UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Ana Carina Cruz de Mello

Estudo da aplicação da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular para remoção de fenol de efluentes

Rio de Janeiro
2017

Ana Carina Cruz de Mello

Estudo da aplicação da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular para remoção de fenol de efluentes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia de Processos Químicos e Biológicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Profª. Drª. Andréa Medeiros Salgado
Profª. Drª. Fabiana Valéria da Fonseca

Rio de Janeiro
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Mello, Ana Carina Cruz de

M527e Estudo da aplicação da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular para remoção de fenol de efluentes / Ana Carina Cruz de Mello. - Rio de Janeiro, 2017. 93 f.

Orientadora: Andréa Medeiros Salgado.
Coorientadora: Fabiana Valéria da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2017.

1. Tratamento de efluentes. 2. Tirosinase. 3. Carvão ativado granular. 4. Imobilização. 5. Remoção de fenol. I. Salgado, Andréa Medeiros, orient. II. Fonseca, Fabiana Valéria da, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CARINA CRUZ DE MELLO

Estudo da aplicação da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular para remoção de fenol de efluentes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnologia de Processos Químicos e Biológicos, Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em:

_____

(Andréa Medeiros Salgado D.Sc., EQ/UFRJ)

_____

(Fabiana Valéria da Fonseca D.Sc., EQ/UFRJ)

_____

(Ana Maria Rocco D.Sc., EQ/UFRJ)

_____

(Isabelli do Nascimento Dias D.Sc., EQ/UFRJ)

_____

(Gisele dos Santos Costa D.Sc., SME/PCRJ)

Dedico esse trabalho a minha mãe, Dulce,

pelo incentivo e apoio incondicionais em todos

os momentos e por sempre ter acreditado em mim

Agradecimentos

A Deus, o que seria de mim sem a fé que tenho nele.

À minha mãe, Dulce, que faleceu antes de poder presenciar fisicamente a conclusão de mais essa etapa de minha vida, mas que estará sempre comigo em meu coração, por nunca medir esforços para que eu alcançasse meus objetivos e por sempre cuidar de mim.

Ao meu irmão Diogo, meus sobrinhos amados, Ana Letícia e Davi Lucas, e a toda minha família por todo carinho, apoio e compreensão durante mais essa jornada.

As minhas orientadoras, Professora Andrea, que me acompanha desde minha iniciação científica, e Professora Fabiana, por toda paciência, incentivo e inspiração que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos Rafaela, Rafael Santos, Rafael Pereira, Mariana, Josi e Alisson pelos momentos de descontração e apoio constante, principalmente nos momentos mais difíceis.

A todos os colegas do Laboratório de Sensores Biológicos pela companhia, ajuda e momentos de descontração. Em especial a Érica, Gabi e Paula pela amizade e troca de conhecimento.

Ao pessoal do LABTARE, em especial a Déborah, pelo auxilio prestado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (CAPES), pela bolsa concedida.

Resumo

MELLO, Ana Carina Cruz de. **Estudo da aplicação da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular para remoção de fenol de efluentes.** Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O fenol e seus derivados são poluentes comumente encontrados em efluentes industriais e mesmo em baixas concentrações, apresentam elevada toxicidade ao ambiente aquático. Os métodos mais utilizados de remoção desses compostos apresentam algumas desvantagens, tais como custos associados as técnicas avançadas de tratamento, toxicidade aos microrganismos para os processos biológicos e dificuldade de degradação, aumentando a demanda pelo desenvolvimento de metodologias mais eficientes e de menor custo, tal como a degradação de fenol e compostos fenólicos através do uso de enzimas, como a tirosinase. Neste trabalho utilizou-se a enzima tirosinase, oriunda do *Agaricus bisporus*, imobilizada em carvão ativado granular (CAG) para remoção de fenol em soluções aquosas. Foi estudada a influência da quantidade de suporte, da agitação do sistema e do tempo de contato para a imobilização. Os melhores resultados foram alcançados utilizando 10 gramas de suporte carvão ativado granular, agitação de 150 RPM e tempo de contato de 90 minutos. Para ensaios de remoção de fenol via oxidação enzimática, o uso da enzima imobilizada em carvão ativado granular com atividade enzimática maior que 200 U/grama de suporte foi suficiente para adequar soluções de 10 e 20 ppm de fenol ao limite exigido para descarte pelo CONAMA 430/2011, que é de 0,5 ppm. O carvão ativado granular utilizado como suporte se mostrou ineficiente na remoção do fenol sem a presença da enzima, porém foi capaz de remover o produto da degradação do fenol, observado pela coloração menos intensa da solução aquosa após o ensaio de oxidação enzimática. Mesmo com perda da enzima imobilizada durante os ensaios, foi possível reutilizar a enzima imobilizada 3 vezes antes da remoção de fenol ser inferior a 50 %. A reutilização do suporte também foi testada e os resultados mostraram que apesar da eficiência do método de imobilização ser menor do que quando utilizado suporte novo, a adsorção da enzima foi efetiva, visto que a perda de proteínas no final de cada ensaio foi menor que a perda quando se usa um suporte novo. O resultados demonstraram que o carvão ativado granular pode ser utilizado como suporte da enzima tirosinase contida no extrato enzimático bruto, sendo possível sua reutilização, assim como a reutilização da enzima imobilizada em ensaios de remoção do fenol, indicando a possibilidade de seu uso em aplicações industriais.

Palavras-chave: Tratamento de efluentes; Tirosinase; Carvão Ativado Granular; Imobilização; Remoção do fenol.

Abstract

MELLO, Ana Carina Cruz de. **Estudo da aplicação da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular para remoção de fenol de efluentes.** Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de processos químicos e bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Phenol and its derivatives are pollutants found in industrial effluents and even at low concentrations present high toxicity to the aquatic environment. Most commonly used methods of removing those compounds have some drawbacks such as costs associated with advanced treatment techniques, toxicity to microorganisms for biological processes and difficulty in degradation. This problems raises the interest in development of more efficient and lower-cost methodologies, for instance degradation of phenol and phenolic compounds through the use of enzymes, for example, tyrosinase. In this work the enzyme tyrosinase, from *Agaricus bisporus*, was immobilized on granular activated carbon and used for the removal of phenol present in aqueous solution. The influence of amount of support, system agitation and contact time for immobilization was studied. Best results were achieved when using 10 grams of support, granular activated carbon, system agitation of 150 RPM and contact time of 90 minutes. For phenol removal trials through enzymatic oxidation, the use of enzyme immobilized on granular activated carbon with enzymatic activity superior than 200 U/ grams of support to adapt solutions of 10 and 20 ppm of phenol to the limit required for disposal by CONAMA 430, which is 0,5 ppm. Granular activated carbon utilized as support showed to be inefficient in phenol removal without the presence of enzyme, however it was able to remove the product from phenol degradation, observed by the less intense coloring of the synthetic solution after the enzymatic oxidation test. Even with immobilized enzyme loss during tests, it was possible to reuse the immobilized enzyme 3x before phenol removal fell below 50%. Support reuse was also tested and results show that although immobilization efficiency is lower than when using new support, enzyme adsorption was effective since protein loss at the end of each trial was less than protein loss when using anew support. Results show that granular activated carbon can be used as support of enzyme tyrosinase contained in crude enzyme extract, being possible reused it as well as the reuse of immobilized enzyme in phenol removal trials, indicating the possibility of its use in industrial applications.

Keywords: Effluents Treatment; Tyrosinase; Granular activated carbon; Immobilization; Phenol removal.

Lista de Figuras

Figura 1: Forma Estrutural do fenol (Mello, 2017) 20

Figura 2: Estrutura do sítio ativo da tirosinase (Rolff *et al.*, 2011) 25

Figura 3: Etapas da conversão do fenol a o-quinona. Etapa (1) representa a atividade catalítica monofenolase e Etapa (2) representa a atividade catalítica difenolase ou oxidase. (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2001) 26

Figura 4: Ciclo Catalítico da Tirosinase (CHAVITA, 2010). 26

Figura 5: Métodos de imobilização de enzimas. (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012) 32

Figura 6: Procedimento para o confinamento de enzimas durante o processo sol-gel, incluindo (a) formação de partículas de sol durante a hidrólise e condensação, adição (b) da enzima na suspensão contendo as partículas sol, e (c) agregação de partículas coloidais em torno das moléculas de enzima. (MALLIK e HAGE, 2006) 34

Figura 7: Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; (d) reticulação direta. CRY: cristais de enzima; AGG: agregados enzimáticos; SDE: enzima atomizada. CLEC:cristais de enzima reticulados; CLEA: agregados enzimáticos reticulados; CSDE: enzimas atomizadas reticuladas; CLE: enzimas solubilizadas reticuladas. Fonte: (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003). 37

Figura 8: Tipos de carvão ativado: (a) em pó; (b) granular; (c) pelotizado (SHARMA,2011). 43

Figura 9: Carvão Ativado Granular Carbotrat AP 49

Figura 10: Carvão Ativado Granular Carbomafra 119 50

Figura 11: Carvão Ativado Granular GranularNorit® 1240 51

Figura 12: Curva padrão de dosagem de fenol utilizando o método colorimétrico direto descrito no Standard Methods. 55

Figura 13: Curva padrão de quantificação de proteína obtida pelo método de Bradford usando albumina bovina como padrão 56

Figura 14: Etapas para reutilização do suporte usado 57

Figura 15: Variação da taxa de imobilização da enzima em suporte Carbotrat AP em relação ao tempo de contato em tempos de contato final de 30,60 e 90 minutos. 59

Figura 16: Comparação da imobilização da tirosinase utilizando como suporte (a) CAG Carbotrat AP e (b) CAG CARBOMAFRA 119, sistema em agitação de 150 RPM durante 90 minutos 61

Figura 17: Análises de imagem do carvão ativado antes da imobilização por adsorção utilizando MEV, (a) ampliação de 10000 vezes, (b) ampliação de 2500 vezes. 65

Figura 18: Análises de imagem do carvão ativado após a imobilização por adsorção utilizando MEV, (a) ampliação de 10000 vezes, (b) ampliação de 2500 vezes 65

Figura 19: Espectros de Infravermelho do carvão ativado granular Carbotrat AP (a) antes da imobilização e (b) após a imobilização 66

Figura 20: Remoção de fenol de uma solução de 10 ppm através de oxidação enzimática com (a) Enzima tirosinase imobilizada em CAG Carbotrat AP (Atividade enzimática de 1.500 U, [CAG = 20 g/L]) e (b) Enzima tirosinase na forma livre (Atividade enzimática de 1.500 U); e através da adsorção em (c) Carvão Ativado Granular da marca Carbotrat AP na concentração de 20 g/L; (d) Carvão Ativado Granular da marca NORIT® 1240 na concentração de 20 g/L. 71

Figura 21: Coloração da solução aquosa, contendo inicialmente 10 ppm de fenol, após duas horas de oxidação enzimática utilizando (a) enzima livre e (b) enzima imobilizada 73

Figura 22:Espectro no Ultravioleta-Visível na faixa de 250-400 nm das soluções sintéticas após oxidação enzimática utilizando (a) enzima livre e (b) enzima imobilizada. 74

Figura 23: Gráfico da velocidade de remoção do fenol por (a) oxidação enzimática com tirosinase imobilizada; (b)oxidação enzimática com tirosinase livre; (c) adsorção em CAG Carbotrat AP; (d) adsorção em CAG NORIT® 1240 75

Figura 24: Perda de proteínas imobilizadas em suporte (a) novo e (b) reutilizado, durante o ensaio de oxidação enzimática 79

Lista de Tabelas

Tabela 1 : Concentração de fenol presente no efluente (Adaptado de Aghav, 2011 e González-Muñoz *et al.*, 2003). 21

Tabela 2: Parâmetros orgânicos para descarte de efluentes em corpos hídricos estabelecidos pela Resolução CONAMA 430/2011 (MMA, 2011). 24

Tabela 3: Especificações do Carvão Ativado Granular CARBOTRAT AP (Carbonífera Criciúma, 2015) 49

Tabela 4: Especificações do Carvão Ativado Granular CARBOMAFRA 119 (CARBOMAFRA, 2014) 50

Tabela 5: Especificações do Carvão Ativado Granular Norit®1240 (NORIT, 2012) 50

Tabela 6: Valores da atividade enzimática da tirosinase dos extratos obtidos a partir dos 3 lotes de cogumelos 58

Tabela 7: Variação da Taxa de imobilização e da atividade enzimática da enzima imobilizada em relação à agitação do sistema 60

Tabela 8: Comparação da taxa de imobilização em suportes diferentes 61

Tabela 9: Resultado do ensaio de oxidação enzimática do fenol 62

Tabela 10: Imobilização da enzima utilizando quantidades diferentes de suporte 63

Tabela 11: Resultados do ensaio de oxidação enzimática do fenol presente em soluções sintéticas 63

Tabela 12: Concentração de fenol final média e remoção do fenol de soluções aquosas contendo concentrações diferentes de fenol após a oxidação enzimática 67

Tabela 13: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato da enzima imobilizada (1.500 U) em uma solução de 10 ppm de fenol 68

Tabela 14: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato da enzima livre em uma solução de 10 ppm de fenol 69

Tabela 15: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato do CAG Carbotrat AP em uma solução de 10 ppm de fenol 70

Tabela 16: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato do CAG NORIT® 1240 em uma solução de 10 ppm de fenol 71

Tabela 17: Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP 76

Tabela 18: Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbomafra 119 76

Tabela 19: Quantificação de proteínas presentes na solução aquosa após o ensaio de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP 77

Tabela 20: Taxa de imobilização de enzima em um mesmo suporte 78

Tabela 21: Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP (2ª utilização do suporte). 78

Lista de Nomenclaturas e Siglas

Abs_1 - absorbância inicial,

Abs_2 - absorbância final,

AGG - agregados enzimáticos;

CAG - Carvão Ativado Granular

CAP - carvão ativado em pó

CLE - enzimas solubilizadas reticuladas.

CLEA - agregados enzimáticos reticulados;

CLEC - cristais de enzima reticulados;

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

COPPE - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia

CRY - cristais de enzima;

CSDE - enzimas atomizadas reticuladas;

D_E - fator de diluição da solução enzimática.

DQO - Demanda Química de Oxigênio

kDa - Quilo Dalton

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

nm - nanômetro

PAM - Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros

pI - ponto isoelétrico

pKa - logaritmo inverso da constante de acidez

ppb - parte por bilhão

ppm - parte por milhão

PPO - Polifenol Oxidase

RPM - rotação por minuto

SDE - enzima atomizada

t_1 - tempo inicial

t_2 - tempo final

U - atividade enzimática

U_f - atividade enzimática residual no tempo x.

U_i - atividade enzimática inicial da solução no tempo 0

U/mL - atividade enzimática por mililitro de extrato bruto

V_E - volume de solução enzimática

λ - comprimento de onda

Sumário

1 Introdução 17
2 Objetivos 19
3 Revisão Bibliográfica 20
3.1 Fenol e seus Derivados 20
3.1.1 Características Gerais 20
3.1.2 Tecnologias de remoção de fenol 21
3.1.3 Legislação Brasileira 23
3.2 Enzima Tirosinase 24
3.2.1 Características Gerais 24
3.2.2 Aplicação da enzima tirosinase para a remoção de compostos fenólicos 27
3.2.3 Fonte da enzima tirosinase: *Agaricus bisporus* 30
3.3 Imobilização de enzimas 31
3.3.1 Confinamento 33
3.3.2 Ligação Covalente 34
3.3.3 Reticulação 36
3.3.4 Encapsulamento 37
3.3.5 Adsorção 38
3.3.6 Suportes para imobilização 40
3.4 Carvão Ativado 41
3.4.1 Tipos de Carvão Ativado 43
3.4.1.1. Carvão ativado em pó (CAP) 44
3.4.1.2 Carvão Ativado Granular (CAG) 44
3.4.2 Aplicação do Carvão Ativado na imobilização de enzimas 45
4 Procedimentos experimentais 48
4.1 Equipamentos 48
4.2 Materiais 48
4.2.1 Fonte da enzima tirosinase: extrato enzimático do macro fungo *Agaricus bisporus* 48
4.2.2 Carvão Ativado Granular 48
(a) Carvão Ativado Granular CARBOTRAT AP 48
(b) Carvão Ativado Granular CARBOMAFRA 119 49
(c) Carvão Ativado Granular Norit® 1240 50

4.3 Métodos 51
4.3.1 Método de extração da enzima tirosinase presente no fungo *Agaricus bisporus* 51
4.3.2 Determinação da Atividade Enzimática da tirosinase 52
4.3.3 Caracterização do Suporte Carbotrat AP 52
4.3.4 Método de imobilização enzimática por adsorção em carvão ativado granular 53
4.3.5 Influência da quantidade de suporte na imobilização 53
4.3.6 Influência do tempo de contato e velocidade de agitação na imobilização 53
4.3.7. Determinação da Concentração de Fenol 54
4.3.8 Determinação da Quantidade de proteína 55
4.3.9 Oxidação enzimática do fenol utilizando enzima imobilizada 56
4.3.10 Oxidação enzimática do fenol utilizando enzima livre 56
4.3.11 Adsorção do fenol utilizando Carvão Ativado Granular (CAG) 57
4.3.12 Determinação da remoção do fenol 57
4.3.13 Reutilização do Suporte 57
5 Resultados e Discussões 58
5.1 Atividade enzimática dos extratos brutos obtidos 58
5.2 Influência da agitação e tempo de contato para a imobilização 58
5.3 Influência da origem do Carvão Ativado Granular na imobilização 60
5.4 Influência da quantidade de suporte na imobilização 63
5.5 Caracterização do Suporte Carbotrat AP 64
5.6 Influência da concentração inicial de fenol na oxidação enzimática 66
5.7 Comparação entre a oxidação enzimática utilizando enzima livre e imobilizada e a adsorção por carvão ativado granular para a remoção de fenol 67
5.8 Reutilização da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular 75
5.9 Reutilização do suporte para a imobilização 78
6 Conclusões 81
7 Sugestões para futuros trabalhos 82
8 Bibliografia 83

1 Introdução

O Brasil vem passando por uma crise hídrica nas últimas décadas e uma das alternativas para combater a escassez de água é o tratamento de efluentes industriais visando não somente diminuir a descarga de poluentes nos corpos d'água como também o reuso do efluente tratado pelas indústrias, que no mundo são responsáveis pelo consumo de 22% da água dos mananciais (PENA, 2015).

O fenol e seus derivados são uns dos principais poluentes encontrados em efluentes, estando presentes em efluentes aquosos provenientes de diversas atividades industriais, como a indústria petroquímica, têxtil, de plásticos, de resinas,de celuloses e de papel, além de coquerias (BEKER *et al*., 2010; GUPTA; SUHA; MOHAN, 2006). Assim, torna-se necessária a criação de técnicas eficientes e baratas para o tratamento destes efluentes, haja vista a toxicidade dos compostos fenólicos, que em concentrações da ordem de ppm podem ser letais, a simples ingestão de 1g da substância pode ser letal, mesmo para seres humanos (GIRELLI, 2006).

No Brasil a legislação impõe baixos limites de concentração de fenol em efluentes industriais tratados. A Resolução CONAMA 430/2011 , de 30 de maio de 2011 (MMA, 2011), é bastante restritiva e limita o teor máximo de fenóis totais (substâncias que reagem com 4-amino-antipirina) em 0,5 ppm para lançamento em corpos de água doce.

Os métodos mais utilizados para a remoção de fenóis atualmente envolvem processos físicos, químicos ou bioquímicos, tais como o tratamento biológico, o tratamento com carvão ativado, os processos térmicos ou o arraste com ar (TOLEDO *et al*., 2003; MARTINEZ *et al*., 2003; ZHAO; LIU; SUN, 2004; MACIEL; SANT'ANNA JUNIOR; DEZOTTI, 2004; HOSSEINI; BORGHEI, 2005). Entretanto, apesar de eficazes, eles apresentam desvantagens, por exemplo, toxicidade aos microrganismos, a não regeneração do carvão ativado ou a eliminação de resíduos tóxicos no caso da extração do tipo líquido-líquido.

De modo geral, os métodos convencionais apresentam diversas limitações, aumentando o interesse pelo desenvolvimento de rotas mais eficientes e baratas, tal como a degradação de fenol e compostos fenólicos através do uso de enzimas, como as polifenol oxidases (PPO), entre elas a tirosinase e poliperoxidases.

Os tratamentos enzimáticos vêm sendo muito pesquisados como alternativa a alguns processos convencionais de tratamento de efluentes. Isso se deve a vantagens como seletividade e eficiência (mesmo em baixas concentrações) e ao desenvolvimento a nível de produção de enzimas, traduzido na sua disponibilidade comercial a baixo custo (KARAM e NICELL, 1997).

Uma forma de reduzir o custo da utilização de enzimas em processos industriais, maior limitação para sua utilização em larga escala, é a utilização das enzimas oriundas de extratos brutos, mais baratas que as enzimas comerciais, e a utilização da enzima imobilizada, que permite sua reutilização (YAMADA *et al.*, 2006).

O presente trabalho visa estudar a utilização da enzima tirosinase imobilizada, oriunda de um extrato enzimático bruto obtido a partir do cogumelo *Agaricus bisporus*, utilizando como suporte o carvão ativado granular na remoção de fenol de soluções aquosas, visando obter uma alternativa eficiente para a remoção de fenol de efluentes industriais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi estudar o emprego da enzima tirosinase, oriunda do *Agaricus bisporus*, imobilizada em carvão ativado granular para remoção de fenol em soluções aquosas.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar a influência de diferentes parâmetros (massa de suporte, agitação, tempo de contato e origem do carvão) para a imobilização da enzima tirosinase em carvão ativado granular.

- Avaliar a influencia da concentração inicial de fenol na eficiência de remoção.

- Comparar o processo de tratamento enzima/CAG com oxidação enzimática utilizando a enzima livre e com adsorção em Carvão Ativado Granular, utilizando dois carvões distintos.

- Estudar a reutilização da enzima tirosinase imobilizada em Carvão Ativado Granular

- Estudar a reutilização do Carvão Ativado Granular para a imobilização

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Fenol e seus Derivados

3.1.1 Características Gerais

O fenol é um composto orgânico da família dos alcoóis caracterizado pela presença de uma hidroxila (OH) ligada a um anel aromático (Figura 1), no seu estado puro e em condições ambientes é um sólido branco e incolor. O fenol é o composto mais simples dentre os vários compostos fenólicos, possui um odor característico, detectável na concentração de 40 ppb no ar e em cerca de 1-8 ppm na água (ATSDR,1998). O fenol é considerado um importante contaminante para o meio ambiente devido a sua alta toxicidade e por ser solúvel em água.

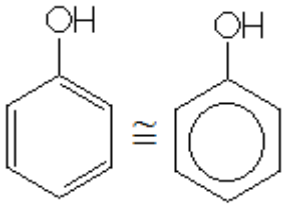

Figura 1: Forma Estrutural do fenol (Mello,2017)

Compostos fenólicos são derivados do fenol, apresentando, portanto, um ou mais grupos hidroxila (OH) ligados diretamente a um anel aromático. Os efluentes industriais podem apresentar mais de um tipo de poluente fenólico e, em geral, quanto maior a complexidade estrutural do composto, maior é a sua toxicidade, comparado com o fenol (MISHRA *et al.*, 1995; ZHOU; FANG, 1997; PHU *et al.*, 2001).

A toxicidade dos compostos fenólicos está associada a algumas características como a acidez, a formação de radicais, a posição do substituinte no anel aromático, o pKa do composto e, principalmente, a hidrofobicidade. A hidrofobicidade vai afetar a maneira como os compostos fenólicos vão interagir com células e estruturas de tecidos, por afetar a solubilidade do composto em água (HANSCH *et al.*, 2000; BOYD;KILLHAM; MEHARG,2001; ERTURK *et al.*,2012).

Os fenóis são considerados tóxicos pois destroem todos os tipos de células, dependendo da concentração de fenol das soluções e do tempo de contato podem causar de

uma irritação na pele até necrose e gangrena dos tecidos, isso porquê o fenol tem a capacidade de penetrar rapidamente na pele, causando lesões que podem ser fatais. A absorção sistêmica provoca danos ao fígado, rins e sistema nervoso central (PERUZZO e CANTO, 1998).

Os compostos fenólicos mais comuns são: fenol, cresol, clorofenol e nitrofenol, sendo encontrados em efluentes provenientes de diversas indústrias incluindo refinarias de petróleo, coquerias, indústrias de plásticos, de celulose, de papel, farmacêutica, de pesticidas e fertilizantes (BUSCA *et al.*,2008). A concentração de fenol presente nos efluentes varia para cada tipo de indústria como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 : Concentração de fenol presente no efluente (Adaptado de Aghav, 2011 e González-Muñoz *et al.*, 2003).

Indústrias	Concentração (mg/L)
Coqueria	4 – 160
Refinarias de óleo	10 – 185
Petroquímica	40 – 2000
Farmacêuticas, tintas, plásticos, resinas	0,1 – 1600

3.1.2 Tecnologias de remoção de fenol

As tecnologias de tratamento de efluentes que visam a remoção de fenol e seus derivados envolvem processos biológicos, químicos e físicos, todas apresentando vantagens e desvantagens (AHMARRUZAMAN, 2008). Dentre os processos convencionais utilizados na remoção de fenol em efluentes industriais pode-se destacar: o tratamento biológico, a incineração, os processos de extração, a adsorção com carvão ativado, os processos térmicos e a osmose inversa.

Também são empregados outros métodos, tais como a oxidação eletroquímica ou o uso de agentes oxidantes como permanganato de potássio, cloro, peróxido de hidrogênio ou ozônio e métodos envolvendo a utilização de enzimas capazes de degradar fenol e compostos fenólicos. Dentre estas técnicas, os processos utilizando enzimas têm se apresentado como promissores no tratamento de efluentes industriais, por serem catalisadores naturais altamente

específicos e mais resistentes que os microrganismos usados no tratamento biológico. (YAMADA *et al.*, 2006; KAMEDA; LANGONE;COELHO, 2006).

As tecnologias convencionais têm sido muito utilizadas no tratamento de águas residuais, embora apresentem algumas desvantagens. O processo biológico pode requerer muito tempo para os microrganismos degradarem os poluentes, além de não ser adequado ao tratamento de contaminantes muito tóxicos e produzir grandes quantidades de lodo. Por outro lado, a incineração é adequada para tratar efluentes com uma demanda química de oxigênio (DQO) acima de 100 g/L, exigindo elevada demanda de energia e apresenta considerável emissão de outros compostos tóxicos, tais como dioxinas e furano; além disso, do ponto de vista ecológico é um processo que pode disseminar poeira (DEBELLEFONTAINE *et al.*, 1995; KIM *et al.*,2011).

Os processos de extração líquido-líquido consistem nas etapas de extração e regeneração. Na extração, os compostos fenólicos são solubilizados e,posteriormente, o solvente é regenerado em fase aquosa de forma que o poluente seja eliminado (MESSIKH *et al.*, 2007). Este método, em geral, é utilizado em efluentes com concentrações superiores a 1000 mg/L de fenol (PALMA *et al.* 2007;BUSCA *et al.*, 2008). A principal desvantagem deste método é que muitos solventes orgânicos, empregados nesse processo são tóxicos e inflamáveis, o que gera prejuízos ao meio ambiente. Dessa forma, muitos estudos têm sido conduzidos visando a empregar solventes “verdes”, tais como os líquidos iônicos ao invés dos solventes usualmente empregados (ZHAO *et al.*, 2005).

As demais técnicas, tais como floculação, precipitação, osmose inversa e adsorção, requerem um pós-tratamento para eliminar os poluentes. Por outro lado, a adsorção do poluente em sólidos porosos, tais como carvão ativado, argilas e sólidos mesoporosos, são eficazes na remoção de compostos orgânicos, mas são processos em que o contaminante é apenas transferido da fase líquida para a fase sólida, necessitando de uma disposição final adequada. (AHMARRUZAMAN, 2008).

O tratamento enzimático consiste em uma etapa onde ocorre a oxidação enzimática para converter fenóis em quinonas e uma etapa onde ocorre a separação ou adsorção de produtos gerados pelas enzimas após a conversão (ERHAN *et al.*, 2002).

Na maioria dos processos de remoção enzimática, é utilizado somente a etapa de oxidação, sendo necessário a adição de aditivos químicos, agentes oxidantes ou protetores de enzimas a fim de evitar a perda de atividade enzimática. Neste caso, os produtos gerados pela

bioconversão dos compostos fenólico são removidos do efluente em etapas de tratamento posteriores (COOPER e NICELL 1996, IKEHATA e BUCHANAN 2002).

O tratamento enzimático para a remoção de fenol de efluentes é realizado utilizando polifenóis oxidases (PPO) comerciais, na forma livre ou imobilizada, sendo que a forma imobilizada apresenta uma maior eficiência em relação à livre em termos de reutilização, estabilidade e maior viabilidade (KAMEDA *et al.*, 2006, BEVILAQUA *et al.*, 2002; LÓPEZ-MOLINA *et al.*, 2003).

A remoção enzimática de fenóis tem várias vantagens potenciais em relação aos métodos convencionais, tais como, a enorme disponibilidade de enzimas na natureza, a especificidade de substrato mais larga, a eficácia numa vasta gama de pH e temperatura, a falta de período de aclimatização, ausência de problemas relacionados a choques de carga ou efeitos tóxicos de produtos inesperados devido à sua elevada especificidade (KLIBANOV *et al.*, 1983; KARAM e NICELL 1997; GOIA *et al.*, 2004).

No entanto, a principal desvantagem deste método é que requer grande quantidade da enzima para alcançar uma elevada eficiência de remoção devido à inativação da enzima, o que limita a sua aplicabilidade industrial (WU *et al.*, 1993). Várias técnicas baseadas em PPO foram desenvolvidas para a remoção de fenóis contidos em efluentes industriais, mas o alto custo relacionado resulta em aplicações limitadas (LONCAR *et al.* 2011). O uso de extratos brutos enzimáticos e a imobilização de enzimas em suportes de baixo custo fazem com que este método se torne menos caro, tornando-o uma alternativa viável para os métodos convencionais.

3.1.3 Legislação Brasileira

No Brasil a legislação impõe baixos limites de concentração de fenol em efluentes industriais tratados. A Resolução CONAMA nº 430, de 13/05/2011 é a mais recente e é bem restritiva e limita o teor máximo de fenóis totais (substâncias que reagem com 4-amino - antipirina), em 0,5 ppm para lançamento em corpos de água doce (Tabela 2). Esta resolução segue o procedimento reportado em Métodos Padrão para Exame de Águas e Rejeitos (*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater).*

Tabela 2: Parâmetros orgânicos para descarte de efluentes em corpos hídricos estabelecidos pela Resolução CONAMA 430/2011 (MMA, 2011).

Parâmetros	Valor máximo	Unidade
Parâmetros Orgânicos		
Benzeno	1,2	mg/L
Clorofórmio	1	mg/L
Dicloroetano	1	mg/L
Estireno	0,07	mg/L
Etilbenzeno	0,84	mg/L
Fenóis Totais	0,5	mg/L
Tetracloreto de carbono	1	mg/L
Tricloroeteno	1	mg/L
Tolueno	1,2	mg/L
Xileno	1,6	mg/L

3.2 Enzima Tirosinase

3.2.1 Características Gerais

A enzima tirosinase (EC 1.14.18.1), também conhecida como creolase e catecolase, pertence a família das polifenóis oxidase, da qual também faz parte a lacase, e pode ser utilizada numa faixa de pH entre 5,0-8,0 (SILVA, 2011). As polifenóis oxidases são enzimas capazes de catalisar a oxidação de compostos fenólicos, na presença de oxigênio molecular (FENOLL *et al.*,2001).

A tirosinase é amplamente encontrada na natureza, estando presente em microrganismos, animais e plantas (DECKER *et al.*, 2006), sendo responsável pelos fenômenos de pigmentação em mamíferos e pelo escurecimento de frutas e vegetais, devido ao fato de catalisar a oxidação da L-tirosina, formando a dopaquinona que sofre polimeralização na presença de diferentes nucleófilos dando origem a melanina (FARIA *et al.*,2007).

Estudos apontam que, independente da fonte, as tirosinases mantém suas características funcionais e apresentam estruturas semelhantes (SEO *et al.*,2003; VIEIRS *et al.*,2003; KOCHNA *et al.*,2008). A enzima é um composto tetrâmero, com um peso

molecular de 110-120 kDa e com dois sítios ativos por molécula. Cada sítio ativo apresenta dois átomos de cobre coordenados com histidinas, como pode ser observado na Figura 2.

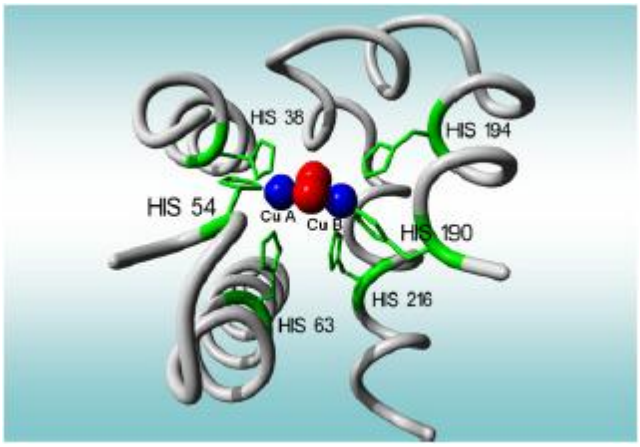

Figura 2: Estrutura do sítio ativo da tirosinase (Rolff *et al.*,2011)

Devido ao fato de apresentar dois tipos de atividade catalítica (monofenolase e oxidase) e pela reação com monofenóis apresentar uma fase lag, o mecanismo cinético da tirosinase é considerado complicado (SILVA, 2011). A conversão do monofenol em sua o-quinona correspondente se dá em duas etapas consecutivas, sendo a primeira a hidroxilação do monofenol ao seu o-difenol correspondente (atividade difenolase ou oxidase) e a segunda, a oxidação do o-difenol formando sua correspondente o-quinona enquanto a enzima é oxidada de volta a sua forma nativa pelo oxigênio molecular (MARKO-VARG *et al.*, 1995; ORTEGA *et al.*, 1993). A Figura 3 apresenta um esquema simplificado dessas duas etapas.

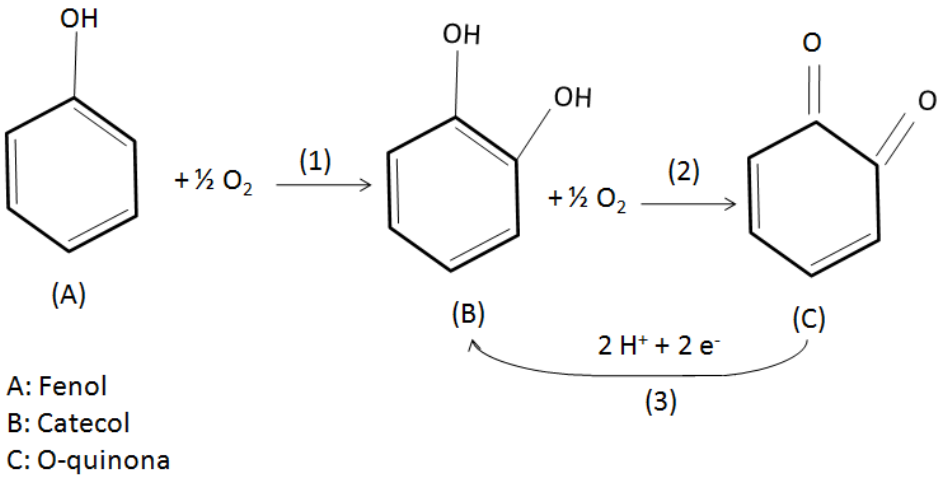

Figura 3: Etapas da conversão do fenol a o-quinona. Etapa (1) representa a atividade catalítica monofenolase e Etapa (2) representa a atividade catalítica difenolase ou oxidase. (Adaptado de ZHANG *et al.*, 2001)

A etapa de conversão do fenol em o-difenol é irreversível devido ao forte poder oxidante do oxigênio, esta etapa apresenta uma fase de adaptação, fase lag, antes de atingir a velocidade máxima de reação, esta fase é influenciada por fatores como fonte da enzima, pH, concentração de substrato e concentração de enzima. A presença de quantidades catalíticas de difenóis ou íons metálicos de transição (principalmente Fe^{+2}, mas também Cd^{+2}, Ni^{+2}, Co^{+2} e Zn^{+2}) pode acabar com esta fase lag (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995).

A Figura 4 mostra a dependência do cobre, por parte da enzima, e os diferentes níveis de oxidação (met, oxi, deoxi), que a tirosinase apresenta, de acordo com o número de oxidação do cobre. Estas variações ocorrem durante a segunda fase de reação de oxidação do fenol, Etapa 2 da Figura 3.

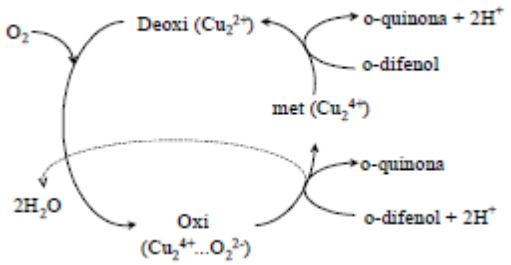

Figura 4: Ciclo Catalítico da Tirosinase (CHAVITA, 2010).

Em preparações frescas de tirosinase de cogumelo predomina a forma $Tirosinase_{met}$, um estado catalítico inativo, enquanto que a forma $Tirosinase_{oxi}$, estado catalítico ativo, existe apenas em pequenas proporções, no estado latente, podendo a tirosinase apresentar até 30% da forma $Tirosinase_{oxi}$.

O uso desta enzima em relação às Polifenol Peroxidases resulta em economia devido ao alto custo das peroxidases além do que, as polifenol oxidases não necessitam de peróxido de hidrogênio como substrato, elas utilizam o oxigênio molecular. O mais interessante quanto às reações envolvendo a tirosinase é o surgimento de oligômeros, que são semelhantes às melaninas, e por isso, conferem coloração marrom à amostra, sendo assim possível quantificar em tempo real a degradação dos compostos fenólicos.

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

3.2.2 Aplicação da enzima tirosinase para a remoção de compostos fenólicos

Os primeiros estudos sobre a enzima tirosinase foram publicados no final da década de 70 e tinham como objetivo entender o mecanismo de escurecimento enzimático de cogumelos, vegetais e frutas, na presença de ar, e evitá-lo afim de não reduzir o valor desses produtos. Porém já na década de 80 o foco de estudo dessa enzima se voltou para seu uso em aplicações biotecnológicas e ambientais, sendo os pioneiros ATLOW *et al.* (1984), que estudaram a utilização da tirosinase na oxidação de fenóis (CHAVITA, 2010).

As principais aplicações da tirosinase são o seu uso na biossíntese de L-DOPA; a detecção e a quantificação de compostos fenólicos em águas, onde é utilizado como o biocomponente de biossensores; a formação de redes de proteínas ligadas (cross-linked proteína) e a remoção de compostos fenólicos de efluentes industriais (FARIA, 2008).

Um dos primeiros estudos sobre a utilização da tirosinase para a degradação de fenóis via oxidação enzimática foi realizado por Atlow *et al.* (1984), onde os autores estudaram a influência do pH e da concentração enzimática da enzima pura e bruta, extraída do cogumelo

Agaricus bisporus, na oxidação de soluções fenólicas com concentrações variando de 10 a 100 ppm. Eles relataram uma eficiência de remoção próxima a 100% utilizando pH básico e concentração de enzima por volta de 50U/mL. Neste estudo os autores verificaram que o extrato bruto apresentou uma maior eficiência quando comparado com a enzima pura.

Wada *et al.* (1994) estudaram a remoção de fenóis e de aminas aromáticas de efluentes através da oxidação enzimática com tirosinase livre com e sem a presença de coagulantes (poli(hexametileno-diamina-epicloridrina), polietilenoimina e quitosana) para a remoção dos produtos da oxidação dos fenóis, os quais conferem cor ao efluente e inativam a enzima. Os autores concluíram que a quitosana atua melhor como coagulante do que adsorvente dos fenóis oxidados e que os demais coagulantes foram mais efetivos que a quitosana, por apresentarem a mesma eficiência com concentrações menores. Também testaram a tirosinase imobilizada em resina trocadora catiônica e magnetita e confirmaram a maior estabilidade da enzima imobilizada.

Edwards *et al.* (1999) estudaram o uso da enzima tirosinase comercial imobilizada em uma membrana polimérica coberta com quitosana em um biorreator para oxidar uma faixa de fenóis presentes em efluentes sintéticos e reais. A eficiência de remoção foi alta até mesmo para concentrações baixas de fenol e a quitosana adsorveu as o-quinonas geradas durante reação, ajudando a diminuir a inativação da enzima.

Nicell e Ikehata (2000) estudaram a utilização de tirosinase extraída de cogumelos como alternativa ao uso das peroxidases para redução de fenol aquoso. Eles estudaram o melhor pH para a reação e a utilização de adsorventes como a quitosana e o polietileno glicol como uma forma de diminuir a inativação da enzima, que ocorre com o aumento da concentração da o-quinona no sistema.

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

Bevilaqua *et al.* (2002), estudaram a utilização da tirosinase como um pré-tratamento para redução de carga de choque em sistemas microbiológicos aeróbicos de tratamento de efluentes fenólicos. Foi estudada também a aplicação das enzimas como polimento a efluente tratado em sistemas biológicos, a redução das cargas de fenol foi alta, porém como a concentração de fenol que no sistema biológico eram altas, a eficiência deste foi baixa, não atingindo os limites exigidos pela legislação.

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

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

Ensucho *et al.* (2005) utilizaram a tirosinase presente no Agaricus bisporus imobilizada em um suporte de quitosana-alginato, em biorreatores em escala de bancada e piloto, com borbulhamento de ar pelo sistema. Conseguiram uma remoção acima de 92% de fenol na escala de bancada e de 60% no reator em escala piloto.

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

Girelli, Mattei e Messina (2006), estudaram a remoção de fenol, catecol, 4 – metilcatecol, cresol e Cl – fenol em sistemas com tirosinase imobilizada em amino propil e utilizando quitosana como adsorvente da o – quinona para a redução da cor do efluente tratado. O processo foi desenvolvido de forma contínua, realizando o reciclo da água no

sistema com enzimas e posteriormente com quitosana. Foi estudado o comportamento da atividade enzimática em relação à redução do substrato.

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

Chavita (2010) estudou processos biotecnológicos para a remoção de fenol de soluções aquosas em regime de batelada em 3 processos distintos, adsorção de fenóis de soluções aquosas em Quitosana, degradação enzimática de fenóis através da tirosinase comercial em meio aquoso e adsorção/degradação de fenóis de soluções aquosas em quitosana contendo tirosinase comercial imobilizada.

Para isso, Chavita estudou a influência de variáveis como temperatura, pH, concentração de quitosana e velocidade de agitação. O autor concluiu que apesar de eficiente, o custo da tirosinase pura é muito alto para sua utilização no tratamento de efluentes e a eficiência de oxidação do fenol reduziu rapidamente com as reutilizações, porém a concentração total de fenol removido das soluções chegou a ser quase 3 vezes maior do que o que foi removido utilizando as enzimas livres.

Pigatto (2013) avaliou a oxidação e destruição do fenol através da utilização da enzima tirosinase extraída de batatas (das variedades Ágata e Galette di Bologna), maçã, kiwi, banana e cogumelo, mas apenas o último mostrou uma atividade bastante considerável para a utilização na oxidação enzimática As melhores condições da oxidação do fenol encontradas por essa autora com a enzima contida no extrato de cogumelo foram: 30°C, pH 7, concentração de enzima 328U/mL e de fenol 100mg/L.

3.2.3 Fonte da enzima tirosinase: *Agaricus bisporus*

Dentre as várias fontes possíveis para a enzima tirosinase, se destaca o macro fungo *Agaricus bisporus*, comumente conhecido como Champignon de Paris, principalmente pelo fato de apresentar a maior concentração de tirosinase em relação às outras fontes e por ser uma fonte barata de tirosinase (FARIA, 2008; SILVA, 2009; CHAVITA, 2010)

O Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) é uma das espécies de cogumelos mais extensivamente cultivada no mundo sendo a primeira a ser cultivada no Brasil, pertence a família *Agaricaceae* e constitui um alimento com excelente valor nutritivo devido aos elevados teores de proteínas, vitaminas e fibras e baixos teores de carboidratos e gorduras (FURLANI e GODOY, 2005).

3.3 Imobilização de enzimas

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante para o uso industrial de enzimas por proporcionar que a mesma seja reutilizada, pela maior facilidade da sua separação do produto final e por aumentar a sua estabilidade frente a solventes orgânicos (BRADY, D.; JORDAAN, 2009).

O estudo sobre tecnologias de imobilização enzimáticas despontou no início da década de 1960 com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos (KRAJEWSKA,2004). Desde então esses biocatalisadores têm sido empregados em diversos segmentos, como na síntese de compostos bioativos e de novos biopolímeros, construção de biossensores, em terapia enzimática, em processos em indústrias tradicionais como óleos e gorduras, curtumes, papel, celulose, têxtil, cosméticos e em processos utilizados em tratamento de efluentes (MENDES *et al.*, 2011).

Apesar da imobilização de enzima ter um longo histórico de utilização, (STRAATHOF; PANKE;SCHMID, 2002) estima-se que apenas 20% dos processos biocatalíticos envolvem enzimas imobilizadas. No entanto, ao longo dos últimos anos um número interessante de novas metodologias de imobilização enzimática tem sido relatado na literatura e nos pedidos de patentes, indicando que a imobilização de enzimas está em evidência (BRADY; JORDAAN, 2009).

A imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a sua imobilização em um suporte pode resultar em melhorias do seu desempenho catalítico, e, reduzir a sua inativação por distorção de sua estrutura nativa pela influência da temperatura, do pH e de solventes orgânicos, o que se torna um grande atrativo para a aplicação de enzimas no setor industrial (BRADY; JORDAAN, 2009; MENDES, *et al.*, 2011).

As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas livres são: reutilização do biocatalisador; retenção da atividade catalítica por um maior período de tempo; possibilidade de conduzir processos em modo contínuo; facilidade de separação do catalisador do produto da reação e a interrupção da reação quando se atinge um determinado grau de conversão (BRADY, D.; JORDAAN,2009; MENDES *et al.*, 2011).

Entretanto, é necessário, durante o processo de imobilização, atentar para questões como: mudanças conformacionais da estrutura da enzima que levem a sua imobilização em uma forma inativa; perda da atividade catalítica e perdas mássicas de enzima por meio da lixiviação; efeitos difusionais ou de transferência de massa, em decorrência de limitações do acesso do substrato à enzima e do produto para o seio da solução; o custo da imobilização deve ser compensado pela vida útil do biocatalisador (MATEO *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2011).

Os principais métodos de imobilização de enzimas são reticulação, ligação covalente, confinamento, encapsulamento e adsorção (Figura 5). Suas principais características e os recentes avanços nessas técnicas serão relatados a seguir.

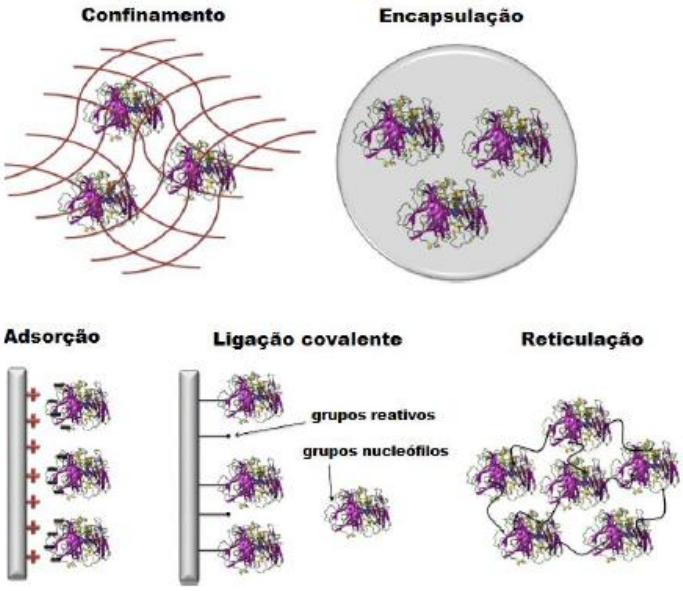

Figura 5: Métodos de imobilização de enzimas. (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012)

3.3.1 Confinamento

O método de imobilização de enzimas por confinamento consiste na polimerização *in situ* da matriz porosa em torno das enzimas a serem imobilizadas. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. Na medida em que a polimerização prossegue, a matriz polimérica vai se formando em torno da enzima, confinando-a dentro de sua estrutura. Esse método é atraente para a imobilização de enzimas pelo processo sol-gel, visto que o mesmo ocorre em meio aquoso, o que permite a manutenção da atividade catalítica das enzimas confinadas na matriz de sol-gel, sem que sofram uma desnaturação significativa (KATO *et al.*, 2002; HODGSON *et al.*, 2004; HAGE e RUHN, 2005).

O processo de sol-gel é um processo de síntese de materiais no qual ocorre uma transição do sistema sol para um sistema gel. O termo sol é definido como uma dispersão de partículas coloidais em um fluido, enquanto o termo gel pode ser empregado para definir um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que retém, normalmente, a fase líquida nos seus interstícios. Desse modo, os géis coloidais resultam da agregação de partículas coloidais, devido a uma adequada alteração das condições físico-químicas da suspensão, enquanto que os géis poliméricos são, geralmente, preparados a partir de soluções onde se promovem reações de polimerização, em que a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

De modo simplificado, o processo global de imobilização de enzimas por confinamento por meio do processo sol-gel pode ser visualizado na Figura 6 a seguir.

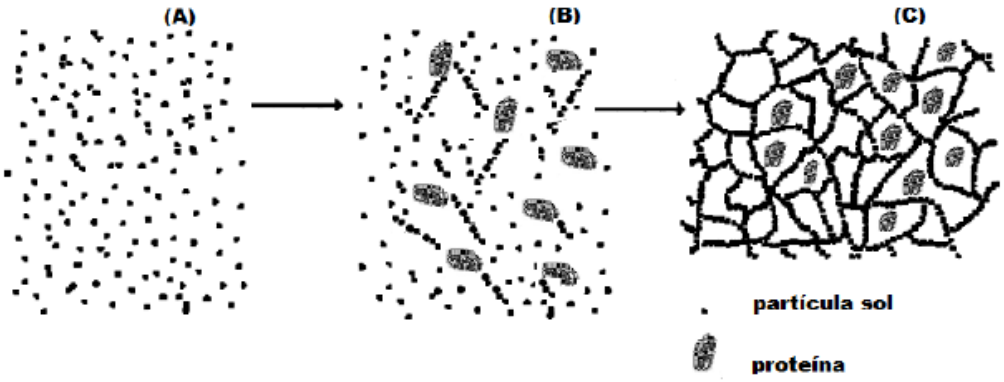

Figura 6: Procedimento para o confinamento de enzimas durante o processo sol-gel, incluindo (a) formação de partículas de sol durante a hidrólise e condensação, adição (b) da enzima na suspensão contendo as partículas sol, e (c) agregação de partículas coloidais em torno das moléculas de enzima. (MALLIK e HAGE, 2006).

As principais vantagens do método de imobilização por confinamento são: facilidade de execução; poder ser utilizado para imobilizar uma ampla gama de enzimas, uma vez que não promove alterações estruturais da enzima; o confinamento protege a enzima do contato direto do meio reacional, minimizando a possibilidade de desnaturação da enzima por fatores externos (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; SHELDON e ROGER, 2007; BRADY e JORDAAN, 2009).

As desvantagens desse método estão associadas as dificuldades com: o controle do tamanho de poro do suporte, devido à retração do sol-gel com o tempo; o encolhimento do gel durante o processo de condensação e de secagem, que pode levar à desnaturação das enzimas; além da lixiviação da enzima devido aos diferentes tamanhos de poros; limitações de transferência de massa e difusão dos substratos através da matriz (VILLENEUVE *et al.*, 2000; KATO *et al.*, 2002; DALLAVECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; HODGSON *et al.*, 2004;; ALFAYA; KUBOTA, 2002; BRADY e JORDAAN, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

3.3.2 Ligação Covalente

A imobilização por ligação covalente consiste na fixação da enzima ao suporte através de ligações covalentes. A força desta ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima proporcionando uma grande rigidez na estrutura da mesma. Essa rigidez pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor,

solventes orgânicos, pH extremos e outros (MATEO *et al.*, 2007; MACARIO *et al.*, 2009; MILETIĆ *et al.*, 2009).

Este método, em geral, se inicia com a modificação da superfície do suporte por meio de reações de ativação, na qual os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012). O reagente mais utilizado na ativação de suportes e/ou como braço espaçador é o glutaraldeído devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis (MATEO *et al.*, 2007; CHAUBEY *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2012).

O número de ligações covalentes entre o suporte e a enzima depende da densidade dos grupos reativos por unidade de área do suporte, da reatividade dos grupos funcionais tanto da enzima quanto do suporte e do estado de protonação dos mesmos, bem como da especificidade dos grupos ativos do suporte (BRADY e JORDAAN, 2009; ERDEMIR e YILMAZ, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN e MOLDES, 2012).

Este método de imobilização se torna aplicável em muitas situações devido a diversidade de suportes com grupos funcionais capazes de promover ligações covalentes, ou suscetíveis à ativação, porém a escolha de condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de imobilização.

As principais vantagens desse método são a maior resistência da enzima quanto à variação de pH e temperatura, frente a solventes orgânicos; os derivados preparados também podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, após a etapa de imobilização, a enzima não corre o risco de ser lixiviada (MATEO *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012).

Entre as desvantagens da imobilização da enzima por ligação covalente pode-se citar inconvenientes relacionados à desativação parcial e/ou a redução da atividade catalítica da enzima que se deve às restrições conformacionais devido a ligação entre os grupos reativos do suporte e as enzimas (ERDEMIR; YILMAZ, 2009).

Ainda pode ocorrer da região do sítio ativo da enzima se tornar menos acessível durante o processo de interação, ocasionando um impedimento estérico (Mateo *et al.*, 2007), ou então, a ativação da enzima pode ser prejudicada devido a uma forte fixação da enzima ao

suporte, em especial se ela tiver comformações distintas quando ativa e inativa (MATEO *et al.*, 2007; MACARIO *et al.*, 2009).

Entre os métodos de imobilização disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas (PEDROCHE *et al.*, 2007; MANRICH *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2011). Essa estabilização é devida à formação de ligações covalentes entres os grupos amina primário das enzimas e os grupos aldeídos do suporte ou entre outros grupos funcionais da enzima e do suporte. Tais ligações aumentam a rigidez da enzima imobilizada, por induzir uma elevada resistência frente a modificações conformacionais causadas pelo aquecimento, solventes orgânicos ou agentes desnaturantes, entre outros (ERDEMIR; YILMAZ, 2009). O aumento da estabilidade das enzimas, não obstante, é ainda umas das principais questões que dificultam a implementação das enzimas como biocatalisadores industriais (LÓPEZGALLEGO *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2011).

3.3.3 Reticulação

A primeira metodologia de imobilização de enzimas via reticulação foi desenvolvida na década de 60, a partir da reação do glutaraldeído com grupos NH_2 reativos na superfície de uma proteína (DOSCHER e RICHARDS, 1963). No entanto, esse método de produção de enzimas reticuladas (CLEs) apresentava inconvenientes como baixa retenção da atividade catalítica, reprodutibilidade e estabilidade mecânica, além da dificuldade do manuseio dos CLEs, uma vez que esses apresentavam um aspecto gelatinoso (SHELDON; SCHOEVAART;VAN LANGEN, 2005).

A primeira descrição da técnica de reticulação de enzimas foi feita por Quiocho e Richards em 1964, e teve como objetivo estabilizar cristais de enzimas para estudo de difração de raio X. Par isso foi empregado um agente bifuncional como o glutaraldeído, sendo observado a formação de cristais de enzimas insolúveis com um atividade catalítica residual de 30 a 70 % em comparação com cristais de enzimas nativas (QUIOCHO; RICHARDS, 1964; SHELDON, R. A.;SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005.

Desde então tem sido realizados diversos estudos tendo em vista a imobilização de enzimas livre de suportes. Em geral, a imobilização é feita a partir da reação de reticulação entre um reagente reticulante e diferentes preparações enzimáticas, tais como a enzima

solubilizada (MANECKE, 1972), cristalizada (ABRAHAM *et al.*, 2004; ROY;ABRAHAM, 2006), atomizada (AMOTZ, 1987) e agregada (GUPTA, P. *et al.*, 2009; CRUZ *et al.*, 2012), que ao final da reticulação resultará na formação de reticulados de enzimas solubilizadas, cristais de enzima reticulados, enzimas atomizadas reticuladas (CSDE) e agregados enzimáticos reticulados, respectivamente (Figura 7).

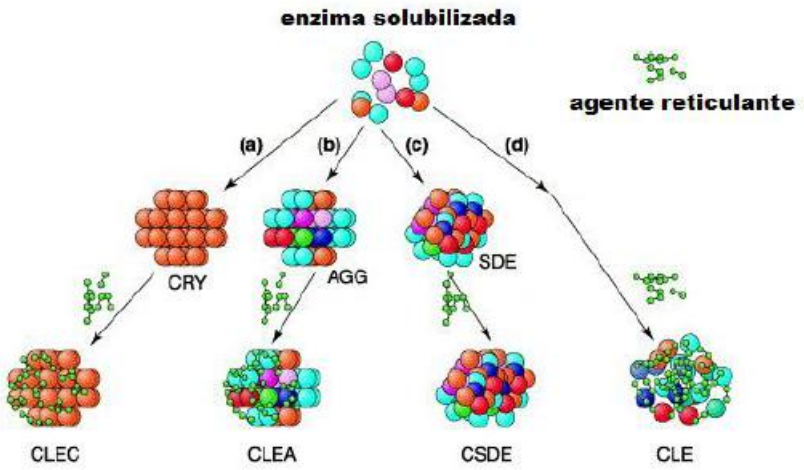

Figura 7: Diferentes abordagens para a obtenção de enzimas imobilizadas livre de suporte: (a) cristalização, (b) agregação; (c) secagem por atomização; (d) reticulação direta. CRY: cristais de enzima; AGG: agregados enzimáticos; SDE: enzima atomizada. CLEC:cristais de enzima reticulados; CLEA: agregados enzimáticos reticulados; CSDE: enzimas atomizadas reticuladas; CLE: enzimas solubilizadas reticuladas. Fonte: (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003).

A técnica de reticulação oferece vantagens como atividade enzimática altamente concentrada no catalisador, alta estabilidade e baixos custos de produção decorrente da exclusão de um suporte (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003;SHELDON, R. A.; SCHOEVAART; VAN LANGEN, 2005).

3.3.4 Encapsulamento

Este método consiste na formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a em uma estrutura tridimensional, ou a retenção do biocatalisador por uma membrana porosa. Em ambos os casos, a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Consequentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzima

imobilizada. Este método inclui a encapsulação em gel e em fibras e a micro-encapsulação (Rosevear *et al.*, 1987).

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em "confinar" uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma micro cápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão,embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem (Dalla-Vechia *et al.*, 2004).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência.

As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador. Outra grande vantagem na utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, como citado anteriormente, a desnaturação.

Esta técnica, entretanto, não é uma das técnicas mais utilizadas devido a baixa velocidade de difusão de substratos e produtos através da membrana. Além da restrição no peso molecular das moléculas que conseguem atravessar este material e ainda devido a possibilidade de haver incorporação da enzima na parede da membrana (Dalla-Vechia *et al.*, 2004,Mariotti, 2000).

3.3.5 Adsorção

A adsorção é um método simples e muito empregado para imobilização de enzimas. Nesse método, as enzimas são imobilizadas no suporte por meio de ligações de baixa energia, tais como interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (ZHENG *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2012).

As principais vantagens da imobilização por adsorção são seu baixo custo e a facilidade e simplicidade do seu processo. Além disso, a adsorção promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável (ZHOU *et al.*,2012).

Entre as desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e possibilidade de dessorção e lixiviação da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica. (GUIDINI *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011)

Entretanto, tem sido alvo de estudos diversas técnicas a fim de reduzir a lixiviação da enzima como por exemplo, a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros (HE *et al.*, 2006; REIS; WITULA, HOLMBERG, 2008). Alguns desses estudos sugerem que a hidrofobização do suporte pode resultar na redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática (SERRA *et al.*, 2008).

A eficiência do método de imobilização da enzima por adsorção está relacionada com o suporte empregando para tal fim. Nesse sentido, diversos suportes podem ser utilizados e a escolha de um deles depende de suas propriedades como porosidade e tamanho dos poros, área superficial, resistência mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção da enzima e custo (Moldes, 2012).

Os materiais que mais se destacam, nos últimos anos, para a utilização como suportes para adsorção de enzimas, são os materiais mesoporosos devido a características desejáveis como: tamanhos de poros uniformes, elevada área superficial e facilidade de funcionalização, o que permite proporcionar estabilidade química e térmica à enzima imobilizada. Outra vantagem do uso de suportes mesoporosos é que as enzimas podem ser adsorvidas tanto na superfície externa quanto no interior dos poros do suporte (QUIRÓS; GARCÍA; MONTESMORÁN, 2011; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2012; ZHOU *et al.*, 2012).

Uma técnica de adsorção comumente utilizada para a imobilização de enzimas é a troca iônica, que ocorre a partir das interações iônicas e eletrostáticas entre os grupos iônicos da proteína e os íons com cargas opostas do suporte (MOLDES, 2012; ZHENG *et al.*, 2012). A adsorção das enzimas por troca iônica mais eficiente são quando as forças eletrostáticas são maximizadas. Para isso, a enzima e o suporte devem apresentar cargas líquidas opostas, ou

seja, o pH do meio de mobilização deverá estar abaixo do ponto isoelétrico (pI) da enzima e acima do pI do material que constitui o suporte e vice-versa.

A principal desvantagem do uso da adsorção por troca iônica é que, se houver alterações no pH do meio ou na força iônica durante uma reação, as enzimas se desprendem do suporte. Um modo de contornar isso é a adição de um agente bifuncional para se reticular com a enzima adsorvida, servindo como proteção para a mesma (FILHO *et al.*, 2008; GUIDINI *et al.*, 2010).

3.3.6 Suportes para imobilização

A maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada é dada pelo suporte e, apesar de existirem inúmeros materiais que podem ser aplicados na imobilização de enzimas, a sua escolha dependerá, essencialmente, das características peculiares da enzima e das condições de uso da biomolécula imobilizada (MILETIĆ *et al.*, 2009).

De modo geral, os requisitos básicos para um material ser considerado um suporte adequado são: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânicas, boas condições operacionais, capacidade de regeneração, custo, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes na superfície dos mesmos, dentre outras (MATEO *et al.*, 2007;MENDES *et al.*, 2011; TALBERT; GODDARD, 2012).

De acordo com a sua origem, os suportes podem ser classificados como materiais orgânicos e inorgânicos. Quanto à sua morfologia, esses podem ser porosos, não porosos e de estrutura de gel (MATEO *et al.*, 2007; MENDES, *et al.*, 2011).

Os suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com o substrato. No entanto, a pequena área superficial exibida por estes suportes é sua mais notória desvantagem (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MATEO *et al.*,2007; MENDES *et al.*, 2011).

Os materiais porosos apresentam como principal vantagem sua elevada área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas. Contudo, é importante ter atenção para o diâmetro dos poros do suporte, de modo que esses sejam suficientemente

grandes para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (DALLA-VECCHIA;NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Como inconveniente do uso dos suportes porosos, tem-se possíveis problemas relacionados a limitações difusionais, uma vez que o substrato além de se difundir do seio da solução para a superfície externa, deverá difundir-se também para o interior dos poros do suporte, no qual grande parte das moléculas do catalisador estão situadas. Todavia, a localização das enzimas no interior dos poros, também lhes conferem uma proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO;SOLDI, 2004; MATEO *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2011).

Dentre os diferentes suportes que podem ser empregados na imobilização de enzimas, este trabalho irá destacar o Carvão Ativado Granular (CAG), suporte poroso, muito utilizado para a adsorção de poluentes, incluindo o fenol, e largamente utilizado no tratamento de água e efluentes.

3.4 Carvão Ativado

Carvão Ativado pode ser definido como "uma ampla faixa de materiais a base de carbono amorfo preparados de tal forma que exibem um alto grau de porosidade e uma extensa área superficial" (ÇEÇEN e AKTAŞ, 2012). Grande parte dos carvões ativados é produzida a partir de matérias-prima contendo carbono, tais como cascas de nozes, madeira, carvão vegetal, lodos de esgoto sanitário e resíduos de petróleo. As impurezas não carbonáceas presentes na matéria-prima são removidas e a sua superfície sofre oxidação térmica durante o processo de ativação.

O processo de obtenção do carvão ativado ocorre em duas etapas básicas: a carbonização pela pirólise do precursor e a ativação propriamente dita (CLAUDINO, 2003). A carbonização consiste na pirólise (tratamento térmico) da matéria-prima, em atmosfera inerte, a uma temperatura superior a 200ºC, podendo chegar até 700-800 ºC. Nesta etapa são removidos componentes voláteis e gases leves (CO, H_2, CO_2, CH_4), gerando uma massa de carbono fixo e uma estrutura porosa primária, favorecendo a etapa de ativação. O produto da etapa de pirólise em geral apresenta uma pequena capacidade de adsorção, pois seus interstícios livres são ocupados ou parcialmente bloqueados com carbono desorganizado ou

outros produtos da decomposição (RODRIGUES-REINOSO E SABIO-MOLINA, 1998; WIGMANS, 1989).

A etapa de ativação consiste em submeter o material carbonizado a reações secundárias visando obter o aumento da área superficial. É nesta etapa que ocorre o aumento da porosidade do carvão sendo por isso considerada a etapa fundamental. Durante este processo é desejável um controle das características básicas do material (distribuição de poros, área superficial especifica, atividade química da superfície, resistência mecânica, etc.) de acordo com a configuração requerida para uma aplicação específica (SOARES, 2001).

Existem dois tipos de ativação, a ativação química e a ativação física. A ativação química envolve a impregnação de agentes como ácido fosfórico, hidróxido de potássio e cloreto de zinco, geralmente sobre o material carbonizado e, em seguida, a remoção destes agentes, por extração (reação com ácidos, no caso do $ZnCl_2$, e neutralização, no caso do H_3PO_4) ou por outro meio, o que expõe a estrutura porosa do carvão ativado (NASRIN *et al.*, 2000). Já a ativação física consiste na exposição do material carbonizado à gases oxidantes como vapor d'água, dióxido de carbono, ar ou qualquer mistura desses gases, em uma faixa de temperatura entre 800 ºC e 1.100 ºC. O carbono desorganizado contido no material carbonizado é o primeiro a reagir com os gases do processo de ativação, expondo a superfície dos cristalitos elementares a ação dos gases, criando uma estrutura porosa nas partículas de carvão (TCHOBANOGLOUS, BURTON E STENSEL, 2004).

O processo de ativação cria, dentro de cada partícula de carvão, poros seletivamente dimensionados, que proporcionam a área superficial interna onde a adsorção ocorre. Os tamanhos de poros resultantes são definidos como: Macroporos> 25 nm, Mesoporos> 1 nm e < 25 nm e Microporos< 1 nm.

As propriedades adsorventes e as propriedades químicas derivam da estrutura e da composição do carvão ativado. As propriedades adsorventes se devem principalmente a alta superfície interna do carvão ativado, onde as moléculas de gás e soluto se movem desde o fluido até o interior da partícula, e se unem na superfície do carvão principalmente por forças de dispersão. De forma que a concentração do gás e do soluto na interface e mais alta do que a do fluido.

Sua alta capacidade de adsorção está associada principalmente com a distribuição do tamanho dos poros, área superficial e volume de poros (SOARES, 1998). Este material é

utilizado com freqüência em processos de purificação, desodorização, descoloração, desintoxicação e separação.

A adsorção em carvão ativado é um processo bem conhecido para eliminação de contaminantes orgânicos de efluentes líquidos, incluindo águas residuárias coloridas das industrias têxteis e efluentes de indústrias químicas e petroquímicas. A adsorção de compostos orgânicos de soluções aquosas sobre carvão ativado é resultado das propriedades hidrofóbicas do adsorvente e /ou alta afinidade dos compostos orgânicos pelo adsorvente (CHANG *et al.*, 1981).

Durante o seu uso, o carvão torna-se gradativamente saturado com as espécies adsorvidas (adsorbatos), de tal forma que vai perdendo sua capacidade adsortiva. Isto ocorre quando a partícula de carvão estiver em equilíbrio com a solução circundante, ou seja, quando todos os sítios disponíveis estiverem ocupados. A aplicação econômica do carvão ativado depende de uma maneira eficiente de regeneração e reativação do carvão após a saturação ser atingida. O método mais comum para a restauração de capacidade é a regeneração térmica ou reativação (TCHOBANOGLOUS, BURTON e STENSEL, 2004).

3.4.1 Tipos de Carvão Ativado

O carvão ativado pode apresentar-se como carvão ativado em pó (CAP), carvão ativado granular (CAG) ou carvão ativado pelotizado, sendo este último pouco utilizado em tratamento de águas e efluentes (Figura 8). Segundo alguns autores, as propriedades de adsorção desses carvões são fundamentalmente semelhantes, uma vez que estas dependem do tamanho do poro e da área de superfície interna destes poros, os quais por sua vez são independentes do tamanho global da partícula (CLARK e LYKINS JR., 1991).

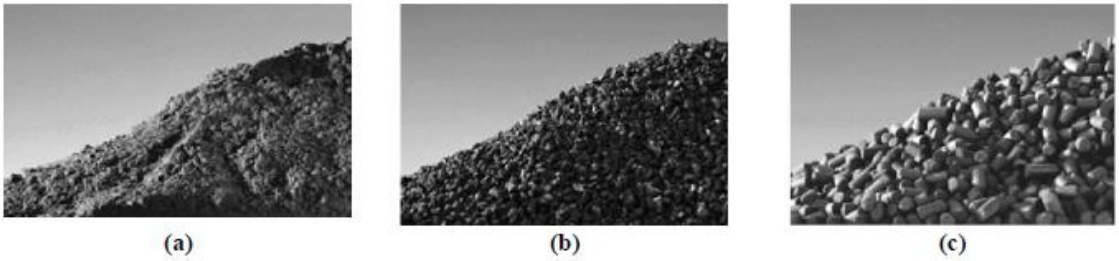

Figura 8 : Tipos de carvão ativado: (a) em pó; (b) granular; (c) pelotizado (SHARMA,2011).

3.4.1.1. Carvão ativado em pó (CAP)

O Carvão Ativado em pó (CAP) é definido pela American Water Works Association Standard como partículas de carvão cominuídas tal que 95-100% destas passam através de uma determinada peneira de 0,297 mm; enquanto a ASTM D5158 adota a peneira de 0,177mm, e já para vários autores, o diâmetro do carvão ativado em pó é menor que 0,074 mm (TCHOBANOGLOUS, BURTON E STENSEL, 2004; ÇEÇEN E AKTAŞ, 2012; CAVALCANTI, 2012).

O carvão ativado em pó encontra ampla aplicação no tratamento de efluentes, sendo adicionado aos lodos ativados ou entrando em contato com o efluente em uma unidade separada. Quando o CAP atua na etapa de coagulação associada a coagulantes para frações coloidais na fase líquida sua regeneração pode ser um tanto quanto difícil, uma vez que as partículas coloidais precisam ser separadas antes da regeneração.

Em geral, o carvão ativado em pó é dosado em uma corrente de processo, seja ela líquida ou gasosa, e após o período de contato estabelecido, é separado por filtração, ciclones ou sedimentação. A escolha para seu uso é feita em função de tempo de contato requerido, sistema de dosagem, dosagem em estágio único ou multiestágios, separação do carvão e medidas de segurança (CRITTENDEN *et al.*, 2005; NORIT, 2012)

3.4.1.2 Carvão Ativado Granular (CAG)

O carvão ativado granular (CAG) é definido por Norit (2012) como um carvão ativado que apresenta pelo menos 90% de suas partículas com tamanho maior que 0,177 mm. Alguns autores definem que as partículas de CAG têm tamanhos variando de 0,1 a 5 mm (TCHOBANOGLOUS, BURTON E STENSEL, 2004; ÇEÇEN E AKTAŞ, 2012; CAVALCANTI, 2012).

O CAG é designado pelo tamanho das malhas das peneiras tais como 2,38 mm x 0,841mm; 0,841 mm x 0,420 mm ou 2,38 mm x 0,595 mm para as aplicações em fase líquida e 4,76mm x 3,36 mm; 4,76 mm x 2,38 mm ou 4,76 mm x 2,00 mm para as aplicações na fase vapor. Em carvão ativado, as granulometrias mais comuns (não padronizadas) estão compreendidas nas seguintes faixas de abertura de peneiras: 5,66 mm x 3,36 mm; 5,66 mm x 2,38 mm; 3,36mm x 2,00 mm; 3,36 mm x 1,68 mm; 2,38 mm x 1,19 mm; 2,38 mm x 0,595 mm; 1,68 mm x0,707 mm; 1,68 mm x 0,420 mm; 0,841 mm x 0,420 mm; 0,841 mm x 0,297

mm; 0,595 mm x0,250 mm e 0,420 mm x 0,177 mm. Os tamanhos de partícula na faixa de 1,68 mm x 0,420 mm são vantajosos para a adsorção em fase líquida.

O CAG se encontra normalmente na forma de grãos derivados de carvão ou de cascas de nozes, porém também pode ser preparado pela granulação de carvão pulverizado com o auxílio de um ligante, tal como piche de alcatrão de carvão. A etapa limitante na taxa de adsorção em fase líquida para o CAG frequentemente é a difusão intrapartícula, ao contrário da adsorção em fase líquida com CAP (ÇEÇEN e AKTAŞ, 2012). Cada carvão ativado granular disponível comercialmente tem propriedades que o torna mais adequado para certas aplicações do que outros (CLARK e LYKINS JR., 1991).

O carvão ativado granular é principalmente utilizado em filtros de leito fixo, ou alternativamente em filtros de leitos móveis. Algumas das questões envolvidas no projeto e operação destes filtros são: tempo de contato requerido ou velocidade espacial hidráulica, vasos de filtração permanentes ou móveis, facilidades para carregamento e descarregamento de carvão nos filtros e as medidas de segurança. Além disso, uma consideração crítica em relação ao CAG refere-se à possibilidade de regeneração, in situ ou “off-site” do carvão ativado granular, tendo que ser analisado qual opção interfere menos durante a operação e também o custo dessas duas possibilidades de regeneração.(CRITTENDEN *et al.*, 2005; NORIT, 2012).

3.4.2 Aplicação do Carvão Ativado na imobilização de enzimas

Nos últimos anos, os carvões ativados granulares vêm sendo utilizados de forma eficiente como suporte para imobilização de enzimas em especial devido à presença de poros e uma grande área superficial

Silva *et al.* (2005) estudaram a imobilização da enzima pancreatina comercial, por adsorção, em carvão ativado granular comercial e em alumina em diferentes condições de imobilização (30, 60 e 90min a 25°C, e 12h a 5°C) visando seu uso na hidrolização do soro de leite. Os autores verificaram a taxa de imobilização determinando indiretamente a enzima não adsorvida nos suportes. Para a imobilização em carvão ativado, os autores não verificaram uma diferença significativa entre as condições testadas, tendo-se obtido até 100% de imobilização enzimática.

além disso, os autores foram capazes de reutilizar a enzima imobilizada por até 5 vezes antes da eficiência do processo de hidrolização do soro de leite ficar abaixo de 50%.

Kennedy *et al.* (2007) estudaram o comportamento da imobilização da tirosinase extraída de Solanum tuberosum, um tipo de batata, em duas matrizes de carvão ativado granular mesoporoso, um com uma área superficial grande e outro com menor área superficial, variando a atividade enzimática inicial, a temperatura e o pH. Os autores concluíram que o suporte com a maior área superficial apresentou a melhor imobilização e conseguiram os melhores resultados utilizando 300 U/mL de atividade enzimática, a um pH igual a 5 e a 40ºC.

Naranjo *et al.* (2010) utilizaram carvão ativado granular sintetizado em laboratório, utilizando o endocarpo do coco como material precursor de carbono, para a imobilização de lipase, sendo o biocatalisador aplicado na síntese de biodiesel. Os resultados mostraram uma capacidade de imobilização de 95% da lipase sob o suporte. A utilização da lipase imobilizada em carvão ativado resultou em um maior geração de biodiesel, a partir da transesterificação do óleo de palma, quando comparada com a enzima em sua forma solúvel.

Prieto *et al.* (2014) utilizaram carvão ativado em pó comercial pré-tratado com ácidos para a imobilização de β-galactosidase comercial, estudando a influência do pré-tratamento, da concentração inicial de enzima e da quantidade de CAP na eficiência de imobilização. Os autores verificaram que o pré-tratamento do CAP melhorou a capacidade do CAP de manter a enzima adsorvida em sua superfície. A maior eficiência de imobilização foi de 54%, após 5 minutos de imobilização, utilizando 1% em massa de CAP, a 30ºC de tempertura, pH=4,5 e concentração inicial de enzima de 0,12 g/L. Os autores concluíram que os resultados encontrados por ele foram interessantes no ponto de vista industrial, quando comparado com a literatura pois obtiveram a mesma eficiência de imobilização de quando se utilizado suportes caros, partindo de um suporte de baixo custo e com um tempo de contato muito curto.

Brito (2016) avaliou o processo de imobilização de lipase utilizando carvão ativado granular sintetizado em laboratório, utilizando o caroço do cajá como precursor de carbono. Os carvões foram preparados pelo método de ativação química utilizando o ácido fosfórico (H_3PO_4) ou hidróxido de potássio (KOH) como agentes de ativação. As melhores condições de imobilização para suporte obtido a partir da impregnação ácida foram: tempo 80 minutos, pH 3,5, concentração inicial de lipase 4000 $mg.L^{-1}$, apresentando atividade enzimática máxima de 278,4 U/g de CAG nas condições ideais, . O suporte sintetizado por meio da

ativação básica, apresentou uma atividade máxima de 270,0 U/g de CAG com o tempo de 120 minutos em pH 5, e atividade inicial 4000 $mg.L^{-1}$. O autor concluiu que CAGs obtidos a partir do caroço de cajá, possuem potencial para serem empregados no processo de imobilização da lipase, tendo em vista que enzimas imobilizadas mostraram boa atividade enzimática.

4 Procedimentos experimentais

4.1 Equipamentos

Para realização dos ensaios experimentais foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança eletrônica (FA-2104N, Bioprecisa);
- Estufa microprocessada de secagem (Quimis);
- Placa de aquecimento e agitação (Quimis);
- Agitador orbital (Thomas);
- Espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800);
- Liquidificador inox (Croydon Industrial Ltda);
- Shaker (Cientec CT-712R)

4.2 Materiais

4.2.1 Fonte da enzima tirosinase: extrato enzimático do macro fungo *Agaricus bisporus*

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados corpos de frutificação do *Agaricus bisporus*, conhecido como champignons de Paris, *in natura*, adquiridos no Hortifruti Mercado Valqueire. Cada lote adquirido continha 1kg e os cogumelos apresentavam corpos de frutificação brancos com alguns tons amarronzados. Após a compra os cogumelos foram estocados em refrigerador a 4°C por no máximo 5 dias até sua utilização na extração enzimática da tirosinase.

4.2.2 Carvão Ativado Granular

Entre ensaios de imobilização da enzima tirosinase e ensaios de remoção de fenol por adsorção foram utilizados 3 tipos de carvão ativado granular comercial:

(a) Carvão Ativado Granular CARBOTRAT AP

O carvão ativado granular Carbotrat AP é de origem brasileira. Foi fornecido pela Indústria Química Carbonífera Criciúma S.A. É feito a partir do carvão antracito, que é um

composto mineral, sendo destinado ao tratamento de água potável (Figura 9). A Tabela 3 apresenta as especificações técnicas deste tipo de carvão fornecidas pela indústria.

Tabela 3: Especificações do Carvão Ativado Granular CARBOTRAT AP (Carbonífera Criciúma, 2015)

Especificações	
Cinzas (%)	Máx. 10
Umidade (%)	Máx. 2,5
Peso Especifico Aparente (g/cm3)	1,4
Dureza (Moh)	2,7
Granulometrias (mm)	0,8 - 1,1

Figura 9: Carvão Ativado Granular Carbotrat AP

(b) Carvão Ativado Granular CARBOMAFRA 119

O carvão ativado CARBOMAFRA 119 (Figura 10) usado é de origem brasileira. Foi fornecido pela Indústria Química Carbomafra S.A. situada no estado de Santa Catarina, sendo um dos principais produtores de carvão ativado do país. É um carvão ativado granular, produzido a partir da casca de coco. A Tabela 4 apresenta as especificações técnicas deste tipo de carvão fornecidas pela indústria.

Tabela 4: Especificações do Carvão Ativado Granular CARBOMAFRA 119 (CARBOMAFRA, 2014)

Especificações	
Número de Iodo (mg I_2/g)	850 a 950
Cinzas (%)	Max. 10
Umidade (%)	Max. 10
Peso Especifico Aparente (g/cm_3)	0,5 – 0,05
Dureza (%)	Min. 90
Granulometrias (mm)	0,42 -1,66

Figura 10: Carvão Ativado Granular Carbomafra 119

(c) Carvão Ativado Granular Norit® 1240

O carvão ativado granular Norit®(Figura 11) é de origem estrangeira. Foi fornecido pela empresa Cabot Corporation, com sede nos Estados Unidos. É feito a partir do carvão betuminoso, de origem mineral, e é muito utilizado para a remoção de compostos fenólicos e para a remoção de odores e compostos que conferem coloração em efluentes industriais. A Tabela 5 apresenta as especificações técnicas deste tipo de carvão fornecidas pela Cabot.

Tabela 5: Especificações do Carvão Ativado Granular Norit®1240 (NORIT, 2012)

Especificações	
Número de Iodo (mg I_2/g)	min. 950
Cinzas (%)	Max. 10
Umidade (%)	Max. 5
Peso Especifico Aparente (g/cm^3)	0,47
Dureza (%)	97
Granulometrias (mm)	0,42 -1,68

Figura 11: Carvão Ativado Granular GranularNorit® 1240

4.3 Métodos

4.3.1 Método de extração da enzima tirosinase presente no fungo *Agaricus bisporus*

O método de extração da tirosinase presente no *Agaricus bisporus* mais eficiente, de acordo com a literatura, e, portanto, o método de extração utilizado, foi o procedimento desenvolvido por Kameda (2003). Os corpos de frutificação do *Agaricus bisporus* foram triturados em acetona gelada na concentração 1:1 (g/mL) e o preparado foi filtrado em papel de filtro (whatman nº 1) a vácuo. Em seguida, a pasta resultante foi congelada por 24 h a 0 °C e posteriormente ressuspensa em água destilada e resfriada por 24 h à 4 °C, originando assim o extrato enzimático. Foram retiradas alíquotas de 1,0mL do extrato obtido para a determinação da atividade enzimática, descrita no item 4.3.2.

4.3.2 Determinação da Atividade Enzimática da tirosinase

A medida da atividade enzimática da tirosinase foi determinada seguindo o procedimento adaptado de Santos (2012). Foi retirada uma alíquota de 1 mL do extrato bruto enzimático seguida da preparação de diluições de 1:10 em solução tampão de fosfato de sódio 0.2 M a pH 7. Em um becker de 10 mL foram adicionados 5.5 mL da solução do tampão fosfato de sódio 0.2M a pH 7, 1.5 mL de solução de L-tirosina 1.2 mM e 1 mL do extrato enzimático previamente diluído. A mistura foi imediatamente vertida em cubeta de quartzo e levada ao espectrofotômetro para análise, onde a variação da absorbância resultante da reação da enzima do extrato enzimático com o substrato L-tirosina, foi lida em comprimento de onda(λ) de 280 nm em intervalos de 30 segundos durante pelo menos 10 minutos. O procedimento descrito foi realizado para o extrato bruto e para as soluções enzimáticas feitas a partir do extrato bruto, geralmente em duplicata.

Para o cálculo da atividade a equação 1 foi utilizada:

$$A = \frac{(Abs_1 - Abs_2) \times 1000 \times D_E}{(t_2 - t_1) \times V_E} \; U/mL \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde, Abs_1 é absorbância inicial, Abs_2 é absorbância final, t_1 é o tempo inicial, t_2 é o tempo final, V_E é o volume de solução enzimática e D_E é o fator de diluição da solução enzimática.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como sendo a quantidade de enzima que provoca o aumento de 0.001 na absorbância a 280 nm por minuto.

4.3.3 Caracterização do Suporte Carbotrat AP

A Caracterização da Superfície do Carvão Ativado Granular Carbotrat AP foi obtida através da Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), realizada pelo aparelho de MEV da Marca Phillips XL30, no Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM), localizado na COPPE, UFRJ, fornecendo as fotografias de superfície dos mesmos e através da análise da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, realizada também no Laboratório de Processos de Separação com Membranas e Polímeros (PAM), localizado na COPPE, UFRJ.

4.3.4 Método de imobilização enzimática por adsorção em carvão ativado granular

O método de imobilização por adsorção utilizando carvão ativado granular como suporte foi desenvolvido por Silva (2005) e sua escolha se baseou em sua eficiência de imobilização referente a outras metodologias encontradas na literatura.

Para a imobilização foram colocados em um béquer uma quantidade determinada de suporte e 50 mL de solução de extrato bruto enzimático, contendo em média uma atividade enzimática de 3.000 U, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0. Deixou-se em contato por um período determinado, em agitação constante. Após o período de contato, centrifugou-se a 4.000 RPM por 10min, a 25 °C, seguida de filtração a vácuo. Foram preparados brancos, utilizando tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0, no lugar da solução enzimática, nas mesmas condições para os testes em diferentes tempos de contato. Foram tomadas amostras de tempo em tempo para análise da atividade enzimática, feita em duplicata.

A taxa de imobilização da enzima no carvão ativado foi feita de forma indireta, a partir dos dados de atividade enzimática residual (U) da solução enzimática. É utilizado um método indireto de cálculo devido ao fato de não ser possível determinar a atividade enzimática da enzima imobilizada no suporte (SILVA *et al.*, 2005; KENNEDY *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2010). O cálculo utilizado foi:

$$\text{Taxa de imobilização}(\%) = \frac{U_i - U_f}{U_i} \times 100 \qquad \text{(Equação 2)}$$

onde U_i, é a atividade enzimática inicial da solução no tempo 0 e U_f é a atividade enzimática residual no tempo x.

4.3.5 Influência da quantidade de suporte na imobilização

A avaliação foi realizada utilizando a metodologia descrita na seção 4.3.4 e variando a massa do suporte utilizado em 2,5g, 5g e 10g.

4.3.6 Influência do tempo de contato e velocidade de agitação na imobilização

A avaliação foi feita utilizando a metodologia descrita na seção 4.3.4, colocando em um béquer 10 g do suporte e 50 mL de solução de extrato bruto enzimático, contendo em média uma atividade enzimática de 3.000 U, em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,0. Deixou-se

em contato por 30min, 60min e 90min, a 25°C, e em agitação de 100, 150, 200 e 300 RPM, a fim de avaliar esses parâmetros. Foram tomadas amostras de tempo em tempo para análise da atividade enzimática, feita em duplicata.

4.3.7. Determinação da Concentração de Fenol

A concentração do fenol das soluções foi determinada pelo método colorimétrico direto descrito no Standard Methods (APHA, 1995), empregando o reagente 4-amino-antipirina como agente complexante. Este método permite a dosagem de fenol simples e fenóis substituídos, exceto na posição *para*.

A quantificação do fenol foi realizada pela adição de 250 µl de hidróxido de amônio (NH_4OH) 0,5 M a 10 ml da solução padrão, água destilada ou tampão fosfato de sódio pH 7,0. Posteriormente, foram adicionados 100 µl da solução de 4-amino-antipirina a 2 % (p/v) e 100 µl da solução de ferricianeto de potássio a 8 % (p/v). O pH foi ajustado para 7,9 (± 0,1) pela adição de hidróxido de amônio 0,5M ou solução tampão fosfato de potássio pH 6,8. Após 15 minutos, a absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onde (λ) de 500 nm.

A fim de construir a curva padrão (Figura 12) do método utilizado, as soluções de fenol, com concentrações de 1 a 5 ppm, foram preparadas a partir de diluições de uma solução mãe de 100 ppm em tampão fosfato de sódio pH 7,0. O branco da reação consistiu de somente o tampão .

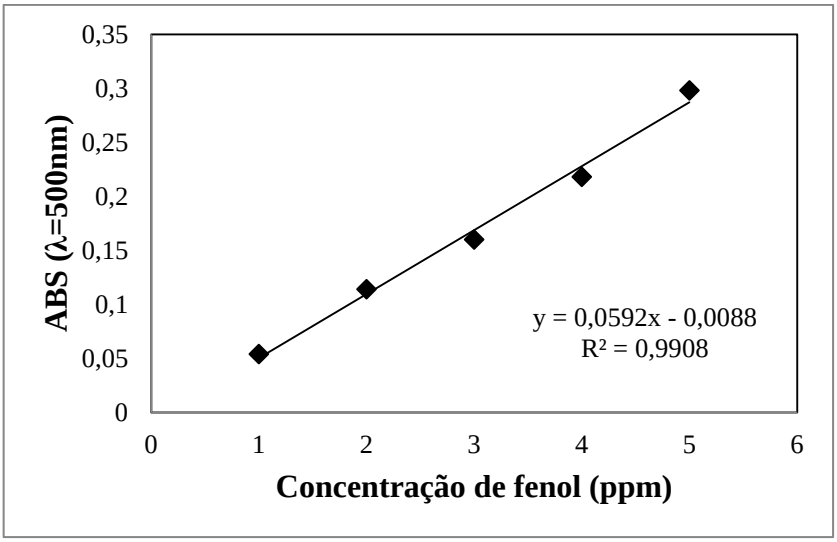

Figura 12: Curva padrão de dosagem de fenol utilizando o método colorimétrico direto descrito no Standard Methods.

4.3.8 Determinação da Quantidade de proteína

A determinação da quantidade de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). O método se baseia na interação entre o corante azul brilhante de comassie G-250 (BG-250) e proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A reação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma antônica, que absorve fortemente em 595nm, o azul brilhante de comassie G-250 se converte da cor vermelha pra a cor azul após ligação à proteína.

A dosagem de proteínas foi feita adicionando 5 mL do reagente de Bradford (Sigma), que consiste em 100 mg do azul brilhante de comassie G-250 dissolvido em 50 mL de etanol 100 %, 100 mL de ácido fosfórico 85 % e água mili-Q qsp 1000 mL, em 100 µL de amostra. Após 5 minutos, a absorbância da solução foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onde (λ) de 595 nm, em duplicata.

A absorbância medida foi correlacionada com uma curva padrão (Figura 13), obtendo-se a concentração de proteínas da amostra analisada. A curva padrão foi construída utilizando-se albumina bovina (10 - 100 µg de albumina em 100 µL de solução A (solução de 1 mg/mL de albumina bovina em NaCl 0,5 M).

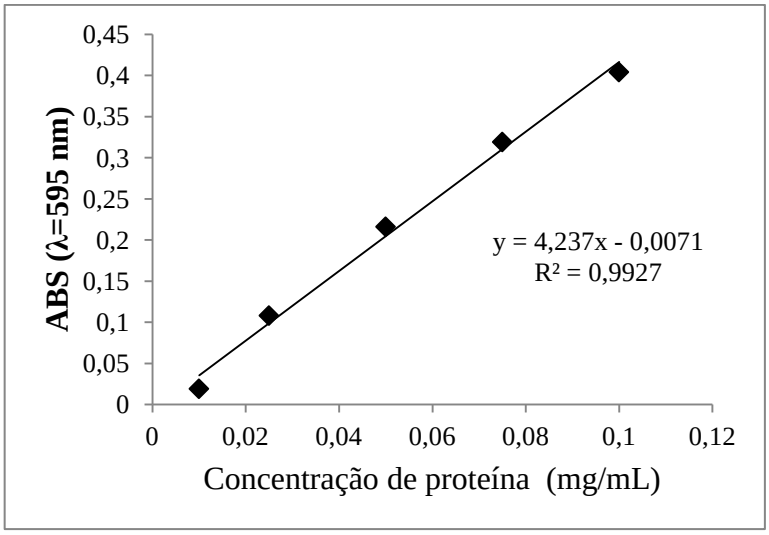

Figura 13: Curva padrão de quantificação de proteína obtida pelo método de Bradford usando albumina bovina como padrão

4.3.9 Oxidação enzimática do fenol utilizando enzima imobilizada

O ensaio de oxidação enzimática foi realizado adicionando a enzima imobilizada em carvão ativado, com uma atividade média de 1.500 U e 10 g de suporte em uma solução aquosa de fenol em concentrações variando de 10 a 100 ppm, com um de 7,0, mantidas a uma agitação constante de 150 RPM. Os ensaios tiveram uma duração de 2 horas e ocorreram na temperatura ambiente de 25ºC. Foram coletadas amostras a cada determinado período de tempo para ser analisadas quanto a quantidade de fenol restante nas soluções, em duplicata.

4.3.10 Oxidação enzimática do fenol utilizando enzima livre

O ensaio de oxidação enzimática com a enzima livre foi realizado adicionando um volume de extrato bruto de forma a se ter aproximadamente 1.500 U de atividade enzimática da tirosinase, em uma solução de 10 ppm de fenol, pH de 7,0, mantida a uma agitação constante de 150 RPM, durante 2 horas, em temperatura de 25 ºC. A cada 10 minutos foi removido uma alíquota para a determinação da quantidade de fenol restante na solução aquosa, pelo método colorimétrico.

4.3.11 Adsorção do fenol utilizando Carvão Ativado Granular (CAG)

O ensaio de adsorção foi realizado adicionando carvão ativado granular em uma solução de 10 ppm de fenol, de modo que a concentração fosse de 20g de CAG/ L de solução. O sistema foi mantido a uma agitação constante de 150 RPM, durante 2 horas, sendo tomadas amostras em intervalos de 10 minutos para análise de quantidade de fenol residual. Os CAG utilizados nos ensaios de adsorção foram CAG Carbotrat AP e CAG Norit 1240W®.

4.3.12 Determinação da remoção do fenol

A remoção de fenol foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Remoção de fenol (\%)} = \frac{[Fenol]_i - [Fenol]_f}{[Fenol]_i} \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

Onde, $[Fenol]_i$ é a concentração de fenol inicial na solução aquosa e $[Fenol]_f$ é a é a concentração de fenol final na solução aquosa.

4.3.13 Reutilização do Suporte

Antes de reutilizar o suporte em novas imobilizações ele passava pelas seguintes etapas a fim de garantir que qualquer enzima ainda imobilizada não apresentasse mais atividade enzimática:

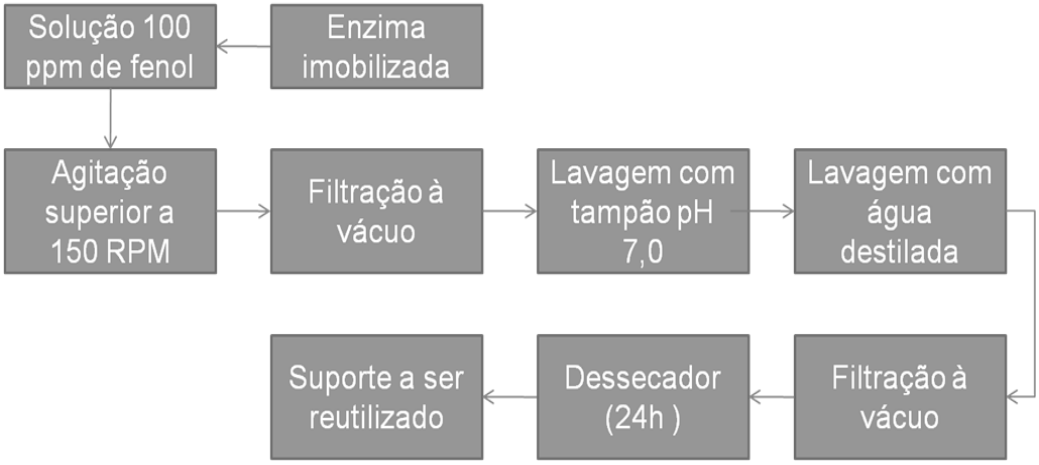

Figura 14: Etapas para reutilização do suporte usado

5 Resultados e Discussões

5.1 Atividade enzimática dos extratos brutos obtidos

Para a realização dos experimentos, foram feitas três extrações de três lotes diferentes de cogumelo *Agaricus bisporus*, gerando 6 extratos brutos, uma vez que cada extração resultava em 2 extratos brutos, como descrito nos procedimentos experimentais. Em todas as extrações, o valor de atividade enzimática do 2º extrato obtido foi mais alta que o 1º (Tabela 6). Este resultado também foi encontrado na literatura (SILVA, 2009; BOTELHO, 2010; SANTOS, 2012). Os valores mínimos e máximos para as atividades enzimáticas dos extratos foram, respectivamente 420 e 1340 U/mL.

Tabela 6: Valores da atividade enzimática da tirosinase dos extratos obtidos a partir dos 3 lotes de cogumelos

Lote	Extratos	Atividade Enzimática (U/ml)
1	1	632
	2	1245
2	1	420
	2	1340
3	1	650
	2	1054

A enzima tirosinase, encontrada no cogumelo *Agaricus bisporus*, é uma enzima intracelular, presente no citoplasma do cogumelo (SILVA, 2009). O maior valor de atividade enzimática dos segundos extratos pode ser explicado pelo fato que durante a incubação da segunda ressuspensão para a obtenção do segundo extrato ocorra um maior rompimento celular, promovendo uma maior difusão da enzima ao meio externo.

5.2 Influência da agitação e tempo de contato para a imobilização

Foram feitos ensaios de imobilização, usando como suporte o Carvão Ativado Granular Carbotrat AP, na quantidade de 10 g e uma solução enzimática com 3.000 U de atividade, feita a partir do extrato bruto em três tempos diferentes, 30, 60 e 90 minutos. Alguns autores observaram que, durante a imobilização de enzimas em CAG, a porcentagem

de enzimas imobilizadas se estabiliza em até 90 minutos de tempo de contato (SILVA *et al.*, 2005; KENNEDY *et al.*,2007; KUMAR *et al.*, 2010).

Pode se observar que a taxa de imobilização aumenta com o tempo, indicando a imobilização da enzima contida no extrato bruto no suporte e que a maior taxa de imobilização ocorre no tempo de 90 minutos. resultado similar ao encontrado por KENNEDY (2007).

A Figura 15 apresenta os resultados da taxa de imobilização obtidas, sendo observado que quanto maior o tempo de contato, maior a taxa de imobilização da enzima no suporte.

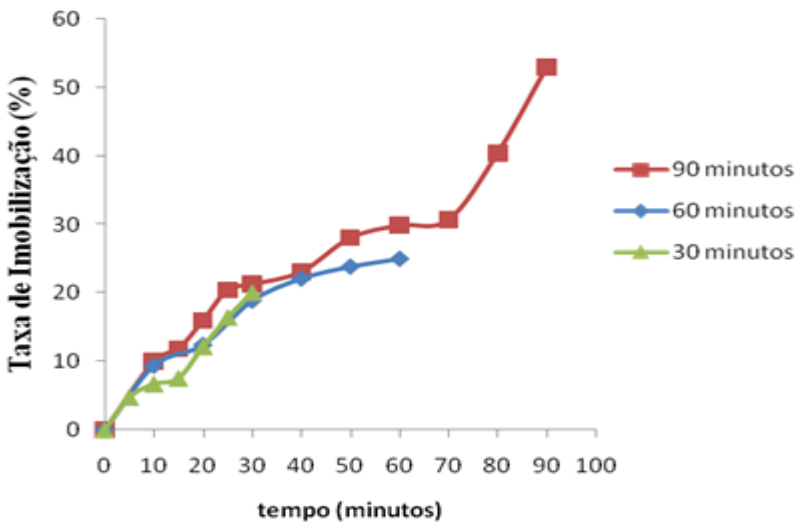

Figura 15: Variação da taxa de imobilização da enzima em suporte Carbotrat AP em relação ao tempo de contato em tempos de contato final de 30,60 e 90 minutos.

A partir desses resultados, tem-se que o melhor tempo de contato é o tempo de 90 minutos, onde a atividade enzimática da enzima imobilizada no suporte foi de 1.604 U, com uma taxa de imobilização de mais de 50%, resultado similar ao encontrado por Kennedy (2007), porém abaixo dos resultados encontrados por Silva (2005) e Kumar (2007), ressaltando que estes autores trabalharam com outros tipos de enzimas.

Para a escolha da melhor agitação, foram feitos ensaios de imobilização usando como suporte o Carvão Ativado Granular Carbotrat AP, na quantidade de 10 g e uma solução enzimática com ± 3.000 U de atividade, com o tempo de contato de 90 minutos e variando a agitação em 100, 150, 200 e 300 RPM. A Tabela 7 apresenta as taxas de imobilização

encontradas em agitações diferentes após o tempo de contato entre a solução enzimática e suporte.

Tabela 7: Variação da Taxa de imobilização e da atividade enzimática da enzima imobilizada em relação à agitação do sistema

Agitação (RPM)	Atividade Enzimática (U)	Taxa de Imobilização (%)
100	900	30
150	1650	55
200	1590	53
300	1200	40

A pior taxa de imobilização foi obtida usando uma agitação de 100 RPM, ao utilizar uma agitação de 150 e 200 RPM foi possível obter uma taxa de imobilização acima de 50% enquanto utilizando uma agitação de 300 RPM, a taxa de imobilização ficou em 40%. A baixa eficiência de oxidação para baixa velocidade de agitação deve-se à mistura insuficiente da Tirosinase com fenol aquoso. Para valores maiores de agitação observa-se a inativação mecânica da enzima que ocorre devido ao aumento da área de contato da enzima com ar e com as superfícies do erlenmeyer. Este fenômeno foi relatado por COLOMBIÈ *et al.* (2001), CHAVITA (2010), MENONCIN *et al.* (2009) e SILVA *et al.* (2005) .

A partir dos dados obtidos, foi escolhido o tempo de contato de 90 minutos e a agitação do sistema de 150 RPM para as posteriores imobilizações por apresentarem o melhor resultado em relação à taxa de imobilização, quantidade de enzima imobilizada, em termos de unidades de atividade enzimática (U), em relação à atividade enzimática da solução enzimática preparada a partir do extrato bruto.

5.3 Influência da origem do Carvão Ativado Granular na imobilização

Foram feitos ensaios de imobilização, com as mesmas condições dos ensaios descritos na seção 4.3.4, desta vez mantendo o tempo de contato em 90 minutos e a agitação em 150 RPM e variando o tipo de suporte. Foram utilizados o CAG Carbomafra 119, de origem vegetal e o CAG Carbotrat AP, de origem mineral. Os ensaios foram realizado sem triplicata.

A Tabela 8 apresenta a comparação das taxas de imobilização obtidas nos ensaios de imobilização utilizando como suporte o CAG Carbotrat AP e CAG Carbomafra 119. A Figura

16 apresenta o gráfico comparando a imobilização que apresentou o melhor resultado utilizando CAG Carbotrat AP (CAG Mineral) e CARBOMAFRA 119 (CAG Vegetal) como suporte.

Tabela 8: Comparação da taxa de imobilização em suportes diferentes

	Taxa de imobilização (%)	
Ensaio	CAG Carbotrat Ap	CAG Carbomafra 119
1	53	76
2	51	74
3	51	71

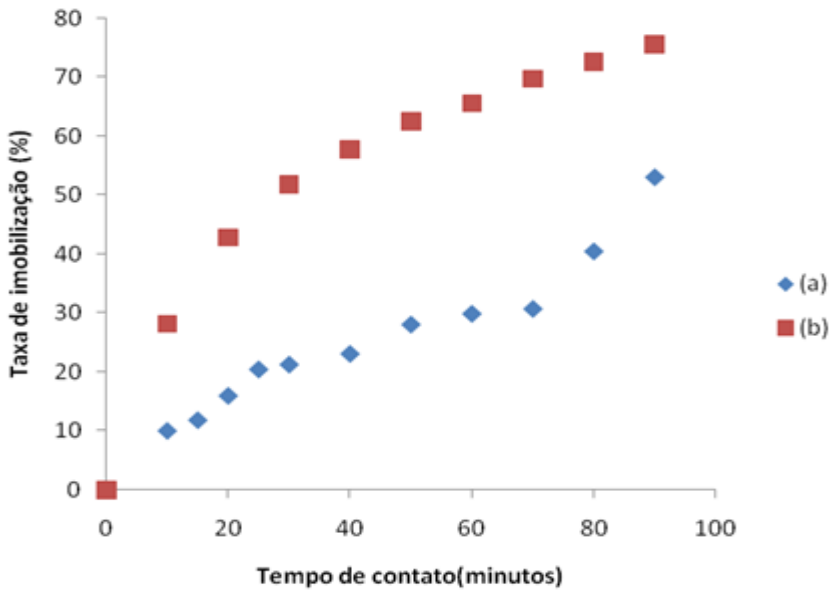

Figura 16: Comparação da imobilização da tirosinase utilizando como suporte (a) CAG Carbotrat AP e (b) CAG CARBOMAFRA 119, sistema em agitação de 150 RPM durante 90 minutos

Através da análise do gráfico presente na Figura 16, pode ser observado que a imobilização utilizando CAG Carbomafra 119, de origem vegetal, apresenta uma maior eficiência. Segundo Souza (2009) a diferença na adsorção ocorre não devido à origem do carvão ativado (mineral ou vegetal) e sim, em acordo com o modo que é produzido, que gera características diferentes. No caso da imobilização da enzima tirosinase por adsorção, a área

superficial e a polaridade do carvão ativado são os diferenciais. Após a imobilização, o suporte contendo enzimas foram lavados com água destilada, passaram por uma filtração à vácuo e armazenados em um recipiente, sob refrigeração. A atividade enzimática da água de lavagem foi analisada, não sendo significativa.

Além do ensaio de imobilização realizou-se um ensaio de oxidação enzimática do fenol, utilizando as enzimas imobilizadas anteriormente em CAG Carbotrat AP e CAG Carbomafra 119, tendo como atividade enzimática, 1.565 e 1.605U (CAG Carbotrat AP) e 2.224 e 2.232U (CAG Carbomafra 119). Os ensaios de oxidação enzimática do fenol seguem o procedimento descrito na seção 4.3.9, utilizando soluções sintéticas com 10 ppm e 60 ppm de fenol e seus resultados estão presentes na Tabela 9.

Tabela 9: Resultado do ensaio de oxidação enzimática do fenol

Tipo de Suporte	Atividade Enzimática (U)	concentração inicial de fenol (ppm)	concentração final de fenol (ppm)	Remoção de Fenol (%)
CAG Carbotrat Ap	1565	10	-	≡ 100
	1605	60	20,28	66,2
CAG Carbomafra 119	2224	10	-	≡ 100
	2232	60	18,42	69,3

Como pode ser observado, apesar da imobilização de enzima ser mais eficiente utilizando como suporte o CAG Carbomafra 119, os valores de remoção do fenol, através da oxidação enzimática, não apresentaram muita diferença. Uma justificativa seria que as enzimas presentes no suporte CAG Carbotrat AP pudessem estar mais disponíveis ao substrato que as enzimas presentes no suporte CAG Carbomafra 119.

O CAG Carbotrat AP, de origem mineral, pode ser até 50 % mais barato que o CAG Carbomafra 119, de origem vegetal, segundo empresas responsáveis pela venda desses produtos (CARBOMAFRA, 2015; AQUASTORE,2015). A diferença de preço é devido principalmente à especificidade do carvão ativado, ou seja, onde ele pode ser aplicado dependendo de sua aplicação. Levando em consideração os resultados dos testes preliminares, o custo dos carvões e a maior disponibilidade de CAG Carbotrat AP, a maioria das imobilizações subseqüentes foram realizadas utilizando este carvão como suporte.

5.4 Influência da quantidade de suporte na imobilização

Foram realizados testes a fim de verificar a influência da quantidade de suporte para a imobilização. Para isso, utilizou-se o procedimento de imobilização descrito na seção 4.3.5, porém utilizando como quantidade de suporte 2,5 g, 5 g e 10 g. O suporte utilizado foi o carvão ativado granular Carbotrat AP e foi analisada a atividade enzimática (U) da solução enzimática, preparada a partir do extrato bruto, antes da imobilização e após os 90 minutos de contato. A Tabela 10 apresenta os resultados dos ensaios:

Tabela 10: Imobilização da enzima utilizando quantidades diferentes de suporte

Quantidade de Suporte (g)	Atividade enzimática (U)	Taxa de Imobilização (%)
2,5	1200	40,1
	1233	41,1
5	1509	49,7
	1512	50,4
10	2123	71,5
	2118	70,6

Todas as soluções enzimáticas utilizadas para a imobilização apresentavam uma atividade enzimática inicial de aproximadamente 3.000 U, sendo aceito variações de até 10 % para mais ou para menos. Estes testes demonstraram que quanto maior a quantidade de suporte, maior a quantidade de enzima imobilizada, uma vez que a atividade enzimática aumentou conforme o aumento da massa do suporte.

Essas enzimas imobilizadas foram utilizadas em ensaios de oxidação enzimática do fenol, sendo analisadas a remoção de fenol de soluções de 10 e 20 ppm, resultados disponíveis na Tabela 11, os valores de concentração de fenol final são valores médios.

Tabela 11: Resultados do ensaio de oxidação enzimática do fenol presente em soluções sintéticas

Quantidade de Suporte (g)	Atividade enzimática (U)	Concentração de fenol inicial (ppm)	Concentração de fenol final (ppm)	Remoção de fenol (%)
2,5	1200	10	0,5	95
	1233	20	3,5	82,5
5	1509	10	~0	~100
	1512	20	2,1	89,5
10	2123	10	~0	~100
	2118	20	0,4	98

Analisando o resultado e levando em consideração que o limite de fenol presente em efluentes para descarte é de 0,5 ppm, segundo a CONAMA 430/2011, a enzima imobilizada em 10 g de suporte gera um resultado final abaixo desse limite, enquanto que utilizando 5 g de CAG esse limite só não é ultrapassado para uma concentração inicial de fenol de 10 ppm. O sistema suporte-enzima, onde para a imobilização se utilizou somente 2,5 g do suporte se mostrou ineficiente para adequar as soluções sintéticas de10 e 20 ppm ao limite exigido para descarte. Ainda assim, a remoção de fenol em todos os ensaios foi superior a 80%.

5.5 Caracterização do Suporte Carbotrat AP

As Figuras 17 (a) e 17 (b) mostram as microscopias de varredura eletrônica do carvão ativado granular Carbotrat AP antes da imobilização, em ampliações de 10000 e 2500 vezes e as Figuras 18 (a) e 18 (b) apresentam as microscopias de varredura eletrônica do carvão ativado granular Carbotrat AP após a imobilização, também em ampliações de 10000 e 2500 vezes.

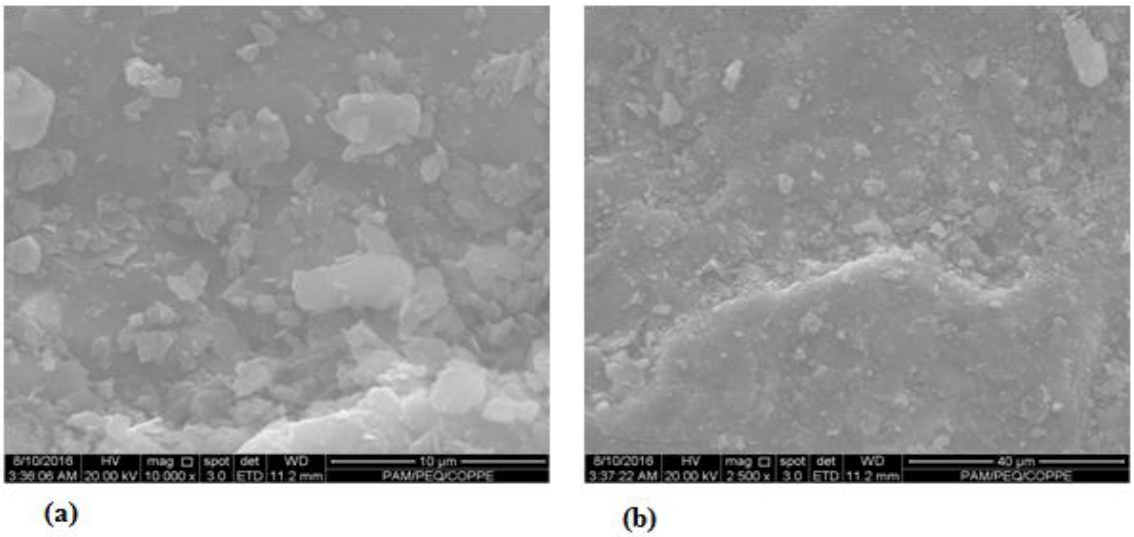

Figura 17: Análises de imagem do carvão ativado antes da imobilização por adsorção utilizando MEV, (a) ampliação de 10000 vezes, (b) ampliação de 2500 vezes.

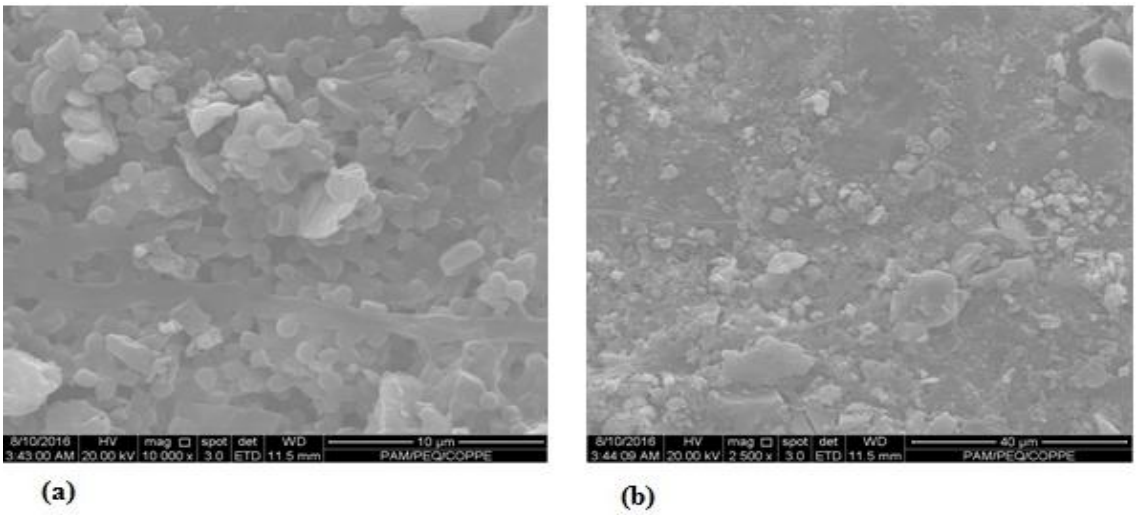

Figura 18: Análises de imagem do carvão ativado após a imobilização por adsorção utilizando MEV, (a) ampliação de 10000 vezes, (b) ampliação de 2500 vezes

As análises de imagem da Figura 17, mais claramente na ampliação de 10000 vezes, mostram uma estrutura homogênea e regular do carvão ativado. Já nas imagens da Figura 18, é possível observar a presença de outros componentes na superfície do carvão ativado granular, ou seja a adsorção da enzima aparenta ser superficial.

A Figura 19 apresenta a comparação dos espectros de infravermelho do carvão ativado antes da imobilização (a) e após a imobilização da enzima tirosinase (b).

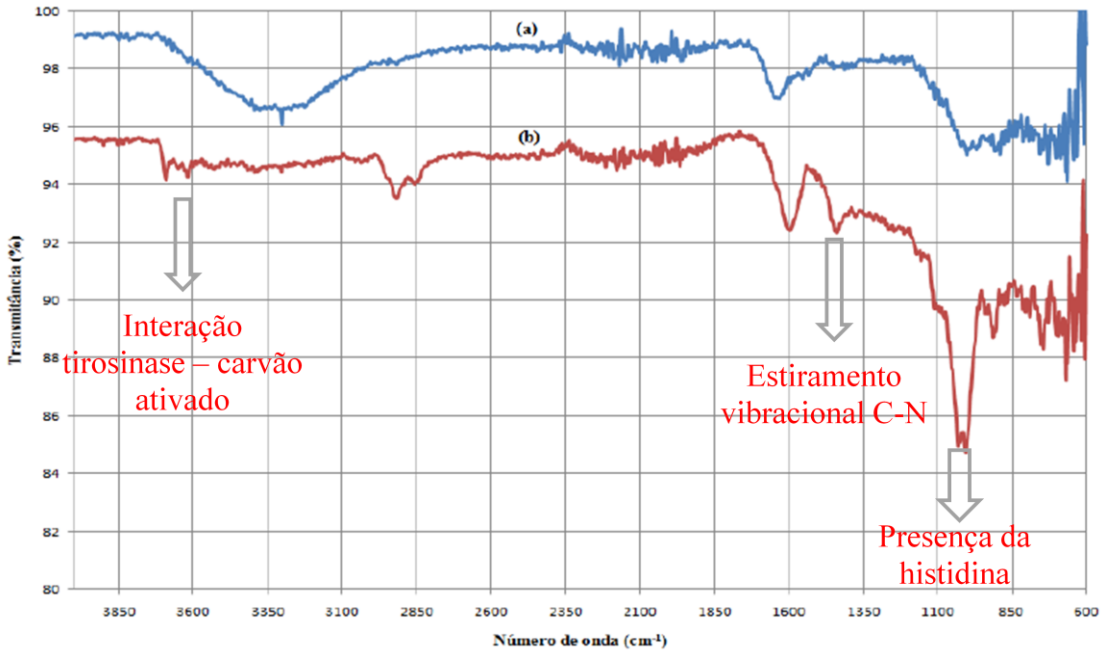

Figura 19: Espectros de Infravermelho do carvão ativado granular Carbotrat AP (a) antes da imobilização e (b) após a imobilização

É possível observar algumas diferenças entre os espectros do carvão ativado granular Carbotrat AP antes e após a imobilização da enzima. O espectro de infravermelho do suporte após a imobilização, apresenta picos que indicam a presença da histidina, que faz parte da estrutura da tirosinase. Observa-se também que a adsorção da enzima não modificou a estrutura do carvão ativado. A aparição de duas bandas na região de 3700 - 3600 cm^{-1} no espectros de Infravermelho do carvão ativado granular Carbotrat AP após a imobilização (b), correspondente à freqüência de estiramento da ligação N-H, é devido a interação da tirosinase com a matriz de carvão ativado (KENNEDY *et al.*, 2007). Além disso, a banda que aparece próximo de 1400 cm^{-1} no espectro do carvão ativado após a imobilização (b) é indicativo do estiramento vibracional da ligação C-N, o que confirma a presença de tirosinase imobilizada na matriz, nota-se que esta banda estava ausente no espectro do carvão ativado antes da imobilização (a).

5.6 Influência da concentração inicial de fenol na oxidação enzimática

Foram realizados ensaios de oxidação enzimática do fenol utilizando o sistema suporte-enzima, em soluções de 10, 20, 40, 60 e 100 ppm, onde a atividade enzimática das enzimas imobilizadas em 10 g de suporte Carbotrat AP eram de aproximadamente ~1.500 U, seguindo o procedimento descrito na seção 4.3.9. Os resultados, em termo de concentração

final média do fenol na solução aquosa (média dos valores das análises em triplicata) e remoção do fenol estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Concentração de fenol final média e remoção do fenol de soluções aquosas contendo concentrações diferentes de fenol após a oxidação enzimática

Suporte: Carbotrat AP			
Atividade enzimática (U)	Concentração de fenol inicial (ppm)	Concentração de fenol final (ppm)	Remoção de fenol (%)
~1500	10	~0	100
~1500	20	2,5	87,50
~1500	40	6,67	83,33
~1500	60	19,5	67,50
~1500	100	45,6	54,40

Utilizando enzima imobilizada com atividade enzimática de 1.500 U, o limite de fenol exigido pelo CONAMA 430/2011 só é atingido através da oxidação enzimática em soluções com 10 ppm de fenol. Porém, apesar de não se adequar ao limite para descarte, utilizando a enzima imobilizada foi possível obter remoção de fenol acima dos 50%, mesmo para soluções contendo 100 ppm de fenol. A diminuição da eficiência de remoção com o aumento da concentração inicial de fenol presente na solução pode ser explicada, não só pela quantidade de enzima imobilizada no suporte, mas também pelo fato da o-quinona, formada pela degradação do fenol através da tirosinase, inativar a enzima quando em maiores concentrações (WADA *et al.*,1993; BEVILAQUA *et al.*, 2002). Uma outra razão para soluções com concentração inicial de fenol alta não se adequar ao limite estabelecido pelo CONAMA 430/2011, é o tempo de contato da enzima imobilizada nas soluções, que neste trabalho foi fixado em 2 horas, alguns autores precisaram de 8 horas para remover praticamente 100 % de fenol de soluções contendo inicialmente 100 ppm (KAMEDA *et al.*, 2006; CHAVITA, 2010).

5.7 Comparação entre a oxidação enzimática utilizando enzima livre e imobilizada e a adsorção por carvão ativado granular para a remoção de fenol

A fim de validar a utilização da enzima tirosinase, oriunda de um extrato bruto, imobiliza para a remoção de fenol, através da oxidação enzimática, foram realizados ensaios de oxidação enzimática do fenol a partir da enzima imobilizada, ensaios de oxidação enzimática do fenol a partir da enzima livre, adsorção de fenol em carvão ativado granular

Carbotrat AP e adsorção de fenol em carvão ativado granular NORIT® 1240, CAG cuja utilização envolve a remoção de fenol de efluentes.

Para o ensaio utilizando a enzima imobilizada em carvão ativado granular da marca Carbotrat AP, usou-se a enzima imobilizada em 10 g de carvão ativado granular, com uma atividade enzimática de aproximadamente 1.500 U, a adicionando a uma solução aquosa contendo 10 ppm de fenol. Os resultados estão presentes na Tabela 13.

Tabela 13: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato da enzima imobilizada (1.500 U) em uma solução de 10 ppm de fenol

tempo (min)	Concentração de fenol (ppm)	Degradação do fenol
0	10,1	0,0
10	9,9	0,2
20	8,2	1,9
30	6,7	3,4
40	4,9	5,2
50	3,0	7,1
60	0,4	9,7
70	0,2	9,9
80	0,2	9,9
90	0,0	10,1
100	0,0	10,1
110	0,0	10,1
120	0,0	10,1

Como pode ser observado, a enzima imobilizada em carvão ativado removeu aproximadamente 100% do fenol contido na solução aquosa no tempo de 60 minutos. Essa remoção é semelhante à encontrada por alguns autores como Chavita, 2010 e Pigatto, 2013.

No ensaio utilizando somente a enzima livre, visando comparar seu resultado com o resultado obtido no ensaio de oxidação enzimática utilizando a enzima imobilizada, com a mesma atividade da enzima imobilizada, 1.500 U, para a oxidação enzimática do fenol de uma solução aquosa de 10 ppm. Os resultados estão presentes na Tabela 14.

Tabela 14: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato da enzima livre em uma solução de 10 ppm de fenol

tempo (min)	Concentração de fenol (ppm)	Degradação do fenol
0	10,1	0,0
10	6,4	3,7
20	5,3	4,8
30	3,2	6,9
40	2,6	7,5
50	0,9	9,2
60	0,2	9,9
70	0,1	10,0
80	0,2	9,9
90	0,2	9,9
100	0,2	9,9
110	0,1	10,0
120	0,2	9,9

A eficiência de remoção é próxima de 100 % no tempo de 60 minutos, neste período, a concentração de fenol residual já se encontra abaixo do limite exigido por lei para o descarte do efluente que contém compostos fenólicos.

O resultado obtido, assim como o resultado da enzima imobilizada é similar ao encontrado na literatura (WADA *et al.*,1994; NICELL e IKEHATA, 2000; YAMADA *et al.*, 2005), levando-se em conta a duração do teste e a atividade enzimática utilizada.

No ensaio de adsorção utilizando o carvão ativado granular utilizou-se a metodologia descrita na seção 4.3.11. Assim como nos ensaios anteriores, a cada 10 minutos foi removido uma alíquota para a determinação da quantidade de fenol pelo método colorimétrico. Os resultados da adsorção do fenol presente na solução aquosa utilizando o carvão ativado granular Carbotrat AP estão presentes na Tabela 15.

Tabela 15: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato do CAG Carbotrat AP em uma solução de 10 ppm de fenol

tempo (min)	Concentração de fenol (ppm)	Quantidade de fenol adsorvido (ppm)
0	10,1	0,0
10	9,9	0,2
20	9,8	0,3
30	9,7	0,4
40	9,6	0,5
50	9,6	0,5
60	9,5	0,6
70	9,4	0,7
80	9,4	0,7
90	9,4	0,7
100	9,4	0,7
110	9,3	0,8
120	9,3	0,8

No ensaio de adsorção utilizando o carvão ativado granular da marca NORIT® 1240 utilizou-se a metodologia descrita na seção 4.3.11. Os resultados estão presentes na Tabela 16. O carvão ativado granular NORIT® 1240, produzido por uma indústria estrangeira e, portanto, importado, de acordo com seu produtor, deve ser utilizado para remover substâncias orgânicas que causem mudança no odor e na coloração do efluente, no caso, fenol e seus derivados.

Tabela 16: Quantidade de fenol residual em relação ao tempo de contato do CAG NORIT® 1240 em uma solução de 10 ppm de fenol

tempo (min)	Concentração de fenol (ppm)	Quantidade de fenol adsorvido (ppm)
0	10,1	0,0
10	5,6	4,5
20	4,1	6,0
30	0,8	9,3
40	0,4	9,7
50	0,4	9,7
60	0,3	9,8
70	0,2	9,9
80	0,1	9,9
90	0,1	9,9
100	0,1	9,9
110	0,1	9,9
120	0,0	10,1

A Figura 20 apresenta a remoção do fenol da solução aquosa, dentro das 2 horas de duração do teste para cada método de remoção testado.

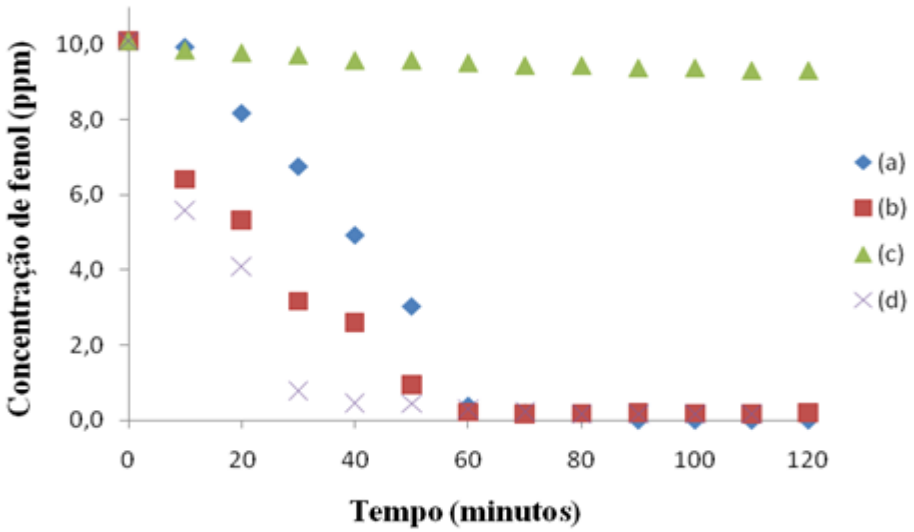

Figura 20: Remoção de fenol de uma solução de 10 ppm através de oxidação enzimática com (a) Enzima tirosinase imobilizada em CAG Carbotrat AP (Atividade enzimática de 1.500 U, [CAG = 20 g/L]) e (b) Enzima tirosinase na forma livre (Atividade enzimática de 1.500 U); e através da adsorção em (c) Carvão Ativado Granular da marca Carbotrat AP na concentração de 20 g/L; (d) Carvão Ativado Granular da marca NORIT® 1240 na concentração de 20 g/L.

Observa-se que a adsorção em carvão ativado granular da marca NORIT® 1240 apresentou uma remoção de quase 100 % próximo de 40 minutos, enquanto a oxidação enzimática usando a enzima tirosinase livre e imobilizada obtém 100 % de remoção do fenol próximo ao tempo de 60 minutos. A adsorção em carvão ativado granular da marca Carbotrat AP se mostrou ineficiente na remoção, o que indica que a remoção do fenol utilizando a enzima imobilizada em suporte ocorre principalmente devido à tirosinase, sem grande participação do carvão ativado granular da marca Carbotrat AP, usado como suporte.

As curvas referentes à oxidação enzimática utilizando a enzima livre e a enzima imobilizada apresenta um patamar, que também foi reportado por outros autores (SILVA, 2009; BOTELHO, 2010; SANTOS, 2012) e ocorre pois em concentrações baixas de substrato, no caso o fenol, a enzima apresenta um tempo de adaptação. A curva referente a oxidação enzimática utilizando a enzima livre apresenta uma queda mais acentuada que da enzima imobilizada, o que pode ter ocorrido devido a um impedimento maior para o contato do fenol com a enzima, ocasionado pela imobilização.

Interessante notar que a coloração final da solução após a oxidação enzimática utilizando enzima imobilizada foi menos intenso que a da solução após a oxidação enzimática utilizando enzima livre (Figura 21). A coloração da solução após o teste se dá pela presença da o-quinona, produto da degradação do fenol pela enzima tirosinase, e com o discutido anteriormente, uma grande concentração de o-quinona inativa a enzima. Esta diferença da coloração se deve ao fato do carvão ativado granular ser um material adsorvente, autores que estudaram imobilização da enzima em quitosana, também um material adsorvente, apresentaram resultados similares, em termo da coloração final da solução.

(a) (b)

Figura 21: Coloração da solução aquosa, contendo inicialmente 10 ppm de fenol, após duas horas de oxidação enzimática utilizando (a) enzima livre e (b) enzima imobilizada

A presença da o-quinona nas soluções após os ensaios de oxidação enzimática foi confirmada realizando uma varredura no espectrofotômetro eletrônico, na faixa de 250-400 nm, segundo Gárcia (2004) o-quinonas apresentam um pico considerável próximo de 293 nm. Como pode ser observado na Figura 22, o pico obtido pela varredura da solução aquosa após o contato tanto da enzima livre quanto da enzima imobilizada foi no comprimento de onda de 290 nm. Como era esperado, pela diferença de coloração, a intensidade do pico para a solução após oxidação enzimática utilizando enzima livre (a) foi maior que a intensidade do pico para a solução após oxidação enzimática utilizando enzima imobilizada (b), demonstrando que o carvão ativado granular foi capaz de adsorver uma quantidade da o-quinona formada pela reação de degradação do fenol.

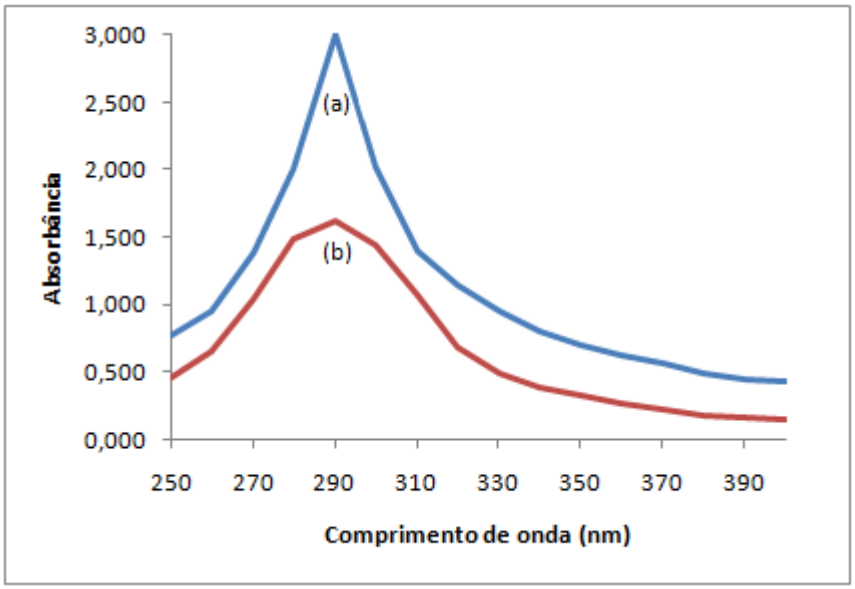

Figura 22:Espectro no Ultravioleta-Visível na faixa de 250-400 nm das soluções sintéticas após oxidação enzimática utilizando (a) enzima livre e (b) enzima imobilizada.

A cinética de adsorção do fenol em carvão ativado granular da marca NORIT® 1240 é similar ao reportado por diversos autores, tais como Blanco (2001), Cooney (1999) e Rodrigues-Reinoso e Sábio-Molina (1998) onde, em geral, a cinética de adsorção é rápida inicialmente, em virtude de a adsorção ocorrer principalmente na superfície externa, seguida por uma etapa lenta de adsorção na superfície interna do adsorvente.

Para o estudo da cinética de remoção separou-se os pontos em que a curva se assemelha com uma reta para o cálculo da velocidade, observado na Figura 23, utilizando a seguinte fórmula:

$$v = \frac{\Delta y}{\Delta x}$$

onde v é a velocidade de remoção, Δy é a variação da concentração do fenol e Δx é a variação do tempo.

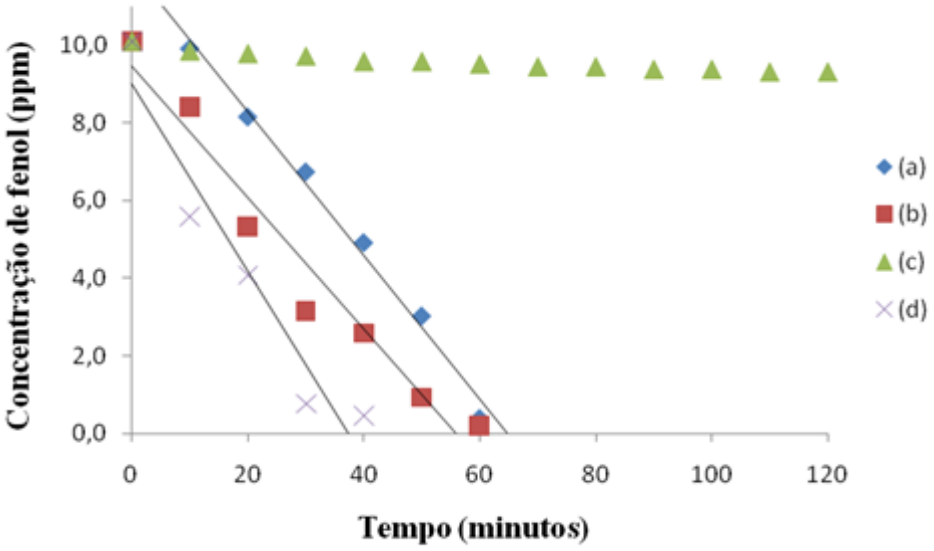

Figura 23: Gráfico da velocidade de remoção do fenol por (a) oxidação enzimática com tirosinase imobilizada; (b)oxidação enzimática com tirosinase livre; (c) adsorção em CAG Carbotrat AP; (d) adsorção em CAG NORIT® 1240

A velocidade encontrada foi de 0,189 $g*L^{-1}*min^{-1}$ para a oxidação enzimática com tirosinase imobilizada, 0,127 $g*L^{-1}*min^{-1}$ para a oxidação enzimática com tirosinase livre e 0,239 $g*L^{-1}*min^{-1}$ para a adsorção em CAG NORIT® 1240. O uso da técnica usual para remoção de fenol, adsorção em carvão ativado, apresentou melhor velocidade, porém para esses ensaios utilizou-se uma concentração de CAG muito superior ao utilizado para tratamento de efluentes. Uma maior velocidade da oxidação enzimática com tirosinase imobilizada em relação à velocidade da oxidação enzimática com tirosinase livre pode ser explicada por uma estabilidade da enzima no suporte, esta maior estabilidade da enzima em relação à sua forma livre aparece nos estudos de Chavita (2010).

5.8 Reutilização da enzima tirosinase imobilizada em carvão ativado granular

A maior vantagem de se utilizar enzimas imobilizadas é poder reutilizá-las, o que não ocorre com a utilização de enzimas livres. Foi testado a utilização da mesma enzima imobilizada em três ensaios de oxidação enzimática.

Para os ensaios foram utilizadas enzimas imobilizadas com atividade enzimática inicial de 1.500 U, em suporte de CAG Carbotrat AP e 2.100 U, em suporte de CAG Carbomafra 119.Após cada ensaio, a enzima imobilizada era lavada com água destilada e

passava por uma filtração a vácuo. Os resultados da reutilização da enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP e CAG Carbomafra 119 são mostrados nas Tabela 16 e 17.

Tabela 17: Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP

Suporte: CAG Carbotrat AP	Concentração de fenol inicial (ppm)	Concentração de fenol final (ppm)	Remoção de fenol (%)	Queda do rendimento (%)
1ª		0	100	
2ª	10 ppm	0,45	95,5	-95,5
3ª		5,144	48,56	-48,56
1ª		20,28	66,2	
2ª	60ppm	27,768	53,72	-5,16
3ª		45,624	23,96	24,6

Tabela 18: Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbomafra 119

Suporte: CAG Carbmafra 119	Concentração de fenol inicial (ppm)	Concentração de fenol final (ppm)	Remoção de fenol (%)	Queda do rendimento (%)
1ª		0	100	
2ª	10 ppm	0,544	94,56	-94,56
3ª		5,284	47,16	-47,16
1ª		18,42	69,3	
2ª	60ppm	27,42	54,3	-54,3
3ª		46,2	23	-23

A 1ª utilização da enzima imobilizada foi similar aos resultados já obtidos em ensaios anteriores, com 100 % de remoção do fenol para a oxidação enzimática de solução de 10 ppm A remoção de fenol de uma solução aquosa de 60 ppm foi de 66,2% para a oxidação enzimática utilizando a tirosinase imobilizada em CAG Carbotrat AP e 69 % para a oxidação enzimática utilizando a tirosinase imobilizada em CAG Carbomafra 119, apesar da tirosinase imobilizada em CAG Carbomafra 119 apresentar uma atividade enzimática maior sua remoção foi somente 3,1% maior que remoção utilizando a tirosinase imobilizada em CAG Carbotrat AP.

Em ambos os casos para a remoção de 10 ppm de fenol, a 2ª utilização da tirosinase imobilizada conseguiu manter a remoção acima de 90%, sendo que a tirosinase a imobilizada em CAG Carbotrat AP apresentou 4,5% de queda de rendimento em relação à sua 1ª utilização contra 5,4% da imobilizada em CAG Carbomafra 119. Para a remoção de 60 ppm, novamente a enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP obteve uma queda menor de rendimento em relação a enzima imobilizada em CAG Carbomafra 119, 12,5 % contra 15 %. Já a 3ª utilização apresentou queda de rendimento maior que 50 % para a remoção de 10 ppm, enzima em suporte CAG Carbotrat AP apresentou queda de 51,4 % e em suporte de CAG Carbomafra 119, 52,8 % e maior que 40 % para a remoção de 60 ppm, queda de 42,2 % para tirosinase imobilizada em CAG Carbotrat AP e 46,3 % para tirosinase imobilizada em CAG Carbomafra 119.

A queda de rendimento pode indicar a inativação da enzima ou a perda da mesma durante o ensaio, devido à agitação e atrito entre as partículas de CAG. Para investigar a queda do rendimento, após cada ensaio de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP de uma solução aquosa de 10 ppm de fenol, separou-se uma alíquota para a determinação de proteínas. Apesar da determinação de proteínas não servir para quantificar a tirosinase, um vez que ela está presente em um extrato bruto, se a solução aquosa, após as 2 horas do ensaio apresentasse proteínas seria um indicativo da presença da tirosinase em solução. O resultado pode ser visto na Tabela 19.

Tabela 19: Quantificação de proteínas presentes na solução aquosa após o ensaio de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP

Suporte: CAG Carbotrat AP		
nº de utilização	Remoção de fenol (%)	Proteínas (mg/mL)
1	100	0,009
2	95,5	0,021
3	48,56	0,011

Os resultados indicam que há um desprendimento de proteínas, incluindo a tirosinase, do suporte (CAG Carbotrat AP) para a solução aquosa, ou seja a adsorção física da enzima tirosinase, presente no extrato bruto, no carvão ativado granular Carbotrat AP, utilizado como suporte, não é forte o suficiente para suportar a agitação constante durante os ensaios de oxidação enzimática. Uma forma de tentar melhorar a fixação da enzima é após a sua adsorção, passar por um processo de reticulação com um agente bifuncional como o

glutaraldeído ou o PVP de modo a tornar a enzima mais resistente (FILHO *et al.*, 2008; GUIDINI *et al.*, 2010).

5.9 Reutilização do suporte para a imobilização

A reutilização do suporte em futuras imobilizações é muito interessante do ponto de vista econômico. A Tabela 20 mostra o resultado da reutilização do suporte, em função da taxa de enzima imobilizada, onde a atividade enzimática inicial se refere à solução enzimática e a atividade enzimática final se refere à atividade estimada das enzimas imobilizadas no suporte.

Tabela 20: Taxa de imobilização de enzima em um mesmo suporte

Utilização do suporte	Atividade Enzimática inicial (U)	Atividade Enzimática final (U)	Taxa de imobilização (%)
1	3000	1440,0	52,0
2	3015	1581,7	47,5
3	3002	1701,2	43,3

A taxa de imobilização decaiu a cada uso do mesmo suporte, porém essa queda foi inferior a 10%, o que pode ser considerado um resultado muito positivo, pois a reutilização do suporte ajudaria a diminuir o custo da utilização da enzima imobilizada, dando uma maior viabilidade econômica para a mesma.

Foram realizados ensaios de oxidação enzimática utilizando a enzima imobilizada em suporte reutilizado (2ª imobilização com o suporte), também reutilizando a enzima imobilizada neste suporte, para a remoção de fenol de uma solução aquosa contendo 10 ppm de fenol.

Os resultados da oxidação enzimática, em função da taxa de remoção do fenol e o teor de proteínas estão expressos na Tabela 21.

Tabela 21: Ensaios de oxidação com enzima imobilizada em CAG Carbotrat AP (2ª utilização do suporte).

Suporte: CAG Carbotrat AP				
Utilização da enzima	[Fenol]i	[Fenol]f	Remoção de fenol	Proteínas (mg/mL)
1	10	0,0	100,0	0,007
2	10	0,3	97,0	0,010
3	10	4,9	50,8	0,003

Observa-se que foi possível alcançar o limite estabelecido pela CONAMA 430 nas duas primeiras utilizações da enzima imobilizada e que houve uma queda brusca na remoção do fenol da 1ª utilização para a terceira. Assim como ocorreu com as enzimas imobilizadas em suporte novo, também foi verificado, porém em uma proporção menor. A queda da remoção ainda pode ser explicada pela perda da enzima durante o ensaio e pela inativação da mesma, presente no carvão ativado.

A perda menor de proteínas, ocasionada pelo desprendimento do suporte, indica que a adsorção da enzima no suporte que já foi utilizado em uma imobilização é mais eficiente quanto à força envolvida para manter a enzima adsorvida. Este fenômeno pode ter ocorrido por uma possível alteração superfície do carvão ativado durante a 1ª imobilização, sendo necessária a realização de mais análises para a investigação deste fenômeno. A Figura 24 a seguir apresenta a comparação da perda de proteínas, durante os ensaios de oxidação enzimática, utilizando (a) suporte novo e (b) suporte reutilizado.

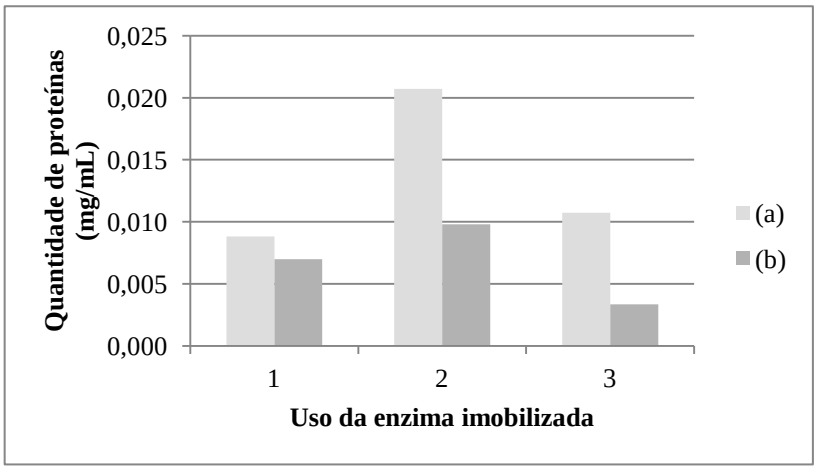

Figura 24: Perda de proteínas imobilizadas em suporte (a) novo e (b) reutilizado, durante o ensaio de oxidação enzimática .

Os resultados do reaproveitamento da enzima imobilizada e da reutilização do suporte em subsequentes imobilizações demonstram uma grande vantagem em relação ao uso da enzima livre, tornando esta metodologia de remoção de fenol mais atrativa ao uso industrial

por conseguir utilizar uma menor quantidade de enzima e de suporte, uma vez que o alto custo da enzima torna sua utilização industrial, na maioria dos casos, impraticável.

6 Conclusões

A metodologia utilizada neste trabalho permitiu imobilização de até 70% de enzimas presentes na solução enzimática, em um suporte de carvão ativado granular. As melhores condições de imobilização foram alcançadas utilizando 10 g de suporte, agitação de 150 RPM e tempo de contato de 90 minutos. Todos os ensaios foram realizados mantendo a temperatura em 25ºC e o pH em 7,0.

Ensaios de oxidação em soluções de fenol com concentrações iniciais na faixa de 10 a 100 ppm , utilizando tirosinase imobilizada em CAG, com atividade enzimática média de 1.500 U, por um período de 2 horas só obtiveram uma concentração final de fenol abaixo do limite exigido pela legislação brasileira para uma solução com concentração inicial de 10 ppm. Entretanto, mesmo em soluções contendo 100 ppm de fenol, foi possível alcançar uma remoção deste composto superior a 50%.

Utilizando tirosinase imobilizada em CAG, com atividade enzimática acima de 2000 U é possível obter remoções de fenol próximos a 100%, em soluções de 10 e 20 ppm de fenol.

A comparação entre a remoção de fenol de uma solução de 10 ppm de fenol usando oxidação enzimática com enzima livre e imobilizada e adsorção em carvão ativado granular comercial mostrou que, em termo de velocidade de remoção, a utilização da tirosinase imobilizada foi bastante efetiva e só obteve uma menor remoção quando comparada com o carvão ativado granular da marca NORIT® 1240, porém a oxidação enzimática degrada o fenol enquanto a adsorção do fenol simplesmente o transfere de fase.

O CAG Carbotrat AP utilizado como suporte para a imobilização da enzima se mostrou ineficiente para a remoção do fenol quando utilizado individualmente, como demonstrado no teste de equilíbrio. Porém nos testes em que este material foi usado como suporte, houve uma maior remoção do produto da degradação formado.

Foi possível utilizar a enzima imobilizada por até três vezes antes da remoção de fenol diminuir em 50%. Essa queda se deu devido à perda do material imobilizado, evidenciado pelas proteínas presentes na solução aquosa após o período de 2 horas dos ensaios de oxidação enzimática.

Também foi possível a reutilização do suporte, sendo que na sua 3ª utilização, taxa de imobilização caiu menos de 10 %. A imobilização da enzima em um suporte usado se

mostrou mais resistente que a imobilização da enzima em um suporte novo, demonstrado pelo teor de proteínas encontrados na solução aquosa ter sido menor em ensaios utilizando a enzima imobilizada em suporte usado.

7 Sugestões para futuros trabalhos

Otimizar a imobilização em carvão ativado granular, de modo a imobilizar mais enzimas em uma quantidade menor de suporte.

Avaliar a interação da enzima com o suporte novo e da enzima com um suporte usado.

Realizar ensaios de oxidação enzimática com tempo de contato maior, para investigar a durabilidade da enzima imobilizada.

Estudar novos materiais que podem servir de matrizes de imobilização e também para adsorção dos compostos gerados pela degradação do fenol. Suportes sugeridos são resinas, membranas e quitosana.

Realizar ensaios de remoção de fenol com efluentes reais.

8 Bibliografia

ABRAHAM, T. E.; JOSEPH, J. R.; BINDHU, L. B. V.; JAYAKUMAR, K. K. **Crosslinked enzyme crystals of glucoamylase as a potent catalyst for biotransformations.** Carbohydrate Research, v. 339, n. 6, p. 1099-1104, 2004.

AGHAV, R.M.; KUMAR, S.; MUKHERJEE, S.N. **Artificial neural network modeling in competitive adsorption of phenol and resorcinol from water environment using some carbonaceous adsorbents.** Journal of Hazardous Materials, v.188, p.67, 2011.

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

ALFAYA, A.A.S.; KUBOTA, L.T.A. **Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores.** Química Nova, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.

AMOTZ, S. **Method for production of an immobilized enzyme preparation by means of a crosslinking agent.** Novo Industri A/S, 1987.

APHA-AWWA-WPCF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 19th Edition. American Public Health Association, Washington, DC, 1995.

AQUASTORE, **Produto carvão ativado granular Carbotrat AP**. Disponível em http://www.aquastore.com.br/default.aspx?code=13&item=453, Acesso em: 10 de novembro de 2015.

ATLOW, S.C.;Bonadonna-Aparo, L.;Klibanov, A.M. **Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. Biotechnology.** Bioengineering. v.26, p.599–603, 1994.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ASTDR), 1998.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*.** Process Biochemistry, v. 47, n. 8, p. 1220-1227, 2012.

BEKER, U; GANBOLD, B; DERTLI, H; GÜLBAYIR, D. D. **Adsorption of phenol byactivated carbon: influence of activation methods and solution pH.** Energy Conversion and Management. v 51, p. 235–240, 2010.

BEVILAQUA, J. V.; CAMMAROTA. M. C.;FREIRE, D. M. G.; SANTANNA, G. L. Jr.; **Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments.** Brazillian Journal of Chemistry, v.19, p.151–158, 2002

BLANCO, M. M. F. S. **Remoção de Fenol em Solução Aquosa com Carvão Mineral.** Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding.** Anal. Biochem. v.72, p.248-254, 1976.

BRITO, M.J.P. **Imobilização de lipase em carvão ativado produzido a partir do caroço de cajá.** Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), UESB, Itapetinga, Bahia, 2016.

BOTELHO, A. C. N. **Estudo preliminar de método de análise para detecção de Streptococcus agalactiae em amostras de leite contaminado para futura aplicação em um biossensor.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

BOYD, E. M.; KILLHAM, K.; MEHARG, A. A. **Toxicityof mono-, di-and tri-chlorophenolsto lux marked terrestrial bacteria, Burkholderia species Rasc c2 and Pseudomonas fluorescens.** Chemosphere, v. 43, n. 2, p. 157-166, 2001.

BRADY, D.; JORDAAN, J. **Advances in enzyme immobilization.** Biotechnology Letters, v.31, n. 11, p. 1639-1650, Nov 2009.

BUSCA, G.; BERARDINELLI, S.; RESINI, C.; ARRIGHI, L. **Technologies for the removal of phenol from fluid streams: a short review of recent developments.** Journal of Hazardous Materials, v. 160, p. 265-288, 2008.

CAO, L.; LANGEN, L. V.; SHELDON, R. A. **Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?** Current Opinion in Biotechnology, v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003.

CARBOMAFRA S.A, INDÚSTRIAS QUÍMICAS. **Boletim Técnico Carvão Ativado 119 Granulado**, Curitiba, Paraná, 2014.

CARBOMAFRA, S.A, INDÚSTRIAS QUÍMICAS. **Preço do Carvão Ativado Granular Carbomafra 119.** Disponível em: http://3123.br.all.biz/carbono-119-g7137, Acesso em 15 de novembro de 2015.

CARBONÍFERA CRICIÚMA S.A. **Boletim Técnico Carvão Ativado Carbotrat AP**, Criciúma, Paraná, 2016.

CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de efluentes industriais.** Engenho Editora Técnica Ltda., 2ª edição ampliada, São Paulo, 2012.

ÇEÇEN, F.; AKTAŞ, Ö. **Activated carbon for water and wastewater treatment: integration of adsorption and biological treatment.** Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH& Co. KGaA, 2012.

CHANG, C. H.; SAVAGE, D. H.; LONGO, J. M. **Carbon – Sulfur Surface Compounds – Novel Regenerable Adsorbents for the Removal of Aromatics Aqueous Solutions.** J. Coll. Interface Sci., v. 79, n. 1, p.178-191. 1981.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; GUPTA, P.; TANEJA, S.C.; QAZI, G.N.; RAJAN, C.R.; PONRATHNAM, S. **Arthrobacter sp. lipase immobilization for preparation of enantiopure masked β-amino alcohols.** Bioorg. Med. Chem. n.17, v.1, p. 29-34, 2009.

CHAVITA, A.C. **Estudo da remoção de fenóis de soluções aquosas através da adsorção em quitosana, degradação enzimática por tirosinase e imobilização de tirosinase em matriz de quitosana.** Dissertação, USP, São Paulo, 2010.

CLARK, R. M.; LYKINS, J. R.; BENJAMIN, W. **Granular activated carbon: design, operation and cost.** Chelsea: Lewis Publishers, Inc., 1991.

CLAUDINO, A. **Preparação de carvão ativado a partir de turfa e sua utilização na remoção de poluentes.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

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

COONEY, D. O. **Adsorption Design for Wastewater Treatment.** Lewis Publishers, USA, 1999.

CRITTENDEN, J. C.; TRUSSELL, R. R.; HAND, D. W.; HOWE K. J.;TCHOBANOGLOUS, G. **Water treatment principles and design.** John Wiley & Sons, Inc., MWH second edition, 2005.

CRUZ, J.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R.; ORTIZ, C. **Optimized preparation of CALB-CLEAs by response surface methodology: The necessity to employ a feeder to have an effective crosslinking.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 80, n. 0, p. 7-14, 2012.

DALLA-VECHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. **Aplicações de lipases imobilizadas em polímeros.** Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004.

DEBELLEFONTAINE, H.; CHAKCHOUK, M.; FOUSSARD, J.N.; TISSOT, D.; STRIOLO, P. **Treatment of organic aqueous wastes: wet air oxidation and wet peroxide oxidation.** Environmental Pollution, V.. 92, p..155-164, 1996.

DECKER, H.; SCHWEIKARDT, T.; TUCZEK, F. **The First Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions?** AngewandteChemie International, Mainz, v.I, n. 45, p. 4546 – 4550, 2006.

DOSCHER, M. S.; RICHARDS, F. M. **The Activity of an Enzyme in the Crystalline State: Ribonuclease S*.** JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, v. 238, p.2399-2406, 1963.

EATON, A. D.; CLESCERI, L.S.; GREENBERG, A. E.; **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 19th ed., American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation: Washington, 1995.

EDWARDS, W.; LEUKES, W.D.; ROSE, P.D.; BURTON, S.G. **Immobilization of polyphenol oxidase on chitosan-coated polysulphone capillary membranes for improved phenolic effluent bioremediation.** Enzyme Microb. Technol. v.25, p.769–773,1999.

ERDEMIR, S.; YILMAZ, M. **Synthesis of calix[n]arene-based silica polymers for lipase immobilization.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 58, n. 1–4, p. 29-35, 2009.

ERTÜRK, M.D.; SAÇAN, M.T.; NOVIC, M.; MINOVSKI, N. **Quantitative structure–activity relationships (QSARs) using the novel marine algal toxicity data of phenols.** Journal of Molecular Graphics and Modelling, v. 38, p. 90 – 100. 2012.

FARIA, R.O. **Análise de polissacarídeos e tirosinase de Lentinulaboryana (Berk&Mont) Pegler: um macrofungo com potencial biotecnológico.** Tese (Doutorado em Ciências: Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FENOLL, L. G. *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/Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1548, p. 1-22, 2001.

FENOLL, L. G. *et al.* **Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates.** TheInternational Journal of Biochemistry & Cell Biology, Murcia, v.I, n. 36, p. 235-246, 2004.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. **Recent developments and applications of immobilized laccase.** Biotechnology Advances, 2012.

FILHO, M.; PESSELA, B. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; FERNANDEZLAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. **Immobilization-stabilization of an β-galactosidase from Thermus sp. strain T2 by covalent immobilization on highly activated supports: Selection of the optimal immobilization strategy.** Enzyme and Microbial Technology, v. 42, n. 3, p. 265- 271, 2008.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. **Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, Campinas, v. II, n. 64, p. 149-154, 23 setembro 2005.

GARCÍA, P. L. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para derteminação de hidroquinonas em cosméticos e medicamentos.** Dissertação, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E.; MESSINA, A. **Phenols removal by immobilized tyrosinase reactor in on-line high performance liquid chromatography.** Anal. Chim. Acta, n.580, p.271–277, 2006.

GOIA, A.; TRAPIDOA, M.;,TUHKANENB, T.; **A study of toxicity, biodegradability, and some by-products of ozonised nitrophenols.** Adv Environ Res v.8, p.303–311, 2004.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.J.; LUQUE, S.; ÁLVAREZ, J.R.; COCA, J. **Recovery of phenol from aqueous solutions using hollow fibre contactors.** Journal of Membrane Science, v. 213, n. 1-2, p. 181-193, 2003.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. **Immobilization of Aspergillusoryzae β-galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking.** Biochemical Engineering Journal, v.52, n. 2-3, p. 137-143, 2010.

GUPTA, P.; DUTT, K.; MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. **Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould Thermomyces lanuginosa using glutaraldehyde.** Bioresource Technology, v. 100, n. 18, p. 4074-4076, 2009.

GUPTA, V.; SUHA, D. MOHAN, K.P. Industrial & Engineering Chemistry Research, v.45, p. 1113 – 1122. 2006.

HAGE, D.; RUHN, P. **An Introduction to Affinity Chromatography.** In: Hage, D. S. (Ed.). Handbook of Affinity Chromatography. Boca Raton: CRC Press, p.3-13, 2005.

HANSCH, C.; MCCARNS, S.; SMITH, C.; DODITTLE, D. **Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity.** Chemical Biological Interaction.v.127, n.61. 2000.

HE, J.; SONG, Z.; MA, H.; YANG, L.; GUO, C. **Formation of a mesoporous bioreactor based on SBA-15 and porcine pancreatic lipase by chemical modification following the uptake of enzymes.** Journal of Materials Chemistry, v. 16, n. 44, p. 4307-4315, 2006.

HODGSON, Richard J. *et al.* **Protein-Doped Monolithic Silica Columns for Capillary Liquid Chromatography Prepared by the Sol− Gel Method: Applications to Frontal Affinity Chromatography.** Analytical chemistry, v. 76, n. 10, p. 2780-2790, 2004.

HOSSEINI, S. H.; BORGHEI, S. M. **Treatment of phenolic wastewater using a moving bed bio-reactor.** Process Biochemistry, v. 40, n. 3 – 4, p. 1027 – 1031, 2005.

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

KAMEDA, E. **Estudo do processo de obtenção de extrato enzimático de Agaricus bisporus para remoção de fenol em efluente sintético.** UFRJ. Rio de Janeiro. 2003.

KAMEDA, E.; LANGONE, M.A.P.; COELHO, M.A.Z. **Tyrosinase extractfromAgaricus bisporus mushroom and its in natura tissue for specific phenol removal.** Environ. Technol., 27, 1209-1215, 2006.

KARAM, I.; NICELL, I.A. **Potential applications of enzymes in waste treatment.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, n.69, p.141-153, 1997.

KATO, M.; SAKAI-KATO, K.; MATSUMOTO, N.; TOYO'OKA, T. **A Protein-Encapsulation Technique by the Sol− el Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography.** Analytical Chemistry, v. 74, n. 8, p. 1915-1921, 2002.

KENNEDY, L. J. ; SELVI, P.K.; PADMANABHAN, A.; HEMA, K.N.; SEKARAN, G. **Immobilization of polyphenol oxidase onto mesoporous activated carbons - isotherm and kinetic studies.** Chemosphere, 69 , 2007, p. 262-270.

KIM, K.; IHM, S. **Heterogeneous catalytic wet air oxidation of refractory organic pollutants in industrial wastewaters: A review.** Journal of Hazardous Materials, v.186, p. 16–34, 2011.

KLIBANOV, A. M.; ALBERTI, B. N.; MORRIS, E. D.; FELSHIN, L. M.; **Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters.** Journal of Appl. Biochem.v.2,p.414–421,1980

KOCHANA, J. *et al.* **Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds.** Microchemical Journal, v. 89, p. 171-174, 2008.

KRAJEWSKA, B. **Application of chitin - and chitosan - based materials for enzyme immobilizations: a review.** Enzyme and Microbial Technology, v. 35, n. 2-3, p. 126-139, 2004.

KUMAR, A. G. ; PERINBAM , K.; KAMATCHI, P. ; NAGESH, N.; SEKARAN, G**. In situ immobilization of acid protease on mesoporous Activated carbon packed column for the production of protein hydrolysates.** Bioresource Technology, v.101, p.1377-1379, 2010.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE R. **Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports.** *J. Biotechnol. v.*119, p.70-75, 2005.

LÓPEZ-MOLINA, D.; HINER, A. N. P.; TUDELA, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N.; **Enzymatic removal of phenols from aqueous solution by artichoke (Cynarascolymus L.) extracts.** Enzyme Microbiology Technology, v. 33, p.738–742, 2003.

LONCAR, N.; BOZIC, N.; ANDELKOVIC, I.; MILOVANOVIC, A.; DOJNOV, B.; VUJCIC, M.; ROGLIC, G.; VUJCIC, Z.; **Removal of aqueous phenol and phenol derivatives by immobilized potato polyphenol oxidase.** Jounal of Serbian Chemistry Society v.76, p.513–522, 2011.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. **Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic–inorganic system.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 118, n. 1–3, p. 334-340, 2009.

MACIEL, R.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L.; DEZOTTI, M. **Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photo-Fenton reactions.** Chemosphere. v. 57, n.7, p. 711-719, 2004.

MALLIK, R.; HAGE, D. S. **Affinity monolith chromatography.** Journal of Separation Science, v. 29, n. 12, p. 1686-1704, 2006.

MANECKE, G. **Immobilization of enzymes by various synthetic polymers.** Biotechnol. Bioeng. Symp., v. 3, n., p. 185–187, 1972.

MANRICH, A.; GALVÃO, C. M. A.; JESUS, C. D. F.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. **Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports.** International Journal of Biological Macromolecules, v.43, n. 1, p. 54-61, 2008.

MARIOTTI, P. M. **Hidrólise de lactose de soro de leite por meio de ?- galactosidase imobilizada.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

MARKO-VARGA, G.; EMNÉUS, J.; LOGORTON; Ruzgas, T.; Trends Anal. Chem. 1995, 14, 319.

MARTINEZ, N. S. S.; FERNANDEZ, J. F.; SEGURA, X. F.; FERRER, A. S**. Pre-oxidation of an extremely polluted industrial wastewater by the fenton's reagent.** Journal of Hazardous Materials, v. 101, n. 3, p. 315-322, 2003.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques.** Enzyme Microb. Technol. v.40, p.1451–1463, 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C. D.; CASTRO, H. F. D.; GIORDANO, R. D. L. C. **Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial.** Química Nova, v. 34, n., p. 831-840, 2011.

MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, J. V.; Di LUCCIO, M. ; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D**. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(2), 2009, p. 440-443.

MESSIKH, N.; SAMAR, M. H.; MESSIKH, L. **Neural network analysis of liquid–liquid extraction of phenol from wastewater using TBP solvent.** Desalination, v. 208, n. 1-3, p. 42-48, 2007.

MILETIĆ, N.; VU OVIĆ, Z.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. **Macroporouspoly (glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins—Versatile immobilization supports for biocatalysts.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 56, n. 4, p. 196-201, 2009.

MISHRA, V.S.; KUMAR, V.; MOHAJARI, V.; JOSHI, J. T. B. **Wet Air Oxidation.** Industrial Engineering Chemical Research. v.34, n.1, p. 2-48. 1995.

MMA - Ministério do Meio Ambiente - **Resolução CONAMA n° 357**, de 17 de março de 2005.

MMA - Ministério do Meio Ambiente - **Resolução CONAMA n° 430**, de 30 de maio de 2011.

NAISH-BYFIELD, S.; COOKSEY, C. J.; RILEY, P. A.; Biochem. J. 1994, 304,155.

NAISH-BYFIELD, S.; RILEY, P. A.; Biochem. J. 1992, 288, 63. 57.

NARANJO, J. C. ; CÓRDOBA, A.; GIRALDO, L.; GARCÍA, V. S.; MORENO-PIRAJÁNC, J. C. **Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,, v.66 p.166-171, 2010.

NASRIN, R. K.; CAMPBELL, M.; SANDI, G.; GOLÁS, J. **Production of micro and mesoporous activated carbon from paper mill sludge - I Effect of zinc chloride activation.** Carbon, v. 38, p. 1905-1915, 2000.

NORIT. **Norit GAC 1240 W Datasheet.** 2012.

ORTEGA, F.; DOMÍNGUEZ, E.; JÖNSSON-PETTERSSON, G.; GORTON, L.; J. Biotechnol.1993, 31, 289.

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

PEDROCHE, J.; DEL MAR YUST, M.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GIRÓN-CALLE, J.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J.; GUISÁN, J. M.; MILLÁN, F. **Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability.** Enzyme and Microbial Technology, v. 40, n. 5, p. 1160-1166, 2007.

PENA, R. F. A. **Atividades que mais consomem água.** Disponível em: http:\\www.brasilescola.com.br/amp/geografia/atividades-que-mais-consomem-agua.htm, acessado em 20 de novembro de 2016.

PERUZZO, F. M.; CANTO, E. L. **Química na Abordagem do cotidiano**, Ed.Moderna, v.1, São Paulo/SP, 1998.

PRIETO, L. M.; RICORDI, R. G.; KUHN, R. C.; FOLETTO, E. L.; MAZUTTI, M. A.; BURKERT, C. A. V. **Evaluation of β-galactosidase adsorption into pre-treated carbon** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3, p.26-29, 2014.

PHU, N.; NGUYEN, N. H.; TRAN, K. T.; PHU, N.; NGUYEN, N. H.; TRAN, K. T. **Characterization and activity of Fe-ZSM-5 catalysts for the total oxidation of phenol in aqueous solutions.** Applied. Catalysis B: Environmental. v.34, n.4, p. 267 – 275. 2001.

QUIOCHO, F. A.; RICHARDS, F. M. **Internolecular Cross Linking of a Protein in the Crystalline state: Carboxypeptidase-A*.** ProcNatlAcadSci U S A, v. 52, n.; p. 833-839, 1964.

QUIOCHO, F. A.; RICHARDS, F. M. **The Enzymic Behavior of Carboxypeptidase-A in the Solid State.** Biochemistry, v. 5, n. 12, p. 4062-4076, 1966.

QUIRÓS, M.; GARCÍA, A. B.; MONTES-MORÁN, M. A. **Influence of the support surface properties on the protein loading and activity of lipase/mesoporous carbon biocatalysts.** Carbon, v. 49, n. 2, p. 406-415, 2011.

REIS, P.; WITULA, T.; HOLMBERG, K. **Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 110, n. 2–3, p. 355-362, 2008.

RODRIGUEZ, M. O.; FLURKEY, W. H.; J. Chem. Educ. v.69, p. 767, 1992.

RODRIGUES, D. S.; MENDES, A. A.; **ADRIANO, W. S.; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 51, n.3–4, p. 100-109, 2008.

RODRIGUES-REINOSO, F.; SÁBIO-MOLINA, M. **Textural and chemical characterization of carbons microporous.** Advances in colloid and interface Science, v. 76-77, p. 271-294, 1998.

ROLFF, M. *et al.* **Copper-mediated Activation of Oxygen.** Christian-Albrechts-Universitadzu Kiel, 2011. Disponível em: http://www.ac.uni-kiel.de/tuczek/research-new/oxygen-activation . Acesso em: 10 dez 2015.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S**. Immobilized enzymes and cells.** Bristol, Adam Hilger, 1987.

ROY, J. J.; ABRAHAM, T. E. **Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 38, n. 1, p. 31-36, 2006.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRÍGUEZ-LOPEZ, J. M.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; Biochim. Biophys. Acta. 1995, 1247, 1.

SANTOS, V. P. S.; **Desenvolvimento de um método para detecção de ácido benzóico em refrescos a base de guaraná.** Dissertação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SEO, S.Y.; SHARMA, V.K.; SHARMA, N. Mushroom **tyrosinase: Recent prospects.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, n. 10, p. 2837-2853, 2003.

SERRA, E.; MAYORAL, Á.; SAKAMOTO, Y.; BLANCO, R. M.; DÍAZ, I. **Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 114, n. 1–3, p. 201-213, 2008.

SHARMA, S.K. **Activated Carbon Treatment.** Lecture Handouts of Unesco-IHE Institute for Water Education, The Netherlands, 2011.

SHELDON, R.A. **Enzyme immobilization: the quest for optimum performance.** Adv Synth Catal v. 349,n.8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. **Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review).** Biocatalysis and Biotransformation, v. 23, n. 3-4, p. 141-147, 2005.

SIGLER, P. B.; SKINNER, H. C. W. **The reaction of diisopropylfluorophosphate with crystals of γ-chymotrypsin**. Biochemical andBiophysicalResearch Communications, v.13, n. 3, p. 236-240, 1963.

SILVA, V. D. M.; DE MARCO, L. M.; DELVIVO,F. M.; COELHO, J. V.; SILVESTRE, M. P. C. **Imobilização da pancreatina em carvão ativado e em alumina para o preparo de hidrolisados de soro de leite.** Acta Scientiarum. Health Sciences, v.27, n.2, p. 163-169, 2005.

SILVA, V. V.; Guilarduci, Mesquita, J. P.; Martelli P. B.; Honória de Fátima Gorgulho, H.F. **Adsorção de fenol sobre carvão ativado em meio alcalino** Quim. Nova, Vol. 29, No. 6, 1226-1232, 2006.

SILVA, L. M. D. C. **Utilização do tecido fúngico (corpo de frutificação) de *Agaricus bisporus* como biocomponente no desenvolvimento de um biossensor amperométrico de fenol.** Dissertação, UFRJ. Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, L.M.C.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. **Development of an amperometric biosensor for phenol detection.** Environmental Technology, v. 32, n. 5, p. 493 – 497, 2011.

SOARES, C.; DE CASTRO, H.; SANTANA, M.; ZANIN, G. **Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 91-93, n. 1, p. 703-718, 2001.

SOARES, J. L. **Remoção de Corantes Têxteis por adsorção em carvão mineral ativado com alto teor de cinzas.** Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

SOUZA, F.B. **Remoção de compostos fenólicos de efluentes petroquímicos com tratamentos sequenciais e simultâneos de ozonização e adsorção.** Dissertação, UFSC, Florianópolis, 2009.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. **The production of fine chemicals by biotransformations.** Current Opinion in Biotechnology, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. **Enzymes on material surfaces.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 93, p. 8-19, 2012.

TOLEDO, L. C.; SILVA, A. C. B.; AUGUSTI, R.; LAGO, R. M. **Application of Fenton's reagent to regenerate activated carbon saturated with organochloro compounds.** Chemosphere, v. 50, n. 8, p. 1049-1054, 2003.

TCHOBANOGLOUS, George; BURTON, Franklin. L.; STENSEL, H. David, **Wastewater engineering, treatment and reuse**, Fourth Edition, Metcalf and Eddy, Inc.; McGraw-Hill Education, 2004.Vieirs *et al.*,2003;

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HOSS, M.J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches**. J. Mol. Catal. B: Enzym. v. 9, p.113-148, 2000.

WIGMANS, T. **Industrial Aspects of Production and use of Activated Carbons.** Carbon, v. 27, n. 1, p. 13-22, 1989.

WU, J.; TAYLOR, KE.;BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; **Optimization of the reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethyleneglycol.** Water Research, v.27, p.1701–1706, 1993.

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

ZAWISTOWSKI, J.; BILIADERIS, C. B.; ESKIN, N. A. M. **Polyphenol Oxidase.** Oxidative Enzymes in Food. Elsevier Applied Science; New York, 1991, pp. 217.

ZHAO, J.; LIU, Z.; SUN, D. **TPO-TPD study of an activated carbon-supported copper catalyst-sorbent used for catalytic dry oxidation of phenol.** Journal of Catalysis, New York, v. 227, n. 2, p. 297-303, 2004.

ZHAO, H.; XIA, S.; MA, P. **Review: Use of ionic liquids as 'green' solvents for extractions.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 80, p. 1089–1096, 2005.

ZHENG, M.-M.; LU, Y.; DONG, L.; GUO, P.-M.; DENG, Q.-C.; LI, W.-L.; FENG, Y.-Q.; HUANG, F. H. **Immobilization of Candida rugosa lipase on hydrophobic/strong cationexchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters.** Bioresource Technology, v. 115, n. 0, p. 141-146, 2012.

ZHOU, G. M.; FANG, H. P. **Co-degradation of phenol and m-cresol in a UASB reactor.** Bioresource Technology. v. 61, n. 1, p. 47 - 52. 1997.

ZHOU, Z.; INAYAT, A.; SCHWIEGER, W.; HARTMANN, M. **Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas.** Microporous and Mesoporous Materials, v. 154, n. 0, p. 133-141, 2012.