

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA MATEMÁTICA E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TESE DE DOUTORADO:

**Aplicação da enzima cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago* na
degradação oxidativa de clorofenóis e compostos fenólicos de águas
residuárias de refinaria.**

Autor:

Camilo Enrique La Rotta Hernández, MSc

Orientador:

Professora Elba Pinto da Silva Bon, PhD

Rio de Janeiro

Outubro / 2005

APLICAÇÃO DA ENZIMA CLOROPEROXIDASE DE *Caldariomyces fumago*
NA DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE CLOROFENÓIS E COMPOSTOS
FENÓLICOS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE REFINARIA.

CAMILO E. LA ROTTA H., MSc

Tese de Doutorado submetida ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovada por:

Profª. Elba Pinto da Silva Bon – Orientadora
Doutor em Ciências

Profª. Eliane D'Elia
Doutor em Ciências

Profª. Selma Gomes Ferreira Leite
Doutor em Ciências

Prof. Geraldo Lippel Sant'Anna Junior
Doutor em Ciências

Prof. Joab Trajano da Silva
Doutor em Ciências

Rio de Janeiro / Outubro de 2005

Essa tese de Doutorado foi realizada com
o apoio financeiro da ANP - Agência
Nacional do Petróleo, Gás Natural e
Biocombustíveis.



FICHA CATALOGRÁFICA

La Rotta Hernández, Camilo Enrique

APLICAÇÃO DA ENZIMA CLOROPEROXIDASE DE *Caldariomyces fumago* NA DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE CLOROFENÓIS E COMPOSTOS FENÓLICOS DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE REFINARIA.

Rio de Janeiro, UFRJ

Instituto de Química, 2005

144 Folhas

Tese – Doutor em Ciências – Bioquímica

1. *Caldariomyces fumago*
2. Cloroperoxidase
3. Compostos fenólicos
4. Degradação oxidativa
5. Modificação química
6. Geração eletroquímica
7. Peróxido de hidrogênio

Al ser y al deber ser

A mis padres Inés y Enrique y a mi querido hermano Alejandro.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Recursos Humanos da Agência Nacional de Petróleo, pela bolsa de doutorado concedida.

Ao Conselho Nacional de Apoio a Pesquisa – CNPq, à Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, e à Agência DAAD – Alemanha, pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, professora Elba P.S. Bon, pela orientação deste trabalho e pelos ensinamentos profissionais e pessoais que contribuíram para o meu amadurecimento científico.

À professora Eliane D’Elia, pelo apoio incondicional, pela confiança, pela enorme dedicação e amizade.

À professora Maria Regina Bastos L., pela sua amizade, confiança e ensinamentos.

Aos meus pais, Enrique La Rotta Mendoza e Inês Hernández de La Rotta, que embora distantes, nunca ficaram ausentes e me presentearam com a riqueza do estudo, a dignidade, a moral, a ética e a responsabilidade que me fazem ser a cada dia um ser humano melhor.

Ao meu irmão Alejandro La Rotta, pelo seu amor, união, dedicação e exemplo de vida.

Aos meus companheiros do Laboratório de Tecnologia Enzimática, por terem compartilhado comigo momentos de alegria, união e também tristezas ao longo destes anos. Especialmente à Valeria Soares.

À química Adriana Sousa por ter contribuído com seu trabalho de projeto de final de curso que enriqueceu grandemente esta tese.

Aos meus amigos no Brasil, Anita, Tatiana, Maisa, Rodrigo, Fabio e Alan, que sem eles não teria sido possível suportar as saudades da minha terra, da minha família e dos amigos que deixei atrás Elsitá, Astrid e Yesid.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica IQ/UFRJ.

Aos Drs. C. Wandrey, A. Liese e S. Lütz por terem me acolhido no seu laboratório do Instituto de Biotecnologia II do Centro de Pesquisas Tecnológicas em Jülich - Alemanha.

À Astrid L. Pimiento B. do Instituto Colombiano de Petróleo - Colômbia e ao professor M.A. Pickard do Instituto de Microbiologia da Universidade de Alberta – Canadá, por terem cedido as cepas utilizadas neste trabalho.

Aos Departamentos de Química Inorgânica, Química Orgânica e Bioquímica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

Aplicação da enzima cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago* na degradação oxidativa de clorofenóis e compostos fenólicos de águas residuárias de refinaria.

Palavras-chave: *Caldariomyces fumago*, cloroperoxidase, compostos fenólicos, degradação oxidativa, modificação química, geração eletroquímica, peróxido de hidrogênio.

Neste trabalho estudou-se a degradação oxidativa usando enzima cloroperoxidase (CPO) de *Caldariomyces fumago* dos compostos fenólicos: fenol (P), 4-clorofenol (4-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) e pentaclorofenol (PCP) e de compostos fenólicos presentes nas águas residuais de refinaria em efluente bruto – água acida (EB) e água de fundos de tanque de armazenamento de óleo cru (TA).

A CPO foi tratada com cianoborohidreto de sódio e 9-antraldeído (9A) para alquilação redutiva e com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) ou com hexametilendiamina (HMDA) para amidação, e entrecruzados com glutaraldeído (GA), visando aumentar a estabilidade da CPO frente à temperatura, pH, salinidade e em meio orgânico. CPO-EDAC, CPO-HMDA e todos os derivados entrecruzados apresentaram 40% de atividade residual após um período de incubação de 120 minutos a 60° C em pH 6,0 e durante 60 minutos a 30° C em pH 7,0; condições que resultaram na completa inativação da CPO nativa. O derivado CPO-9A apresentou um incremento de 4 vezes na hidrofobicidade e o derivado CPO-GA mostrou ser 30% mais estável em *tert*-butanol 60% (v/v).

Visando aumentar a estabilidade da CPO frente à inativação por H₂O₂, o reagente foi disponibilizado nas misturas reacionais de três formas; adição direta (AD) em pulsos (AP) e através de geração eletroquímica (GE).

Misturas reacionais contendo 6,0 UI/mL de CPO-GA, 0,5 mM de CPC e adição do peróxido em cinco pulsos concentração final de 1,0 mM em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 e 25°C, resultaram nos melhores níveis de degradação de clorofenóis. Assim, após 4 horas de reação foram observados 100% de degradação para P, 4-CP e de 96%, 95% e 90% para 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP respectivamente. Foi também observado que a remoção por precipitação de 80% para P e 4-CP foi completa com a adição de 2 ppm de quitosana. O uso de GE foi igualmente eficiente na degradação de P e 4-CP com 100% de degradação. Porém, para o caso de 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP níveis de degradação menores de 77%, 70% e 60%, respectivamente, foram observados quando o reator de bicompartimentado foi usado. Melhoras na oxidação total foram observadas quando o utilizando reator de câmara única em -620 mV_{ECS} e aeração contínua durante 4h. Assim, foram observados concentrações de fenol residual para 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP de 97%, 88% e 86%, respectivamente. Conforme o esperado com GE conseguiu-se aumentar em 30% na atividade residual da CPO-GA. Em todos os casos verificou-se a ocorrência de oxidação anódica abaixo de 30% e oxidação química causada pelo peróxido de 17%.

No tratamento dos efluentes de refinaria os níveis máximos de oxidação enzimática de 74%, foram alcançados em 4 horas. Níveis de remoção por precipitação e coagulação de até 50%, foram observados pela adição de 2,0 ppm de quitosana.

A efetividade da remoção enzimática de compostos fenólicos por CPO e a possibilidade de produção da enzima a baixo custo justificam os estudos de escalonamento do processo e de avaliação econômica.

ABSTRACT

Aplication of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* on the oxidative degradation of chlorophenols and fenolic compounds from refinery wastewaters.

Keywords: *Caldariomyces fumago*, chloroperoxidase, phenolic compounds, oxidative degradation, chemical modification, electrochemical generation, hydrogen peroxide.

This work studied the oxidative degradation by the enzyme chloroperoxidase (CPO) from *Caldariomyces fumago* of the phenolic compounds: phenol (P), 4-chlorophenol (4-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) e pentachlorophenol (PCP) and phenolic compounds present in refinery wastewaters such as raw effluents – acid water (RE) and tanks for crude oil storage (ST).

Chloroperoxidase was chemical modified either with sodium cyanoborohydride and 9-antraldehyde (9A) for reductive alkylation and by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) or hexamethyldiamine (HMDA) for amidation. Furthermore, native CPO and amidated derivatives were cross-linked with glutaraldehyde (GA). CPO–EDAC and CPO–HMDA and all GA cross-linked derivatives presented 40% residual activity after incubation for 120 min at 60 °C in pH 6.0, and during 60 min at 30 °C in pH 7.0, conditions that completely inactivated the native CPO. The CPO–9A derivative presented a four-fold hydrophobicity increase and the CPO–GA showed to be 30% more stable than the native enzyme in 60% *tert*-butanol.

Aiming to enhance CPO stability towards hydrogen peroxide inactivation, the availability of this reagent was achieved using direct addition (DA) or pulsed addition (PA) and by continuous electrogeneration (EG).

Oxidation efficiency and phenol removal were studied in separately for each CP, in reaction mixtures containing 6.0 UI/mL of CPO, 0,5 mM either of phenolic compound and different concentrations of hydrogen peroxide up to 1.2 mM in 100 mM sodium-potassium phosphate pH 6.0 buffer. Thus, after 4 hours of reaction, degradation levels of 100% were observed for P and 4-CP. For 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP, 96%, 95% and 90% were attained, respectively. Also was observed removal by precipitation of 80% for P and 4-CP, and higher removal levels up-to 100% by the addition of 2 ppm of chitosan. Degradation efficiency for EG in bicompartmented reactor was comparable for P and 4-CP with 100% of degradation. However, lower degradation levels for 2,4-DCP, 2,4,6-TCP and PCP of 77%, 70% and 60% were observed, respectively. Improvements in total oxidation levels were observed when a single chamber reactor, -620 mV_{SCE} and continuous aeration during 4 h were used. Thus, final phenol concentrations for 2,4-DCP, 2,4,6-TCP and PCP of 97%, 88% and 86% were observed, respectively. As expected, EG improved CPO half-life time in 30%. In all cases was verified anodic oxidation bellow 30% and chemical oxidation up-to 17% caused by the hydrogen peroxide

During the degradation of refinery wastewater samples maximum enzymatic oxidation levels up to 74% were similar for both methodologies DA and EG, after 4 hours of treatment. Removal levels were also higher, up to 50%, with the addition of chitosan 2,0 ppm.

The effectiveness of the enzymatic removal of phenolic compounds by CPO and its low cost production justifies scale-up and process economic viability studies.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| 1X | Adição única de peróxido de hidrogênio |
| 2,4,6-TCP | 2,4,6-triclorofenol |
| 2,4-DCP | 2,4-diclorofenol |
| 2-MC | <i>Meta</i> -cresol |
| 3-CP | 3-clorofenol |
| 4-AAP | 4-Aminoantipirina |
| 4-CP | 4-clorofenol |
| 4-MC | <i>Para</i> -cresol |
| 4-MP | 4-metoxifenol |
| 5X | Adição em pulso de peróxido de hidrogênio em 5 vezes |
| 9A | 9-Antraldeído |
| ABS | Absorbância |
| AD | Adição direta |
| AOX | <i>Absorbable organic halides</i> |
| APQI | Aminopirrolquinoneimina |
| C A | Controle câmara anódica |
| C C | Controle câmara catódica |
| C GE | Controle oxidação química devida ao peróxido de hidrogênio eletrogerado |
| CE | Contraeletrodo ou eletrodo auxiliar |
| CECA | Comissão Estadual de Controle Ambiental, Rio de Janeiro |
| CEPESP | Secretaria Estadual do Meio Ambiente, São Paulo |
| CETESP | Ciência e Tecnologia Aplicada ao Meio Ambiente, São Paulo |
| CG | Cromatografia de gases |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| CPO | Cloroperoxidase |
| CPO _n | Cloroperoxidase nativa |
| CWA | Clean Water Act |
| ϵ | Coeficiente de extinção molar |
| ECS | Eletrodo de calomelano saturado |
| EDCA | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl |

| | |
|----------------------------------|---|
| EF1 | Efluente bruto 1 |
| EF2 | Efluente bruto 2 |
| EF2d | Efluente bruto 2 (diluída) |
| EMS | Environmental Management System |
| EPA | Environmental Pollution Agency |
| ER | Eletrodo de referência |
| ET | Eletrodo de trabalho |
| FBBR | Reator de leito fluidizado |
| FEEMA | Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro |
| FTA | Faixa de toxicidade aguda |
| GA | Glutaraldeído |
| GE ou EG | Geração eletroquímica |
| HMDA | Hexametilendiamina |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| IAA | Ácido <i>trans</i> -3-iodoacrílico |
| k_{cat} | Constante catalítica |
| $k_{\text{cat}}/K_{\text{M ap}}$ | Eficiência catalítica |
| kDa | Kilodaltons |
| kg | kilogramas |
| $K_{\text{M ap}}$ | Constante de Michaelis-Menten |
| $K_{\text{o/w}}$ | Coeficiente de partição octanol/água |
| L | Litros |
| LAC | Lacase |
| LiP | Lignina peroxidase |
| LTHA: | Concentração do poluente em água potável adversos pela exposição durante uma vida |
| M | Molar |
| <i>m</i> | Meta |
| m/z | Massa/carga |
| MALDI | Ionização por matriz assistida por dessorção a laser |
| MCL: | Concentração máxima do contaminante legalmente permitida em água potável. |
| MCLGs | Concentração máxima do contaminante previa ao aparecimento de sintomas |
| mg | Miligramas |

| | |
|----------|--|
| mg | Microgramas |
| mL | Microlitros |
| mL | Mililitros |
| mM | Milimolar |
| mM | Micromolar |
| MnP | Manganês peroxidase |
| MS | Espectrometria de massas |
| nM | Nanomolar |
| <i>o</i> | Orto |
| ODHA | Concentração do poluente em água potável |
| O-PP | <i>ortho</i> -fenilfenol |
| OQ | Oxidação química devida ao peróxido |
| P | Fenol |
| <i>p</i> | Para |
| p/p | Concentração peso a peso |
| p/v | Concentração peso a volume |
| PCP | Pentaclorofenol |
| PO | Peroxidase |
| ppb | Partes por bilhão |
| ppm | Partes por milhão |
| PPO | Tirosinase - polifenol oxidase |
| P-PP | <i>para</i> -fenilfenol |
| PSA | Ácido 4-fenilsulfônico |
| Q | Quitosana |
| RfD: | A Dose de referência é a quantidade estimada do contaminante por pessoa pode por dia |
| Rz | Renzenheilt – parâmetro de pureza enzimática para peroxidase |
| SDWA | Safe Drinking Water Act |
| SWTR | Surface Water Treatment Rule |
| TA | Tanque de armazenamento |
| TAd | Tanque armazenamento (diluída) |
| TAM | Toxicidade aguda média |
| TDHA: | Concentração do poluente em água potável adversos pela exposição durante dez dias. |
| tetraCP | Tetraclorofenol |

| | |
|-----------|---|
| TNBS | Acido trinitrobenzensulfônico |
| TVM | Tempo de vida média |
| TVU | Tempo de vida útil |
| UI/mg | Unidade internacional de atividade enzimática por miligrama de proteína |
| UI/mL | Unidade internacional de atividade enzimática por mililitro de solução |
| V/v | Concentração volume a volume |
| V_i | Velocidade de inativação |
| V_{max} | Velocidade inicial máxima de reação |
| V_o | Velocidade inicial |
| XOA | Haletos orgânicos absorvíveis |
| $Y_{E/S}$ | Rendimento da fermentação Enzima (mg/mL)/ (substrato g/L) |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

| | |
|----|---|
| 4 | Tabela I-1. Histórico dos processos de refinação. |
| 9 | Tabela II-1. Sumário da toxicidade aguda por grupo de organismo. |
| 10 | Tabela II-2. Parâmetros de avaliação em humanos para níveis de exposição, carcinogenicidade e toxicidade aguda. |
| 12 | Tabela II-3. Comparação entre as tecnologias convencionais e alternativas para a remoção de compostos fenólicos. |
| 15 | Tabela II-4. Compostos poluentes reportados na literatura como alvo da degradação de enzimas oxidativas. |
| 21 | Tabela II-5. Relação geral das peroxidases. |
| 22 | Tabela II-6. Microorganismos produtores de enzimas ligninolíticas. |
| 23 | Figura II-1. Estrutura terciária da cloroperoxidase de <i>Caldariomyces fumago</i> |
| 25 | Figura II-2. Ciclos catalíticos para cloroperoxidase e citocromo P-450. |
| 33 | Figura II-3. Resumo do ciclo mecanístico para as peroxidases. |
| 37 | Figura II-4. Mecanismo da alquilação de grupamentos amino por aldeídos e cetonas. |
| 39 | Figura II-5. Estabilização por entrecruzamento. |
| 43 | Tabela II-7. Comparação dos métodos de quantificação de peróxido de hidrogênio. |
| 58 | Tabela IV-1. Matriz experimental para avaliação do efeito dos modos de adição da CPO. |
| 61 | Tabela IV-2. Condições reacionais empregadas nos experimentos preliminares de geração eletroquímica de peróxido. |
| 61 | Figura IV -1. Reator bioeletroquímico de câmara única. |
| 62 | Figura IV -2. Reator bioeletroquímico bicompartimentado. |
| 66 | Tabela IV-5. Ajustes realizados sobre as amostras de efluentes antes da degradação enzimática |
| 72 | Figura V-1. Efeito do excesso molar do agente modificador sobre a atividade da CPO. Tratamento simples. |
| 72 | Figura V-2. Efeito do excesso molar do agente modificador sobre a atividade da CPO. |

Tratamento duplo.

- 73 **Figura V-3.** Graus de modificação dos resíduos de aminoácidos.
- 75 **Figura V-4.** Efeito do agente modificador em excesso molar de 1:100 sobre a
solubilidade e hidrofobicidade.
- 76 **Figura V-5.** Efeito da concentração do *tert*-butanol sobre a atividade peroxidásica.
- 78 **Figura V-6.** Efeito da concentração do *tert*-butanol sobre a estabilidade de CPO.
- 79 **Figura V-7.** Perfis do efeito da temperatura sobre a atividade peroxidásica e estabilidade
da CPO.
- 80 **Figura V-8.** Perfis do efeito da temperatura sobre a estabilidade da CPO.
- 82 **Figura V-9.** Perfis do efeito do pH sobre a atividade da CPO.
- 83 **Figura V-10.** Perfis do efeito do pH sobre a estabilidade da CPO.
- 87 **Tabela V-3.** Parâmetros cinéticos $K_{M\ ap}$ e k_{cat} e valores de eficiência dos APQI para HRP
e CPO.
- 89 **Figura V-11.** Dependência da concentração do peróxido de hidrogênio na velocidade
inicial de oxidação de substratos fenólicos
- 90 **Tabela V-4.** Parâmetros cinéticos $K_{M\ ap}$ e k_{cat} e valores de eficiência catalítica
determinados para o peróxido de hidrogênio.
- 93 **Figura V-12.** Efeito da relação estequiométrica milimolar 4-CP/peróxido.
- 94 **Figura V-13.** Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio (0,5 mM).
- 95 **Figura V-14.** Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio (1,0 mM).
- 96 **Tabela V-5.** Efeito da adição de peróxido de hidrogênio (1.0 mM) nas velocidades iniciais
de oxidação de CPC.
- 98 **Tabela V-6.** Efeito da adição de peróxido de hidrogênio sobre a remoção.
- 100 **Figura V-15.** Efeito da concentração do coagulante sobre a remoção.
- 103 **Figura V-16.** Efeito do potencial na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio.
- 104 **Figura V-17.** Efeito da aeração na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio.
- 107 **Figura V-18.** Efeito do potencial aplicado sobre a bioeletro-oxidação de 4-CP
- 108 **Figura V-19.** Bioeletro-oxidação de CPC a -620 mV_{ECS}, em célula bicompartimentada
- 109 **Tabela V-7.** Comparação das velocidades iniciais máximas de oxidação CPC, para adição

única, pulsada e GE.

110 **Figura V-20.** Bioeletro-oxidação de CPC a $-620\text{ mV}_{\text{ECS}}$, em célula de câmara única

111 **Tabela V-8.** Comparação das velocidades iniciais de oxidação CPC adição pulsada e GE.

112 **Figura V-21.** Remoção de CPC por GE a $-620\text{ mV}_{\text{ECS}}$, em célula de câmara única.

114 **Tabela V-9.** Descrição das amostras provenientes da refinaria REDUC-Petrobras.

115 **Tabela V-10.** Acondicionamento realizado sobre as amostras de efluentes.

116 **Figura V-22.** Resultados da degradação oxidativa de compostos fenólicos em amostras de efluentes de refinaria.

117 **Figura V-23.** Efeito da adição direta de peróxido de hidrogênio (5X) e coagulante (quitosana).

118 **Figura V-24.** Efeito do modo de aeração sobre a degradação via bioeletroquímica de fenol total.

119 **Figura V-25.** Efeito do modo de aeração sobre a remoção bioeletroquímica.

122 **Figura V-26.** Efeito da inativação causada pelo peróxido de hidrogênio sobre a atividade peroxidásica.

122 **Tabela V-11.** Perda na atividade peroxidásica causada pelo peróxido de hidrogênio.

123 **Figura V-27.** Perfis para o efeito do tipo de suplementação usada para o peróxido de hidrogênio sobre a atividade enzimática.

124 **Tabela V-12.** Atividade peroxidásica residual (UI/mL e Porcentagem)

125 **Tabela V-13.** Velocidades de inativação para CPO durante os processos de oxidação de CPC.

126 **Figura V-28.** Porcentagens de atividade peroxidásica residual observada para CPO nativa e modificada quimicamente.

SUMÁRIO

Página

| | |
|-----|---|
| vii | RESUMO |
| ix | ABSTRACT |
| xi | LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS |
| xv | LISTA DE ILUSTRAÇÕES |
| 1 | CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO |
| 5 | CAPÍTULO II: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA |
| 6 | 1. OS FENÓIS NOS EFLUENTES DA INDÚSTRIA PETROQUÍMICA |
| 6 | 1.1. Fenol e compostos fenóis clorados: toxicidade, persistência e recalcitrância |
| 11 | 1.2. Tecnologias para a biodegradação de compostos fenólicos em efluentes de refinaria |
| 13 | 2. BIOCATÁLISE AMBIENTAL: USO DE ENZIMAS OXIDATIVAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES |
| 16 | 2.1. Oxidases: Tirosinase e Lacase |
| 19 | 2.2. Peroxidasas: cloroperoxidase, peroxidase de raiz forte, Lignina peroxidase e manganês peroxidase |
| 19 | 1.2.1. <i>Horse-radish peroxidase</i> |
| 20 | 1.2.2. <i>Lignina peroxidase e manganês peroxidase</i> |
| 23 | 1.2.3. <i>Cloroperoxidase</i> |
| 28 | 3. DEGRADAÇÃO BIOCATALÍTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS MONOSUBSTITUÍDOS USANDO CLOROPEROXIDASE DE <i>Caldariomyces fumago</i>. |
| 31 | 4. ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS |
| 32 | 4.1. Estabilidade da CPO: efeito das condições reacionais; inativação por peróxido de hidrogênio e auto-inativação |
| 35 | 4.2. Estabilização de cloroperoxidase por modificação química |
| 36 | 4.2.1. <i>Alquilação e arilação redutivas de grupamentos amino.</i> |
| 38 | 4.2.2. <i>Entrecruzamento com reagentes bifuncionais</i> |

| | |
|----|--|
| 40 | 5. BIOELETRQUÍMICA |
| 40 | 5.1. A geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio |
| 42 | 5.2. A quantificação do peróxido de hidrogênio |
| 45 | CAPÍTULO III: RELEVÂNCIA, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO |
| 48 | 1.1. Objetivo geral |
| 48 | 1.2. Objetivos específicos |
| 49 | CAPÍTULO IV: MATERIAIS E MÉTODOS |
| 50 | 1. CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES DE CLOROPEROXIDASE |
| 50 | 1.1. Determinação da atividade enzimática |
| 50 | 1.1.1. <i>Método da monoclóródimedona – MCDO (Atividade halogenásica)</i> |
| 50 | 1.1.2. <i>Método do 2,4- Diclorofenol – 2,4-DCP (Atividade peroxidásica)</i> |
| 51 | 1.1.3. <i>Método do ABTS (Atividade peroxidásica residual)</i> |
| 51 | 1.2. Determinação da pureza e da concentração de proteína das preparações enzimáticas |
| 51 | 1.2.1. <i>Determinação da concentração molar e da pureza espectrométrica das preparações de CPO</i> |
| 52 | 1.2.2. <i>Quantificação de proteína total</i> |
| 52 | 1.2.3. <i>Determinação da estabilidade das preparações enzimáticas</i> |
| 52 | 2. ESTABILIZAÇÃO DA CLOROPEROXIDASE POR MODIFICAÇÃO QUÍMICA |
| 52 | 2.1. Determinação do excesso molar para os reagentes modificadores |
| 53 | 2.2. Reações de modificação química da CPO. |
| 53 | 2.2.1. <i>Ariliação redutiva com aldeídos aromáticos (9-antraldeído e cianoborohidreto de sódio) e entrecruzamento com GA.</i> |
| 53 | 2.2.2. <i>Ligação cruzada com os reagentes bifuncionais (glutraldeído, hexametildiamina, carbodiimida).</i> |
| 54 | 2.2.3. <i>Recuperação e purificação dos derivados de CPO.</i> |
| 54 | 2.3. Caracterização das preparações de CPO pós-modificação. |
| 54 | 2.3.1. <i>Determinação do grau de modificação química – Método do TNBS</i> |
| 55 | 2.3.2. <i>Determinação na mudança da hidrofobicidade</i> |
| 55 | 2.3.3. <i>Determinação do efeito da modificação química frente ao pH e à temperatura.</i> |
| 55 | 2.3.4. <i>Determinação do efeito da modificação química frente à concentração de solvente orgânico.</i> |

| | |
|----|---|
| 56 | 3. DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS |
| 56 | 3.1. Determinação de parâmetros cinéticos da CPO nas reações de oxidação de fenóis clorados. |
| 56 | 3.1.1. <i>Efeito da concentração do composto fenólico sobre a atividade da CPO</i> |
| 57 | 3.1.2. <i>Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a atividade da CPO.</i> |
| 57 | 3.1.3. <i>Efeito do modo de adição da CPO e do peróxido de hidrogênio: único ou em pulsos</i> |
| 58 | 3.2. Determinação da eficiência das reações de oxidação biocatalítica de fenóis clorados. |
| 58 | 3.2.1. <i>Determinação do nível da oxidação enzimática (eficiência da oxidação)</i> |
| 59 | 3.2.2. <i>Determinação do nível da remoção (eficiência da polimerização)</i> |
| 59 | 3.2.3. <i>Quantificação do fenol residual</i> |
| 59 | 4. DEGRADAÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS |
| 59 | 4.1. Geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio |
| 59 | 4.1.1. <i>Experimentos preliminares de geração de peróxido de hidrogênio</i> |
| 62 | 4.1.2. <i>Experimentos de geração de peróxido de hidrogênio usando malha de cobre eletrolítico.</i> |
| 63 | 4.1.3. <i>Efeito do potencial aplicado sobre a geração eletroquímica de peróxido e a bioeletrooxidação.</i> |
| 64 | 4.1.4. <i>Efeito da aeração sobre a geração eletroquímica de peróxido e a oxidação enzimática.</i> |
| 64 | 4.1.5. <i>Oxidação bioeletroquímica de compostos fenólicos clorados</i> |
| 65 | 5. REAÇÕES DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUAS DE REFINARIA (MATRIZES REAIS) |
| 65 | 5.1. Oxidação enzimática convencional de compostos fenólicos presentes águas residuais de refinaria (matriz real): Adição direta única ou em pulsos de peróxido de hidrogênio |
| 67 | 5.2. Oxidação bioeletroquímica de compostos fenólicos presentes águas residuais de refinaria |
| 68 | 5.3. Efeito da adição de coagulante sobre a degradação enzimática convencional e bioeletroquímica. |
| 69 | CAPITULO V: RESULTADOS E DISCUSSÃO |
| 70 | V-1: ESTABILIZAÇÃO DA CLOROPEROXIDASE POR MODIFICAÇÃO QUÍMICA |
| 71 | 1.1. Otimização dos excessos molares para os reagentes modificadores. |

| | |
|-----|---|
| 73 | 1.2. Grau de modificação |
| 74 | 1.3. Efeito da modificação química sobre as hidrofobicidade e solubilidade dos derivados de CPO |
| 76 | 1.4. Atividade e estabilidade dos derivados de CPO na presença de solventes orgânicos. |
| 76 | 1.5. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da CPO nativa e seus derivados |
| 81 | 1.6. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da CPO nativa e seus derivados |
| 84 | V-2: DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS SOBRE A ATIVIDADE DE PEROXIDÁSICA |
| 85 | 2.1. Efeito da concentração de composto fenólico |
| 87 | 2.2. Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a oxidação de fenóis clorados usando CPO. |
| 91 | V-3: DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS: ESTUDO DA ADIÇÃO ÚNICA OU PULSADA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO |
| 92 | 3.1. Efeito da relação estequiométrica CPC: peróxido de hidrogênio, na degradação oxidativa de compostos fenólicos clorados. |
| 93 | 3.2. Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio na degradação oxidativa de compostos fenólicos clorados |
| 96 | 3.3. Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio na remoção de compostos fenólicos clorados |
| 98 | 3.4. Efeito da adição de coagulante sobre a remoção de compostos fenólicos clorados. |
| 101 | V-4: DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS: ESTUDO DA GERAÇÃO ELETROQUÍMICA DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO |
| 102 | 4.1. Efeito do potencial na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio (GE) |
| 103 | 4.2. Efeito da aeração na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio (GE) |
| 105 | V-5: DEGRADAÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS |
| 106 | 5.1. Experimentos em batelada de oxidação de CPC com geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio: Efeito do potencial aplicado. |
| 111 | 5.2. Remoção bioeletroquímica de CPC e Efeito da adição de coagulante na remoção |
| 113 | V-6: DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUAS RESIDUAIS DE REFINARIA: ADIÇÃO DIRETA VS. BIOELETROGERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO |

| | |
|-------|--|
| 114 | 6.1. Acondicionamento das amostras e verificação da concentração inicial de fenol total. |
| 115 | 6.2. Experimentos preliminares de degradação do fenol total com adição direta de peróxido de hidrogênio |
| 116 | 6.3. Efeito da adição de coagulantes na remoção de fenol total em amostras de efluente de refinaria |
| 118 | 6.4. Degradação eletroquímica de compostos fenólicos em amostras de efluentes de refinaria - Efeito do modo de aeração na degradação do fenol total. |
| 119 | 6.5. Degradação eletroquímica de compostos fenólicos em amostras de efluentes de refinaria - Efeito da adição de agentes coagulantes. |
| 120 | V-7: ESTABILIDADE DA CPO FRENTE À ADIÇÃO DIRETA OU À ELETROGERAÇÃO DE PEROXIDO DE HIDROGÊNIO |
| 127 | CAPÍTULO VI: CONCLUSÕES |
| 131 | CAPÍTULO VII: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E TRABALHOS FUTUROS |
| 133 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS |
| xxii | ANEXO I: PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA CLOROPEROXIDASE. |
| xxxi | ANEXO II: QUANTIFICAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ELETROGERADO POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO. |
| xlili | ANEXOS III: CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE CLORO-FENÓIS. |
| lii | ANEXO IV: PRODUÇÃO CIENTÍFICA |

Capítulo I

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a qualidade das águas marítimas, fluviais e subterrâneas, que tem um grande impacto na integridade dos diferentes ecossistemas marítimos e terrestres e afetam decisivamente a saúde humana, está promovendo o desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento e eliminação de poluentes ambientais (Chet, 1999; Rivas, 1999 e Kirby, 2000). Adicionalmente, legislações nacionais e internacionais, novas ou atualizadas, que definem qualitativa e quantitativamente o nível de diferentes poluentes nestes ambientes, estão influenciando de forma decisiva o desenvolvimento tecnológico no setor de tratamento de efluentes industriais. As legislações americanas e canadenses reunidas na ISO 14001- EMS (Environmental Management System), no SDWA (Safe Drinking Water Act), no CWA (Clean Water Act), e na SWTR (Surface Water Treatment Rule) e reguladas pelas agências EPA (Environmental Pollution Agency) e pela OSHA (Occupational safety and health administration) definem os limites permissíveis de compostos poluentes em águas residuais industriais e domésticas nestes países (Denilizi, 2004).

Em relação à legislação brasileira federal e estadual, a Lei nº 997 (31 de maio de 1976) dispõe sobre a prevenção e o controle da poluição do meio ambiente, o decreto 8.468 (8 de setembro de 1976) aprova os regulamentos da mesma lei e o decreto 50.877 de 1961 dispõe sobre o lançamento de resíduos tóxicos ou oleosos nas águas interiores e litorâneas do país. Esta legislação orienta a atuação de conselhos e órgãos federais e estaduais encarregados do controle e vigilância das emissões de compostos poluentes, entre eles o CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), a FEEMA (Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente, Rio de Janeiro, RJ), a CEPESP (Secretaria Estadual do Meio Ambiente, São Paulo, SP), a CETESP (Ciência e Tecnologia Aplicada ao Meio Ambiente, São Paulo, SP) e a CECA (Comissão Estadual de Controle Ambiental, Rio de Janeiro, RJ), entre outras.

Os métodos convencionais para a remoção de fenóis de efluentes industriais incluem oxidação química (oxigenação, ozonização ou peroxidação) e fotoquímica, adsorção sobre carvão ativado, extração com solventes e degradação microbiana. Estes procedimentos podem apresentar desvantagens tais como alto custo de implementação, detoxificação incompleta, emissão de vapores tóxicos e a possibilidade de formação de compostos ainda mais perigosos. Adicionalmente, tem limitações relacionadas com a concentração e a natureza do fenol (Smith, 1987; Spiker, 1992; Aitken, 1993 e Wada, 1994). Muitas destas tecnologias foram desenvolvidas em países industrializados e repassadas para aqueles em desenvolvimento. Entretanto, peculiaridades geográficas e climáticas limitam a transferência direta destas tecnologias, que muitas vezes envolvem processos biotecnológicos, sabidamente mais sensíveis a estas condições. Assim, pela necessidade da diversificação e aperfeiçoamento de processos para controle da poluição estão sendo desenvolvidos tratamentos alternativos com o uso de enzimas, que podem complementar ou substituir os processos convencionais. Neste contexto a durante os últimos 25 anos a biocatálise ambiental tem sido utilizada intensivamente como uma ferramenta promissora no tratamento de efluentes aquosos industriais e domésticos contaminados por fenóis e aminas aromáticas mono, di e poli substituídos, pesticidas e hidrocarbonetos (Atlow, 1983). Muitos destes compostos são extremamente tóxicos, limitando a aplicação direta de tratamentos microbiológicos.

Os compostos fenólicos destacam-se como substâncias altamente poluentes, embora nem todos tenham essa característica. Assim, a degradação natural de materiais vegetais origina compostos polifenólicos do tipo taninos, que dão cor e sabor às águas potáveis. Por outro lado o fenol e compostos fenólicos clorados, aminados, nitrados e metoxi-substituídos, provenientes das indústrias do petróleo e química são cáusticos e venenosos (Orser, 1994 e Crecchio, 1995). Os fenóis podem ser encontrados em vários tipos de óleos e matérias primas usadas nos processos de mineração, indústria têxtil, madeireira e indústria de celulose assim como em substâncias empregadas nos processos de fundição, tais como óleos desmoldantes, refrigerantes, ceras e

graxas. Na indústria petroquímica, podem ser encontrados em resíduos da conversão do coque, processamento das diferentes frações do óleo bruto e fabricação de tintas, resinas e plásticos (Chen, 1999 e Kirby, 2000). A **tabela I-1** apresenta o histórico dos processos geradores de compostos fenólicos na indústria petrolífera.

Tabela I-1. Histórico dos processos de refinação e o teor estimado de fenóis gerados em cada processo (Galvão, 1988; Smith, 1991; Notarfonzo, 1992; Quaglia, 1995 e Mogollón, 1997).

| <i>Ano</i> | <i>Nome do Processo</i> | <i>Propósito</i> | <i>Derivados</i> | <i>Teor estimado de fenol total</i> |
|------------|--------------------------------|--|-----------------------|-------------------------------------|
| 1862 | Destilação atmosférica | Produção de querosene | Naftas, alcatrão. | Alto |
| 1870 | Destilação em vácuo | Lubrificantes | Asfaltos, coque. | Muito Alto |
| 1913 | Craqueamento térmico | Aumento de gasolina | “Bunker fuel” | Alto |
| 1916 | “Sweetening” | Redução do enxofre | Enxofre | Baixo |
| 1930 | Reformação térmica | Melhoramento da octanagem | Resíduos | Baixo |
| 1932 | Hidrotratamento | Remoção do enxofre | Enxofre | Baixo |
| 1932 | “Coking” | Gasolina e fundos | Coque | Alto |
| 1933 | Extração com solventes | Melhora índice de lubrificação e viscosidade | Aromáticos | Muito Alto |
| 1935 | Remoção de ceras por solventes | Melhora “pour point” | Ceras | Alto |
| 1935 | Polimerização catalítica | Melhora gasolina | Petroquímicos | Alto |
| 1937 | Craqueamento catalítico | Melhora octanagem | Petroquímicos | Alto |
| 1939 | “Visbreaking” | Redução da viscosidade | Destilados e alcatrão | Muito alto |
| 1940 | Alquilação | Melhora octanagem | Gasolina para aviação | Baixo |
| 1940 | Isomerização | Produtos da alquilação | Naftas | Baixo |
| 1942 | FCC | Melhora gasolina | Petroquímicos | Alto |
| 1950 | Desasfaltado | Aumenta corrente para Craqueamento | Asfalto | Muito Alto |
| 1952 | Reforma catalítica de naftas | Melhoramento de naftas | Aromáticos | Muito Alto |
| 1954 | Hidrodessulfurização | Remoção do enxofre | Enxofre | Baixo |
| 1956 | Inibidores de “sweetening” | Remoção de mercaptanos | Disulfetos | Baixo |
| 1957 | Isomerização catalítica | Melhoramento do octanagem | Correntes alquílicas | Baixo |
| 1960 | Hidrocraqueamento | Melhora qualidade e remove enxofre | Correntes alquílicas | Baixo |
| 1974 | Remoção catalítica de ceras | Melhora “pour point” | Ceras | Alto |
| 1975 | Hidrocraqueamento de resíduos | Aumento das correntes de naftas | Resíduos pesados | Muito alto |

Teor estimado de fenol total: Muito baixo (0- 10 ppm); Baixo (10 – 100 ppm); Alto (100- 500 ppm); Muito alto (acima de 500 ppm)

Capítulo II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. OS FENÓIS NOS EFLUENTES INDUSTRIAIS

1.1. Fenol e compostos fenólicos clorados: toxicidade, persistência e recalcitrância

Os compostos fenólicos são provenientes de atividades industriais tais como conversão do carvão, refino de petróleo, fabricação de resinas e plásticos, corantes, pigmentos e outras substâncias químicas orgânicas, assim como também podem ser gerados a partir das indústrias têxtil, madeireira, mineira, processamento de polpa e papel. Estes compostos também ocorrer naturalmente a partir da degradação de matérias lignocelulósicas e taninos de origem vegetal. Os compostos fenólicos contribuem dando cor, sabor e odor indesejados às águas usadas no processamento de bebidas e alimentos (Loehr, 1998). Virtualmente, todos os fenóis são tóxicos, portanto fenol e todos seus derivados são considerados poluentes perigosos.

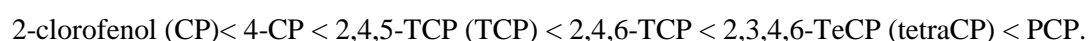
Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos e são encontrados até em ambientes relativamente intocados (Myren, 1994). A degradação destes compostos no meio ambiente pode estar sujeita a reações de degradação enzimática ou não enzimática pelos organismos e as condições presentes nos ecossistemas aquáticos e terrestres. Estas reações podem produzir, por sua vez, sub-produtos ainda mais tóxicos. Embora a velocidade e a extensão da biodegradação destes xenobióticos dependa grandemente da sua estrutura e da sua proximidade com o meio ambiente a resistência bioquímica especialmente para os compostos orgânicos halogenados tem sido observada (Grady, 1985; Kishino, 1994; Annachatre, 1996 e Liu, 2002).

Concentrações em efluentes urbanos e provenientes da agricultura encontram-se na faixa desde poucas partes por bilhão (ppb) até algumas ppm. Efluentes industriais associados à fabricação de compostos orgânicos halogenados caracteristicamente possuem concentrações na faixa das centenas de partes por milhão (ppm) (Abrahamson, 1991 e Suflita, 1982).

Os clorofenóis fazem parte dos chamados AOX (*absorbable organic halides*) ou XOA, haletos orgânicos absorvíveis. Os AOX estão presentes nos efluentes industriais em concentrações entre 0,1 e 2,6 ppm para o caso da indústria de celulose e de 0,01 até 1000 ppm na indústria petroquímica. Porém estes tipos de compostos não são exclusivos destas atividades industriais e também podem ser encontrados fazendo parte de fungicidas e herbicidas do tipo ácido clorofenoxiacético (Hill, 1965 e Betrame, 1980) e do pentaclorofenol ou PCP (Boyd, 1983 e Apajalahti, 1986).

Como mostra a **Tabela II-1**, os fenóis clorados são tóxicos para a maioria dos tipos de microorganismos ainda em baixas concentrações, podendo ser também inibidores do crescimento para aquelas espécies que já possuam alguma capacidade de metabolizá-los e usá-los como substratos.

Em comparação com o fenol, os compostos fenólicos clorados são muito mais persistentes no meio ambiente. Sua potencial toxicidade e bioacumulo aumentam com o aumento do grau de cloração e da lipofilicidade (Sierra-Alvarez, 1994). A bioacumulação potencial pode ser quantificada pelo fator de bioconcentração (BCF) e está possivelmente correlacionada ao coeficiente de partição octanol/água ($K_{o/w}$) (Mohn, 1992). Com base nos valores de $\log K_{o/w}$, o bioacúmulo para os compostos fenólicos clorados seguiria a ordem seguinte:



Isto claramente indica que o potencial de bioacumulação aumenta com o número de cloros substituintes sobre o anel fenólico. Embora, ainda não foi encontrado seu bioacumulo em seres humanos expostos, tem sido achado um incremento estatisticamente significativo no aparecimento de doenças gástricas e renais (PAN, 2005). Outras alterações em longo prazo

como teratogenicidade e carcinogenicidade, além dos limites permissíveis de ingestão e exposição permitidas para seres humanos já foram reportados como mostra a **tabela II-2**.

CPC's ocorrem em correntes não pré-contaminadas, quando isto ocorre a morte dos peixes acontece imediatamente (Pignatello, 1983). Se for mantida a contaminação nestes níveis por um longo período de tempo, a letalidade de organismos superiores continuará por um período de semanas. O fenol e a maioria dos clorofenóis podem também induzir mutações em bactérias, leveduras (Smith, 1987) assim como em animais superiores e no homem (PAN, 2005).

Os clorofenóis são considerados persistentes em solos, concentrando-se nos locais de despejo de águas residuárias, domésticas, industriais e em reservas madeireiras. A degradação parcial de muitos clorofenóis produz metabólitos tais como cloro-catecóis ou produtos da clivagem de anéis clorados os quais inibem severamente o crescimento, como também suprimem o desenvolvimento de microorganismos utilizadores de haloaromáticos (Schmidt, 1983 e Aalard,, 1987). Devido à sua freqüente utilização como fungicidas e à sua presença nos efluentes das indústrias de celulose, exploração e produção de petróleo e petroquímica, os cloro fenóis com freqüência entram no meio ambiente.. Devido a sua natureza tóxica e baixa biodegradabilidade, o tratamento dos efluentes contendo clorofenóis é essencial na fonte de geração através pré-tratamentos físico-químicos ou biológicos Uma ampla variedade de tratamentos biológicos, aeróbios assim como anaeróbios, são empregados na indústria. Contudo, existe uma considerável variação na literatura sobre a eficácia destes sistemas de tratamento (Galvão, 1988; Bello-Ramírez, 2000 e Notanfonzo, 2000).

Tabela II-1. Sumário da toxicidade aguda por grupo de organismo para fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol e 2,4,6-triclorofenol (OSHA, 1996 e PAN, 2005).

| <i>Organismo</i> | <i>Fenol</i> | | <i>4-Clorofenol</i> | | <i>2,4-Diclorofenol</i> | | <i>2,4,6-Triclorofenol</i> | |
|-------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | <i>TAM</i> | <i>FTA</i> | <i>TAM</i> | <i>FTA</i> | <i>TAM</i> | <i>FTA</i> | <i>TAM</i> | <i>FTA</i> |
| Anfíbios | Levemente tóxico | Levemente | - | - | - | - | Moderado tóxico | Moderado tóxico |
| Anelídeos | Não tóxico agudamente | Não tóxico agudamente | - | - | - | - | - | - |
| Plantas aquáticas | Não tóxico agudamente | Não tóxico agudamente | Não tóxico agudamente | Não tóxico agudamente | Levemente tóxico | Levemente tóxico | Moderado tóxico | Moderado tóxico |
| Crustáceos | Levemente tóxico | Não tóxico a altamente tóxico | Levemente tóxico | Leve a moderado tóxico | - | - | Moderado tóxico | Moderado tóxico |
| Peixes | Levemente tóxico | Leve a altamente tóxico | Moderado tóxico | Leve a moderado tóxico | Moderado tóxico | Moderado tóxico | Moderado tóxico | Moderado a altamente tóxico |
| Insetos | Não tóxico agudamente | Não tóxico a moderadamente tóxico | - | - | - | - | Levemente tóxico | Levemente tóxico |
| Moluscos | Não tóxico agudamente | Não tóxico a levemente tóxico | - | - | - | - | Moderado tóxico | Moderado tóxico |
| Nematódeos | Não tóxico agudamente | Não tóxico a levemente tóxico | - | - | - | - | Altamente tóxico | Altamente tóxico |
| Fito-plâncton | Não tóxico agudamente | Não tóxico agudamente | - | - | - | - | - | - |
| Zôo-plâncton | Levemente tóxico | Não tóxico a moderadamente tóxico | Moderado tóxico | Leve a moderado tóxico | Moderado tóxico | Leve a moderado tóxico | Moderado tóxico | Moderado a altamente tóxico |

TAM: Toxicidade aguda média

FTA: Faixa de toxicidade aguda

Tabela II-2. Parâmetros de avaliação em humanos para níveis de exposição, carcinogenicidade e toxicidade aguda de fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol e 2,4,6-triclorofenol (PAN, 2005).

| <i>Parâmetro</i> | <i>Fenol</i> | <i>4-Clorofenol</i> | <i>2,4-Diclorofenol</i> | <i>2,4,6-Triclorofenol</i> |
|---|---------------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|
| MCL | - | - | - | - |
| <u>MCLG</u> | 6000 | 500 | 30 | 30 |
| ODHA (µg/L) | 6000 | 100 | 30 | 30 |
| TDHA (µg/L) | 4000 | 100 | 20 | - |
| LTHA(µg/L) | 600 | 10 | 3 | 0.3 |
| RfD (µg/kg/dia) | 20000 | 1000 | 100 | 10 |
| <u>Risco de vida estimado para câncer (casos por 1.000.000)</u> | - | - | - | 300 |
| Risco de Câncer | | | | |
| <u>IARC Carcinogênicos</u> | 3, não classificado | não listado | 2B, Possível | 2B, Possível |
| <u>U.S. NTP Carcinogênicos</u> | não listado | não listado | não listado | Razoável |
| <u>U.S. EPA Carcinogênicos</u> | D, não classificado | não listado | não listado | B2, Provável |
| <u>TRI Carcinogênicos</u> | não listado | não listado | não listado | não listado |
| Toxicidade Aguda | | | | |
| <u>WHO aguda - perigoso</u> | não listado | não listado | não listado | não listado |
| <u>TRI aguda - perigoso</u> | não listado | não listado | não listado | não listado |
| Etiqueta para o produto | Altamente tóxico | sem consenso Leve a | sem consenso | sem consenso |
| <u>U.S. NTP Estudos de toxicidade aguda</u> | Moderado tóxico | altamente tóxico | Levemente tóxico | Levemente tóxico |
| Inibidor de colinesterase | Não | Não | Não | Não |

MCL: Concentração máxima do poluente legalmente permitida em água potável.

MCLG: Meta de remoção para o nível máximo (MCLG), concentração máxima em efluentes que não causa efeitos nocivos.

ODHA: Concentração do poluente em água potável (1 L para uma criança com 10 kg de peso) que não causa efeitos carcinogênicos adversos pela exposição durante um dia.

TDHA: Concentração do poluente em água potável (1 L para uma criança com 10 kg de peso) que não causa efeitos carcinogênicos adversos pela exposição durante dez dias.

LTHA: Concentração do poluente em água potável que não causa efeitos carcinogênicos adversos pela exposição durante toda uma vida. O LTHA esta baseada na exposição de um adulto de 70 kg consumindo 2 L de água por dia.

RfD: A Dose de referência é a quantidade estimada do poluente que uma pessoa pode consumir por dia durante a vida sem incorrer em risco apreciável ou efeitos negativos.

Risco de câncer: o risco de câncer outras vezes chamado de “nível excessivo de risco de câncer” é a probabilidade estimada de uma concentração dada de um poluente em água potável que pode causar um novo caso de câncer numa população de 1.000.000 de pessoas. Este risco de câncer baseia-se nas seguintes hipóteses: Peso corporal de 70 kg e ingestão diária de pelo menos 2 litros de água durante toda uma vida. A exposição ao poluente acontece só através da bebida de água.

1.2. Tecnologias para biodegradação de compostos fenólicos em efluentes de refinaria

A indústria do petróleo, que se iniciou 150 anos atrás com a exploração comercial do primeiro poço, no Texas, EUA em 1859, e com a abertura da primeira refinaria para a produção de querosene dois anos depois, evoluiu para uma atividade industrial de grande porte, com processos altamente sofisticados de prospecção e produção. Apesar desta indústria adotar práticas de trabalho seguras, somente nos últimos 20 anos houve um aumento na preocupação com a preservação ambiental e o desenvolvimento de tecnologias mais limpas. Assim, a indústria de petróleos investe atualmente esforços no desenvolvimento de tecnologias com menores impactos ambientais, compatíveis com a eficiência e produtividade dos processos convencionais e tecnologias para tratamento de resíduos e efluentes (**Tabela II-3**)

A maioria dos estudos visa apenas a determinação da toxicidade do efluente final, não sendo analisadas as etapas de tratamento necessárias para a redução da toxicidade. A análise da toxicidade dos efluentes de diversas fases do tratamento permite estabelecer quais são os possíveis agentes tóxicos e sua capacidade de passar pelo sistema de tratamento. Entre os sistemas biológicos, os sistemas de lodos ativados são os que estão sendo empregados mais freqüentemente em refinarias dos Estados Unidos e Canadá.

Tabela II-3. Comparação entre as tecnologias convencionais e alternativas para a remoção de compostos fenólicos presentes em águas residuárias (Galvão, 1998; Bello-Ramírez, 2000 e Notarfonzo, 2000).

| <i>Tipo de Tecnologia</i> | <i>Eficácia</i> | <i>Geração de compostos tóxicos</i> | <i>Custo Relativo de Implementação do Tratamento</i> |
|---|-----------------|-------------------------------------|--|
| Adsorção em carvão ativado | Média | Alta | Baixo |
| Aeração | Alta | Alta | Baixo |
| Ozonificação | Alta | Mediana | Baixo |
| Processos avançados de oxidação (UV-Peróxido) | Muito Alta | Alta | Alto |
| Processos avançados de oxidação (Aeração – Adsorção) | Muito Alta | Alta | Alto |
| Degradação Microbiana | Mediana | Baixa | Baixo |
| Remoção enzimática | Alta | Baixa | Alto |
| Método de remoção biológica mista (Microbiana – Enzimática) | Muito Alta | Muito Baixa | Médio |

2. BIOCATÁLISE AMBIENTAL: USO DE ENZIMAS OXIDATIVAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

A capacidade de hemoproteínas de incorporar átomos de oxigênio a partir de oxigênio molecular em substratos orgânicos (atividade oxigenásica) e de usar peróxido de hidrogênio e outros peróxidos para oxidar substratos (atividade peroxidásica), amplamente ilustra a sua versatilidade catalítica.

A redução parcial do oxigênio a peróxido de hidrogênio e superóxido ocorre naturalmente na maioria dos sistemas biológicos. Estes produtos altamente oxidáveis e potencialmente perigosos são degradados por enzimas tais como a catalase e a superóxido dismutase. Outros biocatalisadores, tais como as oxidases lacase (LAC) de *Trametes versicolor* (Jönsson, 1997), *Pleurotus ostreatus* (Quinguo, 2005), *Cerrena unicolor* (Lauterrec, 1997) e tirosinase (PPO) de *Agaricus* sp (Atloe, 1983; Crecchio, 1995; Suitell, 1998 e Madani, 1999) e as peroxidases “horseradish” peroxidase (HRP) (Danner, 1972; Courteix, 1995 e Bakker, 2000), lignina peroxidase (LiP) de *Phanerochaete chrysosporium* (Smith, 1991 e Denizli, 2004), *coprinus* sp. (Keisuke, 2005) e *Streptomyces viridosporus* (Spiker, 1992; Yee, 1991 e Duran, 2000) e a cloroperoxidase (CPO) de *Caldariomyces fumago* (Bacocchi, 2001; Budde, 2001; Bougioukou, 2002 e La Rotta, 2002), são também capazes de utilizar o peróxido de hidrogênio e oxidar substratos, tais como a maioria dos compostos fenólicos. Estas enzimas são conhecidas por terem baixa seletividade catalítica, sendo capazes de remover famílias de compostos poluentes presentes em águas residuárias (**Tabela II-4**). Dependendo dos biocatalisadores, das condições reacionais e dos substratos, são formados produtos solúveis ou derivados oligo e poliméricos, que sendo insolúveis podem ser separados do meio líquido por simples filtração (Atlow, 1983 e Spiker, 1992). Alguns dos produtos de degradação enzimática podem corresponder a compostos metabolicamente compatíveis, úteis como nutrientes em um subsequente tratamento biológico.

O uso de enzimas em biocatálise ambiental é recente, sendo uma área em desenvolvimento no mundo todo. Considerando a variedade de oxidases e peroxidases microbianas e de origem vegetal existentes e a diversidade estrutural de compostos poluentes potencialmente degradáveis por *via* enzimática, é importante que se aprofundem os estudos visando o conhecimento dos mecanismos de oxidação. Este conjunto de dados possibilitará a adequação dos biocatalisadores para o tratamento de poluentes específicos e o desenho de misturas enzimáticas efetivas para efluentes complexos. Deve-se ainda considerar as propriedades físico-químicas dos catalisadores visando seu uso em condições extremas de pH, temperatura e força iônica.

Tabela II-4. Compostos poluentes reportados na literatura como alvo da degradação de enzimas oxidativas (Wada, 1994; Crecchio, 1995; Ortiz-León, 1995; Chen, 1999 e Rivas, 1999).

| <i>Xenobióticos</i> | Padrão de composto poluente | <i>Límite Permissível (mg/L)</i> |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Fenóis e Cresóis | Fenol | 0.039** |
| | o-cresol | 0.11** |
| | m-cresol | 0.36** |
| | p-cresol | 0.36** |
| Fenóis mono-substituídos | 4-etilfenol | |
| Fenóis di-substituídos | 2,3-dimetilfenol | 0.036** |
| | 2,4-dimetilfenol | 0.036** |
| | 2,5-dimetilfenol | - |
| | 2,6-dimetilfenol | - |
| | 3,4-dimetilfenol | - |
| | 3,5-dimetilfenol | - |
| Fenóis tri-substituídos | 2,4,6-triclorofenol | 0,01* |
| Cloro-fenóis | 2-clorofenol | 0.018** |
| | 3-clorofenol | 0.018** |
| | 4-clorofenol | 0.018** |
| | Tetraclorofenol | 0.018** |
| | Pentaclorofenol | 0.089** - 0.01* |
| | 2,4-Diclorofenol | 0.049** |
| | 2,5-Diclorofenol | 0.013** |
| Ciclohexanóis | Ciclohexanol | - |
| | 2-metilciclohexanol | - |
| | 3-metilciclohexanol | - |
| | 4-metilciclohexanol | - |
| Fenóis aminados | o-Aminofenol | 0.46** |
| | N-metil-4-cloroanilina | 0.40** |
| | Difenilamina | 0.52** |
| | p-Cloroanilina | 0.46** |
| | p-Nitroanilina | 0.028** |
| | Dibenzotiofeno | 0.061** |
| | Tiantreno | - |
| | 2-Hexadeciltiolana | - |
| <i>Compostos sulfurados</i> | Difenilsulfuro | - |

(*) Concentrações dos resíduos restritos e perigosos de acordo com o SLAP (Sistema de Licenciamento de Atividade Poluidoras) da FEEMA

(**) Concentrações reportadas pelo CCW (Constituent Concentrations in Wastes) da Regra 3745-59-43 da EPA (Environmental Pollution Agency);

2.1. Oxidases: Tirosinase e Lacase

A tirosinase e a lacase pertencem ao grupo de enzimas que contem cobre (sub-tipo I), também chamadas oxidases azuis. Estas enzimas estão caracterizadas pela presença de quatro átomos de cobre, os quais podem estar distribuídos em diferentes sítios de união dentro da proteína, o que define, além do sub-tipo, o seu papel no mecanismo de ação da enzima.

A tirosinase, também conhecida como polifenol oxidase (PPO) ou catecolase (E.C. 1.14.18.1), é uma enzima bifuncional que possui as atividades catecolásica e cresolásica. A enzima catalisa duas reações consecutivas, a hidroxilação de monofenóis com oxigênio molecular para formar *o*-bifenóis e a subsequente deshidrogenação para formar quinonas. Estas últimas, e em particular as 1,2-benzoquinonas, são instáveis podendo polimerizar-se independentemente da ação enzimática, originando a formação de pigmentos insolúveis em água (Crecchio, 1995). A tirosinase não mostra atividade na oxidação de *p* e *m*-benzenodióis (Atlow, 83).

A tirosinase é uma enzima muito bem caracterizada, amplamente distribuída em plantas, animais e em seres humanos. Na natureza oxida a tirosina formando pigmentos, tais como a melanina em mamíferos e giberelinas em plantas, produzindo escurecimento da superfícies de frutas e vegetais. As enzimas microbianas, provenientes principalmente dos fungos *Agaricus bisporus* (Crecchio, 1995) e *Neurospora crassa* (Fling, 1963), é um tetrâmero com massa molecular de 128 Kda, 4 átomos de cobre por molécula e dois sítios de união para compostos aromáticos, incluindo substratos fenólicos. Apresenta diferentes locais de união para o oxigênio e o cobre, este último provavelmente no estado cuproso. A enzima possui pH ótimo na faixa de 6.0 a 7.0, a sua inativação esta associada com o aumento de íons Cu^{2+} e é inibida não competitivamente por compostos quelantes do mesmo íon. O ácido benzóico é um inibidor reversível em relação ao substrato catecol e o cianeto como inibidor irreversível em relação ao oxigênio (Atlow, 1983). Observa-se para a tirosinase uma alta capacidade de eliminação de

compostos fenólicos por polimerização, que dificilmente seriam removidos de águas residuárias por procedimentos não enzimáticos. O tratamento de águas contaminadas com fenóis empregando tirosinase é igualmente efetiva em uma ampla faixa de concentrações e tipos de fenóis (Fenoll, 2002).

A lacase ou urishiol oxidase (E.C. 1.10.3.2) é uma das enzimas fúngicas mais amplamente envolvidas na biotransformação de compostos aromáticos. A enzima é obtida essencialmente a partir de fungos basidiomicetos como *Phanerochaete cryosporium*, *Trametes sp*, *Cerrena unicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Dichomitus squalens*. A lacase catalisa reações de oxidação que a tirosinase não é capaz de catalisar, especificamente a oxidação de *o*-, *m*- e *p*-benzenedióis para formar as correspondentes *o,m,p*-quinonas (Aitken, 1993).

Adicionalmente, a enzima catalisa reações cruzadas entre fenóis e outros compostos tóxicos presentes nas águas residuárias, como aminas aromáticas, originando polímeros similares aos obtidos a partir da reação espontânea entre os ácidos siríngico e vanílico, monômeros que fazem parte da estrutura da lignina (Duran, 2000). Catalisa também a oxidação de fenilendiaminas e aminofenóis, estes últimos responsáveis pela formação da maioria dos compostos corados presentes nas águas residuárias de refinarias.

Esta enzima foi estudada inicialmente para a detoxificação de hidrolisados de materiais lignocelulólicos a serem subseqüentemente usados em fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*, e para a identificação dos inibidores da fermentação. Trabalhos anteriores reportam a clonagem da lacase em vetores de fácil expressão heterologa como as leveduras *Pichia pastoris* e *S. cerevisiae* (Jönsson, 1997; Lauterek, 1997 e Cassland 1999).

Embora bons resultados tenham sido obtidos até agora, para a detecção e degradação de compostos fenólicos utilizando tanto a PPO quanto a lacase, melhores resultados têm sido

obtidos com o uso conjunto das duas enzimas, já que são geradas maiores quantidades de compostos poliméricos insolúveis, facilmente removíveis por filtração.

A literatura cita a imobilização destes biocatalisadores em suportes inorgânicos, tais como cerâmicas, vidros porosos e orgânicos como géis de alginato e de diotil-succinato. Nesse caso observa-se uma alta remoção de compostos fenólicos e aromáticos comuns em águas residuárias e suspensões aquosas. O emprego de enzimas livres mostra desvantagens, tais como instabilidade térmica, suscetibilidade ao ataque de proteases, inibição da atividade e a impossibilidade de reutilização. Essas desvantagens podem ser superadas com a imobilização, que além de melhorar a estabilidade da enzima, permite a operação contínua de reatores para o tratamento de grandes volumes de efluentes (Da Cruz-Vieira, 1999 e Fenoll, 2002).

2.2. Peroxidases: Horse-radish peroxidase, Lignina Peroxidase, Manganês peroxidase e Cloroperoxidase.

As peroxidases, que dependem da presença de peróxido para catalisar reações de peroxidação, podem ser obtidas de tecidos animais, vegetais e de microrganismos sendo capazes de oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e/ou inorgânicos (**tabela II-5**).

2.2.1. *Horse-radish peroxidase*

A “horse-radish” peroxidase (E.C. 1.11.1.7), e suas isoenzimas são encontradas em células e secreções de organismos superiores como leucócitos, plasma sanguíneo, leite, leveduras e em plantas como a *Armoracia rusticana* ou raiz forte (horseradish). A HRP apresenta um massa molecular de 40 kDa, pH ótimo 7,0 e pI 7,2. Seu sítio catalítico contém uma ferriprotoporfirina IX, e é inibida por cianeto e sulfeto (Courteix, 1995). A HRP catalisa reações de incorporação de oxigênio, incluindo epoxidação e reações de oxidação *via* um elétron para a formação de radicais peroxila, responsáveis pela ocorrência de reações espontâneas de polimerização. A ação da enzima, envolve predominantemente a formação de radicais hidroxila que resultam na formação de complexos do tipo P-Fe(II)-O₂H ou P-Fe(III)-O₂H, onde P corresponde à protoporfirina. Estes complexos são similares aos encontrados nas reações com citocromo P450. Devido a estas características a HRP é um biocatalisador importante na degradação de fenóis. Além disto apresenta baixos custos de produção, diferentemente daqueles observados para o citocromo P450 (Dunford, 1991 e Dimitris, 2002).

Apesar da versatilidade demonstrada por esta enzima na remoção de diferentes xenobióticos, existem poucos estudos sobre a sua imobilização para a aplicação no tratamento de efluentes. A enzima imobilizada em CNBr-sepharose 4B (Peralta-Zamora, 1998) e em cerâmica vitrificada

porosa de titânio-lítio (Peralta-Zamora, 1998), foi empregada na remoção de até 20% de compostos corados de efluentes da indústria de celulose. Bons resultados têm sido obtidos na remoção de fenol e 4-clorofenol com a enzima imobilizada em suportes orgânicos tais como celulose e nylon e inorgânicos com amberlita IRA-400 e alumina ativada (Siddique, 1993 e Peralta-Zamora, 1998).

2.2.2. *Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase*

A lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) são enzimas produzidas por fungos, bactérias (Tabela II-6) e plantas capazes de degradar a macromolécula natural lignina através da clivagem das uniões C(□)-C(□) da cadeia propílica, em presença de peróxido de hidrogênio e manganês no caso da MnP. Estas enzimas também catalisam as reações de hidroxilação de grupos metileno-benzila e a oxidação de fenóis e do álcool benzílico. Lignina peroxidase e manganês peroxidase apresentam valores de pH ótimos na faixa ácida para as enzimas de origem fúngica e alcalina para bacteriana. Espectroscopia de absorção eletrônica, espectroscopia por ressonância RAMAN e ressonância paramagnética indicam que a LiP fúngica possui tanto uma estrutura protéica como um sítio catalítico similares à dos da HRP. Estas semelhanças não se restringem apenas à composição em aminoácidos e à conformação, como também ao mecanismo de ação (Galvão, 1988; Novotny, 1998 e Ferrer, 1991).

Entre as isoenzimas da LiP fúngica as melhores caracterizadas a nível molecular, são as isoenzimas, LiP 2 e 6 do fungo *Phanerochaete crysosporium* e LiP C de *Trametes versicolor*. Tem sido também muito estudadas as enzimas vegetais de tabaco, LiP XT e NT e de *Plebia radiata*, LiP PH. A Tabela II-6 mostra uma relação de organismos produtores de LiP e MnP. A lignina peroxidase bacteriana de *Streptomyces* sp, além das diferenças estruturais com a LiP

fúngica, possui características e propriedades promissoras para a remoção de compostos fenólicos e não fenólicos.

Tabela II-5. Relação geral das peroxidases, suas fontes, doadores naturais de elétrons, propriedades e funções (Courteix, 1995).

| <i>Peroxidase</i> | <i>Fonte</i> | <i>MM (kDa)</i> | <i>Grupo Prostético</i> | <i>Doador natural de elétrons</i> | <i>Função</i> |
|-----------------------------|---|---------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--|
| Horse-radish peroxidase | Raiz forte | 40-42 | Ferri-ppIX | Indol-3-acetato | Controle do nível do hormônio indol-3-acetato |
| Raiz japonesa Peroxidase | Raiz japonesa | 41-55 | Ferri-ppIX | Idem | Idem |
| Turnip peroxidase | Nabo | 38-51 | Ferri-ppIX | Idem | Idem |
| Cloro peroxidase | <i>Caldarimyces fumago</i> | 42 | Ferri-ppIX | Cloreto | Produção do antibiótico caldariomicina |
| Bromo peroxidase | <i>Ascohyllum nodosum</i> | 90 | Vanadio (V) | Brometo | Brominação de vários compostos orgânicos |
| Glutation peroxidase | Células de mamíferos | 90 | Selenio | Glutation reduzido | Armazenagem de glutation |
| Citocromo c peroxidase | Levedura de padeiro e <i>Pseudomonas aureginosa</i> | 34 e 43-44 | Ferri-ppiIX e Heme C | Ferro-cit c | Aceptor de electrons na cadeia respiratória |
| Mielo peroxidase | Neutrofilo, granulócito e monócito | 144 | Ferriclorin- formila | Cloreto | Antibacteriana |
| Eosinófilo peroxidase | Eosinófilo, granulócito | 72 | Ferri-ppIX | Brometo, iodeto | Antibacteriana |
| Lacto peroxidase | Leite, saliva, lágrimas | 77-78 | Ferri-ppIX | Tiocianeto, iodeto | Antibacteriana |
| Tiróide peroxidase | Glândula tiróide | 77-77 | Ferri-ppIX | Iodeto | Produção de tiroglobulina |
| Lignina peroxidase | Ver tabela II-6 | 40-45 | Ferri-ppIX | Álcool veratrílico | Degradação da lignina |

Tabela II-6. Microorganismos produtores de enzimas ligninolíticas (Duran, 2000).

| <i>Microorganismo</i> | <i>Enzima</i> |
|---|-------------------|
| <i>Bjerkandera adusta</i> (Polyporous adustus), <i>Chrysosporium pruinsum</i> , <i>Fomes lignosus</i> (<i>Rigidosporus microsporus</i> , <i>Trametes versicolor</i> (<i>Coriolus versicolor</i>)) | LiP, MnP e Lac |
| <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Phlebia brevispora</i> | LiP, MnP |
| <i>Chrysonilia sitophila</i> | LiP |
| <i>Chrysosporium lignorum</i> | LiP e MnP |
| <i>Corioloopsis occidentalis</i> , <i>Corioloopsis polyzona</i> , <i>Coriolus hirsutus</i> , <i>Coriolellus sepium</i> , <i>Ganoderma</i> <i>valesiacum</i> , <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> , <i>Stereum hirsutum</i> , <i>Trametes gibbosa</i> | LiP |
| <i>Corioloopsis gallica</i> | Lac |
| <i>Coriolus consors</i> | LiP |
| <i>Daedaleopsis confragosa</i> , <i>Trametes vilosa</i> | MnP |
| <i>Dichomitus squalens</i> | MnP |
| <i>Hohenbuehlia grisea</i> <i>Lentinula edodes</i> , , <i>Panus aida</i> , <i>Panus rudis</i> , <i>Pleurotus sajor-caju</i> , <i>Phaeocoriolellus trabeus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Polyporaceae</i> | LiP , MnP |
| <i>Panus tigrinus</i> | MnP |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | LiP e MnP |
| <i>Phellinus pini</i> | LiP |
| <i>Phlebia radiata</i> | LiP e MnP |
| <i>Pleurotus eryngii</i> | LiP |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trametes hísida</i> | LiP, MnP e Lac |
| <i>Polyporus ostreiformis</i> | LiP |
| <i>Rigidosporus lignosus</i> | MnP |
| <i>Streptomyces viridosporus</i> | LiP |

2.2.3. Cloroperoxidase

A cloroperoxidase (E.C. 1.11.1.10), produzida pelo fungo *Caldariomyces fumago* corresponde a uma hemoglicoproteína cujo centro prostético é uma ferriprotoporfirina IX de coeficiente de extinção molar (λ 480 nm) de $2,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Hager, 1965; Nicell, 1988; Avon, 1998 e Loughlin, 2000). Esta enzima monomérica de massa molecular de 42 kDa, é talvez a mais versátil das peroxidases conhecidas, sendo bastante similar às peroxidases de plantas *Horseradish* e *Japanese radish* em relação ao conteúdo de carboidratos, propriedades espectrais e massas moleculares. (**Figura II-1**).

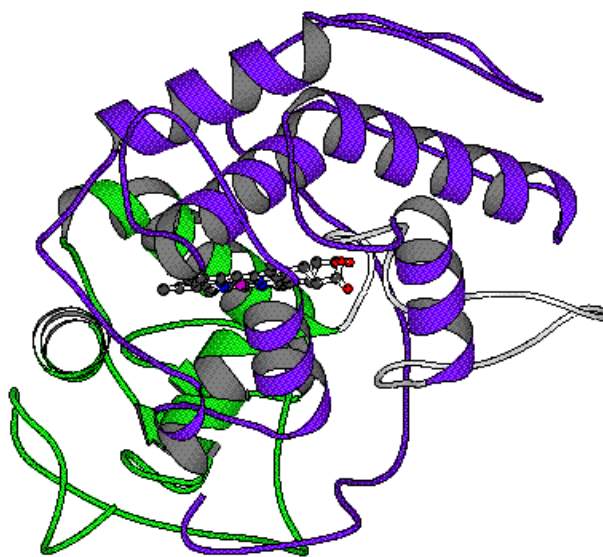


Figura II-1. Estrutura terciária da cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*

Fonte: Enzyme and Peptide Data Base <http://expasy.ch/enzyme>

A cloroperoxidase, assim como o citocromo P-450, corresponde a catalisadores altamente versáteis. Como ilustra a **figura II-2**, a enzima pode atuar como: peroxidase ($2 \rightarrow 7 \rightarrow 8 \rightarrow 2$) através da oxidação de substratos com a simultânea redução de peróxido de hidrogênio para

água; atividade de catalase ($2 \rightarrow 7 \rightarrow 2$) pela degradação de peróxido de hidrogênio a oxigênio e água, e como halogenase ($2 \rightarrow 7 \rightarrow 9 \rightarrow 2$).

De forma semelhante a outras hemoperoxidasas, que podem bromar ou iodar aceptores de halogênio, tais como β -dicetonas usando íons haleto como fonte de halogênio, a cloroperoxidase clora substratos orgânicos usando tanto cloreto como clorito, no último caso sem necessidade de peróxido de hidrogênio (Hager, 1965; Fang, 1986 e Aoun, 1998). Recentemente, foi encontrado para cloroperoxidase a capacidade de catalisar algumas reações próprias do citocromo P-450, tais como N-desalquilação de N-alquilaminas, epoxidação de alquenos e conversão de sulfetos para sulfóxidos (Carmaichael, 1985; Kiljunen, 1999 e Loughlin, 2000). Nos dois últimos casos, o átomo de oxigênio transferido provém do peróxido de hidrogênio (peroxidação). Assim, a cloroperoxidase pode realizar reações de um elétron (peroxidase), como também de dois elétrons (peroxigenase). Outras reações mostram grande similaridade entre cloroperoxidase e citocromo P-450 em relação ao mecanismo de oxo transferência a estireno, sulfoxidação de metionina e cloração de ciclopentanodiona (Manoj, 2001; Van der Velde, 2001 e Vázquez-Duhalt, 2001).

Embora possam ser preparados derivados Fe(II) de cloroperoxidas, os ciclos de reação da enzima envolvem somente Fe(III) e estados de oxidação maiores (**Figura II-2**). Para cada uma das reações catalisadas pela cloroperoxidase já mencionadas, o primeiro passo envolve a adição de peróxido de hidrogênio ao Fe(III) de alto spin em estado de repouso (2) para produzir um intermediário oxidado ferro-oxo de dois elétrons conhecido como composto I (7). No caminho da reação de peroxidação, o composto I é novamente reduzido para o estado de repouso Fe(III), em dois passos, através de uma segunda espécie de ferro-oxo de alta-valência chamada composto II (8). Na reação de catalase, o estado (7) oxida uma segunda molécula de peróxido a oxigênio, o qual devolve ao ferro do agrupamento heme para estado de repouso (2). No caminho

da halogenação, o ion haleto pode interagir diretamente com o oxo-oxigênio do composto I para produzir o composto X (9), correspondente a um derivado de hipoclorito férrico. Os detalhes exatos de como a cloroperoxidase halogena hidrocarbonetos não têm sido estabelecidos completamente.

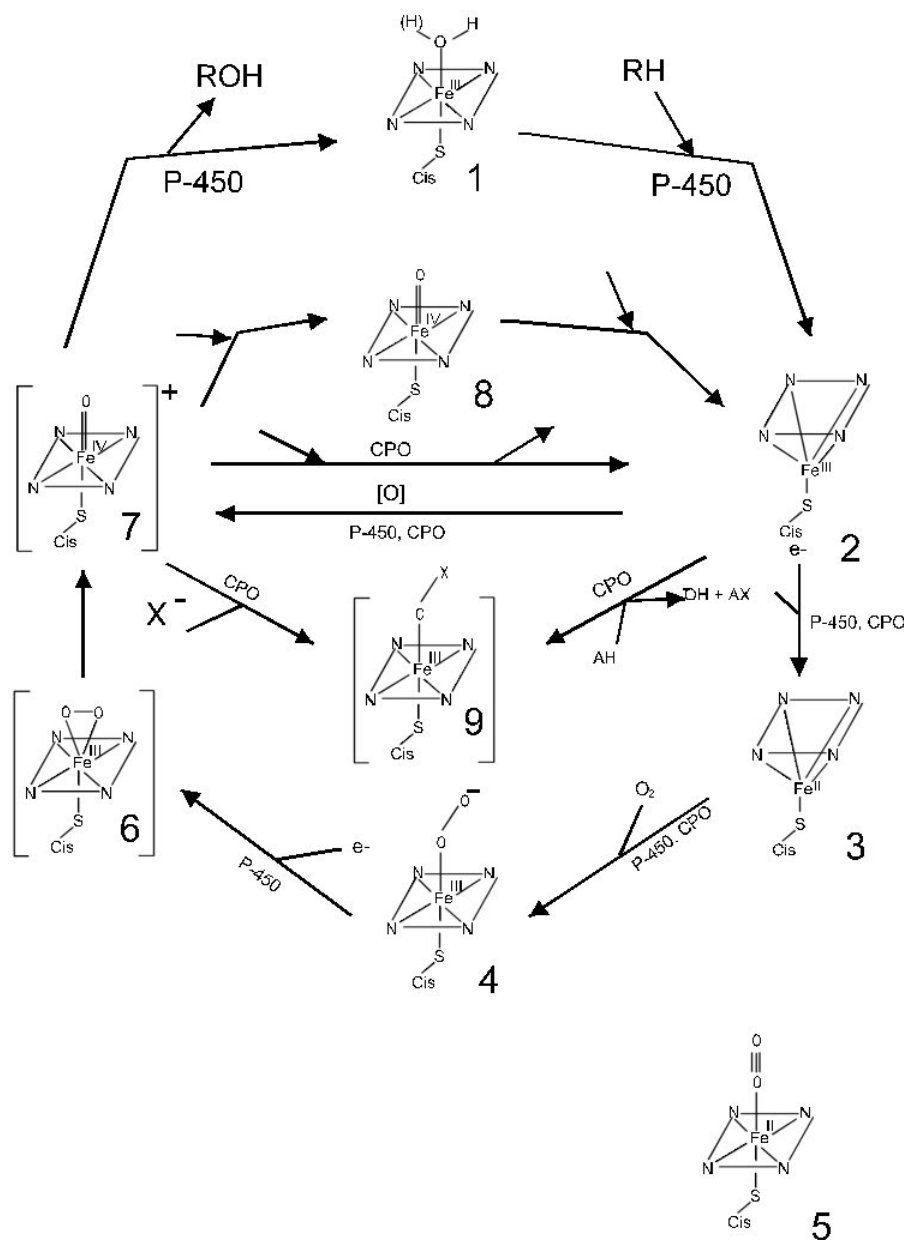


Figura II-2. Ciclos catalíticos para cloroperoxidase e citocromo P-450 e as estruturas propostas dos intermediários (Wagenknecht, 1997).

Estas atividades diferenciadas são dependentes do valor de pH e da presença de íons haleto (Hager, 1965). A composição em aminoácidos predominantemente ácidos confere-lhe um valor de pI em torno de 4,0, sendo a enzima estável na faixa pH de 2,75 a 6,0. Máximas atividades halogenásica e catalásica são observadas na faixa de pH de 2,8 a 3,0 e monoxigenásica e peroxidásica de 5,0 a 6,0.

O gene estrutural da cloroperoxidase foi isolado, clonado e sequenciado, permitindo a sua amplificação em vetores tais como *S. cerevisiae*. Adicionalmente o conhecimento da estrutura da proteína possibilitou a obtenção de mutantes protéicos resistentes a inativação em meios com alto conteúdo de solventes (Van der Velde, 2001 e Ayala, 2002). A cloroperoxidase pode utilizar diversos íons haleto como cloreto, brometo e iodeto e catalisar a formação de ligações carbono-halogênio na presença de um aceptor adequado como, β -ceto ácidos, β -dicetonas e fenóis substituídos. Esta reação de halogenação pode ser evitada em alguns casos controlando o valor de pH e a ausência ou presença de íons haleto no meio reacional (Hager, 1965 e Hoekstra, 1998).

Existem poucos trabalhos sobre a degradação de fenóis clorados empregando cloroperoxidase, e a maioria dos trabalhos que reportam o uso da CPO ou outras peroxidases na oxidação de compostos fenólicos nitrados, aminados, metoxi e polihidroxi-substituídos (Carmichael, 1985; Manoj, 2001 e La Rotta, 2002). Estes estudos abriram a possibilidade do emprego da cloroperoxidase na remoção de fenol em concentrações de até 1 g/L (Carmichael, 1985; Pickard, 1991). Assim, sob condições não otimizadas os produtos originados a partir das reações catalisadas por CPO corresponderam a produtos solúveis ou poliméricos similares aos obtidos pela degradação usando HRP, catalase e tirosinase (Zadrazil, 1996; Toy, 1998 e Vazuquez-Duhalt, 2001).

A enzima tem sido imobilizada com êxito em vários tipos de suportes tais como sílica, hidroxiapatita, alginato e vidro aminopropílico (Pickard, 1988 e Sidique, 1993). O uso potencial da enzima envolve não só o tratamento de efluentes e resíduos da indústria petrolífera, mas também a sua aplicação nas outras frações do petróleo cru, incluindo a fração pentano precipitável do petróleo (asfaltenos) que apresenta um alto teor de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e metais pesados. Além de realizar reações de desmetalização sobre núcleos de protoporfirinas IX, comumente achados na fração pesada do petróleo ou asfaltenos, a enzima é capaz de realizar processos oxidativos sobre compostos nitrogenados e sulfurados (Mogollón, 1996; Van der Velde, 1999 e La Rotta, 2002).

3. DEGRADAÇÃO BIOCATALÍTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS MONOSUBSTITUÍDOS USANDO CLOROPEROXIDASE DE *Caldariomyces fumago*.

Em trabalhos prévios (La Rotta, 2002) desenvolvidos durante o projeto de tese de mestrado foi estudada a degradação de 4-clorofenol (4-CP), 3-clorofenol (3-CP), 4-metoxifenol (4-MP), 3-metoxifenol (3-MP), *para*-cresol (PCR), *meta*-cresol (MCR), *ortho*-fenilfenol (2-PP) e *para*-fenilfenol (4-PP), presentes em águas residuárias de refinarias, pela enzima cloroperoxidase (CPO).

Condições reacionais relacionadas com a concentração de CPO (3,5 UI/mL), presença de íons cloreto (20 mM) e pH (3,0 e 6,0) foram definidas em experimentos preliminares utilizando-se *orto*-aminofenol (OAP) como substrato.

As concentrações dos compostos fenólicos nas misturas reacionais foram definidas com base nas concentrações geralmente encontradas nos efluentes de refinaria. Assim foram realizados experimentos preliminares em que se variou a concentração dos compostos fenólicos de 0,125 a 100 mM, mantendo-se constante a concentração de peróxido de hidrogênio em 4 mM. A partir dos tipos de produtos obtidos, foram definidas as concentrações de 0,5; 5,0 e 50 mM para a continuação dos estudos.

Subseqüentemente estudou-se o efeito das concentrações absolutas e de diferentes relações estequiométricas fenol:peróxido, utilizando uma matriz experimental em que foram variadas as três concentrações anteriormente selecionadas em relação a concentrações de peróxido na faixa 0,005 a 50 mM.

A remoção dos fenóis foi também estudada em misturas reacionais com a presença concomitante de dois fenóis com concentrações equimolares (5,0 mM) de fenol total e peróxido. A eficiência das reações de oxidação foi avaliada pelo grau de remoção dos fenóis. Dependendo

das condições reacionais, foram obtidos produtos corados e/ou insolúveis e/ou a formação de precipitados escuros. A oxidação enzimática dos fenóis 4-CP, MCR e 3-MP resultou na formação predominante de derivados corados, e/ou de baixa solubilidade (soluções turvas) e/ou produtos insolúveis (precipitados escuros), indicando a oxidação nas posições 1 e 2 do anel aromático. Os fenóis 3-CP, PCR, 4-MP e 4-PP geraram produtos oxidados solúveis, sugerindo oxidação em outras posições. A concentração absoluta do peróxido e do composto fenólico e sua relação estequiométrica influenciaram no tipo de produto e na intensidade das reações.

Níveis máximos de degradação, para todos os compostos ocorreram em pH 6,0 com concentrações equimolares (1,0 mM) de peróxido e de fenol. Nestas condições observou-se remoção em torno de 95%, com formação de produtos corados, insolúveis e precipitados para os fenóis 4-CP, MCR e 3-MP. Nas mesmas condições, foi observado para 3-CP, PCR e 4-MP degradações máximas de 70%, sem formação de precipitado. Baixa degradação foi observada para o 4-PP, com um máximo de 10%. O 2-PP não foi oxidado pela CPO. Os resultados correspondentes aos testes com misturas binárias demonstraram a existência de remoção por precipitação induzida de 4-PP, 3-CP, PCR e 4-MP quando 4-CP, MCR ou 3-MP estavam presentes. Foram observados incrementos na faixa de 20 a 40 % na remoção de 3-CP, PCR e 4-MP.

Análise por CLAE dos produtos oxidados solúveis de 4-CP, MCR ou 3-MP, confirmou a presença de produtos com massas moleculares superiores aos substratos iniciais sugerindo a ocorrência de reações secundárias de polimerização não enzimáticas.

Como foi mencionado anteriormente, o estudo das reações catalisadas por oxido-redutases, como as peroxidases e oxidases vêm recebendo muita atenção como catalisadores da polimerização oxidativa do fenol, anilina e derivados na produção de novos poliaromáticos (Nicell, 1993; Ghiourelotis, 1999 e Quingguo, 2005). Estas enzimas oxidativas podem agir em

meio aquoso ou na presença de solventes miscíveis com água para a polimerização oxidativa. A polimerização ocorre a temperatura ambiente e os compostos poliméricos são freqüentemente pouco solúveis precipitando-se o que facilita sua coleta por filtração. A catálise por peroxidase induz à polimerização de compostos fenólicos formando polifenóis de tamanhos e propriedades diferentes, dependendo da composição do monômero de partida, da composição do meio e da origem da enzima.

4. ESTABILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A conformação nativa de um biocatalizador pode ser estabilizada através do reforço da sua estrutura. Contudo, as reações químicas de modificação incluindo entre-cruzamento ou *crosslinking*, amidação, alquilação redutiva, assim como as imobilizações têm sido estudadas. As reações de entre-cruzamento de proteínas podem ser alcançadas pelo uso de compostos bifuncionais tais como glutaraldeído que reage com as cadeias laterais nucleofílicas dos resíduos aminoácidos (amino livres) presentes na lisina e sobre o grupamento N-terminal assim como nos grupamentos sulfidríla da cisteína (Pickard, 1991 e Ayala, 2002).

A modificação química pode ser feita igualmente por carbodiimidas e diaminas cujos alvos correspondem aos resíduos amino-acidos com grupamentos carboxílicos presentes nos ácidos aspártico e glutâmico, grupamentos imidazolila em histidina, e tioéter na metionina (Wong, 1992). Compostos bifuncionais podem ser classificados como: comprimento-zero, homofuncionais e heterobifuncionais, os quais variam em estrutura, reatividade e grau de especificidade (Wong, 1992). Os *cross-linkers* de comprimento zero, tais como carbodiimidas, derivados isoazólio, cloroformiatos e carbonildiimidazóis, que induzem a formação direta de ligações entre duas diferentes espécies químicas, podem ser usados individualmente ou concomitantemente com outros reagentes bifuncionais como o glutaraldeído, aumentando com isto a eficiência e o grau da modificação (Wong, 1992 e Ayala, 2002). A reatividade dos grupamentos amino-acidos presentes na cadeia lateral e a reatividade relativa dos nucleófilos varia de acordo com a estrutura eletrônica, o *pK* de um grupo funcional relevante e o microambiente. Portanto, várias cadeias laterais de aminoácidos podem reagir com o mesmo reagente bifuncional causando intracruzamento (dentro da mesma cadeia) ou intercruzamento (entre cadeias diferentes). Embora a extensão da modificação pode melhorar a estabilidade da enzima ao imitar os “grampos” naturais como são os grupamentos dissulfeto, com frequência diminuem a atividade do biocatalito com o aumento do enrijecimento da estrutura protéica.

4.1. Estabilidade da CPO: efeito das condições reacionais; inativação por peróxido de hidrogênio.

A cloroperoxidase por ser o menos usual tipo de peroxidase e por possuir um mecanismo catalítico não completamente elucidado. Este fato, apresenta também desvantagens quanto aos mecanismos de inativação. Porém compartilha com muitas das peroxidases e em especial com o citocromo P 450 um mecanismo de oxido-redução bastante estudado.

Este mecanismo inclui um primeiro passo de ativação, no qual o peróxido de hidrogênio transforma o grupo ferro (III) porfirínico em um radical π baseado em oxo-ferro(IV)porfirínico, correspondente ao composto I da **Figura II-3**. Subseqüentemente, o composto I pode seguir três caminhos alternativos: no primeiro, a oxidação de um substrato para formar o oxo-ferro-(VI) porfirina sem a porfirina associada ao radical π (composto II), de acordo com o caminho 2 da **figura II-3**; o segundo passo, corresponde à reação com o íon cloreto para formar o grupo ClO-ferro(III)porfirínico, chamado de composto X (caminho 4, **Figura II-3**), o qual parece responsável pela atividade de halogenase. Adicionalmente, este composto X catalisa reações oxidativas pela liberação de um íon cloreto (caminho 7, **Figura II-3**). Depois que ambas as reações acontecem, o composto X retorna ao estado nativo de ferro(III)porfirina (caminhos 5 e 6, **Figura II-3**). Finalmente a cloroperoxidase mostra uma significativa atividade catalítica (caminho 8, **Figura II-3**), na qual o composto I reage com uma segunda molécula de peróxido para formar um intermediário da enzima com três átomos de oxigênio, que se decompõe para produzir quantidades estequiométricas de oxigênio, água e CPO na forma nativa (Valderrama, 2002).

A CPO é significativamente resistente à inativação por peróxido de hidrogênio ou por outros peróxidos orgânicos devido a sua atividade catalásica intrínseca. Porém, a exposição da enzima

a grandes quantidades de peróxido (30 mM) a inativa irreversivelmente. Contudo, números de *turn-over* muito altos podem ser alcançados com reatores em lote alimentados acoplados a um controlador para adição de peróxido. Na atualidade nenhuma informação está disponível sobre os intermediários de CPO durante o processo de inativação mediado por peróxido.

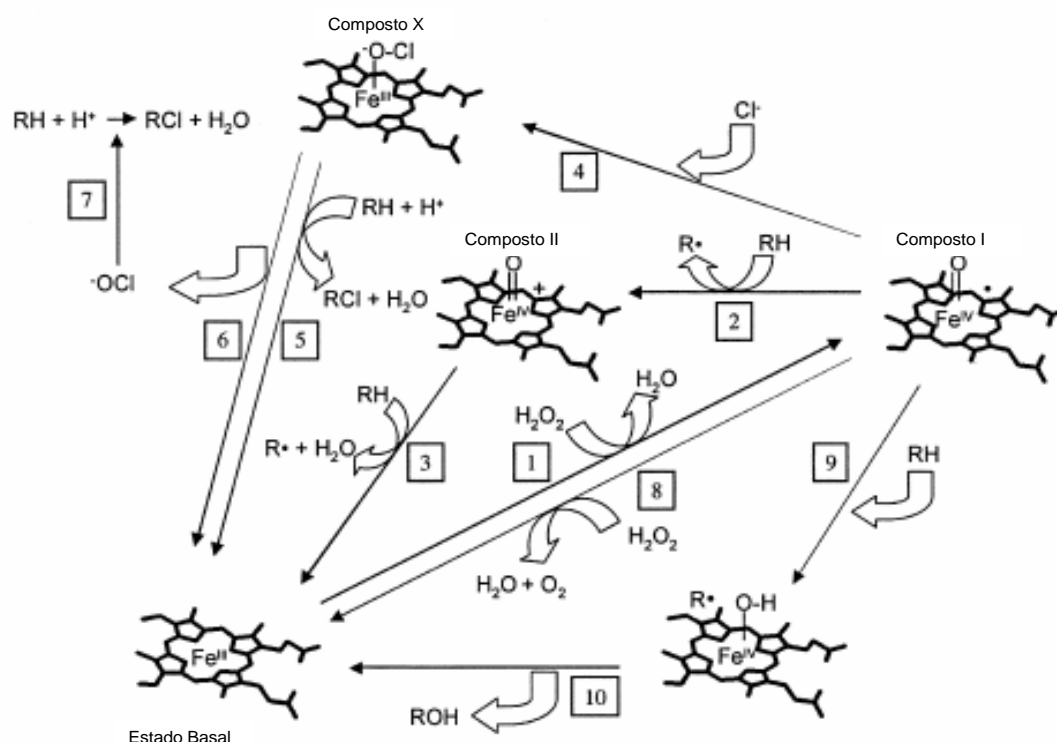


Figura II-3. Resumo do ciclo mecanístico para as peroxidases (Valderrama, 2002).

A auto-inativação da cloroperoxidase tem sido reportada já nos primeiros trabalhos sobre este versátil biocatalisador (Hager, 1965 e Morris, 1965), e desde então vários pesquisadores têm estudado este inconveniente fenômeno a partir de diferentes ângulos, porém sem muito sucesso. Uma enzima pode cometer auto-inativação por muitos motivos, porém considerando prévios trabalhos sobre a inativação de peroxidases e oxidases, existem cinco principais motivos pelos quais isto pode acontecer (Bayton 1994; Valderne, 2002 e Valderrama, 2002).

- O produto final da reação enzimática permanece ligado à enzima e a torna incompetente.

- Existe um produto único final para a reação a partir de um único substrato.
- Como resultado da reação enzimática, uma molécula reativa é produzida que pode atacar a estrutura da enzima e inativando-a.
- A enzima ataca outras moléculas da mesma proteína causando perda da atividade com o decréscimo do numero de moléculas protéicas ativas.
- A enzima, durante a reação, perde sua estabilidade estrutural.

É de se esperar que a enzima, além dos mecanismos de inativação por peróxido já reportados para outras peroxidases, siga também os mesmos processos que inativam oxidases como a tirosinase e a lacase durante a oxidação de compostos fenólicos. Peroxidases, lacase ou tirosinases catalisam a oxidação de compostos fenólicos usando tanto peróxido como oxigênio molecular, gerando pela sua vez radicais fenoxi- que reagem com eles mesmos ou outros compostos fenólicos formando dímeros (La Rotta, 2002). Estas reações, eventualmente e dependendo do tipo de espécie fenólica presente no meio reacional podem produzir grandes oligômeros (soluções turvas) ou polímeros de baixa solubilidade, os quais precipitam facilmente e podem ser retirados por sedimentação ou filtração. Contudo estes mesmo produtos de oxidação, obtidos durante a geração dos radicais fenoxi podem causar a inativação da enzima pela reação direta *via* bases de Shiff entre o fenoxi- radicais (grupo carbonila) e os grupamentos amino presente na proteína. Vários estudos tem sido conduzidos para tentar solucionar este problema, especialmente para o caso de lacase e tirosinase aonde as estruturas protéicas tem sido protegidas *via* modificação química com polímeros e com compostos de baixa massa molecular (Ghiourelitis, 1999; Liu, 2002 e Garcia-Molina, 2005).

4.2. Estabilização de cloroperoxidase através da modificação química

Embora CPO tenha sido estudada pela sua grande gama de aplicações, desde a síntese em química fina até na biocatálise ambiental, seu uso tem sido diminuído pela instabilidade nas condições indústrias, fato freqüentemente observado para outros biocatalitos. Não obstante, a CPO já tenha sido modificada pelo uso de vários *cross-linkers*, somente o glutaraldeído tem sido capaz de produzir CPO solúvel cataliticamente ativa, assim como cristais insolúveis (Tisher, 1999 e Ayala, 2002). Contudo, a alta reatividade desse reagente prevê o uso de um adequado excesso molar a fim de evitar o sobre-cruzamento dentro da estrutura da molécula protéica ou o aparecimento de entre-cruzamento entre proteínas individuais podendo danificar a atividade enzimática. Uma possível estratégia para solucionar este problema poderia envolver o pré-tratamento com carbodiimidas ou diaminas para aumentar o número de grupamentos amino livres antes do subsequente passo de entrecruzamento com glutaraldeído. Variantes da CPO com alta estabilidade também têm sido obtidas através do simples passo de entrecruzamento com carbodiimidas. Certamente, como cloroperoxidase contém um grande número de resíduos dos aminoácidos ácido aspártico e glutâmico, poderia ser viável o *design* através do emprego de aminas bi-funcionais a obtenção de ligações intramoleculares entre estes resíduos com grupamentos carboxílicos (Ayala, 2002). O arranjo tridimensional de uma proteína alvo da modificação deve ser conhecido para poder realizar este processo. Baseados nesta informação dada pelo sequenciamento, e pela conformação protéica obtida através de difração de raios X, é também possível encontrar uma diamina apropriada para cobrir a distância entre dois grupamentos carboxílicos em moléculas protéicas adjacentes (Ayala, 2002; Wagner, 2002).

Igualmente, mudanças nas características superficiais da CPO têm sido alcançadas através da remoção das suas unidades de carboidrato presentes na estrutura pela desglicosilação com a enzima N-glicosidase-F (peptido N4-[N-acetil]- β -glucosaminil) previamente usada com outras peroxidases (Vazquez-Duhalt, 1992). A desglicosilação aumenta a hidrofobicidade, uma propriedade alterada igualmente pela alquilação redutiva que elimina os grupamentos amino

livres pelo acoplamento com um grupamento hidrofóbico (geralmente aril ou alquil aldeídos), seguido pelo tratamento com um agente redutor (Ex. cianoboroidreto) (Friedman, 1974).

4.2.1. Alquilação e arilação redutivas de grupamentos amino.

A alquilação redutiva corresponde a um método altamente específico para a modificação de grupamentos amino sob condições reacionais relativamente moderadas. Este processo pode ser aplicado para a maioria das proteínas exceto para aquelas com componentes facilmente reduzíveis ou com grupos prostéticos tais como fosfato de piridoxal e rodopsina, ou para aquelas que não sejam estáveis nas condições alcalinas requeridas para a reação de alquilação.

Vários aldeídos simples e cetonas reagem rápida e irreversivelmente com os grupamentos amino das proteínas. Nem sempre o aduto ou a base de Schiff, que são formados a partir da desidrogenação são muito estáveis em soluções aquosas diluídas, porém a modificação extensiva dos grupamentos amino de uma proteína pode ser obtido pela redução da base de Schiff a uma amina secundária mais estável (**Figura II-4**).

A alquilação redutiva pode ser realizada com diversos aldeídos ou cetonas, de tamanho, forma e hidrofobicidades diferentes, sob condições de reação moderadas empregando boroidreto ou cianoboroidreto de sódio como agentes redutores. Sob estas condições, ambos os grupamentos α - e ϵ -amino são facilmente modificados, porém outros grupamentos comuns na superfície da proteína não são afetados, desde que os grupamentos a serem modificados não experimentem grandes mudanças na sua basicidade, em pH neutro, restando suas cargas catiônicas. Em contraste com muitos outros procedimentos para modificação de proteínas, a alquilação redutiva freqüentemente tem surpreendido pelo pequeno efeito sobre as propriedades físico-químicas ou as propriedades biológicas das proteínas modificadas (Kadima, 1998).

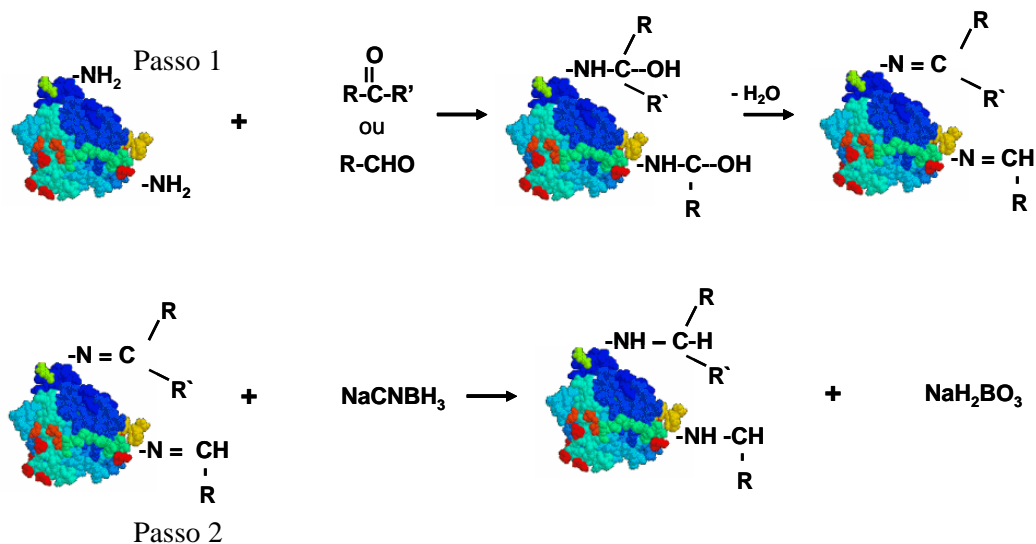


Figura II-4. Mecanismo da alquilação de grupamentos amino por aldeídos e cetonas (Passo 1) . Modificação química extensiva pela redução da base de Schiff até uma amina secundária mais estável (Passo 2). Fonte: Imagem editada a partir da CPO 3D molecular view: <http://expasy.ch>

A alquilação redutiva não somente preserva as cargas positivas dos grupamentos amino, mas também em contraste com outros métodos não muda a localização aproximada dessas cargas. Por exemplo, com compostos carbonílicos pequenos tais como formaldeído e acetaldeído, a alquilação redutiva tem pouco ou nenhum efeito na distribuição de cargas, causando o mínimo de distúrbio nas interações eletroquímicas existentes.

A análise de ϵ -mono e di-alquil derivados de lisina, podem ser identificados e quantificados usando analisadores de amino-acidos, porém na pratica estes derivados alquilados são eluídos bastante próximos à lisina e na maioria dos sistemas usualmente ocorre o sobre-posicionamento. As separações variam com diferentes resinas e são sensíveis às leves diferenças de temperatura, pH e força iônica, assim como na presença de solventes orgânicos. Geralmente a quantificação

da extensão da modificação é realizada pelo método do ácido tinitrobenzensulfônico (TNBS). Sendo que amins secundárias e terciárias não reagem com o TNBS o decréscimo na reatividade dos grupamentos aminos quando comparada com a reatividade da proteína não modificada, indica o grau de modificação (Habeeb, 1966).

4.2.2. Entrecruzamento com reagentes bifuncionais

Se a base molecular da inativação é um reflexo da perda das estruturas secundária e terciária de uma proteína, a conformação ativa desta poderia ser reforçada através da inserção de “grampos” (reagentes de entrecruzamento) similares a aqueles já existentes em algumas proteínas, como são as pontes disulfeto. A **Figura II-5** mostra como o entrecruzamento químico aumenta a reticulação da proteína, diminuindo a entropia entre a cadeia polipeptídica, conseguindo com isto o decréscimo da velocidade de desnaturação.

O entrecruzamento químico de proteínas pode ser facilmente alcançado pelo uso de reagentes bifuncionais em comparação com monofuncionais (Wong, 1973). Os reagentes bifuncionais são essencialmente agentes de modificação que podem ser classificados em entrecruzadores de comprimento zero, homofuncionais e heterofuncionais. Estes compostos reagem quimicamente com as cadeias nucleofílicas laterais dos aminoácidos, tais como sulfidril na cisteína, amino em lisina e aminoácidos N-terminais; grupamentos carboxílicos dos ácidos aspártico e glutâmico e aminoácidos C-terminais; também podem reagir com grupamentos imidazolila presente em histidina, e tioéter em metionina. A especificidade destes reagentes para um determinado aminoácido de cadeia lateral depende da relativa reatividade do nucleófilo. Já que a nucleofilicidade é função da estrutura eletrônica, do pK_a e do micro-ambiente, a reatividade de um aminoácido de cadeia lateral geralmente não é específica e várias cadeias podem ser modificadas pelo mesmo reagente. Contudo, em geral o íon tiolato é o melhor nucleófilo (Friedman, 1974). Assim o grupamentos sulfidril das proteínas reagirão com a maioria dos entrecruzadores em pH

alcalino. Em proteínas nas quais unidades de sulfidrina não estão disponíveis, o grupamento amino se torna o alvo da reação.

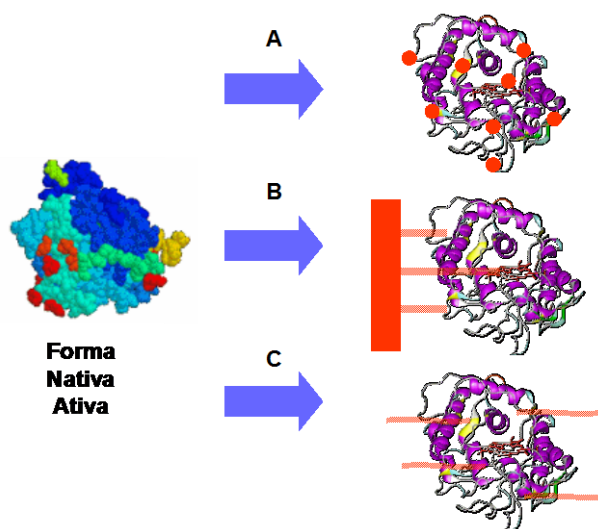


Figura II-5. Estabilização por entrecruzamento intra- e intermolecular. (A) Entrecruzamento intramolecular multi-pontual. (B) Entrecruzamento multi-pontual intermolecular a um suporte sólido. (C) Entrecruzamento multipontual intermolecular a uma entidade solúvel. Fonte: Imagem editada a partir da CPO 3D molecular view: <http://expasy.ch>

Dentre os reagentes entrecruzadores, os de comprimento zero induzem a união direta entre dois componentes químicos sem a introdução de nenhum material extrínseco. Isto contrasta com os reagentes homo- e heterobifuncionais, para os quais um espaçador é incorporado entre os dois grupamentos entrecruzados. Exemplo dos entrecruzadores de comprimento zero estão as carbodiimidas, derivados de isoxazolia e carboximidazóis (Friedman, 1974), os quais se acoplam a grupamentos carboxila e amino. E os 2,2'-dipiridilsulfeto e a di(1,10-fenatrolina) de cobre, que realizam a modificação sobre grupamentos disulfeto.

5. BIOELETROQUÍMICA

O acoplamento de um processo eletroquímico a uma reação enzimática apresenta diversas aplicações que incluem a química analítica no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (amperométricos e potenciométricos) para quantificação, por exemplo, de compostos poluentes presentes em efluentes industriais (compostos fenólicos), a síntese de produtos mais puros (química fina, farmácia, cosmetologia, alimentos) e até mesmo o tratamento de efluentes.

A síntese eletroenzimática utiliza elétrons como reagentes baratos. Neste caso, por meio de um processo eletroquímico, há geração ou regeneração *in situ* de espécies envolvidas em uma reação bioquímica na presença de catalisadores enzimáticos. Como exemplos de processos eletroquímicos na regeneração contínua destas espécies, podem ser citados: a produção de ácido glucônico pela glicose oxidase imobilizada com regeneração eletroquímica do acceptor de elétrons; a produção de acetaldeído a partir do etanol com regeneração eletroquímica do NAD^+ ; a redução eletroquímica indireta da meta-hemoglobina utilizando o mononucleotídeo flavina como mediador; e a redução de nitrato e nitrito em água catalisada por enzimas imobilizadas.

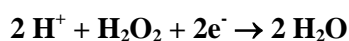
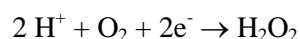
5.1. A geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio

Os experimentos realizados no estudo cinético envolvendo peroxidases são frequentemente conduzidos a concentrações iniciais de H_2O_2 relativamente altas de modo a obter velocidades iniciais mensuráveis. Com isso, os dados cinéticos devem ser obtidos nos primeiros minutos de reação devido às elevadas concentrações de H_2O_2 degradarem a enzima e promoverem reações paralelas.

A eletrogeração de H_2O_2 pode, portanto, proporcionar à enzima um suprimento contínuo de H_2O_2 a baixas concentrações, o que prolongaria o tempo de vida útil da enzima e minimizaria a formação de produtos indesejáveis, além de impedir um fenômeno comum de inibição

enzimática ou degradação da enzima causado por concentrações excessivas de H_2O_2 . Além disso, apesar de ser uma substância barata, o seu estoque em grande quantidade apresenta desvantagens pela sua baixa estabilidade e pelo risco ocupacional que produz. A estabilidade da peroxidase, portanto, pode ser significativamente aumentada num sistema eletroenzimático, onde a quantidade de H_2O_2 no meio reacional pode ser controlada pelas condições eletroquímicas.

A proposta de combinar a catálise enzimática de oxidação de um substrato pelo H_2O_2 gerado catodicamente a partir da redução do O_2 dissolvido tem sido estudada para diferentes fins tais como, polimerização do fenol, oxidação da dimetilanilina e oxidação enantioseletiva do tioanisol. Nos dois primeiros casos a peroxidase de raiz forte (HRP) foi a enzima estudada, já no último exemplo utilizou-se a cloro-peroxidase (CPO) (Nicell, 1993; Frieder, 2002; Ureta-Zañartu, 2002 e Lütz, 2004). É importante ressaltar que a escolha do material a ser usado como catodo da célula é fundamental, pois a redução do O_2 , neste caso, deverá necessariamente passar por duas etapas de modo a estabilizar o H_2O_2 , conforme mostra o esquema abaixo. Têm sido investigados vários materiais (Cu, Ni, Mo, C, Zr, Ta, W e Au), através de voltamogramas em soluções tampão apropriadas para catálises enzimáticas, e observou-se que somente o cobre, carbono e o ouro permitem que tal redução ocorra em duas etapas.



A bioeletroquímica retratada neste item demonstra o quanto este ramo da eletroquímica é fascinante pelas suas inúmeras aplicações e como vem sendo rapidamente desenvolvido nos últimos anos.

5.2. A quantificação do peróxido de hidrogênio

Na atualidade devido ao melhoramento e à diversificação de novos processos de síntese em química fina, controle da poluição e diagnóstico, metodologias alternativas como aquelas envolvendo o uso de enzimas estão sendo desenvolvidas, complementando ou substituindo as antigas e tradicionais metodologias. Neste contexto, a biocatalise esta emergindo como uma ferramenta promissora.

Dentro deste trabalho com enzimas peroxidasicas e sua aplicação em processos de oxidação de poluentes *via* eletroquímica houve a necessidade de aplicar uma metodologia apta para a quantificação do peróxido de hidrogênio eletrogerado dentro das faixas de concentração obtidas, e que permitisse a quantificação rápida e com alta repetibilidade destes composto. A detecção e quantificação de peróxido de hidrogênio têm sido desenvolvidas por uma ampla variedade de metodologias que variam em sensibilidade, precisão e consumo de tempo (**tabela II-7**). Porém, algumas limitações tais como a disponibilidade de sensores eletroquímicos específicos ou de kits comerciais para a quantificação do peróxido durante este trabalho, provocaram o desenvolvimento de uma nova metodologia adequada, rápida e de baixo custo.

Tabela II-7. Comparação dos métodos de quantificação de peróxido de hidrogênio em termos de tipo, sensibilidade, limite de concentração, consumo de tempo e nível de erro causado por interferências (Fiamegos, 2002; Fraisse, 2002 e Vojinovich, 2004).

| <i>Método</i> | <i>Tipo</i> | <i>Sensibilidade (mM)</i> | <i>Limite (mM)</i> | <i>Consumo de tempo (min)</i> | <i>Erro e interferências</i> |
|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Metodologia desenvolvida | Enzimático | 0.0005 | 1.0 | 3.0 | Baixo |
| | espectrofotométrico | | | | |
| HRP-Phenol Red | Enzimático | 0.0015 | 0.005 | 30 | Baixo |
| | espectrofotométrico | | | | |
| HRP- PSA | Enzimático | 0.0006 | 0.21 | 15 | Baixo |
| | espectrofotométrico | | | | |
| SOD – Phenol Red | Enzimático | 0.000005 | 1.0 | 0.1 | Médio |
| | quimioluminiscente | | | | |
| Direct dual-wavelength method | Espectrofotométrico | 0.2 | 20 | 10 | Médio |
| Optochemical oxygen | Eletroquímico | 30 | 600 | 0.4 | Médio |
| Iodometria | Titulação química | 10 | 1000 | 60 | Alto |
| Permanganometria | Titulação química | 10 | 1000 | 60 | Alto |

De acordo com a literatura, a maneira mais fácil de quantificar este composto é através da geração de compostos corados ou de derivados que com um cromógeno apropriado produzam produtos corados podendo ser estes determinados espectrofotometricamente.

As peroxidases têm sido amplamente estudadas com propósitos analíticos (Subba-Rau, 1982). Estas enzimas catalizam a redução do peróxido de hidrogênio na presença de um agente redutor. As aplicações que envolvem estas enzimas em diagnostico incluem colorimetria, quimio luminescência, fluorescência e dosagens amperométricas. Contudo, além do emprego de HRP, superóxido dismutase e catalase, junto com substratos redutores tais como, fenóis, tiois e diaminas têm sido usados na determinação espectrofotométrica do peróxido (Subba-Rau, 1982). Porém nenhuma tem sido reportada usando CPO. Por outro lado, a quantificação do peróxido de hidrogênio eletrogerado oferece uma barreira de sensibilidade devido às baixas concentrações que podem ser produzidas eletroquimicamente e que com frequencia não poderiam ser detectadas pelos métodos convencionais de uso geral tais como a iodometria e permanganometria, além destas serem demoradas e produzir grandes erros experimentais

(>10%) (Chai, 2004). Mais recentemente, métodos colorimétricos envolvendo reações enzimáticas estão sendo desenvolvidos com alta sensibilidade e baixos erros experimentais (Chai, 2004).

Neste trabalho, foi realizada uma adaptação do método do Red-Phenol, desenvolvido por Emerson em 1943, que além de ser amplamente usado devido, em parte, às suas características especiais, tais como rapidez, custo e ausência de passos laboriosos, permitiria, através da sua adaptação, o uso de peroxidases como agente mediador da redução do peróxido de hidrogênio. Desde os primeiros trabalhos de Emerson, sobre as reações de geração de cor a partir da 4-aminoantipirina, os produtos corados têm sido bem caracterizados. No nosso trabalho os produtos finais da reação de oxidação de um único substrato o 2,4-diclorofenol na presença de uma peroxidase e de quantidades variáveis de peróxido de hidrogênio com o acoplamento subsequente com 4-aminoantipirina foram usados para a quantificação do peróxido eletrogerado. Determinações em termos da eficiência enzimática e da concentração ótima das espécies participantes foram estudadas.

Capítulo III

RELEVÂNCIA, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO TRABALHO

A legislação internacional sobre o manejo das águas residuárias provenientes das indústrias organo-química, de plásticos e petrolífera cita os compostos fenólicos entre os poluentes mais importantes.

Na indústria do petróleo, os fenóis estão presentes em óleos e lubrificantes queimados, óleos hidráulicos baseados em fosfato-éster e fluidos refrigerantes, entre outros. Adicionalmente os fenóis podem ser encontrados nos efluentes das refinarias, são gerados nas operações de desengorduramento e lavagem de maquinários e nos processos de eliminação dos catalisadores envenenados provenientes do hidrotratamento. Convém, entretanto, ressaltar que fenóis relativamente inócuos por sua natureza e concentração, podem ser encontrados em alguns produtos de uso cotidiano, tais como na essência de cânfora, no enxágüe bucal e em alimentos tais como cerveja e vinho.

A EPA (Environmental Pollution Agency) dos Estados Unidos, de acordo com suas diretrizes para efluentes industriais, classificou em diferentes categorias, por tipo, origem e limites permissíveis, os resíduos produzidos pelas indústrias metal-mecânica, petroleira e química. O estrito cumprimento destes limites de concentrações nos efluentes é um dos grandes objetivos das organizações envolvidas na vigilância do meio ambiente em nível internacional e nacional.

Embora os tratamentos biológicos atualmente empregados em refinarias no Brasil sejam bastante efetivos para a remoção da maioria dos fenóis, em alguns casos compostos com maior nível de toxicidade são gerados, como é o caso do tratamento de fenóis poli-clorados e aminas aromáticas (Quaglia, 1995 e Peralta-Zamora, 1997). Assim é de fundamental importância o desenvolvimento de novos métodos para o tratamento destes efluentes como, por exemplo, aqueles envolvendo o uso de enzimas.

Certamente, além de microrganismos, utilizados para a biorremediação do solo e águas residuárias e potáveis, algumas proteínas e enzimas; hemeproteínas, lignina peroxidase, Mn peroxidase e polifenol oxidase, mostraram alta capacidade para a transformação de compostos fenólicos. Assim, é possível que uma combinação adequada dos dois processos, enzimático e

microbiológico, possa aumentar a eficiência do tratamento dos efluentes industriais pela degradação intensiva e extensiva destes compostos.

O uso de enzimas na degradação de compostos recalcitrantes (biocatálise ambiental) é uma área da tecnologia enzimática relativamente recente e que necessita para o seu desenvolvimento de catalisadoras de custo muito baixo e muito estáveis, devido à variação das características físico-química dos efluentes. Em relação à degradação de fenóis, são apenas parcialmente conhecidas as condições reacionais para a sua degradação enzimática, os produtos resultantes e o seu grau de toxicidade. Assim, é preciso que os biocatalisadores sejam caracterizados em relação aos seus mecanismos de ação e à sua estabilidade em condições reacionais similares às aquelas em que estes compostos poluentes são encontrados. Estes dados serão úteis para o desenvolvimento dos processos de tratamento destes efluentes cujo destino final é a descarga no meio ambiente.

A eletrogeração de peróxido de hidrogênio proporcionará à enzima um suprimento contínuo de H_2O_2 a baixas concentrações, o que prolongaria o tempo de vida útil da enzima e minimizaria a formação de produtos indesejáveis, além de impedir um fenômeno comum de inibição enzimática ou degradação da enzima causada por concentrações excessivas de peróxido de hidrogênio. Além disso, apesar de ser uma substância de baixo custo, o seu estoque em grande quantidade apresenta desvantagens pela sua baixa estabilidade e pelo risco ocupacional que produz.. Em termos da relevância e justificativa deste trabalho, é interessante salientar que os dados obtidos poderiam ser utilizados em estudos de tratamento de outros xenobióticos altamente tóxicos como os organoclorados, aminas aromáticas e compostos aromáticos policíclicos, também presentes em águas residuárias.

1.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a degradação de compostos fenólicos clorados em matrizes sintéticas e compostos fenólicos em geral presentes em águas residuárias e efluentes de refinaria, por cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*, nativa e modificada quimicamente.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter preparações de cloroperoxidase por cultivo submerso de *C. fumago*.
- Obter variantes CPO mais estáveis ao pH, à temperatura e em meio orgânico, através da estabilização por modificação química.
- As preparações de CPO nativa e estabilizada serão utilizadas em estudos visando:
 1. Otimizar as condições para a degradação enzimática de compostos fenólicos clorados em termos de: concentração de CPO, fenol total, peróxido de hidrogênio e da relação estequiométrica fenol: peróxido.
 2. Avaliar o efeito do modo da adição direta única ou em pulsos de peróxido de hidrogênio na degradação e na remoção de compostos fenólicos clorados.
 3. Estudar as condições reacionais ótimas para a geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio de forma efetiva para a degradação oxidativa de compostos fenólicos.
 4. Avaliar a efetividade da degradação oxidativa convencional empregando a adição direta ou a geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio na remoção de compostos fenólicos presentes em águas residuárias e efluentes de refinaria.
 5. Identificar os produtos formados a partir da oxidação enzimática.

Capítulo IV

MATERIAIS E MÉTODOS

1. CARACTERIZAÇÃO DAS PREPARAÇÕES DE CLOROPEROXIDASE

1.1. Determinação da atividade enzimática

1.1.1 Método da Monoclorodimedona – MCDO (Atividade Halogenásica)

Baseia-se no decréscimo da absorbância a 278 nm, resultante da halogenação da 1,1-dimetil,4-cloro,3,5-ciclohexanediona ou monoclorodimedona (MCDO), com formação da 1,1-dimetil,4,4-dicloro,3,5-ciclohexanediona ou diclorodimedona (DCDO), na presença de íons cloreto e peróxido de hidrogênio. Foram utilizadas misturas reacionais com um volume total de 2,01 mL, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM pH 2,75; cloreto de potássio 20 mM, peróxido de hidrogênio 2,0 mM; monoclorodimedona 0,1mM e a enzima cloroperoxidase em diluição adequada. Os ensaios de atividade enzimática foram acompanhados por experimentos controle que consistiram de misturas reacionais sem enzima ou sem peróxido. A reação foi iniciada pela adição do peróxido de hidrogênio às misturas reacionais pré-incubadas durante 2 minutos a 30°C. O decréscimo da absorbância a 278 nm foi acompanhado durante 2 a 3 minutos, faixa na qual trabalhou-se em condições de velocidade inicial. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida pela halogenação de 1 micromol por mililitro de MCDO por minuto, sob as condições descritas (Hager, 1965).

1.1.2 Método do 2,4- Diclorofenol – 2,4-DCP (Atividade peroxidásica)

A atividade peroxidásica foi determinada usando o método do red-phenol. Neste método O 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) é oxidado pela enzima que simultaneamente reage com a 4-aminoantipirina (4-AA) para formar o correspondente derivado corado ou antipirilquinonimina (APQI). Foram usadas misturas reacionais contendo 10 mM de 2,4-DCP, 0,2 mM de peróxido de hidrogênio e 2,4 mM (4-AA) em tampão de fosfato de sódio e potássio 100mM pH 6,0 . O aumento na absorbância é proporcional à formação do derivado corado que é acompanhado a 510 nm ($\epsilon = 20100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a pH 6,0 na ausência de íons cloreto, por três minutos. Uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade (micromoles por mililitro) do derivado corado formado por minuto em pH 6,0 e 30°C (Metelitz, 1991).

1.1.3 Método do ABTS (Atividade peroxidásica residual)

Este método foi usado somente em caso da quantificar a atividade residual peroxidásica em amostras provenientes após oxidação de compostos fenólicos. Devido à presença de subprodutos que poderiam resultar em uma leitura errônea do valor de absorbância, foi usada a reação de oxidação da sal disódica do 2,2'-azino-bis[3-etil-benzotiazolina-(6) ácido sulfônico ou (ABTS), na presença de peróxido de hidrogênio. Misturas reacionais contendo 1,7 mM de ABTS e 0.83 mM peróxido de hidrogênio em tampão de fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 foram usadas. A mudança na absorbância foi determinada a 405 nm ($\epsilon = 18600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade (4 micromoles por mililitro) de ABTS oxidado por minuto em pH 6,0 e 30°C (Zhang, 2000).

1.2. Determinação da pureza e da concentração de proteína das preparações enzimáticas

1.2.1. Determinação da concentração molar e da pureza espectrométrica das preparações de CPO

O valor de concentração molar das preparações de CPO foi estabelecido a partir dos coeficientes de extinção molar 75,3, 11,5, 10,8 and 4,2 $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinados nos comprimentos de onda respectivos de 403, 515, 542 e 650 para a forma nativa da enzima a partir de soluções de CPO em tampão de fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6.0. Igualmente o grau de pureza das preparações foi determinado usando o parâmetro de R_z obtido a partir da relação de absorbâncias A_{403}/A_{280} (Morris, 1965).

1.2.2. Quantificação da proteína total

A concentração de proteína total (mg/mL) nas preparações enzimáticas foi quantificada de acordo com o método espectrofotométrico de Lowry (Lowry, 1951) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O método baseia-se na formação de um complexo cobre-proteína em meio alcalino, que por sua vez reduz o complexo de ácido fosfomolibdotungstênico (reagente de Folin-Ciocalteu) levando a formação de uma coloração azul intensa. A proteína total é calculada a partir da equação gerada da curva calibração que relaciona concentração de albumina bovina (mg/mL) *versus* $ABS_{750\text{ nm}}$.

1.2.3. Determinação da estabilidade das preparações enzimáticas

Além da atividade peroxidásica residual, a estabilidade da cloroperoxidase nas preparações enzimáticas e nas misturas reacionais foi acompanhada espectrofotometricamente através do coeficiente de extinção molar ($ABS_{403} 75,3\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) correspondente ao sitio prostético da forma ativa da cloroperoxidase (Morris, 1965).

2. ESTABILIZAÇÃO DA CLOROPEROXIDASE POR MODIFICAÇÃO QUÍMICA

2.1. Determinação do excesso molar para os reagentes modificadores

A fim de otimizar as condições de reação para as modificações químicas usando glutaraldeído (GA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida HCl (EDAC) e hexametilendiamina HMDA, foram avaliados três excessos molares (reagente modificador: enzima) de 10, 100, 1000. O cálculo da concentração molar para cada reagente está baseado na concentração molar de resíduos de aminoácido de superfície, alvos da modificação química por molécula de CPO (Hager, 1965; Ayala, 2002 e Wagner, 2002). Em todos os casos foram usadas preparações de CPO com R_z de 1,4; 4200 UI/mL (MCDO) e 3.46 mg/mL de proteína total.

2.2. Reações de modificação química da CPO.

Misturas reacionais contendo CPO e os diferentes modificadores nos excessos molares acima mencionados foram preparadas de acordo com as condições específicas para cada modificador descritas a seguir.

2.2.1 Ariliação redutiva com aldeídos aromáticos (9-antralaldeído e cianoboridreto de sódio) e entrecruzamento com GA

- Alquilação redutiva com 9-A e cianoboridreto de sódio, foram realizadas em tampão de fosfato de sódio 10 mM, pH 6.0 e 50% (v/v) de etanol para garantir a completa dissolução do 9-A no meio reacional.
- Modificação e entrecruzamento com GA foram realizadas em tampão de acetato de zinco 10 mM pH 5,5.

NOTA: As misturas foram mantidas sob refrigeração e baixa agitação (menos de 50 ppm) durante 1 a 4 horas dependendo da extensão da modificação a ser obtida.

2.2.2. Ligação cruzada com os reagentes bifuncionais (glutraldeído, hexametilendiamina, carbodiimida).

As reações de entre-cruzamento e amidação foram realizadas na presença de polietileno glicol 1500 5% (p/v). As reações foram mantidas sob refrigeração a 4°C e agitadas durante uma hora (duas no caso da reação de amidação). A seguir, cada derivado de CPO foi recuperado e purificado de acordo com o item 3.2.3. Para o caso dos derivados amidados, estes foram submetidos a um passo adicional de tratamento de entrecruzamento com GA.

2.2.3 Recuperação e purificação dos derivados de CPO

Ao término do período de incubação os derivados de CPO foram diafiltrados usando uma unidade de microfiltração AMICON® através de membranas de *cut-off* de 10 kDa, contra uma solução de etanol 5:95 em tampão de fosfato de potássio 10 mM pH 6,5 durante 12h sob refrigeração a 4°C . Posteriormente as amostras foram diafiltradas e concentradas até alcançar aproximadamente a concentração de proteína inicial usando o sistema AMICON® e membranas de *cut-off* de 30 kDa em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 6,5 durante 12h sob refrigeração a 4°C.

2.3. Caracterização das preparações de CPO pós-modificação.

2.3.1. Determinação do grau de modificação química – Método do TNBS

A determinação do grau e extensão da modificação foi determinada através do método do ácido 2,4,6-trinitrobenzen sulfônico (TNBS). Este método baseia-se na formação de uma sulfonamida a partir da reação do TNBS com grupamentos amino livres, aminas secundárias ou cianeto (Habbeeb, 1965). Assim, soluções de enzima nativa ou as preparações de CPO modificada apresentando a mesma concentração de proteína (mg/mL) foram adicionadas em uma mistura previamente equilibrada a temperatura ambiente contendo 0,1% de TNBS em tampão de bicarbonato de sódio 100 mM pH 8,5 (1:1). A mistura reacional foi incubada com agitação (200 rpm) a 40°C por duas horas. Depois deste tempo a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de HCl (1,0 N). Simultaneamente, foi adicionado 1,0 mL de SDS 10% em tampão de bicarbonato de sódio 100 mM pH 8,5, para ressuspender a proteína que pudesse precipitar pela adição do HCl. A concentração dos produtos sulfonados foi determinada pelo aumento na absorbância a 335 nm contra branco contendo água Milli Q no lugar da proteína. Os resultados foram expressos como a porcentagem de grupamentos amino modificados (decréscimo no número de -NH₂ livres). Para o caso das modificações com HMDA e EDCA o grau de

modificação foi expresso pelo aumento no número de grupamentos amino livres em relação à forma nativa da CPO.

2.3.2. Determinação na mudança da hidrofobicidade

As preparações de CPO nativa e modificada foram adicionadas separadamente a uma mistura contendo suspensão de Phenyl-sepharose CL-4B® e sulfato de amônia 1,7 M em tampão fosfato de potássio pH 6,0 (1:1), previamente equilibrada a temperatura ambiente. Após cinco minutos de agitação forte, as misturas foram centrifugadas a 3500 rpm para provocar a separação das fases e realizar a determinação da atividade de peroxidásica em cada fase. A partir do valor da atividade em cada fase, os coeficientes de partição foram estimados de acordo com a relação de atividades da fase orgânica (Phenyl-sepharose) e da fase aquosa (sulfato de amônia).

2.3.3. Determinação do efeito da modificação química frente ao pH e temperatura.

O perfil de pH para a CPO nativa e seus derivados obtidos por modificação química foi determinado dentro da faixa de valores de pH de 2,0 a 8,0 usando tampões de fosfato de sódio e potássio 100 mM, a temperatura ambiente. Nos experimento para determinar a estabilidade ao pH as preparações enzimáticas foram pré-incubadas por 30 minutos a 1 hora a temperatura nos mesmos valores de pH. No caso dos perfis de temperatura estes foram determinados na faixa dos 20° a 80 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0. Para os experimentos de estabilidade à temperatura, as preparações enzimáticas foram incubadas na mesma faixa de temperatura por 30 minutos a 1 hora. Em todos os casos, as atividades enzimáticas pré e pós-ensaio foram determinadas pelo método do 2,4-DCP.

2.3.4. Determinação do efeito da modificação química frente à concentração de solvente orgânico.

Este parâmetro foi avaliado usando várias misturas reacionais em sistemas binários contendo uma concentração crescente de *tert*-butanol até 80% (v/v) em tampão fosfato de sódio e potássio

100 mM, pH 6.0. Em seguida, as misturas reacionais foram incubadas por 1, 2 e 4 horas a temperatura ambiente e as atividades iniciais e residuárias para cada preparação foram determinadas.

3. DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

3.1. Determinação de parâmetros cinéticos para CPO nas reações de oxidação de fenóis clorados.

Na oxidação de compostos fenólicos foram estudados os efeitos da concentração do composto fenólico, concentração do peróxido de hidrogênio e modo de adição do peróxido de hidrogênio: único ou pulsado. Outras condições reacionais tais como, concentração de enzima e o modo de adição da CPO, temperatura e pH foram estabelecidas em trabalhos anteriores (La Rotta, 2002). Como será justificado posteriormente, somente foram avaliados a enzima nativa e o melhor dos biocatalizadores obtidos a partir dos processos de estabilização por modificação química da CPO. Em todos os casos o acompanhamento das reações foi realizado empregando o espectrofotômetro UV-VIS com arranjo de diodos Shimadzu Multispect 1501 com célula de temperatura controlada (Shimadzu Co. Japan) nos modos temporário (time-scan) de 3 a 30 minutos e varreduras (spec-scan) na faixa de 190 a 800 nm.

3.1.1. Efeito da concentração do composto fenólico sobre a atividade da CPO.

A determinação do valor das constantes catalíticas: $K_{M\text{ app}}$, k_{cat} e eficiência catalítica $k_{\text{cat}}/K_{M\text{ app}}$ para CPO nas reações de oxidação de compostos fenólicos clorados selecionados: fenol, 4-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-DCP e PCP 2,4-DCP foram realizadas a partir de misturas reacionais independentes contendo concentrações variáveis do composto fenólico na faixa de 0,5 a 20 mM com concentração constante de CPO de 0,4 nM, 0,2 mM de H_2O_2 e 0,5 mM de 4-AAP em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 25°C. Para minimizar a competição entre

a 4-AAP e o 2,4-DCP pelo composto I da enzima foram mantidas relações de composto fenólico/4-AAP $\geq 0,5$ (Vojinovic, 2004). Experimentos controle sem adição da enzima ou peróxido também foram realizados.

3.1.2. Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a atividade da CPO.

Na determinação do efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a atividade da CPO, a velocidade de inibição do peróxido de hidrogênio para a CPO na reação de oxidação compostos fenólicos foi determinada a partir de misturas reacionais independentes contendo concentrações variáveis de H_2O_2 na faixa de 0,005 a 25,0 mM de peróxido de hidrogênio e avaliadas sobre a oxidação de concentrações constantes de 2,4-DCP na faixa de 0,5, 1,0, 5,0 e 10 mM, com concentração constante de CPO de 0,4 nM, e 0,5 mM de 4-AAP em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 25°C.

3.1.3. Efeito do modo de adição da CPO e do peróxido de hidrogênio: único ou pulsado

O efeito dos modos de adição da CPO e do peróxido de hidrogênio (adição única ou pulsada) foi avaliado em separado em misturas reacionais contendo concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 mM de 4-CP escolhido como composto fenólico modelo, e concentrações finais de 0,4 nM CPO, 0,5 e 1,0 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 25°C de acordo com a matriz experimental descrita na **Tabela IV-1**.

Tabela IV-1. Matriz experimental para avaliação do efeito dos modos de adição da CPO e do peróxido de hidrogênio na oxidação de compostos fenólicos clorados.

| <i>Mistura</i> | <i>Tipo de adição</i> | <i>CPO</i> | <i>H₂O₂</i> |
|----------------|-----------------------|------------|-----------------------------------|
| Controle 1 | Única | Sim | Sim |
| Controle 2 | Única | Sim | Não |
| Controle 3 | Única | Não | Sim |
| 4 | Pulso 3X | Sim | Sim (1X) |
| 5 | Pulso 5X | Sim | Sim (1X) |
| 6 | Pulso 3X | Sim (1X) | Sim |
| 7 | Pulso 5X | Sim (1X) | Sim |

3.2. Determinação da eficiência das reações de oxidação biocatalítica de fenóis clorados.

Para a determinação da eficiência das reações de oxidação biocatalítica de fenóis clorados, foram estabelecidos os parâmetros de nível da oxidação e nível da remoção.

3.2.1. Determinação do nível da oxidação enzimática (eficiência da oxidação)

Este parâmetro corresponde à quantidade total de composto fenólico que foi oxidado, determinada pela quantificação do fenol residual após a reação enzimática (ver item 4.3). Neste caso foram realizadas reações de 25 mL sem a adição de 4-AAP contendo 0,4 nM de CPO; concentrações dos CP de 0,5, 1,0 e 5,0 mM e 0,5 e 1,0 mM de peróxido hidrogênio, em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 25°C. As misturas reacionais foram iniciadas pela adição de enzima e acompanhadas durante 4 horas. A amostragem foi realizada a cada 30 minutos, sendo as reações enzimáticas interrompidas pela adição de hidróxido de amônia 0,2 % e armazenada até sua análise.

3.2.2. *Determinação do nível da remoção (eficiência da polimerização)*

O nível de remoção, foi determinado somente para aqueles fenóis capazes de gerar compostos de baixa solubilidade (precipitados) após a reação enzimática, e pela sua vez pudessem ser removidos do líquido por simples centrifugação a 3000 rpm e filtração, para sua posterior análise gravimétrica. Análise espectrofotométrica UV-Vis foi realizada nos sobrenadantes antes e depois da remoção dos produtos insolúveis. O aumento no nível de remoção foi avaliado após a adição de agentes coagulantes relacionado com um nível de remoção alcançado sem a adição destes agentes.

3.2.3. *Quantificação do fenol residual*

A quantificação espectrofotométrica do fenol residual foi realizada usando a metodologia modificada do red-phenol (Emerson, 1943; Metelitz, 1991 e Fiamegos, 2002) baseada na oxidação do composto fenólico por hexacianoferrato de potássio com a simultânea derivatização com 4-AAP em etanol/ água 1:1 pH 8,0, para prevenir a possível precipitação dos compostos fenólicos. A concentração dos derivados corados foi estabelecida em curvas de calibração para cada composto fenólico (0,01 a 0,1 mM) pela interpolação na curva de absorbância de *versus* concentração. Os picos de absorbância máxima foram determinados para os derivados APQI de cada composto fenólico clorado avaliado. Para prover reprodutibilidade na dosagem, todas as reações foram realizadas em triplicata. Os parâmetros de calibração foram estatisticamente calculados.

4. DEGRADAÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS

4.1. Geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio

4.1.1. *Experimentos preliminares de geração de peróxido de hidrogênio*

Experimentos preliminares de oxidação de compostos fenólicos foram inicialmente realizados usando 4-CP como composto modelo a fim de estabelecer as melhores condições de geração e oxidação. Sistemas e condições foram avaliadas, tais como: geometria do reator, tipo, tamanho, forma e composição do eletrodo de trabalho e potencial aplicado.

A geração catódica de peróxido de hidrogênio foi realizada em um reator de câmara única de 250 mL ou em uma célula bicompartimentada com capacidade de 100 mL por câmara, de acordo com os esquemas representados nas **Figuras IV -1 e IV -2**. As condições reacionais empregadas encontram-se sumarizadas na **Tabela IV -2**. Inicialmente verificou-se somente a geração do peróxido pela oxidação *in-situ* de 1 mM de 4-CP, pela adição de 6,0 UI_{2,4DCP}/mL de CPO e 2,4 mM de 4-AA em tampão de fosfato de sódio e potássio 100mM pH 6,0. Em experimentos posteriores a geração do peróxido foi estudada no mesmo tampão, sem a adição de 4-CP ou enzima.

Em todos os casos, quando possível, os seguintes parâmetros foram estudados:

- Concentração (mM) do peróxido eletrogerado
- Cinética de eletrogeração do peróxido eletrogerado
- Percentagem de oxidação química devida ao peróxido
- Percentagem de oxidação anódica
- Percentagem de oxidação enzimática
- Remoção por precipitação

Tabela IV-2. Condições reacionais empregadas nos experimentos preliminares de geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio e oxidação bioeletroquímica de compostos fenólicos clorados.

| <i>Experimento</i> | <i>Tipo de Célula</i> | <i>Volume(mL)</i> | <i>ET</i> | <i>CE</i> | <i>ER</i> | <i>Tamanho ET</i> | <i>PA (mV)</i> |
|--------------------|----------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------|-----------------------|--------------------|
| 1 | Câmara única | 250 | C (grafite) | Pt (espiral) | SCE | NR | - 220 |
| 2 | Câmara única | 250 | C (tecido) | Pt (espiral) | SCE | 2,0 cm ² | - 220 |
| 3 | Câmara única | 250 | Cu (espiral) | Pt (espiral) | SCE | 10,0 cm | - 220 |
| 4 | Câmara única | 250 | Cu (malha) | Pt (espiral) | SCE | 2,0 cm ² | - 220 |
| 5 | Câmara Bicompartmentada | 50 (por câmara) | C (tecido) | Pt (espiral) | SCE | 2,0 cm ² | - 220 |
| 6 | Câmara Bicompartmentada | 50 (por câmara) | Cu (malha) | Pt (espiral) | SCE | 2,0 cm ² | - 220 |

ET: eletrodo de trabalho; CE: Eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo; ER: Eletrodo de referência; PA: Potencial aplicado

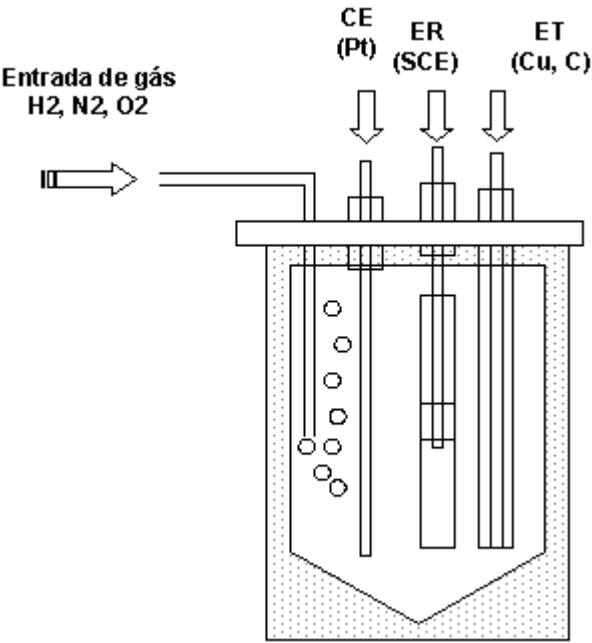


Figura IV -1. Reator bioeletroquímico de câmara única para a geração *in-situ* de peróxido de hidrogênio e oxidação de compostos fenólicos clorados. ET: eletrodo de trabalho; CE: Eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo; ER: Eletrodo de referencia (ECS: Eletrodo de calomelano saturado).

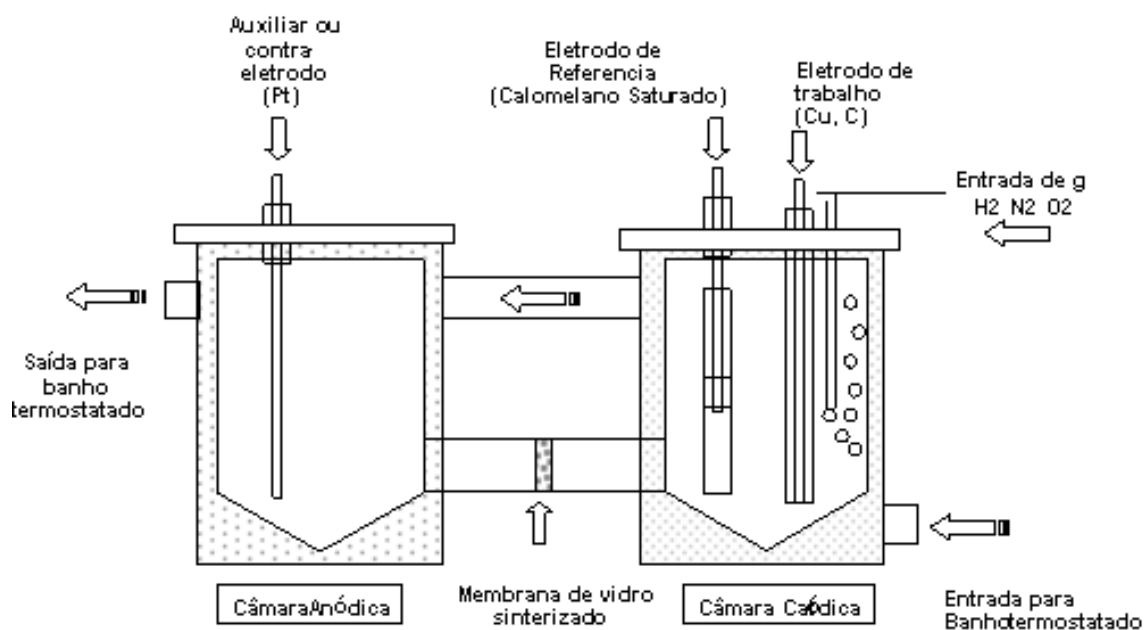


Figura IV -2. Reator bioeletroquímico bicompartimentado para a geração *in-situ* de peróxido de hidrogênio e oxidação de compostos fenólicos clorados.

4.1.2. Experimentos de geração de peróxido de hidrogênio usando malha de cobre eletrolítico.

A produção eletroquímica de peróxido está baseada na redução do oxigênio dissolvido presente no meio reacional. Esta redução do oxigênio produz como produto final, água, com o consumo de 4 eletrodos. Contudo dependendo do material utilizado como eletrodo de trabalho, a reação pode acontecer em duas etapas produzindo a estabilização do peróxido formado como intermediário em uma determinada faixa de polarização. Como será aprofundado durante a discussão dos resultados escolheu-se trabalhar com uma câmara bicompartimentada com

temperatura controlada, para poder estudar por separado os diferentes eventos que acontecem durante a geração *in-situ* do peróxido, assim como durante a reação de oxidação bioeletroquímica. Desta maneira em câmaras separadas por uma membrana de vidro sinterizado, foi dividido o meio reacional em câmara catódica, onde a reação de geração de peróxido acontecia, assim como a reação enzimática de oxidação. Na câmara anódica onde somente a oxidação anódica do substrato acontece sem o efeito do peróxido, como mostra a **Figuras IV-1 e IV -2**.

Desta maneira, o sistema eletroquímico de geração foi constituído por um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo em forma de uma espiral de fio de platina de 10 cm de comprimento. Um eletrodo de calomelano saturado (ECS) empregado como eletrodo de referência. E uma malha de cobre eletrolítico de 27 cm², como eletrodo de trabalho. Antes de ligar o sistema, em cada câmara foram colocados volumes iguais do tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 pré-aerado por 1 hora. A amostragem foi realizada a cada 60 minutos e as amostras foram armazenadas até sua análise sob refrigeração a -20°C.

4.1.3. Efeito do potencial aplicado sobre a geração eletroquímica de peróxido e a bioeletro-oxidação.

Como no item anterior e usando o sistema eletroquímico descrito anteriormente, foi estudado o efeito do potencial aplicado sobre a geração eletroquímica do peróxido e a bioeletro-oxidação, em sistemas com aeração contínua e descontínua similares aos descritos no item 5.1.4. Assim, a variação do potencial aplicado foi avaliado na faixa dos -220 aos -820 mV_{ECS}.

4.1.4. Efeito da aeração sobre a geração eletroquímica de peróxido e a oxidação enzimática.

Empregando o sistema eletroquímico descrito anteriormente foi estudado o efeito da aeração sobre a geração eletroquímica de peróxido e a bioeletro-oxidação. Assim, antes de ligar o sistema, o tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 adicionado nas duas câmaras foi pré-areado por 1 hora ou areado continuamente ao longo do tempo da reação de 4h. Os experimentos foram realizados com uma polarização de -620 mV, e realizados empregando-se inicialmente o 4-CP como composto fenólico modelo. A polarização do eletrodo foi realizada no mesmo potencial (-620 mV_{ECS}), por 1 hora antes de iniciar a reação.

4.1.5. Oxidação bioeletroquímica de compostos fenólicos clorados

Usando o mesmo sistema bioeletroquímico acima descrito, a degradação oxidativa de outros compostos fenólicos clorados foi estudada separadamente. Foram usadas misturas reacionais independentes contendo 6.0 UI_{2,4-DCP}/mL de CPO, 0,5 mM de cada composto fenólico (4-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP) em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6.0. As reações foram realizadas a 25°C, iniciadas pela adição da enzima simultaneamente com a ligação do sistema. Amostras e duplicatas de 0,3 mL foram tiradas a partir de cada câmara a cada 30 minutos ao longo das 4h de reação. A reação em cada amostra foi interrompida pela adição de 0,2 mL de NH₄OH 0,2 % e mantidas em refrigeração a -20°C até o momento da análise. Em todos os casos foi realizada a pré-aeração com oxigênio por 1 hora antes de a reação ser iniciada, evitando com isto a possível perda por arraste do fenol.

5. REAÇÕES DE DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUAS DE REFINARIA (MATRIZES REAIS)

5.1. Oxidação enzimática convencional de compostos fenólicos presentes em águas residuárias de refinaria (matriz real): adição direta única ou pulsada de peróxido de hidrogênio

Igualmente aos compostos fenólicos puros, foram realizados experimentos de degradação enzimática convencional sobre amostras de efluentes de refinaria, duas provenientes de bacia de equalização ou efluente bruto (EF) com 4 e 200 ppm de fenol total e uma terceira proveniente de fundos de tanque de armazenamento de óleo cru (TA) com 400 ppm de fenol total. As amostras não foram caracterizadas físico-quimicamente, porém as concentrações de fenol total foram verificadas. Nenhuma amostra recebeu algum tipo de tratamento para remoção de compostos fenólicos.

De acordo com a **Tabela IV-5** as amostras foram ajustadas antes de ser iniciado o processo de degradação enzimática. Uma vez preparadas, as amostras foram tratadas enzimaticamente pela adição de 6,0 UI_{2,4-DCP}/mL de CPO e concentrações de 0,5 e 1,0 mM de peróxido de hidrogênio em modo de adição única ou em pulso de até 5X. As reações foram realizadas a temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. Controles de reação foram igualmente realizados em misturas reacionais contendo EF ou TA mais enzima sem peróxido, EF ou TA mais peróxido sem enzima e EF ou TA sem peróxido ou enzima.

Amostras foram coletadas a cada 30 minutos, durante 4 horas, e a reação enzimática foi interrompida pela adição de hidróxido de amônia 0,2%. Todas as amostras foram analisadas imediatamente após a coleta e contra amostras foram armazenadas sob refrigeração.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Percentagem de oxidação química devida ao peróxido
- Percentagem de oxidação enzimática (fenol residual)
- Remoção por precipitação

Tabela IV-5. Ajustes realizados sobre as amostras de efluentes antes da degradação enzimática.

| Amostra | Tipo de amostra | Código | Fenol Total (ppm) | pH inicial | pH final |
|---------|--------------------------------|--------|-------------------------|------------|----------|
| 1 | Efluente bruto 1 | EF1 | 4,13 | 7,41 | 6,02 |
| 2 | Efluente bruto 2 | EF2 | 245,2 | 8,88 | 6,03 |
| 3 | Tanque de armazenamento | TA | 201,5 | 9,50 | 6,01 |
| 4 | Efluente bruto 2 (diluída) | EF2d | 50,0 | 8,88 | 6,00* |
| 5 | Tanque armazenamento (diluída) | TAd | 50,0 | 9,50 | 6,00* |

* Diluição com tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0

5.2. Oxidação bioeletroquímica de compostos fenólicos presentes em águas residuárias de refinaria

Empregando o sistema eletroquímico descrito anteriormente foi estudada a bioeletro-oxidação dos compostos fenólicos presentes nas amostras provenientes da refinaria. Inicialmente as amostras foram avaliadas diretamente sem pré-tratamento algum na célula bicompartimentada e posteriormente foram avaliadas no reator de câmara única sendo as amostras adequadas de acordo com a **Tabela IV-5**. Duas abordagens para determinar o efeito do tipo de aeração foram avaliadas em ambos os sistemas:

- Pré-aeração por 1 hora com oxigênio.
- Aeração contínua com oxigênio por 4 horas.

Os sistemas foram pré-polarizados em $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$, por 1 hora antes de iniciar a reação. Uma vez polarizados o volume de amostra foi renovado com amostra fresca. As reações foram iniciadas pela adição de $6,0 \text{ UI}_{2,4\text{-DCP}}/\text{mL}$ de CPO em modo de adição única ou em pulso de até 5X e pela ligação do sistema em $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Percentagem de oxidação química devida ao peróxido
- Percentagem de oxidação anódica
- Percentagem de oxidação enzimática
- Percentagem de oxidação total
- Remoção por precipitação do composto fenólico

5.3. Efeito da adição de coagulante sobre as degradações enzimáticas convencional e bioeletroquímica.

A adição de um coagulante foi avaliada a fim de promover os processos de precipitação dos produtos formados a partir das reações catalisadas pela CPO nos sistemas convencional e eletroquímico, visto que já existem reportes do uso destes coagulantes na remoção de compostos fenólicos em reações catalisadas por peroxidases (Nicell, 1993 e 1995; Lai, 2005 e Zhang, 2005). A quitosana foi selecionada, pois este coagulante apresentou os melhores resultados nestes estudos.

Inicialmente, experimentos preliminares foram realizados sobre um sistema conhecido. Neste caso foi selecionada a degradação em uma mistura contendo 6,0 UI_{2,4-DCP}/mL de CPO, 0,5 mM de 4-clorofenol, 1,0 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0. Diferentes concentrações finais de 2, 20, 100 e 200 ppm do agente coagulante pré-gelificado em solução de ácido acético foram adicionadas antes e depois do tratamento enzimático.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Percentagem de oxidação química devida ao peróxido
- Percentagem de oxidação anódica
- Percentagem de oxidação enzimática
- Percentagem de oxidação total
- Remoção por precipitação do composto fenólico
- Perda por arraste do composto fenólico
- Efeito da concentração do coagulante

Capítulo V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

V-1

**ESTABILIZAÇÃO DA CLOROPEROXIDASE POR MODIFICAÇÃO
QUÍMICA**

1.1. Otimização dos excessos molares para os reagentes modificadores.

A fim de lograr um eficiente grau de modificação em termos da extensão da reação e para evitar uma possível sobre-modificação, três excessos molares dos reagentes modificadores foram avaliados. Os resultados correspondentes aos tratamentos de entre-cruzamento simples e duplo, de amidação e de alquilação redutiva são mostrados nas **Figuras V-1 e V-2**. Como pode ser observada a perda de atividade aumentou em resposta ao aumento do excesso molar na faixa que vai desde uma quase imperceptível perda, como foi no caso do excesso de 1:10 a um grande decréscimo na atividade de 75 a 91% da atividade inicial, para o caso do excesso molar de 1:100. Estas observações já tinham sido feitas para excessos molares nesta faixa durante a obtenção de cristais entre-cruzados de CPO (Ayala, 2002). Contudo, a perda da atividade foi muito mais notável durante a obtenção dos derivados alquilados de CPO denominados como CPO-9A, em que a perda de 91% da atividade inicial pode estar relacionada com as condições reacionais relativamente extremas associadas ao pH e ao excesso do cianoboridreto.

O uso do excesso molar de 1:100 resultou na perda de atividade de 10 a 17% dependendo do tratamento aplicado à CPO, assim a alquilação redutiva causou perda de 10,5%, a amidação com HMDA de 11,2% e com EDAC de 13,4%. A modificação por entrecruzamento com GA provocou uma perda de 16,6%. Assim sendo, esta condição de excesso molar de 1:100 por mostrar uma relativa baixa perda de atividade além de se obter boa eficiência da modificação foi escolhida para futuras modificações. Os experimentos controle mostraram que a enzima perde até 5% da atividade inicial só por causa das condições reacionais em ausência dos reagentes modificadores.

Durante os processos de entre-cruzamento adicional com GA dos derivados aminados CPO-EDAC e CPO-HMDA, assim como da enzima nativa o excesso molar de 1:100 também mostrou ser a melhor escolha. De acordo com os resultados apresentados nas figuras a seguir,

pode ser observada uma perda adicional na atividade inicial da CPO de 25 %. Como os resultados preliminares também confirmaram, os derivados obtidos a partir de CPO comercial e a CPO produzida no nosso laboratório possuem as mesmas características biocatalíticas independentemente da preparação enzimática inicial.

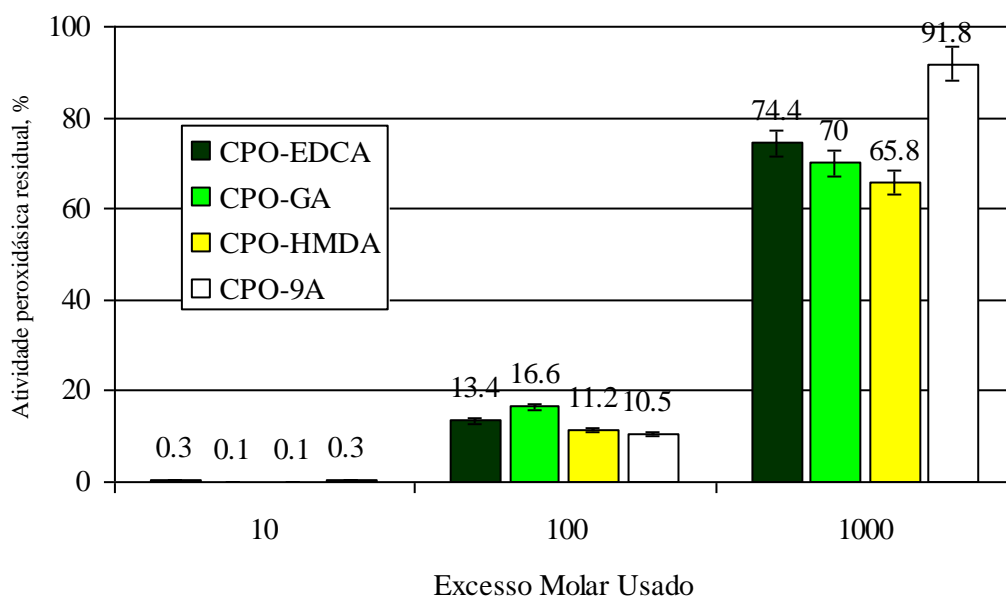


Figura V-1. Efeito do excesso molar do agente modificador sobre a atividade da CPO e derivados. Tratamento simples.

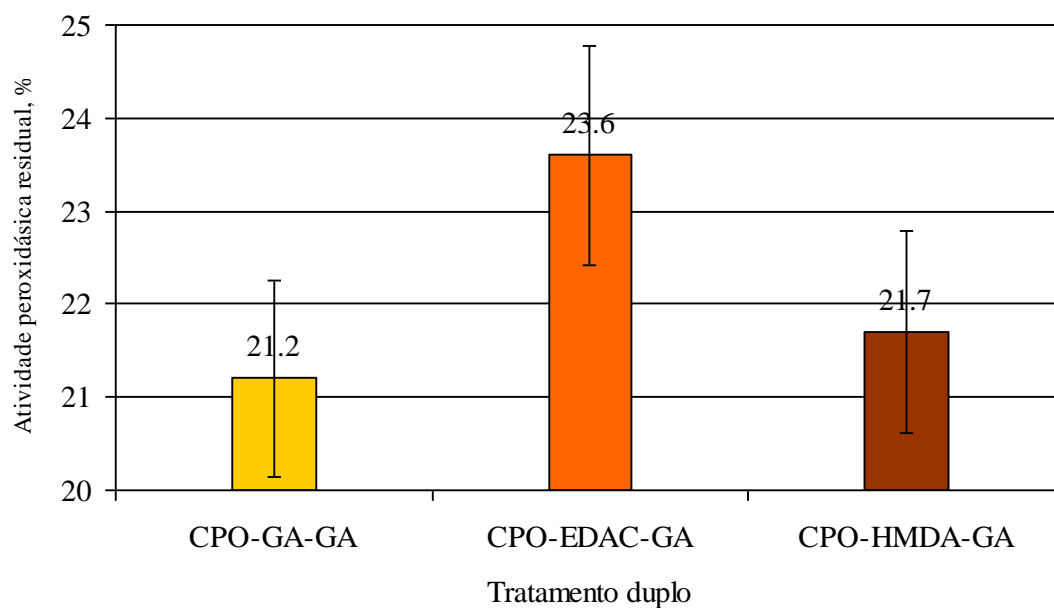


Figura V-2. Efeito do excesso molar do agente modificador sobre a atividade da CPO e derivados. Tratamento duplo.

1.2. Grau de modificação

A extensão da modificação dos resíduos de aminoácidos para cada tratamento foi avaliada, como já foi descrito usando o método do TNBS para grupamentos amino livres. De acordo com os dados apresentados na **Figura V-3**, os tratamentos com 9A ou GA resultaram na modificação de 9% dos grupamentos amino livres, enquanto para os derivados obtidos a partir da amidação mais entrecruzamento com GA renderam em 23% de modificação de grupamentos amino livres. Os derivados CPO-HMDA e CPO-EDAC apresentaram um incremento de 9 a 11% no número de grupamentos amino livres comparados com o valor observado para a CPO nativa. O mais baixo nível de modificação obtido (5%), foi observado para o derivado alquilado CPO-9A. Esta observação pode estar relacionada com o tamanho e baixa solubilidade do 9A em meio aquoso. A possível interferência do cianeto durante a determinação dos grupamentos amino livres, foi contornada pelo uso de experimentos controles (Lambier, 1983).

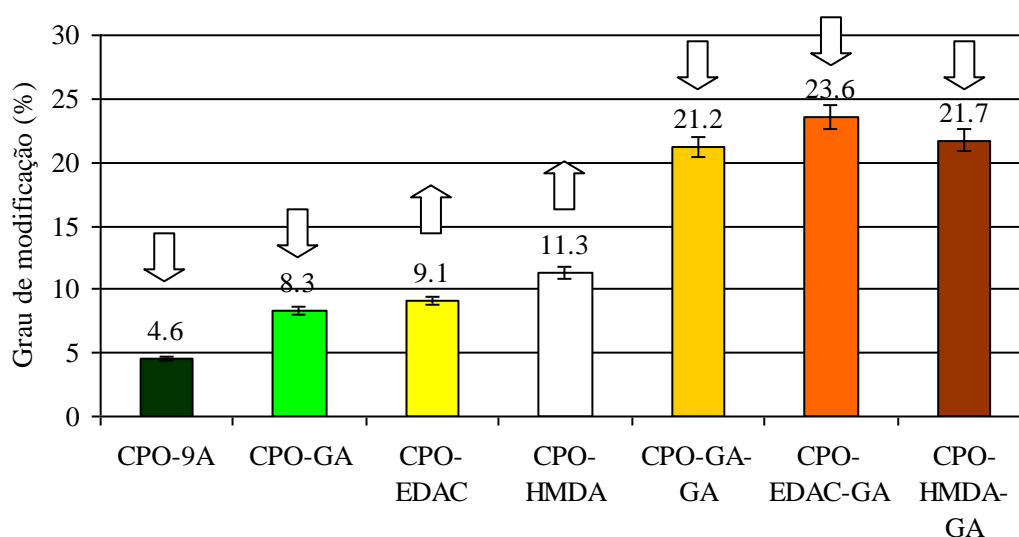


Figura V-3. Graus de modificação dos resíduos de aminoácidos (aumento ou diminuição de grupamentos amino livres) na CPO usando um excesso molar de 1:100.

1.3. Efeito da modificação química sobre as hidrofobicidade e solubilidade dos derivados de CPO

Em geral, a solubilidade dos derivados de CPO sofreu decrescimentos de 30 a 40% em comparação com a CPO nativa. Os dados correspondentes à enzima alquilada com 9-antraldeído foi coerente com a maior hidrofobicidade observada para este derivado, como mostra a **Figura V-4A**.

Assim, para o derivado CPO-9A, observou-se um coeficiente de partição 4 vezes maior (200%) em comparação com o da CPO nativa. Embora tenha sido alcançado um baixo grau de modificação (5%) usando a metodologia de alquilação redutiva, este resultado é promissor, considerando o uso deste derivado em síntese orgânica envolvendo substratos com baixa solubilidade em água. Resultados interessantes foram também observados para o derivado CPO-GA que apresentou um coeficiente de partição de 2,3 vezes maior (115%) que o observado para a CPO nativa, fato que pode estar relacionado com a formação de agregados de CPO como já foi mencionado por outros autores (Wong, 1992; Ayala, 2002). Como também mostra a **Figura V-4B**, para o caso dos derivados aminados o parâmetro de hidrofobicidade não foi significativamente afetado.

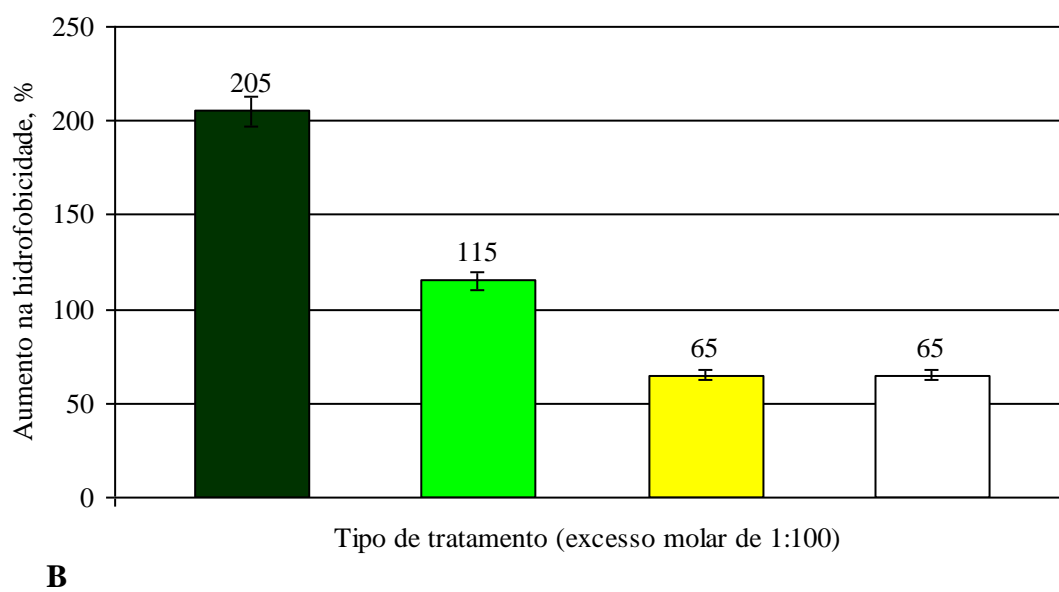
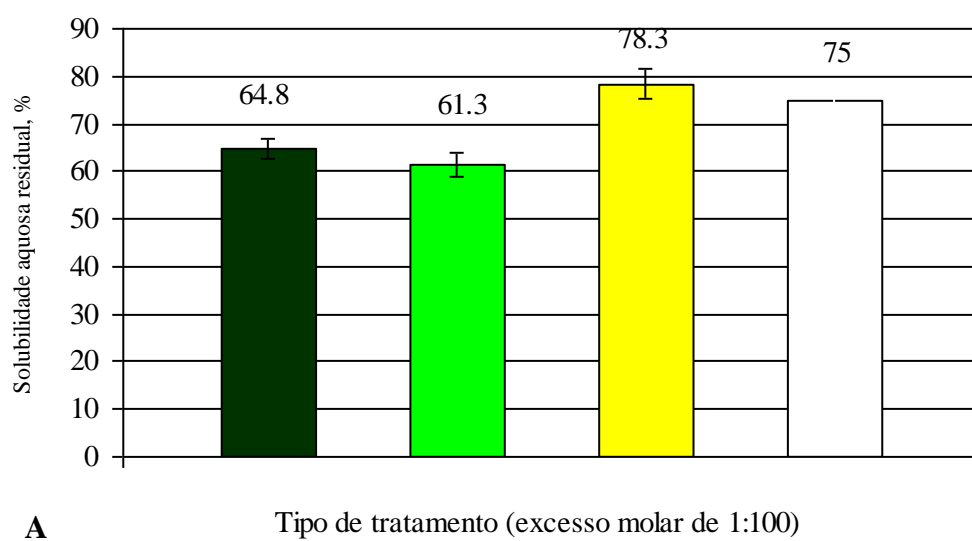


Figure V-4. Efeito do agente modificador em excesso molar de 1:100 sobre a solubilidade (A) e sobre a hidrofobicidade (B).

1.4. Atividade e estabilidade dos derivados de CPO na presença de solventes orgânicos.

A **Figura V-5** mostra o efeito da presença do solvente orgânico *t*-butanol na atividade da CPO e dos derivados obtidos. Embora a presença de *t*-butanol em uma concentração de 5% no meio reacional não afetou significativamente a atividade da CPO, foi observado um decréscimo gradual na atividade que alcançou 30% em resposta às concentrações de solvente orgânico de até 60%. Na maioria dos derivados um comportamento similar ao da CPO nativa foi observado. Em geral as atividades na presença da 30 ou 60% de *t*-butanol foram similares. Os dados relatam que a tolerância ao solvente orgânico foi muito mais notável para os derivados CPO-9A e CPO-EDAC pois eles retiveram quase por completo a atividade inicial nas concentrações de 30% e 60% de *t*-butanol, respectivamente.

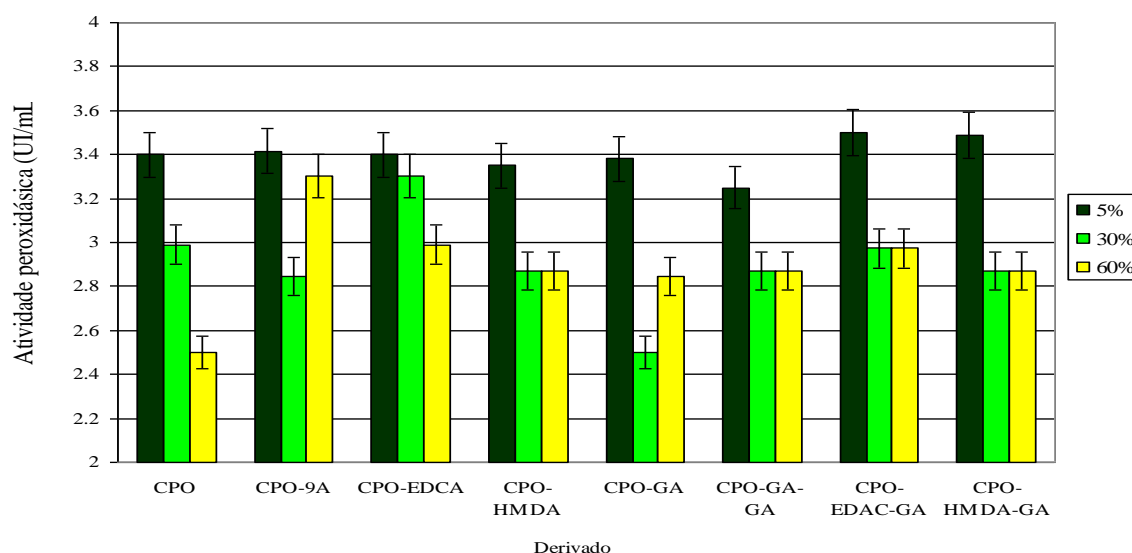


Figura V-5. Efeito da concentração do *tert*-butanol sobre a atividade peroxidásica da CPO nativa e seus derivados.

Como é mostrado na **Figura V-6**, tanto a CPO nativa como seus derivados, mostraram serem bastante estáveis a períodos de incubação de até 2 horas em sistemas binários contendo *t*-butanol. Embora houvesse alguma perda de atividade, esta só foi observada após 4 horas de incubação em misturas contendo acima de 50% (v/v) de *t*-butanol.

Perfis similares de estabilidade foram observados para ambos dos derivados amidados CPO-HMDA e CPO-EDAC. A CPO nativa mostrou ser afetada com perda de até 40% da atividade inicial por concentrações de *t*-butanol de até 30%.

1.5. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da CPO nativa e seus derivados

De acordo com os dados apresentados nas **Figuras V-7**, o efeito da temperatura sobre as atividades da CPO nativa e modificada foi bastante similar na faixa de temperatura estudada (20 – 80°C). Embora uma leve melhoria foi observada a partir dos 30°C para o caso do derivado CPO-HMDA-GA. Este derivado como mostra a **Figura V-8** também apresentou maior estabilidade à temperatura após da incubação a 40° e 60°C com valores de atividade peroxidásica residuais comparados com a CPO nativa de 75% e 40% a 40° C e 35% e 5% a 60°C, respectivamente. Vale a pena mencionar que o derivado CPO-HMDA também mostrou o maior aumento no número de grupamentos amino livres, o que favoreceu um maior entrecruzamento posterior a partir do tratamento com GA. Os gráficos mostraram também que CPO e derivados apresentam os mesmos perfis frente à temperatura.

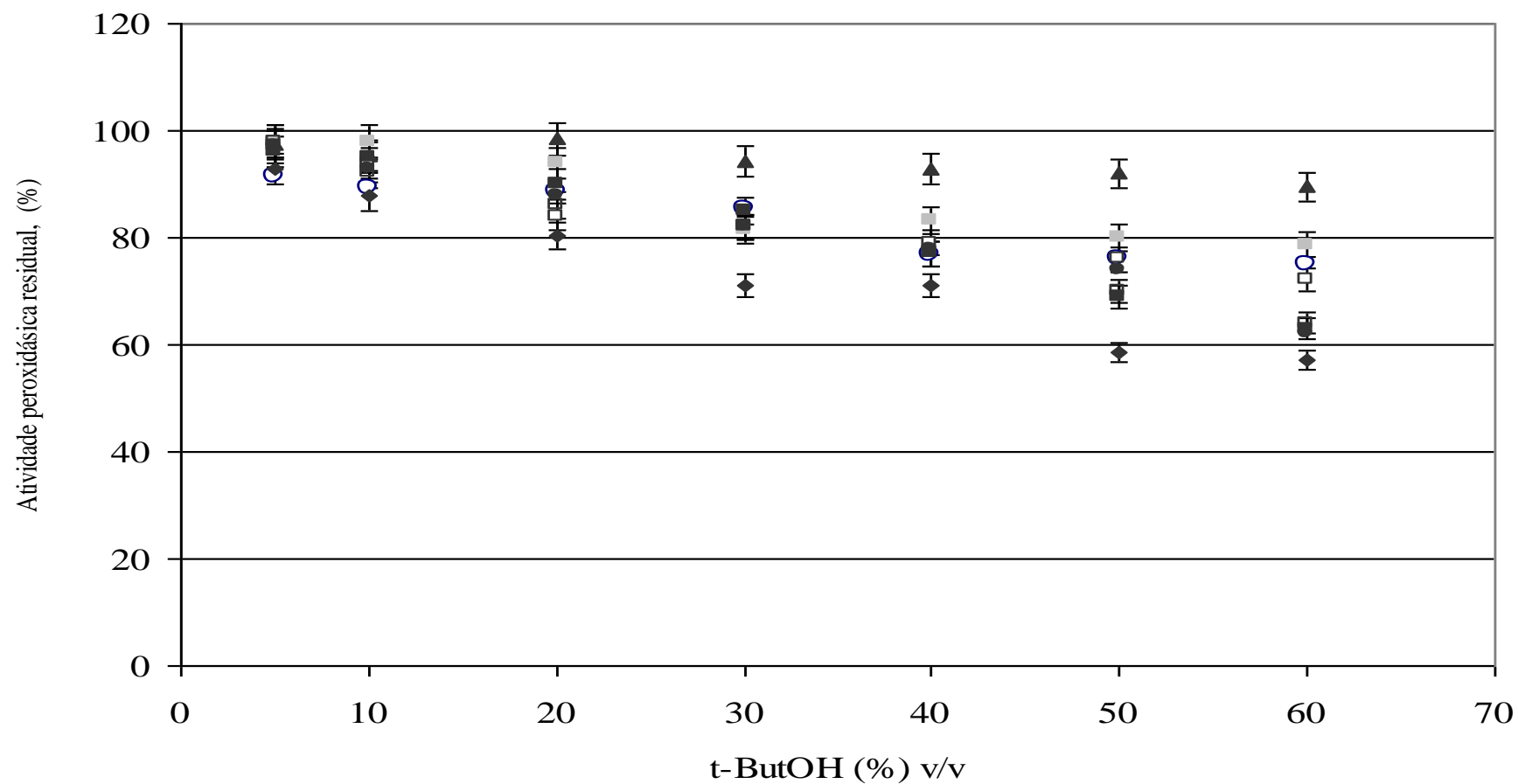


Figura V-6 Efeito da concentração do *tert*-butanol sobre a estabilidade de CPO nativa e seus derivados após de um período de incubação de 4 horas: ◆

Nativa CPO; ■ CPO-EDAC; ▲ CPO-GA; □ CPO-HMDA; ○ CPO-GA-GA; ● CPO-EDAC-GA e ■ CPO-HMDA-GA.

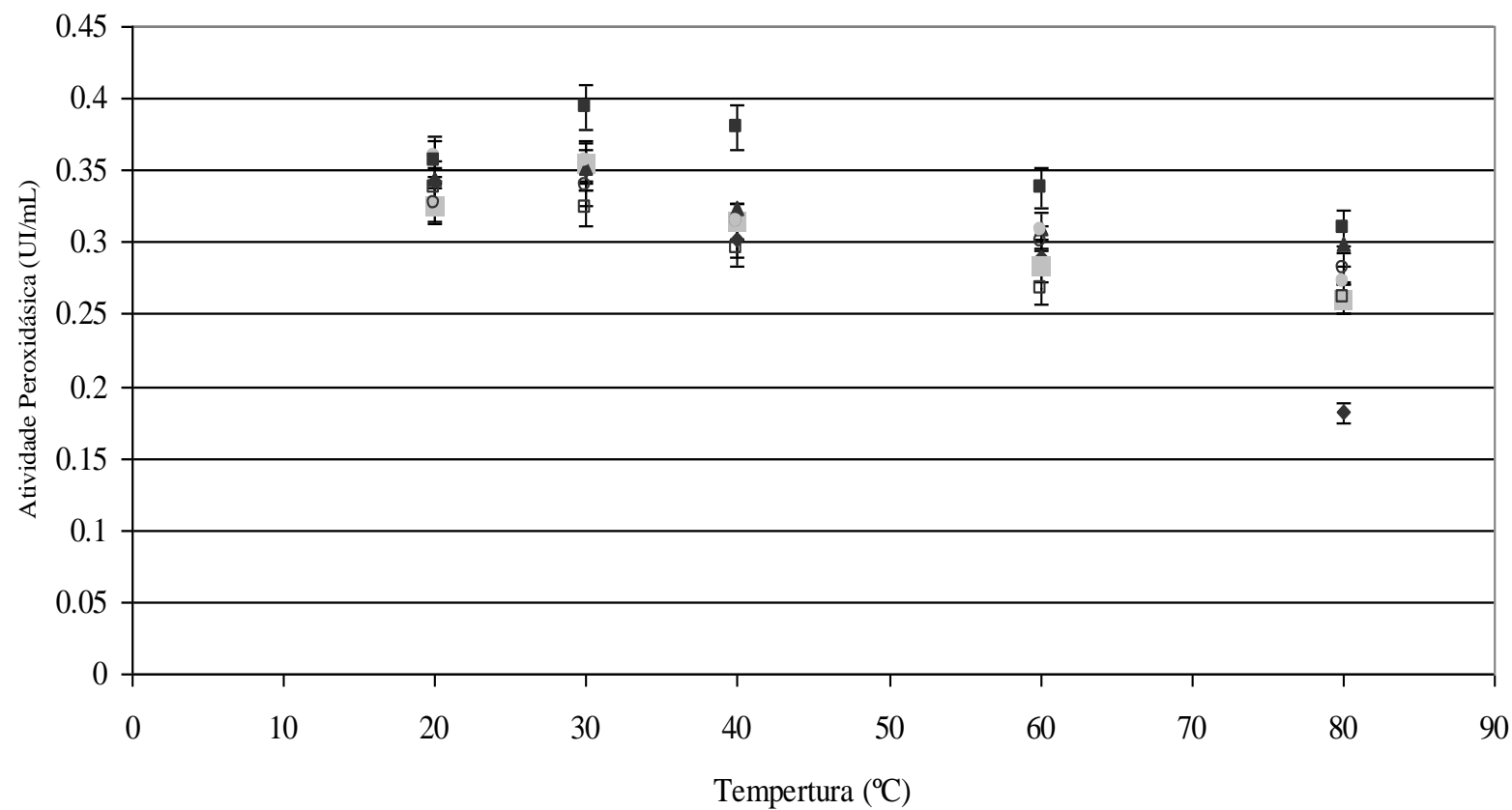


Figura V-7. Perfis do efeito da temperatura sobre a atividade peroxidásica (A) e estabilidade (B) da CPO e seus derivados. ◆ CPO nativa; ■ CPO-EDAC; ▲ CPO-GA; □ CPO-HMDA; ○ CPO-GA-GA; ● CPO-EDAC-GA e ■ CPO-HMDA-GA.

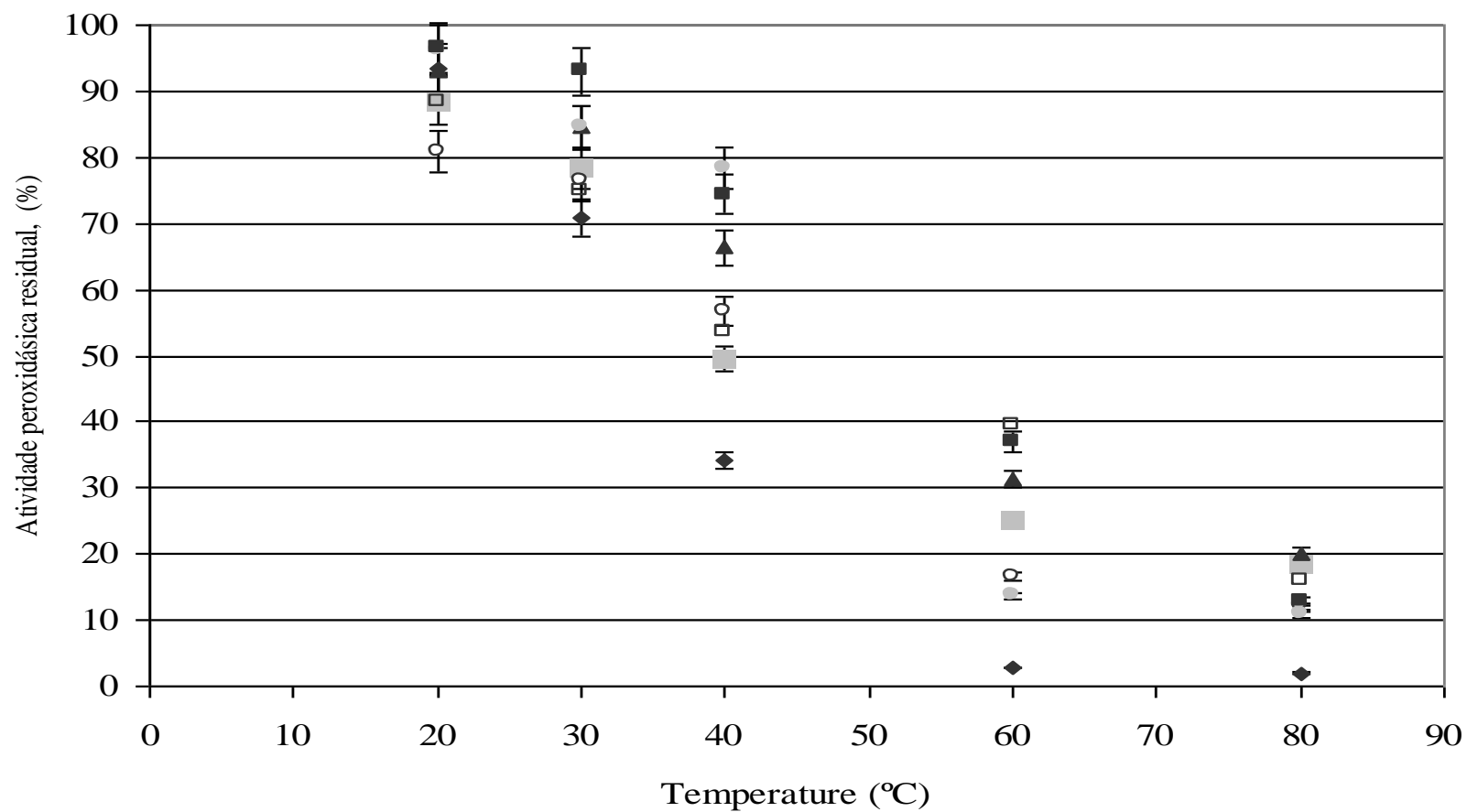


Figura V-8. Perfis do efeito da temperatura sobre a estabilidade da CPO e seus derivados após de um período de incubação de 120 minutos: ◆ CPO nativa; ■ CPO-EDAC; ▲ CPO-GA; □ CPO-HMDA; ○ CPO-GA-GA; ● CPO-EDAC-GA e ■ CPO-HMDA-GA

1.6. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da CPO nativa e seus derivados

A **Figura V-9** mostra o efeito do pH sobre a atividade da CPO nativa e derivatizada. Os perfis de atividade peroxidásica na oxidação do 2,4-DCP a 30°C foram bastante similares em todos os casos. Dois picos de atividade, em valores de pH de 3,0 e 6,0 foram observados para a CPO nativa de acordo com estudos prévios sobre as reações de halogenação de monoclorodimedona (Hager, 1965 e Morris, 1965) e na oxidação de compostos fenólicos e tetrametil-*p*-fenilendienamina (Kadima, 1998). Tanto a enzima nativa como os derivados obtidos mostraram total perda de atividade em pH extremos em valores de 2,0 e 8,0. Contudo, alguma atividade residual (menos de 10%) foi observada dentro de um período de incubação curto menor que 30 minutos.

A **Figura V-10** mostra os perfis de estabilidade da CPO nativa e seus derivados. Quando o tempo de incubação se prolongou por um período de até 1 hora, os mesmos perfis de estabilidade ao pH foram observados. Porém, após 2 horas de incubação, a retenção de atividade só foi observada a pH 7,0 e 8,0 especialmente para os derivados obtidos a partir do entrecruzamento com GA. Em pH 7,0 os derivados CPO-EDAC-GA, CPO-CPO-HDMA-GA e CPO-GA mostraram retenções de atividade entre 43,8% a 48,3% e em pH 8,0 de 32,2 a 36,2%, respectivamente.

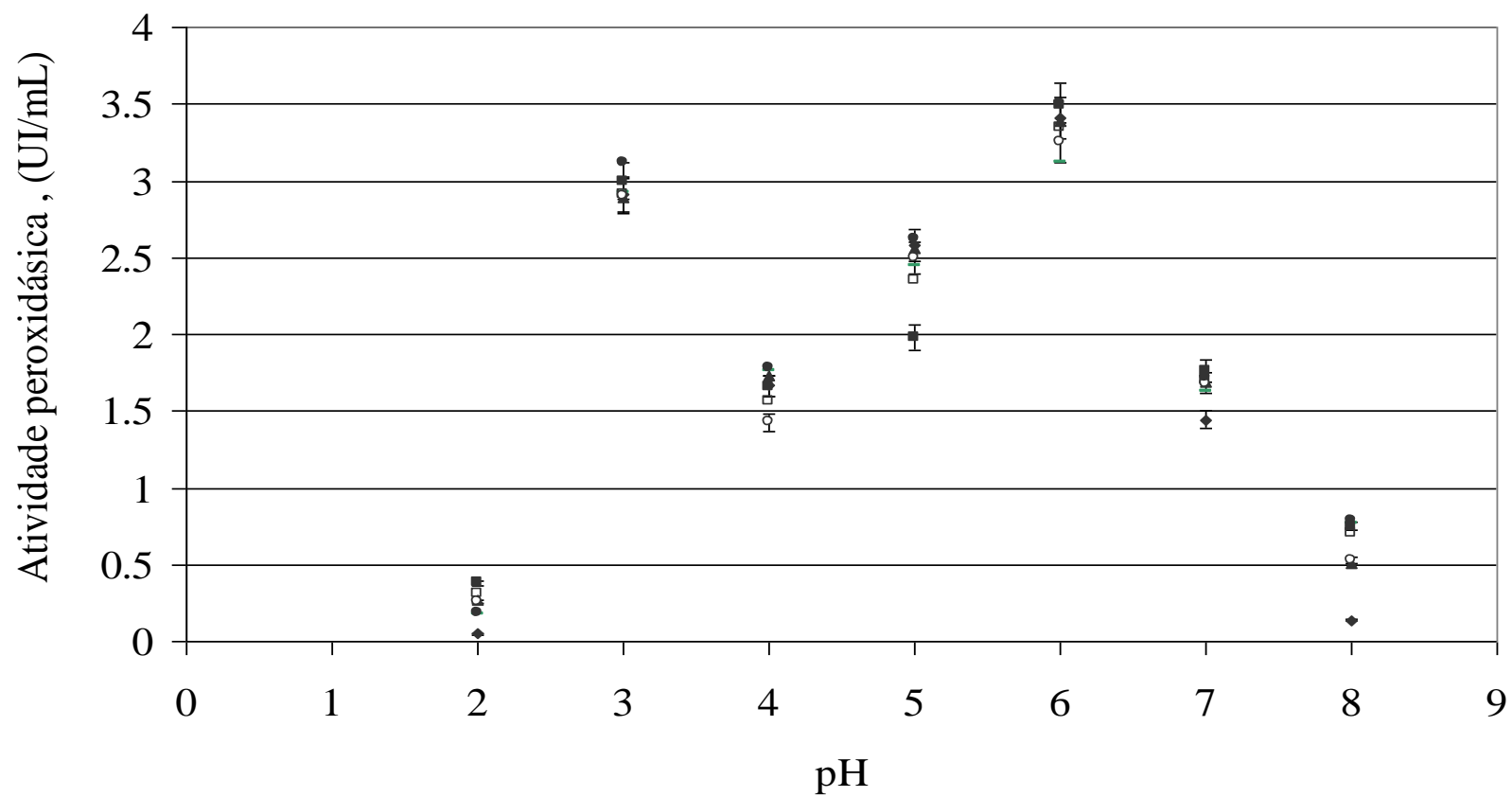


Figura V-9 Perfis do efeito do pH sobre a atividade da CPO e seus derivados: ◆ CPO nativa; ■ CPO-EDAC; ▲ CPO-GA; □ CPO-HMDA; ○ CPO-GA-GA; ● CPO-EDAC-GA e ■ CPO-HMDA-GA.

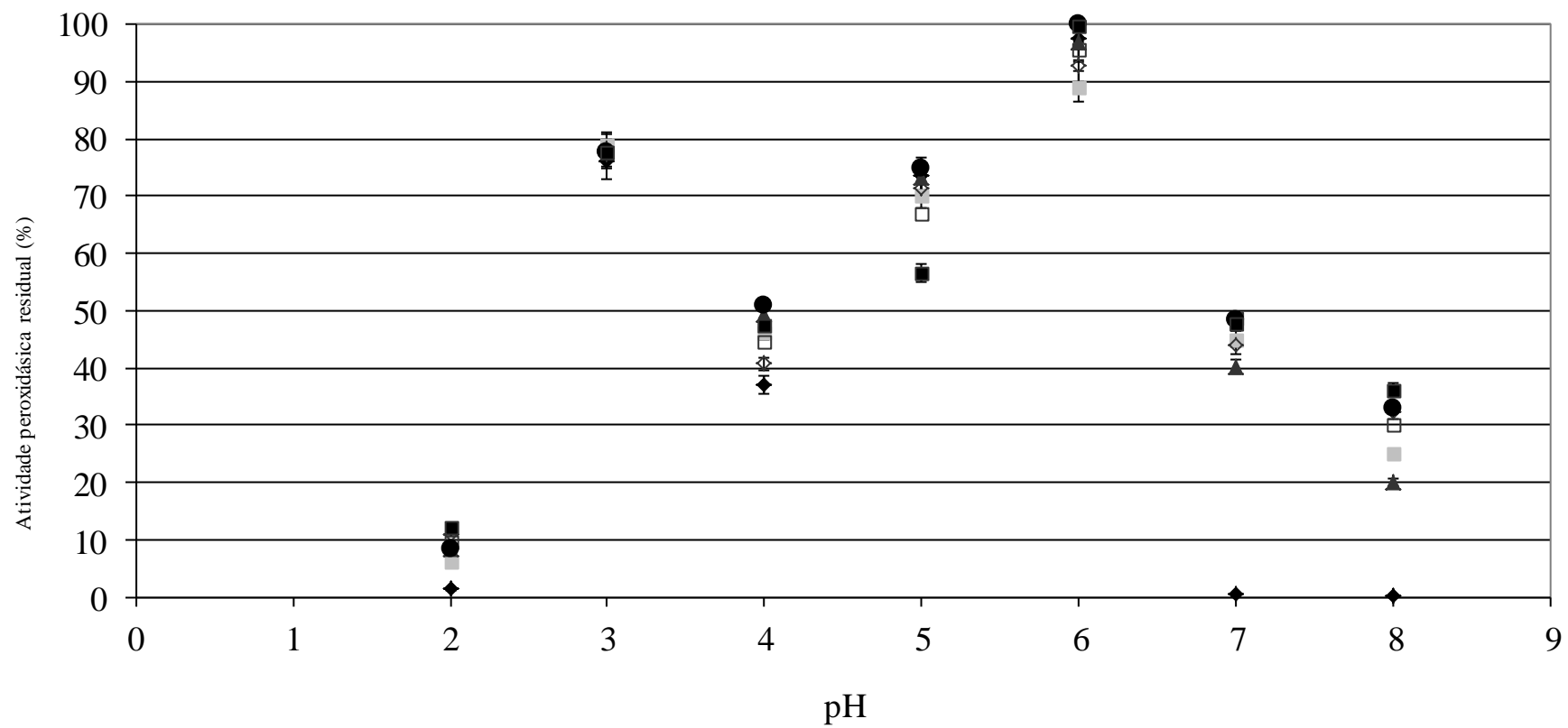


Figura V-10 Perfis do efeito do pH sobre a estabilidade da CPO e seus derivados: ◆ CPO nativa; ■ CPO-EDAC; ▲ CPO-GA; □ CPO-HMDA; ○ CPO-GA-GA; ● CPO-EDAC-GA e ■ CPO-HMDA-GA.

V-2

**DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS
CLORADOS: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS SUBSTRATOS
SOBRE A ATIVIDADE DE PEROXIDÁSICA**

2.1. Efeito da concentração de composto fenólico

Com a finalidade de conhecer o efeito real que a concentração do substrato exerce sobre a atividade peroxidásica da CPO nas reações de oxidação de CPC, foram determinados os parâmetros cinéticos de constante aparente de Michaelis ($K_{M\text{ ap}}$) e constante catalítica k_{cat} . Estes valores foram comparados com os valores reportados na literatura para o caso de HRP na oxidação dos mesmos substratos fenólicos sobe as mesmas condições reacionais. O parâmetro ($k_{\text{cat}}/K_{M\text{ ap}}$) foi estabelecido a fim de comparar a eficiência catalítica dos dois biocatalisadores. A relação $k_{\text{cat}}/K_{M\text{ ap}}$ pode ser calculado depois da determinação dos parâmetros individuais, neste caso foram empregados os métodos de Line Weaver Burke e Hanes (Toti, 2005) para a determinação de V_m e $K_{M\text{ ap}}$ foram utilizados. O valor de k_{cat} foi estabelecido a partir da expressão $k_{\text{cat}} = V_m/E_t$, onde E_t é a concentração ativa da enzima determinada a partir dos coeficientes de extinção milimolar para cada enzima: $E_{408} = 75,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $E_{408} = 83 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para CPO e HRP, respectivamente.

Como pode ser observado a partir dos dados sumarizados na **Tabela V-3**, os valores de $K_{M\text{ ap}}$ e k_{cat} determinaram-se valores de $K_{M\text{ ap}}$ bastantes parecidos para as duas enzimas. Para o caso da CPO mostraram ser similares aos reportados para HRP pela literatura (Metelitz, 1991). Este fato confirma um afinidade bastante similar das duas peroxidases pelos mesmos substratos. Não obstante, em termos de constante catalítica k_{cat} não foram observadas as mesmas semelhanças, embora as condições reacionais fossem as mesmas: 1,0 nM de CPO ou HRP; 2,5 a 20 mM de compostos fenólico clorado, 1,0 mM de peróxido de hidrogênio e 0,5 mM de 4-AAP. A 25° C em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 para CPO e tampão tartarato de sódio 100 mM pH 7,0.

O parâmetro de eficiência catalítica determinada pela relação de $k_{\text{cat}}/K_{M\text{ ap}}$ fornece também uma medida da especificidade pelo substrato. Permite adicionalmente comparar a especificidade por

diferentes substratos para a mesma enzima ou as velocidades de reação para enzimas que como neste caso oxidam os mesmos substratos. Esta relação possui uma constante de velocidade de segunda ordem expressada como $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Devido à possibilidade de inibição por causa do substrato ou precipitação do substrato em altas concentrações, a relação $k_{\text{cat}}/K_{\text{M ap}}$ também pode ser determinado trabalhando sob condições de primeira ordem quando a concentração de substrato é bastante inferior ao valor estimado para $K_{\text{M ap}}$. Nestas condições a equação de Michaelis-Menten $v = (V_{\text{m}} \cdot S)/(K_{\text{M}} + S)$ torna-se igual a $v = (V_{\text{m}}/K_{\text{M}}) \cdot S = k_{\text{obs}} \cdot S = -dS/dt$; Assim $k_{\text{obs}} = V_{\text{m}}/K_{\text{M}} = (k_{\text{cat}} \cdot E_{\text{t}})/K_{\text{M}}$; Por tanto $k_{\text{cat}}/K_{\text{M ap}} = k_{\text{obs}}/E_{\text{t}}$.

Os valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M ap}}$ mostraram que em geral houve aumento na eficiência catalítica com o aumento da halogenação. Porém para o caso do 2,4,6-TCP observou-se decréscimo no valor de $k_{\text{cat}}/K_{\text{M ap}}$ para ambas das enzimas. A CPO mostrou ser em todos os casos, o catalisador mais eficiente na oxidação de substratos fenólicos clorados que HRP. Valores máximos de eficiência catalítica foram observados para o composto 2,4-DCP com $139 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $459 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para HRP e CPO, respectivamente.

Tabela V-3. Parâmetros cinéticos $K_{M\ ap}$ e k_{cat} e valores de eficiência catalítica determinados para a formação de APQI na co-oxidação de fenóis clorados e 4-AAP, catalisada por HRP e CPO.

HRP

| Composto fenólico | $K_{M\ ap}$ mM | k_{cat} s ⁻¹ | $k_{cat}/K_{M\ ap}$ mM ⁻¹ . s ⁻¹ |
|---------------------|-------------------|------------------------------|---|
| Fenol | 6,07 / 5* | 544 / 561* | 89,6 / 92,4* |
| 4-clorofenol | 12,15 / 11* | 959 / 1123* | 79 / 92,4* |
| 2,4 - diclorofenol | 25,34 / 26* | 3530 / 3625* | 139 / 143* |
| 2,4,6-triclorofenol | 31,20 | 2221 | 71,85 |

CPO

| Composto fenólico | $K_{M\ ap}$ mM | k_{cat} s ⁻¹ | $k_{cat}/K_{M\ ap}$ mM ⁻¹ . s ⁻¹ |
|---------------------|-------------------|------------------------------|---|
| Fenol | 6,42 | 1000 | 155,7 |
| 4-clorofenol | 10,04 | 6200 | 418,3 |
| 2,4 - diclorofenol | 33,30 | 15300 | 459,5 |
| 2,4,6-triclorofenol | 42,51 | 12100 | 288,0 |

*Valores reportados na literatura (Metelitz, 1991)

2.2. Efeito da concentração do peróxido de hidrogênio sobre a oxidação de fenóis clorados usando CPO.

Igualmente ao caso dos substratos fenólicos, os parâmetros cinéticos foram também determinados para o caso do co-substrato, o peróxido de hidrogênio. Assim, foram avaliadas misturas reacionais contendo 4,0 nM de CPO ou HRP, peróxido de hidrogênio (0,05 a 50mM)

2,4-DCP (0,5, 1,0, 5,0 e 10,0 mM), a 30° C em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM , pH 6,0 a 25°C.

A **Figura V-11** mostra a dependência da concentração do peróxido de hidrogênio na velocidade inicial de oxidação de substratos fenólicos e na correspondente formação dos APQI durante o acoplamento dos derivados oxidados com 4-AAP. Como pode ser observado, o aumento da atividade enzimática acompanhou o aumento da concentração efetiva de peróxido de hidrogênio até uma concentração de 5,0 mM de peróxido. Após este valor, a atividade peroxidásica decresce rapidamente independente da concentração do substrato fenólico. Em todas as concentrações de 2,4-DCP avaliadas foi observado o mesmo comportamento, porém máximas velocidade iniciais foram atingidas na medida que a concentração do substrato aumentou. Contudo, a concentração de peróxido em concentrações acima de 5,0 mM foi inibitória para CPO. Resultados similares foram reportados previamente na literatura (Metelitz, 1991; Bayton 1994; Crecchio, 1995 e Ghiourelotis, 1999) para o caso da HRP na oxidação de 4-CP e 4-bromofenol. Nos dois casos concentrações de peróxido de hidrogênio na faixa de 3 a 5 mM foram efetivas para atingir os valores máximos de velocidade inicial máxima, porém com concentrações ainda maiores, um rápido decréscimo na atividade foi observado.

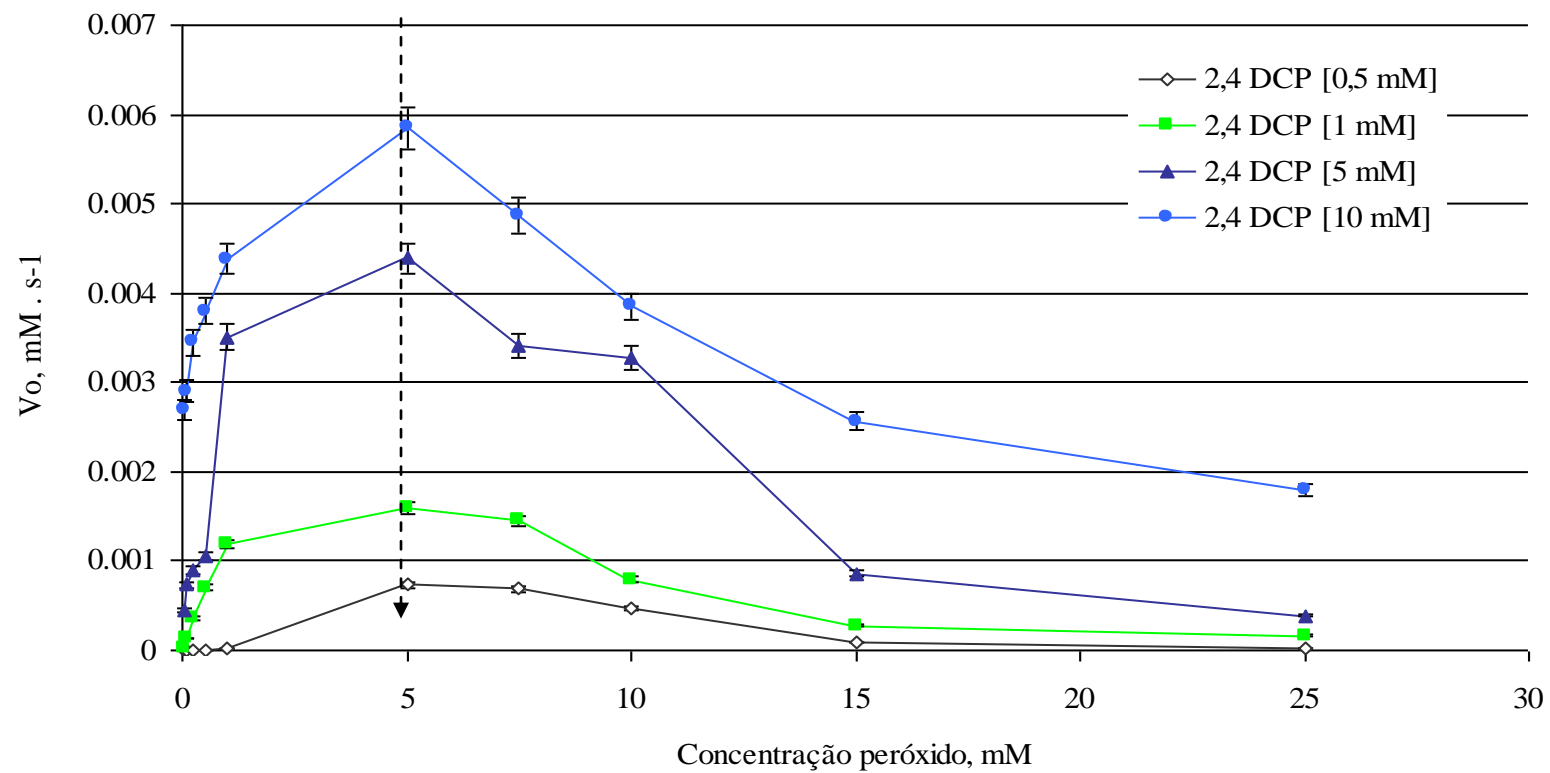


Figura V-11. Dependência da concentração do peróxido de hidrogênio na velocidade inicial de oxidação de substratos fenólicos.

A **Tabela V-4** sumariza os parâmetros cinéticos $K_{M\ ap}$ e k_{cat} e valores de eficiência catalítica determinados para o peróxido de hidrogênio. Como pode ser observado, o um aumento da concentração do 2,4-DCP de 0,5 mM para 1,0 mM promoveu um aumento de até três ordens de magnitude para o valor de V_o . Com valores de concentração para o 2,4-DCP acima de 1,0 mM houve um decréscimo no valor de V_o de uma ordem de magnitude, mantendo-se constante com concentrações ainda maiores.

Vale a pena ressaltar que a CPO mostrou uma velocidade inicial máxima de aprox. $0,006\text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ usando 2,4-DCP em uma concentração de 10,0 mM, superior às velocidades iniciais máximas reportadas para HRP de aprox. $0,001\text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ usando outros compostos fenólicos halogenados, tais como 4-CP ou 4-IP em uma concentração de até 25,0 mM (Metelitz, 1991).

Tabela V-4. Parâmetros cinéticos $K_{M\ ap}$ e k_{cat} e valores de eficiência catalítica determinados para o peróxido de hidrogênio. Misturas reacionais contendo 4,0 nM de CPO ; concentrações variáveis de 2,4-DCP de 0,5 a 10 mM e 0,5 mM de 4-AAP. A 25°C em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0.

| 2,4-DCP mM | $K_{M\ ap}/V_{o\max}$ | $1/V_o$ | $V_{o\max}$ $\mu\text{M}/\text{mL s}^{-1}$ | $K_{M\ ap}$ $\mu\text{M}/\text{mL}$ | Et $\mu\text{M}/\text{mL}$ | k_{cat} s^{-1} | $k_{cat}/K_{M\ ap}$ $\text{mM} \cdot \text{s}^{-1}$ |
|---------------|-----------------------|---------|---|--|-------------------------------|------------------------------|--|
| 0.5 | 34827 | 62118 | 1,61E-05 | 0,560659 | 4,0 | 4,02E-06 | 7,18E-06 |
| 1 | 7,49E+02 | 14,419 | 0,069353 | 51,94812 | 4,0 | 0,017338 | 0,000334 |
| 5 | 6,94E+01 | 788,13 | 0,001269 | 0,088049 | 4,0 | 0,000317 | 0,003603 |
| 10 | 5,81E-01 | 264,98 | 0,003774 | 0,002193 | 4,0 | 0,000943 | 0,430293 |

V-3

DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS: ESTUDO DA ADIÇÃO ÚNICA OU EM PULSO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

3.1. Efeito da relação estequiométrica CPC: peróxido de hidrogênio, na degradação oxidativa de compostos fenólicos clorados.

Como foi estudado previamente, o efeito da concentração dos substratos fenólicos e do co-substrato, o peróxido de hidrogênio sobre a atividade peroxidásica, mostrou que para as concentrações de enzima usadas (4,0 nM) os melhores níveis de atividade são conseguidos com concentrações de peróxido ou CPC abaixo de 5,0 mM, evitando com isto inibição pela concentrações de substrato e co-substrato ou inativação em altas concentrações de peróxido. No entanto, foi nosso interesse conhecer o efeito real de ditas concentrações nas relações estequiométricas CPC : peróxido a fim de estabelecer as melhores condições que permitissem os maiores níveis de oxidação enzimática e remoção dos compostos fenólicos clorados estudados.

Como mostra a **Figura V-12**, o efeito da relação estequiométrica milimolar fenol/peróxido na oxidação enzimática de fenóis clorados usando CPO foi inicialmente estudada pra o caso do 4-clorofenol. Os resultados claramente mostraram três perfis dependentes desta relação estequiométrica. Assim, para relações estequiométricas iguais de 0,1, 0,5 e 1,0 máximos níveis de degradação oxidativa acima de 93% foram observados. Igualmente, quando a concentração de peróxido esteve em excesso molar, como no caso das relações estequiométricas de 0,1/0,5 e 0,5/1,0 níveis de até 100% de oxidação foram atingidos. Finalmente, com concentrações de peróxido de 5,0 mM foi encontrado um efeito deletério do peróxido sobre a atividade enzimática como descrito anteriormente, o que provocou a queda da eficiência da oxidação dos CPC.

Sendo que nossa concentração, alvo de degradação para amostras de efluente de refinaria, encontra-se na faixa de 50 a 500 ppm de fenol total (+/- 0,5 a 5,0 mM), decidimos utilizar o limite inferior de 50 ppm \approx 0,5 mM como concentração de CPC ou fenol total de estudo e as concentrações de peróxido de hidrogênio de 0,5 e 1,0 visto os bons resultados alcançados empregando estas duas relações estequiométricas.

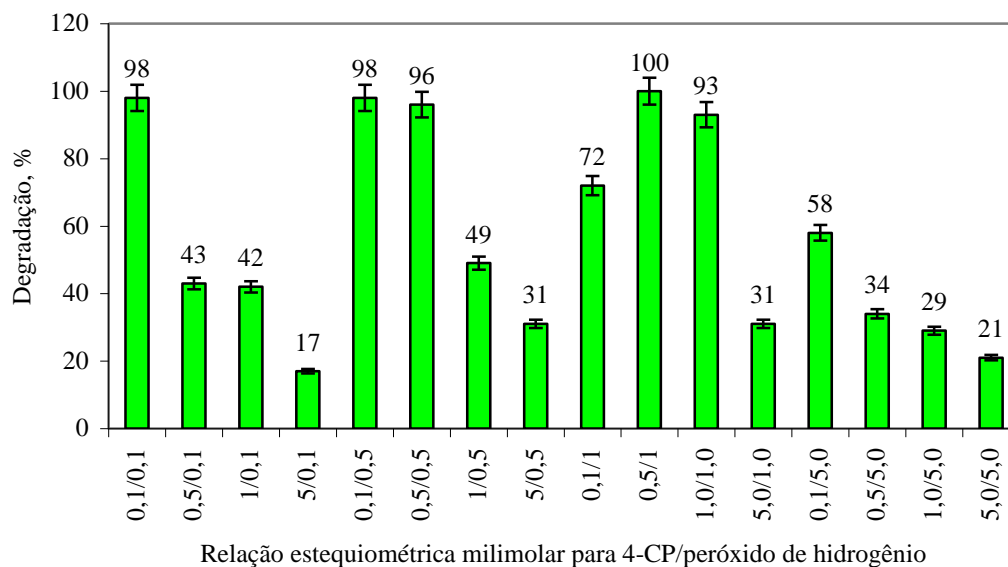


Figura V-12. Efeito da relação estequiométrica milimolar 4-CP/peróxido de hidrogênio na oxidação enzimática de fenóis clorados usando CPO (Ex. 4-clorofenol).

3.2. Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio na degradação oxidativa de compostos fenólicos clorados

Embora com nas relações estequiométricas selecionadas foi possível atingir bons níveis de degradação para o caso do 4-clorofenol, estas relações ainda tinham de ser avaliadas para os outros CPC alvos do estudo. Assim mesmo foi avaliado o efeito da adição em pulso sobre a eficiência da degradação e sobre a atividade residual da enzima. Desta maneira o efeito da adição única ou em pulso em adições sucessivas de 3x ou 5x foram estudadas.

Como mostram as **Figuras V-13 e V-14**, bons níveis de degradação acima de 93% foram observados para P e 4-CP independente se fossem usadas a adição única ou em pulsos de peróxido de hidrogênio em concentrações finais de 0,5 mM ou 1,0 mM fossem usadas. Em

todos os casos usando a adição em pulso de 5x foram alcançados os níveis máximos de degradação de CPC. Assim mesmo foi observado que a adição única de peróxido causa oxidação química direta do substrato de até 12% da concentração inicial dependendo do substrato fenólico.

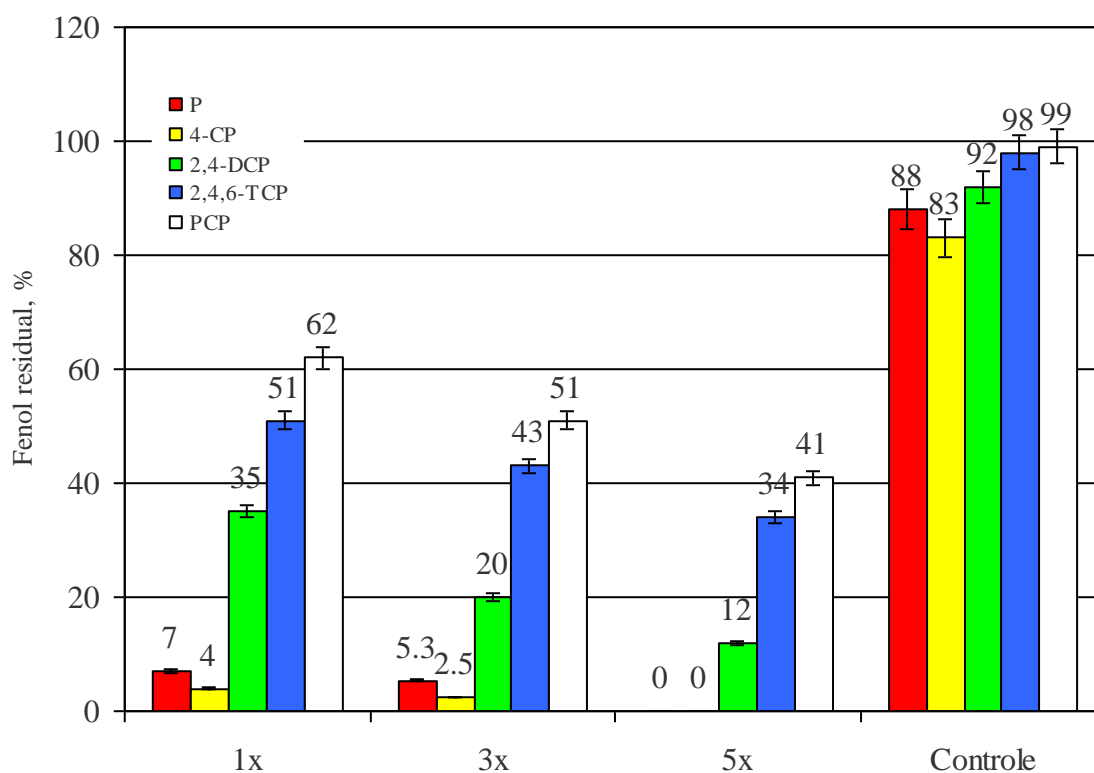


Figura V-13. Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio (0,5 mM) na degradação de compostos fenólicos clorados. Adição única (1X) e adições em pulsos de 3X e 5X.

Com o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio de 0,5 mM para 1,0 mM foi observado além do aumento na degradação um aumento em termos de eficiência. Este aumento na eficiência foi ainda maior quando concentrações de peróxido de hidrogênio de 1,0 mM foram adicionadas em pulsos de até 5X, como mostra a **Tabela V-5**. Assim, foram observados incrementos nas velocidades iniciais de oxidação de 10% até 30%, dependendo do substrato fenólico.

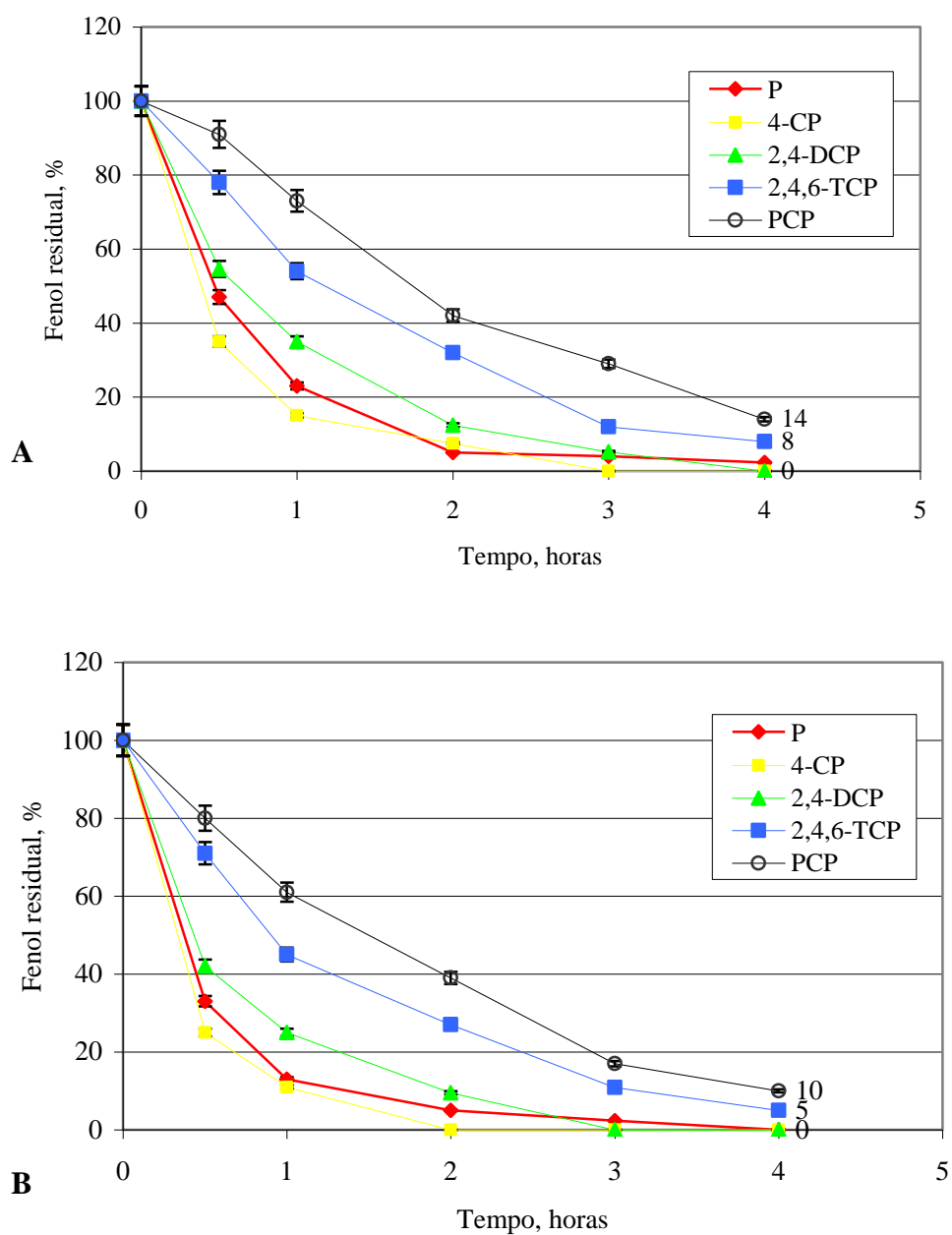


Figura V-14. Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio (1,0 mM) na degradação de compostos fenólicos clorados. Adição única (A) e adições pulsadas de 5X (B) de peróxido de hidrogeno para uma concentração final de 1,0 mM.

Tabela V-5. Efeito da adição de peróxido de hidrogênio avaliado pelo incremento nas velocidades iniciais de oxidação CPC usando CPO com adição única ou pulsada (5X) de peróxido de hidrogênio para uma concentração final de 1,0 mM.

| | 1x | 5x | |
|------------------|--|--|-------------------|
| | Vo | Vo | Incremento |
| | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ | % |
| P | 0,00961 | 0,00980 | 1,9 |
| 4-CP | 0,01063 | 0,01300 | 18,2 |
| 2,4-DCP | 0,00783 | 0,01350 | 42,0 |
| 2,4,6-TCP | 0,00431 | 0,00580 | 25,7 |
| PCP | 0,00243 | 0,00410 | 40,7 |

3.3. Efeito do modo de adição do peróxido de hidrogênio na remoção de compostos fenólicos clorados

Até agora tem sido mostrado como as concentrações de CPC e de peróxido de hidrogênio e sua relação estequiométrica afetam a atividade peroxidásica e a degradação oxidativa. Porém a remoção de compostos fenólicos via oxidação não é um evento que dependa tão só da formação de derivados oxidados, mas também das condições reacionais que favoreçam o aparecimento de espécies reativas (radicais livres) que promovam a polimerização e com isto a formação de produtos de alto peso molecular e baixa solubilidade que possam precipitar.

A **Tabela V-6** sumariza os resultados obtidos em termos do nível de remoção atingida quando misturas reacionais contendo os CPC (0,5 mM), foram tratadas com CPO (6,0 UI/mL) e peróxido de hidrogênio 0,5 ou 1,0 mM em adições únicas ou em pulso de peróxido de 5x. Como

pode ser observado, o nível máximo de remoção foi obtido com o aumento no número de pulsos de adição e com relações estequiométricas de CPC/peróxido de 0,5/1,0. Assim foi observado alto nível de remoção de 100 % , 80 % e 65%, para P, 4-CP e 2,4-DCP, respectivamente. Para o caso de TCP e PCP, não foi possível a determinação do nível de remoção devido à baixa solubilidade destes compostos, que interfere com a dosagem gravimétrica dos produtos oxidados derivados a partir deles. Por outra parte espera-se que para estes compostos exista uma baixa ou até mesmo nenhuma polimerização como no caso do PCP devido a seu alto grau de halogenação.

De maneira geral, a adição única de 1,0 mM de peróxido foi relativamente mais benéfica em termos de remoção do que a adição pulsada da mesma concentração de peróxido. Uma vez mais vemos que as condições oxidativas iniciais têm um papel muito importante na formação de derivados poliméricos, sendo que com uma maior concentração inicial de peróxido disponível durante a adição única é favorecida a formação de precipitados em comparação com a adição em pulsos onde a concentração de peróxido disponível é limitada.

Espera-se que níveis maiores de remoção usando CPO possam ser atingidos quando a enzima seja utilizada na forma imobilizada, da mesma maneira que estudos prévios já mostraram que níveis maiores de remoção de CPC foram atingidos usando HRP imobilizada (Nicell, 1993; Laurent, 2003 e Lai, 2005).

Tabela V-6. Efeito da adição de peróxido de hidrogênio sobre a remoção de CPC após reação enzimática de 4 h.

| RE | 5X 0,5/0,5 para | | | | | |
|----------------|-----------------|---------|---------|---------|--------------------|------------|
| | 1X | | 5X | | 1X para 5X | 5X 0,5/1,0 |
| | 0,5/0,5 | 0,5/1,0 | 0,5/0,5 | 0,5/1,0 | Aumento na remoção | |
| | | | | | % | % |
| P | 75 | 87 | 100 | 100 | 25 | 13 |
| 4-CP | 45 | 60 | 65 | 80 | 20 | 25 |
| 2,4-DCP | 25 | 55 | 32 | 65 | 12 | 33 |
| 2,4,6- | | | | | | |
| TCP | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| PCP | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

RE: Relação estequiométrica milimolar para de fenol/peróxido de hidrogênio

ND: Não determinado.

3.4. Efeito da adição de coagulante sobre a remoção de compostos fenólicos clorados.

Na atualidade a degradação de compostos fenólicos em solução não esá limitada tão só à geração de produtos oxidados, mas também à remoção deste tipo de produtos que muitas das vezes permanecem no efluente, provocando o aparecimento de cor e turvação mas sem a formação de precipitados que poderiam ser facilmente retirados por filtração. Como temos visto até agora, na medida que aumenta o grau de halogenação de um composto fenólico diminui a facilidade com que este gera produtos poliméricos após a reação enzimática. Estudos recentes (Nicell, 1993; Zhang, 1997 e Lai, 2005) têm mostrado como o uso concomitante de agentes coagulantes poderia melhorar a eficiência da remoção enzimática. Alguns destes agentes floculantes agem mecanicamente na remoção de derivados oxidados e polímeros de baixo peso molecular que puderam permanecer na solução, outros no entanto podem reagir diretamente com os derivados oxidados primários que não polimerizaram, para subsequente remoção por precipitação.

Estes agentes podem ser do tipo mecânico, como sais minerais: aluminatos, silicatos etc. Outros tipo de agentes flocculantes, orgânico tais como PEG, celuloses que além do arraste mecânico e especialmente como no caso de proteínas e alguns carboidratos tais como quitosana, ricos em grupamentos aminos, reagem diretamente com as quinonas e outros derivados carbonílicos formados a partir da reação enzimática através de reações de Maillard para formar bases de Schiff de alto peso molecular e baixa solubilidade (Nicel, 1993; Zhang 1997).

A enzima HRP já foi usada com sucesso na remoção de compostos fenólicos com a adição de diversos flocculantes, porém os melhores resultados foram obtidos a partir do uso de géis de quitosana (Zhang, 1991; Lai 05). Desta maneira, e visto a similaridade com nosso trabalho decidimos avaliar o efeito da adição deste agente coagulante sobre a remoção de compostos fenólicos clorados. Cabe ressaltar que esta adição só foi efetiva no início ou durante o processo de oxidação enzimática, pois adicionando quitosana após o término da reação enzimática o efeito esperado não foi observado.

Como mostra a **Figura V-15** concentrações variáveis de quitosana previamente gelificada foram adicionadas antes de iniciar o processo de oxidação enzimática. Os resultados mostram claramente aumentos na remoção de 12 e 30% para o caso de 2,4-DCP e 4-CP, respectivamente. Isso significa a quase completa remoção destes fenóis ou dos seus produtos oxidados da solução. Para o caso de P, não foi observada a formação adicional de precipitados visto que o processo enzimático de oxidação já é eficiente na polimerização deste composto. Para o caso dos fenóis 2,4,6-TCP e PCP, os resultados não foram conclusivos, e o arraste mecânico foi maior do que a reação de coagulação. O efeito químico da quitosana só foi observado com concentrações de até 2 ppm. Com concentrações maiores de quitosana a reação do carboidrato com as quinonas em solução foi o mesmo. Cabe ressaltar que nestas concentrações (acima de 2 ppm) a remoção foi induzida mais pelo arraste mecânico do fenol residual.

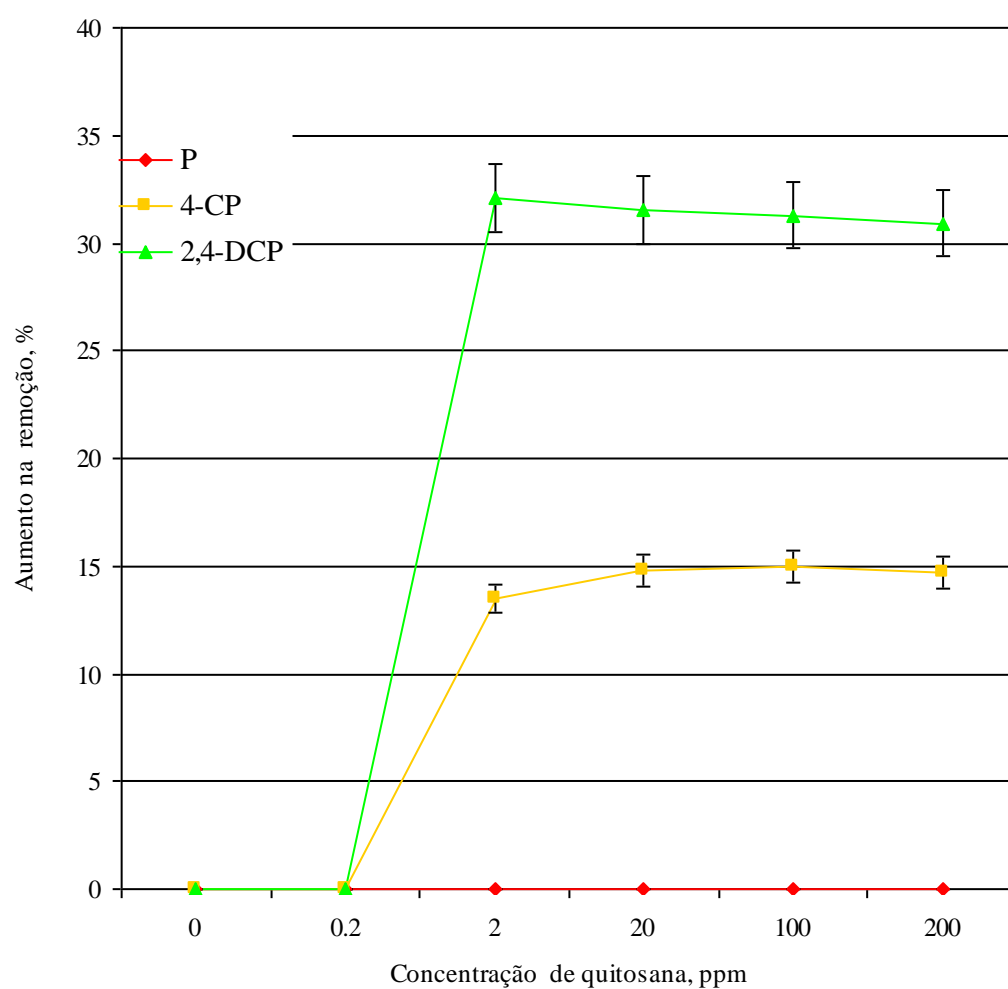


Figura V-15. Efeito da concentração do coagulante sobre a remoção final de CPC após reação enzimática de 4 h.

V-4

DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS CLORADOS :
ESTUDO DA GERAÇÃO ELETROQUÍMICA DE PERÓXIDO DE
HIDROGÊNIO

Visto as baixas concentrações de peróxido de hidrogênio que podem ser obtidas através da geração eletroquímica, e devido a dificuldade para sua quantificação pelos métodos convencionais de titulação iodométrica ou permanganométrica, foi desenvolvida uma metodologia que permitiu a quantificação espectrofotométrica do peróxido de hidrogênio eletrogerado. O desenvolvimento e descrição desta metodologia serão ampliados nos anexos.

4.1. Efeito do potencial na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio (GE)

De acordo com a **Figura V-16** foi possível confirmar que com potenciais mais eletronegativos uma maior produção de peróxido de hidrogênio pode ser alcançada. Assim, aumentando a sobre tensão catódica até $-620 \text{ mV}_{\text{ESC}}$ a mais alta geração foi atingida. Com potenciais ainda mais negativos foi observado o decréscimo na geração do peróxido devido a sua redução para água. Como poderia ser esperada, a geração do peróxido deveria se estabilizar quando o sistema atingisse o máximo pico de geração, porém, devido ao uso da suplementação descontínua de oxigênio, o máximo é atingido em uma hora e a concentração decresce acompanhando a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio reacional. Assim, a máxima concentração de peróxido de $0,77 \text{ mM}$ foi observada a $-620 \text{ mV}_{\text{ESC}}$ em uma hora. Concentrações finais de $0,4 \text{ mM}$ foram determinadas após 4 horas usando este mesmo potencial.

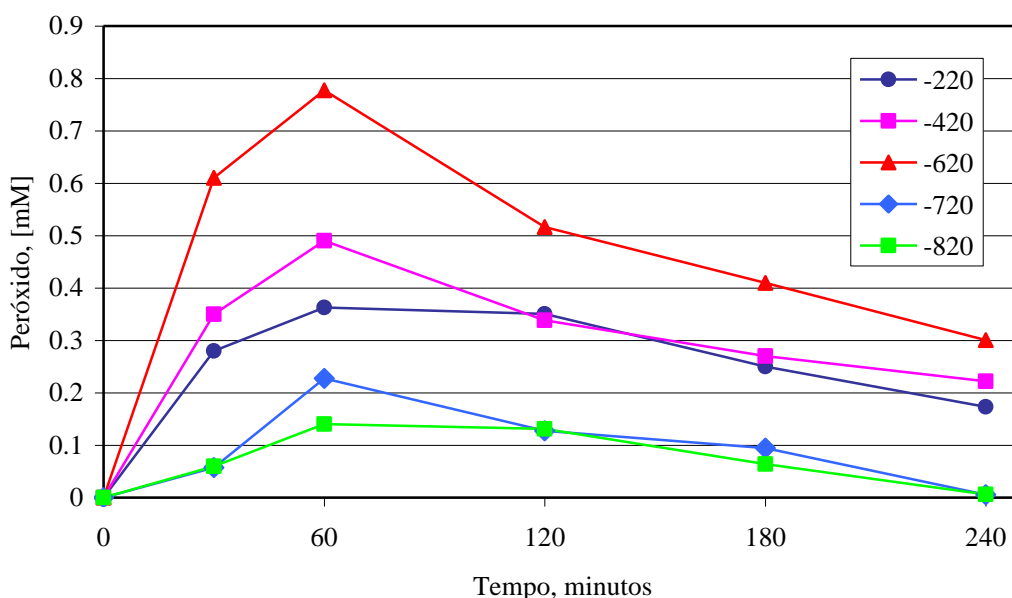


Figura V-16. Efeito do potencial na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio em célula eletroquímica bicompartimentada.

4.2. Efeito da aeração na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio (GE)

Como foi mencionada anteriormente, a disponibilidade do oxigênio no meio de reação é uma das limitantes do processo de eletrogeração de peróxido de hidrogênio. A **Figura V-16** mostra os resultados obtidos na otimização das condições de geração em termos de suplementação de oxigênio (razão de vazão e tempo). Nesta figura são comparados os níveis máximos de geração de peróxido durante 4 h obtidos aplicando um sobre-tensão catódica de $-620 \text{ mV}_{\text{ESC}}$, pré-aeração de 0,5 vvm com oxigênio por 60 min prévios ao início da ligação do sistema e aeração contínua com oxigênio de 0,5 vvm durante todo o processo de 4h.

Como pode ser observado nas **Figuras V-16 e 17**, a aeração contínua consegue aumentar em até 35% a concentração máxima de peróxido de hidrogênio, além de manter bons níveis de geração ao longo das 4 horas de processo, com concentrações finais de até 3 vezes a concentração final

obtida com a pré-aeração. Entretanto, deveria ser esperado que os níveis de geração fossem mantidos uma vez alcançado o máximo de geração após 1 hora, porém o decréscimo observado deve-se a fatores não relacionados com aeração mas com processos de passivação do eletrodo e de transferência de massa.

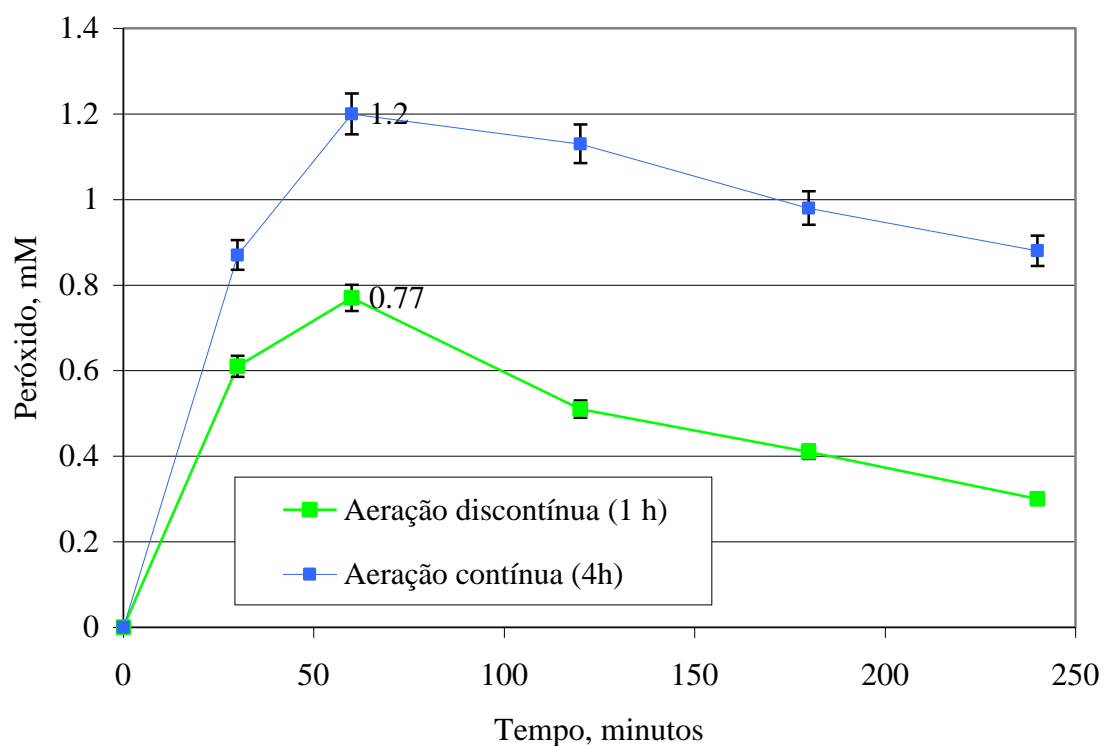


Figura V-17. Efeito da aeração na geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio em célula eletroquímica bicompartimentada.

V-5

**DEGRADAÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE COMPOSTOS
FENÓLICOS CLORADOS**

5.1. Experimentos em batelada de oxidação de CPC com geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio: Efeito do potencial aplicado.

Como já foi mencionado com potenciais catódicos baixos de até $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ é observada uma boa geração de peróxido de hidrogênio, porém esta condição podia ou não estar relacionada com as melhores condições eletroquímicas para a oxidação de CPC. A fim de confirmar se as melhores condições de geração eletroquímica (GE) correspondem também às melhores para a degradação, experimentos a -220 , -420 e $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ foram realizados. Embora a aeração contínua usando oxigênio tivesse mostrado os melhores resultados em termos de geração, esta condição dificultaria ainda mais a quantificação do nível de oxidação real de CPC, devido ao arraste que a corrente de ar exerce sobre a solução fenólica. Por este motivo optou-se pela pré-aeração durante 1 hora. Durante o estudo prévio no processo de bioeletrodegradação foi usado o 4-CP como alvo da oxidação. Adicionalmente, os experimentos foram realizados na célula bicompartimentada a fim de avaliar separadamente tanto a oxidação enzimática e química devida ao peróxido eletrogerado como a oxidação anódica direta.

Na **figura V-18** é mostrado o efeito do potencial sobre o processo bioeletroquímico de oxidação do 4-CP usando CPO. A oxidação bioeletroquímica de 4-CP aconteceu exclusivamente na câmara catódica, onde bons níveis de oxidação de 75, 93 e 100% do fenol inicial foram observados dependendo do potencia aplicado.

Os resultados confirmaram que empregando uma sobretensão catódica de $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ além de serem obtidos os mais altos níveis de geração de peróxido, também foram observados os melhores níveis de oxidação de até 100% do 4-CP inicial. Adicionalmente, experimentos controles demonstraram que oxidação anódica é responsável pela oxidação de até 30% do fenol inicial e esta foi proporcional ao aumento da sobretensão. Níveis similares de oxidação química devida ao peróxido também foram observados. Estes níveis de oxidação química foram similares àqueles observados durante os experimentos com adição direta de peróxido de hidrogênio.

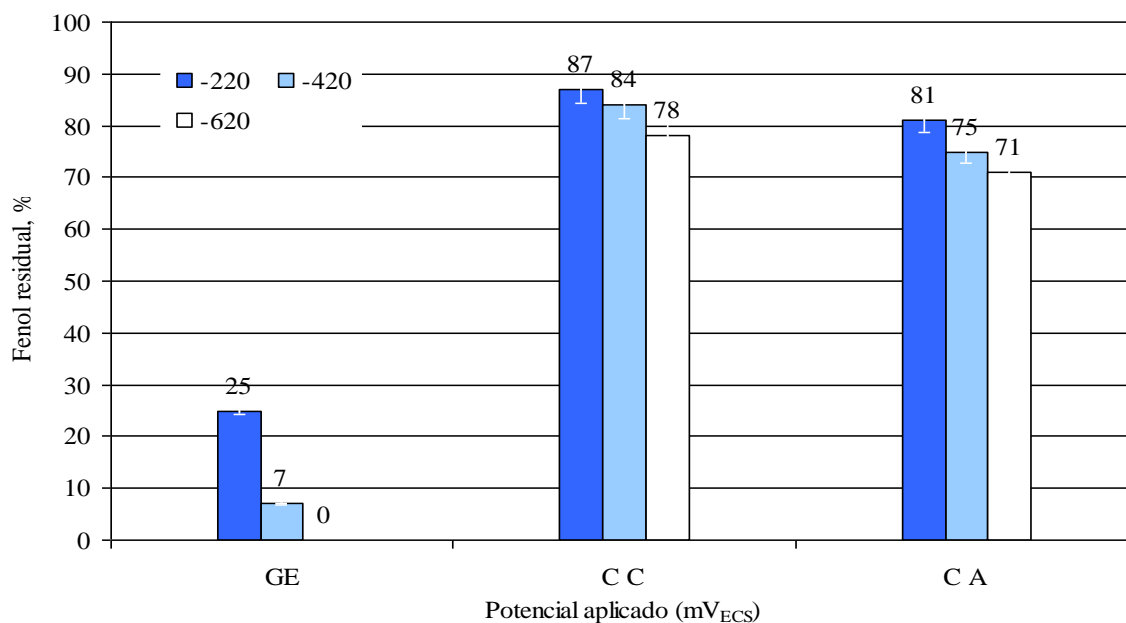


Figura V-18. Efeito do potencial aplicado sobre a bioeletro-oxidação de 4-CP. GE: Reação enzimática com eletrogeração de peróxido de hidrogênio. C C: controle da câmara catódica. C A: Controle da câmara anódica.

Como confirmado as melhores condições de eletrogeração corresponderam também às melhores para a oxidação de 4-CP. Assim estas condições foram aplicadas na bioeletrodegradação dos outros CPC alvos do estudo. Na **figura V-19** são mostrados resultados obtidos durante a bioeletrodegradação dos outros CPC. Como pode ser observado na **figura V-19 A**, a eletrogeração de peróxido de hidrogênio durante a oxidação enzimática mostrou excelentes níveis de oxidação de até 100% para P e 4-CP e níveis inferiores de 77, 69 e 59% para 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP, respectivamente, após 4 horas de reação. De maneira geral os níveis de degradação obtidos através do uso de GE com exceção de P e 4-CP foram inferiores aos níveis observados com a adição direta de peróxido (5X 1,0 mM), onde foram oxidados 96, 95 e 90% dos fenóis 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP, respectivamente. Adicionalmente, foram observados níveis de oxidação anódica na faixa de 20 a 30% bastante similares dependendo do CPC avaliado.

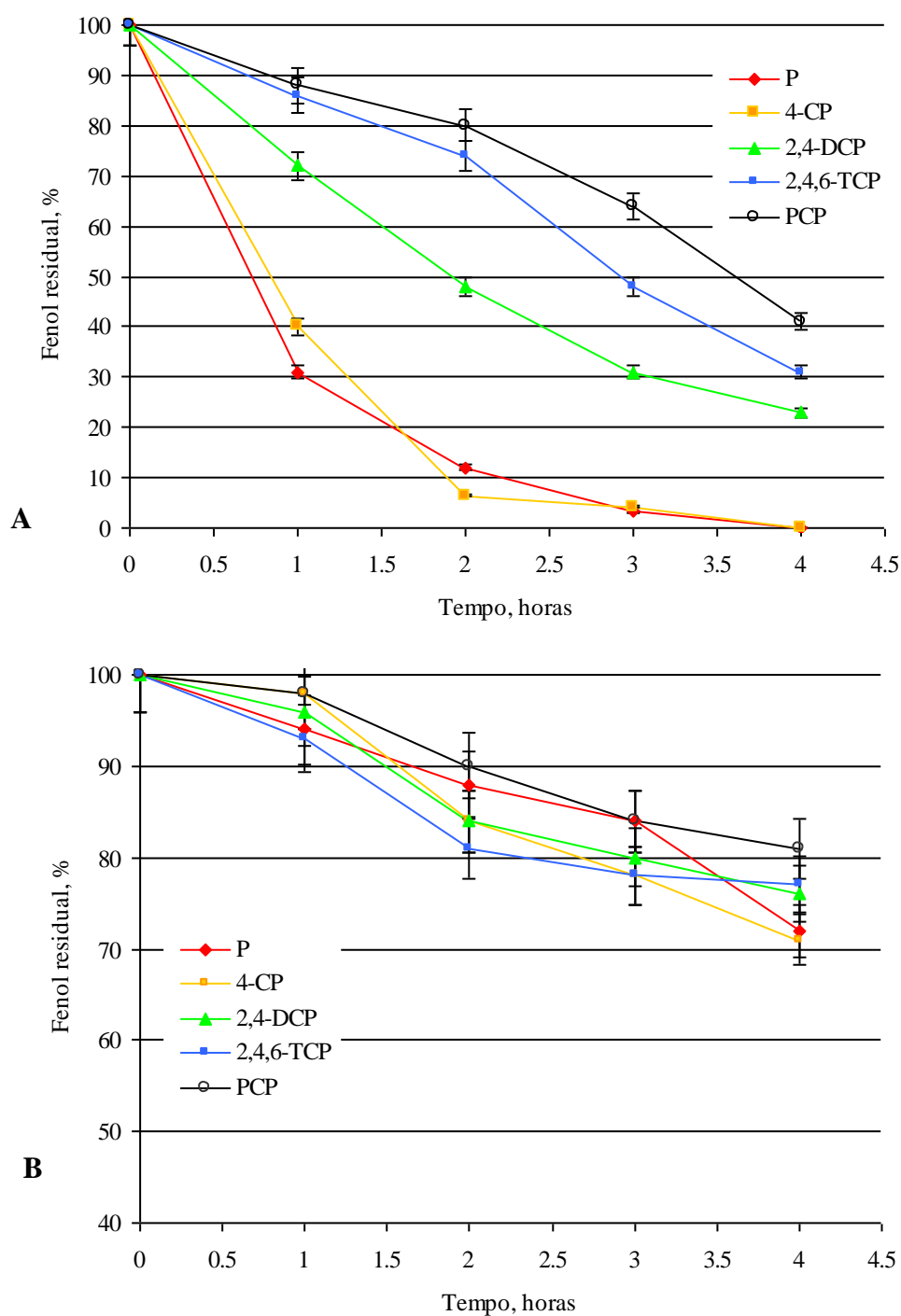


Figura V-19. Bioeletro-oxidação de CPC a $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$, em célula bicompartimentada. Pré-aeração de 1 h com 0,5 vvm (O_2) e agitação de 220 rpm. (A) GE: Reação enzimática com eletrogeração de peróxido de hidrogênio no compartimento catódico. (B) C A: Controle da câmara anódica.

Assim como os níveis de oxidação que foram menores usando GE em comparação com a adição direta de peróxido, as velocidades de oxidação foram em geral maiores na adição direta como mostram as **Tabelas V-7 e V-8**. Como pode ser observado dependendo do CPC avaliado quando a adição direta foi usada, houve um aumento de quase 2 vezes na velocidade de oxidação para o caso de 4-CP, de aproximadamente 4 e 6 vezes para PCP e 2,4-DCP, respectivamente. Para o caso de 2,4,6-T as menores velocidades de oxidação foram observadas. Como já tinha sido comentado anteriormente, a velocidade de oxidação é proporcional à disponibilidade de peróxido no meio reacional. Embora a longo prazo sejam obtidos similares níveis de degradação usando adição pulsada (5X), a eletrogeração, poderá estar em desvantagem devido às baixas concentrações efetivas peróxido que são geradas ao longo do processo e que dependem da concentração de oxigênio dissolvido.

Tabela V-7. Comparação das velocidades iniciais máximas de oxidação CPC usando CPO com adição única ou pulsada (5X) de peróxido de hidrogênio (1,0 mM) e eletrogeração (EG - 620mV_{ECS}).

| | 1x | 5x | EG (Bicomp) |
|------------------|--|--|--|
| | V _o | V _o | V _o |
| | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ |
| P | 0,00961 | 0,00980 | 0,00790 |
| 4-CP | 0,01063 | 0,01300 | 0,00710 |
| 2,4-DCP | 0,00783 | 0,01350 | 0,00240 |
| 2,4,6-TCP | 0,00431 | 0,00580 | 0,00060 |
| PCP | 0,00243 | 0,00410 | 0,00110 |

Com a finalidade de melhorar a performance da bioeletro-oxidação em termos de eficiência e velocidade de reação, experimentos de oxidação bioeletroquímica de CPC, foram avaliados em

reator de câmara única com aeração contínua por 4 h. Desta maneira, o conjunto de todos os eventos e condições ótimas responsáveis pela oxidação dos CPC foram avaliados. Como mostra a **figura V-20**, níveis de degradação de 100% para P e 4-CP permaneceram iguais. Porém foram níveis oxidação melhores para o caso de 2,4-DCP, 2,4,6-TCP e PCP de 97%, 93% e 88% foram atingidos, respectivamente. Estes níveis foram similares àqueles obtidos com a adição direta 5X de peróxido hidrogênio (1,0 mM).

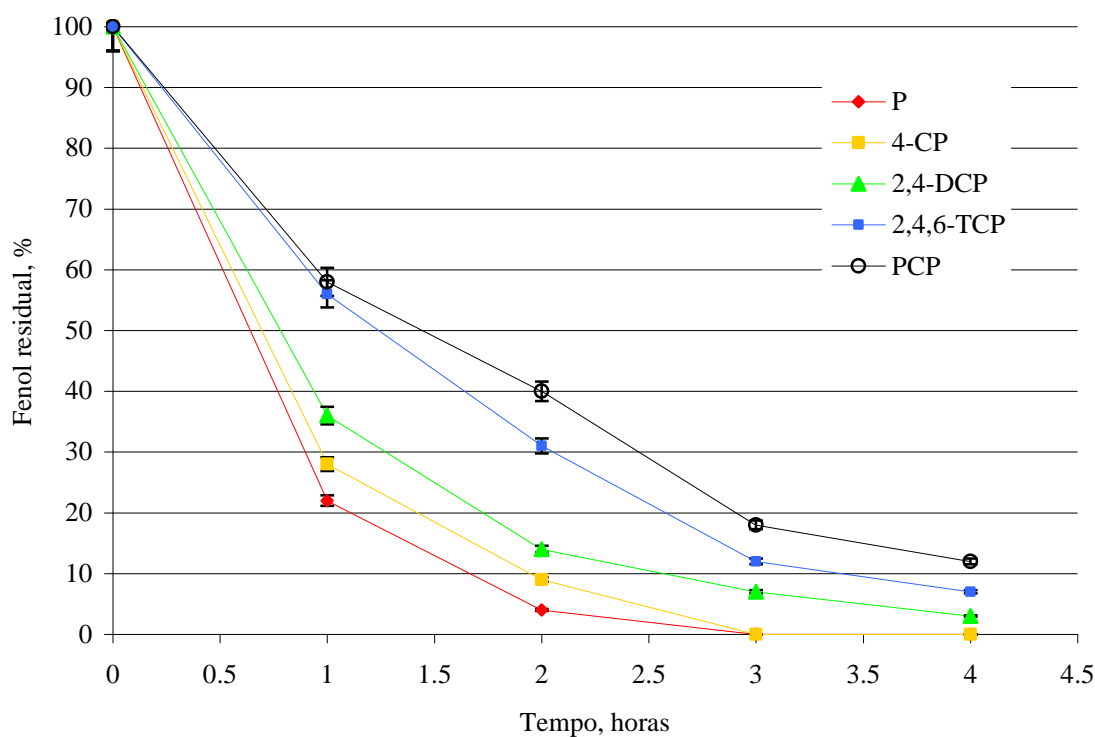


Figura V-20. Bioeletro-oxidação de CPC a $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$, em célula de câmara única. Aeração contínua de 4 h com 0,5 vvm (O_2) e agitação de 220 rpm (A) GE: Reação enzimática com eletrogeração de peróxido de hidrogênio no compartimento catódico. (B) C A: Controle da câmara anódica.

Tabela V-8. Comparação das velocidades iniciais de oxidação CPC usando CPO com adição única ou pulsada (5X) de peróxido de hidrogênio (1,0 mM) e eletrogeração (EG -620mV_{ECS}) em células bicompartimentada e de câmara única..

| | 5x | EG (Bicomp.) | EG (Câmara única) | Incremento |
|------------------|--|--|--|---------------------|
| | Vo | Vo | Vo | Bicomp. Vs C. única |
| | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ | $\mu\text{M mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ | % |
| P | 0,00980 | 0,00790 | 0,00920 | 14,1 |
| 4-CP | 0,01300 | 0,00710 | 0,00820 | 13,4 |
| 2,4-DCP | 0,01350 | 0,00240 | 0,00740 | 67,5 |
| 2,4,6-TCP | 0,00580 | 0,00060 | 0,00420 | 85,7 |
| PCP | 0,00410 | 0,00110 | 0,00390 | 71,8 |

5.2. Remoção bioeletroquímica de CPC e efeito da adição de coagulante

O efeito da adição de quitosana como coagulante e promotor da precipitação dos derivados oxidados provenientes da reação de oxidação enzimática durante a geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio foi igualmente avaliado. Como mostra a **figura V-21**, resultados similares foram observados durante a geração eletroquímica (GE) e a adição direta de peróxido (AD). Assim, 100% do fenol inicial para o caso de P foi removido pela precipitação dos produtos oxidados da reação enzimática e 78 e 59% para o caso de 4-CP e 2,4-DCP, respectivamente. Quando quitosana foi adicionada no início da reação, níveis de remoção ainda maiores foram observados para os fenóis 4-CP e 2,4-DCP de 91,5 e 91,3%, respectivamente. Isto significou em um aumento de quase 14% na remoção de 4-CP e 32% para o caso de 2,4-DCP. Deve ser mencionado que a adição de quitosana embora melhora os níveis de remoção por GE, também aumenta a possibilidade de passivação do eletrodo, pois o produto floculado fica

aderido sobre este durante a precipitação, o que diminui a transferência de massa e com isto seu tempo de vida útil.

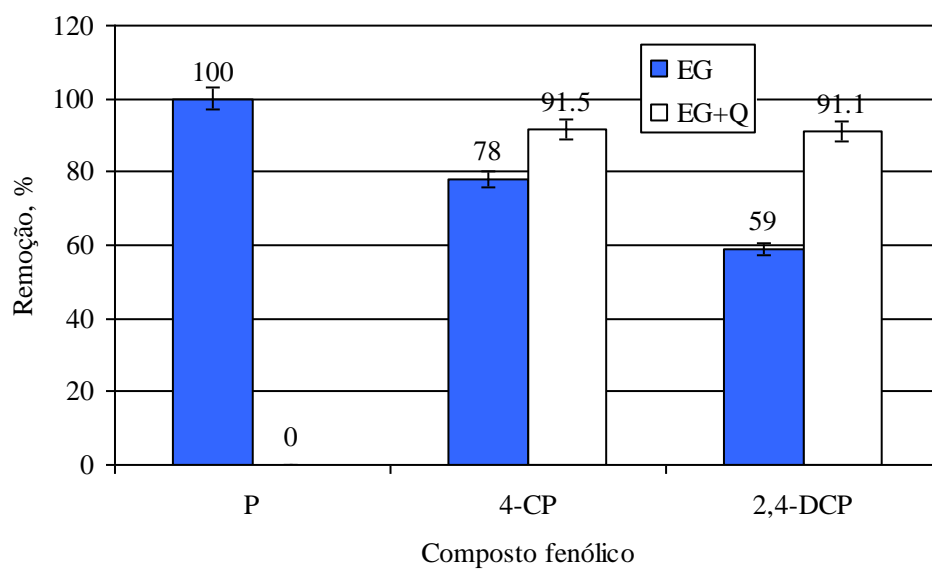


Figura V-21. Remoção de CPC por GE a $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$, em célula de câmara única e aumento na remoção pela adição de coagulante. Aeração contínua de 4 h com 0,5 vvm (O_2) e agitação de 220 rpm. Adição de coagulante (2 ppm de quitosana).

V-6

DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM ÁGUAS
RESIDUÁRIAS DE REFINARIA: ADIÇÃO DIRETA E
BIOELETROGERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Recebemos através do laboratório de águas residuais do CENPES, três amostras não caracterizadas da refinaria de Duque de Caxias REDUC da Petrobras. Estas amostras com concentrações informadas de fenol total de 4, 200 e 400 ppm eram provenientes de dois efluentes brutos sem tratamento e de um tanque para o armazenamento de óleo cru, respectivamente. As amostras foram usadas com alvo da degradação oxidativa usando CPO em reações com adição direta ou geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio, sob as melhores condições reacionais previamente encontradas para cada metodologia de acordo com o estudo de degradação de compostos fenólicos clorados.

6.1. Acondicionamento das amostras e verificação da concentração inicial de fenol total.

Antes de realizar os processos de tratamento enzimático sobre estas amostras, as concentrações de fenol total foram confirmadas e o valor de pH foi ajustado.

Tabela V-9. Descrição das amostras provenientes da refinaria REDUC-Petrobras usadas como alvos da oxidação enzimática de compostos fenólicos.

| Amostra | Tipo de amostra | Fenol Total (ppm) informado | pH | Fenol Total (ppm) confirmado |
|---------|-------------------------|--------------------------------|------|---------------------------------|
| 1 | Efluente bruto 1 | 4 | 7,41 | 4,13 |
| 2 | Efluente bruto 2 | 200 | 8,88 | 245,2 |
| 3 | Tanque de armazenamento | 400 | 9,50 | 201,5 |

Tabela V-10. Acondicionamento realizado sobre as amostras de efluentes antes da degradação enzimática.

| Amostra | Tipo de amostra | Código | Fenol Total (ppm) | pH inicial | pH final |
|---------|--------------------------------|--------|----------------------|------------|----------|
| 1 | Efluente bruto 1 | EF1 | 4,13 | 7,41 | 6,02 |
| 2 | Efluente bruto 2 | EF2 | 245,2 | 8,88 | 6,03 |
| 3 | Tanque de armazenamento | TA | 201,5 | 9,50 | 6,01 |
| 4 | Efluente bruto 2 (diluída) | EF2d | 50,0 | 8,88 | 6,00* |
| 5 | Tanque armazenamento (diluída) | TAd | 50,0 | 9,50 | 6,00* |

* Diluição com tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0

6.2. Experimentos preliminares de degradação do fenol total com adição direta de peróxido de hidrogênio.

Com a finalidade de determinar o grau de degradação a ser obtido em amostras de efluentes de refinaria, experimentos com adição direta em pulsos de até 5X de peróxido de hidrogênio foram realizados. Como pode ser observado na figura V-22, quando a degradação foi realizada diretamente sobre as amostras sem nenhum tipo de pré-tratamento ou acondicionamento, baixos níveis de degradação foram observados abaixo de 52%. Porém, quando as amostras foram acondicionadas em termos de ajuste de pH ou diluição com tampão para ajuste da concentração, níveis melhores de degradação foram observados. Assim, para a amostra do efluente bruto sem diluição (EF1) com 4,15 ppm de fenol total inicial foi observado o mais alto nível de degradação de 100%. Para os efluentes de 200 e 400 ppm diluídos até uma concentração final de 50 ppm com tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0, foram achados níveis de degradação

similares de até 75 % da concentração inicial de fenol. Estas mesmas amostras sem nenhum tipo de pré-tratamento, apenas com o ajuste do pH com ácido, mostraram níveis de degradação de 80 e 70% para EF2 e TA, respectivamente.

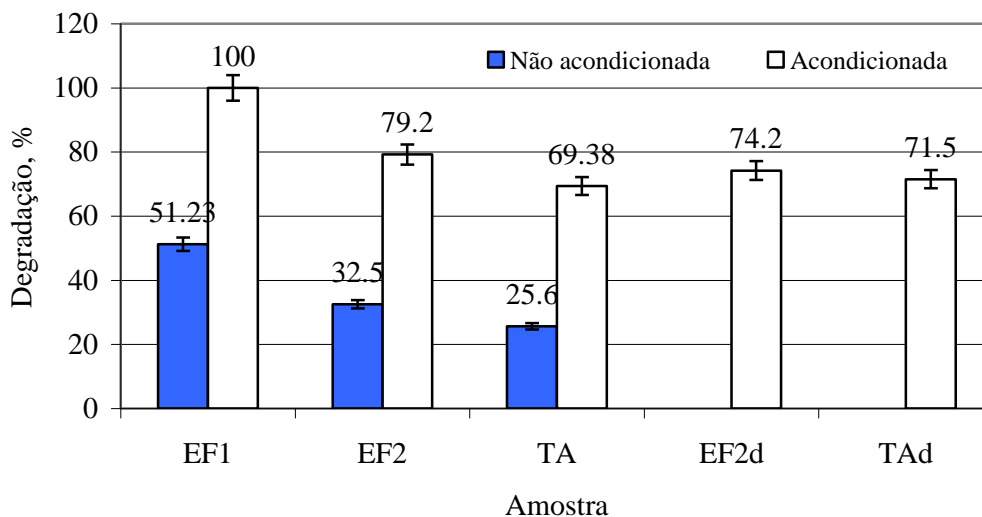


Figura V-22. Resultados da degradação oxidativa de compostos fenólicos em amostras de efluentes de refinaria, com adição direta (5X) de peróxido de hidrogênio, após 4 horas de reação. Misturas reacionais contendo 6,0 UI/mL de CPO, 1,0 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0, a 25° C.

6.3. Efeito da adição de coagulantes na remoção de fenol total em amostras de efluente de refinaria.

A figura V-23 mostra os resultados obtidos em termos de remoção do fenol total e do efeito adicional da adição de coagulante. Neste caso foram empregados 2,0 ppm de quitosana sobre amostras de efluentes de refinaria de tanque de armazenamento (TA com 200 ppm) e a mesma amostra porém diluída com tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 até 50 ppm de fenol total.

Os resultados mostraram um leve aumento no nível de remoção para o caso da amostra diluída (TAd) onde com a adição de coagulante verificou-se um aumento de apenas 7% na remoção. Contudo o nível de remoção foi bastante alto chegando a quase 80% do fenol total inicial. Quando a amostra original sem acondicionamento foi tratada e quitosana foi colocada no meio reacional o aumento no nível inicial de remoção atingiu de 12,7% a 23,2% com adição de quitosana.

Vale a pena ressaltar que foram observadas remoções mecânica e química devidas à quitosana e ao peróxido, respectivamente. Assim, a quitosana arrasta parte do fenol inicial em até 6% para o caso de TA e 2,4% para TAd. Igualmente o peróxido causou oxidação química direta do fenol total inicial de até 11%. Quando quitosana e peróxido estiveram presentes simultaneamente níveis de remoção de até 8,5% e 7,8% para TA e TAd foram observados, respectivamente.

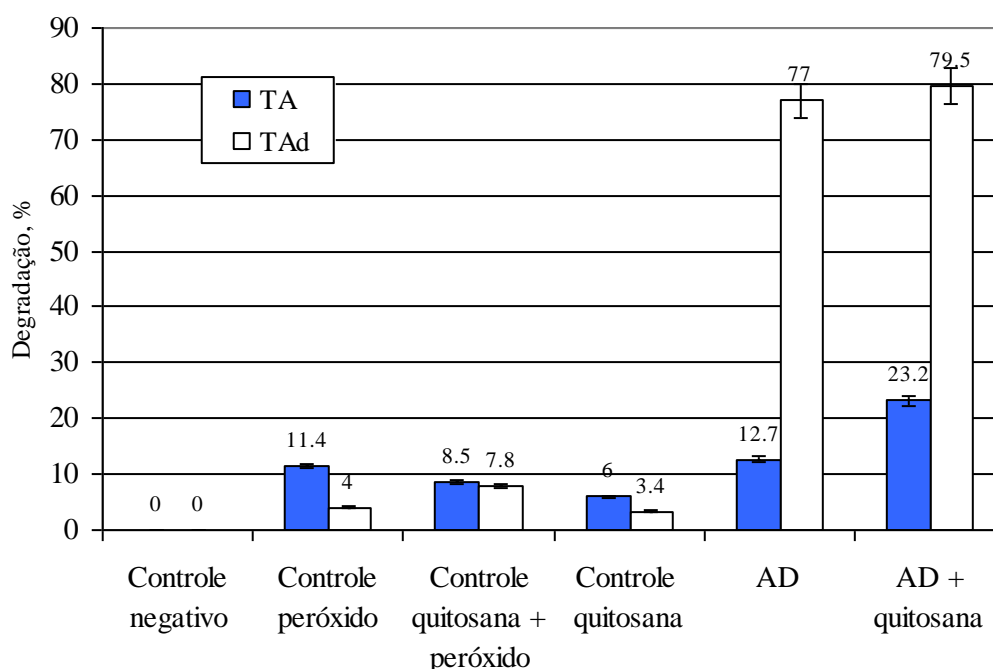


Figura V-23. Efeito da adição direta de peróxido de hidrogênio (5X) e coagulante (quitosana) na remoção de fenol em amostras de efluentes de refinaria. AD: reação com adição direta e AD + quitosana 2,0 ppm.

6.4. Degradação eletroquímica de compostos fenólicos em amostras de efluentes de refinaria - Efeito do modo de aeração na degradação do fenol total.

Como pode ser observado na figura V-24, resultados bastante similares foram obtidos em termos de degradação de 72% e 77% quando o reator de câmara única com aeração descontínua e a adição direta 5X de peróxido de hidrogênio foram usadas, respectivamente. Como era de esperar-se ao manter a aeração contínua ao longo do processo foi observado um aumento de até 30% na degradação em comparação com a aeração descontínua. Experimentos controle mostraram que existe oxidação química direta devida ao peróxido de hidrogênio eletrogerado de 11 a 17% dependendo do modo de aeração. Assim mesmo foi observada oxidação anódica de até 32% que não dependeu do modo de aeração, similar à observada nos experimentos com os compostos fenólicos clorados puros.

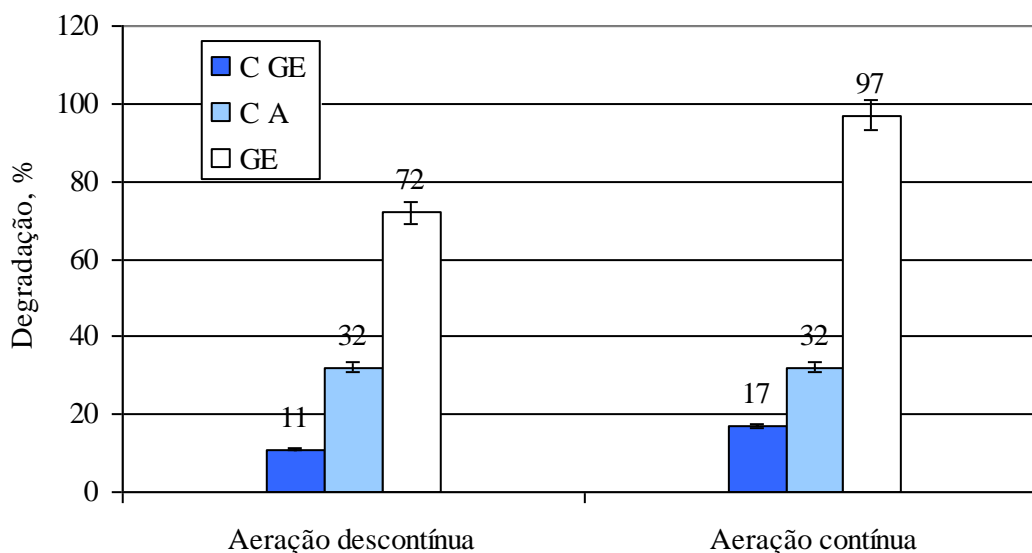


Figura V-24. Efeito do modo de aeração sobre a degradação via bioeletroquímica de fenol total em amostra diluída proveniente de tanque de armazenamento de óleo cru (50 ppm). GE: oxidação bioeletroquímica. C GE: controle oxidação química devida ao peróxido de hidrogênio; C A: Controle oxidação anódica.

6.5. Degradação eletroquímica de compostos fenólicos em amostras de efluentes de refinaria - Efeito da adição de agentes coagulantes.

Uma vez mais ficou demonstrado o efeito benéfico da adição de quitosana como coagulante e promotor da precipitação dos derivados oxidados provenientes da reação de oxidação enzimática durante a geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio. Como mostra a figura V-25, aumentos crescentes na remoção foram observados com o uso da pré-aeração e aeração contínua ambos com a adição de quitosana. Assim, o valor máximo de remoção de 100% foi observado com amostra de TAd tratada em reator de câmara única com aeração contínua por 4 h e adição de quitosana 2 ppm em comparação com o tratamento de degradação empregando adição direta 5X de peróxido e quitosana na mesma concentração. Valores menores de remoção de 92% foram atingidos sem a adição de quitosana e com uso da pré-aeração.

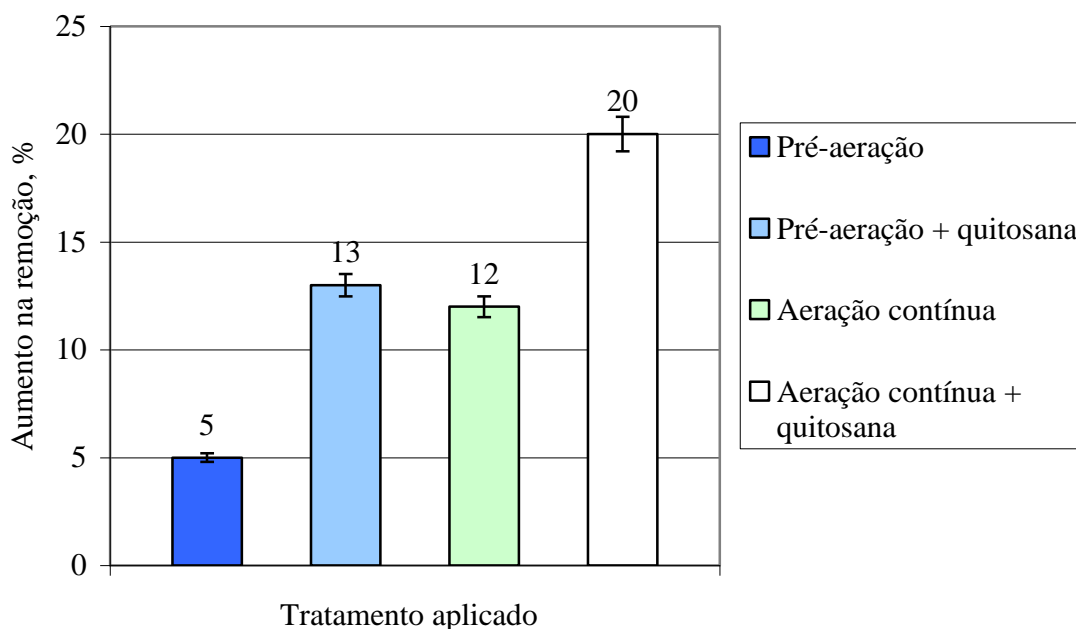


Figura V-25. Efeito do modo de aeração sobre a remoção bioeletroquímica de fenol total em amostra diluída proveniente de tanque de armazenamento de óleo cru (50 ppm). Adição de quitosana 2 ppm.

V-7

**ESTABILIDADE DA CPO FRENTE À ADIÇÃO DIRETA OU À
ELETROGERAÇÃO DE PEROXIDO DE HIDROGÊNIO**

Considerando trabalhos prévios sobre a inativação suicida sofrida por muitas peroxidases como HRP de *Armoracia rusticana* e amplamente estudada para o caso da tirosinase de *Agaricus bisporus*, lacase de *Pleurotus ostreatus* e de se esperar que esta inativação possa vir acontecer a no caso da CPO durante a oxidação de compostos fenólicos (9,17,30,59,159).

Desta maneira foram determinados os efeitos deletérios causados pelo próprio processo de oxidação enzimática de compostos fenólicos clorados (ex. 4-CP) sobre a atividade peroxidásica da CPO e a inativação causada pelo peróxido de hidrogênio usando GE e AD.

Na **Figura V-26**, são mostrados os perfis do efeito do peróxido de hidrogênio na atividade peroxidásica residual observados para CPO na degradação de 4-CP. Como pode ser observada, a adição direta de peróxido de hidrogênio bem seja em adição única ou em pulsos de até 5X, apresenta uma significativa diferença com relação à GE. Assim, o perfil para GE mostra que existe uma maior retenção da atividade peroxidásica após 4 horas (aprox 90%) quando o peróxido foi gerado eletroquimicamente em baixas concentrações (**Tabela V-11**). Assim mesmo o processo de GE apresenta velocidades iniciais máximas de inativação devidas ao peróxido de hidrogênio para CPO de 0,0026 UI/mL/min (**Tabela V-13**), menores que as observadas para AD de 0,0083 e 0,0050 UI/mL/min quando adição única ou pulsada foi usada, respectivamente.

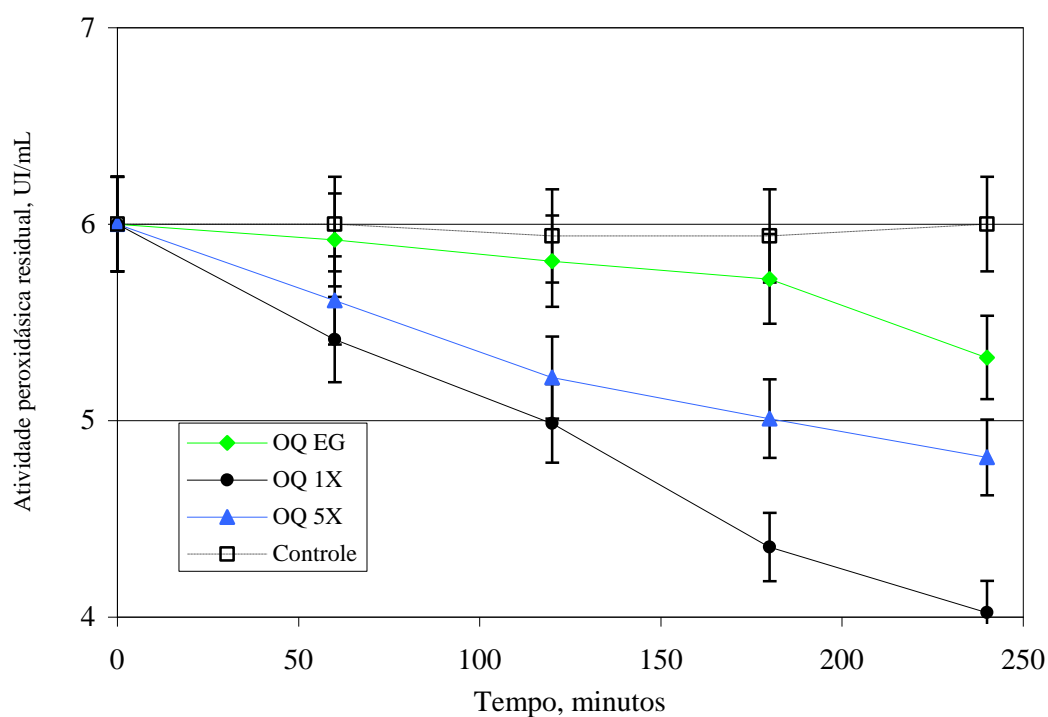


Figura V-26. Efeito da inativação causada pelo peróxido de hidrogênio sobre a atividade peroxidásica da CPO. Usando bioeletro-oxidação (GE) a $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ em reator de câmara única com aeração contínua e agitação de 220 rpm. E 1,0 mM de peróxido de hidrogênio (AD).

Tabela V-11. Perda na atividade peroxidásica causada pelo peróxido de hidrogênio após 4 horas dos processos de bioeletro-oxidação (GE) a $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ em reator de câmara única com aeração contínua e agitação de 220 rpm. E adição direta de peróxido hidrogênio (1,0 mM): única (1x) ou pulsada (5x)

| | Atividade residual | |
|-----------|--------------------|-------|
| | UI/mL | % |
| OQ GE | 5,32 | 88,70 |
| OQ AD 1 X | 4,98 | 67,05 |
| OQ AD 5 X | 5,01 | 80,20 |
| Controle | 6,00 | 100,0 |

Porém esta perda de atividade não é exclusiva ao efeito que o peróxido causa sobre a CPO, mas também à presença dos derivados oxidados gerados a partir dos compostos fenólicos que podem reagir diretamente com a molécula protéica inativando-a (Roper, 1995 e Shevelkova, 1996). Desta maneira, como pode ser observado na **Figura V-27**, o efeito real que o processo oxidativo tem sobre a estabilidade da CPO pode ser apreciado. Assim, como mostra a **Tabela 12** GE mostra-se como a melhor alternativa em termos de estabilidade para CPO, pois é retida até 65% da atividade peroxidásica inicial em comparação com os 33% e 42% retidos quando AD em adição única ou em pulsos foi usada, respectivamente.

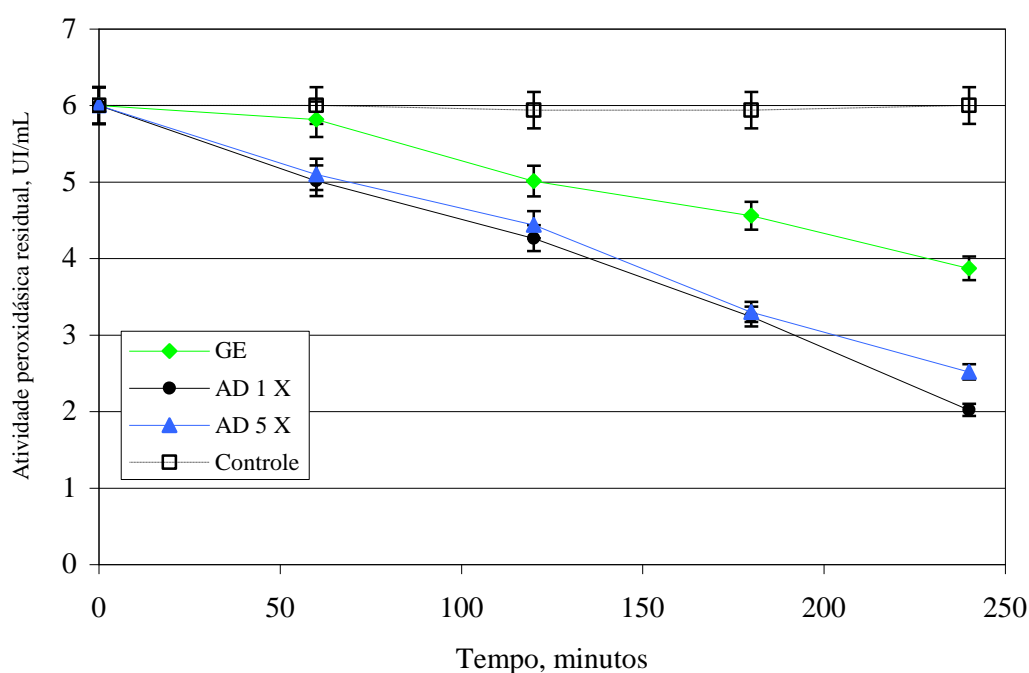


Figura V-27. Perfis para o efeito do tipo de suplementação usada para o peróxido de hidrogênio sobre a atividade enzimática. Bioeletro-oxidação (GE) a $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ em reator de câmara única com aeração contínua e agitação de 220 rpm; Adição direta de peróxido (1,0 mM): única (1x) ou pulsada (5x).

A partir dos perfis para o efeito do tipo de suplementação usada para o peróxido de hidrogênio GE ou AD sobre a atividade enzimática, foram determinados para o biocatalisador os valores de

tempo de vida útil e tempo de vida média para cada processo. Como mostra a **Tabela 13**, CPO apresenta um tempo de vida útil (TVU) de 11,2 horas quando a geração eletroquímica de peróxido foi empregada em comparação com a adição direta onde os valores de TVU foram de 6,2 e 6,9 horas, para a adição única e pulsada, respectivamente.

Tabela V-12. Atividade peroxidásica residual (UI/mL e %) após 4 horas dos processos de Bioeletro-oxidação (GE) a $-620 \text{ mV}_{\text{ECS}}$ em reator de câmara única com aeração contínua e agitação de 220 rpm. E adição direta de peróxido hidrogênio (1,0 mM): única (1x) ou pulsada (5x).

| | Atividade residual | |
|-----------------|--------------------|------|
| | UI/mL | % |
| GE | 3.87 | 64.5 |
| AD 1 X | 2.022 | 33.7 |
| AD 5 X | 2.52 | 42 |
| Controle | 6 | 100 |

Tabela V-13. Velocidades de inativação para CPO durante os processos de oxidação de CPC usando geração eletroquímica ou adição direta de peróxido de hidrogênio. Tempos de vida útil e vida média para a CPO.

| | V_i | TVU | TVU | TVM | TVM |
|------------------------------|---------------|---------|-------|---------|-------|
| | $UI\ mL^{-1}$ | | | | |
| | min^{-1} | min | h | min | h |
| Geração eletroquímica | 0.0092 | 669.1 | 11.2 | 343.0 | 5.7 |
| Adição única | 0.0162 | 373.8 | 6.2 | 188.6 | 3.1 |
| Adição pulsada 5X | 0.0146 | 412.6 | 6.9 | 207.1 | 3.5 |
| Inativação química GE | 0.0026 | 2333.1 | 39.0 | 1179.3 | 19.6 |
| Inativação química 1X | 0.0083 | 717.76 | 11.96 | 365.3 | 5.9 |
| Inativação química 5X | 0.0050 | 1185.22 | 19.75 | 584.2 | 9.7 |
| Controle | 0.0001 | 59880.0 | 998.0 | 29880.0 | 498.0 |

V_i : Velocidade de inativação; TVU : tempo de vida útil; TVM : tempo de vida média

Igualmente para os processos de oxidação de compostos fenólicos clorados, a atividade peroxidásica residual foi determinada após o processo de oxidação de compostos fenólicos em matrizes reais usando a CPO nativa e quimicamente modificada CPO-GA e como modelo de matriz real a amostra proveniente de tanque de armazenamento de combustíveis TA (400 ppm) e sua respectiva diluição TAd (50 ppm).

Como pode ser observado na **figura V-28**, quando a amostra diluída TAd foi avaliada, CPO nativa reteve somente 17% da atividade inicial em comparação com os 29% retidos pela enzima modificada CPO-GA, quando adição direta em pulsos de 5X, foi usada. Níveis de atividade ainda maiores foram observados para as duas enzimas quando GE foi escolhida como metodologia para a suplementação de peróxido de hidrogênio. Assim porcentagens de 40% e 55% de atividade residual encontrados para CPO-GA e CPO nativa, respectivamente.

Na medida que a concentração total de fenol aumenta o nível de degradação diminui como também a estabilidade da enzima, se temos em conta as características da amostra que são incompatíveis com as condições ótimas para a atividade da CPO. Com isto, níveis de atividade residual baixos de 9% e 14% foram achados quando CPO nativa e CPO- GA foram usadas com adição direta 5X. Melhores valores de retenção da atividade peroxidásica foram igualmente observados que para o caso da amostra TAd, porém menores de 22 e 36% em termos da atividade peroxidásica inicial.

Estes resultados demonstram uma vez mais a vantagem da metodologia eletroenzimática sobre a metodologia convencional para a suplementação de peróxido de hidrogênio na degradação de compostos fenólicos em águas residuais de refinaria, assim como a superioridade da CPO estabilizada quimicamente sobre a CPO nativa.

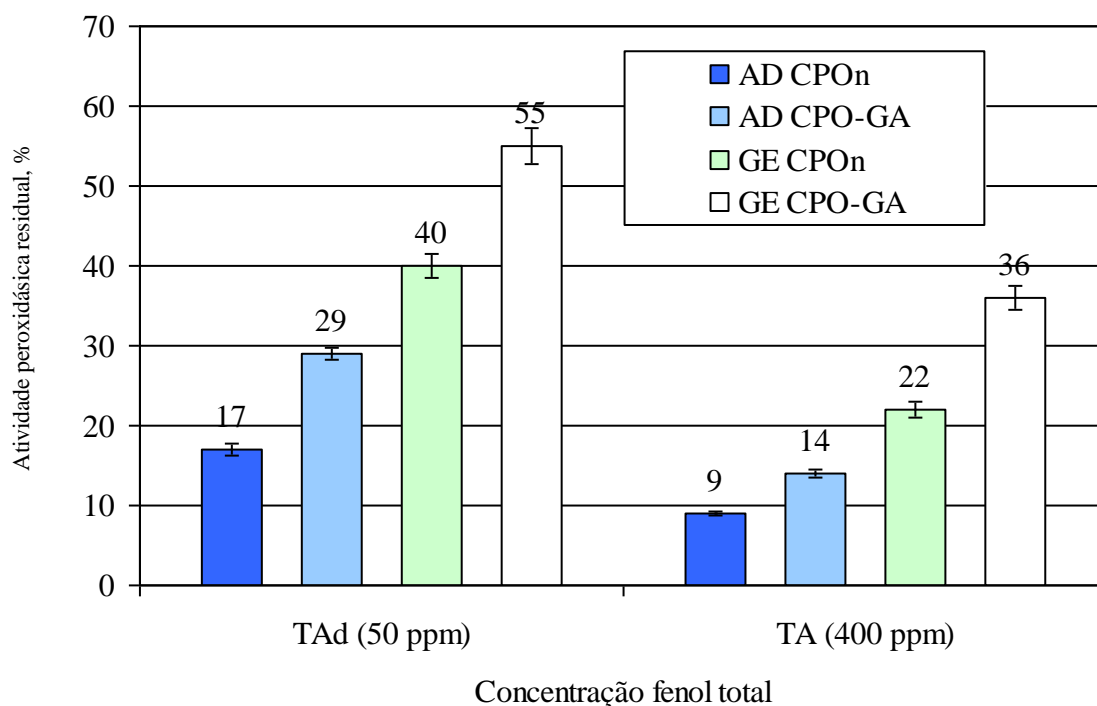


Figura V-28. Porcentagens de atividade peroxidásica residual observada para CPO nativa e modificada quimicamente CPO-GA após 4 horas de tratamento enzimático de amostras de efluente proveniente de tanque de armazenamento de óleo cru.

Capítulo VI
CONCLUSÕES

1. Estabilização da CPO por modificação química

Através da modificação química de CPO foi possível obter 7 derivados de CPO. Dentre estes derivados os mais estáveis à temperatura e pH por períodos de incubação de 120 minutos a 60° C em pH 6,0 e durante 60 minutos a 30° C em pH 8,0 foram os derivados amidados CPO-EDAC, CPO-HMDA e aqueles entrecruzados com tratamento simples ou duplo com glutaraldeído.

Igualmente derivados de CPO mais estáveis às altas concentrações de solvente orgânico de até 60% (*tert*-butanol v/v), foram obtidos, os quais são aptos para o trabalho em síntese em meios reacionais não convencionais. Outras variantes modificadas com hidrofobicidade aumentada em até 4 vezes em comparação com a forma nativa, como foi o caso do derivado alquilado CPO-9A poderiam ser usados em reações onde a solubilidade de substratos hidrofóbicos limita o uso da forma nativa da CPO devido à sua baixa solubilidade em meios orgânicos.

2. Degradação de compostos fenólicos clorados por cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*.

As melhores condições reacionais de degradação de compostos clorados utilizando adição única e em pulsos de peróxido hidrogênio mostrou que as relações estequiométricas CPC/ peróxido de 1:1 e 1:2 favorecem a oxidação e a precipitação, respectivamente. Assim mesmo, a adição direta em até 5 pulsos para uma concentração final de peróxido de hidrogênio de 1,0 mM mostrou níveis de degradação de 90 a 100% dependendo do composto fenólico alvo. De outro lado adição pulsada, concomitante com a adição de coagulante (quitosana 2,0 ppm) favoreceu a remoção com um aumento de 30%.

As melhores condições reacionais de degradação de compostos clorados utilizando geração eletroquímica de peróxido hidrogênio foram obtidas empregando eletrodo de cobre de 27 cm² - 620 mV_{ECS}, aeração contínua (O₂ 0,5 vvm) por 4h e adição de coagulante (quitosana 2,0 ppm):

3. Degradação de compostos fenólicos em águas residuais de refinaria por cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*.

As melhores condições reacionais de degradação de fenol total em efluentes de refinaria foram obtidas através da geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio em reator de câmara única empregando:

- Eletrodo de cobre de 27 cm²
- Sobre-tensão catódica de -620 mV_{ECS}
- Aeração contínua (O₂ 0,5 vvm) por 4h
- Adição de coagulante (quitosana 2,0 ppm).

Assim, para amostras de tanque de armazenamento de óleo cru foi observado:

- Degradação de 15% de, para a amostra não acondicionada.
- Degradação de até 97% do fenol total e aumento de 25% na remoção para a amostra condicionada (50 ppm).

Os resultados demonstram a vantagem da metodologia eletroenzimática sobre a metodologia convencional de adição direta de peróxido de hidrogênio na degradação de compostos fenólicos em águas residuais de refinaria, assim como a superioridade da CPO estabilizada quimicamente CPO-GA sobre a CPO nativa, pois esta reteve somente 17% da atividade inicial em comparação com os 29% retidos pela enzima modificada CPO-GA, quando adição direta em pulsos de 5X, foi usada. Níveis de atividade ainda maiores foram observados para as duas enzimas quando GE foi escolhida como metodologia para a suplementação de peróxido de hidrogênio. Assim,

porcentagens de 40% e 55% de atividade residual foram achados quando para CPO-GA e CPO nativa, respectivamente.

CPO apresentou um tempo de vida útil (TVU) de 11,2 horas quando a geração eletroquímica de peróxido foi empregada em comparação com a adição direta aonde os valores de TVU foram de 6,2 e 6,9 horas, para a adição única e pulsada, respectivamente.

4. Isolamento e caracterização dos produtos formados a partir da oxidação enzimática de compostos fenólicos clorados.

O papel da CPO no acoplamento oxidativo está limitado à oxidação do substrato para dar lugar a radicais pouco estáveis neste caso quinonas. Estas formas de ressonância podem acoplar-se umas com as outras para formar dímeros ou até mesmo oligômeros de alto peso molecular, conforme exemplificado baixo. Estas espécies químicas são estabilizadas logo pela polimerização.

È possível afirmar que estes derivados solúveis correspondem a traços dos dímeros ou trímeros provenientes do acoplamento oxidativo, similares a aqueles encontrados na literatura com relação a polímeros formados por mistura heterogênea de unidades de fenileno e oxifenileno.

Capítulo VII

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS
E TRABALHOS FUTUROS**

1. Aplicações Biotecnológicas

O estudo realizado demonstra a capacidade da enzima cloroperoxidase de remover compostos fenólicos comuns em águas residuais de refinaria, em uma ampla faixa de concentrações, o que permitiria sua aplicação tanto em pré-tratamentos como em pós-tratamentos.

A facilidade de produção da enzima com alto rendimento justifica a continuação de estudos de biodegradação utilizando matrizes reais. Assim justificam também o estudo de processos de remoção de fenóis que associem este método enzimático com outros métodos de remoção tanto físico-químicos como microbiológicos.

2. Trabalhos futuros

Avaliar a aplicação da tecnologia enzimática para a remoção de compostos fenólicos sobre outras correntes e efluentes de refinaria contaminadas com este tipo de substâncias.

Estudar a imobilização da CPO e sua utilização e reutilização no tratamento de efluentes industriais como complemento das tecnologias existentes.

Estudos sobre o escalonamento do processo e a sua viabilidade econômica estão justificados por:

- O domínio da tecnologia de produção da enzima.
- A obtenção, por modificação química, de um biocatalisador mais robusto e eficiente no tratamento de efluentes industriais
- A efetividade da remoção enzimática de compostos fenólicos clorados e no tratamento de efluentes de refinaria
- A disponibilidade de peróxido e/ou a possibilidade da sua geração eletroquímica com a correspondente diminuição no custo de produção e aumento na segurança durante o transporte e uso deste reagente

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALARD A.L.; NEILSON A.H.; , C. LINDGREN *ET AL.* Transformations of chloroguaiacols, chloroveratroles, and chlorocatechols by Stable Consortia of Anaerobic Bacteria, *Applied Environmental Microbiology.*, 53, 2511-2519 (1987).
2. ABRAHAMSSON K.; KLICK S. Degradation of Halogenated Phenols in Anoxic Marine Sediments, *Marine Pollution Bulletin*, 22, 227-233 (1991).
3. AITKEN M.D., MASSEY I.J., CHEN T., HECK P.E., Characterization of reaction products from enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research* 28 (9), 1879-1889 (1993)
4. ALVAREZ, R.G.; HUNTER I.S.; SUCKLING C.J.; *ET AL.* A novel biotransformation of benzofurans and related compounds catalysed by a chloroperoxidase. *Tetrahedron* 57, 8581-8587 (2001)
5. ANNACHHATRE A.P.; GHEEWALA S.H. Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnology Advances*, Vol. 14, No. 1, pp. 35-56. (1996)
6. AOUN S.; BABOULÈNE M., Regioselective Bromohydroxylation of alkenes catalysed by chloroperoxidase: Advantages of the immobilization of enzyme on talc. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4. P.p. 101-109 (1998)
7. AOUN S.; CHEBLI C.; BABOULÈNE M., Noncovalent immobilization of chloroperoxidase onto talc: Catalytic properties of a ne biocatalyst. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 380-385 (1998)
8. APAJALAHTI J.H.A.; M.S. SALKINOJA-SALONEN. Degradation of Polychlorinated Phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*, *Applied Environmental Microbiology*, 25, 62-67 (1986).
9. ARNAO M.B.; M. ACOSTA; J.A. DEL RIO I ; F. GARCIA-CÁNOVAS Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1038 85-89 85, (1990)
10. ATLOW S.C., BONADONNA-AMPARO L., KLIBANOV A.M., Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering* 26. pp 599-603 (1983)
11. AXLEY, M.J.; KENISBERG, P.; HAGE, L.P., (1986) Fructose induces and glucose represses chloroperoxidase mRNA levels. *The Journal of Biological Chemistry*
12. AYALA MARCELA; EDUARDO HORJALES; MICHAEL A. PICKARD; RAFAEL VAZQUEZ-DUHALT Cross-linked crystals of chloroperoxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 828-831 (2002)
13. BACIOCCHI, E. FABBRINI, M., LANZALUNGA, O, MANDUCHI, L., POCHETTI, G., Prochiral selectivity in H₂O₂-promoted oxidation of arylalkanols catalysed by chloroperoxidase. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 268 (3). P.P. 665-672 (2001)
14. BAKKER M.; VAN DE VELDE F.; VAN RANTWIJK F.; SHELDON R.A Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foam. *Biotechnology and Bioengineering*. 70 (3). P.p. 342-348(2000)
15. BANERJEE S., P.H. HOWARD, A.M. ROSENBERG, A.E. *ET AL.*. Development of a General Kinetic Model for Biodegradation and Its Application to Chlorophenols and Related Compounds, *Environmental Science Technology*, 18, 416-422 (1984).

16. BAYNTON KATHY J. A; JATINDER K. BEWTRA B; NIHAR BISWAS B; KEITH E. TAYLOR A., Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1206 272-278, (1994)
17. BELLO-RAMIREZ A.M.; CERREÓN-GARABITO B.Y.; NAVA-OCAMPO A.A.; A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides. *Toxicology* 149. 63-68(2000)
18. BELTRAME P.; BELTRAME P.R.; CARNITI P *ET AL.*. Kinetics of Phenol Degradation by Activated Sludge in a Continuous-Stirred Reactor, *Journal WPCF*, 52, 126-133 (1980).
19. BOUGIOUKOU D.J.; SMONOU I., Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of conjugated dienoic esters. *Tetrahedron Letters* . 43 (In-press) (2002)
20. BOYD S.A. AND D.R. SHELTON. Anaerobic Biodegradation of Chlorophenols in Fresh and Acclimated Sludge, *Applied. Environmental Microbiology* 47, 272-277 (1984).
21. BOYD S.A.; SHELTON D.R.; DUANE B. *ET AL.*. Anaerobic Biodegradation of Phenolic Compounds in Digested Sludge, *Applied. Environmental Microbiology.*, 46, 50--54 (1983).
22. BUDDE C.L.; BEYER A.; MUNIR, I.Z.; DORDICK J.S., *ET AL.* Enzymatic nitration of phenols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 15,55-64 (2001)
23. CARAM J.A.; NICELL J.A Potential applications of enzymes in wastewater treatment. *Journal of Chemical Tecnology and Biotechnology*. 69. 141 (1997)
24. CARMICHAEL R., FEDORAK M.P., PICKARD M.A., Oxidation of phenols by chloroperoxidase *Biochemistry Letters* 7 (4). 289-294 (1985)
25. CASSLAND P, JÖNSSON LJ Characterisation of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52 pp 393-400. (1999).
26. CEPESB DECRETO Nº 50.877, DE 1961 Dispõe sobre o lançamento de resíduos tóxicos ou oleosos nas águas interiores ou litorâneas do País, e dá outras providências. Regula a Ação Popular (alterada pela Lei 6513/77). CEPESB - Secretaria Estadual do Meio Ambiente, São Paulo SP. Brasil
27. CEPESB DECRETO Nº 8.468, DE 8 DE SETEMBRO DE 1976 Aprova o Regulamento da Lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a Prevenção e o Controle da Poluição do Meio Ambiente. CEPESB - Secretaria Estadual do Meio Ambiente, São Paulo SP. Brasil
28. CHAI X.-S.; Q.X. HOU; Q. LUO; J.Y. ZHU1 Rapid determination of hydrogen peroxide in the wood pulp bleaching streams by a dual-wavelength spectroscopic method. *Analytica Chimica Acta* 507 281–284, (2004)
29. CHEN S., STEVENS D. K., KANG G., Pentachlorophenol and crystal violet degradation in water and soils using heme and hydrogen peroxide *Water Research* 33 (17) 3657-3665 (1999)
30. COURTEIX A Protein structure of Ligninperoxidase. School of Chemical and Life Science, Universite of Greenwich - Woolwich Wellington St. LONDON SE18 6PF
31. COURTEIX A., BERGEL A., Horse-Radish peroxidase catalyzed hydroxylation of phenol I. Thermodynamic analysis *Enzyme and Microbial Technology* 17. 1094-1100(1995)

32. COURTEIX A., BERGEL A., Horse-Radish peroxidase catalyzed hydroxylation of phenol II. Kinetic Model Enzyme and Microbial Technology 17. 1087-1093(1995)
33. CRECCHIO C., RUGGIERO P., PIZZIGALLO D.R., Polyphenoloxidases Immobilized in Organic gels: Properties and Applications in the detoxification of PAH Biotechnology and Bioengineering 48. 585-581(1995)
34. DA CRUZ VIEIRA IOLANDA; ORLANDO FATIBELLO-FILHO I-Cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure. Analytica Chimica Acta 399 287–293 (1999)
35. DAÍ L., KLIVANOV, A.M., (1999) Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media. Proc. National Academy of Sciences USA. 268 (3). 665-672
36. DANNER D.J., BRIGNAC P.J., ARCENEUX D., PATEL V., The oxidation of phenol and its reaction product by Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide. Archives on Biochemistry and Biophysic. 156. 759-763 (1972)
37. DENIZLI ADIL; NILÜFER CIHANGIR; ABBAS YOUSEFI RADC Removal of chlorophenols from synthetic solutions using *Phanerochaete chrysosporium*. Process Biochemistry 39 2025–2030, (2004)
38. DIKALOV S.I., MASON R.P., Reassignment of organic peroxy radical adducts. Free radical Biology and Medicine 27(7/8) 864-872 (1999)
39. DIMITRIS P. MAKRISA; JOHN T. Rossiterb. An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymatic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. Food Chemistry 77 177–185, (2002)
40. DUNFORD H.B., (1991) Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. Peroxidases in Chemistry and Biology . Everse J., Everse K.E., and Grishman M.B.. 2. 1-24, CRC Press, Boca Raton, Fla USA
41. DURAN N., ESPOSITO E., Potential application of oxidative enzymes and phenol oxidized-like compounds in wastewaters and soil treatment: A review. Applied Catalysis B: Environmental 28. 83-99(2000)
42. EMERSON J. Quantification of phenol by derivatization using 4-aminoantipyrine and potassium ferricyanide. Journal of Organic Chemistry 8: 417 (1943)
43. EPA Regulations of restricted waste and concentration of hazardous substances - Rule 3745-59-43. Environmental Protection Agency EPA, 1200 Pennsylvania Avenue, NW, Washington, DC 20460
44. FANG G.H., KENISBERG P. AXLEY M.J., NUEL M., HAGER L.P., Cloning and sequencing of chloroperoxidase cDNA. Nucleic Acid Research. 14. 8061-8071. (1986).
45. FENOLL LORENA G.; JOSE NEPTUNO RODRÍGUEZ-LÓPEZ FRANCISCO GARCÍA - SEVILLA; ET AL. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. Biochimica et Biophysica Acta 1548 1-22 (2001)

46. FENOLL LORENA G.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ JOSÉ N.; GARCÍA-MOLINA FRANCISCO; ET AL. Michaelis constants of mushroom tyrosinase with respect to oxygen in the presence of monophenols and diphenols. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 332–336 (2002)
47. FERRER I, DEZOTTI M., DURAN N., Decolorization of kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horse-radish peroxidase. *Biotechnology Letters* 13. 577-582 (1991)
48. FIAMEGOS Y.; C. STALIKAS; G. PILIDIS 4-Aminoantipyrine spectrophotometric method of phenol analysis Study of the reaction products via liquid chromatography with diode-array and mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 467 105–114 (2002)
49. FLING, M., HOROWITZ, N., HEINEMANN, S. The Isolation and Properties of Crystalline Tyrosinase from *Neurospora*, *Journal of Biological Chemistry*, 238-245(1963).
50. FRAISSE LAURENT; MARIE CLAUDE BONNET; JACQUES PHILIPPE DE Farcy A colorimetric 96-well microtiter plate assay for the determination of urate oxidase activity and its kinetic parameters. *Analytical Biochemistry* 309 173–179 (2002)
51. FRIEDER W.; SCHELLER ULLA WOLLENBERGERA; CHENGHONG LEIA; ET AL. Bioelectrocatalysis by redox enzymes at modified electrodes. *Reviews in Molecular Biotechnology* 82 411-424 (2002)
52. FRIEDMAN M, WILLIAMS DL, MASRI MS. Reductive alkylation of proteins with aromatic aldehydes and sodium cyanoborohydride. *Int J Pept Protein Res*;6:183–5 (1974)
53. GALVÃO F. , J.B.; GRIECO, V.M.; ARAÚJO, R.P.A.; *ET al.* Treatability studies and toxicity reduction in pulp and paper mill effluents. *Water Science and Technology*., v. 20 p. 149 – 160 (1988)
54. GARCÍA-MOLINA VERÓNICA; MARTA LÓPEZ-ARIASA; MAGDALENA FLORCZYKB ET al. Wet peroxide oxidation of chlorophenols. *Water Research* 39 795–802 (2005)
55. GENTHNER B.R.S. , W.A. PRICE AND P.H. PRITCHARD. Anaerobic Degradation of Chloroaromatic Compounds in Aquatic Sediments under a Variety of Enrichment Conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1466-1471 (1989)
56. GHIURELIOTIS MICHAEL; JAMES A. NICELL Assessment of soluble products of peroxidase-catalyzed polymerization of aqueous phenol. *Enzyme and Microbial Technology* 25 185–193 (1999)
57. GRADY C.P.L. . Biodegradation and its Measurement and Microbiological Basis, *Biotechnology and Bioengineering*., 27, 660-674 (1985).
58. HABEEB AFSA. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzensulfonic acid. *Anal Biochem*;14:328–36. (1966)
59. HAGER L.P., MORRIS D.R., DROWN F.S., EBERWEIN H., Chloroperoxidase II. Utilization of halogen anions. *The Journal of Biological Chemistry* 241 (8). pp 1769-1777 (1965)
60. HAN Y., WATSON J.T., STUCKY G.D., BUTLER A, Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic* 671.1-8 (2001)
61. HILL G.A.; C.W. ROBINSON. Substrate Inhibition Kinetics: Phenol Degradation by *Pseudomonas putida*, *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1599-1615 (1975).

62. HOEKSTRA E.J., VERHAGEN F.J., FIELD J.A., DE LEER E.W., BRINKMAN U.A, Natural production of chloroform by fungi. *Phytochemistry* 49 (1) 91-97 (1998)
63. JIANGNING WU ; KLAAS RUDYA; JOSEF SPARKA Oxidation of aqueous phenol by ozone and peroxidases. *Advances in Environmental Research* 4 339-346, (2000)
64. JÖNSSON LJ, PALMQVIST E, NILVEBRANT NO, HAHN-HÄGERDAL B Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49. pp 691-697(1998).
65. JÖNSSON LJ, SALOHEIMO M, PENTTILÄ M Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics* 32 pp 425-430(1997).
66. KADIMA T.A.; PICKARD M.A.. Immobilization of chloroperoxidase on aminopropyl-glass. *Applied Environmental Microbiology*;56:3473-7 (1998)
67. KARGI FIKRET; SERKAN EKER Removal of 2,4-dichlorophenol and toxicity from synthetic wastewater in a rotating perforated tube biofilm reactor. *Process Biochemistry* 40 2105-2111, (2005)
68. KEISUKE IKEHATA A, IAN D. BUCHANAN; MICHAEL A. PICKARD; DANIEL W. SMITH. Purification, characterization and evaluation of extracellular peroxidase from two *Coprinus* species for aqueous phenol treatment. *Bioresource Technology in-press*, (2005)
69. KILJUNEN E., KANERVA L.T., Chloroperoxidase-catalysed oxidation of alcohols to aldehydes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 9.. 163-173(2000)
70. KINSLEY CHRISTOPHER; JAMES A. NICELL Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technology* 73 139-146 (2000)
71. KIRBY P., The ISSO 14001 Approach to environmental management . Pollutec Environmental Limited. 768 Westgate Road, Oakville, Ontario, L6L 5N2. Ontario, Canada. (2000)
72. KISHINO T.; K. KOBAYASHI. Relationship between the Chemical Structures of Chlorophenols and their Dissociation Constants and Partition Constants in Several Solvent-Water Systems, *Water Research*, 28, 1547-1552 (1994).
73. LAI, YI-CHEN; LIN SUNG-CHYR Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochemistry* 40 1167-1174, (2005)
74. LA ROTTA H.C.E, BON EPS. 4-Chlorophenol degradation by chloroperoxidase from *C. fumago*—formation of insoluble products. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100:191-203. (2002)
75. LA ROTTA H.C.E.; LUTZ S.; LIESE A. ET AL. Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking *Enzyme and Microbial Technology* 37 582-588 (2005)
76. LAMBEIR ANNE-MARIE H; KAREL HEREMANS Q.; W. BRIAN DUNFORD H. High-pressure effect on the equilibrium and kinetics of cyanide binding to Chloroperoxidase. *Biophysical Chemistry* 18 195-201 (1983)
77. LAURENT ENZO I; ELENA GHIBAUDI, SILVIA ARDISSONE; ET al. Oxidation of 2,4-dichlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase: characterization of the reaction mechanism by

- UV-visible spectroscopy and mass spectrometry. *Journal of Inorganic Biochemistry* 95 171–176, (2003)
78. LAUTERER L.J., GIANFREDA M., WOJTAS-WASILEWSKA J., ET AL. Screening of the wood-rotting fungi for laccase production: Induction by ferulic, partial purification, and immobilization of laccase from the high-producing strain, *Cerrena unicolor*. *Acta of Microbiology. Pol* 47. 297-311 (1997).
 79. LIESE A, SEELBACH K, WANDREY C. *Industrial Biotransformations*. Weinheim: VCH; 2000.
 80. LIU JIAN-ZHONG ; HAI-YAN SONG; LI-PING WENG; ET AL. Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18 225–232 (2002)
 81. LIU JIAN-ZHONG; HAI-YAN SONG; LI-PING WENG LIANG-NIAN JI Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18 225–232 (2002)
 82. LOEHR R.C. AND R. KRISHNAMOORTHY. Terrestrial Bioaccumulation Potential of Phenolic Compounds, *Haz. Waste and Haz. Matl.*, 5, 109-119 (1988).
 83. LOUGHLIN W.A, HAWKES D.B., Effect of organic solvents on chloroperoxidase biotransformation. *Bioresource Technology* 71. 167-172 (2000)
 84. LOWRY OH, ROSEBROUGH AL, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*;193:227– 65 (1951)
 85. LUTZ STEPHAN; EBERHARD STECKHAN; ANDREAS LIESE; First asymmetric electroenzymatic oxidation catalyzed by a peroxidases. *Electrochemistry Communications* 6 583–587 (2004)
 86. MADANI W.; KERMASHA S.; BISAKOWSKI B. Inhibition of tyrosinase activity by a polyphenol esterase using selected phenolic substrates *Phytochemistry* 52 1001-1008 (1999)
 87. MANOJ M.K., HAGER L.P., Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertions reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1547. P.408-417 (2001)
 88. MCLEESE D.W. , V. ZITKO E M.R. Peterson. Structure-Lethality Relationship for Phenols, Anilines and other Aromatic Compounds in Shrimp and Clams, *Chemosphere*, 8, 53-57 (1979).
 89. METELITZA D.I.; LITVINCHUK A.V.; SAVENKOVA M.L.; Peroxidase-catalysed co-oxidation of halogen-substituted phenols and 4-aminoantipyrine. *Journal of Molecular Catalysis*, 1991; 67:402-11
 90. MOGOLLÓN L.I., RODRÍGUEZ R., LA ROTA C.E., ORTIZ C., TORRES R., (1997) Fraccionamiento y desmetalización biocatalítica de asfaltenos de crudo castilla. *Ciencia, Tecnología y Futuro*. 1 (3). Pp 109-121
 91. MOHN W.M.E, KENNEDY K.J.. Reductive Dehalogenation of Chlorophenols by Desulfomonile tiedje DCB-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1367-1370 (1992).
 92. MORRIS D.R., HAGER L.P., Chloroperoxidase I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *The Journal of Biological Chem* 241 (8). pp 1763-1768 (1965)
 93. MYREN B. *Pulp and Paper Manufacture in Transition*, *Wat. Sci. Tech.*, 29, 1-9 (1994).

94. NADCA Environmental Issues (1999) Phenols in Die Castings Wastestreams Clean Water Act. EPA North American Die Casting Association. 9701 West Higgins Roads, Suite 880, Rosemont, Illinois, USA.
95. NEILSON A.H. , A.-S. ALLARD, P. HYNNING, M. REMBERGER *ET AL.* Methylation of Chlorinated Phenols and Guaiacols: Formation of Veratroles from Guaiacols and High-Molecular Weight Chlorinated Lignin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 774-783 (1983).
96. NICELL J. A.; J. K. BEWTRA; N. BISWAS et al. Reactor development for peroxidases catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Research*. Vol. 27, No. 11 pp. 1629-1639 (1993)
97. NICELL J.A.; K.W. SAADI; I.D. Buchanan Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidases enzyme and an additive. *Bioresource Technology* 54 5-16, (1995)
98. NICELL JAMES A.; HAROLD WRIGHT A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology* 21:302-310, (1997)
99. NICELL, J.A; DAAADI K.W.; Buchanan I.D.; Phenol polymerization and precipitation using HRP enzyme and an additive. *Bioresource Technology*, 59: 5-6 (1995)
100. NOTARFONZO R.F., TALKINGTON R.W., SIMM R.A. (2000) Treatment alternatives for BTEX contaminated ground water. Pollutec Environmental Limited. 768 Westgate Road, Oakville, Ontario, L6L 5N2. Ontario, Canada.
101. NOVOTNY C., ERVANOVA P., SASEK V., KUBATOVA A., CAJTHAM T., LANG E., KRAHL, ZADRAZIL F., Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*, 10. 159-198 (1998)
102. NUEL M., FANG G.H., AXLEY M.J., KENISBERG P. HAGER L.P., Isolation and nucleotide sequence of chloroperoxidase gene from *Caldariomyces fumago*. *Journal of Bacteriology*. 170. 1007-1011. (1988).
103. NUEL, M.J., FANG, G.H., AXLEY, M.J., KENISBERG, P., HAGER, L.P., Isolation and nucleotide sequence of chloroperoxidase gene from *Caldariomyces fumago*. *Journal of Biochemistry*. 170 (20). P.p. 1007-1011 (1988)
104. OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH GUIDELINE FOR PHENOL (1996) OSHA - Occupational Safety and Health Administration, U.S., Department of Labor. Office of Public Affairs - Room N3647200 Constitution Avenue Washington, D.C. 20210
105. ORSER C.S., LANGE C.C., Molecular analysis of pentachlorophenol degradation *Biodegradation* 5. 277-288 (1994)
106. ORTIZ-LEÓN M., VELASCO L., VAZQUEZ-DUHALT R., Biocatalytic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by hemoglobin and hydrogen peroxide *Biochemistry and Biophysical Research* 215 (3) 968-973 (1995)
107. PAN Pesticides Database – Chemicals Identification, toxicity, use, water pollution potential, ecological toxicity and regulatory information. 2005

108. PERALTA-ZAMORA P., ESPOSITO E., PELEGRINE R., GROTO R., REYES J., DURAN N., Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilized horse-RADISH PEROXIDASE. ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY AND TECHNOLOGY. 19. 55-63 (1998)
109. PERALTA-ZAMORA P., GIMENES I.F., CORDI L., REYES J., ALVES O.L., DURAN N., Remediation of effluents from pulp and paper industry using horseradish peroxidase immobilized on ceramic materials . Proc. Third Latin American Biodegradation & Biodeterioration Symp - LABS-3- (1998)
110. PERALTA-ZAMORA P., MOARES S.G., ESPOSITO E., ANTUNES PELEGRINE R., GROTO R., REYES J., DURAN N., (1997) Bioremediation of effluents from paper industry using immobilized lignin peroxidase. Proceedings of the 5th Brazilian Symposium on Chemistry of Lignins other Wood Materials
111. PICKARD M. A., A defined growth medium for the production of chloroperoxidase by *Caldariomyces fumago*. Canadian Journal of Microbiology 27. pp 1298-1305 (1981)
112. PICKARD M.A., HASHIMOTO A., Stability and carbohydrate composition of chloroperoxidase from *C. fumago* grown in a fructose-salts. Canadian Journal of Microbiology 34. pp 998-1002 (1988)
113. PICKARD M.A., KADIMA T.A., CARMICHAEL R., Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. Journal of Industrial Microbiology 7. pp 235-242 (1991)
114. PIGNATELLO J.J. , M.M. MARTINSON, J.G. STEIERT, R.E. CARLSON *ET AL.* Biodegradation and Photolysis of Pentachlorophenol in Artificial Freshwater Streams, Applied Environmental Microbiology, 46, 1024-1031 (1983).
115. PUSARI A., JUBARAJ B., Synthesis, characterization and physicochemical properties of polyphenols prepared by cobalt (III) catalyzed oxidative polymerization. Reactive and Functional Polymers 46. 101-107 (2000)
116. QINGGUO HUANG; JIXIN TANG; WALTER J. WEBER JR.. Precipitation of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects. Water Research 39 3021–3027 (2005)
117. QUAGLIA, L.J.C.; QUADORS, R.A.Q. Caracterização da toxicidade aguda dos efluentes setoriais e final da Bahia Sul Celulose. In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE DE PAPEL DA ABTCP, 28, 1995. São Paulo, Anais. São Paulo, 1995. p.577-589.
118. RESOLUÇÃO CONAMA No. 20 inciso IX art. 7 (1994) Classificação de águas doces, salobres e salinas do Brasil CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente . Governo Federal do Brasil, Brasil
119. RIVAS J.F., KOLACZKOWSKI S.T, BELTRAN F.J., MCLURGH D., Hydrogen peroxide promoted wet air oxidation of phenol: influence of operating condition and homogeneous metal catalysts Journal Chemistry Technology and Biotechnology 74. pp 390-398 (1999)
120. ROPER J. CHADWICK; JAWED M. SARKAR Enhanced enzymatic removal of chlorophenols in the presence of co-substrates. Water Research Vol. 29, No. 12, 272-274 (1995)
121. SCHMIDT E. , M. HELLWIG AND H.J. KNAEKMUSS. Degradation of Chlorophenols by a

- 122.SHEVELKOVA. A, RYABOV, A.D., Irreversible inactivation of *Caldariomyces fumago* - Chloroperoxidase by hydrogen peroxide. A kinetic study in chloride and bromide system. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 39 (4). 665-670 (1996)
- 123.SIDDIQUE M.H., STPIERRE C.C., BISWAS N., BEWTRA J.K, TAYLOR K.E., Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol from aqueous solution. *Water Research*. 27. Pp 883-890 (1993)
- 124.SIERRA-ALVAREZR. , J.A. FIELD, S. KORTEKAAS AND G. LETTINGA. Overview of the Anaerobic Toxicity caused by Organic Forest Industry Wastewater Pollutants, *Water Science Technology* 29, 353-363 (1994).
- 125.SISTEMA DE LICENCIAMENTO DE ATIVIDADES POLUIDORAS (1986) Critérios e Padrões para lançamento de efluentes líquidos CECA - SLAP -FEEMA, Governo Federal, Brasília, Brasil.
- 126.SISTEMA DE LICENCIAMENTO DE ATIVIDADES POLUIDORAS (1990) Criterios e Padrões para lançamento de efluentes líquidos CECA - SLAP -FEEMA, Governo Federal, Brasília, Brasil.
- 127.SMITH J.M., PAYNE G.F., LUMPKIN J.A., KARNS J.S., Enzyme-Based strategy for toxic waste treatment and waste minimization *Biotechnology and Bioengineering* 39. pp 741-752 (1991)
- 128.SPIKER J.K., CRAWFORD D.L., THIEL E.C, Oxidation of phenolic and non-phenolic compounds substrates by LiP of *S. viridosporus* T7A *Applied Microbiology and Biotechnology* 37. 518-523 (1992)
- 129.STANDAR METHODS for the examination of water and waste water. 17th Edition. American Public Health Association NY. 1989, 5-51
- 130.SUBBA-RAO R.V.; RUBIN H.E.; ALEXANDER M.. Kinetics and Extent of Mineralization of Organic Chemicals at Trace Levels in Freshwater and Sewage, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1139-1150 (1982).
- 131.SUFLITA J.M. , A. HOROWITZ, D.R. SHELTON *ET AL.*. Dehalogenation: A Novel Pathway for the Anaerobic Biodegradation of Haloaromatic Compounds, *Science*, 218, 1115-1117 (1982).
- 132.SVITEL J., MIERTUS S., Development of tyrosinase-based biosensor and its application for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds. *Environmental Science Technology* 32 (6). 828-832 (1998)
- 133.TISCHER WILHELM ;VOLKER KASCHE Immobilized enzymes: crystals or carriers?. *Trends in Biotechnology* 17 326-324, (1999)
- 134.TOTI P.; PETRI A.; PELATA V.; ET AL. A linearization method for low catalytic activity enzyme kinetic analysis. *Biophysical Chemistry*. 114: 245-251 (2005)
- 135.TOY P.H., NEWCOMB M., HAGER L.P., Hipersensitive radical probe studies id chlorperoxidase-catalyzed hydroxilation reactions. *Chemical Research in Toxicology* . 11(7). 816-823 (1998)
- 136.Toyobo - Colorimetric method for the determination of peroxidase activity by the oxidation of ortho-aminophenol (2000), Toyobo do Brasil Co. Campinas, SP, Brasil
- 137.U.S. Environmental Protection Agency, Alternate Water Quality Criteria for Phenol, EPA 440/5-80-066 1980.

138. URETA-ZAÑARTU M.S. A; P. BUSTOS A; C. BERRÍOS A; ET AL. Electrooxidation of 2,4-dichlorophenol and other polychlorinated phenols at a glassy carbon electrode. *Electrochimica Acta* 47 2399-2406 (2002)
139. URETA-ZAÑARTU M.S. A; P. BUSTOS A; C. BERRÍOS A; ET AL. Electro-oxidation of chlorophenols at a gold electrode. *Electrochimica Acta* 46 2545–2551 (2001)
140. UYAMA H.; KURIOKA H.; KOBAYASHI S.; Preparation of polyphenol particles HRP-catalysed disperion polymerization. *Colloids and Surfactants: A*, 153: 189-194 (1999)
141. VALDERRAMA BRENDA; MARCELA AYALA; RAFAEL VAZQUEZ-DUHALT Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chemistry & Biology*, Vol. 9, 555–565 (2002)
142. VAN DE VELDE F., BAKKER M., VAN RANTWIJK F., ET AL. Selective oxidations with molecular oxygen, catalyzed by in the presence of a reductant. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6. 453-461 (1999)
143. VAN DE VELDE F., BAKKER M., VAN RANTWIJK F., ET AL Engineering Chloroperoxidase for activity and stability, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11. 765-769 (2001)
144. VAN DE VELDE F., BAKKER M., VAN RANTWIJK F., ET AL Chloroperoxidase-catalyzed enantioselective oxidations in hydrophobic organic media. *Biotechnology and Bioengineering*. 72 (5). 523-529 (2001)
145. VASQUEZ-DUHALT R., AYALA M., MÁRQUEZ-ROCHA F.J. Biocatalitic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *Phytochemistry* 58. 929-933 (2001)
146. VASUDEVAN P.T., LI L.O. Peroxidase catalyzed polymerization of phenol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 60. 73-82 (1996)
147. VAZQUEZ-DUHALT R, FEDORAK PM, WESTLAKE DWS. Role of enzyme hydrophobicity in biocatalysis in organic media solvents. *Enzyme Microbial Technology*;14:837–41. (1992)
148. VOJINOVIC A.; AZEVEDO A.M.; MARTINS V.C.B. ET AL. Assay of H₂O₂ by HRP catalysed co-oxidation of phenol-4-sulphonic acid and 4-aminoantipyrine: characterisation and optimisation *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 28 129–135 (2004)
149. WADA S., ICHIKAWA H., TATSUMI K., Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by combined treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnology and Bioengineering* 45. 304-309 (1994)
150. WAGENKNECH H.A, WOGGON W.D., Identification of intermediates in the catalytic cycle of chloroperoxidase. *Chemistry and Biology*. 4 (5). 367-372 (1997)
151. WAGNER MONIKA; JAMES A. NICELL Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research* 36 4041–4052 92002)
152. WALT DR, AGAYN VI. The chemistry of enzyme and protein immobilisation with glutaraldehyde. *Trends Anal Chem* 1994;13:425–30.

153. WOGGON W.D., WAGENKNECHT H., CAUDE C., Synthetic active site analogues of heme-thiolate proteins Characterization and identification of intermediates of the catalytic cycles of cytochrome P450 cam and Chloroperoxidase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 83.. 289-300 (2001)
154. WONG S.S.; WONG L.C. Chemical cross-linking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microbial Technology*;14:866-74. (1992)
155. YEE DENNIS C.; THOMAS K. WOOD 2,4-Dichlorophenol Degradation Using *Streptomyces viridosporus* T7A Lignin Peroxidase. *Biotechnology and Progress*, 13, 53-59, (1997)
156. ZADRAZIL F., LANG E., ELLER G., Lignocellulose Decomposition and Production of Ligninolytic Enzymes During Interaction of White Rot Fungi with Soil Microorganisms. *Microbial Ecology*. 34. 1-10 (1996)
157. ZADRAZIL F., LANG E., ELLER G., Influence of incubation temperature on activity of ligninolytic enzymes in steril soils by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens*. *Journal of Basic Microbiol.* 40 (1). 33-39 (1999)
158. ZHANG GUOPING; JAMES A. NICELL Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidases and hydrogen peroxide. *Water Research* Vol. 34, No. 5, 1629-1637, (2000)
159. ZHANG TONG; ZHAO QINGXIANG; HUANG HUI, LI QIN ET AL. Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from waste water by horseradish peroxidases. *Chemosphere*, Vol. 34, No. 4, 893-913 (1997)

ANEXO I

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA CLOROPEROXIDASE

A enzima foi produzida em nossos laboratórios devido ao alto custo das preparações enzimáticas comerciais com $R_z = 1,4$ e 3000 UI/mg (R\$ 700 Sigma-Aldrich). Assim, embora o objetivo principal deste trabalho foi o da degradação de compostos fenólicos, os estudos para otimização da produção da enzima realizados durante o trabalho de mestrado foram bem sucedidos, suprimindo as necessidades do próprio projeto de pesquisa.

Trabalhos anteriores de produção da enzima utilizaram diversos meios de cultura, tais como glicose-extrato de malte, glicose-melaço, melaço-sais, entre outros. Estes meios além de resultarem em baixas concentrações de enzima, resultavam também produziram grandes quantidades do pigmento gelatinoso acompanhante, coincidente com o pico de máxima atividade enzimática. A presença deste pigmento dificultava as etapas subsequentes de recuperação e purificação da enzima. Adicionalmente, a alcalinização dos meios contribuía para a perda da atividade enzimática.

A cloroperoxidase foi produzida pelo fungo *Caldariomyces fumago*, cepa CMI 89362, por fermentação submersa nos meios de cultivo descritos na **Tabela A-1** e sob as condições de cultivo descritas na **Tabela A-2**. O cultivo em placa de agar batata-dextrose de 8 dias forneceu o micélio utilizado como inóculo para a confecção do pré-inóculo. As fermentações de 1000 mL para a produção da enzima foram inoculadas com 100 mL de uma cultura crescida durante 6 dias em meio líquido, agitadas em shaker a 150 rpm e 25° C.

Tabela A-1: Meios de cultivo avaliados para a produção da enzima cloroperoxidase de *Caldariomyces fumado* e as relações carbono-nitrogênio C/N para cada meio.

| Componente | Meio 1* | Meio 2** | Meio 3*** |
|------------------------------|-----------|----------|-----------|
| | C/N 15,25 | C/N 3,22 | C/N 4,21 |
| Melaço (Sacarose 50%) | - | 6,50 | - |
| Frutose | 40,0 | 6,50 | 40,0 |
| Ureia | 2,00 | 1,20 | 10,0 |
| NaNO3 | 2,00 | 0,20 | 2,00 |
| KCl | 2,00 | 0,30 | 2,00 |
| KH2PO4 | 2,00 | 1,50 | 2,00 |
| MgSO4.7H2O | 1,00 | 0,20 | 1,00 |
| FeSO4.7H2O | 0,02 | 0,10 | 0,02 |

* Pickard,1981; **Mogollón, 1997; *** La Rotta, 2002

Tabela A-2. Condições de cultura empregadas nas fermentações em frascos agitados de *Caldariomyces fumago* para a produção de cloroperoxidase

| | <i>Meios de cultivo</i> | <i>Tempo</i> | <i>Volume</i> | <i>Rpm</i> | <i>T °C</i> |
|----------------------------|-------------------------|--------------|---------------|------------|-------------|
| Cultura em placa: | Agar batata-dextrosa | 8 días | | | 25 |
| Preparo do Inóculo: | Meios | 6 días | 100 mL | 150 | 27 |
| Produção da enzima | Meios | 10 días | 1000 mL | 150 | 27 |

As **figuras A-1a, 1b e 1c** mostram como a substituição de glicose por frutose, a remoção do melaço e de do extrato de malte e a otimização da relação C/N dos meios de cultura, sob condições físicas similares resultaram em:

- Duplicação da concentração da enzima no sobrenadante da fermentação.
- Diminuição do tempo de fermentação para atingir uma maior concentração da enzima (8-10 dias em lugar de 10-15)
- Redução da concentração do pigmento em até três vezes, com a conseqüente redução da viscosidade do meio.
- Melhoras na normnalização do pH do meio que contribuiu com aumento da estabilidade da enzima, sob as condições de armazenamento.

A **tabela A-3**, sumariza os resultados máximos obtidos em termos de: Concentração total de proteína (mg/mL), concentração de enzima (mg/mL), rendimento em enzima em diversos substratos consumidos ($Y_{E/S}$), atividade enzimática (UI/mL) e concentração de pigmento (ABS_{575}).

Tabela A-3. Resultados obtidos na otimização da produção da CPO.

| <i>Parâmetro</i> | <i>Meio Otimizado</i> |
|--|-----------------------|
| * Concentração total de proteína (mg/mL) | 11,76 |
| $Y_{E/S}$ | 5,65 |
| **Atividade máxima (UI/mL) | 350 |
| Pigmento ABS_{575} | 50 |

*Concentração de proteína determinada pelo método de Lowry (92)

** Atividade da enzima determinada por MCDO.

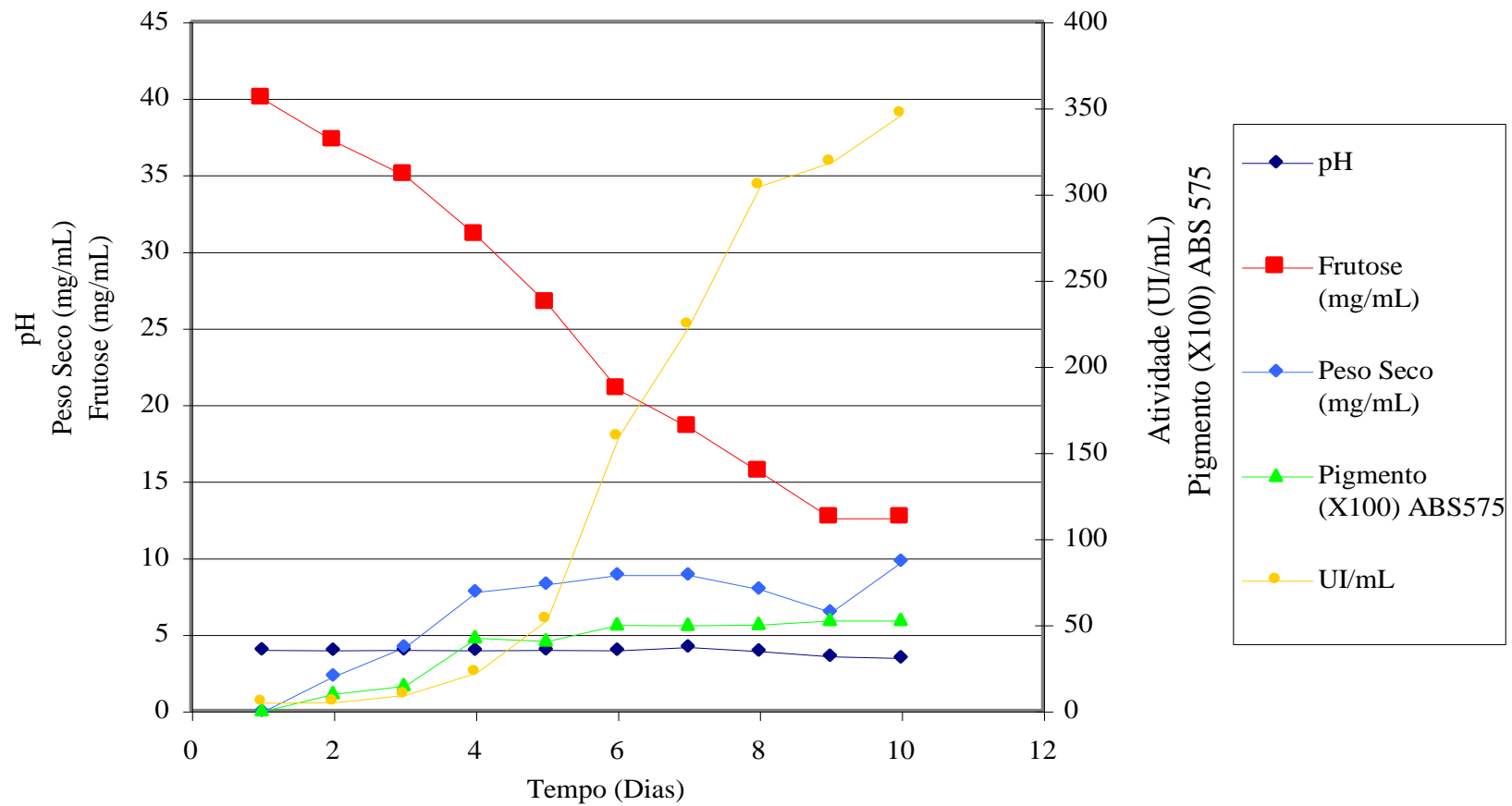


Figura A-1. Perfil da fermentação submersa para produção da cloroperoxidase pelo fungo *Caldariomyces fumago* CMI 89362. Meio de cultura No. 3: Frutose 40 g/L, Uréia 10,0 g/L e Nitrato de sódio 2,0 g/L

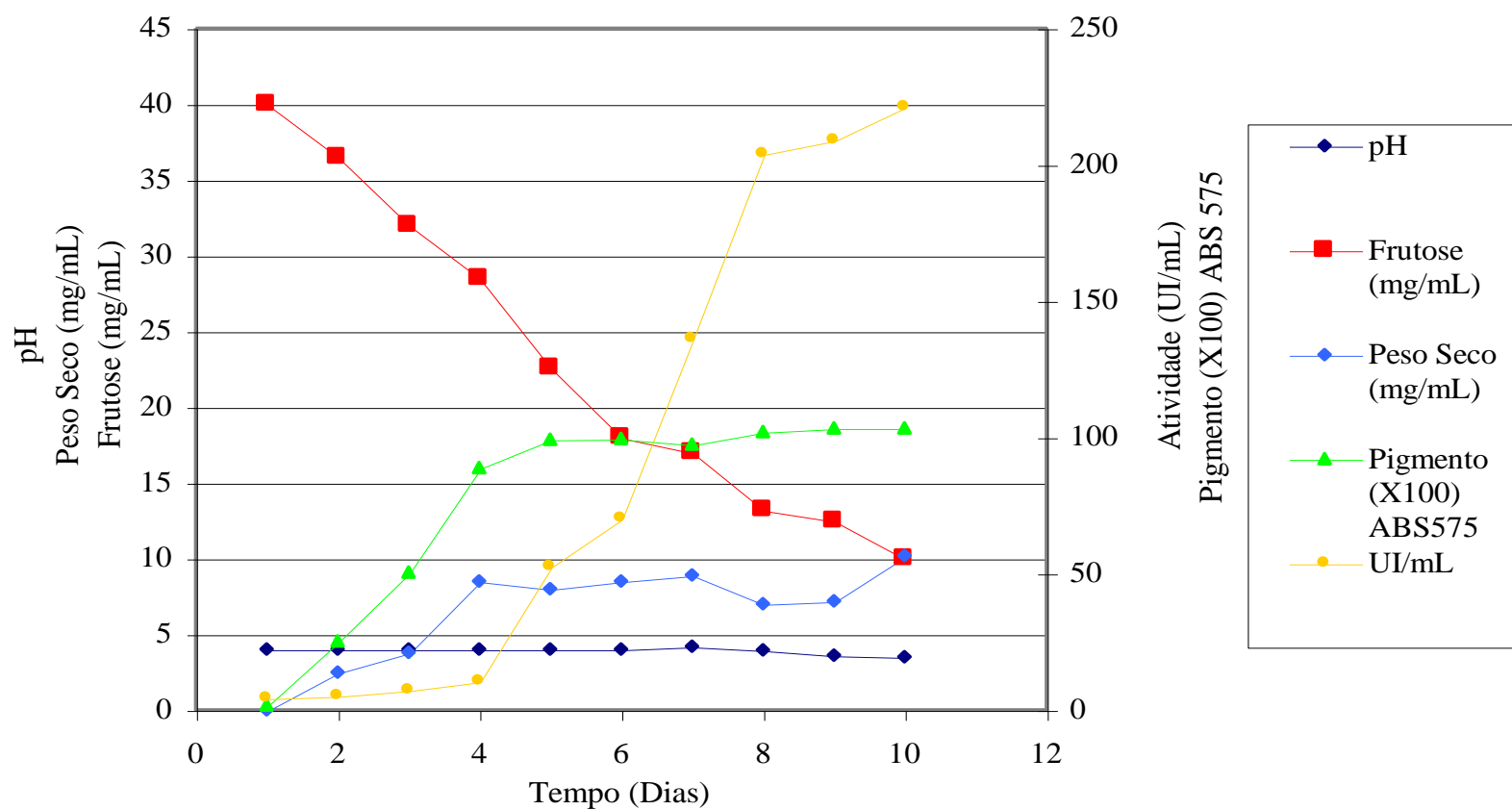


Figura A-2. Perfil da fermentação submersa para produção da cloroperoxidase pelo fungo *Caldariomyces fumago* CMI 89362. Meio de cultura No. 1 : Frutose 40 g/L, Uréia 2,0 g/L e Nitrato de sódio 2,0 g/L

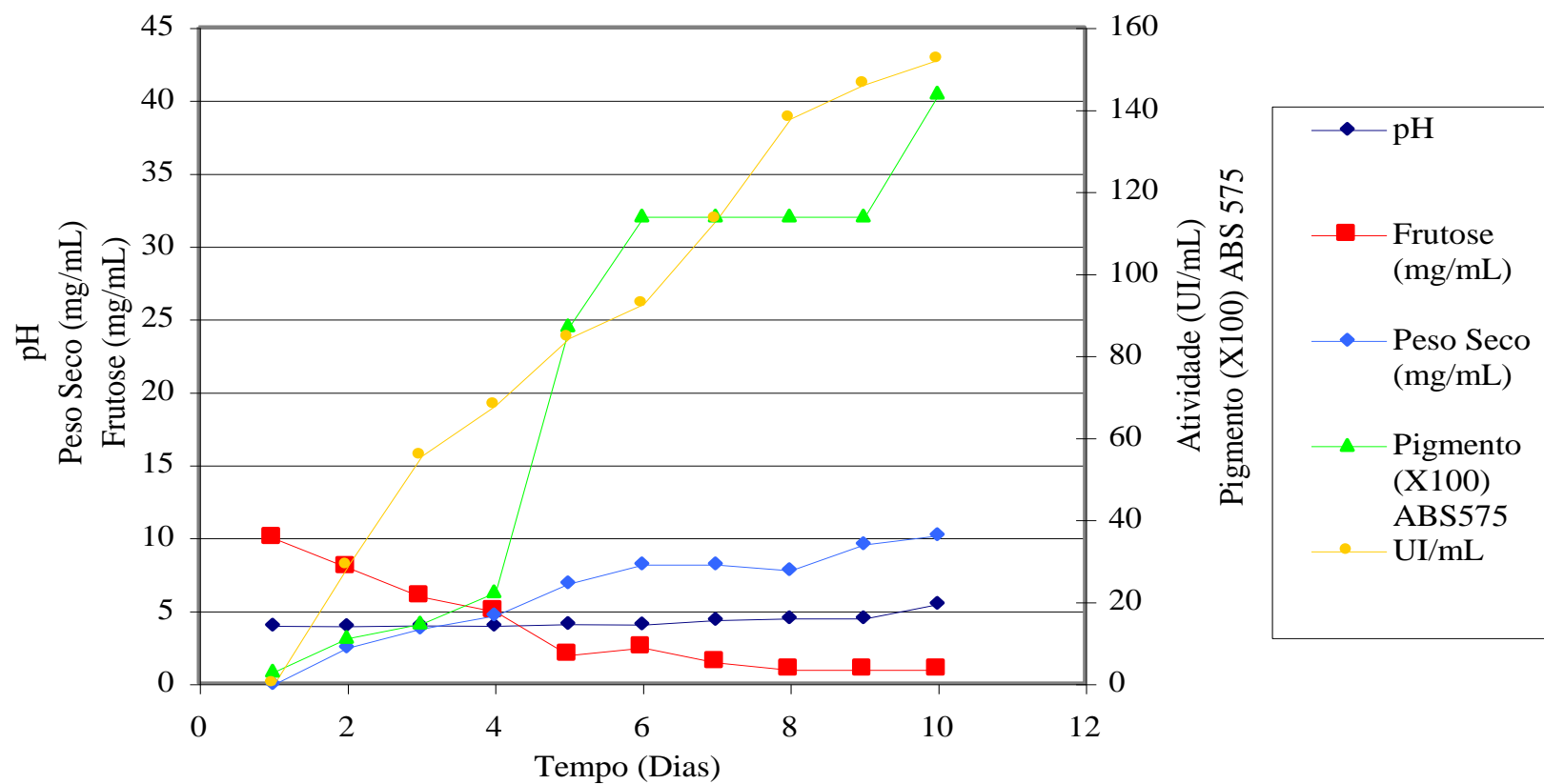


Figura A-3. Perfil da fermentação submersa para produção da cloroperoxidase pelo fungo *Caldariomyces fumago* CMI 89362. Meio de cultura No. 2

: Melaço 6,5 g/l; Frutose

O processo de purificação iniciou-se com a interrupção da fermentação em quando registrado o pico de atividade enzimática, em torno de 347 UI/mL. Procedeu-se à purificação, de acordo com as etapas a seguir (Pickard, 1981 e Pickard, 1991):

- A cultura foi filtrada através de malha de algodão para a remoção do micélio e exprimido para aumentar a recuperação do sobrenadante.
- O sobrenadante apresentando CPO e pigmento foi congelado e descongelado duas vezes para a remoção da maior parte do pigmento por coagulação seguida de centrifugação.
- Este sobrenadante foi diafiltrado através de membrana de 30 kDa contra tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 4,5, a frio, para eliminar componentes residuais do meio de cultura e metabólitos excretados pelo fungo, e a seguir concentrado nas mesmas condições até a metade do volume inicial. Uma segunda etapa de concentração foi efetuada em membrana de 10 kDa, tendo sido a preparação concentrada mais cinco vezes. Embora esta preparação de CPO já fosse adequada para os ensaios de degradação dos fenóis, a presença de pigmento, embora em pequenas quantidades, poderia interferir na interpretação dos dados de degradação dos fenóis que originariam produtos precipitados e insolúveis.
- Assim, a eliminação total do pigmento foi realizada, na preparação concentrada 10 vezes, por precipitação com etanol até 45% de saturação.
- A enzima foi, a seguir, precipitada com 65% de saturação de etanol.
- A preparação purificada final (Rz 1,25 e 2800 UI/mL) foi mantida a - 20°C, de acordo com as previsões de uso.

Várias metodologias têm sido propostas incluindo a aplicada neste trabalho, que oferece bons níveis de recuperação e purificação, apesar de algumas perdas durante a precipitação com etanol (Pickard, 1991). Embora a remoção do pigmento contaminante seja realizada na atualidade pela adição de polietilenoglicol 3500 até 10%, este procedimento foi descartado pela possível

interferência com os ensaios de degradação dos fenóis. Outros passos de purificação sugeridos na literatura, que incluem cromatografia de troca-iônica e permeação em gel não foram aplicados neste trabalho por prescindir-se de um maior grau de purificação. A **Tabela A-4** mostra os resultados obtidos passo a passo, durante o processo de purificação da CPO.

Tabela A-4. Resultados obtidos no processo de purificação da cloroperoxidase. Dados da atividade enzimática foram determinados pelo método da MCDO

| <i>Operação</i> | <i>Volume</i> <i>(mL)</i> | <i>CPO</i> <i>(UI/mL)</i> | <i>Pigmento</i> <i>(ABS 575)</i> | <i>Proteína Total</i> <i>(mg/mL)</i> | <i>Rz</i> <i>ABS</i> <i>430/280</i> | <i>Atividade</i> <i>Específica</i> <i>UI/mg</i> |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|---|---|---|
| Fermentação | 1100 | 347 | 0,527 | 11,76 | N.D. | 29,50 |
| Filtração | 1040 | 347 | 0,420 | 10,75 | N.D. | 32,27 |
| Diafiltração 30 kDa | 500 | 410 | 0,400 | 8,4 | N.D. | 48,80 |
| Concentração 30 kDa | 120 | 2500 | 0,400 | 9,8 | 0,5 | 255,10 |
| Concentração 10 kDa | 120 | 2520 | 0,320 | 9,8 | 0,56 | 257,14 |
| Fracionamento 45% etanol | 240 | 1420 | 0,008 | 2,99 | 0,75 | 474,91 |
| Fracionamento 65% etanol | 50 | 2580 | - | 2,78 | 1,05 | 928,05 |
| Diálise | 50 | 2800 | - | 1,86 | 1,10 | 3255,81 |

N.D. Não determinado

ANEXO II

QUANTIFICAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

ELETROGERADO POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Neste trabalho é proposta a quantificação enzimática do peróxido de hidrogênio nas micro-concentrações obtidas durante a eletrogeração, através da adaptação do bem conhecido método da 4-aminoantipirina para quantificação de fenol (Phenol-red) desenvolvido por Emerson em 1943. O método original continua sendo bastante usado na atualidade devido a suas características especiais tais como rapidez, baixo custo e ausência de passos laboriosos. Desde o trabalho pioneiro de Emerson sobre a reação e geração de cor a partir da reação da 4-AAP com diversos compostos fenólicos, inúmeros trabalhos têm sido realizados sobre a química dos produtos formados e as aplicações da reação na quantificação de fenol e/ou peróxido. No nosso caso, os produtos da reação a partir de um único substrato o 2,4-diclorofenol ,foram oxidados pela enzima cloroperoxidase na presença de concentrações variáveis de peróxido de hidrogênio com a simultânea derivatização dos produtos oxidados, a antipirilquinoniminas com 4-aminoantipirina. Este trabalho mostra as avaliações feitas a respeito da eficiência e concentração da enzima, do 2,4-DCP, da 4-AAP e do peróxido de hidrogênio.

1. Otimização do método

Todos os experimentos foram realizados usando um espectrofotômetro UV-VIS com arranjo de diodos e célula de temperatura controlada Shimadzu MultiSpec-1501, Shimadzu Co. Japão. As amostras foram incubadas a 25°C e as reações foram iniciadas pela adição da enzima. As reações foram acompanhadas até alcançar valores de velocidade máxima em aproximadamente 3 minutos.

2. Determinação do efeito da concentração do 2,4-DCP

A determinação do valor da constante catalítica da CPO para a oxidação do 2,4-DCP ($K_{M\text{ app}}$) foi determinada a partir de misturas reacionais contendo concentrações variáveis de 2,4-DCP na faixa de 0,5 a 10 mM com concentração constante de CPO de 0,4 nM, 0,2 mM de H_2O_2 e 0,5 mM de 4-AAP em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0. Para minimizar a competição entre a 4-AAP e o 2,4-DCP pelo composto I da enzima foram mantidas as relações de $2,4_DCP/4-AAP \geq 0,5$ (97,166). Experimentos controle sem enzima foram realizados.

3. Determinação do efeito da concentração da 4-AAP

A dependência da velocidade inicial de formação de antipirilquinonimina (APQI) e da concentração da 4-AAP foi determinada usando misturas reacionais contendo concentrações variáveis de 4-AAP na faixa de 0,01 a 1,0 mM, com concentração constante de CPO de 0,4 nM, 0,2 mM de H_2O_2 em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0. Foi usado um excesso de 2,4-DCP 10 mM para manter as relações de $2,4_DCP/4-AAP \geq 0,5$. Porém, em experimentos posteriores concentrações ainda menores de 2,4-DCP foram usadas, mantendo o desenvolvimento de cor satisfatório sem a formação de precipitado ou turvação.

4. Determinação do efeito da concentração H_2O_2

Nos experimentos para a determinação dos parâmetros cinéticos para o peróxido de hidrogênio, foram usadas diferentes concentrações de H_2O_2 de 0,0005 até 25 mM. Igualmente para a determinação do $K_{M\text{ app}}$ do 2,4-DCP, concentração constante de CPO de 0,4 nM e 1,0 mM de 4-AAP em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0, assim como o excesso de 2,4-DCP foi mantido em 10 mM.

5. Curvas de calibração para o peróxido de hidrogênio.

Misturas reacionais independentes contendo 6 UI/mL de CPO; 0,5 mM de 2,4-DCP; 0,5 mM de 4-AAP, em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 25° C. O peróxido de hidrogênio foi usado como iniciador da reação em concentrações variáveis de 0,0005 a 1,0 mM. Para prover reprodutibilidade na dosagem, todas as reações foram realizadas em triplicata. Os parâmetros de calibração foram estatisticamente calculados.

6. Quantificação da concentração do peróxido de hidrogênio comercial

As soluções comerciais de peróxido de hidrogênio com aproximadamente 30% (p/v) foram padronizadas usando o método de titulação permanganométrica. Para esta titulação uma solução de permanganato de potássio de aproximadamente 0,1 M foi preparada, pela dissolução da sal em água, logo aquecida por 30 minutos e finalmente filtrada. Esta solução foi pela sua vez padronizada com uma solução de padrão primário oxalato de sódio 0,05 M, da seguinte maneira: Em um erlenmeyer de 100 mL foram colocados 20 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 10%, 25 mL de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ e 75 mL de água. Efetuou-se a titulação com a solução de permanganato até o aparecimento de uma coloração levemente rosa na solução.

Para a análise do peróxido de hidrogênio, calculou-se um volume de peróxido necessário para preparar uma solução de concentração 0,05 M. Transferiu-se uma alíquota de 25 mL da solução para um erlenmeyer junto com 20 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 10% e 25mL de água. Efetuou-se a titulação com a solução de permanganato até o aparecimento de uma coloração levemente rosa na solução.

7. Características espectrofotométricas dos derivados 2,4-DCP-APQI.

Como foi mencionada anteriormente, a quantificação das baixas concentrações de peróxido obtidas através da metodologia geração eletroquímica de peróxido de hidrogênio, nos fez pensar no desenvolvimento de uma metodologia sensível, confiável e rápida que nos permitisse monitorar a formação do peróxido durante o processo de geração dentro do reator eletroquímico. A alta especificidade dos ensaios baseados no uso de peroxidases, especialmente em estudos empregando HRP tem sido amplamente usados e investigados com fins analíticos (Vojinovic, 2004). Como já foi mostrado anteriormente tanto HRP como CPO catalisam a redução de do peróxido de hidrogênio na presença de um agente redutor (Ex. fenol). Se este composto redutor produz por se mesmo derivados corados ou mesmo através de reações adicionais com um cromógeno apropriado para dar lugar a produtos corados, então o peróxido de hidrogênio pode ser determinado espectrometricamente. Porém devido à ampla faixa de agentes redutores alvo da HRP ou da CPO sua seleção estará determinada pelos seguintes parâmetros: especificidade enzima: substrato, limites de concentração, sensibilidade da resposta fenol:cromógeno e toxicidade.

O método apresentado a seguir corresponde a uma modificação da metodologia originalmente desenvolvida por Emerson (1943) e modificada por Vojinovic (2004) e aonde o sistema HRP/fenol/4-AAP foi usado. Na atualidade existem reportes sobre o uso de outros compostos fenólicos menos perigosos e com melhor solubilidade em água que o fenol, como é o caso do fenol-4-ácido sulfônico ou PSA (Vojinovic, 2004). Fatos como os bons níveis de atividade observados com concentrações de 2,4-DCP abaixo de até 5,0 mM e resultados obtidos em termos de parâmetros cinéticos para as duas peroxidases HRP e CPO, abrem o caminho para otimização de uma metodologia espectrométrica usando 2,4-DCP e CPO no lugar do PSA e HRP, respectivamente. Adicionalmente, o efeito do cromógeno no meio reacional foi avaliado, com a finalidade de estabelecer a concentração ótima de 4-AAP a ser usada no ensaio.

A **Figura A-4** mostra como usando o substrato 2,4-DCP, HRP e CPO exibem produtos com padrões espectrofotométricos similares em termos a coeficiente de extinção molar, sugerindo a possível formação de produtos comuns. Porém, estas observações só foram posteriormente corroboradas ao realizar a purificação e identificação dos produtos por CG-Massas. Para o caso dos derivados 2,4-DCP-APQI da HRP existem pelo menos três valores diferentes reportados na literatura para os coeficientes de extinção molar ($\epsilon = \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), este fato fez necessária a determinação de um valor único para CPO e também a confirmação do valor de ϵ reportado para HRP. Estas observações confirmaram os nossos resultados preliminares sobre a espectrometria dos derivados APQI usando CPO e 2,4-DCP, similares às observações descritas na literatura concernentes aos produtos APQI usando a enzima HRP (Fiamegos, 2002 e Vojinovic, 2004). O valor determinado para coeficiente molar dos 2,4-DCP-APQI purificados, obtidos a partir das reações catalisadas pelas duas enzimas não teve diferenças significativas e foi estabelecido como $\epsilon_{510 \text{ nm}} = 20750 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

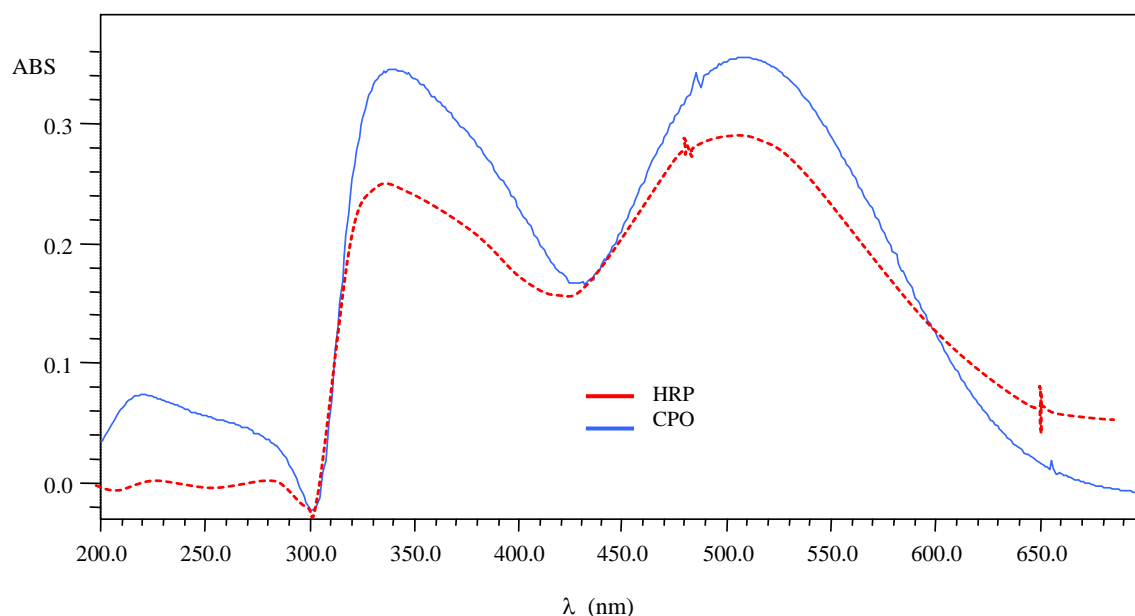


Figura A-4. Espectros de absorção UV-Vis determinados após 3,0 minutos, para os derivados APQI obtidos usando 4,0 nM de CPO ou HRP, 1,0 mM de 2,4-DCP; 0,5 mM de 4-AAP e 0,5 mM de peróxido de hidrogênio em tampões fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 para CPO e tampão tartarato de sódio 100 mM pH 7,0.

8. Estabilidade dos derivados 2,4-DCP-APQI.

Com a finalidade de conhecer a estabilidade que os derivados 2,4-DCP-APQI possuem no meio reacional durante a dosagem de peróxido, assim como o tempo necessário para o desenvolvimento máximo da cor, foram desenvolvidos experimentos usando misturas reacionais contendo 4,0 nm de CPO ou HRP, 1,0 mM de 2,4-DCP; 0,5 mM de 4-AAP e 0,5 mM de peróxido de hidrogênio em tampões fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 para CPO e tartarato de sódio 100 mM pH 7,0 para HRP. A reação foi iniciada pela adição do peróxido, pois se este permanecesse em contato com o substrato poderia oxidá-lo independente da reação enzimática. Adicionalmente, experimentos contendo a mesma mistura descrita acima, porém com adição enzima sem peróxido e adição de peróxido sem enzima foram usadas como branco e controle de reação, respectivamente. Como pode ser observado na **Figura A-5**, perfis muito similares ABS_{510} vs. Tempo são obtidos para ambas as enzimas, porém como já foi anteriormente mencionados a velocidade de reação e o grau de oxidação do 2,4-DCP é maior usando CPO no lugar de HRP. A máxima formação de cor nos dois casos acontece entre 2,5 a 3,0 minutos, mantendo-se estável por 5 minutos desde o início da reação. Porém, após este período de tempo, existe uma lenta mas progressiva perda de absorbância devida possivelmente a hidrólise do derivado APQI ou como foi mencionado por outros autores pela formação de agregados APQI+APQI e APQI+4AAP (Metelitz, 1991 e Vojinovic, 2004).

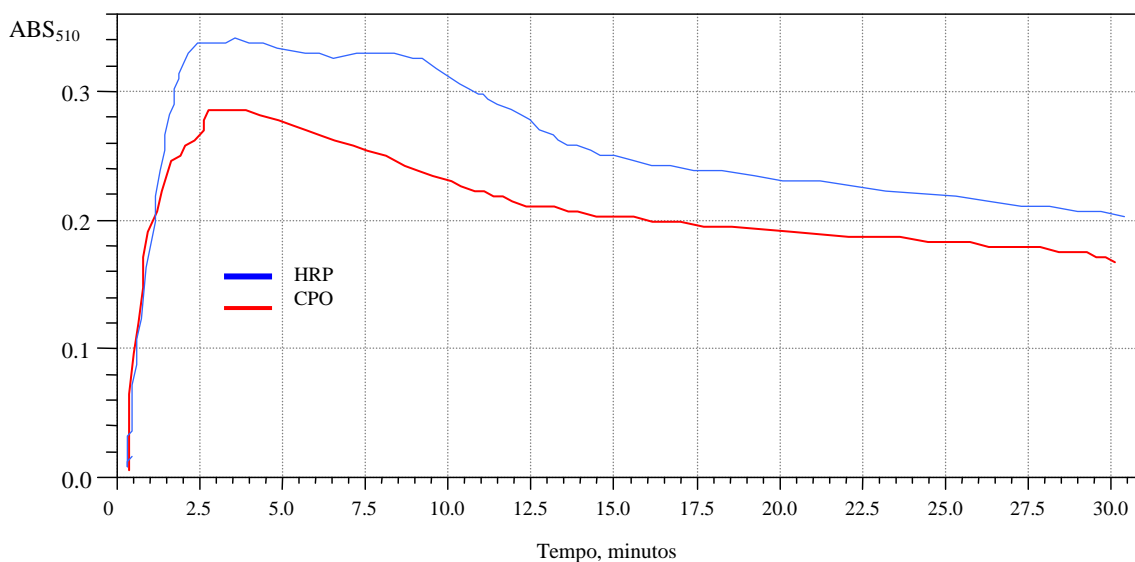


Figura A-5. Perfis de absorvância a 510 nm para os derivados 2,4-DCP-APQI da reação de oxidação do 2,4-CP acoplamento com 4-AAP, obtidos durante 30,0 minutos usando 4,0 nM de CPO ou HRP, 1,0 mM de 2,4-DCP; 0,5 mM de 4-AAP e 0,5 mM de peróxido de hidrogênio em tampões fosfato de sódio e potássio 100 mM pH 6,0 para CPO e tampão tartarato de sódio 100 mM pH 7,0 para HRP.

9. Dependência da velocidade inicial de formação dos APQI das concentrações iniciais de 2,4-DCP e peróxido de hidrogênio

A partir dos resultados descritos no **sub-capítulo V-2**, foi possível selecionar o melhor catalisador e o melhor substrato em termos de eficiência catalítica para o desenvolvimento da metodologia para quantificação de peróxido de hidrogênio baseado na formação de APQI. Embora 4-CP ofereça um nível de eficiência catalítica similar aos observados para 2,4-DCP no caso CPO. A escolha do 2,4-DCP como substrato deve-se em grande parte a sua menor toxicidade comparada com a apresentada por outros CPC. Na faixa de concentração escolhida para o método foi possível trabalhar sem a formação de precipitado ou soluções turvas e com bons níveis de atividade.

Por outro lado, o aumento na concentração do substrato é proporcional ao aumento na velocidade inicial máxima e adicionalmente ao nível de resposta relacionado com a intensidade de coloração que pode ser ainda maior. Este fato permite obtenção de bons níveis de resposta para concentrações de peróxido ainda menores próximas a 0,0005 mM. Contudo para mantermos a linearidade da resposta amostras com concentrações de peróxido de hidrogênio abaixo de 0,0005 mM não seriam quantificáveis a menos que fossem usadas concentrações de 2,4-DCP de no mínimo 10,0 ou 25,0 mM, porém este fato aumentaria o risco devido a toxicidade do composto além das interferências devidas ao decréscimo na solubilidade do substrato.

Desta maneira, foi selecionada uma faixa de concentração para o 2,4-DCP de 0,5 a 2,0 mM que podem ser usadas indiferentemente com CPO ou HRP, sem o efeito inibitório do substrato sobre a enzima, assim como altas velocidades iniciais de oxidação e alta eficiência para o caso da CPO. Adicionalmente, nesta faixa de concentração consegue-se prevenir a formação de produtos insolúveis como aqueles observados em estudos prévios aonde concentrações de 5,0 mM de 4-CP ou 2,4-CP causaram a formação de soluções turvas ou precipitados, fato incompatível com a análise por colorimetria.

10. Dependência da velocidade inicial de formação dos APQI e a concentração inicial de 4-AAP

A **figura A-6** mostra a dependência da velocidade inicial de formação de APQI sobre a concentração de 4-AAP e seu acoplamento como produto da oxidação enzimática do 2,4-DCP, usando as enzimas CPO e HRP. Os resultados confirmaram observações prévias reportadas na literatura para o caso de HRP (Metelitz, 1991, Fiamegos, 2002 e Vojinovic, 2004). E comportamentos bastante similares para o caso da CPO. Assim, para as duas enzimas a máxima concentração de APQI foi atingida com a mesma concentração de 4-AAP (aprox. 0,5 mM).

Vale a pena ressaltar que após este ponto outros produtos podem ser formados e que não estão relacionados com o acoplamento fenol-4AAP mas sim com a dimerização da 4-AAP. Outros estudos também mostraram que a velocidade inicial de formação dos APQI durante a oxidação do fenol aumenta até este ponto, porém incrementos adicionais na concentração da 4-AAP não mudaram a concentração final de APQI (Metelitz, 1991).

Assim, o efeito da a concentração da 4-AAP sobre a formação dos APQI pode ser ignorada se a mistura reacional tiver relações de concentração para 2,4-DCP/4-AAP $\geq 1,0$. Para garantir um baixo efeito co-lateral devido à concentração de 4-AAP, esta foi mantida preferencialmente abaixo de 0,5 mM.

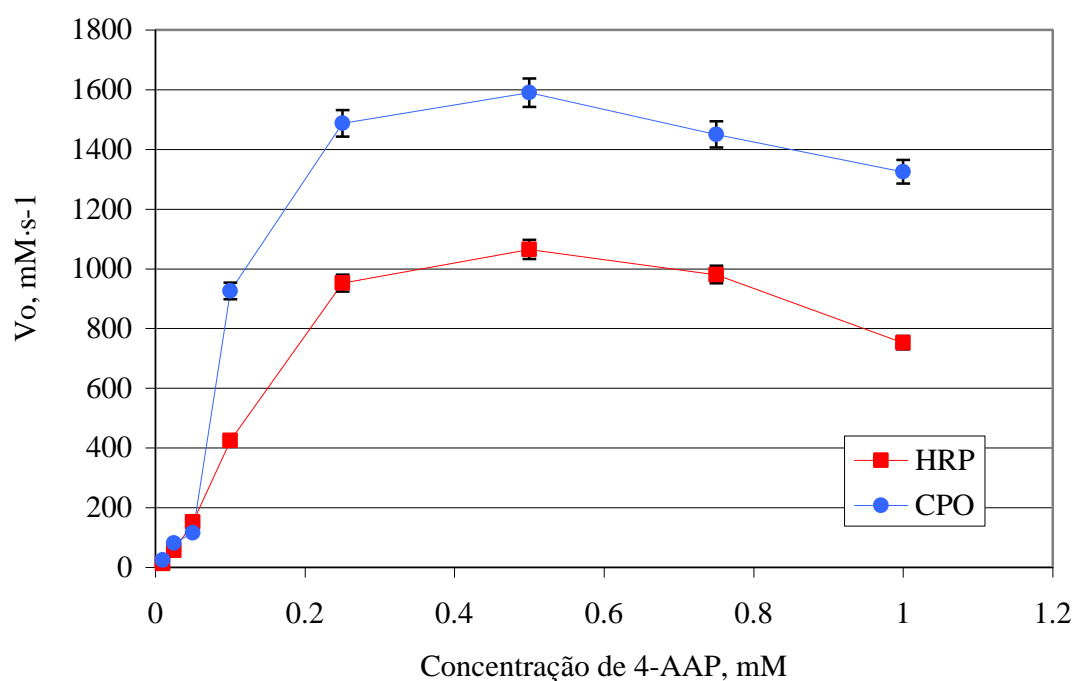


Figura A-6. Efeito da concentração da 4-AAP na velocidade inicial de formação dos APQI. Misturas reacionais contendo 10 mM de 2,4-DCP, 1,0 mM de peróxido de hidrogênio e 0,4 nM de CPO ou HRP, em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 30°C

11. Ensaio para a quantificação colorimétrica de peróxido de hidrogênio.

De acordo com os resultados obtidos, uma mistura reacional padrão foi definida para uma faixa de concentração 0,0005 a 0,01 mM de peróxido de hidrogênio para quantificação usando misturas reacionais contendo 4,0 nM (6,0 UI/mL) de CPO, 1,0 mM de 2,4-DCP, 0,5 mM de 4-AAP em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 30°C . Assim uma curva de calibração de ABS_{510} vs. Concentração de H_2O_2 pode ser construída **Figura A-7**.

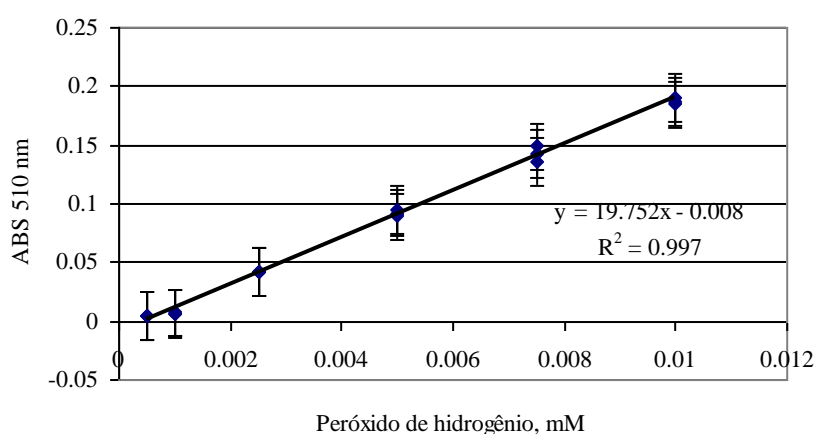


Figura A-7. Exemplo de curva de calibração padrão para quantificação colorimétrica do peróxido de hidrogênio usando misturas reacionais contendo 4 nM de CPO, 1,0 mM de 2,4-DCP, 0,5 mM de 4-AAP em tampão fosfato de sódio e potássio 100 mM, pH 6,0 a 25°C.

Desta maneira, como é mostrado na **tabela A-5** obteve-se uma metodologia rápida, simples, sensível e reproduzível para a quantificação de microconcentrações de peróxido de hidrogênio comparável com metodologias atualmente em uso e inclusive em alguns aspectos melhor.

Tabela A-5. Tratamento estatístico para o calculo dos coeficientes angular e de correlação linear para a curva de calibração obtida.

| <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | <i>D</i> | <i>E</i> | <i>F</i> | <i>G</i> | <i>H</i> | <i>I</i> |
|-------------|--------------------------|---------------|---------------|----------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------------|------------|
| <i>X</i> | <i>Média</i> | <i>X-</i> | <i>Y-</i> | <i>C²</i> | <i>D²</i> | <i>C²x10⁻⁴</i> | <i>D2x10⁻⁸</i> | <i>C*D</i> |
| <i>(mM)</i> | <i>ABS₅₁₀</i> | <i>Xmedia</i> | <i>Ymedia</i> | | | | | |
| 0.0005 | 0.00459 | -0.00392 | -0.07658 | 1.53E-05 | 0.005864 | 0.153429 | 5.86E-11 | 0.0003 |
| 0.001 | 0.0099 | -0.00342 | -0.07127 | 1.17E-05 | 0.005079 | 0.116759 | 5.08E-11 | 0.000244 |
| 0.0025 | 0.042295 | -0.00192 | -0.03887 | 3.67E-06 | 0.001511 | 0.036749 | 1.51E-11 | 7.45E-05 |
| 0.005 | 0.092 | 0.000583 | 0.010833 | 3.4E-07 | 0.000117 | 0.003399 | 1.17E-12 | 6.32E-06 |
| 0.0075 | 0.1425 | 0.003083 | 0.061333 | 9.5E-06 | 0.003762 | 0.095049 | 3.76E-11 | 0.000189 |
| 0.01 | 0.18727 | 0.005583 | 0.106103 | 3.12E-05 | 0.011258 | 0.311699 | 1.13E-10 | 0.000592 |
| Soma | | | | | | | | |
| 0.0265 | 0.478555 | -2E-06 | -0.00845 | 7.17E-05 | 0.027591 | 0.717083 | | 0.001406 |

| | | |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| Média de A | | 0.004416667 |
| Média de B | | 0.079759 |
| Coeficiente angular | soma H / soma E | 19.60396 |
| Intercepto | soma Y – b(soma X/n) | -0,00541 |
| Coeficiente de correlação | r = soma H/raiz (soma E * soma F) | 0.999413 |
| Equação | | Y =19,60396 -0,00541 |

ANEXO III

CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA OXIDAÇÃO

ENZIMÁTICA DE CLORO-FENÓIS.

A caracterização completa de um polímero não é uma tarefa fácil, diferentes estratégias são recomendadas. O estudo dos produtos da oxidação enzimática de cloro-fenóis baseou-se especificamente no caso dos produtos oligo- e poliméricos obtidos em estudos anteriores a partir da oxidação enzimática do 4-clorofenol. Desta maneira pretendeu-se estabelecer uma possível rota de formação para estes polímeros ao estudar os produtos monoméricos primários da oxidação enzimática (quinonas) e os posteriores oligômeros gerados através de reações radicalares.

1. Extração dos produtos de degradação

Conforme mostrado na **Figura A-8**, os produtos gerados a partir da oxidação enzimática do 4-CP usando CPO foram extraídos, purificados e identificados.

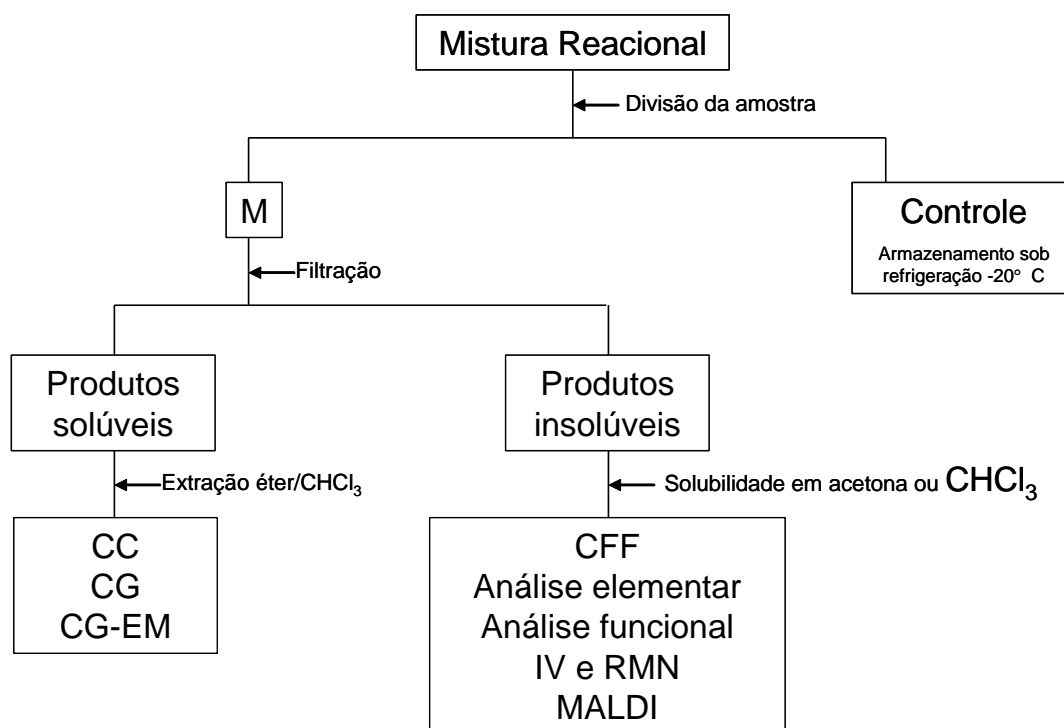


Figura A-8. Fluxograma do protocolo analítico empregado no isolamento e caracterização dos produtos da oxidação enzimática por CPO do 4-CP.

A mistura reacional foi dividida em duas porções iguais (M) e o controle ou amostra de reserva mantida sob refrigeração. Por precipitação da amostra M, foram separados os produtos solúveis da reação (S) e os insolúveis e o precipitado (P). Os produtos solúveis (S) foram extraídos da fase aquosa (S): extração solvente-solvente com clorofórmio e éter.

2. Análise dos extratos obtidos a partir da fração solúvel.

2.1. Análise elementar – cloro e cloreto

A amostra foi analisada usando o teste específico para cloro através do método de Villier. Neste método o cloro molecular reage com uma solução de anilina e *otro*-toluidina em ácido acético para dar coloração roxa. A amostra é preparada pela mistura do analito com dicromato de potássio (1:20), a seguir, cuidadosamente é coberta com ácido sulfúrico 98% e aquecido em banho-maria por 3 a 5 minutos. Os vapores desprendidos são então recebidos em papel de filtro umedecido pela mistura de anilina e *otro*-toluidina em ácido acético até aparecimento da cor.

O Cloreto foi determinado pela adição direta de 0,5 mL reagente de nitrato de prata 0,1 M a 5 mL da fração solúvel. Formação ou aumento na turvação ou formação de precipitado escuro indicam a presença de íons cloreto na solução.

2.2. Cromatografia em coluna

Os extratos orgânicos provenientes da fração solúvel, foram secados e impregnados sobre sílica (*mesh* 70-230) até formar uma pastilha em evaporador rotatório. A separação foi realizada pela técnica de cromatografia em coluna aberta em sílica com eluição por gradiente de metanol (5,10, 20 e 30%) em clorofórmio.

.2.3. Análise por cromatografia de gases

Os extratos orgânicos obtidos a partir da separação em CC foram analisados por cromatografia de gases e cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massas, de acordo com as seguintes condições:

- A separação cromatográfica foi realizada usando um cromatógrafo de gases HP 5890 equipado com uma coluna capilar Ultra-2 (comprimento de 30 m; 0,22 mm diâmetro interno e 0,11 µm de espessura da fase estacionária); CG: gás de arraste H₂ (8 psi).
- Temperatura do injetor: 240°C.
- Temperatura do detector de ionização de chama (FID): 270°C
- Tipo de injeção: splitless, com tempo de válvula de 0,5 min.
- Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 50°C (2 minutos), rampa 1 de 5°C /minuto até 80°C e rampa 2 de 10°C /minuto e temperatura final de 280°C por 15 min..

Para o caso da análise por cromatografia de gases acoplada a espectrometria de massas, as condições usadas foram as seguintes:

- CG: gás de arraste He (8 psi); A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna capilar HP-1 (comprimento de 30 m; 0,22 mm diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária); cromatógrafo de gases HP 5973 acoplado com detector de massas.
- Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 60°C (4 minutos), rampa de 10°C /minuto e temperatura final de 280°C por 15 min.
- Espectrômetro de massas: 70 eV; temperatura da fonte 230°C. E equipado com a espectroteca Wiley 275.

3. Análise dos extratos obtidos a partir da fração insolúvel.

O precipitado e outros produtos não solúveis, obtidos a partir da filtração da mistura reacional foram secados sob atmosfera de nitrogênio e posteriormente ressuspensos em acetona e clorofórmio.

3.1. Análise elementar – cloro e cloreto

O cloro e cloreto foram determinados de acordo com as metodologias descritas no item 2.2.1.

3.2. Análise funcional – fenóis e éteres fenólicos

Os compostos fenólicos e éteres fenólicos são reconhecidos pelo aparecimento de coloração amarela após da pulverização das placas cromatográficas de camada fina em sílica, com o reagente de Millon composto por mercúrio dissolvido em solução aquosa de ácido nítrico (8:10).

3.3. Análise por cromatografia de camada fina – CCF

As análises por CCF foram realizadas usando cromato-folhas de alumínio contendo sílica gel (mesh 60) Merck F₂₅₄®. Como fase móvel foi usada uma mistura de clorofórmio : etanol (6%). A visualização das bandas foi realizada sob luz UV e pela pulverização com uma solução aquosa de acetona e nitrato de prata. Como padrões foram usados os compostos: hidroquinona, 1,4-benzoquinona, antraceno, pireno e 4-clorofenol.

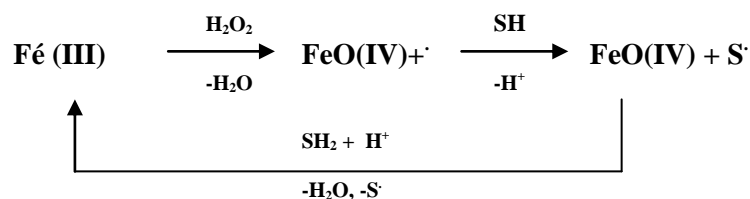
3.4. Análise por espectrofotometria no infra-vermelho IV

As análises por IV foram realizadas no espectrofotômetro para infra-vermelho NICOLEC modelo MAGA-IR 660, por transformada de Fourier. As amostras foram preparadas por compressão em pastilha de KBr.

3.5. Espectrometria de massa por MALDI (Ionização por matriz assistida por dessorção laser)

Esta técnica espectrométrica está baseada na dessorção de moléculas de íons orgânicos com um pulso de fótons. Os íons são gerados em um ponto, em termos de espaço e tempo o que torna MALDI altamente compatível com um espectrômetro de massa equipado com tempo de voo. Este método é muito útil na análise de proteínas simples e conjugadas, assim como na determinação dos pesos moleculares de peptídeos, oligonucleotídeos, oligossacarídeos, glicoconjugados, ligninas e polímeros sintéticos. Esta matriz serve pra absorver a energia do laser e prevenir a decomposição das espécies de interesse, ao isolar as biomoléculas umas das outras para aumentar o número de íons e evitar a agregação que pode interferir na análise. Os espectros de massas pela técnica de MALDI foram obtidos usando um equipamento Voyager DE-PRO no modo linear, com um número de pulsos do laser por espectro de 100. As matrizes utilizadas foram: 1,8,9-antracenotriol, diantról e ácido *trans*-3-iodoacrílico (IAA), assim como uma pequena quantidade de trifluoroacetato de prata como facilitador da ionização.

Como já foi mostrado anteriormente, a CPO catalisa a oxidação de compostos fenólicos na presença de peróxido de hidrogênio produzindo radicais livres e água de acordo com o equação a seguir



Para o caso do substrato escolhido como alvo para a identificação dos produtos de oxidação (4-clorofenol). O radical livre 4-CP (S') nas três formas de ressonância (A,B,C) são apresentados na **figura A-8**: O papel da enzima no acoplamento oxidativo está limitado à oxidação do substrato para dar lugar a radicais inestáveis neste caso quinonas. Estas formas de ressonância podem acoplar-se umas com as outras para formar dímeros ou até mesmo oligômeros de alto peso molecular, conforme exemplificado baixo. Estas espécies químicas são estabilizadas logo pela polimerização.

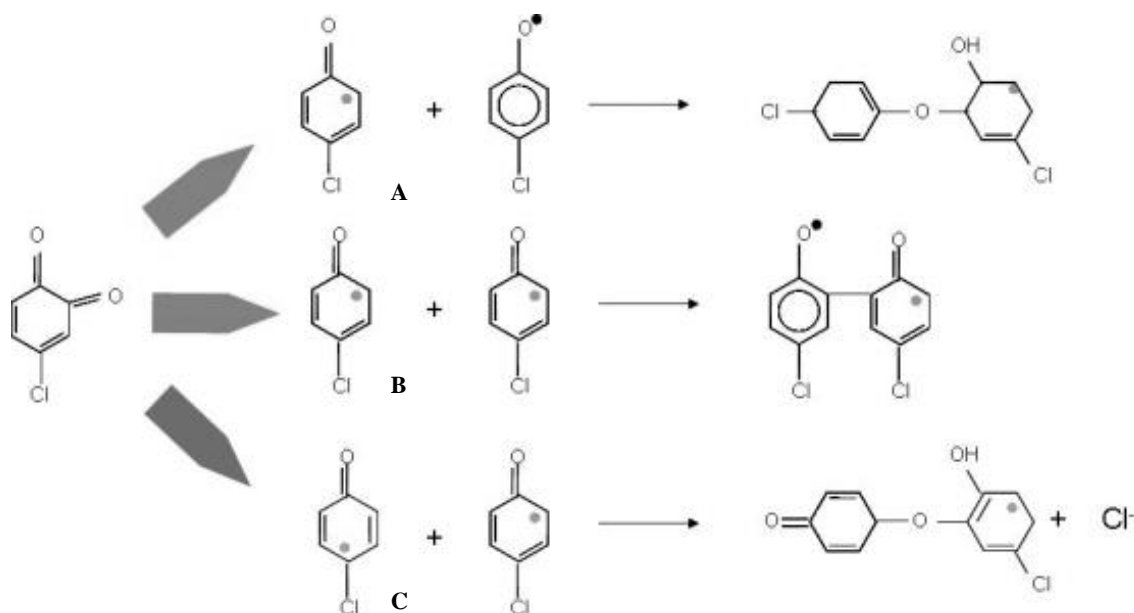


Figura A-8. Formação dos derivados diméricos base para a polimerização do 4-Clorofenol.

Muitas vezes, estes acoplamentos podem resultar na saída de um substituinte, e como foi observado para o caso do 4-CP, o acoplamento possibilita a saída de cloro na forma de cloreto, o que daria lugar a um derivado oxidado polimérico ainda menos tóxico que o composto fenólico clorado original.

Com base nas informações aportadas pelas análises de espectrometria de massa para os picos minoritários observados em CG e CLAE da fração solúvel foi possível afirmar que estes correspondem a traços dos dímeros ou trímeros provenientes do acoplamento oxidativo, similares àqueles encontrados na literatura com relação a polímeros formados por mistura heterogênea de unidades de fenileno e oxifenileno (Nicell, 1997; Dikalov, 1999 e Uyama, 1999) como mostra a **Figura A-9**.

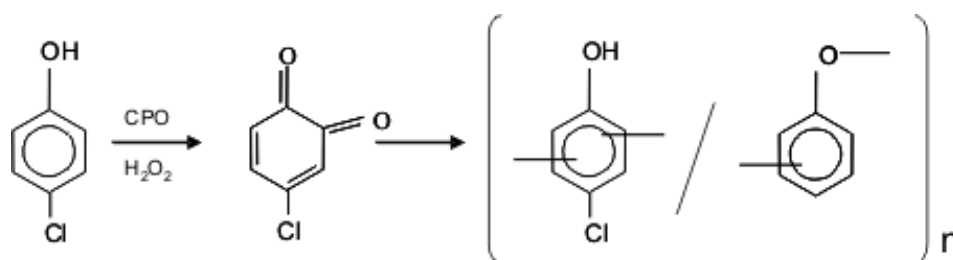


Figura A-9 Esquema resumido da oxidação e polimerização de 4-CP pela formação de radicais livres na forma de quinona e oligômeros de fenileno e oxifenileno.

Observa-se ainda, a existência de dois cloros na sua estrutura, segundo a disposição característica dos picos 310, 312 e 314 referentes a contribuição isotópica do elemento cloro, além da presença do pico correspondente a perda de C-O característica dos compostos fenólicos. O precipitado resultante do acoplamento oxidativo, segundo as análises realizadas por CG-MS e RMN mostraram que se trata de um composto aromático hidroxilado e clorado. No espectro IV foi observado ainda bandas de carbonila além das bandas referentes aos grupamentos metila e metileno oriundos a contaminação com etanol presente no meio. O espectro de RMN de hidrogênio apresentou grande complexidade na determinação da substituição do anel aromático. Como já foi mostrado na literatura (Nicell, 1995 e Oyama, 1999), é importante conhecer as características deste polímero pois existe a possibilidade de ser empregado como matéria prima na indústria química de resinas pois estes possuem várias vantagens tais como:

- A polimerização de fenóis é realizada sob condições de reação moderadas
- A solubilidade do polímero pode ser controlada pela mudança nas condições reacionais
- E os procedimentos de polimerização assim como o isolamento e purificação dos polímeros são muito convenientes.

A identificação de íons cloreto na solução e ausência de cloro no produto solúvel **1** dá claros indícios de que o acoplamento se dá também pela posição *para*- com a correspondente saída do cloro na forma de ânion, embora exista a presença de impedimento estérico.

Embora com a técnica de MALDI fosse possível determinar a massa molecular média do polímero assim como a caracterização do seu monômero principal, os resultados da análise MALDI utilizando matriz de diantról não foram claros devido à interferência da matriz. Com a matriz de IAA foram obtidos alguns picos na região de 100 m/z. Estes dados também não foram conclusivos, pois foram verificados no espectro picos referentes ao acoplamento da matriz com a prata na forma de adutos, possivelmente devido à grande quantidade de prata introduzida no sistema.

ANEXO IV
PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGOS PUBLICADOS

1. Camilo E. La Rotta Hernandez, Stephan Lütz, Andreas Liese and Elba P.S. Bon.
ACTIVITY AND STABILITY OF *Caldariomyces fumago* CHLOROPEROXIDASE
MODIFIED BY REDUCTIVE ALKYLATION, AMIDATION AND CROSS-
LINKING. Enzyme and Microbial Technology, 37 (2005) 582-588

ARTIGOS A SEREM SUBMETIDOS

1. A: Letters in Analytical Biochemistry
LA ROTTA, C.E.H. ; D'ELIA, Eliane ; BON, Elba Pinto da Silva . A SENSIBLE
METHOD FOR HYDROGEN PEROXIDE QUANTIFICATION USING
CHLOROPEROXIDASE FROM *Caldariomyces fumago*: APPLICATION TO
ELECTROGENERATED HYDROGEN PEROXIDE.
2. A: Enzyme and Microbial Technology
LA ROTTA, C.E.H. ; D'ELIA, Eliane ; BON, Elba Pinto da Silva.
BIOELECTROCHEMICAL DEGRADATION OF CHLORINATED PHENOLS
USING CHLOROPEROXIDASE FROM *Caldariomyces fumago* IN REACTORS
WITH ELECTROGENERATED HYDROGEN PEROXIDE .

TRABALHOS COMPLETOS EM EVENTOS

1. LA ROTTA, C.E.H.; VIERA, Eduardo; D'ELIA Eliane; BON, Elba Pinto da Silva
TRATAMENTO BIOELETROCATALÍTICO DE REMOÇÃO FENÓLICA EM
ÁGUAS RESIDUAIS DE REFINARIA. In: XV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE
ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, Dezembro 2005. Londrina - PR
2. LA ROTTA, C.E.H.; D'ELIA Eliane; BON, Elba Pinto da Silva
BIOELECTROCHEMICAL DEGRADATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM
REFINERY WASTE-WATERS USING CHLOROPEROXIDASE FROM
Caldariomyces fumago AND ELECTROGENERATED HYDROGEN PEROXIDE. In:
III CONGRESSO BRASILEIRO DE PETRÓLEIO E GÁS NATURAL, outubro de
2005, Salvador – BA,
3. LA ROTTA, C.E.H. ; BON, Elba Pinto da Silva . ESTABILIZAÇÃO POR
MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE CLOROPEROXIDASE DE *Caldariomyces fumago*.
In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática -ENZITEC 2004, Rio de Janeiro.

TRABALHOS (RESUMOS) EM EVENTOS

1. LA ROTTA, C.E.H.; Honório, F.; Ferreira-Leitão, Viridiana; Lutz, Stephan; Bon, Elba Pinto da Silva; D'Elia, Eliane. ESTUDO DA ELETROGERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO UTILIZANDO-SE CATODO DE COBRE COM APLICAÇÃO NA DEGRADAÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE POLUENTES. XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005 Poços de caldas - MG
2. LA ROTTA, C.E.H. ; BON, Elba Pinto da Silva ; FERREIRA, V. S. . PEROXIDASE-CATALYZED SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR HYDROGEN PEROXIDE QUANTIFICATION.. In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2004, Caxambú - MG.
3. LA ROTTA, C.E.H. ; SOUZA, A. ; BON, Elba Pinto da Silva . CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE 4-CLOROFENOL POR CLOROPEROXIDASE DE *Caldariomyces fumago*. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática -ENZITEC 2004, 2004, Rio de Janeiro.
4. LA ROTTA, C.E.H. ; MADEIRA, L. S. ; FERREIRA, V. S. ; BON, Elba Pinto da Silva . POTENCIAL UTILIZAÇÃO DAS PEROXIASES NA DEGRADAÇÃO DE POLUENTES INDUSTRIAIS. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC 2004, 2004, Rio de Janeiro.
5. LA ROTTA, C.E.H.; Ferreira-Leiãõ V.; D'ELIA, Eliane ; LÜTZ, S. ; BON, Elba Pinto da Silva . PEROXIDASE DEGRADATION OF METHYLENE BLUE AND 4-CHLOROPHENOL USING IN-SITU ELECTROGENERATED HYDROGEN

- PEROXIDE. In: International Congress on Biocatalysis, 2004, Hamburg, Germany. Biocat 2004, 2004. p. 142.
6. LA ROTTA, C.E.H. MONO-SUBSTITUTED PHENOLS BIO-OXIDATION using *Caldariomyces fumago* CHLOROPEROXIDASE. In: 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2003, Breckenridge - Colorado. Proceedings for the 25th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2003.
7. LA ROTTA, C.E.H. ; BON, Elba Pinto da Silva ; LÜTZ, S. ; ANDREAS, L. . ESTUDOS PRELIMINARES DE REMOÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE ÁGUAS RESIDUAIS DE REFINARIA. . In: 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2003, Rio de Janeiro.
8. LA ROTTA, C.E.H.; SOUZA, A.; BON, Elba Pinto da Silva . 4-CHLOROPHENOL DEGRADATION BY CHLOROPEROXIDASE FROM *Caldariomyces fumago*: ISOLATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF SOLUBLE AND INSOLUBLE PRODUCTS. In: 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, 2003, Rio de Janeiro.