxidation rate.

The values of *t* did in fact vary only from 30 to 50 min with increasing $C_{P,o}$ from 50 to 400 ppm, while the initial oxidation rate exhibited a bell-shaped behavior with a maximum (- $r_o = 14.4$ mg L⁻¹ min⁻¹) at $C_{P,o} = 200$ ppm and decreased over this threshold, which is typical of the well-known excess substrate inhibition observed in about 20% of the enzymes (Chaplin & Bucke, 1990).

On the other hand, the bell-shaped curve of the oxidation efficiency suggests that this parameter could have been modulated by the inhibiting action of *o*-quinones produced by phenol oxidation. As suggested by the minimum value of this parameter ($\eta = 73.0\%$) at $C_{P,o} = 50$ ppm, the lower the phenol level, the stronger such an inhibition. An increase in phenol concentration to 100 ppm may have accelerated the diffusion of phenol molecules towards the active site, and then led to more effective release of *o*-quinones molecules from it, thus exerting a sort of active site protection ($\eta = 88.1\%$). However, an excess increase in $C_{P,o}$ (400 ppm) led to a sharp decrease in η (52.0%), as the likely result of limitation of this transfer to the bulk.

The panel B of Fig. 4 and Table 1 show the results of oxidation of *o*-cresol and *p*-nitrofenol (PNP) compared to phenol. It is evident that the type of substrate had little effect on both *t* and - r_o , but strongly influenced η . The minimum and maximum values of η were obtained with PNP and *o*-cresol, respectively, which points out higher affinity of tyrosinase for hydrophilic

compounds. The values of $-r_o$ were similar for *o*-cresol and phenol and about 30% lower for PNP, which suggests that the increase in the electrophilicity of the aromatic ring or, more likely, in the steric hindrance, both associated to the presence of the nitro group in PNP, may have significantly reduced its reactivity.

CONCLUSIONS

In this work, we investigated the influence of temperature (*T*), pH, rotational speed (*N*), enzyme concentration (C_T) and initial concentration of phenol ($C_{P,o}$) on phenol oxidation by tyrosinase in homogeneous aqueous solutions and compared these results with those obtained using *o*-cresol and *p*-nitrophenol as substrates. The process proved to be reproducible, and the results allowed properly assessing the influence of the selected variables. The optimum operating conditions resulted to be N = 400 rpm, $T = 45^{\circ}$ C, $C_T = 50$ U/mL, pH = 6.6-7.6 and $C_{P,o} = 100$ ppm. Although under these conditions the final concentration of phenol in the treated solution was only 11.9 ppm, corresponding to oxidation efficiency of 88.1%, this treatment did not allow meeting the limit of 0.5 ppm imposed for phenols by the Brazilian legislation; therefore, additional study is in progress to increase the process efficiency.



Figure 4 - A) Influence of the initial phenol concentration ($C_{P,o}$) on phenol oxidation by tyrosinase and B) oxidation of different phenolics by tyrosinase. Conditions: A) N = 400 rpm, $T = 45^{\circ}$ C, $C_T = 50$ U/mL, pH = 6.6. $C_{P,o}$ (ppm): (\diamond) 50, ($-\Box$ -) 100, (\triangle) 200, (\bullet) 400. B) N = 400 rpm, pH = 6.6, $C_T = 50$ U/mL, $C_{P,o} = 100$ ppm, $T = 45^{\circ}$ C. (\bigcirc) *p*-nitrophenol, (\bullet) *o*-cresol, ($-\Box$ -) phenol. The line ($-\Box$ -) represents the best conditions determined in this study ($T = 45^{\circ}$ C, $C_T = 50$ U/mL, $C_{P,o} = 100$ ppm, N = 400 rpm, N = 400 rpm, pH = 6.6). The average standard deviation is of about 3 ppm for all the experimental results.

Moreover, to face the high cost of pure tyrosinase, which would make an industrial process for the treatment of wastewater contaminated by these compounds unfeasible, efforts are underway to obtain and test cheaper tyrosinase extracts of vegetable origin.

Preliminary experiments in our laboratory have demonstrated that filtered raw extract of potatoes (*Solanum tuberosum*) had activity of the order of 30,000 U/Kg of biomass whereas Lopes-Molina et al. (2003) obtained extracts of artichoke (*Cynara scolymus* L.) with 21,000 U/Kg.

ACKNOWLEDGEMENTS

The financial support from FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – and CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – are gratefully appreciated.

REFERENCES

Anonymous (2002), Phenol. Chemical Week, 164, 31-31

- Ayranci, K.; Conway, B.E. (2001), Removal of phenol, phenoxide and chlorophenols from waste-waters by adsorption and electrosorption at high-area carbon felt electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 513, 100-110
- Britto, J.M.; Rangel, M.C. (2008), Advanced oxidation process of phenolic compounds in industrial wasterwater (in Portuguese). *Quim. Nova*, 31, 114-122
- Campeanu, G.; Pele, M.; Cimpeanu, M.; Ilies, M.; Ilies, M.A. (1999), Evaluation of the activity of horseradish peroxidase and mushroom polyphenoloxidase in wastewater phenol degradation process. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 4, 319-326
- Chaplin, M.; Bucke, C. (1990), *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 70-76
- Colombié, S.; Gaunand, A.; Lindet, B. (2001), Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces. *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 820-826
- Converti, A.; Del Borghi, A.; Gandolfi, R.; Lodi, A.; Molinari, F.; Palazzi, E. (2002), Reactivity and stability of mycelium-bound carboxylesterase of Aspergillus oryzae. *Biotechnol. Bioeng.*, 77, 232-237
- Converti, A.; Zilli, M.; Arni, S.; Di Felice, R.; Del Borghi, M. (1999), Estimation of viscosity of highly viscous fermentation media containing one or more solutes. *Biochem. Eng. J.*, 4, 81-85

- Durán, N.; Esposito, E. (2000), Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidaselike compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B-Environ.*, 28, 83-99
- Eaton, H.D.; Clesceri, L.S.; Rice, E.W.; Greenberg, A.E.; Franson, M.A.H. (2005), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington
- Eidhin, D.M.N.; Murphy, E.; O'Beirne, D. (2006), Polyphenol oxidase from apple (*Malus domestica* Borkh. Cv Bramley's Seedilng): purification strategies and characterization. J. Food Sci., 71, C51-C58
- Fang, C.; Wang, C.; Xiong, Y. L.; Pomper, K. W. (2007), Extraction and characterization of polyphenol oxidase in pawpaw (*Asimira triloba*) fruit. *J. Food Biochem.*, 31, 603-620
- Faria, R.O.; Moure, V.R.; Amazonas, M.A.L.A.; Krieger, N.; Mitchell, D.A. (2007), The biotechnological potential of mushroom tyrosinases. *Food Technol. Biotechnol.*, 45, 287-294
- Freire, R.S.; Pelegrini, R.; Kubota, L.T.; Duran, N. (2008), New trends for treatment of industrial effluents containing organochloride species (in Portuguese). *Quim. Nova*, 23, 504-511
- Fuerst, E.P.; Anderson, J.V.; Morris, C.F. (2006), Polyphenoloxidase in wheat grain: whole kernel and bran assays for total and soluble activity. *Cereal Chem.*, 83, 10-16
- Hasmann, F.A.; Gurpilhares, D.B.; Roberto, I.C.; Converti, A.; Pessoa Jr., A. (2007), New combined kinetic and thermodynamic approach to model glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and stability. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 849-858
- Ikehata, K.; Nicell, J.A. (2000), Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresour. Technol.*, 74, 191-199
- Ikehata, K.; Nicell, J.A. (2000), Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.*, 16, 533-540
- Jain, A.K.; Bhatnagar, S.; Bhatnagar, A. (2002), Methylphenols removal from water by low-cost adsorbents. *J. Colloid Interface Sci.*, 251, 39-45
- Jiang, H.; Fang, Y.; Fu, Y.; Guo, Q.X. (2003), Studies on the extraction of phenol in wastewater. *J. Hazard. Mater.*, B101, 179-190
- Jiang, H.; Tang, Y.; Fu, Y.; Guo, Q.X. (2003), Separation and recycle of phenol from wastewater by liquid-liquid extraction. *Sep. Sci. Technol.*, 38, 2579-2596

- Kameda, E.; Langone, M.A.P.; Coelho, M.A.Z. (2006), Tyrosinase extract from Agaricus bisporus mushroom and its in natura tissue for specific phenol removal. Environ. Technol., 27, 1209-1215
- Kujawski, W.; Warszawski, A.; Ratajczak, W.; Porębski, T.; Capała, W.; Ostrowska, I. (2004),
 Removal of phenol from wastewater by different separation techniques. *Desalination*, 163, 287-296
- López-Molina, D.; Hiner, A.N.P.; Tudela, J.; Garcia-Cánovas, F.; Rodriguez-López, J.N. (2003), Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 738-742
- Martin, L.B.; Nikodinovic, J.; Mc Mahon, A.M.; Vijgenboom, E.; O'Connor, K.E. (2008), Assessing the catalytic activity of three different sources of tyrosinase: a study of the oxidation of mono- and difluorinated monophenols. *Enzyme Microb. Technol.*, 43, 297-301
- Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA, *Resolução Nº* 357, 17/03/2005, <u>www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf</u>, accessed on April 15th, 2010.
- Mojović, Z.; Milutinović-Nikolić, A.; Mentus, S.; Jovanović, D. (2009), Electrochemical oxidation of phenol on metal-impregnated zeolite electrodes. *Chem. Eng. Technol.*, 32, 738-744
- Neufeld, R.D.; Paladino, S.B. (1985), Comparison of 4-aminoantipyrine and gas-liquid chromatography techniques for analysis of phenolic compounds. J. Water Pollut. Control Fed., 57, 1040-1044
- Palma, M.S.A.; Paiva, J.L.; Zilli, M.; Converti, A. (2007), Batch phenol removal from methyl isobutyl ketone by liquid-liquid extraction with chemical reaction. *Chem. Eng. Process.*, 46, 764-768
- Palma, M.S.A.; Shibata, C.; Paiva, J.L.; Zilli, M.; Converti, A. (2010), Batch liquid-liquid extraction of phenol from aqueous solutions. *Chem. Eng. Technol.*, 33, 39-43
- Pastorino, L.; Pioli, F.; Zilli, M.; Converti, A.; Nicolini, C. (2004), Lipase-catalyzed degradation of poly(ε-caprolactone). *Enzyme Microb. Technol.*, 35, 321-326

- Porto, T.S.; Porto, C.S.; Cavalcanti, M.T.H.; Lima Filho, J.L.; Perego, P.; Porto, A.L.F.; Converti, A.; Pessoa Jr, A. (2006), Kinetic and thermodynamic investigation on ascorbate oxidase activity and stability of a *Cucurbita maxima* extract. *Biotechnol. Prog.*, 22, 1637-1642
- Quadros, P.A.; Baptista, C.M.S.G. (2003), Effective interfacial area in agitated liquid-liquid continuous reactors. *Chem. Eng. Sci.*, 58, 3935-3945
- Quan, D.; Kim, Y.; Shin, W. (2004), Sensing characteristics of tyrosinase immobilized and tyrosinase, laccase co-immobilized platinum electrodes. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 25, 1195-1201
- Romanovskaya, I.I.; Shesterenko, Yu. A.; Sevast'yanov, O.V. (2009), Elimination of phenol with the use of tyrosinase of fungi. *J. Water Chem. Technol.*, *3*, 135-138
- Rosatto, S.R.; Freire, R.S.; Duran, N.; Kubota, L.T. (2001), Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interest samples (in Portuguese). *Quim. Nova*, 24, 77-86
- Selles-Marchart, S.; Casado-Vela, J.; Bru-Martinez, R. (2006), Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobatrya japonica* lindl.): kinetic characterization and comparison with active form. *Arch. Biochem. Biophys.*, 446, 175-185
- Shibata, C.T.; Palma, M.S.A. (2009), Recovery of priority pollutants from aqueous solutions through liquid-liquid extraction with simultaneous treatment of acid gases. *Chem. Eng. Trans.*, 18, 285-290
- Theodore, L.; Buonicore, A.J.; McKenna, J.D.; Kugelman, I.J.; Jeris, J.S.; Santoleri, J.J.;
 McGowan, T.F. (1997), Waste Management. In-*Perry's Chemical Engineer's Handbook*, eds.
 R.H. Perry; J.O. Maloney. McGraw-Hill, New York. pp. 25.1-25.111
- Toral, M.I.; Beattie, A.; Santibañez, C.; Richter, P. (2002), Simultaneous determination of parathion and *p*-nitrophenol in vegetable tissues by derivative spectrophotometry. *Environ. Monit. Assess.*, 76, 263-274
- Viana, D.A.; Lima, C.A.; Neves, R.P.; Mota, C.S.; Moreira, K.A.; Cavalcanti, M.T.H.; Converti,
 A.; Porto, A.L.F. (2010), Production and stability of protease from *Candida buinensis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162, 830-842
- Worthington Enzyme Manual, http://www.worthington-biochem.com/TY/default.html, 2010, accessed on April 15th.

- Wuyts, N.; Waele, D.D.; Swennen, R. (2006), Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminate* Grande naine) roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 44, 308-314
- Yamada, K.; Tamura, T.; Azaki, Y.; Kashiwada, A.; Hata, Y.; Higashida, K.; Nakamura, Y. (2009), Removal of linear and branched *p*-alkylphenols from aqueous solution by combined use of *melB* tyrosinase and chitosan beads. *J. Polym. Environ.*, 17, 95-102

CAPÍTULO 2 – GENOTOXIC EFFECT OF PHENOL ON THE ROOTS OF ONION ALLIUM CEPA

Gisele Pigatto^{1,2}, Regildo Marcio Gonçalves da Silva³, Gian Luigi Mariottini⁴,

Vanessa Marques de Oliveira¹, Mauri Sergio Alves Palma¹, Attilio Converti^{2,*}

1. Department of Pharmaceutical and Biochemical Technology, Universidade de São Paulo, Sao Paulo, SP, Brasil.

2. Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, University of Genoa, Genova,

Italy

3. Department of Biology, Universidade Estadual Paulista, Assis, SP, Brasil

4. Department of Earth, Environment and Life Sciences, University of Genoa, Genova, Italy

Received accepted

• • •

Abstract: The root of *Allium cepa* stands out for having cells with large size and small number of chromosomes. These characteristics make them useful in bioassays allowing for the measurement of a variety of cytogenetic and morphological parameters, which may serve as toxicity indicators in the analysis of induction and formation of micronuclei and chromosomal aberrations frequency. To estimate the potential genotoxic effect of phenol-containing effluents, we studied in this work the influence of phenol concentrations on cells of the root of *Allium cepa* in terms of induced aberrations and micronuclei formation. It was shown that the higher the concentration of phenol added to the roots of *Allium cepa*, the higher the percentage of aberrant cells and micronuclei, then claiming the genotoxicity effect of this pollutant.

Key words: phenol, Allium cepa, toxicity, genotoxicity, roots

···· Received : Accepted

Biography : Gisele Pigatto (1983 —), female, student of the International Ph. D course of Chemical, Material and Process Engineering (Genoa University) and of Biochemical Pharmaceutical Technology (São Paulo University), E-mail: gi.pigatto@gmail.com; *Corresponding author. E-mail: converti@unige.it

Environmental pollution is a serious and global problem that affects the industrialized societies as well as the natural ecosystems mainly as a consequence of human productive activities and of the resultant resource exploitation ^[1,2].

A lot of environmental pollutants are known to be carcinogenic, mutagenic, or toxic ^[3] and among the damages caused by chemical agents to exposed organisms, the genotoxic effects have proven to be of great concern, because they can induce genetic damage, lead to various health problems and even affect the future generations if, as in the case of the mutagenic ones, they are inherited ^[4]. Furthermore, many enzymatic reactions as well as exogenous sources such as tobacco, smoke, radiations, auto-exhaust and pesticides are responsible for the formation of reactive oxygen species (ROS) as products or by-products, which can oxidize nucleic acids, proteins, lipids and carbohydrates ^[5,6,7] and contribute to the arising of many aging-related pathologies such as cancer and cardiovascular, inflammatory and neurodegenerative diseases ^[8,9,10], having also a genotoxic effect ^[11,12].

Therefore, in order to ensure environmental quality studies leading to the development of tests of mutagenicity and toxicity in a wide range of organisms, the need arose to identify the compounds that react with DNA ^[13] and the test-species useful to assess the activity and the damage of pollutants on living beings and on the ecosystems.

According to Grant ^[14], the higher plants are considered excellent genetic models to detect the damage caused by environmental pollutants and are often used in monitoring studies to evaluate the mechanisms of genetic damage, ranging from mutations to chromosomal aberrations, in cells of different organs and tissues such as leafs, roots and pollen. Plant bioassays are considered sensitive towards directly active mutagens such as herbicides, pesticides, heavy metals and radionuclides and furthermore they are known to have a broad detection spectrum ^[15]. In order to assess the environmental contamination, the most used plant species are *Allium cepa*, *Vicia faba, Zea mays, Tradescantia* spp., *Nicotiana tabacum, Crepis capillaris* and *Hordeum vulgare* ^[14].

According to Leme and Marin-Morales ^[16] the *Allium cepa* bioassay is considered one of the most efficient routinely used approaches to assess the toxic effects of chemicals in the environment. This assay presents also some additional advantages including the possibility of measuring macroscopic and microscopic parameters and disturbances in the mitotic cycle,

because of the presence of a reduced number (2n = 16) of large chromosomes ^[17]. Moreover, this test also allows the analysis of the action mechanisms of the tested agents on exposed organisms' DNA. Therefore, it is an important method for the screening of the environmental contamination and the obtained results can be applied as a warning to other test systems ^[16].

The *Allium cepa* test has already been applied also in the evaluation of the genotoxicity of industrial wastewaters ^[18] as well as to assess petroleum biodegradation in contaminated soils and sludge and can also be considered useful to evaluate the detoxification of pollutants in bioremediated soils ^[19,20].

Phenols and their derivatives commonly exist in the environment being formed during natural processes. Furthermore, they are contained in dyes, polymers and drugs; in the environment they can occur in industrial and municipal sewages and derive from the degradation of pesticides; being ubiquitous environmental pollutants, phenols are widely used reference toxicants in bioassays ^[21]. Phenols are ecotoxic, have peroxidative capacity and can generate organic radicals and ROS; therefore they result harmful for organisms (including humans); in particular, they have been indicated to be hematotoxic, hepatotoxic, mutagenic and carcinogenic ^[22] and can be fatal when used in human therapy ^[23].

On this basis, the objective of this study was to evaluate the genotoxic effects caused by different concentrations of phenol in phosphate buffer on the roots of *A. cepa*, mainly in terms of the presence of micronuclei and aberrant cells in anaphase and telophase.

1 Material and methods

We used 60 healthy *Allium cepa* bulbs of uniform size (3.0 to 3.5 cm in diameter) and mass (15 g \pm 400 mg) obtained from a commercial source. After removal of skin, the bulbs of *Allium cepa* were cut and put in glass beakers with their lower ends immersed in mineral water, kept in a BOD incubator (Buker/Nova Técnica, model NT 708) at controlled temperature (22 \pm 2°C) and 6/18 dark/light photoperiod, (São Paulo - SP, Brazil). After 48 hours, grown roots reached an average length of 2.0 cm were harvested for tests. Phenol solutions in phosphate buffer (pH 6.6, 0.05M), prepared by adding K₂HPO₄ and KH₂PO₄ diluting with distilled water and added to the phenol at the desired concentrations. (0.01, 0.5, 1.0 mg/L), were put into contact with 18 bulbs each. Six of the remaining bulbs were used for the preparation of negative control (mineral water)
and the other 6 for that of positive one, 10 mg/L of methyl methanesulfonate (MMS), prepared with 7.7 microlitres of MMS in 1000 ml of Milli-Q water. Incubations lasted 48 hours for all treatments except for the positive control (6 hours).

All the roots have gone through a recovery period of 48 hours in the solution of Hoagland and Amon ^[24], prepared with: 60mg/L of CaSO₄, 60mg/L of MgSO₃, 96mg/L of NaHCO₃, 4mg/Lof KCl and 1000ml of Milli-Q water, which was renewed every 24 hours. After this period, 0.5 cm from the apex of 6 roots were separated from each bulb and immediately fixed in acetic acid/ethanol (1/3) solution for 24 hours. Roots were washed in distilled water to remove the excess of this solution, treated at 60° C for 10 minutes with 45% acetic acid and HCl (1N) solutions in proportion of 9:1 to promote the maceration, and finally placed on a slide. The first millimeter of the root apex was removed so that the remaining 2 mm corresponding to the meristematic region or to the generation of F1 cells could be utilized for optical microscopy analysis (Zeiss KF-2 Microscope, Freiburg, Germany). The sections were stained with 2% carmine staining solution in 45% acetic acid (Acetocarmine) for the identification of nuclei, micronuclei and aberrations. To this purpose, cells were counted at $400 \times$ magnification to determine the frequency of micronuclei ^[4].

2 Results

Table 1 shows the results of the treatment employing the genotoxicity testing of *Allium cepa* at different phenol concentrations (0.01, 0.5 and 1 mg/L). It can be observed that the meristematic cells in the roots of *Allium cepa* exposed to these phenol concentrations showed an increase in the frequency of aberrant cells for both phases: anaphase and telophase (Table 1). A larger number of aberrant cells was observed at high phenol concentrations, describing a concentration-dependent action, because the higher was the concentration of phenol the higher was the appearance of aberrant cells (0.01mg/L = 25, 0.5 mg/L = 41 and 1.0 mg/L = 62), indicating the genotoxicity of this compound on the root cells of *Allium cepa*.

Treatments	% Mitotic	Aberrations		Total	% Average of
	Index			Aberrant	Aberrant Cells
	\pm SD			Cells	\pm SD
mg/L		Anaphase	Telophase		
NC	13.92±1.90	19	19	38	0.76±0.19
0.01	2.10±0.79	22	03	25	$0.54{\pm}2.40$
0.5	1.57 ± 1.07	37	04	41	1.06 ± 5.60
1.0	1.64 ± 0.62	46	16	62	1.24±4.24
PC	6.14±0.48	62	43	105	2.10±0.12

Table 1. Effect of genotoxicity in Allium cepa cells at three different phenol concentrations0.01, 0.5 and 1 mg/L. NC: negative control; PC: positive control; SD = standard deviation.

The *Allium cepa* test also evaluated the frequency of micronucleated cells, resulting from damage occurring in the DNA molecule. Thus, we observed an increase in the micronuclei number in the experimental groups being visible when compared with the negative control. The higher the concentration of phenol in the roots of *Allium cepa*, the higher also the occurrence of micronuclei (Table 2).

Table 2. Micronuclei in Allium cepa root cells treated with different phenol concentrations
(0.01, 0.5 and 1 mg/L). Negative control (NC) treated with mineral water and positive
control (PC) treated with 10 mg/L Methyl methanesulfonate (MMS). SD = standard

deviation.							
Treatment (mg/L) Micronuclei ± SD							
NC	1.0±0.25						
0.01	3.6±0.61						
0.5	4.0 ± 0.08						
1.0	5.2±0.84						
PC	16.4±2.30						

3 Discussions

Considering the experimental data, the results obtained so far in this paper show that different phenol concentrations (mg/L) induced an increase of chromosome aberrations and micronuclei formation that anyhow did not reach the high values recorded for the reasonably anticipated human carcinogen MMS^[25] assumed as positive control.

The negative control showed always a lower occurrence of micronuclei and chromosomal aberrations in comparison with that observed in phenol-treated samples, with the exception of the average percent of aberrant cells induced by the lowest phenol concentration that showed a result close to that of the negative control thus indicating that a low phenol amount presumptively does not affect appreciably this parameter.

The mutagenic activity of industrial effluents and surface water was demonstrated by a variety of bioassays ^[26,27] and the presence of potentially genotoxic and mutagenic compounds can be easily detected through the use of *Allium cepa* ^[19]. This is due to the fact that the meristematic and F1 cells of this plant have some characteristics that allow to carry out the cytogenetic study, therefore, they are recommended to evaluate chromosomal aberrations and micronuclei formation for the assessment of environmental pollutants ^[20]. In this connection, according to different authors ^[28,29,30,31] the evaluation and determination of the frequency of micronuclei in cells of *A. cepa* represents one of the most widely used tools in biomonitoring studies.

The usefulness of *Allium cepa* for the assessment of environmental contaminants and xenobiotics has been repeatedly emphasized. *Allium cepa* test was applied to analyze the presence of BTEX compounds, which presented a genotoxic and mutagenic effect for meristematic cells, even when tested at low concentrations ^[32]. These same authors concluded that *Allium cepa* is an efficient test-species to evaluate the toxic effects induced by petroleum hydrocarbons, such as BTEX; furthermore, the chromosome aberration test and the micronucleus test were shown to be sensitive tools to detect DNA damage induced by different compounds.

According to Fatima and Ahmad ^[33], the EROD (7-ethoxy resorufin O-deethylase) used as a potential biomarker of pesticide pollution was investigated applying the *Allium cepa* system. Its activity was analysed after exposition to six model pesticides viz. 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), hexachlorobenzene (HCB), malathion (MAL), carbaryl, dichlorodiphenyl

trichloroethane (DDT) and endosulphan, as well as to wastewater samples collected from the industrial areas of Aligarh and Ghaz-iabad cities of Uttar Pradesh, India. *Allium cepa* EROD has a high sensitivity and a wide range between the basal and the induced level and is therefore indicated to be a good biomarker for the detection of certain pesticide residues in water samples. The EROD assay in *A. cepa* system is of great importance because it allows to detect the possible presence of these pesticides in the test water sample before using expensive analytical techniques such as HPLC (High performance liquid chromatography) and GC (Gas chromatography).

Phenols have be repeatedly indicated to be toxic for organisms including humans where the major toxic manifestations include chemical burns, lethargy, coma and cardiac dysrhythmias ^[34]; the toxicity of these compounds has been recently investigated in recombinant bacteria ^[35], in macrophytes ^[21], and in cultured cells ^[36]; a radical-mediated process was supposed to exist in biological interactions involving phenols ^[37]. The cytotoxicity on cultured cells ^[38] and the activity at protein and gene levels ^[39] as well as the action on frond multiplication and colony disintegration in aquatic macrophytes ^[21] induced by phenols were indicated to be concentration-dependent.

Herrero et al. ^[40] evaluated the toxicity of the 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol (triclosan), an anti-bacterial ingredient present in many healthcare products and cosmetics that are found in the aquatic environment ^[41,42], using of the *Allium cepa* test. The triclosan (TCS) caused dose-dependent reduction of onion roots length and chromosome stickiness in anaphase and telophase ^[40]. According to other recent studies ^[43,44] increasing levels of TCS exposure reduced the growth of *A. cepa* roots.

According to Fiskesjo^[45] the chromosome stickiness was the most frequent abnormality detected in the *A. cepa* root after triclosan treatment leading to cell death as well as the folding of chromosome fibres into single chromatids^[46]. Anaphase and telophase bridges were also observed resulting probably from sticky chromosomes, and impaired chromosome segregation that suggest a mitotic spindle disturbance. The *A. cepa* biossay is also considered very important to analyse the toxic potential of unregulated substances and chemical mixtures that are found mainly in the aquatic environment.

The micronucleus test is a cytogenetic test investigating cells previously exposed to chemical agents, in order to detect possible chromosomal aberrations ^[47,48]. It is known that the

micronucleus is formed by a new membrane developing around the chromatin matter that during the anaphase of the mitosis failed to move to either pole. Such chromatin matter arises either from anomalous disjunction of chromosomes due to breakage of chromosomes spindle or abnormalities resulting in the formation of chromatin bridges, dicentric chromosomes and acentric fragments. Therefore, the induction of micronuclei suggests that the pesticide residues in the vegetables may act either as spindle inhibitors or clastogens ^[49].

In this work was shown that the presence of micronuclei in cells treated with phenol, a compound occurring in pesticides, was higher at all evaluated concentrations in comparison with the negative control and was always lower in comparison with the positive control. As concerns chromosome aberrations, excluding the lowest utilized concentration, the higher was the concentration of phenol in the roots of *Allium cepa*, the greater was the number of aberrant cells, demonstrating the genotoxicity of this compound.

The lower sensitivity of the chromosomal aberration test in *Allium cepa* compared to the *Allium cepa* micronucleus test can be explained by the fact that DNA damage, laggards and bridges are more associated with chromosomal aberrations. On the other hand, the induction of micronuclei in root meristems of *Allium cepa* and the consequent increase in the number of aberrant cells is the manifestation of chromosome damage and disturbance of the mitotic processes induced by phenol^[50].

On the whole, the data of the present study showed that a particular attention should be given to the action of emerging contaminants in higher plants, particularly through the utilization of suitable test systems, in order to counter the underestimation of their environmental risks.

Acknowledgments The authors wish to thank CAPES, Coordination of Improvement of Higher Education Personnel Sao Paulo for financial support.

Biography: Attilio Converti (1957 –), male, professor, and advisor at Genoa University of the International Ph. D course of Chemical, Material and Process Engineering (Genoa University) and of Biochemical Pharmaceutical Technology (São Paulo University). The study area is industrial and environmental biotechnology. Email: <u>converti@unige.it</u>.

References

 Brendecke JW, Pepper IL. The extent of global pollution. In: Pollution Science (IL Pepper, CP Gerba, ML Brusseau Eds.), Academic Press Inc., San Diego, CA, USA, 1996, Chapter 1: 3–8.
 Yaron B, Calvet R, Prost R. Soil pollution. Processes and dynamics. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, 1996: pp. 313.

[3] Gerba CP. Principles of toxicology. In: Pollution Science (IL Pepper, CP Gerba, ML Brusseau Eds.), Academic Press Inc., San Diego, CA, USA, 1996, Chapter 21: 323–344.

[4] Ribeiro LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: Mutagênese Ambiental (LR Ribeiro, DMF Salvadori, EK Marques Eds.), Ulbra, Canoas, 2003, cap 8: 201–219.

[5] Halliwell B. Oxygen radical, nitric oxide and human inflammatory joints disease. Annals of the Rheumatic Diseases – BMJ Journal, 1995, 54: 505–510.

[6] Bendich A. Antioxidants, vitamins and immune responses. Vitamines & Hormones Journal, 1996, 52: 35–62.

[7]Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chemistry, 2007, 104: 21–29.

[8] Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. Free Radical Biology & Medicine, 1990, 8: 583–599.

[9] Wiseman H, Halliwell B. Damaging to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochemical Journal, 1996, 313: 17–29.

[10] Borek C. Antioxidants and cancer. Science & Medicine, 1997, 4: 52-61.

[11] Camoirano A, De Flora S, Dahl TA. Genotoxicity of volatile and secondary reactive oxygen species generated by photosensitization. Environmental and Molecular Mutagenesis, 1993, 21(3): 219–228.

[12] Konat GW. H2O2-induced higher order chromatin degradation: A novel mechanism of oxidative genotoxicity. Journal of Biosciences, 2003, 28(1): 57–60.

[13] Marin-Morales MA, Mazzeo DEC, Fernandes TCC. Cellular damages in the *Alliun cepa* test system caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process, Chemosphere, 2011, 85:
 1–40.

[14] Grant WF. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. Mutation Research, 1994, 310: 175–185.

[15] Majer BJ, Grummt T, Uhl M, Knasmueller S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica, 2005, 33: 45–55.

[16] Leme D, Marin-Morales M. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application, Mutation Research, 2009, 682: 71–81.

[17] Fiskesjo G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, Hereditas, 1985, 102: 99–112.

[18] Şik L, Acar O, Aki C. Genotoxic effects of industrial wastewater on *Allium cepa* L.. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(9): 1919–1923.

[19] Souza TS, Hencklein FA, Angelis DF, Gonçalves RA, Fontanetti CS. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72: 1363–1368.

[20] Bosio Tedesco S, Laughinghouse HD. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. In: Environmental Contamination (J Srivastava Ed.), ISBN: 978-953-51-0120-8, InTech, 2012, 137– 156.

[21] Park J-S, Brown MT, Han T. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata*. Aquatic Toxicology, 2012, 106-107: 182–188.

[22] Michałowicz J, Duda W. Phenols – sources and toxicity. Polish Journal of Environmental Studies, 2007, 16(3): 347–362.

[23] Philip AT, Marraffa JM. Death following injection sclerotherapy due to phenol toxicity. J. Forensic Sci., 2012, 57(5): 1372–1375.

[24] Hoagland DR, Amon DI. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, 1950, 347: 1–32.

[25] National Toxicology Program, Department of Health and Human Services. Report on Carcinogens, Twelfth Edition, 2011, 268. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/ MethylMethanesulfonate.pdf

[26] Kungolos AG, Brebbia CA, Samaras CP, Popov V. Environmental Toxicology. WIT Press, Southampton, 2006: 362. [27] Žegura B, Heath E, Černoša A, Filipič M. Combination of *in vitro* bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere, 2009, 75: 1453–1460.

[28]Ateeq B, Adul-Farrah, M, Ali MN, Ahmad W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2-4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. Mutation Research, 2002, 514: 5–113.

[29] Matsumoto ST, Marin-Morales MA. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. Cytologia, 2004, 69: 399–408.

[30] Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 88: 252–259.

[31] Caritá R, Marin-Morales MA. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes, Chemosphere, 2008, 72: 722–725.

[32] Mazzeo DEC, Levy CE, Angelis DG, Marin-Morales MA. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. Science of the Total Environment, 2010, 408(20): 4334–4340.

[33] Fatima RA, Ahmad M. *Allium cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. Chemosphere, 2006, 62: 527–537.

[34] Bey TA, Walter FG. Glucagon and phenol toxicity. Annals of Emergency Medicine, 1997,

30(3): 353--354.

[35] Liu XX, Li JY, Yu JX, Sun ShQ, Wang YJ, Liu HX. QSAR of acute toxicity of halogenated phenol to green fluorescent protein by using density functional theory. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 89(5): 950–954.

[36] Pedersen G, Brynskov J, Saermark T. Phenol toxicity and conjugation in human colonic epithelial cells. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 2002, 37(1): 74–79.

[37] Selassie CD, DeSoyza TV, Rosario M, Gao H, Hansch C. Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process? Chemico-Biological Interactions, 1998, 113: 175–190.

[38] Soekanto A, Kasugai S, Mataki S, Ohya K, Ogura H. Toxicity of camphorated phenol and camphorated parachlorophenol in dental pulp cell culture. Journal of Endodontics, 1996, 22(6): 284–286.

[39] Xiao X, Wentao S, Yongyi B. Role of DNA-PKcs in the biological effect of a benzene metabolite: Phenol toxicity to human K562 cells in vitro. Chemico-Biological Interactions, 2010, 184: 302–305.

[40] Herrero O, Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Carvajal López L, Peropadre A, Hazen MJ. Toxicological evaluation of three contaminants of emergine concern by use of the *Allium cepa* test. Mutation Research, 2012, 743: 20–24.

[41] Lindström A, Buerge IJ, Poiger T, Bergqvist P-A, Muller MD, Buser H-R. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater, Environmental Science & Technology, 2002, 36: 2322–2329.

[42] Singer H, Muller S, Tixier C, Pillonel L. Triclosan occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments, Environmental Science & Technology, 2002, 36: 4998–5004.

[43] Liu F, Ying GG, Yang LH, Zhou QX. Terrestrial ecotoxicological effects of the antimicrobial agent triclosan, Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72: 86–92.

[44] Stevens KJ, Kim SY, Adhikari S, Vadapalli V, Venables BJ. Effects of triclosan on seed germination and seedling development of three wetland plants: *Sesbania herbacea, Eclipta prostrata*, and *Bidens frondosa*, Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28: 2598–2609.
[45] Fiskesjo G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytologic parameters. In: Plants for Environmental Studies (W Wang, J Gorsuch, J Hughes Eds.), CRC Lewis Publishers,

New York, 1997: 308–333.

[46] Klášterská I, Natarajan AT, Ramel C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations, Hereditas, 1976, 83: 153–162.

[47] Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research, 2000, 455: 81–95.

[48] Leme DM, Angelis DF, Marin-Morales MA. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells, Aquatic Toxicology, 2008, 88: 214–219.

[49] Feretti D, Zerbini I, Zani C, Ceretti E, Moretti M, Monarca S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. Food Additives and Contaminants, 2007, 24(6): 561–572.

[50] Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi MR, Zijno A, Norppa H, Fenech M. An increase micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis, 2007, 28(3): 625–631.

CAPÍTULO 3 - A NEW KINETIC AND THERMODYNAMIC APPROACH TO PHENOL BIOSORPTION BY CHITOSAN AND KERATIN

Attilio Converti¹, Milena Nakagawa², Gisele Pigatto^{1,2}, Alessandra Lodi¹, Bronislaw Polakiewicz², Elisabetta Finocchio¹, Mauri Sérgio Alves Palma^{2,*}

¹ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, University of Genoa, Pole of Chmical Engineering, Via Opera Pia 15, I-16145, Genoa, Italy

² Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av. Prof Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900, São Paulo, Brazil

+55-11-3091-2387;

Fax:+55-11-3815-6386

^{*}Author to whom all correspondence should be addressed: email: msapalma@uspbr; Phone:

Abstract

Chitosan and keratin were tested as low cost biosorbents to remove phenol from water solutions at variable temperature (20-50°C), initial phenol concentration (10-90 mg L⁻¹) and pH (5.0-10.0). The pseudo-second order kinetic model exhibited the best fit and allowed estimating sorption capacities of 4.51 mg g⁻¹ for keratin and 2.87 mg g⁻¹ for chitosan. Equilibrium isotherms, described at best by the Freundlich model, pointed out that phenol sorption capacity of keratin was one order of magnitude higher than that of chitosan. Results revealed the occurrence of a sorbent thermoinactivation equilibrium that was investigated through a novel thermodynamic approach. The main functional groups involved in phenol sorption by both raw and phenol-bound materials were identified by FT-IR spectroscopy.

Key words: biosorption, chitosan, keratin, phenol, thermodynamics

1 Introduction

Phenols generated from oil, gasoline coal, paper, textile synthetic rubber and pharmaceutical industries are common pollutants responsible for toxic effects on humans (Manahan, 1991). They can be removed from wastewaters by chemical oxidation (Körbahti and Tanyolaç, 2003), solvent extraction (Yang et al., 2006), separation with membranes (Goncharuk et al., 2002) or biological treatments (Crisafully et al., 2008). An effective alternative way may be the adsorption process, which is mostly applied to remove organic pollutants (Crisafully et al., 2008).

Activated carbon is the mostly used adsorbent, but other materials such as bentonite, resins, alumina, zeolites and fly ash were successfully employed (Ahmaruzzaman, 2008). In recent years, biomaterials have increasingly been used as a promising alternative, being largely available as low cost raw materials or even as industrial wastes. In particular, keratin (Banat and Al-Asheh, 2000) and chitosan (Li et al., 2009) sources were shown to effectively biosorb phenol and its derivatives.

Chitin is a natural polymer of N-acetylglucosamine units linked by $\beta(1-4)$ glycosidic bonds, mainly present in the exoskeletons of crabs and other pods (Berkeley, 1979), from which chitosan is obtained by acetamide groups deacetylation by strong alkaline solutions. Chitosan environmental applications include the treatment of wastewaters, paper and agricultural residues. It is also used in the production of pharmaceuticals, medical, biotechnological and food products, cosmetics, textiles and membranes (Struszczyk, 2002). Maximum phenol removal efficiency (η) of 85% and biosorption capacity (q_e) of 25 mg g⁻¹ were reported for chitosan at pH 4.0 and 25°C (Yan, 2006).

Keratin is a fibrous protein with three dimensional shape of α -helix (α -keratin) or β pleated sheets (β -keratin), consisting of about 15 amino acids, particularly cysteine. These structures result from keratin amino acids interactions through H and disulfide bonds. Keratin, which is abundant in nature, especially in hair and feathers (Banat and Al-Asheh, 2000, 2001), was successfully used for metal removal (Touaibia and Benayada, 2005). Banat and Al-Asheh (2000) utilized keratin wastes like feathers to remove phenol from water and obtained maximum q_e of 5 mg g⁻¹ after 25 h at 20°C, pH 8.0, 50 mg L⁻¹ initial phenol concentration and 10 g L⁻¹ biosorbent dosage.

The present study aims at providing a systematic study on the use of chitosan and keratin as biosorbents for the removal of organic pollutants, taking phenol as a model.

2 Experimental

2.1 Biosorbent Preparation

Low molecular weight-chitosan was prepared from purified chitin power (Sigma-Aldrich Co., Milan, Italy) by treatment with 47% NaOH at 60°C under nitrogen environment for 2 h (Mima et al., 1983). Samples were centrifuged at 5000 g for 20 min, and the precipitate was washed with distilled water at 80°C until pH 7.0 and then lyophilized.

Keratin was obtained by poultry feathers extrusion (Barone et al., 2006). Feathers were ground by ball mill and treated in stainless steel grinding vessel with 2% sodium sulfite solution (120°C for 2 h) to break S-S bonds among cysteine residues. The resulting pulp was dried at 40°C for 12 h and used as biosorbent.

2.2 Batch Biosorption Tests

Batch tests were carried out in triplicate to study the influence of pH, initial phenol concentration (C_0) and temperature (T) on phenol biosorption. Seeking future industrial application of results, the ranges of these variables ($5.0 \le \text{pH} \le 10.0$; $20 \le T \le 50^{\circ}\text{C}$; $10 \le C_0 \le 90$ mg L⁻¹) were selected based on literature (Milhome et al., 2009). All experiments were carried out at the selected T for 24 h in 200 mL-Erlenmeyers containing 100 mL of phenol solutions shaken at 150 rpm, model RSB-12 (Remi, Laboratory Instruments, Mumbai, India). A biosorbent dosage of 10 g L⁻¹ was selected based on the average of values reported in the literature for phenol removal by similar materials (Banat and Al-Asheh, 2001; Milhome et al., 2009; Yan, 2006). A stock phenol solution (1.0 g L⁻¹) was prepared by dissolving phenol loose crystals (purity $\ge 99.0\%$) (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) in high-purity deionized water and stored at $\pm 4^{\circ}$ C, and then diluted according to the selected C_0 .

To investigate the effect of pH, 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH solutions were added up to the selected pH, while *T* and C_0 were kept at 30°C and 50 mg L⁻¹, respectively. To study the effects of *T* and C_0 , tests were carried out at pH 8.0 alternately varying *T* in the range 20-50°C ($C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$) or C_0 in the range 10-90 mg L⁻¹ ($T = 30^{\circ}$ C).

Samples (1.0 mL) were withdrawn at fixed times (2-24 h) and filtered through membrane filters with 0.2 μ m-pore diameter (Millipore, Vimodrone, Italy). Phenol concentration was determined by a UV/Vis spectrophotometer, model Lambda 25 (Perkin Elmer, Milan, Italy), following color development resulting from phenol reaction with 4-aminoantipyrine at 510 nm

(Rawajfih and Nsour, 2006). Results collected versus time were used for kinetic studies, while those at equilibrium for the isotherm ones.

Phenol removal efficiency, η , was calculated as the ratio of mass of removed phenol to that at the beginning and expressed as a percentage, while sorption capacity of each material at equilibrium, q_e , as the ratio of mass of removed phenol to that of biosorbent and expressed as mg g⁻¹.

2.3 FT-IR Spectra

Samples of both biosorbents either before or after phenol sorption were prepared for FT-IR analysis by dilution of pure powders in KBr disks and analyzed in the range of 4000-500 cm⁻¹ using a Nicolet 6700 FT-IR instrument (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) equipped with DTGS-KBr detector and OMNICTM acquisition software. Acquisition was 100 scans for each spectrum, and resolution 2 cm^{-1} . To prepare samples, biosorption was performed using a 50 mg L⁻¹ phenol solution at pH 8.0, 30°C and 10 g L⁻¹ of biosorbent. Samples taken at the start (control) and after 24 h were washed with deionized water to remove impurities. Phenol-loaded and raw biomasses were dried at 50°C for 24 h, mixed with KBr and then ground in an agate mortar for disks preparation.

3 Theory

The most common kinetic and isotherm models, described in detail in previous study (Daneshvar et al., 2012), were applied to elucidate phenol biosorption.

3.1 Biosorption Isotherms

Reversible adsorption onto heterogeneous surface and multilayer adsorption is described by the Freundlich model:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$$
(1)

where C_e is sorbate concentration in liquid phase at equilibrium, K_F the Freundlich constant and *n* an empirical parameter related to biosorption intensity.

The Langmuir model, based on the assumption of monolayer adsorption onto a surface with finite number of identical and homogeneous sites, is described by the equation:

$$q_{e} = \frac{q_{0} K_{L} C_{e}}{1 + K_{L} C_{e}}$$
(2)

where q_0 is the sorbent monolayer sorption capacity and K_L the Langmuir constant depending on adsorption energy.

The Dubinin and Radushkevich (D-R) model, which is based on Polany's adsorption potential theory and Dubinin's minipore filling theory, is described as:

$$q_{\rm e} = q_{\rm s} \exp\left(-\beta\varepsilon^2\right)$$
(3)

where q_s is the maximum adsorption capacity at equilibrium, β the activity coefficient related to both C_e and the mean sorption free energy (*E*), and ε the temperature-dependent Polanyi potential.

Finally, the Temkin isotherm assumes that adsorption heat of molecules of a layer decreases linearly with adsorbent surface coverage due to sorbate/sorbent interactions and that adsorption is characterized by uniform distribution of binding energies, up to a maximum value. It is described by the equation:

$$q_{\rm e} = \frac{RT}{b_T} \ln \left(K_T \, C_e \right) \tag{4}$$

where K_T is the equilibrium binding constant corresponding to maximum binding energy, b_T the Temkin isotherm constant related to adsorption heat and *R* the ideal gas constant.

3.2 Biosorption Kinetics

The linear form of the pseudo first-order Lagergren equation can be written as:

$$\ln\left(q_e - q_t\right) = \ln q_e - k_1 t \tag{5}$$

where q_t is the adsorbed phenol amount per g of sorbent at time t and k_1 the pseudo-first-order rate constant.

The pseudo second-order model of Ho and McKay can be written in its linearized form

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$$
(6)

as:

where k_2 is the pseudo second-order rate constant.

To elucidate the nature of the adsorption-controlling step, it is often used the intraparticle diffusion model, which is described by the equation:

$$q_t = k_{id} t^{1/2} + C$$
(7)

where C is the intercept and k_{id} the intraparticle diffusion rate constant.

4 Results and Discussion

4.1 Effect of Initial pH

As shown in Table 1, even though the removal patterns of chitosan and keratin were qualitatively similar, the latter material exhibited a maximum sorption capacity at pH 7.0 ($q_e = 4.52 \text{ mg g}^{-1}$) that was almost twice that of the former at pH 8.0 ($q_e = 2.71 \text{ mg g}^{-1}$), while marked decreases took place either under very acidic or alkaline conditions.

Table 1

A possible explanation of this behavior of chitosan is that the NH₂ groups released by chitin deacetylation are not ionized at pH >> 8, but phenol dissociation equilibrium is directed towards the negatively-charged phenolate ($pK_a = 9.9$), thus preventing the formation of H-bonds between OH and NH₂ groups. Oppositely, under acidic conditions, phenol is mostly present in its undissociated form, but the NH₂ groups are protonated and then unable to bind it. The best compromise between these opposite tendencies was likely met at pH \cong 8 favoring phenol biosorption; therefore, all subsequent experiments were carried at pH 8.0. Keratin exhibited qualitatively the same behavior as chitosan, because its β -sheets expose to the outside of protein structure a large number of NH₂ and C=O groups able to link phenol.

Most of studies carried out with these materials dealt with other sorbates such as metals, polyphenols and dyes. Nevertheless, a comparison can be made with the work of Yan (2006),

who observed an optimum pH of 4.0 likely due to a different deacetylation degree. On the other hand, Milhome et al. (2009) observed the highest phenol removal by chitosan under more acidic conditions (pH 1-2). These observations suggest that there is a large variability in chitosan behavior depending on its source or preparation.

4.2 Effect of Contact Time

Keratin, being able to remove more than 80% of starting phenol within the first 2 h, exhibited better performance than chitosan, which lasted twice as long to remove less than 50% (Fig. 1). Nonetheless, both biosorbents showed the typical three-step behavior of any adsorbent: a) most of phenol was removed within the first hours because of the large number of free sites available for sorption on their surface, b) then the adsorption rate decreased due to their progressive saturation, and c) the adsorption reached equilibrium after about 24 h.

Figure 1

4.3 Effect of Initial Phenol Concentration

Biosorption capacity increased with initial phenol concentration (C_0) (Fig. 2) as the likely result of an increased number of attractive interactions between phenol and sorbent. Although it reached maximum values of 8.2 and 4.7 mg g⁻¹ with keratin and chitosan, respectively, it is noteworthy that a saturation phenomenon would be expected at C_0 values higher than those tested in this work. Higher q_e was reported for chitosan (21.5 mg g⁻¹) (Dursun and Kalayci, 2005) under highly acidic conditions, which however would be inconsistent with the application purposes of this study, and lower q_e for commercial chitosan (1.9-2.5 mg g⁻¹) (Li et al., 2009), likely due to a lower deacetylation degree.

Figure 2

4.4 Equilibrium Isotherms

The most effective isotherm models were the Langmuir $(0.980 \le R^2 \le 0.983)$ and Freundlich $(0.966 \le R^2 \le 0.991)$ ones (Table 2); therefore, phenol sorption was likely to follow an intermediate behavior between a mono- and a multilayer adsorption mechanism, and the biosorbent surface may be considered a semi-homogeneous one. The good applicability of the Freundlich model suggests that phenol concentration on biosorbent increased with its concentration in solution, and n > 1 confirms favorable adsorption. Although the adsorption intensity was almost coincident for the two biosorbents ($1.18 \le n \le 1.19$), the better performance of keratin is confirmed by an adsorption constant ($K_F = 1.34 \text{ mg}^{1-1/n} \text{ L}^{1/n} \text{ g}^{-1}$) about one order of magnitude higher than with chitosan. The results obtained with chitosan are close to those of literature despite of different environmental conditions (n = 1.54; $K_F = 0.10 \text{ mg}^{1-1/n} \text{ L}^{1/n} \text{ g}^{-1}$) (Milhome et al., 2009).

Table 2

The biosorption energy estimated in this work by the Dubinin and Radushkevich (D-R) model with both sorbents (0.755 $\leq R^2 \leq 0.829$) was significantly low (0.30 $\leq E \leq 0.72$ kJ mol⁻¹), which suggests that phenol may have been physisorbed, consistently with the fact that it should be present in solution prevalently in its undissociated form at pH 8.0.

Finally, the values of the Temkin parameters listed in Table 2 ($0.813 \le R^2 \le 0.925$) suggest uniform distribution of binding energy up to a maximum value and that phenol biosorption is an exothermic process, especially with chitosan ($b_T = 1.48$ g kJ mg⁻¹ mol⁻¹). Consistently with its better performance, the equilibrium binding constant with keratin ($K_T = 1.56$ L mg⁻¹) was about 6-fold that with chitosan, pointing out a higher maximum binding energy.

4.5 Kinetic Study

The pseudo second-order model exhibited by far the best fit with both biosorbents (0.994 $\leq R^2 \leq 0.999$) (Fig. 3), even though the pseudo first-order one gave estimated values of q_e closer to the experimental ones (Table 3). On the contrary, the intraparticle diffusion model was shown to be unsatisfactory.

Figure 3 and Table 3

These results suggest that phenol sorption by both biomaterials may have been kinetically controlled by chemisorption. This rationale is only apparently in contrast with earlier isothermal information, in that sorption could have been subject in a former step to kinetic control by surface exchange reactions up to full involvement of surface active sites, and then in a latter step to a thermodynamic one (physical control at equilibrium) where sorbate molecules entered by diffusion the biosorbent network for further interactions.

Values of q_e estimated by the pseudo second-order model were 4.51 and 2.87 mg g⁻¹ for keratin and chitosan, respectively, and those of the corresponding rate constant (k_2) 1.01 and

0.226 g mg⁻¹ h⁻¹, which is consistent with the presence of a large number of NH_2 and C=O groups in keratin structure as well as its better performance compared to chitosan.

Kinetic parameters estimated by the first-order model are comparable with those reported by Milhome et al. (2009) for chitosan.

4.6 Effect of Temperature and Biosorption Thermodynamics

With keratin, q_e progressively increased from 4.24 to 4.93 mg g⁻¹ when temperature was raised from 20 to 30°C, which means that phenol biosorption is an endothermic process in this *T* range. However, a slow decrease took place at higher *T* (to 4.65 mg g⁻¹ at 50°C), highlighting insufficiency of the Arrhenius approach. A similar trend was observed with chitosan that, however, exhibited lower q_e values (2.6-3.3 mg g⁻¹). Such a bell-shaped temperature dependence of q_e was not yet reported in previous studies. Nevertheless, such a behavior is the rule in biosystems (Roels, 1983); therefore, it should be expected also when biosorbents are used.

Being it so, we can suppose the e of an adsorption equilibrium described as:

$$\begin{array}{ccc} & K_D \\ A + P & \overleftarrow{\longrightarrow} & AP \end{array}$$

where A is biosorbent, P phenol, AP biosorbent pellet with adsorbed phenol and K_D the related equilibrium constant.

(8)

For analogy with biosystems (Roels, 1983), we can also suppose the occurrence of an additional equilibrium responsible for temperature-controlled inactivation of functional groups on biosorbent surface:

$$\begin{array}{ccc} & K_I \\ A & \leftrightarrows & I \end{array} \tag{9}$$

where I is the inactivated form of biosorbent and K_I the related equilibrium constant. By combining these equilibria, we obtain:

$$\frac{q_{e}}{C_{e}} = \frac{K_{D}}{1+K_{I}}$$
(10)

and applying the well-known equation $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K$ to both K_D and K_I , we can express this ratio as function of the thermodynamic parameters of both biosorption and biosorbent inactivation:

$$\frac{q_{e}}{C_{e}} = \frac{A \exp\left(-\frac{\Delta H^{e} D}{RT}\right)}{1 + B \exp\left(-\frac{\Delta H^{e} I}{RT}\right)}$$
(11)

where $\Delta H^{\circ}{}_{D}$ and $\Delta H^{\circ}{}_{I}$ are the standard variations of biosorption and inactivation enthalpies, respectively, and *A* and *B* pre-exponential factors depending on their respective standard entropy variations ($\Delta S^{\circ}{}_{D}$ and $\Delta S^{\circ}{}_{I}$).

At *T* values lower than the optimum ($T_{opt} \cong 30^{\circ}$ C), i.e. under conditions of negligible biosorbent inactivation ($K_I \ll 1$), q_e/C_e simplifies to:

$$\frac{q_e}{c_e} = A \, \exp\left(\frac{-\Delta H^* D}{RT}\right) \tag{12}$$

while for $T > T_{opt}$ the temperature-dependent inactivation equilibrium becomes prevailing over biosorption; therefore, Eq. (11) simplifies to:

$$\frac{q_{e}}{c_{e}} = \frac{A}{B} \exp\left(\frac{\Delta H^{*}_{I} - \Delta H^{*}_{D}}{RT}\right)$$
(13)

The thermodynamic parameters either of phenol biosorption or biosorbent inactivation were then estimated from the slopes and intercepts of straight lines obtained plotting $\ln(q_e/C_e)$ versus reciprocal temperature (Fig. 4) and listed in Table 4.

Figure 4 and Table 4

Contrary to phenol biosorption by chitosan that exhibited always positive values of ΔG°_{D} , the negative ones obtained with keratin confirm the thermodynamic feasibility and spontaneity

of the process at $T \ge 25^{\circ}$ C, while the decrease in all values with T points out progressive biosorption improvement.

On the other hand, consistently with the observed increase in q_e with T up to 30°C, the positive values of ΔH°_D confirm the endothermic nature of phenol sorption, while those of ΔS°_D reflect increased randomness at solid/solution interface. We can infer that the biosorbent/phenol complex might have higher freedom degree than free components, as a result of weak physical attraction between electron clouds of functional groups of sorbent and phenol. The much higher value of ΔS°_D using keratin (637 J mol⁻¹ K⁻¹) compared with chitosan (26.5 J mol⁻¹ K⁻¹) suggests that, in the same *T* range, the protein structure of the former material could have been able to link phenol in stronger way than the glycidic ones of chitosan.

A completely different reasoning should be made for $T \ge 30^{\circ}$ C, in that, as suggested by the decrease in ΔG°_{I} , the inactivation equilibrium was favored by a *T* increase more than that biosorption equilibrium, leading to an overall worsening of phenol removal. The higher values of ΔH°_{I} and ΔS°_{I} compared to ΔH°_{D} and ΔS°_{D} suggest that biosorbent thermal inactivation is a process even more endothermic than phenol biosorption, and that the related randomness increase could have been even larger than that at solid/solution interface.

4.7 FT-IR Spectra

The FT-IR spectrum of raw keratin at high frequencies (Fig. 5) exhibited two broad and weak absorption bands at 3300 and 3080 cm⁻¹ that can be assigned to amide NH stretching modes, superimposed to the broad absorption due to physisorbed water.

Figure 5

Bands at 2960, 2920, 2880 and 2850 cm⁻¹ were due to $-CH_3$ and $-CH_2$ asymmetric and symmetric stretching modes, respectively, belonging to protein alkyl side-chains. As expected, in the low frequency region (2000-400 cm⁻¹) the main FT-IR bands are typically due to protein structure. Secondary amide groups showed several IR bands related to amide I modes in the 1650-1600 cm⁻¹ region, according to different crystalline structure and H-bonding. The amide I band is a single peak at 1655 cm⁻¹, partially overlapped with the HOH deformation band of adsorbed water. Weaker bands due to amide II and amide III modes can be detected at 1535 (shoulder) and 1235 cm⁻¹ respectively, while the complex envelop of bands at 1467, 1450, 1400, 1385 cm⁻¹ can be related to C-H deformation modes of CH₃, CH₂ and CH (Lin-Vien et al., 1984; Wojciechowska et al., 2004). A weak band due to disulfide bonds stretching mode, whose frequency has been reported to fall in the region 490-530 cm⁻¹ [22] (Wojciechowska et al., 2004), could be detected at 495 cm⁻¹.

After phenol adsorption at pH 8.0, the spectrum only slightly changed in the frequency range characterizing protein structure (amide I, II, III bands); thus, in order to evidence possible variations in keratin spectrum, we reported the subtraction spectrum as inset in Fig. 5. New bands observed at 1710, 1606, 1487 cm⁻¹ can be respectively assigned to free -COOH groups, possibly formed by hydrolysis, and to amide modes of keratin having its structure changed by the interaction with phenol. Negative bands correspond to keratin amide groups, which are thus involved in biosorption. This evidence supports the hypothesis of a weak interaction of phenol in its molecular form with not protonated amide groups, replacing adsorbed water molecules, in agreement with kinetic evaluations. Separation of amide I and II adsorption maxima, increasing after phenol adsorption, is a further indication of some secondary structure destabilization (Wojciechowska et al., 2004).

A new strong band is detected at 1094 cm⁻¹, with minor components at lower frequencies. This feature can be assigned to sulfate species coming from cysteine S-sulfonate cleavage or, alternatively, from $-SO_2H$ (Millington and Church, 1997). Therefore, we cannot rule out some limited phenol chemisorption, possibly leading to benzyl-sulphate species after interaction with exposed S=O(OH) containing groups, from cystine/cysteine intermediates in keratin.

As regards to chitosan, the main FT-IR bands at low frequencies (1900-500 cm⁻¹) are typically due to carbohydrate. The broad absorption, showing maxima at 1423, 1380, 1322 cm⁻¹, is related to C-H deformation modes in $-CH_2$ - and $-CH_3$. The corresponding C-H stretching modes are detected at 2919 and 2876 cm⁻¹. At high frequencies two very weak absorptions at 3370 cm⁻¹ (OH stretching mode) and 3300 cm⁻¹ (NH stretching mode) can also be detected, although superimposed to the broad absorption due to physisorbed water.

Strong bands at 1154, 1077, 1030 cm⁻¹ can be assigned to CO and CC stretching modes of COH and COC groups in pyranose ring, the first of them being related to the asymmetric stretching mode of C-O-C bridge. At lower frequencies, the band at 897 cm⁻¹ is due to the stretching mode of C-O-C as well as of glycoside bond (Brugnerotto et al., 2001; Van de Velde and Kiekens, 2004). The band at 1600 cm⁻¹ is due to NH deformation mode of -NH₂ groups resulting from chitosan deacetylation. The overall spectrum appears to be consistent with that reported for deacetylated chitin (Brugnerotto et al., 2001), showing weak bands diagnostic for residual acetylated group.

After phenol adsorption at pH 8.0, the IR spectrum (Fig. 6) shows some significant changes, at both high and low frequencies. CH bands are reduced in intensity, and other minor components appear (2960, 2850 cm⁻¹). The shoulder at 1600 cm⁻¹ assigned to NH deformation mode almost disappears, while a broad component is tailing towards lower frequencies. CH deformation bands, while decreasing in intensity, show a more complex pattern, too. These data provide evidence of phenol interaction through H-bonds formation with exposed -NH₂ of chitosan. Additionally, several significant differences can be seen in CC/CO stretching region: the band at 1154 cm^{-1} becomes a shoulder of the main band at 1082 cm^{-1} , the component at 1030 cm⁻¹ disappears evidencing the shoulder at 987 cm⁻¹. According to these features and considering that at pH 8.0 phenol is mostly undissociated, the main interactions of phenol molecule occurred at primary and secondary polysaccharide OH groups, likely involving H-bonds formation, but also at O of C-O-C and of glycoside bond (band at 1154 cm⁻¹). On the other side, detection of new, very weak components in CH stretching and deformation region, together with reduction in intensity of C-O stretching bands due to glycoside bonds, can be explained by some chitosan chain breaking. In this case, increased exposure of "free" OH groups would allow even higher adsorption capacity.

Figure 6

Since chitosan is an hygroscopic material, OH groups belonging to both -CH₂OH and glycosyl ring can be also involved in intramolecular H bonds and water hydration, thus possible competitive phenol adsorption mechanism with water molecules can be envisaged.

Few weak absorptions are assigned to residual phenol adsorbed at matrix surface in its molecular form, namely bands at 868, 660, 537 cm⁻¹, due to oop CH bendings of the aromatic ring (Lin-Vien et al., 1984). The corresponding CC ring vibration modes in the 1600-1000 cm⁻¹ region are likely masked by strong NH and CH deformation bands.

5. Conclusions

Phenol biosorption by chitosan and keratin was investigated. Maximum removal efficiencies were 89.4% at pH 7 and 54.1% at pH 8, and maximum biosorption capacities 4.52

and 2.71 mg g⁻¹, respectively. Best fitting of equilibrium and kinetic results was obtained by the Freundlich and pseudo second-order models, respectively. Increasing temperature up to 30°C, keratin sorption capacity progressively increased to 4.93 mg g⁻¹ and that of chitosan to 3.3 mg g⁻¹, whilst an opposite trend was observed for T > 30°C, likely due to a temperature-dependent inactivation equilibrium, whose thermodynamic parameters were estimated. FT-IR results suggested that phenol biosorption by keratin occurred mainly through H-bond with amide groups, which explains the better adsorption of this matrix compared to chitosan.

Acknowledgements

Authors would like to thank CESQ-USP and FAPESP, Brazil, and INCA, Marghera-VE, Italy.

References

Ahmaruzzaman M., (2008), Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review, *Advances in Colloid and Interface Science*, **143**, 48-67.

Banat F. A., Al-Asheh S., (2000), Biosorption of phenol by chicken feathers, *Environmental Engineering & Policy*, **2**, 85-90.

Banat F. A., Al-Asheh S., (2001), The use of columns packed with chicken feathers for the removal of phenol from aqueous solutions, *Adsorption Science & Technology*, **19**, 553-563.

Barone J. R., Schmidt W. F., Gregoire N. T., (2006), Extrusion of feather keratin, *Journal* of Applied Polymer Science, **100**, 1432-1442.

Berkeley R. C. W., (1979), *Chitin, chitosan and Their Degradative Enzymes*, In: *Microbial Polysaccharides*, Berkeley R. C. W., Gooday C. W., Elwood D. C. (Eds.), Academic Press, New York, 205-236.

Brugnerotto J., Lizardi J., Goycoolea F. M., Arguelles-Monal W., Desbrières J., Rinaudo M., (2001), An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, **42**, 3569-3580.

Crisafully R., Milhome M. A. L., Cavalcante R. M., Silveira E. R., de Keukeleire D., Nascimento R. F., (2008), Removal of some polycyclic aromatic hydrocarbons from petrochemical wastewater using low-cost adsorbents of natural origin, *Bioresource Technology*, **99**, 4515-4519.

Daneshvar E., Kousha M., Sohrabi M. S., Khataee A., Converti A., (2012), Biosorption of three acid dyes by the brown macroalga *Stoechospermum marginatum*: isotherm, kinetic and thermodynamic studies, *Chemical Engineering Journal*, **195-196**, 297-306.

Dursun A. Y., Kalayci Ç. S., (2005), Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of phenol onto chitin *Journal of Hazardous Materials*, **123**, 151-157.

Goncharuk V. V., Kucheruk D. D., Kochkodan V. M., Badekha V. P., (2002), Removal of organic substances from aqueous solutions by reagent enhanced reverse osmosis, *Desalination*, **143**, 45-51.

Körbahti B. K., Tanyolaç A., (2003), Continuous electrochemical treatment of phenolic wastewater in a tubular reactor, *Water Research*, **37**, 1505-1514.

Li J.-M., Meng X.-G., Hu C.-W., Du J., (2009), Adsorption of phenol, *p*-chlorophenol and *p*-nitrophenol onto functional chitosan, *Bioresource Technology*, **100**, 1168-1173.

Lin-Vien D., Colthup N. B., Fateley W. G., Grasselli J. G., (1984), *The Handbook of Raman and Infrared Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston.

Manahan S. S., (1991), *Environmental Chemistry*, 5th Edition, Lewis Publishers, Chelsea, MI.

Milhome M. A. L., de Keukeleire D., Ribeiro J. P., Nascimento R. F., Carvalho T. V., Queiroz D. C., (2009), Removal of phenol and conventional pollutants from aqueous effluent by chitosan and chitin, *Quimica Nova*, **32**, 2122-2127.

Millington K. R., Church J. S., (1997), The photodegradation of wool keratin II: Proposed mechanisms involving cystine, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **39**, 204-212.

Mima S., Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S., (1983), Highly deacetylated chitosan and its properties, *J. Appl. Polymer Sci.*, **28**, 1909-1917.

Rawajfih Z., Nsour N., (2006), Characteristics of phenol and chlorinated phenols sorption onto surfactant-modified bentonite, *Journal of Colloid and Interface Science*, **298**, 39-49.

Roels J. A., (1983), *Energetics and Kinetics in Biotechnology*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

Struszczyk M. H., (2002), Chitin and chitosan. Part II. Applications of chitosan, *Polimery*, **47**, 396-403.

Touaibia D., Benayada B., (2005), Removal of mercury (II) from aqueous solution by adsorption on keratin powder prepared from Algerian sheep hooves, *Desalination*, **186**, 75-80.

Van de Velde K., Kiekens P., (2004), Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutyrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state 13C NMR, *Carbohydrate Polymers*, **58**, 409-416.

Wojciechowska E., Rom M., Włochowicz A., Wysockib M., Wesełucha-Birczynskac A., (2004), The use of Fourier transform-infrared (FTIR) and Raman spectroscopy (FTR) for the investigation of structural changes in wool fibre keratin after enzymatic treatment, *Journal of Molecular Structure*, **704**, 315-321.

Yan J. L., (2006), Study on the adsorption of phenol by chitosan from aqueous solution, *Chinese Journal of Polymer Science*, **24**, 497-502.

Yang C., Qian Y., Zhang L., Feng J. (2006), Solvent extraction process development and on-site trial-plant for phenol removal from industrial coal-gasification wastewater, *Chemical Engineering Journal*, **117**, 179-185.

Table 1. Influence of pH on phenol biosorption capacity at equilibrium (mg g⁻¹). $T = 30^{\circ}$ C; $C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$.

pH	Chitosan	Keratin
5.0	1.51 ± 0.08	0.64 ± 0.05
6.0	2.10 ± 0.12	4.31 ± 0.21
7.0	2.48 ± 0.14	4.52 ± 0.24
8.0	2.72 ± 0.11	4.37 ± 0.18
9.0	2.40 ± 0.15	3.73 ± 0.17
10.0	1.52 ± 0.07	0.73 ± 0.03

Model	el Langmuir			Freundlich			Dubinin-Radushkevich			Temkin			
Biosorben	$q_0 \pmod{(\mathrm{mg g}^{-1})}$	$\frac{K_L}{(\mathrm{L}\mathrm{mg}^{-1})}$	R^2	$(\mathrm{mg}^{1-1/n}\mathrm{L}^{1/n}\mathrm{g}^{-1})$	n (—)	R^2	$q_s \pmod{(\mathrm{mg g}^{-1})}$	β (mol ² kJ ⁻²)	E (kJ mol ⁻¹)	R^2	$\frac{b_T}{(g \text{ kJ mg}^{-1} \text{ mol}^{-1})}$	$\frac{K_T}{(\mathrm{L mg}^{-1})}$	R^2
Chitosan	16.1	0.010	0.983	0.19	1.18	0.991	3.14	5.49	0.30	0.755	1.48	0.268	0.925
Keratin	12.0	0.138	0.980	1.34	1.19	0.966	6.79	0.95	0.72	0.829	0.934	1.56	0.813

Table 2. Isotherm models applied to phenol biosorption by chitosan and keratin. pH = 8.0; T = 30 °C

Table 3. Kinetic parameters of phenol biosorption by chitosan and keratin estimated by the pseudo first-order, pseudo second-order and intraparticle diffusion models. pH = 8.0; T = 30 °C

	Model	Pseudo first-order			Pseudo second-order			Intraparticle diffusion		
	$q_{ m e(ex)}$	k_1	$q_{ m e(es)}$	R^2	k_2	$q_{ m e\ (es)}$	R^2	k _{id}	С	R^2
Sorbent	(mg g^{-1})	(h^{-1})	$(mg g^{-1})$		$(g mg^{-1} h)$	$(mg g^{-1})$		$(mg g^{-1} h^{-0.5})$	$(mg g^{-1})$	
Chitosan	2.70	0.255	2.71	0.833	0.226	2.87	0.994	0.297	1.41	0.538
Keratin	4.47	0.354	4.47	0.765	1.01	4.51	0.999	0.101	4.03	0.756

Biosorption				
Biosorbent	Temperature (°C)	ΔG°_{D} (kJ mol ⁻¹)	ΔH_D° (kJ mol ⁻¹)	ΔS_{D}° (J mol K ⁻¹)
Chitosan	20	4.42	12.2	26.5
	25	4.28		
	30	4.15		
	40	3.89		
	50	3.62		
Keratin	20	1.47	18.8	637
	25	-1.71		
	30	-4.90		
	40	-11.3		
	50	-17.6		
Inactivation				
Biosorbent	Temperature (°C)	ΔG°_{I} (kJ mol ⁻¹)	$\Delta H^{'}_{I}$ (kJ mol ⁻¹)	ΔS_{I}° (J mol ⁻¹)
Chitosan	20	1.08	35.7	118
	25	0.494		
	30	-0.095		
	40	-1.27		
	50	-2.46		
Keratin	20	8.45	256	845
	25	4.22		
	30	-0.003		
	40	-8.45		
	50	-16.9		

Table 4. Thermodynamic parameters estimated for phenol biosorption onto chitosan and keratin. pH = 8.0; T = 30 °C



Figure 1. Time behavior of phenol removal efficiency. Biosorbent: (\triangle) keratin; (\diamondsuit) chitosan. $T = 30^{\circ}$ C; $C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$; pH 8.0.



Figure 2. Influence of initial phenol concentration on phenol biosorption capacity at equilibrium. Biosorbent: (\triangle) keratin; (\diamondsuit) chitosan. *T* = 30°C; pH 8.0.



Figure 3. Pseudo second-order kinetic plots of phenol removal by (\triangle) keratin and (\diamondsuit) chitosan. $C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$; pH 8.0.



Figure 4. Semi-log plots of $\ln(q_e/C_e)$ versus the reciprocal temperature (1/*T*), for estimation of the thermodynamic parameters of phenol removal by (\triangle) keratin and (\diamondsuit) chitosan. $C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$; pH 8.0.



Figure 5. FT-IR spectra of keratin before and after phenol biosorption. (A) High-frequency region; (B) low-frequency region. Inset: subtraction spectrum: [keratin after phenol adsorption] –[raw keratin].


Figure 6. FT-IR spectra of chitosan before and after phenol biosorption. (A) High-frequency region; (B) low-frequency region.

CAPÍTULO 4- Chitin as biosorbent for phenol removal from aqueous solution: equilibrium, kinetic and themodynamic studies

Gisele Pigatto^{1,2}, Alessandra Lodi¹, Elisabetta Finocchio¹, Mauri S.A. Palma², Attilio Converti^{1,*}

¹ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Pole of Chemical Engineering, Via Opera Pia 15, I-16145 Genoa, Italy

² Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av. Prof Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900, São Paulo, Brazil

*Author to whom all correspondence should be addressed: email: converti@unige.it; Phone: +390-10-

353-2593;

Fax:

+390-10-353-2586.

Abstract

Phenol removal by aqueous solution was studied employing chitin as low cost biosorbent. Biosorption was initially investigated varying the pH between 2 and 10, and optimum pH of 2 was found. Then, temperature and initial phenol concentration were varied in the ranges $15 \le T \le$ 50°C and $10.4 \le C_0 \le 90.8 \text{ mg L}^{-1}$, respectively. The good applicability of Langmuir, Freundlich and Temkin models (R² = 0.990-0.993) to describe equilibrium isotherms suggested an intermediate mono- /multilayer biosorption mechanism along with a semi-homogeneous arquitecture of biosorbent surface. Biosorption capacity progressively increased from 3.56 to 12.7 mg g⁻¹ when starting phenol concentration was raised from 10.4 to 90.8 mg L⁻¹, and the related sorption kinetics was investigated by pseudo-first-order, pseudo-second order and intraparticle diffusion models. The pseudo second-order model, which exhibited the best fit of experimental data (R² = 0.999), exhibited a second order rate constant of 0.151 g mg⁻¹ h⁻¹ and a theoretical sorption capacity of 7.63 mg g⁻¹. Phenol biosorption capacity varied with temperature according to a bell-shaped trend that suggested the possible occurrence of a thermoinactivation equilibrium. Finally, to identify the main functional groups involved in phenol adsorption, both raw and bound-phenol materials were investigated by FT-IR spectroscopy.

Keywords: Chitin; Biosorption; Phenol; Kinetic modeling; Thermodynamic study, FT-IR technique.

Introduction

The increasing presence of pollutants due to industrial activities constitutes a serious problem. On this aspect, the sorption techniques can offer a promising solution for their elimination, as they have the advantage of being environmentally friendly, biodegradable, biocompatible and inexpensive. Bacteria [1], yeast [2], fungi [3], algae [4], as well as low cost chitin [5] and chitosan [6, 7] are materials that can be effectively employed to this purpose. Among these, chitin and its derivates have received considerable attention in the removal of water contaminants, owing to their excellent adsorption capacities.

Chitin is a biomacromolecule present in different crustaceans, molluscs, algae, insects, fungi and yeasts [8], which is usually obtained from waste materials from the seafood processing industry, mainly shells of crab, shrimp, prawn and krill [9]. This biopolymer has been extensively investigated as an adsorbents for the removal of hazardous materials from wastewater; in particular, it showed especially high sorption capacity in the removal of reactive dyes [10, 11], metals [12, 13] and fungicides [14]. Its adsorption potential can be attributed to high hydrophilicity and chemical reactivity, mainly due to the presence of amine and acetyl functional groups [15], together with a high chemical stability and selectivity toward pollutants [16-18].

Phenol and its derivatives are considered among the most noxious pollutants, because they are harmful to living organisms even at low concentrations [19]. Phenols are present in the wastewater from various industrial processes such as oil refineries, petrochemical plants, ceramic plants, coal conversion processes and phenolic resin industry [20]. The ingestion of phenolcontaminated water causes protein degeneration, tissue erosion, paralysis of the central nervous system and also damages the kidney, liver and pancreas in human bodies [21]. According to the recommendation of World Health Organization [22], the permissible concentration of phenolic contents in potable waters is 1 μ g L⁻¹. Therefore, removal of phenols from waters and wastewaters is an important issue in order to protect public health and environment.

The traditional methods such as adsorption, chemical oxidation, precipitation, distillation, solvent extraction, ion exchange, membrane processes and reverse osmosis have been widely used for removal of phenols from aqueous solutions [23]. Among them, adsorption is the most powerful method, because it has significant advantages: high efficiency, easy handling, high selectivity, low operating cost, easy regeneration of adsorbent and minimal production of chemical or biological sludge [24]. Therefore, the use of sorbents with high loading capacity and economically or easily available can be an effective solution for this problem. In recent years, a

number of sorbents have been used for phenol removal, among others activated carbon, [25], red mud [26], rubber seed coat [27].

The aim of this study was to investigate phenol adsorption by commercial chitin from shrimp shells. The adsorption performance was investigated varying pH, temperature and phenol concentration in the ranges $2 \le pH \le 10$, $15 \le T \le 50^{\circ}C$ and $10.4 \le C_0 \le 90.8$ mg/L, respectively. Sorption data were kinetically modeled by the pseudo-first-order [28], pseudo-second order [29] and intraparticle diffusion models [30], while the equilibrium isotherms by those of Langmuir [31], Freundlich [32], Dubinin and Radushkevich [33] and Temkin [34]. Finally, in order to identify the main functional groups involved in phenol adsorption, either raw or bound-phenol chitin material was investigated by FT-IR spectroscopy.

Materials and methods

2.1. Batch biosorption study

Chitin in the form of purified power from shrimp shells was purchased from Sigma-Aldrich Co., Milan, Italy.

Biosorption experiments were carried out batchwise to study the influence of pH, initial phenol concentration (C_0) and temperature (T) on phenol biosorption. To this purpose, these parameters were varied in the ranges $2.0 \le \text{pH} \le 10$, $15 \le T \le 50^{\circ}\text{C}$ and $10.4 \le C_0 \le 90.8 \text{ mg L}^{-1}$ respectively. All the experiments were carried out at the selected conditions in 200 mL-Erlenmeyer flasks containing 100 mL of phenol solutions shaken at 150 rpm in a water bath, model RSB-12 (Remi, Laboratory Instruments, Mumbai, India), using a biosorbent concentration of 4 g/L. Such a dosage was selected as an average of the values reported in the literature for phenol removal by the same materials [35]. A stock phenol solution (1.0 g L⁻¹) was prepared by dissolving phenol loose crystals with purity $\ge 99.0\%$ (Sigma-Aldrich, Milan, Italy) in high-purity deionized water and stored at $\pm 4^{\circ}$ C, and then diluted according to the selected initial concentration. All the experiments were carried out in triplicate for 24 h, a time that was shown to be sufficient to reach equilibrium conditions, and the results expressed either as mean phenol removal efficiency or biosorption capacity.

To investigate the effect of pH on biosorption capacity, the pH of solutions was initially adjusted to the selected value by addition of 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH according to circumstances and measured by a pHmeter, model pH 211 (Hanna, Milan, Italy), and the temperature and initial phenol concentration were kept at 30° C and 50 mg L⁻¹, respectively.

Once optimized the pH, tests at variable temperature were carried out at pH 2.0 and $C_0 = 50$ mg L⁻¹, while those at variable initial phenol concentration at pH 2.0 and $T = 25^{\circ}$ C, respectively.

Samples for biosorption kinetic investigation (1.0 mL) were withdrawn at fixed times (2, 4, 6, 12 and 24 h) and filtered through membrane filters with 0.2 μ m-pore diameter (Millipore, Vimodrone, Italy). The concentration of residual phenol in solution was determined by a UV/Vis spectrophotometer, model Lambda 25 (Perkin Elmer, Milan, Italy), following the development of color resulting from the reaction of phenol with 4-aminoantipyrine at 510 nm wavelength. The results collected along the time were used for kinetic studies, while those at equilibrium for the isotherm ones.

Phenol removal efficiency in aqueous solution, η (%), was calculated by the equation:

$$\eta = \frac{c_0 - c_f}{c_0} \ge 100 \tag{1}$$

where C_f is the final concentration of phenol (mg L⁻¹) in the solution.

Biosorption capacity of chitin at equilibrium, q_e (mg g⁻¹), was calculated from the difference between the initial and final phenol concentrations according to the equation:

$$q_{e} = \frac{V(C_0 - C_f)}{M}$$
(2)

where V is the solution volume (L) and M the mass of biosorbent (g).

2.2. FT-IR chitin spectra

Samples were prepared for FT-IR analysis by dilution of pure powders in KBr disks $(0.1\% \text{ w w}^{-1})$ and analyzed in air using a Nicolet 6700 Thermofisher FT-IR instrument (OMNICTM acquisition software, 100 scans, DTGS-KBr detector).

3. Theory

3.1. Biosorption isotherms

The most common isotherm models were applied to describe the adsorption equilibria. The empirical model of Freundlich [32], describing reversible and multilayer adsorption onto heterogeneous surface, is the most commonly used to describe the adsorption onto solid sorbents at equilibrium:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \tag{3}$$

where C_e is the sorbate concentration in liquid phase at equilibrium (mg L⁻¹), K_F the Freundlich constant (mg^{1-1/n} L^{1/n} g⁻¹) and *n* (dimensionless) an empirical parameter related to the biosorption intensity, varying according to the heterogeneity of the material.

Equilibrium data were also worked out by the model of Langmuir [31], which is based on the assumption of monolayer adsorption onto a surface with a finite number of identical and homogeneous sites and described by the equation:

$$q_{e} = \frac{q_{0} K_{L} C_{e}}{1 + K_{L} C_{e}} \tag{4}$$

where $q_0 \text{ (mg g}^{-1})$ is the monolayer sorption capacity of the biosorbent and $K_L \text{ (L mg}^{-1})$ the Langmuir constant.

An additional model often used to describe equilibrium isotherms was proposed by Dubinin and Radushkevich (D-R) [33], which is based on Polany's adsorption potential theory and Dubinin's minipore filling theory:

$$\mathbf{q}_{\mathbf{e}} = \mathbf{q}_{\mathbf{s}} \exp\left(-\beta\varepsilon^2\right) \tag{5}$$

where q_s is the maximum adsorption capacity at equilibrium (mg g⁻¹), β the activity coefficient (mol² kJ⁻²) and ε the Polanyi potential (kJ mol⁻¹).

The last parameter is defined as:

$$\varepsilon = RT \ln \left[1 + \frac{1}{c_{\varepsilon}}\right] \tag{6}$$

where R (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹) is the ideal gas constant and T (K) the absolute temperature.

The activity coefficient is related to the mean free energy of sorption (E, kJ mol⁻¹), when it is transferred to the surface of the solid from infinity in the solution, by the equation:

$$E = \frac{1}{\sqrt{2\beta}} \tag{7}$$

and gives information about the physical or chemical nature of the adsorption mechanism.

The equilibrium data were finally fitted by the Temkin [34] isotherm, which assumes that the heat of adsorption of all the molecules in a layer decreases linearly with surface coverage of adsorbent due to sorbate/sorbent interactions and that adsorption is characterized by a uniform distribution of bonding energies, up to a maximum binding energy. Such a model is described by the equation:

$$q_{\rm e} = \frac{RT}{b_T} \ln \left(K_T \, C_{\rm e} \right) \tag{8}$$

where K_T is the equilibrium binding constant corresponding to the maximum binding energy (L mg⁻¹) and b_T (g kJ mg⁻¹ mol⁻¹) the Temkin isotherm constant related to the heat of adsorption.

3.2. Biosorption kinetics

To investigate the kinetics of phenol biosorption onto the selected biomaterials, three models available in the literature were used in this study, namely the pseudo first-order, pseudo-

second order and intraparticle diffusion models, with the aim to select the one able to provide the best kinetic description of the process.

The linear form of the pseudo first-order rate expression of Lagergren [28] can be written as:

$$\ln\left(q_e - q_t\right) = \ln q_e - k_1 t \tag{9}$$

where q_t is the amount of phenol adsorbed (mg g⁻¹) at time *t* (h), and k_1 the pseudo-first-order rate constant (h⁻¹).

The pseudo second-order model proposed by Ho and McKay [29] can be represented in its linearized form by the equation:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_\varepsilon^2} + \frac{1}{q_\varepsilon} t \tag{10}$$

where k_2 is the pseudo second-order rate constant (g mg⁻¹ h⁻¹). The values of k_2 and q_t for both biosorbents were obtained from the intercept and the slope of linear plots of t/q_t versus t.

To elucidate the nature of the step controlling the adsorption rate, most researchers have used the intraparticle diffusion model [30], which is described by the equation:

$$q_t = k_{id} t^{1/2} + C \tag{11}$$

where *C* is the intercept (mg g⁻¹) and k_{id} (mg g⁻¹ h^{-0.5}) the intraparticle diffusion rate constant.

3.3. Biosorption thermodynamics

Biosorption of phenol onto the selected biosorbents was also carried out at five different temperatures in the range 15-50°C not only to investigate the influence of this parameter on biosorption, but also to assess its eventual spontaneity through an evaluation of the main

thermodynamic parameters, specifically the standard changes in the Gibbs free energy (ΔG°), enthalpy (ΔH°) and entropy (ΔS°).

For this purpose, the free energy of sorption can be related either to the sorption equilibrium constant, $K_D = q_e/C_e$, also called distribution coefficient, by the Van't Hoff equation:

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_D \tag{12}$$

or to the entropy and enthalpy changes of adsorption at constant temperature by the Gibbs equation:

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T \Delta S^{\circ} \tag{13}$$

4. Results and discussion

4.1. Effect of initial pH

The effect of pH on phenol biosorption by chitin was investigated in batch experiments carried out at 30 °C with 50 mg L⁻¹ phenol concentration and 4 g L⁻¹ biosorbent, varying the initial pH in the range 2-10. Such conditions were selected as the average ones reported in the literature for phenols biosorption. In particular, a chitin dosage of 4 g L⁻¹ was selected taking into account that Milhome et al. [35] observed no further improvement of phenol removal in the range 4-10 g L⁻¹.

As can be observed in Fig. 1, panel A, phenol sorption capacity at equilibrium (q_e) of this sorbent was exalted at acidic pH, reaching a maximum value of 8.85 mg g⁻¹ at pH 2, decreased to 6.24 mg g⁻¹ raising the pH to 6 and then increased again up to 8.26 mg g⁻¹ at pH 10. These results suggest a further increase in biosorption capacity either under more acidic or more alkaline conditions than those investigated in this study, which, however, would be inconsistent with the common practice in wastewater treatment.

Figure 1

According to Dursun and Kalayci [36], at low pH the functional amino groups on chitin surface are protonated, while phenol, behaving as a very weak acid, is only a few negatively charged, a condition that favored direct electrostatic attraction with the protonated amino groups of chitin. However, such a dissociation equilibrium is more and more retrograded under these acidic conditions; therefore, also taking into account that the amino groups are acetylated in chitin, it is more likely that such a mechanism played a limited role. Therefore, one should infer that other phenomena can occur under acidic conditions, i.e. the delocalization of oxygen electron pairs on benzene ring, and the subsequent nucleophilic attack of them or the electrostatic interaction of the electron-rich aromatic ring with the protonated amidic groups of chitin. On the other hand, the progressive enhancement of biosorption at pH > 8 could have been the result of H bond formation between the negatively-charged phenate, which is prevailing under alkaline conditions, and the non-ionized secondary amino groups on chitin surface. Simplifying, the high q_e values detected under acidic conditions could be ascribed to enhanced interactions between phenol and biosorbent.

A very similar behavior was observed by Dursun and Kalayci [36], who obtained a q_e value of about 8 mg g⁻¹ at pH 2 using a biosorbent dosage of only 1.0 g L⁻¹, whereas Milhome et al. [35] reported a lower value (3 mg g⁻¹) likely due to an excess dosage (10 g L⁻¹).

Previous work highlighted a completely different behavior of chitosan, i.e. the deacetylated form of chitin, that showed a maximum sorption capacity at pH 7 ($q_e = 4.52 \text{ mg g}^{-1}$) and marked decreases either under very acidic or alkaline conditions [37]. A possible explanation of this result is that the NH₂ groups released by chitin deacetylation are not ionized at pH >> 8, but phenol dissociation equilibrium is directed towards the negatively-charged phenolate ($pK_a = 9.9$), thus preventing the formation of H-bonds between OH and NH₂ groups. In any case, these results suggest that there would be a very large variability in the behavior also depending on the source of chitin.

Based on these results as well as on the suggestions coming from the work of Dursun and Kalayci [36], all subsequent experimentation was carried out fixing the pH at 2.

4.2 Effect of initial phenol concentration

Biosorption capacity increased with initial phenol concentration (C_0) (Fig. 1, panel B) as the likely result of an increased number of attractive interactions between phenol and sorbent, and reached a maximum value of 12.5 mg g⁻¹ at $C_0 = 90.8$ mg L⁻¹, which allowed us to expect a saturation phenomenon at C_0 values higher than those tested in this work. However, Dursun and Kalayci [36] did not observe it even at $C_0 = 300 \text{ mg L}^{-1}$, which is a particularly high value for an industrial effluent. Lower q_e values were reported for chitosan (4.7 mg g⁻¹) [37], likely due to a reduction of its sorption capacity consequent to deacetylation. Oppositely, the biosorption efficiency progressively decreased with increasing C_0 , which means that sorbate became in excess compared with biosorbent level. These opposite behaviors of q_e and η as functions of C_0 suggest that the selection of optimum sorbate concentration should be based on a compromise aiming at the simultaneous maximization of these responses.

4.3. Equilibrium isotherms

The results of phenol removal by chitin at equilibrium were processed by the most common isotherm models available in the literature for adsorption, namely the Langmuir [31], Freundlich [32], Dubinin-Radushkevich [33] and Temkin [34] ones, each of them being able to provide useful information on the adsorption phenomenon (Table 1).

Table 1

All these models, with exception of that of Dubinin-Radushkevich ($R^2 = 0.878$), were able to describe phenol biosorption by chitin with excellent correlation ($R^2 \ge 0.990$). In particular, taking in mind that the Freundlich model is based on the hypothesis of reversible adsorption onto heterogeneous surface and that the one of Langmuir on monolayer adsorption onto a surface with a finite number of identical and homogeneous sites, phenol sorption was likely to follow an intermediate behavior between a mono- and a multilayer adsorption mechanism, and the biosorbent surface may be considered a semi-homogeneous one [38]. Moreover, the good applicability of the Freundlich model suggests that phenol concentration on biosorbent increased with its concentration in solution and confirms favorable adsorption. The adsorption intensity (n = 2.18) and the adsorption constant ($K_F = 1.58 \text{ mg}^{1-1/n} \text{ L}^{1/n} \text{ g}^{-1}$) obtained for this biosorbent are very close to those reported at 25°C for the same biomaterial by Dursun and Kalayci [36] $(n = 2.21; K_F = 1.51 \text{ mg}^{1-1/n} \text{ L}^{1/n} \text{ g}^{-1})$, but significantly higher than the ones reported at 28-30°C and pH 6-8 for chitosan (n = 1.18-1.54; $K_F = 0.10-0.19 \text{ mg}^{1-1/n} \text{ L}^{1/n} \text{ g}^{-1}$) [35, 37]. This comparison suggests that the better performance of chitin with respect to chitosan should be searched mainly in the presence of acetyl groups linked with the amino groups of acetylglucosamine units, which should improve phenol attraction by the carbonyl especially under acidic conditions. Finally, the value of q_0 (16.1 mg g⁻¹) estimated by the Langmuir model

for chitin is coincident with that previously reported for chitosan [37], which suggests that the deacetylation was not responsible for any variation in the number of the adsorption sites.

The mean free energy of sorption estimated by the Dubinin and Radushkevich (D-R) model [33] with chitin was very low ($E = 0.28 \text{ kJ mol}^{-1}$) and close to that reported for chitosan at pH 8 ($E = 0.30 \text{ kJ mol}^{-1}$) [37], which suggests that phenol sorption by both biomaterials should occur in its undissociated form via a physical mechanism under either acidic or alkaline conditions.

Finally, the values of the Temkin parameters listed in Table 1 suggest uniform distribution of binding energy up to a maximum value and that phenol biosorption by chitin ($b_T = 0.628 \text{ g kJ mg}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) is a less exothermic process compared with that in the absence of acetyl groups ($b_T = 1.48 \text{ g kJ mg}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) [37]. However, this situation appears to be more than counterbalanced by an increase in the maximum binding energy (K_T) from 0.260 to 0.584 L mg⁻¹. These last considerations on the whole highlight that, even though the physisorption should be the prevalent phenomenon with both biomaterials, chemiosorption could have also played a role, although less important.

4.4. Kinetic study

After 24 h of sorption, chitin was able to remove practically all phenol present in solution ($\eta = 0.996$) only at the lowest C_0 value (10.4 mg L⁻¹), and the yield of removal progressively decreased to no more than 0.550 at $C_0 = 90.8$ mg L⁻¹. To have an idea of its sorption performance, at the intermediate C_0 value (41.4 mg L⁻¹), about one half of the adsorbate was removed within 2 h, whereas its deacetylated form (chitosan) lasted longer time (6 h) to do this [37], which suggests an important role exerted by these groups in the sorption mechanism. As most of biosorption systems, also the one investigated in this study showed the typical three-step behavior: a) most of phenol was removed within the first hours because of the large number of free sites available for sorption on the surface, b) then the adsorption rate decreased due to their progressive saturation, and c) the adsorption reached equilibrium after about 10-15 h. Such a trend was already observed by several authors with a lot of different biosorbents used for phenol removal [39, 40].

To investigate the kinetics of phenol biosorption by this biomaterial, the results collected at variable starting phenol concentration ($10.4 \le C_0 \le 90.8 \text{ mg L}^{-1}$) were fitted by the pseudo-first order [28], pseudo-second order [29] and intrapartical diffusion [30] models.

Fig. 2 illustrates, as an example, the straight lines obtained, at different starting phenol concentrations, plotting the results of t/q_1 versus t according to the linearized form of the pseudo-second order model, which gave the best fitting. This model was able to well describe the kinetics under all C_0 conditions, exhibiting R² values ranging from 0.955 to 0.999. An interesting finding is that the theoretical biosorption capacity ($q_{e,th}$), whose values were estimated by linear regression of data shown in this figure, increased almost linearly with C_0 up to a maximum threshold value of about 12 mg g⁻¹ at $C_0 \approx 70$ mg L⁻¹, beyond which it kept almost constant, thus pointing out a saturation phenomenon at the highest concentrations. On the other hand, the specific adsorption rate constant (k_2) was practically constant (0.14-0.17 g mg⁻¹ h⁻¹) within the whole range of C_0 , except at the lowest concentration ($k_2 = 0.035$ g mg⁻¹ h⁻¹ at $C_0 = 10.4$ mg g⁻¹) likely due to diffusion limitation of sorption.

Figure 2

On the basis of these results, a comparison can be made with the other two models, for which we selected an intermediate starting phenol concentration ($C_0 = 41.4 \text{ mg g}^{-1}$) able at the same time to guarantee a maximum biosorption rate and to avoid any interference of sorbent saturation on the process. The results gathered in Table 2 point out that the pseudo-second order model was by far the best one to describe phenol biosorption by chitin ($R^2 = 0.999$), whereas both the pseudo first-order ($R^2 = 0.878$) and intraparticle diffusion ($R^2 = 0.718$) models behaved unsatisfactorily.

Table 2

The chemical control of phenol biosorption suggested by these kinetic results, which are only apparently in contradiction with the findings of isothermal investigation, could have been due to the occurrence of a former step of surface exchange reactions up to full involvement of active sites (kinetic control), followed by a physical step at equilibrium where sorbate molecules entered by diffusion the biosorbent network for further interactions (thermodynamic control). A similar situation was inferred for phenol biosorption on chitosan and keratin [37].

4.5.Effect of temperature and biosorption thermodynamics

As one can see in Table 3, biosorption capacity progressively increased from 5.22 to 9.54 mg g⁻¹ when temperature was raised from 15 to 25°C and progressively decreased at higher *T* reaching a minimum value of 5.54 mg g⁻¹ at 50°C.

Table 3

While the increase in this parameters at $T \le 25^{\circ}$ C points out that phenol biosorption is an endothermic process, its progressive decrease beyond such a *T* threshold suggests the occurrence of a phenomenon responsible for a deviation from the Arrhenius theory. Thus, one can suppose that phenol adsorption, described by the equilibrium constant $K_D = q_e/C_e$, is influenced by the simultaneous occurrence of an opposite equilibrium responsible for the progressive inactivation of functional groups on biosorbent surface.

Combining these adsorption and inactivation equilibria and applying to both the wellknown equation $\Delta G^{\circ} = -RT \ln K$, we can express q_e/C_e as function of the thermodynamic parameters of both phenomena:

$$\frac{q_{e}}{C_{e}} = \frac{A \exp\left(-\frac{\Delta H^{*}D}{RT}\right)}{1 + B \exp\left(-\frac{\Delta H^{*}I}{RT}\right)}$$
(14)

where $\Delta H^{\circ}{}_{D}$ and $\Delta H^{\circ}{}_{I}$ are the standard variations of biosorption and inactivation enthalpies, respectively, and *A* and *B* two pre-exponential factors depending on their respective standard entropy variations ($\Delta S^{\circ}{}_{D}$ and $\Delta S^{\circ}{}_{I}$).

At *T* values lower than the optimum ($T_{opt} \cong 25^{\circ}C$), i.e. under conditions of negligible biosorbent inactivation, q_e/C_e simplifies to:

$$\frac{q_e}{c_e} = A \, \exp\left(\frac{-\Delta H^e_D}{RT}\right) \tag{15}$$

while for $T > T_{opt}$ the temperature-dependent inactivation equilibrium becomes prevailing over biosorption; therefore, Eq. (14) simplifies to:

$$\frac{q_{\varepsilon}}{C_{\varepsilon}} = \frac{A}{B} \exp\left(\frac{\Delta H^{\circ}_{I} - \Delta H^{\circ}_{D}}{RT}\right)$$
(16)

The thermodynamic parameters either of phenol biosorption or biosorbent inactivation were then estimated from the slopes and intercepts of straight lines obtained plotting $\ln(q_e/C_e)$ versus the reciprocal temperature (Fig. 3) and listed in Table 3.

Figure 3

Contrary to phenol biosorption by chitosan that exhibited positive values of ΔG°_{D} at all tested temperatures [37], the negative ones obtained with chitin at $T \ge 30^{\circ}$ C confirm the thermodynamic feasibility and spontaneity of the process, while the decrease in all values with T points out progressive biosorption improvement. In addition, the positive values of enthalpy $(\Delta H^{\circ}_{D} = 10.72 \text{ kJ mol}^{-1})$ and entropy $(\Delta S^{\circ}_{D} = 357.4 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$ variations reflect the endothermic nature of phenol sorption and an increased randomness at solid/solution interface, respectively. While the former value is not so different from that estimated for phenol biosorption by chitosan [37], the latter is about one order of magnitude higher, which suggests a crucial role played by acetyl groups in phenol sorption. In other words, these groups could have been responsible for the higher biosorption capacity of chitin compared to chitosan, acting mainly on the entropic factor.

On the other hand, as suggested by the decrease in ΔG°_{I} with temperature, the inactivation equilibrium was favored more than biosorption by a progressive temperature increase, leading to an overall worsening of phenol removal at $T \ge 25^{\circ}$ C. The higher values of ΔH°_{I} and ΔS°_{I} compared to ΔH°_{D} and ΔS°_{D} suggest that biosorbent thermoinactivation is a process even more endothermic than phenol biosorption, and that the related randomness increase could have been even larger than that at solid/solution interface. All ΔG°_{I} values listed in Table 3 are lower than those reported for chitosan, except at $T \le 20^{\circ}$ C [37], which means that chitin thermal inactivation is stronger than that of chitosan, thus progressively reducing its better performance as a biosorbent.

4.6. FT-IR spectra

Interaction of chitin functional groups with phenol at low pH was finally investigated by FT-IR spectroscopy, in order to evidence the interaction of phenol molecule with surface sites. In the low frequency range (1900-500 cm⁻¹) the main FT-IR bands of the raw chitin spectrum (Fig. 4) are typically due to the carbohydrate structure. The complex envelop of bands at 1430, 1375, 1338 cm⁻¹ is related to C-H deformation modes of the CH₃, CH₂ and CH groups. In particular,

the band at 1375 cm⁻¹ can be assigned to -CH₃ deformation modes of the N-acetyl group. The corresponding C-H stretching modes are detected at 2900 cm⁻¹, as a broad band with shoulders at 2935 and 2965 cm⁻¹. In the high frequency region of the spectrum two very weak absorptions at 3370 cm⁻¹ (OH stretching mode) and 3300 cm⁻¹ (NH stretching mode) can also be detected, superimposed to the broad absorption due to physisorbed water. Strong bands at 1163, 1113, 1060, 1031 cm⁻¹ are assigned to CO and CC stretching modes of COH and COC groups in the pyranose ring, namely, the sharp band at 1163 cm^{-1} is due to the asymmetric stretching mode of the C-O-C bridge. At lower frequencies, the band at 897 cm⁻¹ were assigned to C-O stretching of glicoside linkage [41-46]. The secondary amide groups characterizing chitin structure were reported to show several IR bands related to amide I modes in the 1650-1600 cm⁻¹ region, depending on the different crystalline structure and H-bonding effect. In particular, the split of the main band in chitin structure is a consequence of intrasheet and intersheet hydrogen bonding formation [46]. In our spectrum, however, in spite of a drying step previous to the data collection, the amide I band is a single peak at 1637 cm⁻¹, overlapped with the HOH deformation band of adsorbed water vapor, which is rapidly adsorbed by chitin powder [44]. Thus we cannot rule out the presence of a split band masked by adsorbed water. Weaker bands due to amide II and amide III modes are detected at 1460 (shoulder) and 1318 cm⁻¹ respectively.

Figure 4

After phenol adsorption at pH = 2, the spectrum only slightly varied; thus, in order to evidence possible variations of the chitin matrix spectrum, we reported the subtraction spectrum in Fig. 5. New bands are observed at 1730, 1524, 1370 cm⁻¹, which could be assigned respectively to adsorbed esters, possibly formed by hydrolysis of the N-acetyl group and subsequent esterification at such a low pH [47], and to amide modes of chitin having its structure changed after phenol adsorption.

Figure 5

Correspondingly, negative IR bands are detected in the 1600-1500 cm⁻¹ frequency range, where peaks due to amide groups of chitin fall, as a further indication that they are involved in the adsorption process [48]. It is noteworthy that the negative band due to amide I shows two components, which can be explained taking into account that the two corresponding maxima of the amide band, masked by the strong water deformation mode as proposed in the discussion

above, disappear due to the interaction with phenol. This evidence supports the above hypothesis (formulated in paragraph 4.1) of a weak interaction of phenol in its molecular form with acetamide groups, possibly replacing adsorbed water molecules. On the other side, bands due to CC and CO stretching modes, in the 1200-1000 cm⁻¹ region are scarcely affected by the adsorption process showing that the polysaccharide chain maintains its structure.

In the low frequency region, very weak bands at 771 and 708 cm⁻¹, shifted upwards with respect to the pure phenol bands (755, 692 cm⁻¹, ring bending modes) [49], confirm that some residual phenol molecules are still adsorbed at the surface.

In parallel, in the high frequency region of the spectrum, the broad band due to OH stretching mode lowers its relative intensity, as well as does the weak band at 3300 cm⁻¹, due to NH stretching mode, indicating the interaction of phenol with OH and NH groups, too.

5. Conclusions

Phenol removal was studied employing chitin as a biosorbent material. Adsorption tests performed at variable pH revealed a maximum phenol sorption capacity at equilibrium of 8.85 mg g^{-1} at pH 2, thus this pH value was selected as the optimum one in all subsequent experimentation. Biosorption capacity was also shown to increase with the initial phenol concentration (C_0) likely due to an increased number of attractive interactions between phenol and sorbent, and reached a maximum value of 12.5 mg g⁻¹ at $C_0 = 90$ mg L⁻¹. The good applicability of the Langmuir, Freundlich and Temkin models ($R^2 = 0.99$) suggested an intermediate behavior between a mono-and a multilayer adsorption mechanism, supposing a semi-homogeneous arquitecture of the biosorbent surface. The kinetics of phenol biosorption, evaluated by the pseudo-second order model ($R^2 = 0.99$), evidenced a progressively increase in biosorption capacity from 3.56 to 12.7 mg g⁻¹ when starting phenol concentration was raised from 10.4 to 90.8 mg L⁻¹. The influence of temperature on phenol biosorption capacity showed a bell-shaped trend, revealing the possible occurrence of a thermoinactivation equilibrium responsible for the progressive decrease in sorption capacity at high temperature. Finally, FT-IR results suggested that phenol adsorption occurs mainly through H-bond formation with the amide groups, both oxygen and nitrogen atoms acting as electron-donating groups. A possible competitive adsorption mechanism with water molecules can be envisaged.

Acknowledgements

Authors would like to thank INCA, Marghera-VE, Italy, and CAPES and FAPESP, Brazil.

References

[1] L.Diels, S. Van Roy, K.Somers, I. Willems, W.Doyen, M. Mergeay, D. Spuingael, R. Leysen, The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics, J. Membr. Sci. 100 (1995) 249–58.

[2] R. Ashkenazy, L. Gottlieb, S. Yannai, Characterization of acetone-washed yeast biomass functional groups involved in lead biosorption, Biotechnol. Bioeng. 55 (1997) 1–10.

[3] A. Kapoor, T. Viraraghavan, Removal of heavy metals from aqueous solutions using immobilized fungal biomass in continuous mode, Wat. Res. 32 (1998) 1968–1977.

[4] L. Zhang, J. Zhou, D. Zhou, Adsorption of cadmium and strontium on cellulose/alginic acid ion exchange membrane, J. Membr. Sci. 162 (1999) 103–109.

[5] S. Hoshi, K. Kanuma, K. Sugamara, M. Uto, K. Akotsuka, The spectrophotometric determination of trace molybdenum(VI) after collection and elution as molybdate ion on protomated chitin, Talanta 44 (1997)1473–1478.

[6] N. M. Mahmoodi, R.Salehi, M. Arami, H. Bahrami, Dye removal from colored textile wastewater using chitosan in binary systems, Desalination 267 (2011) 64–72.

[7] J. Xie, C. Li, L. Chi, D.Wu, Chitosan modified zeolite as a versatile adsorbent for the removal of different pollutants from water, Fuel 103 (2013) 480-485.

[8] S. Ifuku, S. Morooka, M. Morimoto, H. Saimoto, Acetylation of chitin nanofibers and their transparent nanocomposite films, Biomacromolecules 11 (2010) 1326–1330.

[9] S.C.D.A. Fernanda, F.S.V. Eunice, R.C. Antonio, Interaction of indigo carmine dye with chitosan evaluated by adsorption and thermodynamical data, J. Colloid. Interf. Sci. 253 (2002) 243–246.

[10] R.S. Juang, F.C. Wu, R.L. Tseng, Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes, Biores. Technol. 80 (2001) 187–193.

[11] F.C.Wu, R.L. Tseng, R.S. Juang, Comparative adsorption of metal and dye on flake and bead type of chitosans prepared from fishery waste, J. Hazard. Mater. 73 (2000) 63–75.

[12] M. A. Robinson-Lora, R. A. Brennan. Efficient metal removal and neutralization of acid mine drainage by crab-shell chitin under batch and continuous-flow conditions, Biores. Technol. 100 (2009) 5063–507. [13] D. Zhou, L. Zhanga, J. Zhou, S. Guoc, Cellulose/chitin beads for adsorption of heavy metals in aqueous solution, Wat. Res. 38 (2004) 2643–2650.

[14] T. Şişmanoğlu, Removal of some fungicides from aqueous solution by the biopolymer chitin, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 297 (2007) 38–45.

[15] G. Crini, Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment, Prog. Polym. Sci, 30 (2005) 38–70.

[16] M. Kumar, A review of chitin and chitosan applications, React. Funct. Polym. 46 (2000) 1–27

[17] A.J. Varma, S. Deshpande, J. Kennedy, Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review, Carbohydr. Polym. 55 (2004) 77–93.

[18] G. Crini, P. Badot, Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature, Prog. Polym. Sci. 33 (2008) 399–447.

[19] F.A. Banat, S. Al-Asheh, Biosorption of phenol by chicken feathers, Environ.Engin. Policy 2 (2000) 85-90.

[20] J. Huang, X. Wang, Q. Jin, Y. Liu, Y. Wang, Removal of phenol from aqueous solution by adsorption onto OTMAC-modified attapulgite, J. Environ. Manage. 84 (2007) 229–236.

[21] A. Knop, L.A. Pilato, Phenolic Resins-Chemistry. Applications and Performance, Springer-Verlag, Berlin, 1985.

[22] World Health Organization, Guidelines for DrinkingWater Quality (vol.II): Health Criteria and Supporting Information, International Programme on Chemical Safety, second ed., WHO, Geneva, Switzerland, 1996.

[23] G. Busca, S. Berardinelli, C. Resini, L. Arrighi, Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments, J. Hazard. Mater.160 (2008) 265–288.

[24] N. Ahalya, T.V. Ramachandra, R.D. Kanamadi, Biosorption of heavy metals, Res. J. Chem. Environ. 7 (2003) 71–78.

[25] S. Mukherjee, S. Kumar, A.K. Misra, M. Fan, Removal of phenols from water environment by activated carbon, bagasse ash and wood charcoal, Chem. Eng. J. 129 (2007) 133–142.

[26] A. Tor, Y. Cengeloglu, M.E. Aydin, M. Ersoz, Removal of phenol from aqueous phase by using neutralized red mud, J. Colloid Interface Sci. 300 (2006) 498–503.

[27] S. Rengaraj, S.Moon, R. Sivabalan, B. Arabindoo, V. Murugesan, Removal of phenol from aqueous solution and resin manufacturing industry wastewater using an agricultural waste: rubber seed coat, J. Hazard. Mater. 89 (2002) 185–196.

[28] S. Lagergren, Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe, Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens, Handlingar 24 (1898) 1–39.

[29] Y.S. Ho, G. McKay, Pseudo-second order model for sorption processes, Process Biochem.34 (1999) 451-465.

[30] W.J. Weber, J.C. Morris, Kinetics of adsorption on carbon from solutions, J. Sanit. Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eng. 89 (1963) 31–60.

[31] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, J. Am. Chem. Soc. 40 (1918) 1361–1403.

[32] H.M.F. Freundlich, Über die Adsorption in Lösungen, Z. Phys. Chem. 57 (1906) 385-470.

[33] M.M. Dubinin, L.V. Radushkevich, Equation of the characteristic curve of activated charcoal, Chem. Zentr. 1(1) (1947) 875.

[34] M. Temkin, Mixtures of fused salts as ionic solutions, Acta Physicochimica URSS 20 (1945) 411-420.

[35] M.A.L Milhome., D. de Keukeleire, J.P Ribeiro, R.F. Nascimento, T.V. Carvalho, D.C. Queiroz, Removal of phenol and conventional pollutants from aqueous effluent by chitosan and chitin, Quim. Nova 32 (2009) 2122-2127.

[36] A.Y. Dursun, Ç.S. Kalayci, Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of phenol onto chitin, J. Hazard. Mater. 123 (2005) 151-157.

[37] A. Converti, M. Nakagawa, G. Pigatto, A. Lodi, B. Polakiewicz, E. Finocchio, M.S.A. Palma, A new kinetic and thermodynamic approach to phenol biosorption by chitosan and keratin, Environ. Eng. Manag. J. (2013), submitted.

[38] E. Daneshvar, M. Kousha, M.S. Sohrabi, A. Khataee, A. Converti, Biosorption of three acid dyes by the brown macroalga *Stoechospermum marginatum*: isotherm, kinetic and thermodynamic studies, Chem. Eng. J. 195-196 (2012) 297-306.

[39] H. Polat, M. Molva, M. Polat, Capacity and mechanism of phenol adsorption on lignite, Int.J. Miner. Process. 79 (2006) 264–273.

[40] R. I. Yousef, B. El-Eswed, A. H. Al-Muhtaseb, Adsorption characteristics of natural zeolites as solid adsorbents for phenol removal from aqueous solutions: Kinetics, mechanism and thermodynamics studies, Chem. Eng. J. 171 (2011) 1143–1149.

[41] M.R.Kasaai, A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy, Carbohyd. Polym. 71 (2008) 497–508.

[42] Y.Saito, T. Iwata, Characterization of hydroxyl groups of highly crystalline □-chitin under static tension detected by FT-IR, Carbohyd. Polym. 87 (2012) 2154-2159.

[43] K.Van de Velde, P. Kiekens, Structure analysis and degree of substitution of chitin, chitosan and dibutyrylchitin by FT-IR spectroscopy and solid state ¹³C NMR, Carbohyd. Polym. 58 (2004) 409-416.

[44] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F.M. Goycoolea, W. Arguelles-Monal, J. Desbrieres, M. Rinaudo, An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, Polymer 42 (2001) 3569-3580.

[45] F. Ding, X. Shi, X. Li, J. Cai, B. Duan, Y. Du, Homogeneous synthesis and characterization of quaternized chitin in NaOH/urea aqueous solution, Carbohyd. Polym. 87 (2012) 422-426.

[46] M-K. Jang, B.-G. Kong, Y.-I. Jeong, C. Hyung Lee, J-W. Nah, Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources J. Polym. Sci. Pol. Chem. 42 (2004) 3423–3432.

[47] A. Einbu, K.M. Vårum, Characterization of chitin and its hydrolysis to GlcNAc and GlcN, Biomacromolecules 9 (2008) 1870–1875.

[48] S.K. Nadavala, K. Swayampakula, V.M. Boddu, K. Abburi, Biosorption of phenol and *o*-chlorophenol from aqueous solutions on to chitosan–calcium alginate blended beads, J. Hazard. Mater. 162 (2009) 482-489.

[49] D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley, J.G. Grasselli, The Handbook of Raman and Infrared Characteristic Frequencies of Organic Molecules, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1994.

Caption of Figures

Figure 1. Effect of A) pH and B) initial phenol concentration on phenol adsorption by chitin. Experimental conditions: A) $C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$, $T = 25^{\circ}\text{C}$, biosorbent dosage = 4 g L⁻¹; B) pH = 2, $T = 25^{\circ}\text{C}$, biosorbent dosage = 4 g L⁻¹. **Figure 2.** Pseudo second-order kinetic plots of phenol removal by chitin at different starting phenol concentrations (mg L⁻¹): (\bigcirc) 10.4; (\blacksquare) 29.1; (\triangle) 41.4; (\blacklozenge); 69.9; (\times) 90.8. *T* = 25°C; pH 2; biosorbent dosage = 4 g L⁻¹.

Figure 3. Semi-log plots of $\ln(q_e/C_e)$ versus the reciprocal temperature (1/*T*), for estimation of the thermodynamic parameters of phenol removal by chitin. $C_0 = 50 \text{ mg } \text{L}^{-1}$; pH 2; biosorbent dosage = 4 g L⁻¹.

Figure 4. FT-IR spectra of raw chitin and chitin after phenol adsorption at pH = 2. Inset: high frequency region.

Figure 5. FT-IR subtraction spectrum: [chitin after phenol adsorption at pH = 2] - [raw chitin].