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

Oxidação enzimática de soluções fenólicas com tirosinase
imobilizada em quitosana

Rafael Mitsuo Miyaguti

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauri Sérgio Alves Palma

São Paulo
2011

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

Oxidação enzimática de soluções fenólicas com tirosinase
imobilizada em quitosana

Rafael Mitsuo Miyaguti

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauri Sérgio Alves Palma

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Miyaguti, Rafael Mitsuo
M685o Oxidação enzimática de soluções fenólicas com tirosinase
 imobilizada em quitosana / Rafael Mitsuo Miyaguti. -- São
 Paulo, 2011.
 111p

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Palma, Mauri Sérgio Alves

1. Bioquímica : Toxicologia 2. Enzimologia industrial I. T.
II. Palma, Mauri Sérgio Alves, orientador.

615.9 CDD

Rafael Mitsuo Miyaguti

Oxidação enzimática de soluções fenólicas com tirosinase
imobilizada em quitosana

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mauri Sérgio Alves Palma
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu pai Wilson, um
exemplo de vida, por prezar
sempre pela minha educação.
Aos meus tios, Áurea e Mauri,
pelo incentivo e cooperação.
As minhas irmãs, Carol e
Valéria, pelo carinho.
Dedico.

Agradecimentos

Ao professor Mauri Sérgio Alves Palma pelos conselhos, orientação do trabalho e pela amizade durante esses anos de convivência.

Ao professor Sunao Sato pela paciência e contribuição na realização das etapas deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica: Mirian, Elza e Juarez, por sempre terem sido tão prestativos.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação: Jorge e Elaine, pela disponibilidade e colaboração.

Aos professores Adalberto Pessoa Júnior (FCF/USP), Luis Antonio Gioielli (FCF/USP) e Pedro de Alcântara Pessoa Filho (DEQ-EPUSP), por permitir a utilização dos espectrofotômetros.

A todos os colegas que passaram pelo laboratório e contribuíram para a realização deste trabalho: Camila Lopes, Juliana Rosa, Mariana Cologna, Mariana Deodato, Raquel Etienne, Mônica Gruner, Gisele Pigatto, Cristina Taberner, Pricila Brito, Alexandre Chavita, Felipe Farias, Marcel Fonseca e Leonardo Capoal.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro.

RESUMO

MIYAGUTI, R. M. **Oxidação enzimática de soluções fenólicas com tirosinase imobilizada em quitosana.** 2011. 11 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Os compostos fenólicos, quando em altas concentrações na água, são poluentes de alta periculosidade, difíceis de serem eliminados até mesmo por métodos convencionais, como por exemplo, a biorremediação microbiológica dos lodos ativados e os métodos físico-químicos. Sabendo da presença dos fenóis em muitos efluentes industriais se faz necessário o estudo de novos processos para o tratamento desses efluentes que possuam aplicações eficazes e, sobretudo, ecologicamente corretas. A presente pesquisa visou a degradação de poluentes fenólicos em soluções aquosas através da oxidação enzimática com tirosinase imobilizada em quitosana. A contribuição tecnológica relaciona-se com a possibilidade de aplicação do estudo em escala industrial em processos de tratamento de efluentes industriais que contenham poluentes fenólicos. Fenóis como o 4-clorofenol, 4-cresol, 4-nitrofenol e o próprio fenol, foram utilizados em ensaios de oxidação enzimática em vaso agitado, em regime dinâmico, em processo de batelada, temperatura de 45°C e três faixas de concentração enzimática (40, 60 e 80 U/ml). Além disso, foram testadas três formas de quitosana utilizadas na imobilização enzimática e aplicadas nos processos de oxidação de fenol: esferas, flocos e micro partículas de quitosana. A enzima tirosinase foi eficiente na degradação de fenol, 4-cresol e 4-clorofenol, diminuindo consideravelmente a concentração destes poluentes nas soluções aquosas. Porém, a tirosinase não oxidou significativamente o 4-nitrofenol. Verificou-se que o efeito de alguns substituintes do anel aromático do fenol e a posição desse substituinte no anel aromático, exerce influência direta na atividade da enzima durante as reações oxidativas envolvendo os compostos fenólicos. Embora o presente estudo tenha apresentado bons resultados na remoção de alguns compostos fenólicos em soluções aquosas por meio da oxidação de tais poluentes pela enzima tirosinase imobilizada em quitosana, o complexo enzima-suporte não apresentou a mesma eficiência nos ensaios subseqüentes, nos quais foi estudada a reutilização da enzima imobilizada.

Palavras-chave: tirosinase, quitosana, fenol, oxidação enzimática.

ABSTRACT

MIYAGUTI, R. M. **Enzimatic oxidation of phenolic solutions with immobilized tyrosinase on chitosan**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The phenolic compounds when in high concentrations in water are extremely dangerous pollutants and difficult to be eliminated even by conventional methods such as the microbiological bioremediation with activated sludge and physico-chemical methods. Phenols are present in many industrial effluents and is necessary to develop new and effective processes for the treatment of that effluents and, if possible, environmentally friendly. This research aimed the degradation of phenolic pollutants in aqueous solutions by enzymatic oxidation with tyrosinase immobilized in chitosan. Phenols such as 4-chlorophenol, 4-cresol, 4-nitrophenol and phenol, had been used in assays of enzymatic oxidation in an agitated reactor, in dynamic regime, in a batch process, temperature of 45°C and three values of enzymatic concentration (40, 60 and 80 U/ml). In addition, three forms of chitosan had been used in enzymatic immobilization and applied in the processes of oxidation of phenol: pellets, flakes and small particles of chitosan. Tyrosinase was efficient in the degradation of phenol, 4-cresol and 4-chlorophenol, reducing significantly the concentration of these pollutants in aqueous solutions. However, tyrosinase did not oxidized 4-nitrophenol. It was verified that the effect of some substitutes and their position in the aromatic ring has a direct influence on the activity of the enzyme during the oxidative reactions involving phenolic compounds. Although this study has shown good results in the removal of some phenolic compounds in aqueous solutions through the oxidation of such pollutants by the tyrosinase immobilized on chitosan, the enzyme-support did not present the same efficiency in subsequent assays, in which we studied the reuse of the immobilized enzyme.

Keywords: tyrosinase, chitosan, phenol, enzymatic oxidation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL DO FENOL (MODIFICADO DE MUKHOPADHYAY, 2005).	21
FIGURA 2 - OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE FENÓIS ATRAVÉS DA AÇÃO DA TIROSINASE.	29
FIGURA 3 - ESTRUTURAS DOS DIFERENTES ESTADOS DE OXIDAÇÃO DA TIROSINASE.	30
FIGURA 4 - CICLO CATALÍTICO: (I) HIDROXILAÇÃO DE MONOFENÓIS E (II) DESHIDROXILAÇÃO DE O-FENÓIS EM O-QUINONAS. M = MONOFENÓIS E D = DIFENÓIS. (NICELL, 2003).	30
FIGURA 5 - CICLO CATALÍTICO DA TIROSINASE PARA A OXIDAÇÃO DE FENÓIS EM SEUS DIFERENTES ESTÁGIOS DE OXIDAÇÃO (MET, OXI, DEOXI). (MODIFICADO DE DURÁN, 2002).	31
FIGURA 6 - ESTRUTURAS DA QUITINA E QUITOSANA.	33
FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DE UMA PORÇÃO DE PÓ DE QUITOSANA COM GRAU DE DESACETILAÇÃO DE 60%.	39
FIGURA 8 - CONFIGURAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE.	41
FIGURA 9 - BÉQUER FIXADO NO SISTEMA DE BANHO-MARIA COM AGITAÇÃO MECÂNICA.	41
FIGURA 10 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE.	42
FIGURA 11 - BANHO TERMOSTATIZADO UTILIZADO NOS ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA (MARCA QUIMIS, MODELO Q226M1).	43
FIGURA 12 - ESQUEMA DOS EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO COM TIROSINASE LIVRE.	44
FIGURA 13 - REATOR ENCAMISADO UTILIZADO NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA.	44
FIGURA 14 - FOTOGRAFIA DO REATOR ENCAMISADO, CILINDRO DE OXIGÊNIO E BANHO COM CONTROLE DE TEMPERATURA UTILIZADO NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA.	45
FIGURA 15 - ESFERAS DE QUITOSANA CONSERVADAS EM TAMPÃO FOSFATO.	48
FIGURA 16 - ESFERAS DE QUITOSANA COM MÉDIA DE DIÂMETRO DE 3,76 MILÍMETROS.	49

FIGURA 17 - SOLUÇÃO DE QUITOSANA EM PLACA DE PETRI.	50
FIGURA 18 - MEMBRANA DE QUITOSANA APÓS SECAGEM EM PLACA DE PETRI.....	50
FIGURA 19 - MEMBRANA DE QUITOSANA RECORTADA EM PEQUENOS FLOCOS.....	51
FIGURA 20 - FLOCOS DE QUITOSANA ATIVADAS POR GLUTARALDEÍDO APÓS LAVAGEM COM ÁGUA DESTILADA COLOCADOS EM RECIPIENTE COM ÁGUA DEIONIZADA.	52
FIGURA 21 - FOTOGRAFIA DE COMPARAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA SECO E ÚMIDO.	54
FIGURA 22 - FOTOGRAFIAS DE UM FLOCO DE QUITOSANA SECO (A) E APÓS O ENSAIO EM MEIO LÍQUIDO (B).....	54
FIGURA 23 - MECANISMO DE TRANSFORMAÇÃO DA L-TIROSINA EM L-DOPA E DOPAQUINONA. (WORTHINGTON, 2006).	59
FIGURA 24 - REAÇÃO DE 4-AMINOANTIPIRINA E FENOL NA PRESENÇA DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO.	61
FIGURA 25 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENOL....	62
FIGURA 26 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 4- CLOROFENOL.	63
FIGURA 27 – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CRESOL. 64	
FIGURA 28 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE 4- NITROFENOL.....	64
FIGURA 29 - DEMONSTRAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE EM MEIO AQUOSO.	66
FIGURA 30 - DEMONSTRAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA VELOCIDADE DA ATIVIDADE DA TIROSINASE NA DEGRADAÇÃO DE FENOL (PPM/MIN).	68
FIGURA 31 - RESULTADOS DA OXIDAÇÃO DE FENOL EM PH = 5,6; 6,6 E 7,6.	69
FIGURA 32 - DEMONSTRAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICAL DE FENOL NA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA COM TIROSINASE.	71
FIGURA 33 - RESULTADOS DEMONSTRANDO A REPRODUTIBILIDADE DA OXIDAÇÃO DE FENOL PELA TIROSINASE EM BÉQUER AGITADO.	73

FIGURA 34 - RESULTADOS DEMONSTRANDO A REPRODUTIBILIDADE DA OXIDAÇÃO DE FENOL PELA TIROSINASE NO REATOR ENZIMÁTICO.....	74
FIGURA 35- FOTOGRAFIAS ("A" E "B") DOS REATORES COM A SOLUÇÃO DE FENOL ANTES DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO.	75
FIGURA 36 - FOTOGRAFIAS ("A" E "B") DOS REATORES COM A SOLUÇÃO DE FENOL OXIDADA APÓS O ENSAIO DE OXIDAÇÃO.	75
FIGURA 37 - OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA EM ESFERAS E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA.	76
FIGURA 38 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA INICIAL.	78
FIGURA 39 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA FINAL.	79
FIGURA 40 - OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).....	81
FIGURA 41 - GRÁFICO DA OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).	83
FIGURA 42 - GRÁFICO DA OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).	85
FIGURA 43 - FLOCOS DE QUITOSANA COM QUINONAS ADSORVIDAS APÓS OS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO DE FENOL.....	85
FIGURA 44 - RESULTADOS COMPARATIVOS DA OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DO FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA.	86
FIGURA 45 - OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).	88
FIGURA 46 - GRÁFICO DA OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).....	90
FIGURA 47 - GRÁFICO DA OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).....	92
FIGURA 48 - GRÁFICO COMPARATIVO DA REMOÇÃO DE 4-CLOROFENOL PARA DIFERENTES VALORES DE CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA DA TIROSINASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA.	93

FIGURA 49 - FOTOGRAFIAS DEMONSTRANDO UMA SOLUÇÃO DE 4-CLOROFENOL ANTES DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO (A) E A MESMA SOLUÇÃO APÓS O ENSAIO DE OXIDAÇÃO (B).....	94
FIGURA 50 - GRÁFICO DA OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).	95
FIGURA 51 - GRÁFICO DA OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).	97
FIGURA 52 - GRÁFICO DA OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).	99
FIGURA 53 - GRÁFICO COMPARATIVO DA REMOÇÃO DE 4-CRESOL EM DIFERENTES FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA DA TIROSINASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA.	100
FIGURA 54 - AMOSTRA DE UMA SOLUÇÃO DE 4-CRESOL NO DECORRER DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA COM TIROSINASE.....	100
FIGURA 55 - COMPARAÇÃO DA REMOÇÃO DE FENÓIS ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).....	102
FIGURA 56 - GRÁFICO COMPARATIVO DA REMOÇÃO DE FENÓIS ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).....	103
FIGURA 57 - GRÁFICO COMPARATIVO DA REMOÇÃO DE FENÓIS ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS CORPOS DE ÁGUA DE ACORDO COM O CONAMA.	24
TABELA 2 - DEFINIÇÃO DAS CLASSES DOS CORPOS DE ÁGUA DOCE (RESOLUÇÃO CONAMA N°357).....	25
TABELA 3 - DEFINIÇÃO DAS CLASSES DOS CORPOS DE ÁGUAS SALINAS (RESOLUÇÃO CONAMA N°357).....	26
TABELA 4 - DEFINIÇÃO DAS CLASSES DE ÁGUAS SALOBRAS (RESOLUÇÃO CONAMA N°357).	26
TABELA 5 - DEFINIÇÃO DAS CLASSES DAS ÁGUAS SUBTERRÂNEAS (RESOLUÇÃO CONAMA N°396).....	27
TABELA 6 - DEFINIÇÃO DO VALOR MÁXIMO PERMITIDO DE FENÓIS E COT PARA AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES E PADRÕES DA QUALIDADE DAS ÁGUAS (RESOLUÇÃO CONAMA N°357). .	28
TABELA 7 - ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DA QUITOSANA.	40
TABELA 8 - DIÂMETRO DAS ESFERAS DE QUITOSANA.	49
TABELA 9 - RESULTADOS DA OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE EM DIFERENTES TEMPERATURAS.	65
TABELA 10 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA TIROSINASE NA DEGRADAÇÃO (PPM/MIN) DE FENOL NOS PRIMEIROS 30 MINUTOS DE ENSAIO.	67
TABELA 11 - RESULTADOS DA OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE VARIANDO-SE O <i>pH</i>	69
TABELA 12 - RESULTADOS DA OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE VARIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO FENÓLICO.	70
TABELA 13 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE EM BÉQUER (V=50ML, 45°C, pH=6.6).	73
TABELA 14 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE NO REATOR ENZIMÁTICO (V=400ML, 45°C, pH=6.6).	74

TABELA 15 - DEGRADAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA EM ESFERAS E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA EM BÉQUER AGITADO.	76
TABELA 16 - RESULTADOS DA ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA INICIAL E FINAL NO ENSAIO DE IMOBILIZAÇÃO.	77
TABELA 17 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).	80
TABELA 18 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).	81
TABELA 19 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).	82
TABELA 20 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).	83
TABELA 21 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).	84
TABELA 22 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).	84
TABELA 23 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).	87
TABELA 24 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).	87
TABELA 25 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).	89
TABELA 26 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).	89
TABELA 27 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).	91
TABELA 28 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).	91

TABELA 29 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).	94
TABELA 30 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 40 U/ML).....	95
TABELA 31 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).	96
TABELA 32 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 60 U/ML).....	97
TABELA 33 - RESULTADOS DO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).	98
TABELA 34 - RESULTADOS DA REUTILIZAÇÃO DOS FLOCOS DE QUITOSANA NO ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA (CE = 80 U/ML).....	99

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 – REAÇÃO ENTRE FENOL E OXIGÊNIO MOLECULAR.....	30
EQUAÇÃO 2 – REAÇÃO ENTRE DIFENOL E OXIGÊNIO MOLECULAR.....	30
EQUAÇÃO 3 – CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1	FENÓIS	21
3.2	LEGISLAÇÃO	23
3.3	TIROSINASE	29
3.4	QUITOSANA.....	32
3.5	TRATAMENTO ENZIMÁTICO DE EFLUENTES.....	33
4	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	38
4.1	REAGENTES QUÍMICOS.....	38
4.2	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE LIVRE	40
4.3	EQUIPAMENTO UTILIZADO NOS ENSAIOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	42
4.4	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO DE FENÓIS COM TIROSINASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA	43
4.5	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS NOS MÉTODOS ANALÍTICOS	45

5	MÉTODOS	46
5.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES QUÍMICAS	46
5.2	PREPARO DA MATRIZ DE QUITOSANA	47
5.3	ATIVACÃO DA QUITOSANA POR GLUTARALDEÍDO	51
5.4	IMOBILIZAÇÃO DA TIROSINASE NA MATRIZ DE QUITOSANA	52
5.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	55
5.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	58
5.6.1	Determinação da atividade enzimática	59
5.6.2	Determinação da concentração residual das soluções fenólicas.....	61
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
6.1	INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA OXIDAÇÃO DE FENOL PELA TIROSINASE	65
6.2	INFLUÊNCIA DO PH NA OXIDAÇÃO DE FENOL PELA TIROSINASE	68
6.3	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE SUBSTRATO FENÓLICO NA OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA.....	70
6.4	ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DA OXIDAÇÃO DE FENOL PELA TIROSINASE.....	72
6.5	DEGRADAÇÃO DE FENOL COM TIROSINASE IMOBILIZADA EM ESFERAS E MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA EM BÉQUER AGITADO	75
6.6	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	77
6.7	DEGRADAÇÃO DAS SOLUÇÕES FENÓLICAS COM TIROSINASE IMOBILIZADA EM MEMBRANA DE QUITOSANA.....	80
6.7.1	Oxidação enzimática de fenol	80

6.7.2	Oxidação Enzimática de 4-clorofenol	86
6.7.3	Oxidação enzimática de 4-cresol	94
6.7.4	Oxidação enzimática de 4-nitrofenol	101
6.8	COMPARAÇÃO DA REMOÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS PELA TIROSINASE IMOBILIZADA EM QUITOSANA	102
7	CONCLUSÕES	104
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental tem sido uma das maiores preocupações do mundo nos últimos anos. As atividades industriais imprudentes com a conseqüente liberação contínua de substâncias tóxicas ao meio ambiente propiciam a degradação de grande parte dos recursos naturais do planeta. Entre os recursos naturais afetados pela poluição, os sistemas aquáticos estão entre os que mais preocupam por ser a água pura um bem fundamental para a articulação da vida e por ser o receptor final de efluentes líquidos de origem industrial, muitas vezes de alta toxicidade, com componentes recalcitrantes não biodegradáveis que contaminam excessivamente os corpos de água, podendo causar danos irreversíveis à saúde de pessoas e o descontrole inestimável de um ecossistema.

As maiores poluidoras do meio ambiente são industriais que produzem, armazenam e distribuem substâncias químicas orgânicas (**Gianfreda e Bollag, 2002**). Entre os poluentes químicos orgânicos estão os fenóis, compostos muito comuns em efluentes de indústrias, como as indústrias farmacêuticas, de resinas, têxteis, de plásticos, de papel e celulose, de tintas e as de refino de petróleo (**Karam e Nicell, 1997**). Das 129 substâncias tóxicas que constituem a lista de poluentes prioritários da Environmental Protection Agency (agência norte-americana de proteção ambiental), 11 são fenóis (**Theodore et al., 1997**). Esses poluentes estão sujeitos a legislação específica e devem ser degradados ou convertidos em substâncias menos tóxicas antes de serem lançados ao meio ambiente. No Brasil, a Resolução **CONAMA N° 357 (2005)** limita em 0,5 ppm a concentração de fenóis para o lançamento em corpos de água doce.

No entanto, quando estão em altas concentrações na água, os fenóis são poluentes difíceis de serem tratados. Na remediação microbiológica, por exemplo, o tipo de tratamento mais comum e eficiente, o processo é lento, os microrganismos necessitam uma grande demanda de oxigênio e muitos compostos de alta periculosidade, como os nitro-aromáticos e organoclorados, não são efetivamente degradados pelos microrganismos (**Kargi e Konia,**

2006; Marrot *et al.*, 2006; Soeira, 2007). Os tratamentos biológicos que utilizam organismos geneticamente modificados devem estar dentro de padrões rigorosos especificados em leis e apresentar níveis de segurança elevados para que esses microrganismos não sejam liberados ao meio ambiente. Os processos físico-químicos, por sua vez, são processos que necessitam de alta quantidade de reagentes químicos que acabam, muitas vezes, comprometendo a qualidade da água (**Nicell, 2003; Kargi e Konia, 2006; Saitoh *et al.*, 2009**).

Sabendo da presença dos poluentes orgânicos, como os fenóis, em muitos efluentes industriais se faz necessário o desenvolvimento de processos alternativos para o tratamento desses poluentes que sejam rápidos, seguros, eficientes e, sobretudo, com aplicações ecologicamente corretas.

A aplicação de enzimas em processos de bioquímicos com propósitos ecológicos tem sido reportada como uma ferramenta biotecnológica promissora no tratamento de água e solo em diversas pesquisas científicas nos últimos anos, principalmente quando considerada sua característica atóxica, de origem natural, fácil biodegradabilidade e com aplicação altamente seletiva para degradação de poluentes específicos (**Alcade *et. al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2009**).

Na presente pesquisa foi estudada a remoção de poluentes fenólicos de soluções aquosas através da oxidação enzimática com tirosinase (polifenol oxidase) imobilizada em quitosana. O estudo deu início às pesquisas relacionadas ao tratamento enzimático de efluentes de indústrias Bioquímico-Farmacêuticas no Laboratório de Tratamento e Valorização de Efluentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O cunho científico desta linha de pesquisa trata-se da melhor compreensão dos mecanismos da degradação enzimática de poluentes fenólicos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral, analisar a eficiência da remoção do fenol, 4-clorofenol, 4-nitrofenol e 4-cresol de soluções aquosas por meio de reações oxidativas promovidas pela enzima tirosinase imobilizada em suportes sólidos constituídos do polímero quitosana.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Análise da influência da Temperatura na atividade da enzima – nos valores de 15, 25, 35, 45 e 55°C – em ensaios de oxidação de fenol pela tirosinase;
- Análise da influência do *pH* na atividade da enzima – nos valores de 5,6, 6,6 e 7,6 – em ensaios de oxidação de fenol pela tirosinase;
- Análise da influência da concentração inicial de substrato fenólico – nos valores de 50, 100, 200 e 400 ppm – em ensaios de oxidação de fenol pela tirosinase.
- Estudo da Reprodutibilidade da oxidação enzimática de fenol pela tirosinase;
- Análise da influência da concentração enzimática – nas faixas de 40, 60 e 80 U/mL – em ensaios de oxidação enzimática de fenóis (fenol, 4-clorofenol, 4-nitrofenol e 4-cresol) com tirosinase imobilizada em quitosana;
- Comparação das eficiências da oxidação enzimática na remoção de cada um dos substratos fenólicos;
- Análise da eficiência de três suportes de quitosana utilizados em ensaios de oxidação enzimática de fenol: esferas, membranas e micropartículas.
- Análise da viabilidade da reutilização da enzima tirosinase imobilizada para mais um ciclo de oxidação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fenóis

Os fenóis são alguns dos compostos químicos orgânicos mais utilizados pelas indústrias (**Keith, 1979 apud Saitoh *et al.*, 2009**). Entre as diversas aplicações, o fenol pode ser utilizado na indústria de lubrificantes como solvente de extração, nas indústrias de adesivos na produção de resinas fenólicas, pode ser utilizado como medicamento veterinário que atua como um anestésico anti-séptico e servir até mesmo como desinfetante sanitário. Na indústria farmacêutica, o fenol pode ser utilizado na síntese de fármacos, como, por exemplo, a aspirina (**Mukhopadhyay, 2005**). Quando convertido em alquilfenóis, clorofenóis, anilina, e outros intermediários secundários, são utilizados na produção de antioxidantes, fertilizantes, surfactantes, tintas, tecidos e borrachas (**Busca *et al.* 2008**). O bisfenol a, por exemplo, um derivado do fenol, é utilizado na produção de plásticos de policarbonatos e resinas epóxi, muito utilizada na indústria de tintas (**Duchowicz *et al.*, 2007**). A Figura 1 esquematiza alguns exemplos da utilização industrial do fenol.

Figura 1 - Utilização industrial do fenol (modificado de **Mukhopadhyay, 2005**).

Nitrofenóis

Os nitrofenóis são compostos que devido a suas propriedades herbicidas, bactericidas, fungicidas e inseticidas, são empregados em larga escala na agroindústria para fabricação de pesticidas. Entre os nitrofenóis, o composto mais utilizado pela indústria é o 4-nitrofenol. De acordo com a Comunidade Econômica Européia seu consumo é superior a 1.000 toneladas por ano nos países da União Européia e esse composto é de grande interesse para as pesquisas do campo ambiental, haja vista que os processos convencionais de tratamento não são eficientes na degradação desse poluente orgânico. Entre os efeitos da inalação ou ingestão do 4-nitrofenol por humanos destaca-se as dores de cabeça, náuseas, narcolepsia e cianose (uma coloração azulada na pele). Além disso, o contato com os olhos pode causar irritação. Devida a sua toxicidade, o 4-nitrofenol está presente na lista de poluentes prioritários da Environmental Protection Agency (**Soeira, 2007**).

Clorofenóis

Assim como os nitrofenóis, os clorofenóis também são compostos utilizados na produção industrial de pesticidas, herbicidas, corantes, pigmentos, resinas fenólicas e papel. Os clorofenóis são recalcitrantes à biodegradação e, portanto, persistentes no meio ambiente. De acordo com Environmental Protection Agency, alguns clorofenóis são listados como poluentes ambientais prioritários devido à sua toxicidade e potencial atividade carcinogênica e mutagênica. A remoção tradicional de clorofenóis acontece por processos físico-químicos, eletroquímicos e/ou biológicos. Contudo, a aplicação destas técnicas individuais têm um efeito limitado e não pode degradar completamente os clorofenóis. (**Sanches et al., 2011**). A poluição de corpos de água por fenóis clorados são motivo de grande preocupação ambiental, pois além destes compostos serem tóxicos para os organismos de diferentes níveis tróficos na cadeia alimentar, os clorofenóis acumulam nesses organismos aquáticos (**Petroutsos et al., 2007**).

Cresóis

Os cresóis são compostos orgânicos largamente utilizados em processos industriais. Entre os cresóis está 4-cresol, composto muito utilizado na fabricação de plastificantes, modificação de resinas fenólicas e na fabricação de antioxidantes, como o butil-hidroxitolueno (BHT). O 4-cresol é um composto altamente tóxico (**Kumar et al., 2008**). Em experimentos laboratoriais com ratos, o 4-cresol foi administrado via oral sendo absorvido e detectado no sangue e distribuído para órgãos vitais, tais como cérebro, rins, fígado, pulmão e baço (**Morinaga et al., 2004**). A exposição constante ao 4-cresol, mesmo em concentração baixa na ordem de ppm, pode causar efeitos adversos no sistema nervoso central, no sistema cardiovascular, nos pulmões, no rim e no fígado. Por isso a Environmental Protection Agency classificou o 4-cresol como um poluente do grupo C (possível composto carcinogênico humano) (**Kumar et al., 2008**).

3.2 Legislação

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações” (**Constituição Federal, Artigo 225**). O parágrafo citado pertence ao capítulo de nossa Lei Fundamental dedicado exclusivamente ao tema meio ambiente, o capítulo VI do Título VIII (Da Ordem Social).

A Constituição Federal apresenta 21 artigos dedicados ao tema ambiental ou a ele vinculados, que impõe ao Estado e a Sociedade, o dever de proteger e garantir um meio ambiente ecologicamente equilibrado. Além disso, define as competências dos entes da federação, promovendo a descentralização da proteção ambiental, fazendo com que a União, Estados e Municípios possuam ampla competência para legislar sobre o meio ambiente. Assim sendo, as fontes poluidoras estão sujeitas a cumprir padrões de emissão estabelecidos por leis das diferentes esferas do governo – federal, estadual e municipal – devendo sempre prevalecer a mais restritiva.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) é o órgão consultivo e deliberativo do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA) com competência de estabelecer, através de suas Resoluções, as normas, os critérios e os padrões relativos ao controle e à manutenção da qualidade do meio ambiente, principalmente os recursos hídricos, na esfera federal. As **Resoluções N°398 de 2008, N°397 de 2008, N°396 de 2008, N°393 de 2007, N°357 de 2005, N°344 de 2004 e N°274 de 2000**, são as Resoluções em vigor que prezam pelos recursos hídricos. Estas resoluções dispõem sobre a classificação dos corpos de água, diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, entre outras providências.

Classificação das águas

De acordo com o CONAMA, os tipos de corpos de águas são classificados conforme sua salinidade ou sua origem, conforme mostrado na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos corpos de água de acordo com o CONAMA.

Tipo de Água	Definição
Águas Doces	Águas com salinidade igual ou inferior a 5%
Águas Salobras	Águas com salinidade superior a 5% e inferior a 30%
Águas Salinas	Águas com salinidade superior a 30%
Águas Subterrâneas	Águas que ocorrem naturalmente ou artificialmente no subsolo

As águas doces são classificadas em 5 diferentes classes mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Definição das classes dos corpos de água doce (**Resolução CONAMA N°357**).

Classes de Águas Doces	Definição
Classe Especial	"Águas destinadas ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção; a preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral."
Classe 1	"Águas que podem ser destinados ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; a proteção das comunidades aquáticas; a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e, a proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas."
Classe 2	"Águas que podem ser destinados ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; a proteção das comunidades aquáticas; a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho; a irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; e, a aquicultura e a atividade de pesca."
Classe 3	"Águas que podem ser destinados ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; a irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; a pesca amadora; a recreação de contato secundário; e a dessedentação de animais."
Classe 4	"Águas que podem ser destinadas a navegação e a harmonia paisagística."

As águas salinas são classificadas em 4 diferentes classes, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Definição das classes dos corpos de águas salinas (**Resolução CONAMA N°357**).

Classes de Águas Salinas	Definição
Classe Especial	"Águas destinadas a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e a preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas."
Classe 1	"Águas que podem ser destinadas a recreação de contato primário; a proteção das comunidades aquáticas; e a aquicultura e a atividade de pesca."
Classe 2	"Águas que podem ser destinadas a pesca amadora; e a recreação de contato secundário."
Classe 3	"Águas que podem ser destinadas a navegação; e a harmonia paisagística."

As águas salobras são classificadas em 4 diferentes classes mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Definição das classes de águas salobras (**Resolução CONAMA N°357**).

Classes de Águas Salobras	Definição
Classe Especial	"Águas destinadas a preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral; e a preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas."
Classe 1	"Águas que podem ser destinadas a recreação de contato primário; a proteção das comunidades aquáticas; a aquicultura e a atividade de pesca; ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado; e a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película, e a irrigação de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto."
Classe 2	"Águas que podem ser destinadas a pesca amadora; e a recreação de contato secundário."
Classe 3	"Águas que podem ser destinadas a navegação; e a harmonia paisagística."

As águas subterrâneas são classificadas em 6 diferentes classes e estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Definição das classes das águas subterrâneas (**Resolução CONAMA N°396**).

Classes de Águas Subterrâneas	Definição
Classe Especial	"Águas dos aquíferos, conjunto de aquíferos ou porção desses destinadas a preservação de ecossistemas em unidades de conservação de proteção integral e as que contribuam diretamente para os trechos de corpos de água superficial enquadrados como classe especial."
Classe 1	"Águas dos aquíferos, conjunto de aquíferos ou porção desses, sem alteração de sua qualidade por atividades antrópicas, e que não exigem tratamento para quaisquer usos preponderantes devido as suas características hidrogeoquímicas naturais."
Classe 2	"Águas dos aquíferos, conjunto de aquíferos ou porção desses, sem alteração de sua qualidade por atividades antrópicas, e que podem exigir tratamento adequado, dependendo do uso preponderante, devido as suas características hidrogeoquímicas naturais."
Classe 3	"Águas dos aquíferos, conjunto de aquíferos ou porção desses, com alteração de sua qualidade por atividades antrópicas, para as quais não é necessário o tratamento em função dessas alterações, mas que podem exigir tratamento adequado, dependendo do uso preponderante, devido as suas características hidrogeoquímicas naturais."
Classe 4	"Águas dos aquíferos, conjunto de aquíferos ou porção desses, com alteração de sua qualidade por atividades antrópicas, e que somente possam ser utilizadas, sem tratamento, para o uso preponderante menos restritivo."
Classe 5	"Águas dos aquíferos, conjunto de aquíferos ou porção desses, que possam estar com alteração de sua qualidade por atividades antrópicas, destinadas a atividades que não tem requisitos de qualidade para uso."

O fenol e a qualidade das águas

O fenol é um dos poluentes orgânicos que servem de parâmetro nas Resoluções do CONAMA para a avaliação das condições e dos padrões da qualidade das águas. Os valores máximos permitidos de fenóis (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina) em cada tipo e cada classe de água estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Definição do valor máximo permitido de fenóis e COT para avaliação das condições e padrões da qualidade das águas (Resolução CONAMA N°357).

	Classe de Água	Valor Máximo Permitido de Fenóis	Valor Máximo Permitido de Carbono Orgânico Total (COT)
Águas Doces	Classe 1	0,003 mg/L	-
	Classe 2	0,003 mg/L	-
	Classe 3	0,010 mg/L	-
	Classe 4	1,000 mg/L	-
Águas Salinas	Classe 1	0,060 mg/L	-
	Classe 2	0,060 mg/L	-
	Classe 3	-	10 mg/L
Águas Salobras	Classe 1	0,003 mg/L	-
	Classe 2	0,003 mg/L	-
	Classe 3	-	10 mg/L

Os valores máximos permitidos de fenóis para o uso das águas subterrâneas deverão ser observados quando da sua utilização, com ou sem tratamento, independentemente da classe de enquadramento. Citando alguns exemplos, as águas destinadas à recreação, dessedentação de animais e consumo humano, deverão conter no máximo 2, 2 e 3 µg/L de fenóis, respectivamente (**Resolução CONAMA N°396**). Nas águas de classe especial deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água (**Resolução CONAMA N°357**).

Legislações e efluentes fenólicos

A **Resolução CONAMA N° 357 (2005)** limita em 0,5 ppm (0,5 mg/L) a concentração de fenóis lançados direta ou indiretamente em corpos de água doce por qualquer fonte poluidora. Da mesma forma, o **Decreto Estadual N° 8468 (1976)** do Estado de São Paulo, limita a concentração máxima de fenóis em efluentes industriais no mesmo valor de concentração da resolução Federal, em 0,5 ppm. Porém, é importante salientar que algumas legislações em diferentes esferas do governo podem limitar ainda mais a concentração desses poluentes em efluentes industriais. O **Decreto Municipal N° 12.961 (2000)** da cidade do Rio Grande do Sul/RS, por exemplo, limita em 0,1 ppm a concentração máxima de fenóis lançados direta ou indiretamente em corpos de

água. Deste modo, a fonte poluidora de compostos fenólicos deve atentar-se ao local no qual esta situada e cumprir os padrões da legislação pertinente.

3.3 Tirosinase

A tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma polifenol oxidase presente em muitas bactérias, frutas, verduras, frutos do mar e em cogumelos (**Wang *et al.*, 2002**). É a 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 em seus sítios ativos dois átomos de cobre. É obtida usualmente a partir do cogumelo e são empregadas como biossensores de fenóis.

A enzima promove a hidroxilação de monofenóis na presença de oxigênio molecular transformando-os em difenóis. Posteriormente, promove a oxidação dos difenóis para o-quinonas. A Figura 2 esquematiza a reação de oxidação enzimática de fenóis.

Figura 2 - Oxidação enzimática de fenóis através da ação da tirosinase.

Os átomos de cobre presentes no sítio ativo da tirosinase se apresentam em três formas distintas. A forma "deoxy" (E deoxy) é a forma reduzida da enzima, no qual os dois átomos de cobre presente no sítio ativo da tirosinase se apresentam no estado Cu^+ . Na forma "met" (E met), os átomos de cobre no sítio ativo da enzima se encontram no estado Cu^{2+} . Finalmente, a forma "oxy" (E oxy) é a forma oxidada da tirosinase, na qual o sítio ativo da enzima apresenta os dois átomos de cobre na forma Cu^{2+} , contendo ainda, dois átomos de oxigênio ligados entre os átomos de cobre. (**Garcia-Canovas *et al.*, 2002**). A Figura 3 esquematiza os três estados de oxidação da tirosinase.

Figura 3 - Estruturas dos diferentes estados de oxidação da tirosinase.

A reação de oxidação de fenóis promovida pela tirosinase consiste numa oxigenação inicial da enzima ($E_{\text{deoxy}} \rightarrow E_{\text{oxi}}$), esta por fim inicia a oxidação dos fenóis em dois ciclos mostrados na Figura 4 (**Nicell, 2003**).

De uma forma resumida a reação se processa sempre na presença da tirosinase atacando o oxigênio molecular, como mostrado nas Equações (1) e (2) e nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 - Ciclo catalítico: (I) hidroxilação de monofenóis e (II) deshidroxilação de o-fenóis em o-quinonas. M = monofenóis e D = difenóis. (**Nicell, 2003**).

Figura 5 - Ciclo catalítico da tirosinase para a oxidação de fenóis em seu diferentes estágios de oxidação (met, oxi, deoxi). (**Modificado de Durán, 2002**).

A escolha da tirosinase, em vista de outras enzimas como as polifenol peroxidases tem como vantagem a diminuição de reagente para a oxidação realizada pela enzima, sabendo que as polifenol peroxidases usam o peróxido de hidrogênio como substrato e a oxidase usa apenas o oxigênio livre (**Ikehata e Nicell, 2000**), resultando em economia devido ao alto custo das peroxidases. 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.

A imobilização da tirosinase tem sido reportada em muitos trabalhos nos últimos anos. Métodos e substâncias para imobilizar tirosinase foram descritos

em trabalhos anteriores como a imobilização em membranas de nylon (**Burton *et al.*, 1998**), em grafite em pó, em gel de sílica, quitosana (**Shao *et al.*, 2007**), e em resinas de troca iônica (**Tamura *et al.*, 2009**).

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**).

3.4 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-glucopirranose 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**). Os processos para desacetilação da Quitina 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**). 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, de modo que sua escolha como matriz visa também estudar suas propriedades com relação à adsorção dos fenóis.

A adsorção em quitosana ocorre pela presença dos grupos amina, disponíveis para interações de Van Der Valls. 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 esotermas 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 polianiónica. Outras vantagens da quitosana são o seu baixo custo, atoxicidade e origem renovável. A Figura 6 mostra as estruturas da quitina e da quitosana.

Figura 6 - Estruturas da quitina e quitosana.

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**).

3.5 Tratamento enzimático de efluentes

A Biotecnologia moderna tem contribuído bastante para melhorar os processos de produção de enzimas em larga escala e diminuir os custos de

produção, diminuindo o custo da enzima para aplicação em processos industriais. O desenvolvimento de tecnologias de DNA recombinante como, a tecnologia metagenômica e a evolução molecular direta, tem contribuído para a produção de quantidades cada vez maiores de enzimas. Em uma produção em larga escala de enzimas, a quantidade de matéria-prima e o consumo de energia, podem ser reduzidos a metade quando utilizados organismos geneticamente modificados portadores de genes apropriados para produção enzimática. Processos antigos de produção enzimática que produziam gramas de enzimas, atualmente, com o desenvolvimento tecnológico, produzem quilogramas do produto. Além disso, novas enzimas podem ser desenvolvidas com propriedades especificadas pelo cliente como, por exemplo, especificidade de substrato, atividade, estabilidade e melhor condição de temperatura e *pH*. (**Powell *et al.*, 2001; Stewart, 2001; DeSantis *et al.*, 2002; Beilen, 2002; Alcade, 2006**).

As pesquisas sobre a utilização de enzimas em processos de tratamento de efluentes, principalmente os fenólicos, tiveram início na década de 1980 e ainda são muito atuais e bastante promissoras, sobretudo ao se considerar o desenvolvimento tecnológico de produção enzimática em larga escala e diversas possibilidades de combinação do uso da tirosinase, livre ou imobilizada, com adsorventes naturais, como por exemplo, a quitosana. Nos últimos anos, tem aumentado o reconhecimento por parte da comunidade científica de que as enzimas poderão ser aplicadas em processos de remediação ambiental visando a remoção de poluentes específicos (**Saitoh *et al.*, 2009**).

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 bisporus*. 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. Substâncias não oxidáveis pela tirosinase também foram removidas do meio aquoso através da coprecipitação com os polímeros formados da oxidação dos fenóis.

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.

Aitken (1993) estudou a oxidação de diferentes componentes fenólicos em soluções aquosas por enzimas peroxidases, lacases e polifenol oxidases. Enzimas como a tirosinase, horseradish peroxidase, lignina peroxidase, manganês peroxidase e cloroperoxidase foram testadas na degradação de fenol, cresóis, nitrofenóis e clorofenóis. Compostos como o 4-clorofenol, 4-cresol e pentaclorofenol foram facilmente degradados por mais de um tipo de enzima. Porém, as oxidações enzimáticas e a provável diminuição da toxicidade de soluções com compostos, como o 4-nitrofenol e 2-cresol, não foram eficientes por nenhuma das enzimas estudadas. Verificaram que a eficiência da oxidação enzimática de fenóis em soluções aquosas depende do tipo da enzima utilizada, e principalmente, do *pH* em que essa enzima possui maior atividade de oxidativa.

Wada *et al.* (1995) 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 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 de trocado catiônica e confirmaram, como no trabalho de **Aitken (1993)**, a maior estabilidade da enzima imobilizada.

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.

Bevilaqua *et al.* (2002) estudaram a degradação de fenol através de uma combinação de tratamento biológico aeróbio e enzimático com tirosinase extraída de cogumelos onde quitosana foi utilizada como coagulante. No tratamento enzimático aqueles autores determinaram que 98% de redução na concentração de fenol pode ser obtida com a utilização de 46 U/mL, 50 mg de quitosana/L a $T = 25^{\circ}\text{C}$ em 20 horas em um vaso agitado e processo batelada. Concluíram que o melhor processo é aquele que utiliza tratamento enzimático anterior ao biológico. Esta configuração do processo promoveu a diminuição da carga de fenol para o tratamento biológico, diminuindo as oscilações de concentração e preservando os microorganismos. No entanto houve a geração de produtos coloridos provenientes da oxidação do fenol e conseqüente aumento da Demanda Química de Oxigênio (DQO) dos efluentes. O uso de tirosinase imobilizada pode diminuir estes inconvenientes, pois retém as quinonas geradas e, conseqüentemente, diminui a cor e a DQO, além de melhorar a estabilidade da enzima.

Molina *et al.* (2003) estudaram a oxidação enzimática de fenóis com extrato de alcachofra (*Cynara scolymus L.*), que contém peroxidases e polifenoloxidasas (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 polifenoloxidasas, respectivamente.

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 de efluentes, mas o uso do tecido cru do cogumelo pode ser economicamente viável.

Bayramoglu e Arica (2008) imobilizaram a enzima horseradish peroxidase em microesferas feitas de metacrilato de glicidila e metacrilato de metila, utilizando glutaraldeído como agente imobilizador enzimático. A enzima horseradish peroxidase imobilizada foi utilizada no tratamento de soluções aquosas contendo Fenol e 4-clorofenol em um reator com sistema fluidizado contínuo. Os autores obtiveram um coeficiente de imobilização enzimática de 79% e conseguiram remover de forma eficiente os fenóis das soluções aquosas, indicando o sucesso do experimento e a possibilidade de aplicação do estudo em sistemas contínuos de larga escala para degradação enzimática de fenóis.

El-Shora e Metwally (2008) avaliaram a eficiência do tratamento enzimático de efluentes fenólicos utilizando tirosinase de *Bacillus thuringiensis* juntamente com compostos que adsorveriam os produtos resultantes da oxidação enzimática dos fenóis, como polietilenoglicol, polisorbato 20 e quitosana. Nesse estudo os autores conseguiram remover eficientemente fenol, 4-clorofenol e 2,4-diclorofenol dos efluentes fenólicos e perceberam que a taxa de remoção dos fenóis aumentou quando a quitosana foi utilizada juntamente com a enzima tirosinase. A quitosana foi o melhor adsorvente das quinonas resultantes dos processos oxidativos promovidos pela tirosinase evitando a inativação da enzima pelas quinonas.

Tamura *et al.* (2009) imobilizaram covalentemente a enzima tirosinase em resinas de troca iônica para remoção de alquilfenóis (por exemplo, o 4-cresol) de soluções aquosas e utilizaram esferas de quitosana para remover as quinonas resultantes das reações oxidativas promovidas pela tirosinase. O trabalho consistiu em um sistema contínuo com duas colunas separadas, uma contendo as resinas com tirosinase imobilizada e outra as esferas de quitosana. A solução fenólica de concentração 20 ppm era tratada na primeira coluna e as quinonas resultantes da oxidação enzimática eram adsorvidas pelas esferas de

quitosana na segunda coluna. Os autores conseguiram uma taxa de remoção de 100% em ensaios com duração de 72 horas.

Yamada *et al.* (2009) utilizaram a enzima tirosinase para degradar alquilfenóis de soluções aquosas juntamente com esferas de quitosana para adsorver as quinonas resultantes da oxidação enzimática. Nesse estudo, a concentração inicial das soluções fenólicas era de 50 ppm e a atividade enzimática 150 U/ml. Foi alcançada uma taxa de remoção fenólica de 100% nos ensaios de oxidação enzimática de 4-cresol, 4-etilfenol, 4-butilfenol, entre outros alquilfenóis. Os autores concluíram que o processo de oxidação enzimática juntamente com a adsorção de quinonas pela quitosana é uma técnica eficiente, fácil de operar e promissora no tratamento de efluentes fenólicos, pois as reações enzimáticas são rápidas e as esferas de quitosana podem ser rapidamente separadas das soluções aquosas após o tratamento enzimático.

4 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Neste capítulo serão apresentados os equipamentos utilizados na parte experimental do trabalho, bem como toda a metodologia aplicada na preparação da matriz de quitosana, imobilização da tirosinase, procedimentos experimentais e os métodos analíticos empregados para determinar a atividade enzimática da tirosinase e a concentração dos compostos fenólicos aquosos.

4.1 Reagentes químicos

Os reagentes químicos utilizados nos experimentos deste trabalho foram:

- Para a realização dos ensaios de oxidação de fenóis: enzima tirosinase T3824-25KV (atividade enzimática ≥ 1000 U/mg) fornecida pela empresa Sigma–Aldrich;
- Para a preparação das soluções de tampão fosfato: fosfato de potássio mono-básico e fosfato de potássio di-básico, ambos P.A, fornecida pela empresa Synth;

- Para a inativação da tirosinase nas amostras: ácido fosfórico P.A fornecida pela empresa Synth;
- Para preparação das soluções de tampão borato: ácido bórico P.A fornecido pela empresa Synth.
- Para a preparação das soluções fenólicas: fenol, 4-clorofenol, 4-cresol e 4-nitrofenol, todos P.A, fornecida pela empresa Synth;
- Para a dissolução da quitosana em pó: ácido acético e hidróxido de sódio, ambos P.A, fornecidos pela empresa Synth;
- Para realização das análises espectrofotométricas de fenóis: 4-aminoantipirina fornecida pela empresa Sigma Aldrich e, ferricianeto de potássio, cloreto de potássio, cloreto de amônio, hidróxido de amônio e hidróxido de sódio, todos P.A, fornecidos pela empresa Synth;
- Para determinação da atividade enzimática da tirosinase: l-tirosina (grau reagente $\geq 98\%$) fornecida pela empresa Sigma-Aldrich;
- Para a imobilização da tirosinase em matriz de quitosana: glutaraldeído com concentração de 25% fornecido pela empresa Synth.

A quitosana em pó foi fornecida pelo Laboratório de Química Orgânica Aplicada, coordenado pelo Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz, do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e colaborador deste projeto. A quitosana, mostrada na Figura 7, tem massa molar média de 6×10^5 g/mol e grau de desacetilação de 60%.

Figura 7 - Fotografia de uma porção de pó de quitosana com grau de desacetilação de 60%.

Na Tabela 7 é mostrada a análise granulométrica da quitosana. Os dados da 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.

Tabela 7 - 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	$63 < D_p < 74$	3,60
250 < Tyler < 270	$53 < D_p < 63$	5,30
Tyler < 270	$D_p < 53$	1,40

4.2 Equipamentos utilizados nos ensaios de oxidação de fenol com tirosinase livre

Os equipamentos utilizados nos ensaios envolvendo a oxidação enzimática de fenol pela enzima tirosinase livre em meio aquoso para o estudo da influência da temperatura, influência do pH e influência da concentração inicial de substrato fenólico estão mostrados nas Figuras 8, 9 e 10. O béquer de vidro (A) com volume útil de 200mL foi fixado em um sistema de banho-maria (B) com controle para aquecimento ou resfriamento da temperatura, agitador mecânico (C), termômetro (D) e medidor de pH (E). O sistema dispõe ainda de um balão de oxigênio (G), que permite a injeção de O_2 para saturar o meio aquoso com oxigênio necessário para os ensaios de oxidação, uma válvula redutora de pressão (H), rotâmetro (I) e ponteira injetora de ar (F).

Figura 8 - Configuração dos equipamentos utilizados nos ensaios de oxidação de fenol com tirosinase livre.

Figura 9 - Béquer fixado no sistema de banho-maria com agitação mecânica.

Figura 10 - Equipamentos utilizados nos ensaios de oxidação de fenol com tirosinase livre.

4.3 Equipamento utilizado nos ensaios de imobilização enzimática

O equipamento utilizado nos ensaios de imobilização enzimática, mostrado na Figura 11, é um aparelho da marca Quimis (Modelo Q226M1) composto por um banho com controle de temperatura (de -10 a 40°C) e um dispositivo de agitação de erlenmeyers na direção horizontal.

Figura 11 - Banho termostatzado utilizado nos ensaios de imobilização enzimática (Marca Quimis, Modelo Q226M1).

4.4 Equipamentos utilizados nos ensaios de oxidação de fenóis com tirosinase imobilizada em quitosana

Os equipamentos utilizados nos ensaios envolvendo o estudo da reprodutibilidade da oxidação de fenol com tirosinase livre e os ensaios de oxidação enzimática de fenóis com tirosinase imobilizada em quitosana estão esquematizados na Figura 12 e mostrados nas Figuras 13 e 14. O reator agitado, R, é de vidro, com volume útil de 2 L, encamisado para resfriamento ou aquecimento. Há 4 entradas nesse reator, uma para o agitador, A, o indicador de temperatura, T, uma para oxigenação pelo cilindro de oxigênio, C, 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 12 - Esquema dos equipamentos utilizados nos ensaios de oxidação com tirosinase livre.

Figura 13 - Reator encamisado utilizado nos ensaios de oxidação enzimática.

Figura 14 - Fotografia do reator encamisado, cilindro de oxigênio e banho com controle de temperatura utilizado nos ensaios de oxidação enzimática.

4.5 Equipamentos utilizados nos métodos analíticos

Os métodos analíticos adotados neste trabalho, tanto para determinação da concentração residual de fenóis como para determinação de atividade enzimática, foram espectrofotométricos e foram utilizados os seguintes aparelhos:

- Para a determinação da atividade enzimática: espectrofotômetro Beckman DU 640 com controle de temperatura (com permissão do Prof. Adalberto Pessoa Jr, FCF/USP);
- Para determinação da concentração de fenóis: espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1203 (com permissão de Prof. Luis Antonio Gioielli, FCF/USP);

- Para determinação da concentração de cresóis: espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 (com permissão da CESQ, DEQ-EPUSP);
- Para determinação da concentração de fenol: espectrofotômetro Beckman DU 530 (com permissão do Prof. Pedro de Alcântara, DEQ-EPUSP).

5 MÉTODOS

5.1 Preparo das soluções químicas

Solução tampão fosfato

As soluções de tampão fosfato de potássio foram feitas seguindo os protocolos da agência Cold Spring Harbor (**cshprotocols, 2007**). Cada litro de solução de tampão fosfato (0,1 M e pH 6,5) era preparada através da adição de 382 mL de solução aquosa de fosfato de potássio mono-básico (0,1 M) em 619 mL de solução aquosa de fosfato de potássio di-básico (0,1 M), resultando em uma solução de pH 6,5 verificada em medidor de pH . As instruções deste manual também foram adotados na preparação de soluções tampão fosfato com outras molaridades ou valores de pH .

Solução fenólica

As soluções fenólicas foram preparadas dissolvendo os fenóis de grau analítico em solução de tampão fosfato (0,05M e pH 6,5). Tais soluções eram diluídas para a concentração correspondente a 100 partes por milhão (ppm). Adotando como exemplo a diluição do fenol, um composto sólido a temperatura ambiente, dissolvia-se 100 mg de fenol em solução de tampão fosfato, completando o volume para 1L.

Solução de tampão borato

A soluções de tampão borato (pH 9,0), utilizadas nas análises espectrofotométricas de fenol foram feitas seguindo os procedimentos a seguir. Primeiramente, foi feita uma solução de cloreto de potássio (0,1 M) equivalente a 7,46 g de KCl em 1000 ml de água destilada. A seguir, preparou-se uma

solução A, dissolvendo 6,18 g de ácido bórico em solução de cloreto de potássio (0,1 M), completando esta solução para 1000 ml com a mesma solução de cloreto de potássio. Posteriormente, preparou-se uma solução B, dissolvendo 2,0 g de hidróxido de sódio em água destilada, completando o volume para 500 ml. A solução de tampão borato (pH 9,0) foi composta por 1000 ml da solução A e 420 ml da solução B. Verificou-se o pH da solução final de tampão borato.

Solução de 4-aminoantipirina

As soluções de 4-aminoantipirina (1%), utilizadas nas análises espectrofotométricas de fenol, foram feitas dissolvendo 0,1g de 4-aminoantipirina em tampão borato (pH 9,0) completando o volume para 100 ml. O peso molecular da 4-aminoantipirina é de 203,24 g/mol. A concentração molar das soluções 1% de 4-aminoantipirina eram de 0,0049M.

Solução de ferricianeto de potássio

Para a preparação das soluções de ferricianeto de potássio (5%) utilizadas nas análises espectrofotométricas de fenol, dissolveu-se 5g de ferricianeto de potássio com um pouco de água destilada, completando o volume para 100 ml com água destilada. A concentração molar das soluções de ferricianeto de potássio (5%) era de 0,1518M já que o peso molecular deste reagente é de 329,24 g/mol.

Solução de glutaraldeído

As soluções de glutaraldeído (1%) utilizadas nos ensaios de ativação das matrizes de quitosana foram preparadas adicionando 4 ml de glutaraldeído (25%) em uma proveta de 100ml, completando o volume para 100ml com água destilada.

5.2 Preparo da matriz de quitosana

Inicialmente, os suportes sólidos para imobilização enzimática eram esferas de quitosana que apresentaram boa capacidade para imobilização

enzimática. Porém, tais esferas não possuíam resistência mecânica e eram fragmentadas com a agitação do reator utilizado neste trabalho. A partir disso, foi realizada uma busca na literatura e novas técnicas de confecção de suportes de quitosana foram desenvolvidas, os quais poderiam servir como suportes alternativos na imobilização da enzima tirosinase e que pudessem apresentar maior resistência mecânica nos ensaios de oxidação com forte agitação. (**Rorrer *et al.*, 1993; Assis e Alves, 2002; Adriano *et al.*, 2003**). A partir disso, foram testadas as membranas de quitosana cortados em pequenos flocos e as micropartículas de quitosana, sempre buscando os melhores suportes com razoável resistência à agitação mecânica e que servissem como bons suportes para imobilização da tirosinase.

Esferas de quitosana

As esferas de quitosana, mostrados na Figura 15 e 16, foram preparadas dissolvendo 1g de quitosana em 20 mL de ácido acético 5% como solvente, deixando a solução em homogeneização por 10 minutos. A quitosana solubilizada foi gotejada através de ponteiros apropriadas em solução de ácido acético 1M. As esferas obtidas foram deixadas em repouso por 2 horas em solução de NaOH 1M. Depois foram lavadas com água deionizada até a neutralidade. Para cada grama de pó de quitosana utilizado, foi obtido aproximadamente 7,5g de esferas úmidas.

Figura 15 - Esferas de quitosana conservadas em tampão fosfato.

Figura 16 - Esferas de quitosana com média de diâmetro de 3,76 milímetros.

A Tabela 8 mostra os diâmetros de uma total 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.

Tabela 8 - 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	

Flocos de quitosana

Os flocos de quitosana foram preparadas dissolvendo 12 g de quitosana em pó em 120 ml de ácido acético 3%, deixando a solução em agitação até que houvesse sua completa homogeneização. A solução com a quitosana dissolvida foi colocada em placas de petri (Figura 17) e mantida em congelador com temperatura de -10°C e posteriormente mantidos em temperatura ambiente

por 5 dias para que ocorresse sua secagem. A membrana de quitosana formada após os cinco dias, mostrada na Figura 18, foi retirada da forma de vidro e recortado em pequenos flocos, mostrados na Figura 19. Esses flocos, por sua vez, foram pesados em balança analítica, separados em porções de 12 gramas, e cada porção foi mantida em solução de NaOH 0,5M por 24 horas. (Krajewska, 2004; Rinaudo, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Dutta *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Figura 17 - Solução de quitosana em placa de petri.

Figura 18 - Membrana de quitosana após secagem em placa de petri.

Figura 19 - Membrana de quitosana recortada em pequenos flocos.

5.3 Ativação da quitosana por glutaraldeído

Esferas de quitosana

As esferas, cerca de 1g de esferas umidas, foram ativadas em 20 mL de solução de glutaraldeído em concentração percentual de 3%, utilizando tampão fosfato (0,1M e pH 8,0) como solvente. A ativação levou 30 minutos e foi realizada a 28°C. O glutaraldeído funciona como um agente que torna propício a reticulação da enzima pelo suporte sólido de quitosana, mantendo a adsorção da mesma. Além disso, o glutaraldeído aumenta a resistência da quitosana a uma degradação química ou biológica (**Rorrer *et al.*, 1993**).

Flocos de quitosana

Os flocos de quitosana, após lavagem com tampão fosfato (0,1M e pH 7,0) e água destilada, foram colocados em solução de glutaraldeído em concentração percentual de 1%, utilizando água destilada como solvente e razão entre solução de glutaraldeído e quitosana de 10 ml/g. A ativação durou 20 minutos sendo realizada a 28°C com agitação branda em banho-maria.

Os flocos de quitosana, mostrados na Figura 20, apresentavam um aspecto rígido na parte externa, porém, internamente maleáveis e porosos.

Figura 20 - Flocos de quitosana ativadas por glutaraldeído após lavagem com água destilada colocados em recipiente com água deionizada.

Micropartículas de quitosana

As micropartículas de quitosana foram confeccionadas a partir da desintegração das esferas de quitosana após a etapa da ativação por glutaraldeído. Ao término do ensaio de ativação por glutaraldeído, as esferas de quitosana foram submetidas a agitação excessiva causando a desintegração das mesmas e a formação de micropartículas de quitosana. Homogeneizou-se a solução que foi filtrada em filtro de 0,45 μm e as micropartículas de quitosana preservadas no próprio filtro de acetato de celulose para o ensaio de imobilização enzimática.

5.4 Imobilização da tirosinase na matriz de quitosana

A técnica de imobilização da tirosinase, fundamentada na imobilização química do tipo ligação covalente (**Gaspari *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1999 e Shao *et al.*, 2007**), foi realizada seguindo os procedimentos a seguir.

Flocos de quitosana

Cada porção de 12 g de flocos de quitosana – previamente pesada, tratada em solução de glutaraldeído e preservada, até então, em água deionizada – foram filtradas em um sistema a vácuo para retirar o excesso de água e, então, colocadas em um erlenmayer com 50ml de solução enzimática contendo a tirosinase (23,5 mg) dissolvida em solução tampão fosfato (0,1M e *pH* 7,0). O erlenmayer foi tampado e mantido sob agitação vertical em banho com temperatura controlada em 4°C por 24 horas.

De acordo com as informações presentes no rótulo do frasco da enzima – fabricada pela empresa Sigma Aldrich – a quantidade de 23,5mg da tirosinase deveria possuir uma atividade enzimática total de 125.000U. Portanto, os 50 ml de solução enzimática possuíam, teoricamente, uma atividade equivalente de 2.500U/ml.

Foram coletadas amostras de 300µL da solução enzimática no início do ensaio – antes da adição dos flocos de quitosana – e no final, após as 8 h de ensaio. Essas amostras foram colocadas em frascos âmbar, com tampa e batoque, devidamente rotulados e identificados, os quais foram imediatamente armazenados a -40°C até o momento da análise espectrofotométrica para determinação da atividade enzimática residual real e definição do coeficiente de imobilização de tirosinase pelos flocos de quitosana. Dos 300µL coletados da solução enzimática, apenas 100µL são utilizados para determinação da atividade enzimática na etapa de análise espectrofotométrica, método que será abordado adiante nos métodos analíticos.

Os flocos de quitosana com a enzima tirosinase imobilizada, ao término do ensaio de imobilização, foram novamente pesados e utilizados, subsequente, nos ensaios de oxidação das soluções fenólicas. É importante salientar que os flocos de quitosana apresentavam boa capacidade de intumescimento quando colocados em meio líquido, e por estarem molhados após os ensaios de imobilização, a massa da quitosana com tirosinase imobilizada apresentavam uma massa maior do que os 12 gramas pesados, anteriormente, na etapa de confecção da membrana de quitosana. Portanto, antes dos ensaios de oxidação, foi novamente realizada a pesagem dos flocos

de quitosana úmidos, dividindo-os em três porções de massas distintas, as quais, cada uma com uma quantidade de enzima imobilizada proporcional aos valores da variável de concentração enzimática estudadas neste trabalho. As Figuras 21 e 22 mostram o intumescimento dos flocos de quitosana.

Figura 21 - Fotografia de comparação dos flocos de quitosana seco e úmido.

Figura 22 - Fotografias de um floco de quitosana seco (a) e após o ensaio em meio líquido (b).

Esferas e micropartículas de quitosana

Após a ativação por glutaraldeído, as esferas ou as micropartículas de quitosana foram colocadas em solução enzimática de 25.000 U teóricos a 4°C por 7 horas e leve agitação. Foram coletadas amostras de 300µL da solução enzimática no início do ensaio e no final, após as 7 h de ensaio. Essas amostras foram colocadas em frascos âmbar os quais foram imediatamente armazenados a -40°C até o momento da análise espectrofotométrica.

5.5 Procedimento experimental

Neste capítulo, serão descritos os dois processos de oxidação enzimática de fenóis pela enzima tirosinase: com tirosinase livre e com tirosinase imobilizada em quitosana. Na primeira, foram realizados os ensaios de oxidação de fenol, verificando a influência da temperatura, do *pH* e da concentração inicial de substrato fenólico na atividade da tirosinase. Foram realizados ainda ensaios com enzima livre para verificar a reprodutibilidade da oxidação de fenol em béquer e em vaso agitado.

Na segunda forma, com a tirosinase imobilizada, foram realizados os ensaios de oxidação enzimática com tirosinase imobilizada em flocos de quitosana na oxidação de diferentes fenóis, separadamente, variando-se as faixas de concentração enzimática dos ensaios (40, 60 e 80 U/ml). Além disso, foram analisados os três suportes de quitosana estudados neste trabalho: esferas, flocos e micropartículas.

Oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre em béquer

Os ensaios de oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre em meio aquoso foram realizados adicionando-se ao béquer com volume útil de 200 ml, 50ml de solução aquosa de fenol em solução tampão fosfato (0,05 M e *pH* 6,5). A injeção de oxigênio pelo cilindro era acionada. Ligava-se, então, o agitador mecânico, e o controle da temperatura era ajustado para os valores adequados. Ao atingir a temperatura ideal para o ensaio, os experimentos eram iniciados adicionando-se 400 µL de tampão fosfato (0,1M e *pH* 6,5) contendo 2.500U teóricos de enzima, e acionado o cronômetro. As amostragens, de 100 µL, eram feitas em tempos pré-determinados. As amostras eram coletadas em frascos âmbar com tampa e batoque, contendo 600 µL de água destilada e 60 µL de ácido fosfórico 5% (m/v). As amostras eram mantidas a 0°C até o instante da determinação espectrofotométrica da concentração de fenol. O ácido fosfórico contido nos frascos é necessário para inibir uma possível quantidade de tirosinase livre contida na amostra que continuaria oxidando o fenol e, por conseguinte, gerando resultados alterados. Nesses ensaios foram verificados a

influência da temperatura, do *pH* e da concentração inicial de substrato fenólico, além da reprodutibilidade dos ensaios no béquer agitado.

Oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre em vaso agitado

Foi introduzido no reator, 390 ml de solução fenólica com concentração de 100 ppm. Então foi ligado o agitador mecânico com velocidade de agitação ajustada para 500 rpm, e o controle de temperatura foi ajustado para 45°C, faixa de calor, na qual, de acordo com os resultados deste trabalho, a enzima possui maior atividade. A injeção de oxigênio proveniente do cilindro de oxigênio foi acionada. O ensaio teve início com a inserção de 10 ml de solução enzimática contendo 25.000 U teóricos de tirosinase, completando o volume total de solução aquosa dentro do reator para 400 ml. Em tempos pré-determinados, a agitação foi interrompida, onde então foi retirada uma amostra de 1 ml para um béquer e 300 µl dessa amostra foi adicionado em um frasco âmbar contendo 600 µl de água e 60 µl de ácido fosfórico 8,5%. A seguir restabeleceu-se a agitação assim como a cronometragem dando continuidade ao ensaio. O restante da amostra foi devolvido ao meio líquido no reator. Os frascos contendo as amostras foram mantidos à temperatura de 0°C até o momento da leitura espectrofotométrica. Nesses ensaios foi verificada a reprodutibilidade da oxidação de fenol no vaso agitado.

Oxidação de fenol com tirosinase imobilizada em esferas ou micropartículas de quitosana em béquer agitado

Os ensaios de oxidação enzimática de fenol com tirosinase imobilizada em esferas, flocos e micropartículas em béquer agitado foram realizados adicionando-se ao béquer com volume útil de 200 ml, 100ml de solução aquosa de fenol dissolvido a 100 ppm em solução tampão fosfato (0,05 M e *pH* 6,5). A injeção de oxigênio pelo cilindro era acionada. Ligava-se, então, o agitador mecânico, e o controle da temperatura era ajustado para o valor de 45°C. Ao atingir a temperatura ideal para o ensaio, os experimentos eram iniciados acionado o cronômetro logo após adicionar os suportes sólidos de quitosana com tirosinase imobilizada no meio aquoso. As amostragens, de 100 µL, foram

feitas em tempos pré-determinados e coletadas em frascos âmbar contendo 600 µL de água destilada e 60 µL de ácido fosfórico 5% (m/v). As amostras eram mantidas a 0°C até o instante da determinação espectrofotométrica da concentração de fenol. Nesses ensaios foram estudados a eficiência dos suportes sólidos nos ensaios de oxidação de fenol.

Oxidação enzimática de fenóis com tirosinase imobilizada em flocos de quitosana em vaso agitado

Nos ensaios de oxidação enzimática de fenóis com a tirosinase imobilizada, para testar as diferentes faixas de concentração enzimática (40, 60 e 80 U/ml), era necessário, primeiramente, saber a quantidade de enzima que havia sido imobilizada junto aos suportes de quitosana. Para isso, previamente aos ensaios de oxidação, era realizada a análise da atividade enzimática das amostras geradas nos ensaios de imobilização. Conhecendo a quantidade de enzima que havia sido imobilizada em certa quantidade de flocos de quitosana, foi possível pesar em balança analítica e separar a massa dos flocos de quitosana com a quantidade de enzima imobilizada que seria utilizada em cada uma das faixas de concentração enzimática.

De acordo com os resultados que serão discutidos mais adiante, dos 125.000 U teóricos de atividade enzimática presentes nos 23,5 mg de tirosinase dissolvida, 84.000 U foi a quantidade média de atividade enzimática da tirosinase imobilizada nos flocos de quitosana. Portanto, considerando que o volume total nos ensaios de oxidação era de 400 ml, foram pesadas as massas das porções dos flocos de quitosana com tirosinase imobilizada equivalentes a 16.000, 24.000 e 32.000 U, para as suas respectivas faixas de concentração enzimática – 40, 60 e 80 U/ml.

A pesagem dos flocos de quitosana foi feita retirando-se os mesmos do béquer com a solução enzimática, mantendo-os por alguns instantes em uma peneira até que fosse retirado o excesso de líquido. Tarou-se o béquer com a solução enzimática e, então, os flocos de quitosana foram novamente adicionados a esse béquer, anotando sua massa.

Conhecendo a quantidade de enzima em cada porção de flocos de quitosana, foi possível iniciar os ensaios de oxidação de fenóis. Foi introduzido no reator, a solução fenólica com concentração de 100 ppm e um volume específico para cada uma das faixas de concentração enzimática. Então foi ligado o agitador mecânico com velocidade de agitação ajustada para 500 rpm, e o controle de temperatura foi ajustado para 45°C. A injeção de ar oxigênio proveniente do cilindro de oxigênio foi acionada. O ensaio teve início com a inserção dos flocos de quitosana contendo a quantidade de tirosinase imobilizada equivalente a faixa de concentração enzimática do ensaio, completando o volume total de solução (fenol e flocos de quitosana) em 400 ml. Nesse momento foi acionado o cronômetro. Em tempos pré-determinados, a agitação foi interrompida, bem como a cronometragem cessada por alguns instantes (de 5 a 10 segundos) para separação das fases sólida e líquida, onde então foi retirada uma amostra de cerca de 1 ml de fase aquosa em um béquer para análise espectrofotométrica e determinação da concentração da solução fenólica. A seguir restabeleceu-se a agitação assim como a cronometragem dando continuidade ao ensaio.

As amostras retiradas do reator foram filtradas com filtro de acetato de celulose com diâmetro de poros de 0,45 µm fornecido pela empresa Sartorius e dessa amostra, 300 µl foram adicionados em um frasco âmbar contendo 600 µl de água e 60 µl de Ácido Fosfórico 8,5%, e mantidos à temperatura de 0°C até o momento da leitura espectrofotométrica. A remoção do material particulado suspenso (polímeros e quitosana) é necessária para que os mesmos não afetem a análise espectrofotométrica para quantificação dos fenóis livres. O restante da amostra foi reposta no meio aquoso dentro do reator.

5.6 Métodos analíticos

Como descrito anteriormente, todos os métodos analíticos adotados neste trabalho foram métodos espectrofotométricos. Para a determinação da atividade enzimática, adotou-se a metodologia apresentada pelo manual de Worthington (**Worthington Enzyme Manual, 2006**). Os métodos analíticos espectrofotométricos para determinação das concentrações de fenóis

basearam-se em curvas de calibração de absorvância em função da concentração obtida a partir de soluções fenólicas com concentrações padronizadas.

5.6.1 Determinação da atividade enzimática

De acordo com a metodologia espectrofotométrica de Worthington para determinação da atividade enzimática da tirosinase (polifenol oxidase), dentro das condições especificadas neste parágrafo, estabelece que uma unidade da enzima tirosinase contida em 0,1 ml de amostra, causa a mudança da absorvância equivalente a 0,001 por minuto, de uma solução saturada com oxigênio molecular – contendo 1,0 ml de L-tirosina (0,001M), 0,9 ml de água de grau analítico e 1,0 ml de tampão fosfato (0,5M e *pH* 6,5) – em comprimentos de onda de 280 nm, a 25°C e *pH* 6,5. A tirosinase oxida a L-tirosina transformando-a em dihidroxifenilalanina (L-dopa), que por sua vez é oxidada a dopaquinona. Esta última gera o aumento da absorvância em comprimento de ondas de 280 nm. A Figura 23 mostra o mecanismo de transformação da L-tirosina em dopaquinona pela tirosinase.

Figura 23 - Mecanismo de transformação da L-tirosina em L-dopa e dopaquinona. (Worthington, 2006).

Para a determinação da atividade enzimática, oxigenou-se uma “solução A” – 1ml de tampão fosfato de *pH* 6,5 e 0,5M, 1ml de solução de L-tirosina 0,001M + 0,9ml de água deionizada – por 15 minutos e à 25°C. Então, foi adicionada à “solução A”, 100µl da amostra da solução enzimática retirada previamente dos ensaios de imobilização e que permaneciam a -40°C até então. Foi feita a leitura espectrofotométrica dessas amostras (100µl + 1,9ml de “solução A”), em cubetas de quartzo, em espectrofotômetro com controle da temperatura em 25°C e comprimento de onda de 280nm. 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 10 minutos.

O cálculo da atividade enzimática foi feito através da seguinte equação:

$$U = \Delta_{280} \times 1000 \quad (3)$$

onde: U = *Unidade de atividade Enzimática* (min^{-1}) e 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 Equação (3) resulta na atividade enzimática total contida em uma dada quantidade de amostra que, nesse trabalho, como visto anteriormente no item 5.4, possui um volume de 0,1 ml (100 μl). Deste modo, para não haver engano quanto aos valores e unidades de atividade enzimática relatadas neste trabalho, torna-se necessário algumas considerações. As amostras analisadas com o propósito de determinar a atividade enzimática nos ensaios de imobilização, com um volume de 0,1 ml, eram somente uma parte de toda a solução enzimática, que por sua vez, possuía um volume total de 50 ml. Portanto, para saber a atividade total do meio aquoso nos ensaios de imobilização, foi necessário aplicar os fatores de amostragem, calculando a atividade enzimática de toda a solução do meio de imobilização (50 ml) a partir do valor da atividade enzimática contida em uma amostra de 0,1 ml. Para se obter uma maior precisão dos resultados, de acordo com Worthington, o resultado obtido pela Equação (3) deve estar na faixa de 200 a 400 U/mL. Caso o valor estivesse fora desta faixa, seria necessário realizar a diluição ou concentração da amostra e repetir a determinação da atividade.

5.6.2 Determinação da concentração residual das soluções fenólicas

A seguir, na descrição da metodologia analítica espectrofotométrica das soluções fenólicas, será apresentada apenas uma das curvas de calibração de cada um dos compostos fenólicos, visto que as curvas de calibração possuem resultados semelhantes.

Determinação da concentração de fenol

As análises para determinação da concentração de fenol foram realizadas seguindo o método da CETESB (**Anvisa, 1996**). Para isso, as amostras retiradas nos ensaios de oxidação enzimática - que continham 300 µl da amostra retirada diretamente do ensaio de oxidação, 600 µl de água e 60 µl de ácido fosfórico 8,5% - e mantidas à temperatura de 0°C até esse momento, foram utilizadas para que reagissem com: 600 µL de solução tampão borato (*pH* 9,0), 600 µL de solução de 4-aminoantipirina 0,1% e 600 µL de solução de ferricianeto de potássio 5%. Exatamente 10 minutos após a adição do ferricianeto de potássio 5%, a absorbância da solução foi determinada a 546nm. Neste método, como mostrado da Figura 24, o fenol reage com a 4-aminoantipirina na presença de ferricianeto de potássio formando a antipirina, da qual a absorbância pode ser lida em 546 nm.

Figura 24 - Reação de 4-aminoantipirina e fenol na presença de ferricianeto de potássio.

O teor de fenol da amostra foi determinado por interpolação ou regressão linear a partir da curva de calibração. A Figura 25 mostra a curva de calibração para obtenção dos dados de concentração de fenol residual, $C_{\text{Fenol}, \text{Res}}$

a partir dos dados de *ABS* juntamente com a reta de regressão linear, que apresentou um coeficiente de correlação elevado ($R^2 = 0,996$).

Figura 25 - Curva de calibração para determinação da concentração de fenol.

Com base na curva de calibração do gráfico da Figura 25, a concentração de fenol aquoso residual é dada pela expressão:

$$C_{Fenol, Res} = (84,03 \cdot ABS - 2,563)$$

Onde:

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

ABS = absorvância da amostra

Determinação da concentração de 4-clorofenol

As análises para determinação da concentração do 4-clorofenol foram semelhantes as feitas na metodologia de análise do fenol, baseando-se no método CETESB (**Anvisa, 1996**). As amostras de 300 µl retiradas dos ensaios de oxidação, 600 µl de água e 60 µl de ácido fosfórico 8,5%, foram utilizadas para que reagissem com: 600 µL de solução tampão borato (*pH* 9,0), 600 µL de solução de 4-aminoantipirina 0,1% e 600 µL de solução de ferricianeto de potássio 5%. Exatamente 10 minutos após a adição do ferricianeto de potássio 5%, a absorvância da solução foi determinada a 500nm. O teor de 4-clorofenol

da amostra foi determinado por interpolação ou regressão linear a partir da curva de calibração, como a mostrada na Figura 26 a seguir.

Figura 26 - Curva de calibração para determinação da concentração de 4-clorofenol.

Determinação da concentração de cresol

As análises para a determinação de cresóis foram feitas baseando-se no método utilizado por **Neufeld e Paladino (1985)**, no qual o cresol também reage com 4-aminoantipirina, porém, na presença do reagente hidróxido de amônio. Nos frascos âmbar que continham 300 µl da amostra retirada diretamente do ensaio de oxidação, 600 µl de água e 60 µl de ácido fosfórico 8,5%, foram adicionados, na ordem: 900 µL de solução de NH₄Cl 5% (m/v), 190 µL de NH₄OH 29% (m/m), 900 µL de solução de 4-aminoantipirina 0,1% e 900 µL de solução de ferricianeto de potássio 5%. Entre a adição de um reagente para o outro, esperou-se por volta de 30 segundos agitando levemente os frascos âmbar. A determinação da absorbância da solução resultante a 510nm foi realizada exatamente 15 min após a adição do ferricianeto de potássio (absorbância variava com o tempo). O gráfico da curva de calibração para determinação de cresol está mostrada na figura 27.

Figura 27 – Curva de calibração para determinação da concentração de cresol.

Determinação da concentração de 4-nitrofenol

As análises para a determinação da concentração residual do 4-nitrofenol foram feitas com base na literatura (**Campbel, 1999**). As amostras retiradas nos ensaios de oxidação enzimática - que continham 300 µl da amostra, 600 µl de água e 60 µl de ácido fosfórico 8,5% - foram adicionadas a 2 mL de solução de NaOH 0,1M. O 4-nitrofenol adquire cor amarelada em meio básico e a absorbância da solução resultante pode ser feita a 405nm (absorbância não variava com o tempo).

Figura 28 - Curva de calibração para determinação da concentração de 4-nitrofenol.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Influência da temperatura na oxidação de fenol pela tirosinase

Foram realizados ensaios de oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre em meio aquoso para cada uma das faixas de temperaturas estudadas (15, 25, 35, 45 e 55°C). Os resultados de concentração de fenol residual aquoso em cada um desses ensaios estão mostrados na Tabela 09 e os mesmos resultados são apresentados na forma de gráfico na Figura 29.

Tabela 9 - Resultados da oxidação de fenol com tirosinase livre em diferentes temperaturas.

15°C		25°C		35°C		45 °C		55°C	
<i>t</i> (min)	<i>C</i> _{Fenol,Res} (ppm)	<i>t</i> (min)	<i>C</i> _{Fenol,Res} (ppm)	<i>t</i> (min)	<i>C</i> _{Fenol,Res} (ppm)	<i>t</i> (min)	<i>C</i> _{Fenol,Res} (ppm)	<i>t</i> (min)	<i>C</i> _{Fenol,Res} (ppm)
0	100	0	100	0	100	0	100	0	100
5	83,7	5	98,5	5	81,9	5	88,4	5	92,7
10	80,0	10	90,0	10	69,1	10	60,9	10	82,9
15	78,2	15	88,7	15	58,5	15	44,2	15	78,8
20	74,6	20	66,7	20	41,2	20	37,5	20	65,1
25	73,0	25	64,2	25	38,1	25	30,0	25	64,0
30	70,9	30	55,0	30	34,0	30	24,4	30	74,2
35	62,4	35	42,8	35	29,9	35	19,7	35	75,6
40	60,3	40	31,3	40	23,1	40	15,0	40	74,5
45	70,4	45	25,4	45	20,9	45	14,3	45	70,7
50	58,6	50	18,1	50	20,0	50	14,1	50	70,7
55	57,8	55	16,5	55	19,1	55	13,8	55	75,5
60	56,1	60	16,5	60	19,0	60	13,4	60	71,2
70	56,9	70	16,4	70	18,7	70	13,3	70	69,7

Figura 29 - Demonstração da influência da temperatura na degradação enzimática de fenol com tirosinase livre em meio aquoso.

Os resultados dos ensaios de oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre são coerentes com informações contidas na literatura (**Atlow *et al.*, 1984; Sun e Payne, 1996; Ikehata e Nicell, 2000; Yamada *et al.*, 2005; Garcia-Molina *et al.*, 2006**), nas quais infere-se que a temperatura ótima para a atividade da tirosinase é por volta de 45°C. De acordo com os resultados, na temperatura de 45°C a concentração de fenol residual final foi de 13% da concentração inicial (87% de remoção). Estes resultados apresentam comportamento semelhante com aqueles obtidos por **Wada *et al.* (1993)** e **Bevilaqua *et al.* (2002)**, nos quais a concentração final de fenol residual foi de 12 ppm, correspondendo a 88% de remoção.

Nas temperaturas de 25 e 35°C, a degradação também ocorreu de forma considerável, porém a concentração residual fenólica nesses ensaios foram maiores que os 13% do ensaio feito na temperatura de 45°C. Na temperatura de 25°C a redução foi de 84% e na temperatura de 35°C foi de 82%. Verificou-se que nas temperaturas de 15°C e 55°C, a atividade enzimática foi baixa. Na temperatura de 15°C, a concentração foi reduzida a cerca de 43%. Em 55°C,

uma temperatura extrema para essa enzima, a capacidade da tirosinase em degradar fenol foi a mais baixa das temperaturas testadas. A redução foi de apenas 30%.

Com os resultados dos ensaios de oxidação de fenol pela tirosinase em diferentes temperaturas, analisou-se a velocidade da atividade enzimática da tirosinase em função da temperatura. Foram considerados os resultados dos primeiros 30 minutos de cada ensaio, intervalo no qual os ensaios ainda não haviam entrado em equilíbrio. O cálculo da variação da atividade enzimática em função da temperatura está mostrado na Tabela 10 e os resultados estão representados graficamente na Figura 30.

Tabela 10 - Influência da temperatura na atividade enzimática da tirosinase na degradação (ppm/min) de fenol nos primeiros 30 minutos de ensaio.

T (°C)	Cálculo	Atividade (ppm/min)
15	$(100-70,92)/30$	0,969
25	$(100-55,02)/30$	1,499
35	$(100-34,05)/30$	2,198
45	$(100-24,38)/30$	2,520
55	$(100-74,26)/30$	0,858

Figura 30 - Demonstração da influência da temperatura na velocidade da atividade da tirosinase na degradação de fenol (ppm/min).

Analisando os resultados da Tabela 10 e do gráfico acima, observa-se que a tirosinase, nos primeiros 30 minutos do ensaio com temperatura fixada em 45°C, apresentou uma taxa média de degradação de fenol de 2,2 ppm/min. Nessa temperatura a tirosinase apresenta o máximo de sua atividade, confirmando informações da literatura. É possível observar no mesmo gráfico que a taxa de degradação de fenol (ppm/min) cresce com a temperatura, chegando ao máximo da atividade enzimática na temperatura de 45°C, quando então, a partir disso a atividade enzimática cai drasticamente.

6.2 Influência do *pH* na oxidação de fenol pela tirosinase

Os ensaios da influencia do *pH* foram realizados modificando-se o *pH* das soluções tampão de diluição do fenol. Os resultados de concentração de fenol residual aquoso nas diferentes faixas de *pH* (5,6, 6,6 e 7,6) estão mostrados na Tabela 11 e na forma de gráfico na Figura 31.

Tabela 11 - Resultados da oxidação de fenol com tirosinase livre variando-se o pH .

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

Figura 31 - Resultados da oxidação de fenol em $pH = 5,6$; $6,6$ e $7,6$.

De acordo com os resultados, observa-se que a remoção de fenol cresce com o aumento do pH de 5,6 para 6,6 e praticamente não varia quando aumentado de 6,6 para 7,6. A remoção de fenol no ensaio com pH 5,6 foi de aproximadamente 75%, enquanto que para os valores de 6,6 e 7,6 a remoção ficou entre 89 e 90%, respectivamente. Analisando a cinética inicial dos três ensaios, percebe-se que no ensaio de pH 6,6 a degradação de fenol ocorre de forma mais rápida. Os tempos necessários para se atingir as concentrações finais foram de 120, 40 e 40 min para valores de pH de 5,6, 6,6 e 7,6, respectivamente.

6.3 Influência da concentração inicial de substrato fenólico na oxidação enzimática

Foi realizado um ensaio de oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre em meio aquoso para cada uma dos valores concentração inicial de substrato fenólico (50, 100, 200 e 400 ppm). Os resultados de concentração de fenol residual aquoso em cada um desses ensaios estão mostrados na Tabela 12 e os mesmos resultados são apresentados na forma de gráfico na Figura 32.

Tabela 12 - Resultados da oxidação de fenol com tirosinase livre variando-se a concentração inicial de substrato fenólico.

50 ppm		100 ppm		200 ppm		400 ppm	
t (min)	$C_{Fenol,Res}$ (ppm)	t (min)	$C_{Fenol,Res}$ (ppm)	t (min)	$C_{Fenol,Res}$ (ppm)	t (min)	$C_{Fenol,Res}$ (ppm)
0	50	0	100	0	200	0	400
5	39,8	5	48,7	5	128,2	5	-
10	21,6	10	36,1	10	103,7	10	298,3
15	18,8	15	22,5	15	111,3	15	269,9
20	16,7	20	15,7	20	107,1	20	240,7
30	13,5	30	13,3	30	92,4	30	224,3
40	11,9	40	11,7	40	91,9	40	212,3
50	13,1	50	12,3	50	78,4	50	197,1
60	13,6	60	13,3	60	92,4	60	197,7
80	14,3	80	11,8	80	87,1	80	190,2
100	14,1	100	10,3	100	76,1	100	188,4
120	14,0	120	-	120	73,4	120	189,1
150	13,8	150	-	145	65,3	150	189,8
180	13,5	180	-	180	61,1	180	-
210	13,1	210	-	210	-	210	-

Figura 32 - Demonstração da influência da concentração inicial de fenol na degradação enzimática com tirosinase.

Os resultados indicam que o ensaio com concentração inicial de 100 ppm com degradação de 89,7% foi o mais eficiente entre os quatro ensaios. No ensaio com concentração inicial de 50 ppm, no qual esperava-se a mais baixa concentração final de fenol entre os quatro ensaios, a concentração final de fenol foi de 13,1 ppm, maior em relação ao valor de 10,3 ppm obtido no ensaio com concentração inicial de 100 ppm. Além disso, apresentou apenas 73,8% de eficiência de degradação de fenol.

Os ensaios com concentrações inicial de 200 e 400 ppm apresentaram eficiências de degradação de fenol de 69 e 52%, respectivamente. Com o aumento da concentração inicial para 200 e 400 ppm, a fração de fenol residual final cresce, provavelmente, devido ao bloqueio que as moléculas de fenol oferecem à saída das quinonas formadas próximo aos sítios ativos.

6.4 Análise da reprodutibilidade da oxidação de fenol pela tirosinase

A análise da reprodutibilidade foi feita através de ensaios de oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre em béquer com volume de solução de substrato de 50ml e ensaios em vaso agitado com volume de 500ml, ambos com temperatura fixada em 45°C, $pH = 6,6$ e concentração enzimática de 50 U/ml. Os resultados para verificação da reprodutibilidade dos ensaios em béquer estão mostrados na Tabela 13 e Figura 33 e os ensaios realizados em vaso agitado estão mostrados na Tabela 14 e Figura 34.

Os gráficos das Figuras 33 e 34 mostra uma excelente concordância dos resultados obtidos em béquer e no vaso agitado. Após os 40 min de ensaio os resultados são coincidentes e o valor de $C_{Fenol, Res}$ de cerca de 10 ppm ou 90% de remoção de fenol. Observa-se que tanto nos ensaios feitos em béquer como os realizados em vaso agitado, ocorreu a reprodutibilidade dos ensaios. Porém, o comportamento cinético inicial entre os dois processos, é diferente. No vaso agitado, devido à melhor mistura e homogeneização do meio, a degradação de fenol nos primeiros minutos ocorre de forma mais rápida do que no béquer.

Tabela 13 - Resultados dos ensaios de oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre em béquer (V=50ml, 45°C, pH=6.6).

Tempo t (min)	Ensaio 1 $C_{\text{Fenol, Res}} \text{ (ppm)}$	Ensaio 2 $C_{\text{Fenol, Res}} \text{ (ppm)}$	Ensaio 3 $C_{\text{Fenol, Res}} \text{ (ppm)}$
0	100	100	100
5	90,5	88	85,6
10	60,4	59,3	59,3
15	44,2	43,5	43,5
20	37,3	33,5	36,6
25	28,9	28,2	28,4
30	23,8	21,9	22,4
35	18,2	17,1	17,5
40	12,6	12,9	11,3
45	12,6	13,5	11,3
50	13,1	12,8	12,6
55	12,2	13,5	13,5
60	11,9	12,6	14,8
70	11,9	12,9	11,9

Figura 33 - Resultados demonstrando a reprodutibilidade da oxidação de fenol pela tirosinase em béquer agitado.

Tabela 14 - Resultados dos ensaios de oxidação enzimática de fenol com tirosinase livre no reator enzimático ($V=400\text{ml}$, 45°C , $\text{pH}=6.6$).

Tempo t (min)	Ensaio 1 $C_{\text{Fenol, Res}} \text{ (ppm)}$	Ensaio 2 $C_{\text{Fenol, Res}} \text{ (ppm)}$	Ensaio 3 $C_{\text{Fenol, Res}} \text{ (ppm)}$	Ensaio 4 $C_{\text{Fenol, Res}} \text{ (ppm)}$
0	100,0	100,0	100,0	100,0
5	57,7	58,0	53,1	58,8
10	46,8	40,2	38,4	43,9
15	29,8	26,5	27,8	-
20	23,5	19,4	21,5	-
30	15,8	12,4	12,4	-
40	13,9	9,6	11,1	16,5
50	11,9	9,4	10,6	14,3
60	14,1	7,6	9,3	11,3
80	14,6	10,0	9,1	11,2
100	13,5	9,5	8,1	13,4
120	10,0	10,8	6,6	10,6

Figura 34 - Resultados demonstrando a reprodutibilidade da oxidação de fenol pela tirosinase no reator enzimático.

A Figura 35 mostra o reator com a solução de fenol antes do início do ensaio de oxidação enzimática e a Figura 36 mostra o reator após o ensaio de oxidação. Percebe-se o escurecimento da solução fenólica devido a formação e polimerização das quinonas.

Figura 35- Fotografias ("a" e "b") dos reatores com a solução de fenol antes do ensaio de oxidação.

Figura 36 - Fotografias ("a" e "b") dos reatores com a solução de fenol oxidada após o ensaio de oxidação.

6.5 Degradação de fenol com tirosinase imobilizada em esferas e micropartículas de quitosana em béquer agitado

A seguir, na Tabelas 15 e no gráfico da Figura 37 são apresentados os resultados da remoção de fenol de soluções aquosas promovidas pela enzima tirosinase imobilizada em esferas e micropartículas de quitosana. Estes ensaios foram realizados em béquer, válidos como ensaios preliminares para verificar a resistência mecânica dos suportes de quitosana em agitações severas. Ambos os suportes não foram utilizados nos ensaios de oxidação de fenóis em reator enzimático, pois desintegravam-se facilmente e não era possível reutilizá-los em ensaios posteriores. Porém, os resultados serão apresentados, pois ambos os suportes apresentaram boas eficiências de degradação de fenol mesmo possuindo uma quantidade menor de tirosinase.

Tabela 15 - Degradação de fenol com tirosinase imobilizada em esferas e micropartículas de quitosana em béquer agitado.

Micropartículas		Esferas	
TEMPO (min)	Concentração (ppm)	TEMPO (min)	Concentração (ppm)
0	100	0	100
30	29,2	20	64
50	21,8	40	58,6
70	20	60	54,9
90	17,1	80	49,6
110	14,8	100	49,3
130	15,8	120	45,6
150	15,2	140	42,7
170	13,2	160	33,3

Figura 37 - Oxidação de fenol com tirosinase imobilizada em esferas e micropartículas de quitosana.

As eficiências de degradação de fenol nos ensaio de oxidação com tirosinase imobilizada em micropartículas e esferas de quitosana foram de 86,8% e 66,7%, respectivamente. Nesses ensaios foi utilizado uma quantidade menor de enzima do que a utilizada nos ensaios com flocos de quitosana que serão abordados posteriormente. A concentração enzimática nesses ensaios foi de 23 U/ml e, por isso, as eficiências de remoção de fenol foi menor do que nos

ensaios com flocos de quitosana. O ensaio com micropartículas é mais eficiente do que as esferas de quitosana devido a maior superfície de contato que as micropartículas possuem em relação as esferas de quitosana.

Embora os suportes utilizados nesse ensaios não pudessem ser reaproveitados nos equipamentos propostos neste trabalho, os mesmos poderão ser estudados em projetos futuros que visem a decantação desses suportes. Após os ensaios, ambos os suportes sedimentavam em tempo médio de 30 minutos.

6.6 Atividade enzimática

Foi realizado um ensaio de imobilização enzimática para cada um dos compostos fenólicos estudados nos ensaios de oxidação, exceto para o 4-nitrofenol, um composto que, de acordo com os resultados dos ensaios preliminares, não é passível de ser oxidado pela enzima tirosinase. Os resultados dos ensaios de imobilização enzimática foram semelhantes, sendo que o coeficiente de imobilização enzimática ficou em torno de 0,7 (70%). A seguir, o resultado de uma análise da atividade enzimática inicial e final é mostrado na Tabela 16 e em forma de gráficos nas Figuras 38 e 39.

Tabela 16 - Resultados da análise de atividade enzimática inicial e final no ensaio de imobilização.

Atividade Enzimática Inicial		Atividade Enzimática Final	
<i>Tempo (min)</i>	<i>ABS (280 nm)</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>ABS (280 nm)</i>
0	0,0322	0	0,0329
1	<u>0,1098</u>	1	<u>0,0977</u>
2	<u>0,3397</u>	2	<u>0,1509</u>
3	0,4527	3	<u>0,2281</u>
4	0,4881	4	<u>0,2892</u>
5	0,4993	5	<u>0,3383</u>
6	0,5012	6	0,3629
7	0,4998	7	0,3753
8	0,5021	8	0,3894
9	0,5020	9	0,3902
10	0,5019	10	0,3911
-	-	11	0,3909
-	-	12	0,3912

Figura 38 - Determinação da atividade enzimática inicial.

Na análise de atividade enzimática inicial do ensaio de imobilização representado pela Tabela 16 e pela Figura 38, o intervalo entre o primeiro e o segundo minuto das leituras espectrofotométricas, com os respectivos valores de absorbância de 0,11 e 0,34, corresponde ao momento onde a enzima obteve o máximo de sua atividade. Percebe-se que os pontos restantes não formam uma faixa linear com este período de maior atividade da enzima. Neste minuto específico, a absorbância aumentou em 0,23. Como abordado anteriormente, nas condições especificadas pela metodologia de Worthington, uma unidade da enzima tirosinase causa a mudança da absorbância equivalente a 0,001 por minuto na solução de l-tirosina com concentração estabelecida pela metodologia. Portanto, o fator de transformação da absorbância deste método é 1000. O valor de 0,23 foi a quantidade de absorbância alterada pela reação da enzima tirosinase com a solução de l-tirosina durante o exato instante no qual a enzima obteve o máximo de sua atividade. Este valor multiplicado por 1000 (fator de transformação de absorbância) é equivalente a 230 – valor dentro dos padrões do método de Worthington. O valor de 230 corresponde às unidades de atividade enzimática (U) presente em 0,1 ml de uma amostra que, por sua vez, fazia parte da solução enzimática com o volume total de 50 ml. Este valor multiplicado por 500 – fator que transforma a atividade contida em 0,1 ml para 50 ml – é equivalente a 115.000 U. Portanto, a solução enzimática

inicial de 50 ml antes da adição dos flocos de quitosana era de aproximadamente 115.000 U.

Figura 39 - Determinação da atividade enzimática final.

Na análise da atividade final deste ensaio de imobilização, o intervalo correspondente entre o primeiro e o quinto minuto das análises espectrofotométrica, representado no gráfico da Figura 39, foi o instante no qual a enzima obteve o máximo de atividade e os valores de absorbância foram lineares. Neste período específico, a absorbância aumentou em média 0,06 de ponto para ponto. Aplicando-se os fatores de transformação deste valor para o volume de 50 ml, chegaremos ao valor de 30.000 U. Portanto, subtraindo 30.000 U de 115.000 U, podemos inferir que a quantidade de enzima imobilizada nos flocos de quitosana correspondia a um atividade enzimática de 85.000 U.

Os flocos de quitosana com atividade enzimática de 85.000 U foram pesados em balança analítica e divididos em três porções de quantidades distintas, sendo as massas de cada uma equivalente a 16.000, 24.000 e 32.000 U. Essas porções foram utilizadas nos ensaios de oxidação de fenóis em vaso agitado com volume aquoso total de 400 ml. Dessa forma, a concentração enzimática nesses ensaios foram respectivamente de 40, 60 e 80 U/ml.

6.7 Degradação das soluções fenólicas com tirosinase imobilizada em membrana de quitosana

A seguir, são apresentados os resultados da remoção de fenol, 4-clorofenol e 4-cresol de soluções aquosas promovidas pela enzima tirosinase imobilizada em flocos de quitosana. Os flocos de quitosana apresentavam razoável resistência à agitação mecânica e por isso foram utilizados nos ensaios de oxidação fenólica em vaso agitado. Para cada composto fenólico, com exceção do 4-nitrofenol, foi realizado um ensaio de oxidação para cada um dos valores de concentração enzimática estudada neste trabalho (40, 60 e 80 U/ml) e um ensaio subsequente de reutilização dos flocos de quitosana.

6.7.1 Oxidação enzimática de fenol

Oxidação enzimática de fenol (CE = 40 U/ml)

As Tabelas 17 e 18 mostram, respectivamente, os resultados do ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e o ensaio subsequente de reutilização dos flocos de quitosana. A Figura 40 representa os mesmos resultados na forma de gráfico.

Tabela 17 - Resultados do ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

OXIDAÇÃO DE FENOL (CE = 40 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	1,1605	100
2	5	0,8593	74,7
3	10	0,6726	59,1
4	15	0,5672	50,2
5	20	0,4622	41,4
6	30	0,3443	31,5
7	40	0,2605	24,4
8	50	0,2157	20,7
9	60	0,1984	19,2
10	80	0,1896	18,5
11	100	0,1785	17,5
12	120	0,1782	17,5

Tabela 18 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

OXIDAÇÃO DE FENOL - Reutilização (CE = 40 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	1,1251	100
2	5	0,9238	81,5
3	10	0,8652	76,6
4	15	0,8176	72,5
5	20	0,7498	66,8
6	30	0,6905	61,7
7	40	0,6271	56,3
8	50	0,5996	54,0
9	60	0,5843	52,7
10	80	0,5783	52,2
11	100	0,5636	50,1
12	120	0,5611	50,7

Figura 40 - Oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

As eficiências de oxidação nos ensaios de oxidação de fenol (CE = 40 U/ml) e no ensaio de reutilização da quitosana foram de 80,5% e 49%, respectivamente. Podemos observar que os flocos de quitosana reutilizados ainda apresentaram atividade na degradação do fenol, embora a eficiência de oxidação nesse ensaio fosse inferior ao do ensaio anterior.

Ainda que os valores da concentração de fenol residual final do primeiro e do segundo ensaio sejam diferentes, ambos atingiram os níveis de concentração final de fenol aproximadamente aos 40 minutos. Ao final do segundo ensaio de oxidação, mesmo utilizando os flocos resistentes no vaso agitado, os mesmos já estavam frágeis à agitação, indicando que a velocidade de agitação de 500 rpm consistiu em um nível de agitação extremo de resistência mecânica dos flocos de quitosana.

Oxidação enzimática de fenol (CE = 60 U/ml)

As Tabelas 19 e 20 mostram os resultados do ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada e o ensaio subsequente de reutilização dos flocos de quitosana. Os mesmos resultados são apresentados na forma de gráfico na Figura 41.

Tabela 19 - Resultados do ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

OXIDAÇÃO DE FENOL (CE = 60 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	1,1492	100
2	5	0,6991	62,5
3	10	0,5021	45,8
4	15	0,3142	29,8
5	20	0,2378	23,3
6	30	0,1619	16,9
7	40	0,1262	13,9
8	50	0,1053	12,1
9	60	0,1014	11,7
10	80	0,1035	11,9
11	100	0,1036	11,9
12	120	0,0985	11,5

Tabela 20 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

OXIDAÇÃO DE FENOL - Reutilização (CE = 60 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	1,1451	100
2	5	0,8733	77,3
3	10	0,7931	70,5
4	15	0,7442	66,3
5	20	0,7078	63,2
6	30	0,6519	58,5
7	40	0,6265	56,3
8	50	0,5811	52,4
9	60	0,5617	50,8
10	80	0,5553	50,2
11	100	0,5476	49,6
12	120	0,5382	48,8

Figura 41 - Gráfico da oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

Na faixa da concentração enzimática de 60 U/ml a concentração residual de fenol no primeiro ensaio diminui em torno de 88% e no ensaio de reutilização dos flocos de quitosana a remoção foi de aproximadamente 51%. Assim como do ensaio de CE = 40 U/ml, a eficiência de oxidação de fenol no ensaio subsequente de reutilização da enzima foi muito menor.

Oxidação enzimática de fenol (CE = 80 U/ml)

Os resultados dos ensaios de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml) são mostrados nas Tabelas 21 e 22 e no gráfico da Figura 42.

Tabela 21 - Resultados do ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

OXIDAÇÃO DE FENOL (CE = 80 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	1,0523	100
2	5	0,5386	53,2
3	10	0,3918	39,8
4	15	0,2747	29,1
5	20	0,1981	22,1
6	30	0,1322	16,1
7	40	0,0859	11,9
8	50	0,0645	9,9
9	60	0,0580	9,3
10	80	0,0429	7,9
11	100	0,0457	8,2
12	120	0,0412	7,8

Tabela 22 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

OXIDAÇÃO DE FENOL - Reutilização (CE = 80 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	1,1311	100
2	5	0,8432	76,3
3	10	0,7535	68,7
4	15	0,7044	64,5
5	20	0,6581	60,6
6	30	0,6020	55,8
7	40	0,5268	49,4
8	50	0,5013	47,3
9	60	0,4924	46,5
10	80	0,4748	45,0
11	100	0,4765	45,2
12	120	0,4702	44,6

Figura 42 - Gráfico da oxidação de fenol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

Nos ensaios com concentração enzimática de 80 U/ml a concentração residual de fenol foi reduzida em torno de 93%, enquanto que no ensaio de reutilização dos flocos de quitosana a remoção foi de aproximadamente 55%. A eficiência foi muito menor em todos os ensaios de reutilização de tirosinase. É muito provável que as quinonas adsorvidas pelos flocos de quitosana tenha também inativado as enzimas imobilizadas. Ilustrativamente estão mostrados na Figura 43 flocos de quitosana contendo tirosinase imobilizada e quinonas (semelhantes à melanina) adsorvidas, que conferiram a cor escura aos flocos.

Figura 43 - Flocos de quitosana com quinonas adsorvidas após os ensaios de oxidação de fenol.

Comparação da oxidação de fenol para diferentes valores de concentração enzimática

Figura 44 - Resultados comparativos da oxidação enzimática do fenol com tirosinase imobilizada.

As eficiências de degradação de fenol nos ensaios de oxidação para os valores de concentração enzimática de 40, 60 e 80 U/ml foram de 82,5%, 88,5% e 92,2%, respectivamente. Ainda que os valores da concentração de fenol residual final dos três ensaios sejam diferentes, os mesmos atingiram os valores de concentração final aproximadamente aos 60 minutos. Percebe-se também que a taxa de degradação de fenol nos ensaios com concentração enzimática de 60 e 80 U/ml são semelhantes, evidenciando que o aumento da concentração enzimática nessa faixa de valor não aumenta significativamente a taxa de degradação de fenol.

6.7.2 Oxidação Enzimática de 4-clorofenol

Oxidação enzimática de 4-clorofenol (CE = 40 U/ml)

A seguir, nas Tabelas 23 e 24 e no gráfico da Figura 45 são mostrados os resultados dos ensaios envolvendo a oxidação do 4-clorofenol (CE = 40 U/ml).

Tabela 23 - Resultados do ensaio de oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL (CE = 40 U/ml)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,2271	100
2	5	0,1845	78,7
3	10	0,1542	62,7
4	15	0,1326	51,3
5	20	0,1197	44,6
6	30	0,1016	35,0
7	40	0,0947	31,4
8	60	0,0821	24,8
9	80	0,0825	25,0
10	120	0,0768	21,1
11	140	0,0743	20,7
12	160	0,0729	19,9
13	200	0,0747	20,89

Tabela 24 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL - Reutilização (CE = 40 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,2522	100
2	5	0,2258	88,7
3	10	0,2144	83,8
4	15	0,2054	79,9
5	20	0,1981	76,7
6	30	0,1923	74,2
7	40	0,1836	70,4
8	60	0,1799	68,8
9	80	0,1724	65,5
10	120	0,1651	62,4
11	140	0,1643	62,0
12	160	0,1669	63,1
13	200	0,1655	62,5

Figura 45 - Oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

A concentração residual de 4-clorofenol ao final do primeiro ensaio de oxidação enzimática (CE = 40 U/ml) foi reduzida cerca de 79%, enquanto que no ensaio posterior de reutilização dos flocos de quitosana a concentração de 4-clorofenol diminui aproximadamente 37%. Ambos os ensaios atingiram os valores finais de concentração fenólica por volta de 60 minutos. Assim como nos ensaios de fenol, a reutilização da enzima nos ensaios de 4-clorofenol (CE = 40 U/ml) apresentou uma baixa eficiência em relação ao primeiro ensaio de oxidação.

Oxidação enzimática de 4-clorofenol (CE = 60 U/ml)

Nas Tabelas 25 e 26 e no gráfico da Figura 46 são mostrados os resultados dos ensaios de oxidação enzimática de 4-clorofenol (CE = 60 U/ml).

Tabela 25 - Resultados do ensaio de oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL (CE = 60 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,2257	100
2	5	0,1752	75,0
3	10	0,1459	60,3
4	15	0,1163	45,5
5	20	0,1049	39,8
6	30	0,0891	31,9
7	40	0,0765	25,6
8	60	0,0697	22,2
9	80	0,0617	18,2
10	120	0,0612	18,0
11	140	0,0589	16,8
12	160	0,0571	15,9
13	200	0,0578	16,3

Tabela 26 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL - Reutilização (CE = 60 U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,2167	100
2	5	0,1866	85,0
3	10	0,1797	81,2
4	15	0,1697	75,6
5	20	0,1612	70,9
6	30	0,1551	67,5
7	40	0,1497	64,5
8	60	0,1443	61,5
9	80	0,1385	58,3
10	120	0,1353	56,5
11	140	0,1318	54,6
12	160	0,1339	55,8
13	200	0,1345	56,1

Figura 46 - Gráfico da oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

Nos ensaios de oxidação enzimática de 4-clorofenol (CE = 60 U/ml) a concentração residual do primeiro ensaio foi reduzida em aproximadamente 83%. No ensaio subsequente de reutilização da tirosinase a concentração final de fenol foi de 56 ppm (redução de 44%). As concentrações finais de fenol são atingidas por volta de 60 minutos em ambos os ensaios.

Oxidação enzimática de 4-clorofenol (CE = 80 U/ml)

Nas Tabelas 27 e 28 e no gráfico da Figura 47 são mostrados os resultados dos ensaios de oxidação enzimática de 4-clorofenol (CE = 80 U/ml).

Tabela 27 - Resultados do ensaio de oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL (CE = 80U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,2224	100
2	5	0,1665	72,1
3	10	0,1368	57,3
4	15	0,1053	41,5
5	20	0,0912	34,5
6	30	0,0789	28,3
7	40	0,0639	20,8
8	60	0,0527	15,2
9	80	0,0481	12,9
10	120	0,0428	10,3
11	140	0,0434	10,6
12	160	0,0419	9,8
13	200	0,0427	10,2

Tabela 28 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CLOROFENOL - Reutilização (CE = 80U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,2231	100
2	5	0,1912	83,7
3	10	0,1817	78,7
4	15	0,1713	73,2
5	20	0,1625	68,6
6	30	0,1525	63,3
7	40	0,1373	55,4
8	60	0,1291	51,0
9	80	0,1244	48,6
10	120	0,1248	48,8
11	140	0,1257	49,2
12	160	0,1292	51,1
13	200	0,1249	48,8

Figura 47 - Gráfico da oxidação de 4-clorofenol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

No primeiro ensaio de oxidação de 4-clorofenol (CE = 80 U/ml) a concentração residual fenólica foi de 10 ppm. No ensaio de reutilização da quitosana a concentração fenólica ao final do ensaio era de 51 ppm. Portanto, a eficiência de remoção no primeiro ensaio foi de 90%, enquanto que no segundo ensaio a eficiência de remoção caiu para 49%.

Comparação da oxidação de 4-clorofenol para diferentes valores de concentração enzimática

Figura 48 - Gráfico comparativo da remoção de 4-clorofenol para diferentes valores de concentração enzimática da tirosinase imobilizada em quitosana.

As eficiências de degradação de 4-clorofenol nos ensaios com concentração enzimática de 40, 60 e 80 U/ml foram de 79,1%, 83,7% e 90%, respectivamente. Analisando o gráfico da Figura 48, percebe-se a maior eficiência de oxidação nos ensaios com maior concentração enzimática. Porém, esperava-se uma maior eficiência de oxidação para os valores de CE = 60 e 80 U/ml. No entanto, percebe-se que o aumento da concentração enzimática não confere maiores valores de eficiências significativos nos ensaios de oxidação.

A Figura 49 mostra uma amostra de 4-clorofenol antes (a) e após (b) o ensaio de oxidação enzimática. O visível escurecimento é provocado pela formação de quinonas que, por sua vez, causam a oligomerização e a formação do composto escuro. Como visto anteriormente e na revisão bibliográfica, as quinonas estão associadas à inativação das enzimas. Portanto, é possível que a eficiência de 100% de remoção de fenóis pelo tratamento enzimático com tirosinase imobilizada não seja alcançado devido a ação das quinonas que são adsorvidas pela quitosana e inativam a tirosinase imobilizada.

Figura 49 - Fotografias demonstrando uma solução de 4-clorofenol antes do ensaio de oxidação (a) e a mesma solução após o ensaio de oxidação (b).

6.7.3 Oxidação enzimática de 4-cresol

Oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 40 U/ml)

A seguir, nas Tabelas 29 e 30 e no gráfico da Figura 50 são mostrados os resultados dos ensaios de oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 40 U/ml).

Tabela 29 - Resultados do ensaio de oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL (CE = 40U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,0309	100
2	5	0,0249	77,3
3	10	-	-
4	15	0,0207	61,1
5	20	-	-
6	30	0,0192	55,4
7	40	-	-
8	60	-	-
9	80	0,0148	38,4
10	120	0,0117	26,5
11	140	0,0108	23,1
12	160	-	-
13	200	0,0101	20,4

Tabela 30 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL - Reutilização (CE = 40U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,0247	100
2	5	0,0221	87,6
3	10	-	-
4	15	0,0208	81,0
5	20	-	-
6	30	-	-
7	40	0,0187	70,5
8	60	-	-
9	80	0,0168	61,1
10	120	0,0157	55,5
11	140	0,0145	49,4
12	160	0,0161	57,6
13	200	-	-

Figura 50 - Gráfico da oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

Ao final do primeiro ensaio de oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 40 U/ml) a concentração fenólica residual era de aproximadamente 20 ppm, ou

seja, houve uma redução de aproximadamente 79%, enquanto que ao final do segundo ensaio a concentração fenólica foi reduzida em torno de 43%.

As oscilações nos resultados dos ensaios do 4-cresol se devem às dificuldades na aplicação do método analítico. O método baseado na reação de fenol com 4-aminoantipirina na presença de ferricianeto de potássio é um método que apresenta bom desempenho para detectar e quantificar o fenol e o 4-clorofenol. Porém, foi observado que o referido método não é sensível para a determinação do 4-cresol, visto que os dados das concentrações dos ensaios de oxidação foram obtidos a partir de valores de absorbância que variaram pouco. Algumas amostras tiveram que ser descartadas devido ao erro de amostragem ou análise. Entretanto, nos pontos restantes, observou-se claramente que a concentração de 4-cresol diminui gradativamente ao longo do ensaio, indicando que houve sua oxidação pela tirosinase.

Oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 60 U/ml)

Nas Tabelas 31 e 32 são apresentados os resultados da oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 60 U/ml). Os mesmos resultados estão representados na forma de gráfico na Figura 51.

Tabela 31 - Resultados do ensaio de oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL (CE = 60U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,0300	100
2	5	0,0237	76,1
3	10	0,0211	66,1
4	15	-	-
5	20	-	-
6	30	-	-
7	40	0,0127	33,8
8	60	-	-
9	80	-	-
10	120	0,0092	20,4
11	140	-	-
12	160	0,0085	17,7
13	200	0,0096	21,9

Tabela 32 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL - Reutilização (CE = 60U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,0326	100
2	5	0,0294	90,3
3	10	0,0278	85,0
4	15	0,027	82,3
5	20	-	-
6	30	0,0243	73,3
7	40	0,0237	71,3
8	60	0,0227	68,0
9	80	0,0219	65,3
10	120	0,0201	59,3
11	140	-	-
12	160	-	-
13	200	0,0204	60,33

Figura 51 - Gráfico da oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

No primeiro ensaio de oxidação de 4-cresol (CE = 60 U/ml), o valor de eficiência de remoção fenólica foi de aproximadamente 80%. No ensaio seguinte de reutilização da quitosana a eficiência de remoção ficou em torno de

39%. Percebe-se também nos ensaios de 4-cresol a diminuição drástica da eficiência dos ensaios de reutilização da tirosinase em relação ao primeiro ensaio de oxidação.

Oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 80 U/ml)

Os resultados da oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 80 U/ml) são mostrados na Tabela 33 e 34 e no gráfico da Figura 52.

Tabela 33 - Resultados do ensaio de oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL (CE = 80U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,0282	100
2	5	0,0213	72,1
3	10	0,0177	57,1
4	15	0,0151	46,3
5	20	-	-
6	30	-	-
7	40	0,0098	24,2
8	60	-	-
9	80	0,0075	14,6
10	120	0,0068	11,7
11	140	0,0072	13,4
12	160	-	-
13	200	0,0071	12,9

Tabela 34 - Resultados da reutilização dos flocos de quitosana no ensaio de oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

OXIDAÇÃO DE 4-CRESOL - Reutilização (CE = 80U/mL)			
AMOSTRA	TEMPO (min)	ABS (510 nm)	CONCENTRAÇÃO (ppm)
1	0	0,0331	100
2	5	0,0287	85,6
3	10	0,0243	71,0
4	15	-	-
5	20	0,0221	63,5
6	30	0,0182	50,6
7	40	-	-
8	60	0,0171	47,0
9	80	0,0373	114,3
10	120	0,0179	49,5
11	140	0,0168	46,0
12	160	-	-
13	200	0,0174	48,0

Figura 52 - Gráfico da oxidação de 4-cresol com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

Nos ensaios de oxidação enzimática de 4-cresol (CE = 80 U/ml), os valores da eficiência de remoção do primeiro e do segundo ensaio foram de aproximadamente 87% e 52%, respectivamente.

Comparação da oxidação de 4-cresol nas diferentes faixas de concentração enzimática

Figura 53 - Gráfico comparativo da remoção de 4-cresol em diferentes faixas de concentração enzimática da tirosinase imobilizada em quitosana.

As eficiências de degradação de 4-cresol foram de 79%, 80% e 87% nos ensaios com concentração enzimática de 40, 60 e 80 U/ml, respectivamente. A Figura 54 mostra o escurecimento de uma amostra de 4-cresol devido a formação de quinonas promovidos pela oxidação do promovida pela tirosinase. Ao contrário dos ensaios de oxidação de fenol e 4-clorofenol, nos quais o meio aquoso tornava-se escuro após a oxidação da tirosinase, no ensaio de 4-cresol o meio aquoso apresentou uma coloração marrom.

Figura 54 - Amostra de uma solução de 4-cresol no decorrer do ensaio de oxidação enzimática com tirosinase.

6.7.4 Oxidação enzimática de 4-nitrofenol

Nos ensaios com o 4-nitrofenol, tanto com a enzima livre em meio aquoso como imobilizada em quitosana, a tirosinase não foi eficiente na oxidação deste composto. A concentração do 4-nitrofenol não se alterou no decorrer dos ensaios, evidenciando, desta forma, alguma incompatibilidade da enzima com o 4-nitrofenol.

Com vistas a manter a pesquisa bibliográfica sobre o assunto deste projeto de pesquisa atualizado e também, sempre que possível, complementado, buscou-se na literatura por trabalhos que dessem melhor embasamento teórico e experimental, além de buscar informações que pudessem redundar no aprofundamento e ampliação dos temas propostos neste estudo. Atualmente na literatura, não existe nenhum trabalho que relacione efetivamente a oxidação do 4-nitrofenol por alguma enzima polifenol oxidase, como por exemplo, a tirosinase. Pelo contrário, de acordo com **Teramoto *et al.* (2004)**, o grupamento Nitro da molécula de 4-nitrofenol é um forte receptor de elétrons fazendo com que o potencial redox da molécula seja muito alto. Dessa forma, é praticamente impossível que ocorra a oxidação enzimática do 4-nitrofenol pela tirosinase. O grupo nitro do 4-nitrofenol não permite que ocorra a hidroxilação do mesmo, uma das etapas fundamentais da oxidação de fenóis. **Armand *et al.* (2004)** estudaram a interação entre os átomos de cobre da enzima tirosinase e um substrato composto de 4-nitrofenol, por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, com o objetivo de elucidar a atividade hidroxilase da enzima. Nesse estudo, o 4-nitrofenol foi utilizado como um inibidor da enzima tirosinase.

6.8 Comparação da remoção dos compostos fenólicos pela tirosinase imobilizada em quitosana

A seguir, são apresentados os gráficos comparativos da oxidação enzimática de fenol, 4-clorofenol e 4-cresol pela tirosinase imobilizada em quitosana para os três valores de concentração enzimática analisados neste estudo (40, 60 e 80 U/ml).

Comparação da oxidação de fenóis com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml)

Figura 55 - Comparação da remoção de fenóis através da oxidação enzimática com tirosinase imobilizada (CE = 40 U/ml).

As eficiências de degradação de fenol, 4-clorofenol e 4-cresol nos ensaios de oxidação (CE = 40 U/ml) foram de 80,5%, 79,1% e 79,6%, respectivamente. Os valores de eficiências são semelhantes, no entanto, a degradação de fenol e 4-clorofenol ocorre de forma mais rápida. Podemos observar que o comportamento cinético inicial nos ensaios de fenol, 4-clorofenol e 4-cresol são semelhantes, porém, em todos os pontos o ensaio de fenol foi mais eficiente em relação ao 4-clorofenol e 4-cresol. O fenol e 4-

clorofenol atingem a concentração final por volta de 60 minutos de ensaio, enquanto o 4-cresol atinge a concentração final por volta de 130 min de ensaio.

Comparação da oxidação de fenóis com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml)

Figura 56 - Gráfico comparativo da remoção de fenóis através da oxidação enzimática com tirosinase imobilizada (CE = 60 U/ml).

Nos ensaios de oxidação (CE = 60 U/ml), os valores da eficiência de degradação do fenol, 4-clorofenol e 4-cresol foram, respectivamente, de 88,5%, 83,7% e 82,3%. O ensaio de fenol apresentou novamente uma eficiência de remoção maior entre os três ensaios. Os ensaios de 4-clorofenol e 4-cresol apresentaram novamente um índice de eficiência semelhante. É possível observar no gráfico da Figura 56 que a degradação de fenol ocorre de forma mais rápida em relação ao 4-clorofenol e 4-cresol.

Comparação da oxidação de fenóis com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml)

Figura 57 - Gráfico comparativo da remoção de fenóis através da oxidação enzimática com tirosinase imobilizada (CE = 80 U/ml).

Os ensaios de oxidação enzimática (CE = 80 U/ml) do fenol, 4-clorofenol e 4-cresol apresentaram eficiências de degradação fenólica de 92,2%, 90% e 87,1%. Percebe-se mais uma vez a maior eficiência e maior velocidade de oxidação do ensaio com fenol. Embora a diferença das eficiências entre os ensaios dos três compostos fenólicos nos três valores de concentração enzimática seja baixa, a tirosinase mostrou ser mais eficiente na degradação do fenol em todos os ensaios realizados comparativamente com o 4-clorofenol e 4-cresol.

7 CONCLUSÕES

A tirosinase imobilizada em quitosana foi eficiente na degradação de fenol, 4-clorofenol e 4-cresol em soluções aquosas em vaso agitado, com eficiências remoção superiores a 85%. O processo mostrou ser rápido e reproduzível. Porém, a tirosinase não foi eficiente na degradação do 4-

nitrofenol. Além disso, tecnologicamente, o estudo precisa ser aprimorado, pois a enzima é um produto caro, o processo de confecção de quitosana e imobilização enzimática são demorados e, no entanto, a reutilização da enzima imobilizada não manteve a alta eficiência dos primeiros ensaios.

A tirosinase possui maior eficiência em degradar o fenol, pois este não possui nenhuma substituição em seu anel aromático. O efeito dos substituintes do anel aromático do fenol exerce influência direta na atividade da enzima durante as reações de oxidação da tirosinase. Por isso, todos os ensaios com 4-clorofenol e 4-cresol apresentaram eficiências de degradação fenólica menores.

Os ensaios de oxidação de fenol realizados previamente aos ensaios com enzima imobilizada em flocos de quitosana mostraram que a enzima tirosinase possui maior atividade enzimática na temperatura de 45°C e *ph* na faixa de 6,6 e 7,6. Os ensaios mostraram ser reprodutíveis, tanto em béquer como em vaso agitado.

O aumento da concentração enzimática não aumenta significativamente a eficiência de degradação dos fenóis. O processo pode não ser tecnologicamente aplicável como tratamento único de efluentes fenólicos, pois não foi alcançado nenhum índice de remoção de fenol maior que 93% e, portanto, não é útil para alcançar os níveis rígidos das legislações. Porém, o processo de tratamento enzimático pode ser aplicado como um tratamento intermediário de efluentes fenólicos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO, W.S.; BRASILEIRO, D.D.; GONÇALVES, L.R.B. Influência da concentração de glutaraldeído no estudo da imobilização de penicilina G acilase em quitosana. **XIV SINA Ferm Simpósio Nacional de Fermentações**, 2003, Florianópolis. **Anais do XIV SINA Ferm**, 2003.
- ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, **Trends in Biotechnology**, v.24, n.6, 2006.
- ASSIS, O.B.G.; ALVES, H. C. Metodologia mínima para a produção de filmes comestíveis de quitosana e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas, **Comunicado técnico n. 49 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, ISSN 1517-4786, 2002.
- AITKEN, M. D.; MASSEY, J.; CHEN, T.; HECK, P. E. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants, **Water Science and Technology**, v.28, p.879-1889, 1994.
- ANVISA. Portaria nº 176/MS/SNVS, 1996
<http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/176_96.htm>. Acesso em: 12 Jan 2011.
- ARMAND, W. J. W.; TEPPER, L. B.; CANTERS, G. W. Interaction between the type-3 copper protein tyrosinase and the substrate analogue p-nitrophenol studied by NMR, **Journal of the American Chemical Society**, v.127 (2), p.567–575, 2005.
- ATLOW, S. T.; BONADONNA-APARO, L.; KILBANOV, A. M. Dephenolization of industrial wastewater catalyzed by polyphenol oxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p. 599-603, 1984.
- BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Enzymatic removal of phenol and *p*-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads, **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, p. 148–155, 2008.

- BEVILAQUA J. V.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D.; SANT'ANNA G. L. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, no.2, 2002.
- BUSCA, G.; BERARDINELLI, S.; RESINI, C.; ARRIGHI, L. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments, **Journal of Hazardous Materials**, v. 160, p. 265–288, 2008.
- CAMPBELL, W. H.
<<http://www.bio.mtu.edu/campbell/bl482/lectures/lec2/482ex2a.htm>>, Acesso em 12 Out 2008.
- DAY JUNIOR, J. W.; HALL, C. A.; YÁÑEZ-ARANCIBIA, A.; PIMENTEL, D.; MARTÍ, C. I.; MITSCH, W. J. Ecology in Times of Scarcity, **BioScience**, v. 59(4), p. 321-331, 2009.
- DESANTIS, G.; ZHU, Z.; GREENBERG, W. A.; WONG, K.; CHAPLIN, J.; HANSON, S. R.; FARWELL, B.; NICHOLSON, L. W.; RAND, C. L.; WEINER, D. P.; ROBERTSON, D. E.; BURK, M. J.; An enzyme library approach to biocatalysis: development of nitrilases for enantioselective production of carboxylic acid derivatives, **Journal of the American Chemical Society**, v. 124 (31), p. 9024-9025, 2002.
- DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, **Applied Catalysis B: Environmental**, v.28, P.83-99, 2000.
- DURÁN, N. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, **Itália Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907–931, 2002.
- DUTTA, P. K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, **Food Chemistry**, v. 114, p.1173–1182, 2009.
- EDWARDS, W.; LEUKES, W.D.; ROSE, P.D.; BURTON, S.G. Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation, **Enzyme and Microbial Technology**, v.25, p.769-773, 1999.

- EL-SHORA, H. M.; METWALLY, M. Use of Tyrosinase from *Bacillus thuringiensis* for the decontamination of water polluted with phenols, **Asian Network for Scientific Information**, Biotechnology 7, p. 305-310, 2008.
- FRANCIS SUH, J. K.; HOWARD, M. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, **Biomaterials**, v. 21, p. 2589-2598, 2000.
- GARCIA-MOLINA F.; MUNOZ, J. L.; GARCIA-RUIZ, P.A.; RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N.; GARCIA-CANOVAS, F.; TUDELA, J. A further step in the kinetic characterisation of the tyrosinase enzymatic system, **Journal of Mathematical Chemistry**, v. 41, p. 393–406, 2006.
- 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.
- GIANFREDA, L.; BOLLAG, J. M. Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: Burns, R. G.; Dick, R. P.; 'Enzymes in the environment: Activity, ecology, and applications'. **Marcel Dekker**, p. 495-538, 2002.
- IKEHATA, K.; NICELL, J.A. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols, **Bioresource Technology**, v. 74, p. 191-199, 2000.
- KAMEDA, E.; LANGONE, M. A. P.; COELHO, M. A. Z. Tyrosinase Extract from *Agaricus bisporus* Mushroom and its in Natura Tissue for Specific Phenol Removal, **Environmental Technology**, v.27, p.1209-1215, 2006.
- KARGI, F.; KONYA, I. COD, para-chlorophenol and toxicity removal from para-chlorophenol containing synthetic wastewater in an activated sludge unit, **Journal of Hazardous Materials**, v.132, I. 2-3, p. 226-231, 2006.
- KOCHANA, J.; GALA, A.; PARCZEWSKI, A.; ADAMSKI, J. Titania sol-gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391(4), p.1275-81, 2008.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126–139, 2004.

- KUMAR, S.; SINGH, R. K.; KUMAR, A. Biodegradation kinetic studies for the removal of p-cresol from wastewater using *Gliomastix indicus* MTCC 3869, **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, i. 2, p. 293-303, 2008.
- MARROT, B.; BARRIOS-MARTINEZ, A.; ROCHE, P. M. N. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor, **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, p. 174–183, 2006.
- MOLINA, D.L.; HINER, A.N.P.; TUDELA, J.; CANOVAS, F.G.; LOPEZ, J.N.R. Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (*cynara scolymus* L.) extracts, **Enzyme and Microbial technology**, v. 33, p. 738-742, 2003.
- MORINAGA, Y., FUKE, C., ARAO, T., MIYAZAKI, T. Quantitative analysis of cresol and its metabolites in biological materials and distribution in rats after oral administration, **Legal Medicine**, V. 6, p. 32–40. 2004.
- NEUFELD, R. D.; PALADINO, S. B. Comparison of 4-aminoantipyrine and gas liquid chromatography techniques for analysis of phenolic compounds, **Journal Water Pollution Control Federation**, v.57, Number 10, p.1040-1044, 1985.
- NICELL, J. M. Enzymatic Treatment of Waters and Wastes, **Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants**, c. 10, p. 2003.
- PETROUTSOS, D.; WANG, J.; KATAPODIS, P.; KEKOS, D.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Toxicity and metabolism of p-chlorophenol in the marine microalga *Tetraselmis marina*, **Aquatic Toxicology**, v. 85, i. 3, p. 192-201, 2007.
- POWELL, K. A.; RAMER, S. W.; DEL CARDAYRÉ, S. B.; STEMMER, W. P. C.; TOBIN, M. B.; LONGCHAMP, P. F.; HUISMAN, G. W. Directed Evolution and Biocatalysis, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, i. 21, 2001.
- RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications, **Progress in Polymer Science**, v. 31, Issue 7, p. 603-632, 2006.
- RORRER, G. L.; HSIEN, T. Y.; WAY, J D. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from waste water, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32 p. 2170–2178, 1993.

- SAITOH, T.; SUGIURA, Y.; ASANO, K.; HIRAIDE, M. Chitosan-conjugated thermo-responsive polymer for the rapid removal of phenol in water, **Reactive and Functional Polymers**, v. 69, p. 792–796, 2009.
- SÁNCHEZ, O. F.; GAITAN, I. J.; MEDINA, S. C.; GONZÁLEZ, J. C.; RODRÍGUEZ, A.; ESPEJO, A. J.; OSMA, J. F.; SARRIA, V.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J. Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by *Trametes pubescens*, **Bioresource Technology**, v. 102, i. 3, p. 3632–3635, 2011.
- 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.
- STEWART, J. D. Dehydrogenases and Transaminases in Asymmetric Synthesis, **ChemInform**, v. 32, i. 43, 2001.
- 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.
- TAMURA, A.; SATOH, E.; KASHIWADA, A.; MATSUDA, K.; YAMADA, K. Removal of Alkylphenols by the Combined Use of Tyrosinase Immobilized on Ion-Exchange Resins and Chitosan Beads, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 115, p. 137–145, 2010.
- TERAMOTO, H.; TANAKA, H.; WARIISHI, H. Degradation of 4-nitrophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 3, p. 312–317, 2004.
- VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview, **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 338–344, 2002.
- ZHANG, Y.; HU, X.; TANG, K.; ZOU, G. Immobilization of hemoglobin on chitosan films as mimetic peroxidase, **Process Biochemistry**, v.41, p. 2410–2416, 2006.
- WADA, S.; ICHIKAWA, K.; TATSUMI, K. Removal of phenols from wastewater by soluble and immobilized tyrosinase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, p.854–858, 1993.

- WADA, S., ICHIKAWA, E.L., TATSUMI, K. Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. **Biotechnology and Bioengineering**, p.45, p.304309, 1995.
- WANG, Y.; GUO, L.; REN, L.; YIN, S.; GE, J.; GAO, Q.; LUXBACHER, T.; SHIJING L. A study on the performance of hyaluronic acid immobilized chitosan film, **Journal of Biomedical Materials Research**, v.4, p. 35009, 2009.
- WORTHINGTON B. C. WORTHINGTON ENZYME MANUAL, <<http://www.worthington-biochem.com/TY/default.html>> Acessado em: 12 Jan 2011.
- YAMADA, K.; AKIBA, Y.; SHIBUYA, T.; KASHIWADA, A.; MATSUDA, K.; HIRATA, M. Water purification through bioconversion of phenol compounds by tyrosinase and chemical adsorption by chitosan beads, **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 823-829, 2005.
- YAMADA, K.; TAMURA, T.; AZAKI, Y.; KASHIWADA, A.; HATA, Y.; HIGASHIDA, K.; NAKAMURA, Y. Removal of Linear and Branched p-Alkylphenols from Aqueous Solution by Combined Use of melB Tyrosinase and Chitosan Beads, **Journal of Polymers and the Environment**, v. 17, p. 95–102, 2009.