



2º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO & GÁS

ESTUDOS PRELIMINARES DE REMOÇÃO BIOELETROQUÍMICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE ÁGUAS RESIDUAIS DE REFINARIA.

Camilo E. La Rotta H.¹, Stephan Lütz², Andreas Liese², Elba P.S. Bon¹

¹Laboratório de Tecnologia Enzimática, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
CT, Bloco A, Ilha do Fundão, 21949-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. elba1996@iq.ufrj.br.

²Forschungszentrum Jülich GmbH, D-52425 Jülich, Germany a.liese@fz-juelich.de

Resumo – Em estudos prévios mostraram à cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago* como uma promissora alternativa para o tratamento dos compostos fenólicos presentes nas águas residuais de refinaria. Porém, a eficiência da remoção enzimática precisa do uso de altas concentrações de peróxido de hidrogênio, que ocasiona a rápida perda da atividade enzimática. A abordagem eletroenzimática permite a geração e o emprego de concentrações baixas de peróxido de hidrogênio sendo estas facilmente controláveis. Desta maneira a estabilidade da enzima pode ser incrementada pelo sistema eletroenzimático.

Assim o método enzimático produz uma ampla faixa de produtos de acordo com cor, concentração e solubilidade que dependeram do valor de pH, concentrações e relações estequiométrica de substrato e peróxido. Foram estabelecidas as melhores condições para a remoção do 4-chlorfenol (4-CP) por precipitação, usando pH 6,0 em ausência de íons cloreto, e uma concentração equimolar de 4-CP e peróxido de hidrogênio de 5,0 mM. Sob estas condições foram observadas as máximas remoção e precipitação de 4-CP. Os experimentos bioeletroquímicos, mostraram também uma alta oxidação de até 90% do fenol inicial. Porém, a presença de precipitados não foi observada. A CPO mostrou ser ativa durante três horas para o ensaio enzimático convencional e até seis hora no caso do ensaio bioeletroquímico.

Palavras-chave: *Caldariomyces fumago*, cloroperoxidase, 4-clorofenol, biodegradação oxidativa, bioeletroquímica.

Abstract - Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* has been previously reported for the oxidation of several phenolic compounds and is emerging as a promising alternative for the treatment of industrial effluents. Nevertheless, a high efficiency of the enzymatic removal means the use of high concentrations of hydrogen peroxide, causing a fast loss of enzyme activity.

The electroenzymatic approach allows a significantly lower and easily controllable hydrogen peroxide formation rate than any other so far. The stability of peroxidase could be significantly increased in this electroenzymatic system.

Using the enzymatic method a distinct pattern of products regarding colour, concentration and solubility was observed in response to pH, substrate concentration and stoichiometry. A higher number of events concerning to product variety and intensity was observed at pH 6,0 in absence of chloride ions, and equimolar concentration of 5,0 mM of 4-chlorophenol and hydrogen peroxide. Under these conditions up to 95% of phenol removal and formation of dark precipitate was observed.

The bioelectrochemical experiment showed also a high phenol oxidation of up to 90% of the initial phenol concentration. Nevertheless, the formation of dark precipitate was not observed. CPO showed to be active for conventional and bioelectrochemical experiments, during three and six hours, respectively.

Key-words: *Caldariomyces fumago*, chloroperoxidase, 4-chlorophenol, oxidative biodegradation, bioelectrochemistry.

1. Introdução

A indústria do petróleo, que se iniciou 150 anos atrás com a exploração comercial do primeiro poço, no Texas, EUA em 1859, e com a abertura da primeira refinaria para a produção de querosene dois anos depois, evoluiu para uma atividade industrial de grande porte, com processos altamente sofisticados de prospecção e produção. Apesar desta indústria preocupar-se com práticas de trabalho seguras, somente nos últimos 20 anos o interesse com a preservação ambiental e o desenvolvimento de tecnologias mais limpas recebeu destaque. Assim, a indústria petroquímica investe atualmente no desenvolvimento de tecnologias de menor impacto ambiental, que sejam, entretanto, compatíveis com a eficiência e produtividade dos processos de produção e também no tratamento de resíduos e efluentes.

Os compostos fenólicos destacam-se como substâncias altamente poluentes, embora nem todos tenham essa característica. Assim, a degradação natural de materiais vegetais origina taninos, polifenóis que dão cor e sabor às águas potáveis. Por outro lado o fenol e compostos fenólicos clorados, aminados, nitrados e metoxi-substituídos, provenientes das indústrias do petróleo e químicas são cáusticos e venenosos. Os fenóis podem ser encontrados em vários insumos químicos usados em mineração, indústria têxtil, madeira e papelaria, assim como em substâncias empregadas nos processos de fundição, tais como óleos desmoldantes, refrigerantes, ceras e graxas (AOUN S. *et al.*, DUNFORD H.B., STUBBLEFIELD, W.A. *et al.*). Na indústria petroquímica, podem ser encontrados em diferentes processos industriais como o processamento das diferentes frações do óleo bruto, na fabricação de tintas, resinas e plásticos e ainda em resíduos da conversão do coque.

A redução parcial do oxigênio a peróxido de hidrogênio e superóxido ocorre naturalmente na maioria dos sistemas biológicos. Estes produtos altamente oxidativos e potencialmente perigosos são degradados por enzimas tais como a catalase e a superóxido dismutase. Outros biocatalisadores tais como as oxidases laccase (LAC) de *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Cerrena unicolor* e *Dichomitus squalens* e tirosinase (PPO) de *Agaricus sp* e as peroxidases “horse-radish” peroxidase (HRP) de raiz forte, lignina peroxidase (LiP) de *Phanerochaete crysosporium* e *Streptomyces viridosporus* e a cloroperoxidase (CPO) de *Caldariomyces fumago*, são também capazes de utilizar o peróxido de hidrogênio e oxidar substratos tais como compostos fenólicos (Aitken M.D. *et al.*, 1993; Carmichael R. *et al.*, 1985; Courteix .A *et al.*, 1995 a,b). Estas enzimas são conhecidas por terem uma baixa seletividade catalítica, sendo capazes de oxidar famílias de compostos contaminantes presentes em águas residuais. Dependendo dos biocatalisadores, das condições reacionais e dos substratos, são formados produtos solúveis ou derivados oligoméricos e poliméricos, que quando insolúveis podem ser separados por filtração. Alguns dos produtos de degradação enzimática podem corresponder a compostos metabolicamente compatíveis que poderiam ser utilizados como nutrientes em um subsequente tratamento biológico.

O uso de enzimas em biocatálise ambiental é relativamente recente, estando esta área em desenvolvimento no mundo todo. Considerando a variedade de oxidases e peroxidases microbianas e de origem vegetal existentes e a diversidade estrutural de compostos poluentes potencialmente degradáveis por via enzimática, é importante que se aprofundem os estudos sobre os mecanismos de oxidação e produtos formados em diferentes condições reacionais. Estes dados possibilitarão a exploração adequada do potencial oxidativo dos biocatalisadores para o tratamento de poluentes específicos ou de efluentes complexos.

No nosso caso, esta sendo estudada a bioeletrocatalise homogênea, aonde o peróxido de hidrogênio que é consumido nas reações catalisadas por peroxidases será gerado continuamente *in situ*, pela redução catódica do oxigênio dissolvido no meio reacional. Como nas reações bioeletroquímicas o peróxido é produzido e consumido continuamente garante-se a proteção do biocatalisador da inativação por excesso de peróxido. Os reatores ou células de bioeletrocatalise podem ser usados para o estudo de diferentes reações de peroxidação, incluindo reações de oxidação enantioseletiva para a obtenção de produtos a serem usados em química fina (A. LIESE *et al.*, 2002a, 2000b) ou de degradação de poluentes como fenóis (LA ROTTA C.E.H., *et al.*, 2002a). A combinação da eletroquímica com a catálise enzimática vem ao encontro à necessidade de desenvolvimento de sistemas reacionais com alta eficiência e baixo custo, visto que as reações usam elétrons como reagentes de baixíssimo custo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Condições reacionais para remoção biocatalítica convencional de 4-clorofenol

Nestes testes, que visam avaliar a oxidação do 4-CP pela enzima CPO, foram utilizadas as melhores condições reacionais determinadas em estudos prévios (LA ROTTA C.E.H., *et al.*, 2002a e 2002b), assim: 3,5 UI de CPO /mL, 5 mM substrato e 5 mM H₂O₂; 30°C, pH 6,0 em ausência de ions cloreto. O grau de remoção do fenol e a geração dos produtos da reação foram determinados a partir de reações em batelada de 100 mL. A fim, de garantir a estabilidade da enzima, esta foi adicionada em pulsos durante os minutos iniciais da reação. O tempo total de reação foi 20 horas.

2.2. Condições reacionais para oxidação enzimática convencional de 4-clorofenol

Espera-se que neste sistema a estabilidade da cloroperoxidase duplamente beneficiada pela manutenção no sistema reacional de baixas concentrações residuais de peróxido. Como teores significativos de solventes orgânicos talvez sejam necessários para a solubilização de alguns substratos espera-se um melhor desempenho da enzima. As condições reacionais utilizadas foram: 3,5 UI de CPO /mL, 5 mM de 4-CP; 30°C; pH 6,0 em ausência de ions cloreto; Potencial: -0.6 V; Corrente: 52,3 c; Amperagem: 76 mA. O tempo total de reação foi 20 horas.

2.3. Análise das misturas reacionais.

O grau de remoção do 4-CP, assim como a formação dos diferentes produtos serão acompanhadas por Espectrofotometria UV-Vis, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS).

3. Resultados

Inicialmente a análise por CLAE foi realizada diretamente a partir das misturas reacionais que proporcionaram o nível máximo de remoção para cada o 4-CP. Deve ser mencionado que o processo cromatográfico empregado não permitiu a separação de produtos de excessivo peso molecular, ou que não foram solúveis na fase móvel empregada. A **figura 1**, mostra os perfis obtidos para os extratos provenientes dos sobrenadantes das misturas reacionais que apresentaram o nível máximo de remoção por precipitação sob uma mesma relação equimolar de 4-CP : peróxido.

Embora tenham sido avaliados extratos de misturas reacionais com tempos de reação maiores de até 20 horas. Não foram observadas modificações substanciais nos cromatogramas obtidos para tempos de reação acima dos 40 minutos.

Pode ser observado que durante os primeiros 3 min de reação, a degradação do fenol atinge aproximadamente 95-98%, aparecendo durante este período, quantidades similares do primeiro e segundo derivado (1,2-quinona e bifenila, respectivamente) . Neste ponto a concentração dos derivados oxidados formados foi superior em 10 vezes à quantidade de fenol residual presente no meio, 4 vezes inferior à quantidade inicial de composto fenólico. Assim, os derivados que permaneceram em solução representaram aproximadamente 20% do fenol total, sendo o 80% restante correspondente aos produtos oligo e poliméricos formados e que foram removidos pela precipitação.

A **figura 2** mostra os cromatogramas obtidos por CLAE dos precipitados obtidos a partir de misturas reacionais contendo 4CP em concentrações equimolares com peróxido (5,0 mM). Podendo ser observados pelo menos 8 produtos de degradação diferentes com pesos superiores ao composto parental. Isto mostra claramente a formação sucessiva de intermediários de maior peso molecular até a obtenção de um derivado de alto peso molecular observado com um tempo de retenção de aproximadamente de 16 min.

Os dados obtidos para tempos maiores não demonstraram uma significativa variação na composição dos extratos, sugerindo portanto que a formação dos diferentes intermediários oligoméricos acontece com tempos menores a 40 min. Porém, foi observado que após 40 minutos de reação observa-se o aumento na quantidade do segundo derivado formado e diminuição da quantidade do primeiro derivado com aparecimento de picos correspondentes a compostos de baixo peso molecular. Com aumento na quantidade dos produtos oligo e poliméricos. A partir da cinética de degradação de 4-CP foi observada a perda de atividade da CPO em menos de 3 horas. Porém, altos níveis de remoção de até 95% foram alcançados em menos de 30 min.

O ensaio no reator bioeletroquímico usou as condições de máxima degradação que já tinham sido estabelecidas, em termos de pH, e temperatura ótimos e concentração de 4CP (5mM). Porém foram observado algumas mudanças no tipo de produto obtido. Assim, foi observada uma rápida oxidação do 4-CP (ver **Figura 3**), para dar lugar a seu derivado oxidado mais abundante 4-Cloro-1,2-quinona. Embora no final do experimento foi achada uma degradação (oxidação) de até 90% do fenol inicial, não observada a formação de precipitado. Porém, quando tiradas algumas das amostras do reator para ser dosada a atividade da enzima (ex. amostra 6 h), foi observado que adicionando peróxido a precipitação acontecia. E neste caso enzima so mantinha 20% da sua atividade inicial. Pressupõe-se que a precipitação tem relação direta tanto com a atividade da enzima e com a concentração alta de peróxido no meio reacional.

O nosso próximo passo será , definir as melhores condições bioquímicas e bioeletroquímicas que permitam a formação de precipitados a partir dos produtos de oxidação do 4-CP, sem adição de peróxido de hidrogênio y mantendo as condições de estabilidade alcançadas com o uso da geração bioeletroquímica de peróxido de hidrogênio.

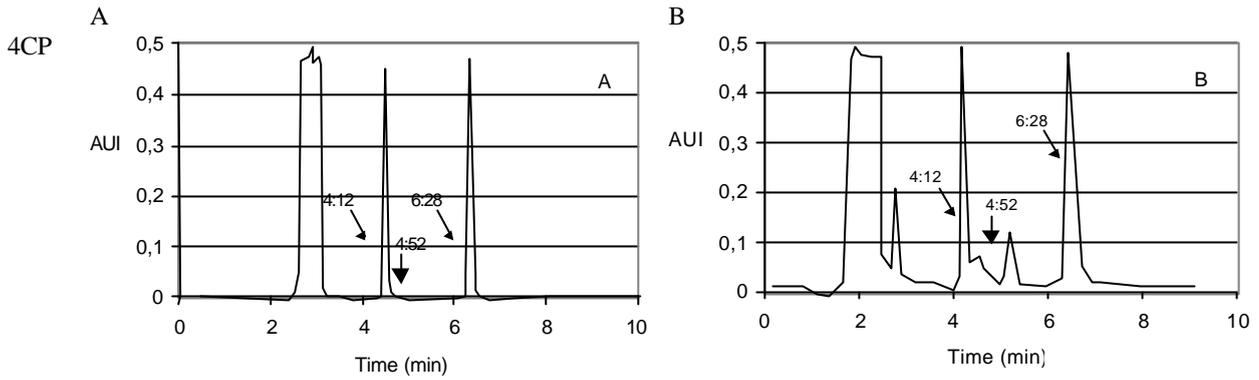


Figura 1. Análise por CLAE para os extratos provenientes dos sobrenadante das misturas reacionais avaliadas sob as condições para máxima remoção para 4CP, MCR e 3MP (5,0 mM), peróxido (5,0 mM), tampão fosfato 100 mM pH 6,0 Tempos de reação 3 min (A) e 40 min (B) Primeiro pico corresponde ao TCA (ác. tricloro acético) adicionado antes do análise cromatográfico.

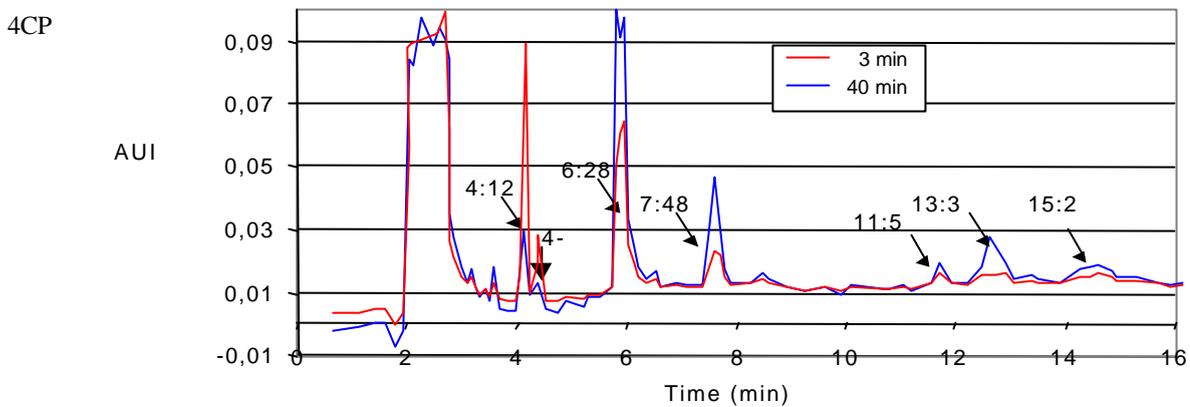


Figura 2. Análise por CLAE para os extratos provenientes dos precipitados obtidos a partir das misturas reacionais avaliadas sob as condições para máxima remoção para 4CP (5,0 mM), peróxido (5,0 mM), tampão fosfato 100 mM. Primeiro pico corresponde ao TCA (ác. tricloro acético) antes do análise cromatográfico.

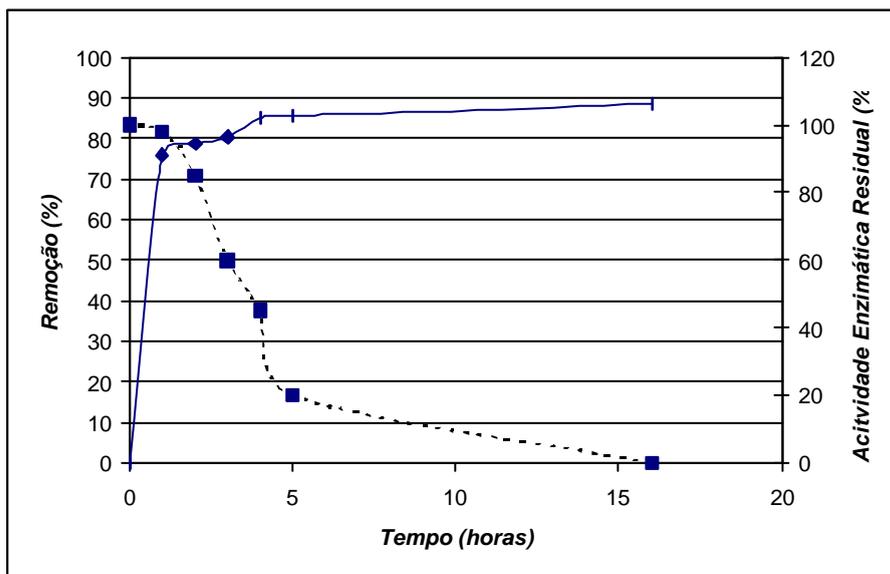


Figura 3. Cinética de degradação de 4-clorofenol por bioeletroquímica. Percentagem de remoção (—) e Atividade Enzimática Residual (- - -).

4. Agradecimentos

Agradecemos aos Doutores Andreas Liese e Stephan Lütz do Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich – Germany, pela sua colaboração na execução dos experimentos de bioeletroquímica. A CNPq (Brasil) e DAAD (Alemanha) pelo financiamento do projeto de colaboração UFRJ/IQ - Forschungszentrum Jülich GmbH. Este trabalho de pesquisa foi desenvolvido com apoio de uma bolsa de doutorado da Agência Nacional do Petróleo – Brasil através do programa de recursos humanos PRH-1.

5. Referências

- A. LIESE, S. LÜTZ. *Relevanz der Elektrochemie in oxidativen Biotransformationen* GDCh Monographie der GDCh-Fachgruppe Angewandte Elektrochemie: Elektronentransfer in Chemie und Biochemie (J. Russow, H.J. Schäfer) 23 pp 305-308. 2002a
- A.LIESE, K. SEELBACH, C. WANDREY. *Industrial Biotransformations*, Ed. Wiley –VCH. Federal Republic of Germany. 2000b.
- AITKEN M.D., MASSEY I.J., CHEN T., HECK P.E.; Characterization of reaction products from enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Research* 28 (9). pp 1879-1889. 1993
- AOUN S., BABOULÈNE M.; Regioselective Bromohydroxylation of alkenes catalysed by chloroperoxidase: Advantages of the immobilization of enzyme on talc. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4. pp 101-109. 1998
- CARMICHAEL R., FEDORAK M.P., PICKARD M.A.; Oxidation of phenols by chloroperoxidase *Biochemistry Letters* 7 (4). pp 289-294. 1985
- COURTEIX A., BERGEL A.; Horse-Radish peroxidase catalyzed hydroxylation of phenol I. Thermodynamic analysis *Enzyme and Microbial Technology* 17. pp 1094-1100. 1995a
- COURTEIX A., BERGEL A., Horse-Radish peroxidase catalyzed hydroxylation of phenol II. Kinetic Model *Enzyme and Microbial Technology* 17. pp 1087-1093. 1995b
- DUNFORD H.B., Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. *Peroxidases in Chemistry and Biology* . Everse J., Everse K.E., and Grishman M.B.. 2. pp. 1-24, CRC Press, Boca Raton, Fla USA. 1991
- DURAN N., ESPOSITO E., Potential application of oxidative enzymes and phenol oxidized-like compounds in wastewaters and soil treatment: A review. *Applied Catalysis B: Environmental* 28. pp. 83-99. 2000
- LA ROTTA C.E.H. Degradation de compostos fenólicos de efluentes de refinaria por Cloroperoxidase de *Caldariomyces fumago*. Tese de Mestrado em Ciências – Depto. Bioquímica – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2002
- LA ROTTA C.E.H., BON E.P.S. 4-chlorophenol degradation by chloroperoxidase from *C. fumago* – formation of insoluble products. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98-100. pp 191-203. 2002
- STUBBLEFIELD, W.A.; MAKI, W. Environmental safety assessment of oil refinery effluents. In: BERGMAN, H.L., KIMERLE, R.A., MAKI, A.W. eds. *Environmental hazard assessment of effluents*. New York, Pergamon Press, pp. 282-296 . 1985