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

**Estudo da remoção de fenóis de soluções aquosas através da
adsorção em quitosana, degradação enzimática por tirosinase e
imobilização de tirosinase em matriz de quitosana**

Alexandre Camargo Chavita

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Mauri Sérgio Alves Palma

São Paulo
2010

Alexandre Camargo Chavita

**Estudo da remoção de fenóis de soluções aquosas através da
adsorção em quitosana, degradação enzimática por tirosinase e
imobilização de tirosinase em matriz de quitosana**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Mestre

Orientador/presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, 05 de Fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FAPESP, CAPES-PROAP e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço ao CESQ (Centro de Engenharia de Sistemas Químicos) do Departamento de Engenharia Química da EPUSP pelo uso do espectrofotômetro Varian Modelo Cary 50.

Agradeço ao Prof. Dr. Mauri Sérgio Alves Palma, orientador deste trabalho, professor e amigo que me ajudou muito a realizar este sonho, a crescer intelectualmente e profissionalmente.

Agradeço ao Prof. Dr. Sunao Sato, por ter me ajudado com sua competência como grande profissional que é, por ser sempre muito prestativo e atencioso com todos os assuntos que cercaram a qualificação de defesa deste trabalho e pela arguição feita na qualificação deste trabalho.

Agradecemos ao Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz pelo fornecimento da Quitosana usada neste projeto, pela ajuda na solução de problemas operacionais durante os experimentos e pelos apontamentos feitos durante a qualificação deste trabalho.

Agradecemos ao Prof. Dr. Wilson Miguel Salvagnini pelas valiosas considerações feitas durante a qualificação deste trabalho, elucidando a abordagem que deveríamos ter com relação aos resultados dos experimentos.

Agradecemos ao Prof. Adalberto Pessoa Jr. (FBT/FCF/USP) pelo uso do espectrofotômetro Beckman DU 640.

Agradecemos ao Prof. Luis Antonio Gioielli (FBT/FCF/USP) pelo uso do espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1203.

Agradecemos ao Prof. Pedro de Alcântara (DEQ-EPUSP) pelo uso do espectrofotômetro Beckman DU 530.

Agradeço à amiga Milena Nakagawa de Arruda por toda ajuda e paciência durante os quatros anos de faculdade que cursamos juntos e por mais essa etapa do mestrado.

Agradeço ao aluno, colega de laboratório e amigo Rafael Mitsuo Miyaguti, que me ajudou com os ensaios para confecção de flocos de quitosana resistente a agitação mecânica.

Agradeço à aluna, colega de laboratório e amiga Mariana de Souza Cologna pela ajuda na metodologia de quantificação da atividade enzimática, método de Worthington.

Agradeço aos alunos Mariana de Souza Cologna, Juliana Paula Rosa, Monica Gruner, Raquel Etienne Alvarez, Mariana Fonte Boa Deodato, por me ajudarem em tudo que precisei para finalizar este estudo.

Agradeço à minha família minha mãe Iraci Camargo Chavita, meu pai Luiz Carlos Chavita de Souza e meu irmão Felipe Camargo Chavita, por estarem comigo em todos os momentos da minha vida e por me darem suporte para eu ser quem eu sou hoje.

Agradeço a Karina Massigli, por sempre ser a pessoa que eu preciso e por me deixar fazer parte de sua vida.

CONTEÚDO

1. RESUMO	12
2. ABSTRACT	13
3. INTRODUÇÃO	14
3.1. Quitosana	14
3.2. Extração de Quitina	16
3.3. Conversão de Quitina em Quitosana	16
3.4. Tirosinase	17
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
4.1. Adsorção em Quitosana	19
4.2. Oxidação Enzimática com Tirosinase	21
4.3. Imobilização de Tirosinase em Quitosana	24
5. EQUIPAMENTOS EXPERIMENTAIS E MATERIAIS	24
5.1. Adsorção em Quitosana	25
5.2. Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre	26
5.3. Imobilização e Oxidação Enzimática com Tirosinase	28
6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	29
6.1. Adsorção em Quitosana	30
6.2. Confeções das Esferas	30
6.3. Ativação com Glutaraldeído	31
6.4. Imobilização da Tirosinase	31
6.5. Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre	32
6.6. Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada	32
7. MÉTODOS ANALÍTICOS	33
7.1. Determinação da Concentração de Fenol	33
7.2. Determinação da Atividade Enzimática	33
8. TRATAMENTO DOS DADOS	34
8.1. Introdução	34
8.2. Adsorção em Quitosana	34
8.3. Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada e Livre	36
8.4. Atividade Enzimática	37
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

9.1.	Adsorção em Quitosana	38
9.2.	Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre	45
9.3.	Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada	67
10.	CONCLUSÕES	86
10.1.	Adsorção em Quitosana	86
10.2.	Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre	86
10.3.	Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada	87
11.	SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	88
11.1.	Adsorção	88
11.2.	Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre	88
11.3.	Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada	88
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
13.	ANEXOS	95
13.1.	Ensaio de Adsorção em Quitosana	96
13.2.	Ensaio de Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada e Livre	97
13.3.	Metodologia de Análise da Atividade Enzimática da Polifenol Oxidase (Tirosinase)	98

Lista de Figuras

Figura 1 - Vaso agitado utilizado nos ensaios de oxidação enzimática com tirosinase livre.	26
Figura 2 - Vaso agitado de 1 L, sistema de agitação e banho.	27
Figura 3 - Vaso agitado de 1 L e sistema de agitação.	27
Figura 4 - Equipamento experimental utilizado nos ensaios de imobilização e de oxidação.	28
Figura 5 - Detalhe do equipamento experimental utilizado nos ensaios de imobilização e de oxidação.	28
Figura 6 - Equipamento experimental utilizado nos ensaios de imobilização e de oxidação.	29
Figura 7 - Curva de calibração para determinação da concentração de fenol ($T = 25^{\circ}\text{C}$).	35
Figura 8 - Curva de calibração para determinação da concentração de fenol ($T = 25^{\circ}\text{C}$).	36
Figura 9 - Verificação da reprodutibilidade dos ensaios ($T = 30^{\circ}\text{C}$).	38
Figura 10 - Influência de T e pH na adsorção de fenol em Quitosana ($CFenol_{in}=50$ ppm).	39
Figura 11 - Influência de T na cinética de adsorção (Quitosana, $pH=8$; $CFenol_{in}=50$ ppm).	40
Figura 12 - Influência de T nas isotermas de adsorção (Quitosana, $pH=8$).	41
Figura 13- Comparação da cinética de adsorção nas condições ótimas de T e pH	42
Figura 14 - Fenol adsorvido pela Quitosana.	43
Figura 15 - Isotermas de adsorção de fenol em Quitosana.	44
Figura 16 - Comparação da oxidação do fenol com Tirosinase em béquer e vaso agitado ($N=400$ rpm, $T=45^{\circ}\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $CFenol_{in}=100$ ppm, $pH=6,6$).	46
Figura 17 - Influência do pH na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $T=45^{\circ}\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $CFenol_{in}=100$ ppm).	47
Figura 18 - Influência de $CFenol_{in}$ na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $T=45^{\circ}\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $pH=6,6$).	48
Figura 19 - Influência de N na oxidação do fenol com Tirosinase ($pH=6,6$, $T=45^{\circ}\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $CFenol_{in}=100$ ppm).	49
Figura 20 - Influência de CT (U/mL) na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $T=45^{\circ}\text{C}$, $pH=6,6$, $CFenol_{in}=100$ ppm).	51
Figura 21 - Influência de T na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $pH=6,6$, $CT=50$ U/mL, $CFenol_{in}=100$ ppm).	52
Figura 22 - Oxidação do Fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $pH=6,6$, $CT=50$ U/mL, $CFenol_{in}=100$ ppm, $T=45^{\circ}\text{C}$).	54
Figura 23 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 01 ($T = 45^{\circ}\text{C}$, concentração enzimática = 50 U/mL).	59
Figura 24 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 02 ($T = 45^{\circ}\text{C}$, concentração enzimática = 50 U/mL).	60

Figura 25 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 03 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	60
Figura 26 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 04 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	61
Figura 27 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 05 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	61
Figura 28 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 06 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	62
Figura 29 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 07 (T = 55°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	62
Figura 30 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 08 (T = 35°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	63
Figura 31 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 09 (T = 25°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	63
Figura 32 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 10 (T = 15°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	64
Figura 33 - Verificação da reprodutibilidade do processo (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).	64
Figura 34 - Verificação da influência da temperatura (concentração enzimática = 50 U/mL).	65
Figura 35 - Meio de reação do Ensaio 02 antes (35A) e após o término da reação (35B).	67
Figura 36 - Esfera de Quitosana antes da ativação.....	68
Figura 37 - Esferas de Quitosana ativados com glutaraldeído (esferas escuras) e antes da ativação (esferas claras).	68
Figura 38 - Atividade da tirosinase pura.	69
Figura 39 – Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização.	70
Figura 40 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 03) (T=45°C, pH=6,6, Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer, Fig. 24).	71
Figura 41 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 04) (T=45°C, pH=6,6, ----- Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer com 50ml, Fig. 16).	73
Figura 42 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 05) (T=45°C, pH=6,6, ----- Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer 50ml, Fig. 16).	74
Figura 43 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 08) (T=45°C, pH=6,6, ----- Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer, Fig. 16).	75

Figura 44 - Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização em Quitosana modificada(maior resistência mecânica).	77
Figura 45 – Ensaio 1- oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.....	78
Figura 46 – Ensaio 2 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.....	79
Figura 47 – Ensaio 3 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.....	80
Figura 48 - Ensaio 4 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.....	81
Figura 49 - Ensaio 5 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.....	82
Figura 50 - Concentração total de fenol removido nos ensaios com enzima livre.....	83
Figura 51 - Concentração total de fenol remavido nos ensaios com reúso dos flocos.....	84
Figura 52 - Comparação do aproveitamento das enzimas na oxidação do fenol.....	85

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Análise Granulométrica da Quitosana	25
Tabela 2 - Reprodutibilidade (Quitosana; <i>CFenol</i> ,in=50 ppm).....	38
Tabela 3 - Influência do <i>pH</i> e T (Quitosana; <i>CFenol</i> ,in=50 ppm).....	39
Tabela 4 - Influência de T na cinética de adsorção (Quitosana, <i>pH</i> =8; <i>CFenol</i> ,in=50 ppm).	40
Tabela 5 - Influência de T nas isotermas de adsorção (Quitosana, <i>pH</i> =8).....	41
Tabela 6 - Cinética de adsorção nas condições ótimas (T=30 °C, <i>pH</i> =8,0).....	42
Tabela 7 - Fenol adsorvido pela Quitosana.	43
Tabela 8 - Influência do <i>pH</i> na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, T=45 °C, CT=50 U/mL, <i>CFenol</i> .in=100 ppm).....	47
Tabela 9 - Influência de C.Fenol.in na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, T=45 °C, CT=50 U/mL, <i>pH</i> =6,6).	48
Tabela 10 - Influência de N na oxidação do fenol com Tirosinase (<i>pH</i> =6,6, T=45 °C, CT=50 U/mL, <i>CFenol</i> .in=100 ppm).....	49
Tabela 11 - Influência de CT (U/mL) na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, T=45 °C, <i>pH</i> =6,6, <i>CFenol</i> .in=100 ppm).	50
Tabela 12 - Influência de T na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, <i>pH</i> =6,6, CT=50 U/mL, <i>CFenol</i> .in=100 ppm).....	52
Tabela 13- Oxidação do Fenol com Tirosinase (N=400 rpm, <i>pH</i> =6,6, CT=50 U/mL, <i>CFenol</i> =100 ppm, T=45 °C).....	53
Tabela 14 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 01 (T = 45 °C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	54
Tabela 15 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 02 (T = 45 °C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	55
Tabela 16 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 03 (T = 45 °C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	55
Tabela 17 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 04 (T = 45 °C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	56
Tabela 18 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 05 (T = 45 °C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	56
Tabela 19 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 06 (T = 45 °C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	57
Tabela 20 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 07 (T = 55 °C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	57

Tabela 21 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 08 (T = 35°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	58
Tabela 22 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 09 (T = 25°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	58
Tabela 23 – Resultados de concentração de fenol. Ensaio 10 (T = 15°C, concentração enzimática = 50 U/mL).....	59
Tabela 24 - Diâmetro das esferas de Quitosana.....	67
Tabela 25 - Atividade da tirosinase pura.	69
Tabela 26 - Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização.	70
Tabela 27 – Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 03).	71
Tabela 28 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 04).	72
Tabela 29 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 05).	74
Tabela 30 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 08).	75
Tabela 31 - Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização em Quitosana modificada (maior resistência mecânica).	76
Tabela 32 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.	78
Tabela 33 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.	79
Tabela 34 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.	80
Tabela 35 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.	81
Tabela 36 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.	82
Tabela 37 – Concentração total de fenol removido nos ensaios com enzima livre.....	83
Tabela 38 - Concentração total de fenol remavido nos ensaios com reúso dos flocos.....	83

1. RESUMO

O presente trabalho apresenta o estudo de processos biotecnológicos para a remoção de fenol de soluções aquosas em regime de batelada em 3 processos distintos (A), (B) e (C) respectivamente. Sendo eles a adsorção de fenóis de soluções aquosas em Quitosana, degradação enzimática de fenóis através da tirosinase em meio aquoso e adsorção/degradação de fenóis de soluções aquosas em Quitosana contendo tirosinase imobilizada.

Para isto foram estudadas as influências das variáveis temperatura, *pH*, concentração da Quitosana e velocidade de agitação no processo (A), temperatura, *pH*, concentração da tirosinase livre e velocidade de agitação no processo (B) e no processo (C), temperatura, *pH*, concentração da Quitosana, concentração da tirosinase imobilizada e velocidade de agitação.

Palavras chave: Efluentes, Tirosinase, Quitosana, Adsorção e Imobilização.

2. ABSTRACT

This paper presents the study of biotechnology processes for the removal of *p*henol from aqueous solution in batch reactor in 3 separate cases (A), (B) and (C) respectively. As they adsorption of *p*Henols from aqueous solutions on chitosan, enzymatic degradation of *p*Henols by tyrosinase in aqueous solution and adsorption / degradation of *p*Henols in aqueous solutions containing chitosan immobilized tyrosinase.

For this we examined the influence of varying temperature, *pH*, concentration of chitosan and stirring speed of the process (A), temperature, *pH*, concentration of free tyrosinase and stirring speed of the process (B) and Case (C), temperature , *pH*, concentration of chitosan, concentration of tyrosinase immobilized and speed of agitation.

Keywords: Wastewater, Tyrosinase, Chitosan, Adsorption and Immobilization.

3. INTRODUÇÃO

Os fenóis estão presentes nos efluentes de muitas indústrias, como refinarias de petróleo, coquerias, indústrias de resinas, têxteis, plástico, celulose, produção de pigmentos, corantes, indústrias que utilizam alcatrão como matéria prima (**Karam e Nicell, 1997**) entre outras. Assim, torna-se necessária a criação de técnicas eficientes e baratas para o tratamento destes efluentes, haja vista a toxicidade dos compostos fenólicos, que em concentrações da ordem de ppm podem ser letais, no caso da ingestão de 1g da substância ela pode ser letal mesmo para seres humanos (**Girelli, 2006**).

No Brasil a legislação impõe baixos limites de concentração em efluentes industriais tratados. De acordo com o Decreto Estadual no. 8468 de 8/9/1976 a concentração máxima de fenóis em efluentes industriais para lançamento em rios classe 1, 2 e 3 em 1 ppb; para rios classe 4 o limite máximo é de 1 ppm. No entanto a Resolução CONAMA no. 357, de 17/3/2005, é mais restritiva e limita o teor máximo de fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina), em 0,5 ppm para lançamento em corpos de água doce.

Das 129 substâncias presentes na lista de poluentes prioritários da Environmental Protection Agency (**Theodore et al., 1997**), 11 são compostos fenólicos. Sabendo da sua presença em muitos efluentes industriais se faz necessária o estudo de novos processos para o tratamento deste efluente que sejam mais baratos e tão eficientes quanto os já existentes, para que não haja o encarecimento do produto final devido aos gastos com o tratamento de seus efluentes.

3.1. Quitosana

A Quitosana é um polímero catiônico, produzido através da desacetilação da Quitina, encontrada, por exemplo, no exoesqueleto de artrópodes, como o camarão, caranguejos, lagostas, krill e formigas. As Quitinas são compostas por uma mistura de unidades de β -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi-d-glucopiranosose e unidades de β -(1-4)-2-

acetamino-2 desoxi-d-glucopirranose, podendo variar de acordo com a fonte de sua obtenção (Li et al., 2004).

Para a desacetilação da Quitina dois caminhos distintos podem ser tomados: (A) através da adição de solução de NaOH 50% m/m seguido de aquecimento a 110°C por 5h (No e Meyers, 2000); (B) por degradação parcial com enzimas específicas (Yomota et al., 1993 e Ottoy et al., 1996). O segundo tratamento é mais apropriado para a produção industrial da Quitosana, visto que é necessário um padrão rígido de qualidade. Ambos os processos disponibilizam grupos amina da cadeia, que na sua forma natural estão ligados a grupos acetila. Como esta remoção não é total na cadeia, ou seja, alguns complexos, como a amina-acetila permanecem ligados, não podemos considerar o polímero Quitosana como regular, mas um composto formado de grupos parcialmente desacetilados (Adati, 2006), como mostra a Figura 1.

Em meio ácido a Quitosana age como um floculante e coagulante sendo capaz da adsorver partículas, metais e moléculas presentes na solução, que podem ser retirados da solução através de filtração.

Figura 1 - Cadeias de Quitina e Quitosana.

A adsorção em Quitosana ocorre pela presença dos grupos amina, disponíveis para interações de Van Der Waals. A capacidade de adsorção é proporcional à área superficial (externa e dentro dos poros) das partículas de Quitosana. Esta determinação

é usualmente feita pelo método tradicional BET (**Juang e Ju, 1997**), baseado nas isotermas de adsorção de N_2 .

A Quitosana apresenta vantagens se utilizada no tratamento de efluentes, pois apresentam valores de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) menores do que os flocculantes usualmente utilizados como, por exemplo, os Polieletrólitos e Celulose Polianiônica. Outras vantagens da Quitosana são o seu baixo custo, atoxicidade e origem renovável.

A solubilidade da Quitosana é diretamente proporcional ao seu grau de desacetilação, de 1 a 40% de desacetilação o polímero é insolúvel, com níveis de desacetilação maiores que 40%, o polímero passa a ser solúvel (**Peter, 1995**).

3.2. Extração de Quitina

A Quitina é extraída a partir das cascas de camarão secas e trituradas (**Canella et al, 2001**). O processo químico que envolve o tratamento da quitina para sua posterior conversão em Quitosana, começa com a imersão das cascas em solução de HCl 2,0M, em proporção de 10 ml de ácido grama por quitina, após 5 horas nesta solução o polímero está dessalinizado, principalmente com relação aos sais de cálcio, presentes nas fibras musculares dos camarões. Após este tratamento inicial é feita a lavagem com água destilada e secagem ambiente. Novamente o polímero é colocado em solução de HCl 2,0M, na razão 2,5ml por grama de polímero, por 48 horas e sob agitação, para eliminação dos íons. Após a lavagem com água destilada, a remoção das proteínas agregadas ao material, é feita a imersão em solução de NaOH 1,0M na razão de 2,5ml por grama desde produto intermediário, durante 12h a 100°C. Com isto surgem flocos de Quitina pura, livre de impurezas que normalmente estão agregadas a sua estrutura mesmo após extração do camarão.

3.3. Conversão de Quitina em Quitosana

Consiste no processo de desacetilação da Quitina, onde esta é imersa em solução de NaOH 50% m/m e mantida a 110°C por uma hora.

Após este tratamento a Quitosana que é lavada com água destilada até atingir o *pH* neutro (**Monteiro, 1999**).

3.4. Tirosinase

A Tirosinase é uma Polifenol Oxidase presente em muitas frutas, verduras, frutos do mar e em cogumelos, responsável pelo escurecimento das frutas, quando estas têm seu tecido interno exposto ao oxigênio, atua numa faixa de *pH* de 5,0 - 8,0. São tetraméricas com peso molecular de 120 KDa, e possuem dois sítios ativos contendo um átomo de cobre em cada sítio. É obtida usualmente a partir do cogumelo e são empregadas como Biossensores de fenóis. Como mostrado na Figura 2, a reação de oxidação de fenóis promovida pela tirosinase consiste numa oxigenação inicial da enzima ($E_{\text{deoxy}} \rightarrow E_{\text{oxy}}$), esta por fim inicia a oxidação dos fenóis em dois ciclos (**Ikehata, 2000**).

Figura 2 - Ciclo catalítico: (I) hidroxilação de monofenóis e (II) deshidroxilação de o-fenóis em o-quinonas, produtos não tóxicos. M = Monofenóis e D = Difenóis.

De uma forma resumida a reação se processa como mostrado abaixo, e sempre na presença da Tirosinase atacando o oxigênio molecular.

A Figura 3 mostra a dependência do cobre, por parte da enzima, e os diferentes níveis de oxidação (met, oxi, deoxi), que a tirosinase apresenta, de acordo com o número de oxidação do cobre, estas variações ocorrem durante a segunda fase de reação, etapa 2, da Figura 3.

Figura 3 - Dependência de Tirosinase por Cobre.

O uso desta enzima em relação às Polifenol Peroxidases resulta em economia devido ao alto custo das peroxidases além do que, as polifenol oxidases não necessitam do peróxido de hidrogênio como substrato, elas usam o oxigênio molecular. O mais interessante quanto às reações envolvendo a tirosinase é o surgimento de oligômeros, que são semelhantes às melaninas, e por isso conferem coloração marrom à amostra, sendo assim possível quantificar em tempo real a degradação dos compostos fenólicos no leito fixo.

Uma característica importante das enzimas em geral é a de que nem todas as moléculas de enzimas presentes em uma amostra pura têm atividade enzimática, ou seja, são inativas. Por este motivo é usual utilizar um parâmetro experimental denominado “unidade de atividade enzimática, *U*” que corresponde à quantidade de enzima que causa a transformação de 1,0 μmol de substrato/min. a 25°C em condições ideais (Price e Stevens, 1999).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com o intuito de manter a pesquisa bibliográfica sobre o assunto do presente trabalho atualizada e também, sempre que possível, complementado, foi realizada uma pesquisa na área da literatura quanto aos trabalhos que possuíam informações que melhor pudessem contribuir para o embasamento teórico e experimental, como também, que resultassem no aprofundamento e ampliação dos temas propostos neste estudo, objetivando assim, aproveitar da melhor forma os recursos fornecidos pela Fundação Apoio a Pesquisa e Ensino de São Paulo (FAPESP).

As aplicações da Quitosana e da tirosinase livre ou imobilizada no tratamento de efluentes, particularmente os fenólicos, são bastante promissoras, sobretudo ao se considerar as possibilidades, por um lado, de funcionalização da Quitosana com grupamentos químicos específicos ao se tratar os efluentes por adsorção e, por outro lado, a combinação do uso da Quitosana com a tirosinase, livre ou imobilizada.

Os artigos resumidos a seguir mostram que as pesquisas sobre este assunto, apesar de ter tido início na década de 1980, ainda são muito atuais.

4.1. Adsorção em Quitosana

Chen et al. (2006) estudaram a adsorção de fenol, m-cresol e m-catecol em Quitosana ramificada com carboximetil- β -ciclodextrina (CCDC). Aqueles autores determinaram que a capacidade de adsorção da CCDC pelo fenol diminui com o *pH* e apresenta um valor máximo com a temperatura, sendo os valores ótimos de 3,0 e 30°C, respectivamente. A máxima capacidade de adsorção foi de aproximadamente 72 mg de fenol/g de CCDC, para uma concentração de fenol aquoso residual de 28 mg/L. A título de comparação, citamos aqui o trabalho de **Rhee et al. (1998)**, que determinaram uma capacidade de adsorção de fenol igual a 0,13 mg/L em Quitosana solubilizada (*pH* = 3,0) para a mesma concentração de fenol aquoso residual. A adsorção em CCDC é 554 vezes maior do que para a Quitosana.

No H. K, Meyres S.P (2000), fizeram o estudo da aplicação da Quitosana em tratamento de efluentes, o estudo apresenta as possibilidades de aplicação do polímero para a remoção de pesticidas, sólidos em suspensão, metais pesados e fenol dos efluentes e aponta a variável temperatura e *pH* como controle da eficiência do processo.

Rinaudo (2006) fez uma revisão da literatura sobre as propriedades e aplicações da quitina e da Quitosana. A quitina é utilizada no tratamento de efluentes contendo complexos de tiosulfato de prata e actinídeos. A Quitosana também é muito utilizada no tratamento de efluentes, como, por exemplo, na remoção de íons metálicos e no tratamento de água como floculantes e na eliminação de odor e cor.

Struszczyk (2002) fez uma revisão da bibliografia sobre propriedades e produção, aplicações e aspectos de biodegradação e de bioatividade da quitina e da Quitosana. Nestes trabalhos são abordadas as definições e os métodos analíticos de importantes propriedades, como grau de desacetilação, massa molar média, viscosidade, solubilidade e propriedades catiônicas. As aplicações da Quitosana são amplas compreendendo o tratamento de água e de efluentes, tratamento de papel, produtos farmacêuticos e médicos, cosméticos, biotecnologia, agricultura, alimentos, têxteis e membranas.

Takahashi et al. (2005) estudaram a adsorção de p-quinona em Quitosana e verificaram a influência da massa molar, grau de desacetilação, *pH* e temperatura neste processo. A remoção da p-quinona é fundamental no processo de oxidação de fenol com tirosinase, pois a p-quinona inativa a enzima. Aqueles autores determinaram que a massa molar e o grau de desacetilação influenciam pouco o processo para valores de até $1,2 \times 10^6$ g/gmol e de 83 a 89%, respectivamente. A eficiência do processo cresceu com o *pH* variando de 4,0 a 7,5 e estabilizou-se para valores maiores. A temperatura teve a maior influência provocando um aumento de cerca de 10 vezes nas concentrações adsorvidas ao se aumentar a temperatura de 10 para 55°C.

Yan (2006) estudou a influência do *pH* (2 a 7), concentração inicial de fenol (20 a 80 ppm) e temperatura (25, 35 e 45°C) na adsorção de fenol em Quitosana em regime dinâmico e no equilíbrio. A maior remoção de fenol, da ordem de 85%, foi obtida para *pH*=4,0; para valores diferentes de 4,0 as remoções caíram, sendo da ordem de 50% para valores de *pH* 2,0 e 7,0. O aumento da concentração inicial de fenol (de 20 para 80 ppm) provoca um aumento da concentração de fenol adsorvido de 8,0 para 25 mg/g Quitosana), porém a queda na remoção de fenol aquoso (de 85 para 65%). A concentração de fenol adsorvido caiu de 25 para 20 mg/g Quitosana com o aumento da temperatura de 25 para 45°C, ao se estudar soluções iniciais de concentração 80 ppm. O estudo da cinética mostrou que o equilíbrio de adsorção foi atingido em 6 horas. Os

resultados de cinética foram bem ajustados pelos modelos de pseudo 1^a. e de 2^a. ordem de Lagergren, sendo ligeiramente melhor para o último.

Ahmaruzzaman (2008) fez uma revisão da literatura sobre a adsorção de fenóis em biomateriais e resíduos de baixo custo, num total de 34 produtos, e verificaram que a capacidade máxima de adsorção determinada pelas isothermas de Freundlich, variou de 0,002 mg/g para a casca de arroz, 19,5 mg/g para penas de galinhas, 158 mg/g para carvão de petróleo tratado com KOH. Como referência relatou que para o carvão ativo comercial a máxima capacidade de adsorção era de 322, 5mg/g.

Li et al. (2009) estudaram a adsorção de fenol, p-clorofenol e p-nitrofenol em Quitosana funcionalizada com aldeído salicílico (CS-SA) e β -ciclodextrina (CS-CD). Utilizaram também um polímero da β -ciclodextrina com ligações cruzadas (EPI-CD). Verificaram a influência do *pH*, temperatura e a concentração de KCl, que altera a interação eletrostática entre os fenóis e os adsorventes. Determinaram as isothermas de adsorção e verificaram que a capacidade de adsorção caiu com o *pH*, como o aumento da temperatura e não se alterou com a concentração de KCl. As capacidades de adsorção foram muito superiores às da Quitosana, sendo da ordem de 35 mg/g para o fenol em EPI-CD, 20 mg/g para o p-nitrofenol em CS-AS e de 60 mg/g para o p-clorofenol em CS-CD.

4.2. Oxidação Enzimática com Tirosinase

Atlow et al. (1984) foram os pioneiros a estudar a utilização da tirosinase na oxidação de fenóis. Aqueles autores testaram soluções fenólicas com concentrações de 10 a 1000 ppm, bem como efluentes reais. Estudaram as influências do *pH* e da concentração enzimática na oxidação de vários fenóis, utilizando tirosinase pura e bruta extraída de cogumelos *Agaricus bispora*. Constataram que eficiências de remoção próximas de 100% são atingidas com *pH* do meio por volta de 8 e concentração enzimática de 50 U/mL. O extrato bruto de cogumelo mostrou-se mais eficiente do que a enzima. Substâncias não oxidáveis pela tirosinase também foram removidas do meio aquoso através da coprecipitação com os polímeros formados da oxidação dos fenóis.

Bevilaqua. J. V, Cammarota M. C, Freire D.M.G e Sant'Anna Jr G.L (2002), estudaram a utilização da tirosinase como um pré-tratamento para redução de carga de choque em sistemas microbiológicos aeróbicos de tratamento de efluentes fenólicos. Foi

estudada também a aplicação das enzimas como polimento a efluente tratado em sistemas biológicos, a redução das cargas de fenol foi alta, porém como a concentração de fenol que no sistema biológico eram altas, a eficiência deste foi baixa, não atingindo os limites exigidos pela legislação.

Duran e Esposito (2000) fizeram uma revisão da literatura sobre a utilização de enzimas oxidativas, incluindo a tirosinase, no tratamento de efluentes e solos contaminados. Aqueles autores verificaram que a tirosinase é particularmente apropriada no tratamento de compostos fenólicos, mas têm elevado custo na aplicação em escala industrial. Os custos podem ser reduzidos com a imobilização da enzima devido ao aumento da estabilidade enzimática. Sugerem ainda que o uso de raízes e tecidos vegetais contendo enzimas é uma boa alternativa na redução dos custos dos tratamentos.

Faria et al. (2007) fizeram uma revisão da literatura sobre o potencial biotecnológico da tirosinase extraída de cogumelos (*Agaricus bisporus*) e avaliaram os processos existentes para sua produção, recuperação e imobilização. Aqueles autores concluíram que para atender a demanda por tirosinase para o tratamento de efluentes fenólicos será necessário desenvolver processos para a produção em meio de cultivo, provavelmente de cogumelos.

Girelli A.M, Mattei E, Messina A (2006), estudaram a remoção de fenol, catecol, 4 – metilcatecol, cresol e Cl – fenol em sistemas com tirosinase imobilizada em amino propil e utilizando Quitosana como adsorvente da o – quinona para a redução da cor do efluente tratado. O processo foi desenvolvido de forma contínua, realizando o reciclo da água no sistema com enzimas e posteriormente com Quitosana. Foi estudado o comportamento da atividade enzimática em relação à redução do substrato.

Kameda et al. (2006) estudaram a oxidação de fenol com extrato de tirosinase, obtida de cogumelo (*Agaricus bisporus*) e com o tecido cru do cogumelo. Aqueles autores utilizaram concentrações enzimáticas de 50 a 400 U/mL e Quitosana como coagulante para tratar soluções aquosas de fenol a 100 ppm. Obtiveram remoções de fenol da ordem de 90% em reatores de batelada a 30°C e sem o controle do *pH*. Aqueles autores concluíram que o uso do extrato pode ter custo proibitivo no tratamento no tratamento de efluentes, mas o uso do tecido cru do cogumelo pode ser economicamente viável.

Molina et al. (2003) estudaram a oxidação enzimática de fenóis com extrato de alcachofra (*Cynara scolymus* L.), que contém peroxidases e polifenoloxidases (a tirosinase é uma polifenol oxidase) e outros constituintes não enzimáticos que auxiliam no tratamento dos efluentes. O fornecimento ao meio de quantidades adequadas de H_2O_2 e de O_2 aumentaram a oxidação de fenóis pelas 2 enzimas presentes, peroxidases e polifenoloxidases, respectivamente.

Nicell J.A e Ikehata K (2000), estudaram a utilização de tirosinase extraída de cogumelos (EC 1.14.18.11) com alternativa ao uso das peroxidases na redução de fenol aquoso. As variáveis estudadas foram o *pH* ideal para a reação e a utilização de polietileno glicol ou Quitosana para reduzir a inativação de tirosinase devido ao aumento da concentração de o-quinona no sistema.

Nicell J.A e Ikehata K (2000), estudaram a remoção de pigmentos produzidos no processo de conversão do fenol em o-quinona catalisado pela ação da tirosinase. O estudo buscou desenvolver uma técnica para adição de Quitosana no reator após o termino da reação ou da inibição da tirosinase de modo que a redução da cor fosse da ordem de 90%.

Yamada et al (2005), realizaram o estudo da bioconversão do fenol através da oxidação com tirosinase livre e adsorção química com esferas de Quitosana, o estudo mostra as condições ideais de *pH* e temperatura para a adsorção das o-quinonas produzidas durante a conversão do fenol.

Wada et al. (1993) estudaram a oxidação de fenóis com tirosinase livre e imobilizada, além de remover os produtos coloridos desta reação com Quitosana e quitina. A Quitosana aumentou a velocidade de oxidação do fenol devido à remoção das quinonas, originadas da oxidação dos fenóis que inativam a tirosinase. A tirosinase livre é menos eficiente do que a tirosinase imobilizada, que pode ser regenerada por até 10 vezes sem perder sua eficiência.

Wada et al. (1994) estudaram a remoção de fenóis e de aminas aromáticas de efluentes através da oxidação enzimática com tirosinase livre com e sem a presença de coagulantes (poli(hexametilenodiaminaepicloridrina), polietilenoimina e Quitosana) para a remoção dos produtos da oxidação dos fenóis, os quais conferem cor ao efluente e inativam a enzima. Aqueles autores concluíram que a Quitosana atua melhor como coagulante do que adsorvente dos fenóis oxidados e que os demais coagulantes foram melhores do que a Quitosana, por apresentarem a mesma eficiência, porém com

concentrações menores. Também testaram a tirosinase imobilizada em resina trocadora catiônica e magnetita e confirmaram, como no artigo anterior, a maior estabilidade da enzima imobilizada.

4.3. Imobilização de Tirosinase em Quitosana

Legge L. R, Ensuncho L, Alvarez – Cuenca M (2005), desenvolveram uma planta piloto onde realizaram o estudo utilizando alginato em matriz Quitosana para imobilizar tirosinase e realizar o tratamento de águas residuais em três fases leito fluidizado através do stripping do fenol aquoso. Este estudo verificou a influencia de quantidade de ar utilizado no stripping e a inativação da tirosinase devido à produção de o – quinona.

Li-Qun Wu et al (2001), estudaram a remoção de compostos fenólicos realizando o stripping das substâncias e catalisando a oxidação dos vapores utilizando tirosinase imobilizada em filmes de Quitosana.

Peniche C. et al (2005), estudaram a produção de micro esferas de Quitosana e sua aplicação como matriz de imobilização de tirosinase, A técnica teve como foco a magnetização das esferas de Quitosana através a suspensão água e óleo com posterior adição de tolueno. A ativação das esferas foi realizada com a adição de glutaraldeído e foi avaliada a quantidade de ciclos que o sistema Quito sana pode suportar mantendo uma eficiência satisfatória.

5. EQUIPAMENTOS EXPERIMENTAIS E MATERIAIS

Os equipamentos e aparelhagem referentes às etapas (A), (B) e (C) do projeto, ou seja, estudo da adsorção de fenol em Quitosana, oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre e oxidação enzimática de fenol com tirosinase imobilizada em Quitosana, respectivamente, foram montados no Laboratório de Tratamento e Valorização de Efluentes – LTVE, localizado no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FBT/FCF/USP). Este laboratório foi montado com recursos da FAPESP, auxílio no. 2004/09946-5, concluído em Novembro/2006.

5.1. Adsorção em Quitosana

Os principais equipamentos utilizados consistiam de béqueres, agitadores magnéticos com aquecimento, balanças semi-analíticas, entre outros e, devido à sua simplicidade, não estão mostrados esquematicamente em uma figura.

Os produtos químicos utilizados para a realização dos ensaios foram: fenol P.A., adquirido da Sigma-Aldrich, e Quitosana em pó fornecida pelo Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz do FBT/FCF/USP e colaborador deste projeto.

A Quitosana tem massa molar média de 6×10^5 g/gmol, determinada por medidas de viscosidade, e grau de desacetilação DA=60%. A análise granulométrica da amostra de Quitosana pode ser observada na Tabela 01.

Tabela 1 - Análise Granulométrica da Quitosana

Tamanho da Malha (Peneira Tyler)	D_p (μm)	% Retida (m/m)
Tyler < 100	$D_p > 149$	18,3
100 < Tyler < 150	$105 < D_p < 149$	50,7
150 < Tyler < 200	$74 < D_p < 105$	20,6
200 < Tyler < 250	$63 < D_p < 74$	3,6
250 < Tyler < 270	$53 < D_p < 63$	5,3
Tyler < 270	$D_p < 53$	1,4

Os dados da Tabela 01 mostram que 50,7% da massa das partículas de Quitosana têm diâmetro médio entre 105 e 149 μm , ou malha Tyler entre 100 e 150. Nos ensaios utilizou-se a fração de tamanho $210 < D_p < 841 \mu\text{m}$.

Os produtos químicos utilizados na análise espectrofotométrica foram: fenol, solução aquosa padrão de fenol 1000 ppm, 4-aminoantipirina, ácido bórico, cloreto de potássio e ferrocianeto de potássio, todos P.A., adquiridos da Sigma Aldrich. Em todos os ensaios utilizou-se água destilada. As filtrações do sobrenadante das suspensões de Quitosana foram feitas a vácuo com papel de filtro Millipore de diâmetro de malha 0,45, 1,2, 5,0 e 8,0 μm .

5.2. Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre

O equipamento utilizado está mostrado na Figura 1, o reator agitado, R, é de vidro, com volume útil de 1 L, encamisado para resfriamento ou aquecimento. Há 4 entradas nesse reator, uma para o agitador, A, o indicador de temperatura, T, uma para alimentação, uma para amostragem com agulha e seringa, S, e funil para alimentação de solvente, F. Há, também uma válvula, V, na base do reator, para descarregamento. No agitador, A, há um indicador de velocidade, constante e ajustável (100 a 1500 rpm). O banho termostatzado, B, pode ser regulado para temperaturas de 20 a 60 °C de modo manter a temperatura constante no reator.

Figura 1 - Vaso agitado utilizado nos ensaios de oxidação enzimática com tirosinase livre.

As Figuras 2 e 3 mostram os equipamentos utilizados nos ensaios.

Figura 2 - Vaso agitado de 1 L, sistema de agitação e banho.

Figura 3 - Vaso agitado de 1 L e sistema de agitação.

5.3. Imobilização e Oxidação Enzimática com Tirosinase

O embasamento para os ensaios de imobilização seguiu as informações da literatura (**Gaspari et al., 1999; Edwards et al., 1999 e Shao et al., 2007**), onde ligações covalentes são as responsáveis pela interação matriz-enzima. A Figura 4 apresenta o esquema do equipamento utilizado nos ensaios de imobilização e oxidação.

Figura 4 - Equipamento experimental utilizado nos ensaios de imobilização e de oxidação.
Nas Figuras 5 e 6 estão mostradas fotografias dos equipamentos utilizados.

Figura 5 - Detalhe do equipamento experimental utilizado nos ensaios de imobilização e de oxidação.

Figura 6 - Equipamento experimental utilizado nos ensaios de imobilização e de oxidação.

Os produtos químicos utilizados na realização dos ensaios foram: solução aquosa padrão de fenol 1000 PPM, tirosinase T3824-25KU (4,7 mg, 5370 U/mg), K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e H_3PO_4 , Ácido acético, Hidróxido de Sódio, Glutaraldeído, L-Tirosina Comassie Blue, Albumina Bovina, Álcool Etílico 95%, Azida Sódica, Cloreto de Sódio todos P.A. adquiridos da Sigma Aldrich. O H_3PO_4 foi utilizado na amostragem. O_2 com grau de pureza superior a 99,8% da White Martins – Praxair Inc., Osasco, SP.

Os produtos químicos utilizados na análise espectrofotométrica do fenol aquoso residual são os mesmos discriminados no item anterior. Em todos os ensaios e amostragens utilizou-se água destilada ou deionizada.

6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos experimentais na etapa (A) correspondem aos ensaios de determinação da influência do pH e T na concentração final residual de fenol aquoso após a adsorção em Quitosana, na cinética e isotermas de adsorção.

Na etapa (B) foi desenvolvida a metodologia para realização de ensaios de oxidação de fenol com tirosinase livre em vaso agitado.

Na etapa (C) foram desenvolvidas, e/ou testadas, metodologias para a confecção de esferas de Quitosana, ativação da Quitosana com glutaraldeído, imobilização de

tirosinase em Quitosana e realização de ensaios de oxidação enzimática de fenol por tirosinase imobilizada.

6.1. Adsorção em Quitosana

Para a realização dos ensaios para a verificação da influência do *pH* foi preparado 50 mL de soluções aquosas de fenol a 50 ppm e adicionado HCl ou NaOH 0,1 N sob agitação para o ajuste do *pH* nos valores desejados (5 a 10). A estas soluções adicionou-se então 0,5 g de Quitosana. Estas soluções foram então colocadas em banho termostatizado agitado (movimento de vai-vem dos frascos) com temperatura ajustada em 20, 30 ou 50°C e mantidos nesta condição por pelo menos 24 hs. Ao término deste tempo foram coletados 600µL do sobrenadante, filtrados em papel de 0,45 µm e diluídos com 600 µL de água destilada para determinação da concentração de fenol residual.

Nos ensaios para determinação da cinética e adsorção foi preparado 50 mL de soluções aquosas de fenol a 50 ppm e o *pH* era ajustado com HCl ou NaOH 0,1 N no valor ótimo obtido anteriormente. A estas soluções foram então adicionados 0,5 g de Quitosana e então colocadas em banho termostatizado na temperatura ótima determinada anteriormente. Foram coletados 600µL do sobrenadante, filtrados em papel de 0,45 µm e diluídos com 600 µL de água destilada para determinação da concentração de fenol residual, a cada 2 h até 24 h.

Nos ensaios para determinação das isotermas de adsorção foi preparado 50 mL de soluções aquosas de fenol com concentração variando de 10 a 90 ppm e o *pH* foi ajustado com HCl ou NaOH 0,1 N no valor ótimo obtido anteriormente. A estas soluções foram então adicionados 0,5 g de Quitosana e então colocadas em banho termostatizado na temperatura ótima determinada anteriormente. Ao término do ensaio foram coletados 600µL do sobrenadante, filtrados em papel de 0,45 µm e diluídos com 600 µL de água destilada para determinação da concentração de fenol residual.

6.2. Confeções das Esferas

Para a confecção das esferas foram testados dois protocolos onde o que diferenciou ambos foi a proporção Quitosana/água e a desidratação da esfera.

No primeiro método foram dissolvidos 5g de Quitosana em 200 ml de solução de ácido acético (5%*m/m*). Deixou-se essa solução em homogeneização por 10 minutos. Posteriormente essa solução foi gotejada em uma solução de NaOH (2M) para a formação de partículas sólidas esféricas de Quitosana. Foram formadas cerca de 200 esferas de Quitosana que foram lavadas com água deionizada e mantidas em água deionizada por 24 h para remoção de resquícios de ácido acético, NaOH e Acetato de Sódio. Estas esferas foram mantidas em solução tampão fosfato (*pH* 7,0 e 1,0M) até que fossem usadas os ensaios de adsorção ou imobilização enzimática.

No segundo método foram dissolvidos 10g de Quitosana em 200 ml de solução de ácido acético (5%*m/m*). Deixou-se essa solução em homogeneização por 10 minutos. Posteriormente essa solução foi gotejada em uma solução de NaOH (2M) para a formação de partículas sólidas esféricas de Quitosana. Foram formadas cerca de 200 esferas de Quitosana que foram lavadas com água deionizada e mantidas em água deionizada por 24 h para remoção de resquícios de ácido acético, NaOH e Acetato de Sódio. Após este período as esferas foram mantidas por 48h em vidro de relógio para desidratação e conseqüentemente aumento da resistência mecânica.

A utilização deste segundo método foi necessária devido à falta de resistência mecânica apresentada pelas esferas de Quitosana processadas no primeiro método.

6.3. Ativação com Glutaraldeído

As esferas de Quitosana limpas foram colocadas em uma solução aquosa de glutaraldeído (3%*m/m*) e submetidas a uma agitação suave em um banho termostaticado e temperatura de 30 °C durante 24h. No final do processo as esferas foram lavadas para retirar o excesso de glutaraldeído. As esferas de Quitosana ativadas foram mantidas em tampão fosfato *pH* 7,0 a 0,1 M.

6.4. Imobilização da Tirosinase

Foram utilizadas 50 esferas de Quitosana previamente tratadas em solução de glutaraldeído, sendo 25 esferas produzidas sem desidratação e 25 esferas produzidas com desidratação, estas últimas foram utilizadas apenas em ensaios de imobilização enquanto as outras foram utilizadas nos ensaios de adsorção e imobilização. A enzima

tirosinase (4,7 mg) foi dissolvida em 10 ml de solução tampão fosfato (pH 7,0 e 0,1M). As esferas de Quitosana foram colocadas em um béquer contendo a solução de tampão fosfato e tirosinase, sob agitação, em banho com temperatura de 4°C. Estes ensaios tiveram duração de 8 horas cada e as amostras da solução aquosa que banhava as esferas de quitosana ativada foram coletadas entre 2 e 8 h de ensaio, de 100 a 300µL e colocadas em frasco âmbar com tampa e batoque e imediatamente armazenadas a -80°C para determinação posterior da atividade enzimática residual.

A análise de atividade enzimática residual na solução de tirosinase teve como objetivo avaliar a imobilização, à medida que a atividade residual diminuía era concluído que as enzimas estavam imobilizadas nas esferas de Quitosana e não mais diluídas em solução, uma vez que a atividade enzimática não diminui neste curto espaço de tempo como foi comprovado nos estudos de atividade enzimática dos ensaios de oxidação com enzima livre.

6.5. Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre

Estes ensaios foram realizados no equipamento mostrado nas Figuras 5 e 6. Adicionava-se ao vaso 500 mL de solução aquosa de fenol a 100 ppm dissolvido em tampão fosfato 0,05 M e pH = 6,5. Ajustavam-se então a velocidade de agitação, N, na faixa de 200 a 800 rpm e a temperatura, T, nos valores 15, 25, 35 ou 45°C. Os experimentos eram iniciados ao se adicionar solução de 3 mL de tampão fosfato pH =6,6 contendo 25.000 U de enzima. Para a verificação da influência de N utilizou-se pH =6,6 e T=45°C. Os ensaios para verificação da influência de T foram realizados com N=400 rpm. Os ensaios para verificação da influência de pH foram realizados com T=45°C e N=400 rpm, e valores de pH =5,6, 6,6 e 7,6. As amostras eram de 300µL filtradas em filtros de 0,45µm e eram colocadas em frascos âmbar com tampa e batoque contendo 60µL de ácido fosfórico 8,5% m/v e 600µL de água destilada.

6.6. Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada

Para a realização destes ensaios foi utilizado o equipamento mostrado nas Figuras 4 a 6. As 25 esferas de Quitosana com tirosinase imobilizada foram colocadas em 50 ml de solução de fenol 100 ppm dissolvido em tampão fosfato 0,05 M e pH = 6,5,

com agitação, aeração e temperatura $T=45^{\circ}\text{C}$. Sendo os valores de pH e T ótimos para esta enzima. As amostragens para determinação da concentração de fenol residual foram realizadas nos instantes 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 220 min. nos primeiros ensaios, as amostragem nos últimos ensaios foram coletados nos instantes 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 220, 260 e 300 min. As amostras eram de 300 μL e eram colocadas em frascos âmbar com tampa e batoque contendo 60 μL de ácido fosfórico 8,5% m/v e 600 μL de água destilada. As esferas eram então lavadas com água destilada e reutilizadas no próximo ensaio seguindo a mesma metodologia citada.

7. MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises eram espectrofotométricas e foram utilizados os seguintes aparelhos:

- Espectrofotômetro Beckman DU 640 (Prof. Adalberto Pessoa Jr, FCF/USP).
- Espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1203 (Prof. Luis Antonio Gioielli, FCF/USP).
- Espectrofotômetro Modelo Cary 50 Varian (CESQ, DEQ-EPUSP).
- Espectrofotômetro Beckman DU 530 (Prof. Pedro de Alcântara, DEQ-EPUSP).

7.1. Determinação da Concentração de Fenol

As análises foram feitas com base no método CETESB (Anvisa, 1996) e em curvas de calibração de absorbância em função da concentração obtidas a partir de soluções com concentrações padronizadas de fenol aquoso.

7.2. Determinação da Atividade Enzimática

A metodologia de Worthington foi utilizada para a determinação de atividade enzimática das amostras de enzima utilizadas nos ensaios de oxidação com enzima livre e oxidação com enzima imobilizada.

A análise da atividade enzimática baseou-se na metodologia Worthington. Oxigenou-se uma “solução A” (1ml de tampão fosfato de /pH/ 6,5 e 0,5M + 1,0ml de solução de Tirosina 0,001M + 0,9ml de água deionizada) por no mínimo 5 minutos e à 25°C. Adicionou-se à “solução A” 100µl de e feita a leitura espectrofotométrica dessas amostras (100µl + 1,9ml de “solução A”) com comprimento de onda de 280nm em cubetas de quartzo. A “solução A” pura foi utilizada para ser o “branco” desse ensaio de Atividade. Foi feita a leitura espectrofotométrica em cada amostra de minuto a minuto por um tempo total de no mínimo 15 minutos.

8. TRATAMENTO DOS DADOS

8.1. Introdução

Os resultados primários obtidos foram absorbâncias correlacionadas com a concentração do fenol residual na fase aquosa através de uma curva de calibração. O método de análise utilizado foi o padronizado pela CETESB (Anvisa, 1996). As curvas de calibração obtidas para os ensaios de adsorção em biomateriais e os ensaios de oxidação enzimática foram ligeiramente diferentes entre si devido ao fato de utilizarmos espectrofotômetros diferentes e volumes de amostragens e de diluições específicas e mais adequadas para cada tipo de ensaio.

8.2. Adsorção em Quitosana

CONCENTRAÇÃO DE FENOL AQUOSO

Uma curva de calibração típica para obtenção dos dados de concentração de fenol, $CFenol$, a partir dos dados de ABS estão mostrados na Figura 7, juntamente com a reta de regressão linear, que apresentou um coeficiente de correlação elevado ($R^2 = 0,996$).

Figura 7 - Curva de calibração para determinação da concentração de fenol (T = 25 °C).

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

$$CFenol_{,Res} = (51,00.ABS - 1,775).10 \quad (6)$$

Onde: $CFenol_{,Res}$ = concentração de fenol aquoso residual (ppm)

ABS = absorvância da amostra

O fator 10 foi introduzido na eq. (6) para corrigir o valor da concentração obtida em vista do fato de a amostra da solução sobrenadante ter sido diluída 10 vezes.

Concentração de Equilíbrio de Fenol Adsorvido no Biomaterial

A concentração de equilíbrio de fenol adsorvido é dada pela expressão:

$$CFenol_{,Ads} = \frac{(C_0 - CFenol_{,Res}).V}{m_{biomaterial}} \quad (7)$$

Onde: $CFenol_{,Ads}$ = concentração de equilíbrio de fenol adsorvido (mg/g)

C_0 = concentração inicial de fenol na solução aquosa (ppm)

$CFenol_{,Res}$ = concentração de fenol aquoso residual (ppm)

$m_{Biomaterial}$ = massa de Quitosana na solução aquosa de Fenol (g)

V = volume da solução aquosa de fenol (L).

8.3. Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada e Livre

CONCENTRAÇÃO DE FENOL AQUOSO RESIDUAL

A curva de calibração típica para obtenção dos dados de concentração de fenol residual, $CFenol_{Res}$ a partir dos dados de ABS estão mostrados na Figura 8, juntamente com a reta de regressão linear, que apresentou um coeficiente de correlação elevado ($R^2 = 0,993$).

Figura 8 - 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 é dada pela expressão:

$$CFenol_{Res} = 181,6.ABS + 2,048 \quad (8)$$

Onde: $CFenol_{Res}$ = concentração de fenol aquoso residual (ppm)

ABS = absorbância da amostra

8.4. Atividade Enzimática

A atividade enzimática é definida como a velocidade de variação de absorbância de 0,001 unidades de absorbância (unidades de absorbância/min) de uma determinada quantidade de enzima nas condições padrão de $\lambda=280$ nm, $T=25^{\circ}\text{C}$ de uma solução líquida saturada de oxigênio e com a seguinte composição:

Reagente	V (μL)
Tampão Fosfato 0,5 M, <i>pH</i> 6,5	1.000
L-Tirosina 0,001 M	1.000
Água Deionizada	900
Amostra	100

A determinação da absorbância deve ser feita durante 15 min. com cubeta de quartzo e comprimento e determinada a velocidade da absorbância no trecho linear da curva.

O cálculo da atividade enzimática é feito através da seguinte expressão:

$$U = \Delta_{280} \times 1000 \quad (9)$$

onde: U = Unidade de Atividade Enzimática (min^{-1})

Δ_{280} =velocidade de variação da absorbância no trecho linear da curva (min^{-1})

O valor 1000 é o fator que transforma a absorbância de unidades *ABS* para unidades 10^{-3}ABS

A eq.(9) dá a atividade total de uma amostra contendo enzima. Assim, cabem algumas observações para não haver confusão quanto aos valores e unidades de atividade enzimática relatadas neste relatório e apresentadas na literatura. A amostra é apenas uma parte do sistema enzimático, ou seja, para se saber a atividade total do meio sendo analisado é necessário aplicar os fatores de amostragem. A atividade poderá ser expressa como uma grandeza intensiva dividindo o valor obtido pela expressão (9) pelo volume da amostra ou pela massa de enzima contida na amostra. Desta forma, teríamos, por exemplo, atividades com as unidades U/mL ou U/mg, respectivamente. O resultado obtido pela expressão (1) deve estar na faixa de 200 a 400 U/mL para se obter uma maior precisão dos resultados. Caso não esteja, deve-se providenciar a diluição ou concentração da amostra e se repetir a determinação da atividade.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Adsorção em Quitosana

Foram realizados ensaios para a determinação da influência do pH e T na concentração final residual de fenol na cinética e isotermas de adsorção em Quitosana. Os valores das variáveis estudadas foram: $pH=5, 6, 7, 8, 9, 10$; $T=20, 30$ e $50^{\circ}C$; concentração inicial de fenol, $CFenol_{in}$, de 50 ppm. Os resultados do estudo da adsorção em Quitosana, estão mostrados nas Tabelas 2 a 5. Os mesmos resultados em forma de gráficos são mostrados nas Figuras 9 a 12.

Os resultados para verificação da reprodutibilidade estão mostrados na Tabela 02 e Figura 09. Foram obtidos na adsorção de fenol em Quitosana para $CFenol_{in}=50$ ppm, $T=30^{\circ}C$ e tempo de contato de 24h.

Tabela 2 - Reprodutibilidade (Quitosana; $CFenol_{in}=50$ ppm).

pH	$CFenol_{Res\ 1}$ (ppm)	$CFenol_{Res\ 2}$ (ppm)	$CFenol_{Res\ 3}$ (ppm)	$CFenol_{Res\ 4}$ (ppm)	$CFenol_{Res\ Médio}$ (ppm)	S (ppm)	CV (%)
5	34,4	34,1	38	33,3	35,0	2,1	6,0
6	27,2	27,3	30,5	30,8	29,0	2,0	6,8
7	23,4	25,9	26,5	25,1	25,2	1,4	5,3
8	21,3	23,4	23,3	23,3	22,8	1,0	4,5
9	25,8	24,3	27,5	26,3	26,0	1,3	5,1
10	36,1	32,5	37,1	33,6	34,8	2,1	6,1

Figura 9 - Verificação da reprodutibilidade dos ensaios ($T = 30^{\circ}C$).

A Tabela 02 mostra que os resultados foram bastante reprodutíveis com desvio padrão, S , variando de 1,0 a 2,1 ppm e coeficiente de variação, CV , variando de 4,5 a 6,8%. Observou-se um mínimo de $CFenol_{Res}$ em $pH=8,0$, que é, aproximadamente, o valor de pH natural da mistura de Quitosana com a solução aquosa de fenol 50 ppm e 0,5 g de Quitosana.

A Tabela 03 e a Figura 10 mostram os resultados da influência do pH e T em $CFenol_{Res}$ para $CFenol_{in}=50$ ppm. Verifica-se que os menores valores de $CFenol_{Res}$ foram obtidos para $T=30^{\circ}C$ e $pH=8,0$.

Tabela 3 - Influência do pH e T (Quitosana; $CFenol_{in}=50$ ppm).

pH	$CFenol_{Res}$ (ppm)		
	$T=20^{\circ}C$	$T=30^{\circ}C$	$T=50^{\circ}C$
5	48,1	34,9	49,0
6	49,3	28,9	49,3
7	49,8	25,2	49,0
8	49,3	22,9	49,1
9	49,4	26,0	49,0
10	49,6	34,8	49,1

Figura 10 - Influência de T e pH na adsorção de fenol em Quitosana ($CFenol_{in}=50$ ppm).

Os resultados de verificação da cinética de adsorção estão mostrados na Tabela 04 e Figura 11, obtidos para $CFenol_{in}=50$ ppm.

Tabela 4 - Influência de T na cinética de adsorção (Quitosana, $pH=8$; $CFenol_{in}=50$ ppm).

$CFenol_{Res}$ (ppm)					
t (h)	$T=20^{\circ}C$	t (h)	$T=30^{\circ}C$	t (h)	$T=50^{\circ}C$
0	50	0	50	0	50
2	51,1	1	36	2	44,3
4	51,4	2	37,7	4	40,7
6	51,3	3	30	6	44,7
24	48,2	4	35,6	24	43,5
-----	-----	5	33,8	-----	-----
-----	-----	24	35,3	-----	-----

Figura 11 - Influência de T na cinética de adsorção (Quitosana, $pH=8$; $CFenol_{in}=50$ ppm).

Observa-se que para valores de tempo de ensaio de 2 h, o valor de $CFenol_{Res}$ já era, praticamente, o de equilíbrio. Os ensaios tiveram duração de 24 h, porém, as amostragens foram regulares para tempos de até 6h e depois somente no final do ensaio, 24h.

As isotermas de adsorção da Quitosana estão mostradas na Tabela 05 e Figura 12.

Tabela 5 - Influência de T nas isotermas de adsorção (Quitosana, pH=8).

$T=20^{\circ}\text{C}$		$T=20^{\circ}\text{C}$		$T=30^{\circ}\text{C}$		$T=50^{\circ}\text{C}$		$T=50^{\circ}\text{C}$	
$CFenol_{Re}$ _s	$CFenol_{Ad}$ _s	$CFenol_{Re}$ _s	$CFenol_{Ad}$ _s	$CFenol_{Re}$ _s	$CFenol_{Ad}$ _s	$CFenol_{Re}$ _s	$CFenol_{Ad}$ _s	$CFenol_{Re}$ _s	$CFenol_{Ad}$ _s
(ppm)	(mg/g)	(ppm)	(mg/g)	(ppm)	(mg/g)	(ppm)	(mg/g)	(ppm)	(mg/g)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12,2	0	13,1	0	1,3	0,87	10,4	0	11,4	0
21,6	0	25	0	8,6	1,14	17,9	0,21	27,2	0
33	0	32,7	0	11,6	1,84	27,2	0,28	32,9	0
35,6	0,44	41,4	0	18	2,2	32,1	0,79	49,1	0,09
48,6	0,14	49,3	0,07	22,9	2,71	39,5	1,05	52,1	0,79
61,7	0,83	55,3	0,47	27,3	3,27	48,2	1,18	64,2	0,58
74,1	1,59	69,5	0,09	32,9	3,71	63,6	0,64	86,6	0
-----	-----	74,8	0,52	37,1	4,29	67,7	1,23	84,5	0,55
-----	-----	84,8	0,52	43,1	4,69	69,4	2,06	-----	-----

Figura 12 - Influência de T nas isotermas de adsorção (Quitosana, pH=8).

Observa-se que a concentração de fenol adsorvido, $CFenol_{Ads}$, cresce linearmente com $CFenol_{Res}$ para $T=30^{\circ}\text{C}$ e o maior valor obtido foi de 4,69 mg/g. Para $T=20$ e 50°C a capacidade de adsorção ficou abaixo de 0,5 mg/g, para $CFenol_{Res}$ de até 30 ppm, e ficou ao redor de 1 mg/g para valores maiores de $CFenol_{Res}$.

Observou-se que após cerca de 6h de ensaio o processo de adsorção em Quitosana atingiu o equilíbrio a eficiência de remoção apresentada pela Quitosana aumentou à medida que houve o aumento da temperatura, de 20 para 30°C e caem par 50°C .

A Quitosana apresentou capacidades máximas de cerca de 8,5 e 4,5 mg/g, com indicação de poderem ser ainda maiores a 50°C a capacidade máximas de adsorção da foi da ordem de 2 mg/g. A Tabela 6 e a Figura 13 mostram, comparativamente, os resultados da cinética de adsorção para $T=30^{\circ}\text{C}$ e $pH=8,0$.

Tabela 6 - Cinética de adsorção nas condições ótimas ($T=30^{\circ}\text{C}$, $pH=8,0$).

Quitosana	
t (h)	$CFenol,_{Res}$ (ppm)
0	50,0
1	36,0
2	37,7
3	30,0
4	35,6
5	33,8
24	35,3

Figura 13- Comparação da cinética de adsorção nas condições ótimas de T e pH.

Os resultados mostram que a adsorção em Quitosana atingiram o equilíbrio antes de 6h de ensaio.

Na Tabela 07 e na Figura 14 estão apresentados os resultados de porcentagem de fenol adsorvido.

Tabela 7 - Fenol adsorvido pela Quitosana.

CQuitosana (g/L Solução)	C _{Fenol} Aquoso (ppm)	q _{eq} (mg Fenol/g Quitosana)	Fenol Adsorvido (%)
10	30,7	6,93	69,3
20	33,8	3,31	66,2
30	29,7	2,34	70,3
40	28,1	1,80	71,9
50	27,1	1,46	72,9
60	34,3	1,10	65,7
70	36,3	0,91	63,7
80	42,4	0,72	57,6
90	51,1	0,54	48,9
100	49,6	0,50	50,4
110	50,6	0,45	49,4
125	46,5	0,43	53,5
150	52,1	0,32	47,9
175	40,9	0,34	59,1

Figura 14 - Fenol adsorvido pela Quitosana.

A Figura 14 mostra que a porcentagem de fenol adsorvido variou de 47,9 a 72,9%, sendo os maiores valores observados para baixos valores de concentração de Quitosana.

A Figura 15 mostra a relação de equilíbrio entre a concentração de fenol residual e a concentração de fenol adsorvido na Quitosana.

Figura 15 - Isotermas de adsorção de fenol em Quitosana.

O comportamento mostrado na Figura 15 é anômalo, pois, fisicamente esperava-se uma curva com inclinação crescente. Exemplificando, para altíssimas concentrações de Quitosana os valores de q_{eq} tenderiam a zero, bem como os valores de $C_{Fenol\ Residual}$. Para baixíssimas concentrações de Quitosana os valores de q_{eq} tenderiam a valor limite e os valores de $C_{Fenol\ Residual}$ tenderiam a 100 ppm, que é a concentração inicial de fenol na solução aquosa. Este comportamento pode dever-se, provavelmente, ao tempo de agitação da mistura aquosa com Quitosana. Ou seja, para baixas concentrações de Quitosana o transporte de massa foi mais eficiente do que para altas concentrações de Quitosana, para o tempo de agitação utilizado (1 hora de agitação e 24 horas de decantação).

Chen et al. (2006) estudaram a remoção de fenol de soluções aquosas com um derivado da Quitosana e observaram que apenas para tempos de agitação superiores a 6 horas a concentração de fenol adsorvido mantinha-se constante. Aqueles autores trabalharam com suspensões diluídas consistindo de 50 mL de solução alcoólica contendo 120 ppm de fenol e 50 mg do derivado da Quitosana. Há que se considerar também possíveis falhas na determinação da concentração de fenol residual por espectrofotometria. A título de comparação dos nossos resultados com aqueles encontrados na literatura citamos **Rhee et al. (1998)**. Aqueles autores determinaram a isoterma de adsorção do fenol em Quitosana solubilizada ($pH = 3,0$), dada pela seguinte expressão:

$$q_{eq} = 0,0094 \cdot (C_{Fenol,Residual})^{0,797} \quad (9)$$

Os resultados calculados pela eq.(9) também estão mostrados na Figura 10.

Foram realizados ensaios para a determinação da influência do *pH* e *T* na concentração final residual de fenol na cinética e isotermas de adsorção. Os valores das variáveis estudadas foram: *pH*=5, 6, 7, 8, 9, 10; *T*=20, 30 e 50°C; concentração inicial de fenol, *CFenol,in*=10 a 130 ppm. Os resultados do estudo da adsorção em Quitosana, estão mostrados nas Tabelas 04 a 7 Os mesmos resultados em forma de gráficos, estão mostrados nas Figuras 09 a 23.

9.2. Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre

Foram realizados ensaios para a determinação da influência do *pH*, *T*, *CFenol,in*, concentração inicial de enzima (atividade inicial), *C_T*, e velocidade de agitação, *N*, na concentração final residual de fenol aquoso após o processo de oxidação de fenol em vaso agitado de 500mL. Foi mantida constante a concentração molar do tampão fosfato em 0,05 M. Os valores das variáveis estudadas foram: *pH*=5, 6, 7, 8, 9, 10; *T*=15, 25, 35 e 45 °C; *CFenol,in*=50, 100, 200,300 e 400 ppm; *C_T*=25, 50 e 75 U/mL e *N*=200, 300, 400, 500, 600 e 800 rpm. A Figura 16 mostra os resultados para duas condições excepcionais: a primeira são os resultados obtidos no ensaio de oxidação em béquer agitado, a segunda mostra os resultados obtidos na condição ótima do vaso agitado de 500mL. Este último resultado será mostrado em outros gráficos a título de comparação.

A Tabela 8 e Figura 17 mostram a influência do *pH* na atividade enzimática, observa-se que com o *pH* em torno de 6,6 a ação da enzima é mais eficiente e realiza uma ótima remoção da toxicidade da solução e em menor tempo quando comparados aos resultados dos ensaios realizados em *pHs* mais ácidos ou mais alcalinos. Os demais resultados estão mostrados nas Tabelas 11 a 31. Os mesmos resultados em forma de gráficos estão mostrados nas Figuras 18 a 36.

Figura 16 - Comparação da oxidação do fenol com Tirosinase em béquer e vaso agitado (N=400 rpm, T=45 °C, CT=50 U/mL, $CFenol_{in}$ =100 ppm, pH =6,6).

A Figura 16 mostra uma excelente concordância dos resultados obtidos em béquer e no vaso e no vaso agitado de 500mL. Após 60 min de ensaio os resultados são coincidentes e o valor de $CFenol_{Res}$ de cerca de 10 ppm ou 90% de remoção de fenol. Há uma pequena diferença de cinética nos dois casos, ou seja, no vaso agitado $CFenol_{Res}$ cai mais rapidamente do que no béquer, devido à melhor mistura e homogeneização do meio.

A Tabela 8 e a Figura 17 mostram a influência do pH na cinética de oxidação enzimática.

Tabela 8 - Influência do pH na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $T=45^\circ\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $CFenol.in=100$ ppm).

t (min)	$CFenol_{Res}$ (ppm)		
	$pH=5,6$	$pH=6,6$	$pH=7,6$
0	100	100	100
5	54,1	48,7	63,4
10	51,0	36,1	48,4
15	46,2	22,5	40,6
20	47,9	15,7	24,6
30	41,5	13,3	21,3
40	39,2	11,7	10,8
50	37,8	-----	11,8
60	35,1	12,3	12,3
80	37,8	13,3	10,5
100	28,9	11,8	7,18
120	24,4	10,3	10,6
150	26,0	-----	12,8
180	25,4	-----	11,3
210	24,9	-----	10,4

Figura 17 - Influência do pH na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $T=45^\circ\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $CFenol.in=100$ ppm).

Observa-se que $CFenol_{Res}$ cai de 24,9 para 10,3 com o aumento do pH de 5,6 para 6,6 e se mantém inalterado com o aumento do pH para 7,6. A cinética também é afetada significativamente com o $pH=5,6$ e a diferença é pequena para os valores de pH 6,6 e 7,6. Observou-se que os tempos necessários para se atingir as concentrações finais foram de 120, 40 e 40 min para valores de $pH=5,6$; 6,6 e 7,6, respectivamente.

A Tabela 9 e a Figura 18 mostram os resultados da influência da concentração inicial de fenol, $CFenol_{in}$, na cinética de oxidação enzimática.

Tabela 9 - Influência de $C.Fenol.in$ na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, T=45 °C, CT=50 U/mL, pH=6,6).

t (min)	$CFenol_{Res}$ (ppm)				
0	50	100	200	300	400
5	39,9	48,7	132,6	81,8	-----
10	21,6	36,1	108,8	59,2	298,4
15	18,8	22,5	116,2	-----	270,0
20	16,7	15,7	112,1	61,7	240,8
30	13,6	13,3	97,8	58,2	224,3
40	12,0	11,7	97,3	61,2	212,3
50	13,1	-----	84,3	-----	-----
60	13,6	12,3	97,8	59,2	197,0
80	14,4	13,3	92,7	64,2	197,8
100	14,1	11,8	82,0	62,7	190,3
120	14,0	10,3	79,4	60,2	188,4
150	13,8	-----	71,5	65,2	189,1
180	13,6	-----	67,4	59,7	189,9
210	13,1	-----	-----	61,2	-----

Figura 18 - Influência de $CFenol.in$ na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, T=45 °C, CT=50 U/mL, pH=6,6).

A concentração de fenol residual cresceu de 13,1 para 189,9 ppm ao se aumentar $CFenol_{in}$ de 50 para 400 ppm. Assim, o valor máximo de remoção porcentual foi de 90% para $CFenol_{in} = 100$ ppm. O valor de remoção porcentual de 80% para $CFenol_{in} = 300$ ppm é devido à inativação da enzima por causa do aumento da concentração de fenol inicial. Observou-se ainda que os tempos necessários para se atingir as concentrações finais foram da ordem de 2 às 3h.

A Tabela 10 e a Figura 19 mostram os resultados da influência da velocidade de agitação, N , na oxidação enzimática do fenol.

Tabela 10 - Influência de N na oxidação do fenol com Tirosinase ($pH=6,6$, $T=45^\circ\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $CFenol.in=100$ ppm).

	$CFenol_{Res}$ (ppm)					
t (min)	$N=200$ rpm	$N=300$ rpm	$N=400$ rpm	$N=500$ rpm	$N=600$ rpm	$N=800$ rpm
0	100	100	100	100	100	100
5	69,5	50,1	48,7	52,3	59,6	64,5
10	55,6	39,2	36,1	44,0	48,0	55,8
15	-----	27,8	22,5	26,4	42,2	-----
20	52,2	17,8	15,7	18,2	36,3	-----
30	43,3	16,5	13,3	15,7	38,2	-----
40	38,9	-----	11,7	21,2	38,4	39,4
50	31,6	-----	-----	-----	27,6	-----
60	31,2	-----	12,3	18,0	28,9	30,3
80	29,9	14,4	13,3	13,4	-----	24,5
100	31,1	15,0	11,8	16,7	31,3	29,2
120	29,5	14,8	10,3	17,0	24,8	36,4

Figura 19 - Influência de N na oxidação do fenol com Tirosinase ($pH=6,6$, $T=45^\circ\text{C}$, $CT=50$ U/mL, $CFenol.in=100$ ppm).

Observa-se que o menor valor de $CFenol_{Res}$ final foi obtido para $N=400$ rpm. Uma curva de $CFenol_{Res}$ final versus N , mostraria que há um mínimo de $CFenol_{Res}$ final para $N=400$ rpm. Quanto à velocidade de oxidação não há diferença significativa para $N=300$, 400 ou 500 rpm.

A baixa eficiência de oxidação para baixa velocidade de agitação deve-se à mistura insuficiente da Tirosinase com fenol aquoso. A cinética da inativação térmica da Tirosinase compete com a cinética da oxidação do fenol pela enzima. Para valores

crescentes de N observa-se a inativação mecânica da enzima que ocorre devido ao aumento da área de contato da enzima com ar e com as superfícies de vidro do reator. Este fenômeno foi relatado por **Colombiè et al. (2001)** que estudaram a inativação mecânica da Lisozima. Observou-se que os tempos necessários para se atingir as concentrações finais foram de 80, 80 e 40 min, para valores de $N=200$, 300 e 400 rpm, respectivamente. Para valores de $N=500$, 600 e 800 rpm observou-se uma tendência no aumento de $CFenol_{Res}$ final para valores de tempo superiores a 80 min. Isto somente ocorreria se houvesse um equilíbrio químico onde as o-quinonas formadas fossem parcialmente reduzidas a fenóis.

A Tabela 11 e a Figura 20 mostram a influência da concentração enzimática em termos de Unidades de Atividade (U), C_T , na oxidação enzimática.

Tabela 11 - Influência de C_T (U/mL) na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $T=45^\circ\text{C}$, $pH=6,6$, $CFenol.in=100$ ppm).

t (min)	$CFenol_{Res}$ (ppm)		$C_T = 75$ U/mL
	$C_T = 25$ U/mL	$C_T = 50$ U/mL	
0	100	100	100
5	77,1	48,7	51,4
10	63,5	36,1	39,3
15	49,2	22,5	38,3
20	45,6	15,7	27,5
25	-----	-----	24,9
30	31,6	13,3	26,3
40	23,0	11,7	18,1
50	21,6	-----	13,8
60	20,8	12,3	6,58
80	22,9	13,3	3,69
100	19,9	11,8	5,62
120	24,5	10,3	-----
150	24,9	-----	-----
180	19,1	-----	-----
210	19,9	-----	-----

Figura 20 - Influência de C_T (U/mL) na oxidação do fenol com Tirosinase ($N=400$ rpm, $T=45^\circ\text{C}$, $pH=6,6$, $C_{Fenol.in}=100$ ppm).

Observa-se que $CFenol_{Res}$ final diminui de 19,9 para 10,3 e 5,62 aumentando-se C_T de 25 para 50 e 75 U/mL, respectivamente. A velocidade de oxidação aumenta com C_T de 25 para 50 U/mL, porém, a velocidade diminui para $C_T=75$ U/mL. Esta diminuição pode ser provocada por impedimento estérico, por serem as enzimas macromoléculas com dobras e, assim, os sítios ativos ficariam escondidos, dificultando a chegada das moléculas de fenol. Observa-se ainda que os tempos necessários para se atingir as concentrações finais foram de 180, 120 e 80 min para valores de $C_T=25$, 50 e 75 U/mL, respectivamente.

A Tabela 12 e a Figura 21 mostram os resultados da influência da temperatura.

Tabela 12 - Influência de T na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, pH=6,6, CT=50 U/mL, CFenol.in=100 ppm).

t (min)	$CFenol_{Res}$ (ppm)			
	$T=15^{\circ}\text{C}$	$T=25^{\circ}\text{C}$	$T=35^{\circ}\text{C}$	$T=45^{\circ}\text{C}$
0	100	100	100	100
5	----	79,9	----	48,7
10	----	70,3	62,7	36,1
15	----	64,3	51,8	22,5
20	80,8	48	47	15,7
30	----	33,1	36,1	13,3
40	73,8	27,9	27,9	11,7
50	----	----	24,9	----
60	64,3	25,5	19,7	12,3
80	----	21,3	11,8	13,3
90	55	----	----	----
100	----	12,8	16,8	11,8
120	48,1	9,03	12,9	10,3
150		12,5	9,36	----
180	43,9	11,4	10,3	----
210		12	9,46	----
240	35,4	----	----	----
300	28,3	----	----	----
360	25,4	----	----	----
420	24	----	----	----
480	23,2	----	----	----

Figura 21 - Influência de T na oxidação do fenol com Tirosinase (N=400 rpm, pH=6,6, CT=50 U/mL, CFenol.in=100 ppm).

Observa-se que $CFenol_{Res}$ final não é influenciada pela temperatura na faixa estudada. Para $T=15^{\circ}\text{C}$ o valor de $CFenol_{Res}$ final ainda não era, aparentemente, o de equilíbrio. A velocidade de oxidação enzimática não foi influenciada pela variação de temperatura de 25 para 35°C ; teve seu valor máximo para $T=45^{\circ}\text{C}$ e mínimo para $T=15^{\circ}\text{C}$. Observou-se que os tempos necessários para se atingir as concentrações finais foram de 480, 120, 120 e 40 min, para os valores de $T=15$, 25, 35 e 45°C , respectivamente.

Tabela 13- Oxidação do Fenol com Tirosinase (N=400 rpm, $pH=6,6$, CT=50 U/mL, $CFenol=100$ ppm, $T=45^{\circ}\text{C}$).

$CFenol_{Res}$ (ppm)	
t (min)	Conc. Fenol
0	100
5	48,7
10	36,1
15	22,5
20	15,7
30	13,3
40	11,7
60	12,3
80	13,3
100	11,8
120	10,3

Figura 22 - Oxidação do Fenol com Tirosinase (N=400 rpm, pH =6,6, CT=50 U/mL, CFenol,in=100 ppm, T=45°C).

A eficiência de remoção de fenol é da ordem de 90% e o equilíbrio foi atingido por volta de 30 a 40 min de ensaio.

Tabela 14 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 01 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	4,00	45,0	-----	100
2	10	6,72	46,6	0,017	5,1
3	15	6,57	44,6	0,004	2,8
4	20	6,40	44,8	0,004	2,8
5	25	6,26	47,2	0,006	3,1
6	30	6,12	49,2	0,010	3,9
7	35	6,08	48,5	0,002	2,4
8	40	6,05	46,5	0,005	3,0
9	45	6,02	44,4	0,005	3,0
10	50	6,04	44,4	0,001	2,3
11	55	6,00	44	0,008	3,5
12	60	5,99	43,9	0,009	3,7
13	75	6,54	48,2	0,009	3,7

Tabela 15 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 02 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T(°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,45	44,5	-----	100
2	5	6,48	44,1	0,487	90,5
3	10	6,47	44,1	0,321	60,4
4	15	6,45	44,2	0,232	44,2
5	20	6,46	44,2	0,194	37,3
6	25	6,45	44,1	0,148	28,9
7	30	6,45	44,1	0,12	23,8
8	35	6,45	44,2	0,089	18,2
9	40	6,44	44,2	0,058	12,6
10	45	6,45	44,1	0,058	12,6
11	50	6,44	44,2	0,061	13,1
12	55	6,44	44,2	0,056	12,2
13	60	6,44	45,1	0,054	11,9
14	75	6,45	45	0,054	11,9

Tabela 16 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 03 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,53	45,1	-----	100
2	5	6,53	44,9	0,473	88,0
3	10	6,53	45,0	0,315	59,3
4	15	6,53	45,1	0,228	43,5
5	20	6,53	45,0	0,173	33,5
6	25	6,52	45,3	0,144	28,2
7	30	6,53	44,9	0,109	21,9
8	35	6,53	45,2	0,083	17,1
9	40	6,53	44,9	0,060	12,9
10	45	6,52	45,2	0,063	13,5
11	50	6,53	44,9	0,059	12,8
12	55	6,52	45,2	0,063	13,5
13	60	6,53	44,9	0,058	12,6
14	70	6,52	45,1	0,060	12,9

Tabela 17 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 04 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,52	44,9	-----	100
2	5	6,52	45,1	-----	-----
3	10	6,52	45,1	0,434	80,9
4	15	6,52	45,1	-----	-----
5	20	6,53	45,1	-----	-----
6	25	6,53	45,1	0,529	98,2
7	30	6,53	45,1	-----	-----
8	35	6,53	45,1	0,321	60,4
9	40	6,52	45,1	0,521	96,7
10	45	6,52	45,1	-----	-----
11	50	6,52	45,1	0,433	80,7
12	55	6,52	45,1	0,500	92,9
13	60	6,52	45,1	0,377	70,5
14	75	6,52	45,1	0,045	10,2

Tabela 18 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 05 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,55	45	-----	100
2	5	6,54	45	0,370	69,3
3	10	6,54	45	-----	-----
4	15	6,54	45	0,28	52,9
5	20	6,53	45	0,196	37,7
6	25	6,53	45	0,168	32,6
7	30	6,53	45	0,177	34,2
8	35	6,53	45	0,132	26,0
9	40	6,52	45	0,125	24,8
10	45	6,52	45	0,063	13,5
11	50	6,52	45	-----	-----
12	55	6,52	45	-----	-----
13	60	6,53	45	0,099	20,0

Tabela 19 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 06 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,51	44,9	-----	100
2	5	6,52	44,9	0,460	85,6
3	10	6,52	45,0	0,315	59,3
4	15	6,52	45,0	0,228	43,5
5	20	6,52	45,1	0,190	36,6
6	25	6,52	44,9	0,145	28,4
7	30	6,51	44,9	0,112	22,4
8	35	6,52	45,0	0,085	17,5
9	40	6,51	44,9	0,051	11,3
10	45	6,52	44,9	0,051	11,3
11	50	6,52	44,9	0,058	12,6
12	55	6,52	44,9	0,063	13,5
13	60	6,52	44,9	0,070	14,8
14	70	6,52	44,9	0,054	11,9

Tabela 20 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 07 (T = 55°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,50	54,9	-----	100
2	5	6,51	55,0	0,484	90,0
3	10	6,52	54,5	0,436	81,3
4	15	6,52	55,4	0,413	77,1
5	20	6,52	54,8	0,350	65,6
6	25	6,52	55,3	0,342	64,2
7	30	6,52	55,0	0,397	74,2
8	35	6,52	54,9	0,403	75,3
9	40	6,52	55,0	0,394	73,6
10	45	6,53	55,0	0,365	68,4
11	50	6,53	55,0	0,371	69,4
12	55	6,53	55,0	0,340	63,8
13	60	6,53	55,0	0,375	70,2
14	75	6,53	55,0	0,356	66,7

Tabela 21 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 08 (T = 35°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,64	35,0	-----	100
2	5	6,55	35,0	-----	-----
3	10	6,53	35,1	-----	-----
4	15	6,53	35,1	0,299	56,4
5	20	6,54	35,2	0,206	39,5
6	25	6,52	35,2	-----	-----
7	30	6,52	35,2	0,169	32,8
8	35	6,53	35,1	-----	-----
9	40	6,52	35,1	0,120	23,8
10	45	6,51	35,1	-----	-----
11	50	6,50	35,2	0,098	19,9
12	55	6,50	35,2	0,093	18,9
13	60	6,50	35,2	0,093	18,9
14	75	6,50	35,2	0,094	19,2

Tabela 22 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 09 (T = 25°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	t(min)	pH	T (°C)	ABS	CFenol(ppm)
1	0	6,51	25,0	-----	100
2	5	6,51	25,0	0,523	97,1
3	10	6,51	25,0	0,478	88,9
4	15	6,51	25,0	0,477	88,7
5	20	6,52	25,1	0,104	20,9
6	25	6,52	25,1	0,348	65,3
7	30	6,53	25,1	0,293	55,3
8	35	6,54	25,1	0,216	41,3
9	40	6,54	25,1	0,166	32,2
10	45	6,54	25,1	0,124	24,6
11	50	6,54	25,1	0,085	17,5
12	55	6,54	25,1	0,071	14,9
13	60	6,54	25,1	0,070	14,8
14	70	6,54	25,1	0,064	13,7

Tabela 23 – Resultados de concentração de fenol. Ensaio 10 ($T = 15^{\circ}\text{C}$, concentração enzimática = 50 U/mL).

Amostra	$t(\text{min})$	pH	$T (^{\circ}\text{C})$	ABS	$CFenol(\text{ppm})$
1	0	6,55	14,9	-----	100
2	5	6,53	14,6	0,447	83,3
3	10	6,53	14,8	-----	-----
4	15	6,53	14,8	0,413	77,1
5	20	6,53	14,9	0,402	75,1
6	25	6,53	14,9	0,397	74,2
7	30	6,53	15,0	0,380	71,1
8	35	6,53	15,0	0,340	63,8
9	40	6,53	15,0	0,327	61,5
10	45	6,53	15,0	0,364	68,2
11	50	6,53	15,0	0,309	58,2
12	55	6,53	15,0	0,294	55,5
13	60	6,53	15,0	0,291	54,9

Os mesmos resultados também estão mostrados nas Figuras 23 a 33.

A Figura 23 mostra os resultados comparativos para verificação da reprodutibilidade do processo e a Figura 20 os resultados para verificação da influência da temperatura.

Figura 23 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 01 ($T = 45^{\circ}\text{C}$, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 24 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 02 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 25 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 03 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 26 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 04 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 27 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 05 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 28 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 06 (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 29 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 07 (T = 55°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 30 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 08 (T = 35°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 31 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 09 (T = 25°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 32 - Resultados de concentração de fenol. Ensaio 10 (T = 15°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 33 - Verificação da reprodutibilidade do processo (T = 45°C, concentração enzimática = 50 U/mL).

Figura 34 - Verificação da influência da temperatura (concentração enzimática = 50 U/mL).

Os resultados mostrados na Tabela 14 e Figura 23 (Ensaio 01) mostram que o controle do *pH* e da temperatura não foram adequados. A falha do controle do *pH* deveu-se ao fato de não ter sido utilizado neste primeiro ensaio preliminar um meio aquoso tamponado em *pH* = 6,5 como sugerido na literatura (**Bevilaqua et al. 2002; Worthington Enzyme Manual, 2006**). O acerto do *pH* durante o ensaio foi feito através da adição de soluções aquosas de *NaOH* ou *HCl* 1% m/m.

O controle da temperatura foi feito manualmente em aquecedor com agitador magnético. Testou-se neste ensaio a amostragem em frascos imersos em gelo para inibir a enzima e que foram posteriormente mantidos resfriados a 2°C em geladeira. Isto explica as baixas concentrações de fenol residual, de cerca de 96% de redução em todas as amostras, mostrando que a atividade enzimática não foi reduzida adequadamente.

Os aspectos positivos deste ensaio foram a baixa concentração residual final de fenol, o que demonstra a alta eficiência do processo com a concentração enzimática utilizada (50 U/mL), a necessidade de aprimorar o controle de temperatura e do *pH*.

Os resultados mostrados na Tabela 06 e Figura 24 (Ensaio 02) apresentam um excelente controle de *pH* e de temperatura. O *pH* do meio foi corrigido utilizando o meio de solução tampão com fosfato (*pH* = 6,5) e o controle da temperatura foi corrigido

substituindo-se o aquecedor com agitador magnético por agitador mecânico e banho Maria termostatzado, no qual o bquer foi introduzido.

Os resultados foram excelentes embora haja alguma disperso experimental, estes resultados apresentam comportamento semelhante com aqueles obtidos por **Wada et al. (2003)** e **Bevilaqua et al. (2002)**. A concentrao final de fenol residual foi de 12 ppm, correspondendo a 88% de remoo.

Os resultados mostrados nas Tabelas 07, 08, 09, 10 e Figuras 25, 26, 27 e 28, obtidos para as mesmas condies do Ensaio 02 ($T = 45^{\circ}\text{C}$, concentrao enzimtica = 50 U/mL) comprovam a reprodutibilidade do processo. A comparao dos Ensaio 02, 03, 05 e 06 tambm est mostrada na Figura 34.

Os resultados do Ensaio 04 (Tabela 08 e Figura 26) apresentaram problemas na anlise espectrofotomtrica e no puderam ser utilizados na verificao da reprodutibilidade. No entanto, o valor final de concentrao residual de fenol prximo dos valores obtidos para os outros ensaios.

Os resultados mostrados nas Tabelas 20 a 23 e Figuras 29 a 32 foram obtidos para temperaturas de 55, 35, 25 e 15°C . A comparao dos resultados e a verificao da influncia da temperatura esto mostradas na Figura 34. Constatou-se que, para os valores de temperaturas testadas, a temperatura tima foi de 45°C . Este valor est dentro da faixa de temperatura tima encontrada na literatura (**Atlow et al., 1984; Sun et al., 1992; Sun e Payne, 1996; Ikehata e Nicell, 2000, Yamada et al., 2005**). A atividade enzimtica cresce de 15 para 45°C e cai bruscamente para 55°C . Ao que parece os ensaios a 25, 35 e 45°C atingiram a concentrao limite final residual de fenol, que foram de 13,7, 19,2 e 11,9 ppm, respectivamente. A concentrao residual de fenol no ensaio a 15°C continuava em queda no instante $t = 60\text{ min.}$, ltima amostragem deste ensaio, o que mostra que a enzima continuava ativa, porm com taxa de oxidao baixa. No ensaio a 55°C a enzima foi aparentemente inativada e a concentrao residual de fenol foi de 66,7 ppm.

A ttulo de ilustrao a Figura 35 mostra o bquer contendo a soluo aquosa do Ensaio 02 antes do incio e aps o trmino da reao.

Figura 35 - Meio de reação do Ensaio 02 antes (35A) e após o término da reação (35B).

9.3. Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada

Inicialmente realizados 03 ensaios para a confecção de esferas de Quitosana, 02 de ativação da Quitosana com glutaraldeído, 08 de imobilização de tirosinase na Quitosana e 23 de oxidação de fenol aquoso com tirosinase imobilizada. Foram determinados os diâmetros das esferas de Quitosana, atividade residual da enzima e concentração de fenol residual. Os resultados estão mostrados nas Tabelas 25 a 31 e Figuras 31 a 38.

Tabela 24 - Diâmetro das esferas de Quitosana

D_p (mm)			
3,15	3,55	3,80	3,95
3,25	3,60	3,80	4,00
3,30	3,65	3,85	4,00
3,40	3,65	3,85	4,00
3,45	3,65	3,85	4,00
3,45	3,70	3,95	4,00
3,50	3,70	3,95	4,05
3,55	3,70	3,95	4,10
3,55	3,70	3,95	4,15
3,55	3,75	3,95	4,45
$D_{p,medio}$ (mm)		3,76	
S_{Dep} (mm)		0,27	
CV (%)		7,2	

A Tabela 24 mostra os diâmetros de uma população de 40 esferas de Quitosana confeccionadas no laboratório. As esferas têm diâmetro bastante homogêneo como se pode constatar pelo desvio padrão ($S=0,27$ mm) e coeficiente de variação ($CV=7,2\%$). O menor diâmetro da amostra foi de 3,15 mm e o maior de 4,15 mm. Figura 36 a Figura 37 mostra as esferas ativadas com glutaraldeído antes desta ativação, respectivamente.

Figura 36 - Esfera de Quitosana antes da ativação.

Figura 37 - Esferas de Quitosana ativados com glutaraldeído (esferas escuras) e antes da ativação (esferas claras).

A Tabela 25 e a Figura 38 mostram os resultados da determinação da atividade da tirosinase pura, com o objetivo de (1) verificar se haveria decaimento da atividade independente da sua imobilização em Quitosana; (2) usar a atividade residual, e não o decaimento da concentração de enzima no meio, como referência da eficiência de imobilização. Por utilizarmos uma tirosinase muito pura (25.000U/mg) os métodos de Bradford (**Bradford, 1976**) e Micro-Bradford (**Rossomando, 1990**) testados neste trabalho foram imprecisos devido à baixa concentração de enzimas.

Tabela 25 - Atividade da tirosinase pura.

t (h)	A (U)
1	15.200
2	13.120
3	17.320
4	14.160
7	17.800
24	16.040
A_{medio}	15.607
S_A (U)	1.652
CV (%)	11

Figura 38 - Atividade da tirosinase pura.

Os resultados mostram que houve reprodutibilidade razoável dos resultados ($S_A=1.625$ U, $CV=11\%$) e, assim, constata-se que a atividade da enzima não é função do tempo neste ensaio em branco. No entanto, o valor de atividade obtido é, em média, 38% inferior ao indicado pelo fornecedor do produto esperado, que é de 25.000 U. Uma possível causa para esta discrepância pode ser a temperatura de análise da atividade, que pode ter sido inferior ao estipulado pelo método de análise padronizado (**Worthington, 2006**), visto que o espectrofotômetro utilizado nestas análises não dispunha de controle de temperatura; uma variação de $\pm 10^\circ\text{C}$ na temperatura de análise provoca uma variação de 50% na atividade medida.

A Tabela 26 e a Figura 39 mostram os resultados de atividade residual determinadas durante 04 dos ensaios de imobilização realizados. A atividade inicial (15.607 U) é a atividade média da tirosinase pura mostrada na Tabela 33.

Tabela 26 - Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização.

t (h)	Ensaio 02	Ensaio 05	Ensaio 06	Ensaio 08
0	15.607	15.607	15.607	15.607
1	5.850	-----	-----	-----
2	-----	4.250	3.310	6.310
3	4.990	-----	-----	-----
4	-----	3.870	3.850	5.300
5	5.200	-----	-----	-----
6	-----	4.150	2.910	4.670
7	5.060	-----	3.010	-----
8	4.690	4.220	-----	4.230
E_{Imob} (%)	70	73	81	73
$E_{Imob,Médio}$	74			
S_{EImob} (%)	4,6			
CV_{EImob} (%)	6,2			
$A_{Final,Médio}$	4.038			
S_{AFinal} (U)	719			
CV_{AFinal} (%)	18			

Obs.: E_{Imob} =eficiência de imobilização; $E_{Imob,Médio}$ =eficiência de imobilização média; S_{EImob} =desvio padrão da eficiência de imobilização; CV_{EImob} =coeficiente de variação da eficiência de imobilização; $A_{Final,Médio}$ =atividade final média; S_{AFinal} =desvio padrão da atividade final; CV_{AFinal} =coeficiente de variação da atividade final.

Figura 39 – Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização.

Houve uma excelente concordância dos resultados e constata-se também que o processo de imobilização ocorreu até as 2h iniciais de cada ensaio. A eficiência de imobilização média ($E_{Imob, Médio}$) foi de 74%.

Os valores estatísticos da atividade final (A_{final}) e eficiência de imobilização (E_{Imob}) mostrados na Tabela 26 mostram que os resultados foram razoavelmente reprodutivos. Os resultados de E_{Imob} foram pouco dispersos ($CV_{Imob}=6,2\%$) e os de A_{final} foram

bastante dispersos devido ao resultado do Ensaio 06. A determinação da atividade é sujeita à dispersão devido à alta sensibilidade do método à temperatura.

A Tabela 27 e a Figura 40 mostram os resultados dos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada para o Ensaio 03, o primeiro com resultados quantitativos.

Tabela 27 – Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 03).

Ensaio 03									
Filtro 02		Filtro 03		Filtro 04		Filtro 04		Filtro 05	
t (min)	$CFenol_{Re}$	t	$CFenol_{Re}$	t	$CFenol_{Re}$	t (min)	$CFenol_{Re}$	t (min)	$CFenol_{Re}$
0	100	0	100,0	0	100	0	100	0	100
5	84,7	20	57,1	30	29,2	20	77,9	20	63,0
10	82,8	40	59,6	50	21,8	40	77,3	40	71,9
15	79,7	60	49,0	70	20,0	60	73,2	60	-----
20	77,3	80	48,3	90	17,1	80	68,8	80	66,3
25	78,4	100	27,6	110	14,8	100	68,9	100	61,5
30	78,1	120	68,3	130	15,8	120	-----	120	59,7
35	72,0	140	45,1	150	15,2	140	74,0	140	58,6
40	69,1	160	-----	170	13,2	160	64,2	160	56,8
45	66,1	180	37,6	190	-----	180	66,3	180	59,0
50	65,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
55	65,0	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
60	68,5	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
80	55,7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 40 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 03) (T=45°C, pH=6,6, Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer, Fig. 24).

Os resultados estão apresentados em termos de número de filtros e de oxidações. Esta identificação foi necessária porque durante a imobilização da enzima na

Quitosana utilizou-se uma velocidade de agitação excessivamente alta, o que provocou a desintegração das 16 esferas de Quitosana utilizadas. Por este motivo ao término do ensaio de imobilização, homogeneizou-se os 10 mL de solução de enzima, que foi dividida em 5 frações que foram então filtradas em papel de filtro 0,45 µm, os quais foram utilizados nos ensaios de oxidação. Esperava-se que as oxidações de número 1 de qualquer filtro fossem semelhantes e bastante eficientes, porém apenas a oxidação 1 do filtro 4 mostrou resultados, da ordem de 87%, próximos ao ótimo obtido anteriormente para oxidação com enzima livre em béquer no ensaio de controle, que foi de 90%.

Considerando que em média, a eficiência de imobilização foi de 74%, estima-se que 11.549 U de enzima estariam, em média, igualmente distribuídos nos 5 filtros, correspondendo a 2310 U/filtro, ou ainda, 2310 U/100 mL = 23,1 U/mL; nos ensaios de oxidação com tirosinase livre em béquer utilizou-se 50 U/mL. O excelente resultado da oxidação 1 do filtro 4 pode dever-se a uma maior quantidade de Quitosana retida no filtro do que nos demais filtros. Por outro lado, a tirosinase imobilizada é mais ativa porque as o-quinonas geradas da oxidação do fenol, e que inativam a enzima, são significativamente adsorvidas pela Quitosana. A queda da eficiência de remoção na reutilização da tirosinase imobilizada no filtro 4 (foi feita uma nova filtração) caiu para 34%, um valor baixo, porém bastante significativo. A Tabela 28 e a Figura 41 mostram os resultados de oxidação do Ensaio 04.

Tabela 28 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 04).

Ensaio 04									
Oxidação 02		Oxidação 03		Oxidação 04		Oxidação 05		Oxidação 06	
t(min)	CFenol _R	t(min)	CFenol	t(min)	CFenol	t(min)	CFenol	t(min)	CFenol
	100	0	100,0	0	100	0	100	0	100
20	77,8	20	100,0	20	58,6	20	64,0	20	100,0
40	69,4	40	94,9	40	49,7	40	58,6	40	100,0
60	90,4	60	82,7	60	48,7	60	54,9	60	86,7
80	65,5	80	87,8	80	35,4	80	49,6	80	96,9
100	60,6	100	77,0	100	42,0	100	49,3	100	95,5
120	67,8	120	-----	120	30,5	120	45,6	120	94,2
140	54,2	140	80,7	140	30,3	140	42,7	140	92,8
160	57,6	160	73,5	160	26,8	160	33,3	160	94,9
-----	-----	180	69,2	180	33,3	180	41,8	180	100,0
-----	-----	210	69,4	210	-----	210	32,3	210	100

Figura 41 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 04) ($T=45^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6,6$, ----- Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer com 50ml, Fig. 16).

Neste ensaio foram utilizadas 24 esferas de Quitosana na imobilização de tirosinase. O 1º. Ensaio de oxidação perdeu-se e nos demais foram utilizadas 24, 22, 18, 16 e 14 esferas, respectivamente. Apesar de se usar baixa velocidade de agitação, algumas esferas se desintegraram. Observa-se que os melhores resultados foram os da 4ª, 5ª, 2ª, 3ª e 6ª oxidação, que é uma anomalia, uma vez que a seqüência esperada era a de número de oxidações crescente. Não se descarta a possibilidade de erro de identificação das amostras. Em todo caso pode-se afirmar que a seqüência de eficiências de oxidação foram de cerca de 75, 68, 56, 30 e 7%. Deve-se considerar que o número de esferas diminuiu da 2ª à 6ª oxidação. Aplicando-se o fator 24/número de esferas à seqüência acima se obtém 74, 74, 75, 45 e 12%. Considerando estes últimos resultados como os melhores, poderíamos afirmar que em até 3 reutilizações a eficiência de oxidação varia pouco e é elevada.

Considerando que $E_{\text{Imob}}=74\%$, cada esfera teria 481 U, o que corresponderia a 115, 105, 87, 77 e 67 U/mL, para os ensaios de oxidação 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Nestes termos, a eficiência de oxidação foi muito inferior ao do ensaio de controle que utilizou 50 U/mL e resultou em oxidação de 90% do fenol. Provavelmente, esta menor eficiência se deva à menor área superficial de contato entre as esferas e o líquido e também à restrição ao transporte de massa, pois o fenol deve migrar para o interior das esferas até a tirosinase imobilizada.

A Tabela 29 e a Figura 42 mostram os resultados de oxidação do Ensaio 05. Neste ensaio foram utilizadas 30 esferas de Quitosana na imobilização de tirosinase. Nos ensaios de oxidação foram utilizadas 30, 30, 29, 28, e 28 esferas, respectivamente.

Tabela 29 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 05).

Ensaio 05									
Oxidação 01		Oxidação 02		Oxidação 03		Oxidação 04		Oxidação 05	
t(min)	CFenol _{i,Res}	t(min)	CFenol _{i,Res}	t(min)	CFenol _{i,Res}	t(min)	CFenol _{i,Res}	t(min)	CFenol _{i,Res}
0	100	0	100,0	0	100	0	100	0	100
20	92,7	20	88,3	20	99,7	60	97,9	20	-----
40	82,5	40	96,2	40	100,0	80	100,0	40	97,2
60	84,9	60	97,8	60	100,0	100	99,4	60	99,5
80	76,0	80	78,0	80	94,2	120	91,4	80	98,7
100	76,1	100	67,8	110	95,5	140	85,1	110	90,8
120	74,9	120	69,2	140	96,0	160	85,0	140	84,6
140	66,2	140	69,0	160	87,8	180	76,1	160	84,4
160	65,1	160	59,9	180	86,3	210	72,9	180	72,4
180	64,4	180	63,2	210	79,7	-----	-----	210	75,7
210	58,1	210	61,3	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Figura 42 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 05) (T=45°C, pH=6,6, ----- Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer 50ml, Fig. 16).

Os valores de eficiências de oxidação foram de cerca de 42, 39, 27, 24 e 20%. Corrigindo estes valores em relação ao número de esferas se obtém 42, 39, 28, 26 e 21%, respectivamente. Inexplicavelmente, os resultados desta seqüência de oxidações foram significativamente inferiores aos obtidos nos ensaios anteriores. Considerando que $E_{mob}=74\%$, cada esfera teria 384 U, o que corresponderia a 115, 115, 112, 108 e 108 U/mL, para os ensaios de oxidação 1 a 5, respectivamente. Nestes termos, a eficiência de oxidação foi muito inferior ao do ensaio de controle que utilizou 50 U/mL e

resultou em oxidação de 90% do fenol. Como no ensaio anterior a pequena área superficial e processos difusivos podem ter provocado a queda observada na eficiência de oxidação.

A Tabela 30 e a Figura 43 mostram os resultados de oxidação do Ensaio de imobilização 08. Neste ensaio as 30 esferas utilizadas foram congeladas a -80°C para posterior utilização nos ensaios de oxidação. Ao serem descongeladas as esferas foram danificadas e tiveram seus diâmetros reduzidos para cerca de 0,5 a 1,0 mm, sendo estas partículas utilizadas nos 04 ensaios de oxidação realizados.

Tabela 30 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 08).

Ensaio 08							
Oxidação 01		Oxidação 02		Oxidação 03		Oxidação 04	
t(min)	$CFenol_{Res}$	t(min)	$CFenol_{Res}$	t(min)	$CFenol_{Res}$	t(min)	$CFenol_{Res}$
0	100	0	100,0	0	100	0	100
10	83,6	10	72,6	10	93,8	20	95,3
20	83,3	20	71,2	20	91,7	40	94,4
40	69,5	40	60,5	40	91,8	60	90,5
60	62,2	60	56,0	60	88,9	80	93,8
80	55,8	80	61,8	80	87,8	100	93,2
100	45,6	100	52,8	100	87,5	120	94,3
120	35,1	120	50,4	120	85,0	140	94,7
140	33,5	140	49,0	140	80,7	160	89,3
160	34,5	160	44,8	160	82,9	180	-----
180	13,1	180	41,2	180	83,0	210	92,8
210	6,9	-----	-----	210	80,4	-----	-----

Figura 43 - Concentração residual de fenol nos ensaios de oxidação com tirosinase imobilizada (Ensaio 08) ($T=45^{\circ}\text{C}$, $pH=6,6$, ----- Oxidação ótima com tirosinase livre em béquer, Fig. 16).

Os valores das eficiências de oxidação foram de cerca de 93, 59, 20 e 7%, respectivamente. De um ensaio de oxidação para outro o meio era filtrado para coletar a Quitosana, que era então reutilizada no ensaio seguinte. A eficiência da 1ª oxidação é superior ao do ensaio de controle em béquer, que foi de 90%.

Considerando que $E_{Imob}=74\%$ a massa de Quitosana conteria 11549 U de atividade enzimática, o que corresponderia a 115 U/mL. Nestes termos, a alta eficiência de oxidação se deve à alta concentração enzimática, maior área superficial e à menor resistência ao transporte de massa por processo difusivo, visto que as esferas foram desintegradas.

Após a avaliação da qualidade dos resultados obtidos através da oxidação com tirosinase imobilizada optou-se por procurar ou desenvolver metodologias que permitissem a produção de flocos de Quitosana com maior resistência mecânica, visto que os ensaios realizados com os flocos obtidos pelo processo de preparo da quitosana apresentaram falhas devido à desfragmentação de algumas esferas.

A Tabela 31 e a Figura 44 mostram os resultados de atividade residual determinadas durante os 03 ensaios de imobilização realizados utilizando esferas de Quitosana com maior resistência mecânica. A atividade inicial (15.959 U) é a atividade média da tirosinase pura mostrada na Tabela 31.

Tabela 31 - Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização em Quitosana modificada (maior resistência mecânica).

t (h)	Ensaio 01	Ensaio 02	Ensaio 03	Ensaio 04	Ensaio 05
0	15.595	15.595	15.595	15.596	15.596
1	7.950	8.250	7.825	7.800	8.100
2	5.240	5.150	5.300	5.500	5.800
3	4.800	4.950	5.050	5.100	-----
4	4.720	4.630	4.820	-----	4.950
5	-----	4.560	-----	4.850	4.730
6	4.830	4.150	4.390	4.700	-----
7	5.060	-----	4.450	4.750	4.820
8	4.900	4.500	4.320	4.780	4.280
E_{Imob} (%)	69	71	72	69	73
$E_{Imob,Médio}$ (%)	70,8				
S_{EImob} (%)	1,8				
CV_{EImob} (%)	2,5				
$A_{Final,Médio}$ (U)	4556,0				
S_{AFinal} (U)	275,5				
CV_{AFinal} (%)	6,0				

Obs.: E_{Imob} =eficiência de imobilização; $E_{Imob,Médio}$ =eficiência de imobilização média; S_{EImob} =desvio padrão da eficiência de imobilização; CV_{EImob} =coeficiente de variação da eficiência de imobilização; $A_{Final,Médio}$ =atividade final média; S_{AFinal} =desvio padrão da atividade final; CV_{AFinal} =coeficiente de variação da atividade final.

Figura 44 - Atividade residual da tirosinase nos ensaios de imobilização em Quitosana modificada(maior resistência mecânica).

Abaixo seguem os resultados de 5 ensaios realizados onde foi realizada a imobilização da tirosinase em flocos de Quitosana com maior resistência, nestes ensaios foi possível realizar o reúso dos flocos de Quitosana com enzima imobilizada por mais 4 ensaios sem que houvesse a desfragmentação destes flocos, porém a atividade enzimática apresentou decaimento e conseqüentemente a eficiências de remoção seguiu e mesma queda.

A Tabela 32 e figura 45 apresentam os resultados do ensaio 1 e da reutilização destes flocos em mais 4 ensaios ciclos de oxidação.

Tabela 32 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.

OXIDAÇÃO COM TIROSINASE EM ESFERAS RESISTENTES MECÂNICAMENTE - REÚSO DE ESFERAS						
		Ensaio 1	Reúso 1	Reúso 2	Reúso 3	Reúso 4
AMOSTRA	TEMPO (min)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
1	0	100,65	102,15	102,92	99,07	101,85
2	10	58,38	69,07	86,76	92,14	96,69
3	20	39,07	48,30	74,46	79,86	92,54
4	40	28,38	35,23	58,30	74,42	89,46
5	60	22,93	29,07	55,2	66,00	90,15
6	80	20,65	27,5	52,93	59,86	88,08
7	100	18,8	25,21	50,65	58,38	88,08
8	120	15,23	22,93	49,07	57,5	86,69
9	160	15,31	20,65	44,42	55,23	85,31
10	200	15,54	19,86	39,86	54,46	86,00
11	240	14,62	18,38	38,38	53,69	85,31
12	280	14,62	18,38	37,8	52,92	85,31
13	320	15,31	17,58	37,38	53,69	85,31
14	360	14,62	18,38	36,00	54,46	85,31

Figura 45 – Ensaio 1- oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.

A Tabela 33 e figura 46 apresentam os resultados do ensaio 2 e da reutilização destes flocos em mais 4 ensaios ciclos de oxidação.

Tabela 33 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.

OXIDAÇÃO COM TIROSINASE EM ESFERAS RESISTENTES MECÂNICAMENTE - REÚSO DE ESFERAS						
		Ensaio 2	Reúso 1	Reúso 2	Reúso 3	Reúso 4
AMOSTRA	TEMPO (min)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
1	0	102,15	102,93	100,15	100,61	99,07
2	10	59,846	75,31	94,62	96,76	96,00
3	20	40,61	55,31	81,85	86,76	92,93
4	40	30,6	40,15	69,77	81,38	90,65
5	60	26,79	31,85	58,08	73,69	89,07
6	80	19,86	26,00	53,92	68,30	84,42
7	100	18,38	22,23	49,46	59,07	86,00
8	120	16,79	19,46	46,69	58,3	86,79
9	160	16,00	20,5	44,62	56,00	86,0
10	200	16,00	19,86	40,15	55,21	85,23
11	240	15,21	19,07	36,69	54,42	86,00
12	280	16,00	19,07	36,69	54,42	86,00
13	320	16,00	18,38	39,77	55,21	85,23
14	360	16,00	19,77	37,8	55,21	85,231

Figura 46 – Ensaio 2 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.

A Tabela 34 e figura 47 apresentam os resultados do ensaio 3 e da reutilização destes flocos em mais 4 ensaios ciclos de oxidação.

Tabela 34 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.

OXIDAÇÃO COM TIROSINASE EM ESFERAS RESISTENTES MECÂNICAMENTE - REÚSO DE ESFERAS						
AMOSTRA	TEMPO (min)	Ensaio 3 (ppm)	Reúso 1 (ppm)	Reúso 2 (ppm)	Reúso 3 (ppm)	Reúso 4 (ppm)
1	0	100,61	102,15	102,92	99,77	101,85
2	10	58,31	70,61	86,76	92,54	98,38
3	20	39,08	50,66	76,00	79,46	95,21
4	40	28,31	37,58	58,08	74,62	92,14
5	60	22,92	29,86	55,23	66,00	89,07
6	80	20,61	26,79	52,92	59,46	88,38
7	100	18,31	25,21	49,07	58,08	88,38
8	120	17,54	22,93	46,00	57,38	86,79
9	160	16,77	22,14	42,15	56,69	86,79
10	200	13,67	19,86	38,30	55,31	86,00
11	240	12,93	17,58	36,76	56,00	85,21
12	280	13,69	16,79	36,00	55,31	86,00
13	320	12,92	18,38	36,00	55,31	86,79
14	360	12,92	17,58	36,00	55,31	86,000

Figura 47 – Ensaio 3 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.

A Tabela 35 e figura 48 apresentam os resultados do ensaio 4 e da reutilização destes flocos em mais 4 ensaios ciclos de oxidação.

Tabela 35 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.

OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE EM ESFERAS						
		Ensaio 4	Reúso 1	Reúso 2	Reúso 3	Reúso 4
AMOSTRA	TEMPO (min)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)
1	0	102,15	102,15	98,31	99,08	103,69
2	10	60,62	70,62	85,23	92,15	99,85
3	20	42,92	50,62	76,77	79,85	96,77
4	40	30,62	37,54	59,85	74,46	92,15
5	60	22,15	29,85	56,00	66,00	89,08
6	80	21,38	26,77	50,62	59,85	88,31
7	100	19,08	25,23	49,08	58,31	88,31
8	120	19,08	22,92	43,69	57,54	86,77
9	160	17,54	22,15	42,15	56,77	86,77
10	200	17,54	19,85	38,31	55,23	86,00
11	240	16,77	19,85	35,23	54,46	85,23
12	280	16,77	19,85	33,69	55,23	86,00
13	320	17,54	20,62	32,15	55,23	87,54
14	360	17,54	19,85	31,38	55,23	86,77

Figura 48 - Ensaio 4 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.

A Tabela 36 e figura 49 apresentam os resultados do ensaio 5 e da reutilização destes flocos em mais 4 ensaios ciclos de oxidação.

Tabela 36 - Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em floco de Quitosana com maior resistência mecânica.

OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE EM ESFERAS						
AMOSTRA	TEMPO (min)	Ensaio 5 (ppm)	Reúso 1 (ppm)	Reúso 2 (ppm)	Reúso 3 (ppm)	Reúso 4 (ppm)
1	0	104,46	102,15	98,31	101,38	101,38
2	10	63,69	66,77	91,38	94,46	101,38
3	20	46,00	53,69	73,69	84,46	99,85
4	40	32,92	42,92	56,77	78,31	98,31
5	60	25,23	32,92	52,92	68,31	97,54
6	80	22,15	27,54	49,08	64,46	95,23
7	100	19,08	23,69	46,77	61,38	91,38
8	120	19,08	22,15	49,08	66,00	89,08
9	160	16,77	22,92	46,00	63,69	86,00
10	200	16,00	20,62	42,92	59,08	86,77
11	240	16,77	19,85	39,85	59,08	83,69
12	280	14,46	18,31	36,77	60,62	82,92
13	320	15,23	18,31	37,54	59,85	84,46
14	360	12,92	18,31	35,23	60,62	85,23

Figura 49 - Ensaio 5 - oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e reúso dos flocos.

Comparando os resultados obtidos com a imobilização da tirosinase com os obtidos utilizando a enzima livre é possível identificar a vantagens com a realização em imobilização e reúso das enzimas.

A Tabelas 37, 38 e Figuras 50 e 51 mostram os resultados da remoção total de fenol obtidos através da oxidação com enzima livre e imobilizada respectivamente.

Tabela 37 – Concentração total de fenol removido nos ensaios com enzima livre.

Oxidação com Enzima Livre	Quantidade de Enzima (U)	Quantidade de Fenol Removido (ppm)	% de Enzima / Substrato Convertido (ppm/U)
Ensaio 01	50.000,00	96,3	0,193
Ensaio 02	50.000,00	88,1	0,176
Ensaio 03	50.000,00	87,1	0,174
Ensaio 04	50.000,00	89,8	0,180
Ensaio 05	50.000,00	86,5	0,173

Figura 50 - Concentração total de fenol removido nos ensaios com enzima livre.

Tabela 38 - Concentração total de fenol removido nos ensaios com reúso dos flocos.

Oxidação com Enzima Imobilizada	Quantidade de Enzima (U)	Conc. Total de Fenol Removido (ppm)	% de enzima/ substrato convertido (ppm/U)
Ensaio 1	9063	291,54	3,217
Ensaio 2	9063	286,92	3,166
Ensaio 3	9063	292,31	3,225
Ensaio 4	9063	289,23	3,191
Ensaio 5	9063	287,69	3,174

Figura 51 - Concentração total de fenol removido nos ensaios com reúso dos flocos.

A Tabela 38 e Gráfico 51 mostram se que mesmo apresentando menor eficiência na remoção do fenol, o fato de poder reutilizar a enzima imobilizada possibilita a remoção mais de 03 vezes maior do que utilizando a enzima livre.

Analisando as Tabelas e Gráficos anteriores conclui-se que apesar da alta eficiência de remoção do fenol, o fato de enzima ser utilizada diluída no meio aquoso torna o resultado menos interessante. Isso porque não é possível reutilizar o material em uma próxima batelada, além do fato da quantidade de enzima necessárias para este processo são muito maiores do que a quantidade usada nos processos de oxidação com tirosinase imobilizada. Essa melhora no desempenho tem como responsável o uso da Quitosana, como foi demonstrado nos ensaios de adsorção, a Quitosana tem elevado potencial de remover partículas de solução aquosa, com uso desta matriz na imobilização da enzima proporcionou a remoção das moléculas de orto-quinona e de poli-orto-quinina da solução, com esta redução a inativação das enzimas imobilizadas foi minimizada, proporcionando o melhor rendimento das enzimas e conseqüentemente trazendo um avanço ao processo de desintoxicação do efluente.

Figura 52 - Comparação do aproveitamento das enzimas na oxidação do fenol.

A Figura 52 apresenta o resultado da seguinte equação:

Aproveitamento Enzimático = $100 \times (\text{quantidade de substrato convertido ppm}) / (\text{quantidade de enzima U})$.

Como este calculo é possível conhecer a quantidade de substrato convertido para cada enzima utilizada nos ensaios, mostrando que o aproveitamento das enzimas nos ensaios com a imobilização foi mais significativo do que o uso destas na forma livre.

10. CONCLUSÕES

10.1. Adsorção em Quitosana

Os resultados de adsorção de fenol em Quitosana mostraram que este processo é interessante tecnologicamente, pois proporcionou a redução de cerca de 50% do fenol dissolvido e, assim, poderia ser utilizado como um processo de polimento do efluente. No entanto, os resultados não são conclusivos devido ao comportamento inesperado da concentração de fenol residual em função da concentração de Quitosana. A comparação dos resultados obtidos com a literatura foi possível apenas com um processo que utilizava Quitosana solubilizada, enquanto no nosso processo a Quitosana era insolúvel. Implantou-se uma metodologia preliminar de obtenção da isoterma de adsorção e de análise espectrofotométrica de fenol aquoso.

Considerações:

- A Quitosana não se satura de fenol para concentrações iniciais de fenol de até 90 ppm.
- Foram determinadas as condições ótimas de pH e T para a adsorção de fenol em Quitosana.

10.2. Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre

Os resultados da oxidação enzimática de fenol mostraram-se muito eficientes, pois foram obtidas eficiências de remoção de até 88% em 60 min. de ensaio para $T = 45^{\circ}\text{C}$ e concentração enzimática de 50 U/mL. O equipamento montado e a metodologia inicialmente desenvolvida foram satisfatórios na obtenção dos dados, o que foi comprovado com a análise dos resultados, quantitativamente coerentes.

Considerações:

- As condições de processo mais apropriadas foram bem definidas (pH , T , N)
- As eficiências de oxidação são superiores a 90% para concentrações iniciais inferiores a 100 ppm.
- O custo da tirosinase pura é proibitivo para sua utilização no tratamento de efluentes.

10.3. Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada

A utilização de tirosinase imobilizada mostrou-se viável principalmente após o desenvolvimento da técnica de produção de esferas resistentes mecanicamente.

Considerações:

- A imobilização ocorre em menos de duas horas de ensaio.
- Alta eficiência de imobilização (80%).
- A eficiência de oxidação do fenol caiu rapidamente com as reutilizações, porém a concentração total de fenol removido das soluções chegou a ser quase 3 vezes maior do que o que foi removido utilizando as enzimas livres.
- As esferas de Quitosana são resistentes mecanicamente, o que possibilita a aplicação tecnológica deste estudo.

11. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

11.1. Adsorção

- Realizar o estudo da adsorção de fenóis em outras substâncias abundantes na natureza, como por exemplo, queratina, quitina e celulose.

11.2. Oxidação Enzimática com Tirosinase Livre

- Extrair Tirosinase de vegetais e testar o uso do extrato bruto na oxidação de fenóis, o desenvolvimento reduzirá os custos de implantação desta tecnologia em escalas industriais.
- Estudar a remoção de compostos derivados do fenol como cresol, p-nitro fenol e compostos da indústria farmacêutica como o 17- β Estradiol.

11.3. Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada

- Procurar por novos biomateriais abundantes na natureza e que podem servir de matrizes de imobilização e também para adsorção dos compostos gerados nas reações enzima substrato. As matrizes sugeridas como continuidade dos estudos são as mesmas apontados no item 11.1, quitina, queratina e celulose.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, J.; AHMAD, M.; KARUPPIAH, N. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of *p*Henol, **Sensors and Actuators**, v. B114, p. 604-609, 2006.
- AITKEN, M. D.; MASSEY, I. J.; CHEN, T.; HECK, P. E. Characterization of Reaction Products from the Enzyme Catalyzed Oxidation of *P*Henolic Pollutants. **Water Res.**, p. 1879-1889 v. 28(9), 1994.
- ADATI, H.K. Preparação e Avaliação das Propriedades Físico–Químicas de Membranas de Quitosana para uso Biomédico e Farmacêutico, Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – **Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- AHMARUZZAMAN, M. Adsorption of *p*Henolic compounds on low-cost adsorbents: A review, **Advances in Colloid and Interface Science**, v.43, p.48-67, 2008.
- ANVISA (www.anvisa.gov/legis/portarias/176_96.htm)
- BANAT, F.A; AL-ASHEH, S. Biosorption of *p*Henol by chicken feathers, **Environ. Engg. And Policy**, v.2, p.85-90, 2000.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254, 1976.
- CALDERBANK, P. H.; MOO-YOUNG, M. B. The continuous *p*Hase heat and mass transfer properties of dispersions, **Chem. Eng. Sci.**, vol. 16, p. 39-54, 1961.
- Campbel, W.H., <http://www.bio.mtu.edu/campbell/bl482/lectures/lec2/482ex2a.htm>), 1999.
- CANELLA, K.N.C.; GARCIA, R.B. Caracterização de Quitosana por cromatografia de permeação em gel-influência do método de preparação e do solvente, **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.
- Carbohydrate Polymers**, v. 31, n. 4, p. 253-261, 1996.
- CHO, I.Y.; NO, H.K.; MEYERS, S.P. *P*Hysicochemical characteristics and functional properties of various commercial chitin and chitosan products, J. **Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 3839-3843, 1998.

COLOMBIÉ, S.; GAUNAND, A.; LINDET, B. Lysozyme inactivation under mechanical stirring: affect of *pH*ysical and molecular interfaces, **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.820-826, 2001.

DURSUN, A.; KALAYCI, C.S. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of *pH*enol onto chitin, **Journal of Hazardous Materials**, v.B123, p.151-157, 2005.

EDWARDS, W.; LEUKES, W.D.; ROSE, P.D.; BURTON, S.G. Immobilization of polyp*pH*enol oxidase on chitosan coated polysulphone capillary membranes for improved *pH*enolic effluent bioremediation, **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p.769-773, 1999.

ENSUNCHO, L.; CUENCA, M.A.; LEGGE, R.L. Removal of aqueous *pH*enol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-*pH*ase fluidized bed reactor, **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 27, p. 185-191, 2005.

GASPARI, J. W.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C. A. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. **Scientia Agricola**, v. 56, n. 4, p. 1135-1140, 1999.

GIRELLI, A.M. *pH*enols removal by immobilized tyrosinase reactor in on-line high performance liquid chromatography, **Analytica Chimica Acta**, v. 580, p. 271-277, 2006.

GUIBAL, E.; VINCENT, T.; SPINELLI, S. Environmental application of chitosan-supported catalysts: catalytic hollow fibers for the degradation of *pH*enolic derivatives, **Separation Science and Technology**, v. 40, p.633-657, 2005.

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

IKEHATA, K.; NICELL, J.A. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous *pH*enols, *Bioresource Technology*, v. 74, p. 191-199, 2000.

Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 69, n. 2, p. 141-153, 1997.

JUANG, R.S.; JU, C.Y. Equilibrium sorption of copper(II) – ethylenediaminetetraacetic acid chelates onto cross – linked, polyaminated chitosan beads, **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 36, p. 5403-5409, 1997.

KARAM, J.; Nicell, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment.

LI, J.M.; MENG, X.G.; HU, C.W.; DU, J. Adsorption of *pH*enol, p-chloro*pH*enol and p-nitro*pH*enol onto functional chitosan, **Bioresource Technolgy**, v. 100, p. 1168-1173, 2009.

MONTEIRO JR., O.A.C. Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero Quitosana, Tese (Doutorado em Química) – **Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 1999.

NO, H.K.; MEYERS, S.P, Application of chitosan for treatment of wastewaters, **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 163, p. 1-28, 2000.

NOGUEIRA, M.I.C.; OLIVEIRA, M.S.; OLIVEIRA, I.B.; BUARQUE, H.L.; ARAÚJO, R.S.; NASCIMENTO, R.F. Adsorção de fenol e nitrofenóis em solução aquosa usando bagaço de coco (*cocos nucifera* L.) como adsorvente, *Conexões-Ciência e Tecnologia, Periódico de Divulgação Científica do CEFECCE*, v.1. n.1, 2007.

OTTOY, M.H.; VARUM, K.M.; CHRISTENSEN, B.E.; ANTHOSEN, M.W.; SMIDSRFD, O. Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans,

PADILHA, A.C.M.; SILAVA, 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**, v.14, Ed. Especial, p. 109-125, 2006.

PETER, M.G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan, **Journal of Macromolecular Science: Pure and Applied Chemistry**, v. A 32, n. 4, p. 629-640, 1995.

PRICE, N.C.; STEVENS, L. Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins. 3rd. Ed., New York, Oxford University Press, 1999.

QUADROS, P.A.; BATISTA, C.M.S.G. Effective interfacial area in agitated liquid-liquid continuous reactors, **Chemical Engineering Science**, vol. 58, junho/2003.

RHEE, S.J.; JUNG, M.W.; PAENG, K.J. Evaluation of Chitin and Chitosan as a Sorbent in the Preconcentration of *p*Henol and Chloro*p*Henols in Water, **Analytical Sciences**, v. 14, p. 83-97, 1998.

ROSSOMANDO, E.F. Measurement of Enzyme Activity. In: Methods in Enzymology, v. 182, Guide to Protein Purification, Deutscher, M.P., Ed., Academic Press, London, 1990.

SADA, E.; KUMAZAWA, H.; AMANO, T. Absorption of carbon dioxide in aqueous solutions of sodium *p*Henoxide, **The Chemical Engineering Journal**, vol. 13, p. 41-44, 1977.

SHANGHAI NICECHEM CO.,LTD, http://www.nicechem.net/High_density_chitosan.htm , 2006.

Shao, J.; Huimin, G.; Yumin, Y. Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-SiO₂ gel for removal of aqueous phenol, **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 901–905, 2007.

STRUSZCZYK, M.H. Chitin and chitosan. Part I. **Properties and production**, **Polimery**, v. 47, n.5, p.316-325, 2002.

STRUSZCZYK, M.H. Chitin and chitosan. Part II. **Applications of chitosan**, **Polimery**, v. 47, n.6, p.396-403, 2002.

STRUSZCZYK, M.H. Chitin and chitosan. Part III. **Some aspects of biodegradation and bioactivity**, **Polimery**, v. 47, n.9, p.619-629, 2002.

SUN, W.Q.; PAYNE, G.F. Tyrosinase-containing chitosan gels: a combined catalyst and sorbent for selective phenol removal, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 79-86, 1996.

SUN, W.Q.; PAYNE, G.F.; MOAS, M.S.G.L.; CHU, J.H.; WALLACE, K.K Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater, **Biotechnol. Prog.** V. 8, p. 179-186, 1992.

TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I. High-potential molecular properties of chitosan and reaction conditions for removing p-quinone from the aqueous phenase, **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 7-13, 2005.

THEODORE, L.; BUONICORE, A.J.; MCKENNA, J.D.; KUGELMAN, I.J.; JERIS, J.S.; SANTOLERI, J.J.; MCGOWAN, T.F. Waste Management. In: PERRY, R.H.; MALONEY, J.O., Eds. Perry's Chemical Engineer's Handbook, 7^a ed. New York, Mc Graw-Hill, p.25.1–25.111, 1997.

TOUAIBIA, 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.

Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads, **Biotechnol. Prog.** V. 21 p. 823-829, 2005.

WORTHINGTON ENZYME MANUAL,
<http://www.worthington-biochem.com/TY/default.html> , 2006.

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, **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 823-829, 2005.

YAN, J.L. Study on the adsorption of phenol by chitosan from aqueous solution, **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 24, n.5, p.497-502, 2006.

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

YOMOTA, C.; MIYAZAKI, T.; OKADA, S. Determination of the viscosimetric constants for chitosan and the application of universal calibration procedure in its gel permeation chromatography, **Colloid and Polymer Science**, v. 271, n. 1, p. 76-82, 1993.

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

Prof. Dr. Mauri Sergio Alves Palma

Alexandre Camargo Chavita

13. ANEXOS

13.1. Ensaios de Adsorção em Quitosana

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE:

- Coletar 1 mL de amostra;
- Filtrar em papel de 0,45 μm ;
- Coletar uma alíquota de 600 μL ;
- Devolver o excesso ao béquer;
- Diluir a amostra com 600 μL de água destilada de forma que a concentração de fenol encontre-se na faixa de 5 a 30 ppm;
- Adicionar 600 μL de solução tampão borato *pH* 9,0;
- Adicionar 600 μL de solução de 4-aminoantipirina 0,1%;
- Adicionar 600 μL de solução de ferricianeto de potássio 5%;
- Determinar a absorbância da solução resultante em exatos 10 minutos a 546nm;
- Preparar uma amostra em branco;
- Fazer uma curva de calibração e determinar o teor de fenol da amostra por interpolação ou regressão linear.

PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTE

- Solução tampão borato *pH* 9,0
- Solução A - Dissolver 6,18 g de ácido bórico P.A. em solução de cloreto de potássio 0,1 M e levar a 1000 ml com a mesma solução.
A solução de cloreto de potássio 0,1 M equivalente a 7,46 g de KCl em 1000 ml de água destilada.
- Solução B - Diluir 2,0 g de hidróxido de sódio P.A. em água destilada, completando o volume a 500 ml.
- Preparo do tampão *pH* 9,0 - Para 1000 ml da solução A, adicionar 420 ml da solução B. Verificar o *pH*.
- Solução de 4-aminoantipirina 0,1% (mínimo = 0,09%, máximo = 0,1%)
Dissolver 0,1g de 4-aminoantipirina em tampão borato *pH* 9,0 completando o volume a 100 ml.
- Solução de ferricianeto de potássio 5%
Dissolver 5g de ferricianeto de potássio P.A. com um pouco de água destilada, completar o volume para 100 ml com água destilada.

13.2. Ensaio de Oxidação Enzimática com Tirosinase Imobilizada e Livre

PROCEDIMENTO DE ANÁLISE

- Coletar 1 mL de amostra;
- Filtrar em papel de 0,45 µm;
- Coletar uma alíquota de 300 µL;
- Devolver o excesso ao béquer ou vaso;
- Adicionar a amostra a um frasco âmbar de 5 mL contendo 600 µL de água destilada, 60 µL de H₃PO₄ 8,5% (m/v);
- Adicionar 960 µL da solução tampão borato *pH* 9,0;
- Adicionar 960 µL da solução de 4-aminoantipirina 0,1%;
- Adicionar 960 µL da solução de ferricianeto de potássio 5%;
- Determinar a absorbância da solução resultante em exatos 10 minutos a 546nm;
- Fazer um ensaio em branco;
- Fazer uma curva de calibração e determinar o teor de fenol da amostra por interpolação ou regressão linear.

13.3. Metodologia de Análise da Atividade Enzimática da Polifenol Oxidase (Tirosinase)

Polifenol oxidase (tirosinase) (TY) é um bifuncional, contendo cobre oxidase com atividade tanto catecolase e cresolase (Malmström e Rydén 1968):

ATIVIDADE

Polifenol oxidase é uma enzima transferência de oxigênio. Além de usar O₂ para catalisar a desidrogenação de catecóis para orthoquinones e o orthohydroxylation de fenóis para catecóis, uma atividade de peroxidase relatada por Strothkamp e Mason (1974). Os estudos cinéticos foram relatados por Kertész et al. (1971). Há também a revisão por Malmström e Ryden.

ESTABILIDADE

O preparado liofilizado é estável durante 6-12 meses, quando armazenado a 5 °C.

MÉTODO

Polifenol oxidase oxida a tirosina dihidroxifenilalanina que por sua vez é oxidado a o-quinona. O último é acompanhado por um aumento da absorbância a 280 nm. A taxa de aumento é proporcional à concentração da enzima e linear durante um período de 5-

10 minutos depois de um atraso inicial. Uma unidade provoca uma alteração da absorbância a 280 nm de 0,001 por minuto a 25 ° C, *pH* 6,5, nas condições especificadas.

REAGENTES

- 0,5 M tampão fosfato de potássio, *pH* 6,5;
- 0,001 M L-Tirosina.

ENZIMA

- Dissolver a uma concentração de 1 mg / ml em água grau reagente;
- Diluir ainda mais em água grau reagente a uma concentração de 200-400 unidades / ml.

PROCESSO

Ajustar o espectrofotômetro a 280 nm e 25 ° C. Pipetar para cada célula da seguinte forma:

- 0,5 M tampão fosfato, *pH* 6,5 1,0 ml;
- 0,001 M L-Tirosina 1,0 ml;
- Água grau reagente 0,9 ml.

Oxigenar esta mistura de reação por borbulhamento de oxigênio através de um tubo capilar por 4-5 minutos e transferir para as cubetas do espectrofotômetro (comprimento de onda 280nm) para atingir a temperatura de equilíbrio e para estabelecer a taxa em branco, se houver. Adicionar 0,1 ml de enzima diluída e realizar a leitura da absorbância a cada minuto, durante 12 minutos. Nos primeiros minutos de leitura é possível que haja discordância entre os valores encontrados.

Cálculo:

$$\text{Units/mg} = \frac{\Delta A_{280}/\text{min} \times 1000}{\text{mg enzima em reação}}$$