

EXTRAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS A PARTIR DE FONTES ALTERNATIVAS PARA O TRATAMENTO DE ÁGUA E EFLUENTES ¹

Rafaela Dexcheimer Alves², Everton Skoronski³, Viviane Trevisan⁴

¹ Vinculado ao projeto “Extração e imobilização de enzimas a partir de fontes alternativas para o tratamento de água e efluentes”

² Acadêmica do Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária – CAV – Bolsista PROBITI/UDESC

³ Orientador, Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária – CAV – everton.skoronski@udesc.br

⁴ Co-orientadora, Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária – CAV – viviane.trevisan@udesc.br

O 2,4 – Diclorofenol (2,4 – DCP) é o principal produto de degradação do herbicida amplamente utilizado 2,4-D, sendo um composto fenólico e não biodegradável. Ele é considerado persistente quando em contato com o meio ambiente, tornando-se de extrema importância o uso de técnicas alternativas para realizar sua remediação. A batata yacon (*Mallanthus sonchifolius*) é uma planta que pode ser cultivada com sucesso no Brasil e apresenta a enzima peroxidase em sua casca, a qual é um biocatalisador atrativo para acelerar a bioconversão de compostos fenólicos por oxidação com peróxido de hidrogênio. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi realizar a extração e aplicação da enzima peroxidase obtida da batata yacon na degradação do composto 2,4 – DCP, livre e imobilizada, bem como identificar os subprodutos gerados na reação. Comparativamente, utilizou-se a enzima comercial *horseradish* peroxidase (HRP), a qual vem sendo aplicada com eficiência em diversos efluentes industriais.

Na primeira etapa, foi obtido o extrato de peroxidase do yacon com 100 gramas de sua casca triturada com 100 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 0,1 mol/L, contendo as enzimas em sua forma livre. A solução foi filtrada à vácuo, e o extrato misturado com 0,05 gramas de polivinilpolipirrolidona (PVPP), agitada por 30 minutos em banho de gelo e em seguida centrifugada a 4.000 rpm por 20 minutos. Na sequência foi realizada a medida de atividade enzimática total utilizando como substrato padrão o ácido pirogálico. O acompanhamento desta reação ocorreu por espectrofotometria UV-Vis com leitura no comprimento de onda $\lambda = 410$ nm para monitoramento da formação de purpurogalina. A reação foi iniciada com a adição de 160 μ L de peróxido de hidrogênio 30% atuando como substrato, em 100 μ L de extrato enzimático e 2,1 mL de água ultrapura, sendo a reação encerrada pela adição de 150 μ L de solução de ácido sulfúrico 1 mol/L. Posteriormente, realizou-se o ensaio de tratabilidade, o qual foi conduzido com uma amostra de 100 mL de água contaminada sinteticamente com 50 mg/L de 2,4 – DCP em pH próximo a 7,00. A quantidade de enzimas peroxidase, provenientes do extrato da batata yacon ou HRP comercial, foram dosadas de forma a gerar uma concentração próxima de 1,5 U/mL. Em seguida, 700 μ L de peróxido foram adicionados e a reação levada à incubadora *shaker*, em um período de 180 minutos e temperatura de 30°C, para reagir e degradar. Após a reação, as amostras foram removidas para análise de fenóis totais de forma colorimétrica utilizando o método da 4-aminoantipirina.

Alternativamente à sua forma livre, foi realizada a imobilização da enzima yacon existente no extrato com óxido de grafeno, via ligação covalente. Foi selecionado como modelo esta matriz devido à experiência do grupo com a imobilização de enzimas HRP realizada em outro projeto. Para a imobilização foram utilizados 50 mL de óxido de grafeno previamente

produzido pelo método de Hummer, 20 mL de água ultrapura, 25 mL de tampão MES (ácido 2(N-morfolino) etanosulfônico) em pH 6,0 a 200 mol/L, e 25 mL de solução NHS (N-Hidroxisuccinimida). A suspensão foi mantida em agitação ultrassônica por 30 minutos. Após, foi adicionado 2,5 mL de solução EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), realizada a remoção de excesso de reagente com tampão MES a 50 mol/L e finalmente adicionado 10 mL de extrato enzimático. Por fim, os produtos gerados na reação foram analisados por técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-MS). Inicialmente os produtos da reação foram extraídos da água utilizando clorofórmio e essa solução foi utilizada para injeção, sendo utilizado um método padrão do equipamento para análise de compostos semivoláteis.

Os resultados obtidos demonstram que a peroxidase obtida da casca da batata Yacon é fonte alternativa promissora, comparativamente à enzima comercial HRP, apresentando uma taxa de conversão média de $70\pm 9\%$ enquanto a HRP foi responsável por uma bioconversão de $80\pm 7\%$ em média. Mesmo apresentando uma taxa de conversão menor, apresenta como vantagem o fato de ainda ser pouco explorada para esse uso, enquanto a enzima HRP é bastante valorizada para uso em diagnósticos clínicos e, portanto, seu valor agregado para este fim é uma barreira para uso em fins menos nobres e com demanda materiais de baixo custo como o tratamento de águas e efluentes. Com relação à imobilização em óxido de grafeno, não foram obtidos resultados promissores como os obtidos pelo grupo utilizando a enzima HRP. Neste caso, o trabalho com a enzima HRP foi em sua forma purificada, enquanto o extrato da batata yacon é apenas parcialmente purificado. Assim, substâncias presentes devido a sua extração podem ter interferido negativamente no processo de imobilização e, portanto, é necessário que a enzima peroxidase da batata yacon seja purificada por cromatografia em um próximo estudo para uma nova rodada de testes de imobilização.

Por fim, a avaliação qualitativa dos compostos produzidos pela oxidação do 2,4-diclorofenol mediada pela enzima HRP ou obtida da batata yacon apresentou as mesmas classes de compostos. De forma geral, foi observada a formação de compostos com menor quantidade de cloro ou nenhum cloro em suas estruturas como 2-cloroquinona, 1-cloro-2-metilciclohexeno, 2-(1-feniletil)fenol e 2-[bis(4-hidroxifenil)metil]fenol. Assim, embora não exista de fato uma remoção do contaminante alvo da água, esse processo mostra potencial para aplicações ambientais devido a bioconversão do 2,4-DCP em compostos de suposta menor toxicidade devido a decoloração.

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que a enzima yacon é um biocatalisador com menor capacidade de conversão de 2,4-DCP comparada à enzima HRP comercial, porém atrativa por ainda não ser explorada para este fim. Em trabalhos futuros deve-se explorar a possibilidade de purificação da peroxidase obtida de yacon por cromatografia para avaliar a possibilidade de imobilização, potencializando seu uso em vários ciclos de reação. A caracterização dos compostos gerados gera motivação para testes futuros com o objetivo de quantificação destes compostos, detalhamento do mecanismo de reação, e testes de toxicidade para acompanhamento da segurança ambiental desse processo de tratamento.

Palavras-chave: Batata Yacon. Compostos Fenólicos. Tratamento de Efluentes.