



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

IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO ENZIMÁTICA DE 4-CLOROFENOL POR CLOROPEROXIDASE DE *Caldariomyces fumago*

Adriana S. de Oliveira, Camilo E. La Rotta H, Elba P. S. Bon¹

¹Instituto de Química - UFRJ, Laboratório de Tecnologia Enzimática – CT - bloco A –
5^ª Andar- Lab.539, RJ, Brasil, elba1996@iq.ufrj.br

Resumo – Os compostos fenólicos correspondem a poluentes tóxicos amplamente encontrados distribuídos nos efluentes das indústrias petroquímica, mineira e papelera. O uso de enzimas oxidativas como oxidases e peroxidases está destacando-se como uma alternativa promissora em pré- e pós-tratamentos de efluentes industriais contendo fenóis. Em estudos prévios mostraram uma remoção de 4-clorofenol (4-CP) por cloroperoxidasas em torno de 98%, a partir de meios reacionais contendo 5,0 mM de 4-CP. Neste trabalho deseja-se dar continuidade ao estudo da degradação de 4-clorofenol por CPO de *Caldariomyces fumago*, focalizando-se na identificação dos produtos formados. A identificação é um parâmetro vital na avaliação da toxicidade destes produtos. Para isto, foram empregadas as condições que permitiram a obtenção simultânea de produtos solúveis e insolúveis. Assim sendo, foi utilizada uma mistura reacional contendo 6,0 UI/mL de CPO, uma relação estequiométrica de 5,0:5,0 mM de 4-CP e H₂O₂, em tampão fosfato 100 mM pH 6,0 em ausência de íons cloreto. Cada grupo de produtos foi por sua vez separado através de cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído através de um gradiente de clorofórmio:metanol. Os produtos purificados foram tentativamente identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, ressonância magnética nuclear e espectroscopia no infravermelho.

Palavras-Chave: *Caldariomyces fumago*, cloroperoxidase, 4-clorofenol, quinonas, biodegradação oxidativa

Abstract – This work gives continuity to the 4-chlorophenol (4CP) enzymatic degradation studies, focusing on the purification and identification of the formed soluble and insoluble products. This identification corresponds to an important parameter when structure-activity and toxicity studied will be performed. Thus, reaction mixtures containing 6,0 UI CPO concentration, 5.0/5.0 mM stoichiometric relation of 4-CP/hydrogen peroxide, in 100mM potassium phosphate buffer pH 6.0, were used to obtain simultaneously, colored soluble, low soluble and insoluble products. Products were firstly separated by filtration, soluble and precipitate portions and were eluted in a silica-gel column using chloroform:methanol gradient, with simultaneous thin layer chromatography. For each fraction obtained was performed in reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC-RP) using an isocratic methanol:water elution. Structure analysis of the isolated products were performed using IR spectrophotometry, nuclear magnetic resonance and GC-Mass spectrometry

Keywords: *Caldariomyces fumago*, cloroperoxidase, 4-chlorophenol, quinones, oxidative biodegradation

1. Introdução

Os compostos tóxicos mais encontrados no meio ambiente são os fenóis e derivados cloro e metoxi substituídos e aminas aromáticas presentes nos efluentes da indústria petroquímica. Estes compostos fazem parte da composição de vários materiais usados na operação das refinarias, como o óleo hidráulico e os líquidos refrigerantes. Outras atividades industriais que contaminam o meio ambiente com fenóis são a conversão de carvão e a produção de resinas, plásticos, corantes e papéis.

Vários estudos relatam o uso de enzimas oxidativas, como lacases de *Trametes versicolor* e tirosinase ou polifenol oxidase de *Agaricus bisporus*, lignina peroxidase de *Phanerochaete crysosporium* e de *Steptomyces viredosporus* e cloroperoxidasas de *Caldariomyces fumago* na degradação de compostos fenólicos. Assim, o uso de oxidases e peroxidases está se destacando como uma alternativa promissora no tratamento de efluentes contendo mono, di e polifenóis substituídos, aminas aromáticas, pesticidas e hidrocarbonetos. Por se tratarem de compostos tóxicos para muitos microorganismos, o uso do tratamento biológico desses efluentes não é eficiente, sendo um pré-tratamento enzimático, uma possibilidade a ser considerada (AITKEN et al., 1993; CARMICHAEL et al., 1985)

Neste trabalho deseja-se estabelecer um protocolo de isolamento, purificação e identificação dos produtos obtidos da oxidação enzimática de 4 - clorofenol (4-CP) por cloroperoxidase (CPO) do fungo *Caldariomyces fumago*. As condições empregadas são aquelas em que cerca de 98% do fenol é removido do meio. O 4-CP é um composto comum em efluentes de refinaria e apresenta alta toxicidade. A identificação dos seus produtos de degradação auxilia na sua caracterização em termos de hidrofiliicidade e toxicidade, bem como o entendimento do mecanismo de oxidação por CPO, e assim sendo a melhor adequação deste processo ao tratamento de efluentes.

2. Degradação enzimática de 4-clorofenol

Na mistura reacional estão presentes cloroperoxidase 6,0 UI (0,5mM), 4 - CP 5,0 mM e peróxido de hidrogênio 5,0 mM em tampão fosfato de potássio 100mM, pH6. A enzima foi adicionada em cinco pulsos durante um minuto. Após três minutos, a reação foi interrompida com a adição de HCl 1,0N.

Estas condições enzimáticas foram selecionadas por removerem cerca de 98 % de fenol do meio, além de originarem diferentes tipos de produtos em comparação com outras condições reacionais, conforme apresentado na figura 1. Em destaque a condição reacional utilizada e a formação de três tipos de produtos (LA ROTTA e BOM, 2002): Produto colorido (FPC), produto de baixa solubilidade (FPP) (solução turva) e produtos precipitados (FPD).

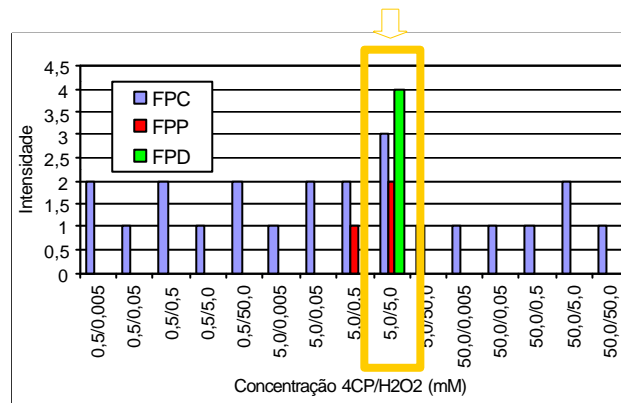


Figura 1. Efeito de diferentes relações estequiométricas Fenol : Peróxido de hidrogênio na degradação enzimática do 4 - CP por CPO.

3. Separação dos produtos derivados da degradação enzimática de 4 - clorofenol

Os produtos obtidos foram separados inicialmente em solúveis e insolúveis por filtração. Os compostos solúveis, possivelmente quinonas, foram extraídos com éter e o material precipitado foi solubilizado em clorofórmio. Cada grupo de produtos foi por sua vez separado através de cromatografia de coluna em sílica-gel e eluído através de um gradiente de clorofórmio:metanol. Foram obtidas 20 frações na separação do material solúvel e 10 para o insolúvel. Os compostos majoritários foram separados para serem analisados.

4. Identificação dos produtos

4.1. Compostos solúveis:

A análise por CLAE das frações majoritárias (18, 19 e 20) da porção solúvel, apresentou apenas um único composto que elui no tempo de retenção próximo ao das quinonas utilizadas como padrões. Além disso, a análise do perfil de fragmentação dos espectros de Massas e das bandas presentes no espectro de Infravermelho do material solúvel (ver tabela 1) permitiram a proposição de uma quinona para o composto majoritário.

Tabela 1. Bandas do espectro de infravermelho do composto presente nas frações 18,19 e 20

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Deformação axial da ligação:
3419	OH
1715	C=O
1456 e 1630	C=C
1075	C-O

4.2. Compostos insolúveis

As bandas do espectro de infravermelho indicam que os compostos majoritários insolúveis presentes nas frações 4 e 9 são aromáticos e clorados, possivelmente produtos oligoméricos provenientes da reação de polimerização entre quinonas e/ou entre estas e o 4-CP. A estrutura dos produtos precipitados ainda não foi elucidada, sendo importante a realização da análise por RMN.

Tabela 2. Bandas do espectro de infravermelho do compostos insolúveis presente nas frações 4 e 9.

Comprimento de onda (cm-1)		Deformação axial da ligação
Fração 4	Fração 9	
3335	3412	OH
1709	1709	C=O
1608 e 1586	1576 e 1539	C=C (núcleo aromático)
721	721	C-Cl

5. Trabalhos Futuros:

Estabelecer novos protocolos de isolamento e purificação de quinonas em cromatografia em coluna usando resinas como Sephadex LH-20 ou Amberlite XAD-2 (VAN DEN BERG e LABADIE, 1989).

Para a elucidação estrutural das quinonas e outros produtos desconhecidos serão utilizadas técnicas de ressonância nuclear magnética prótonica e de Carbono 13.

6. Agradecimentos

Trabalho realizado com apoio do Programa de Recursos Humanos PRH-1 da Agência Nacional de Petróleo – ANP, através de uma bolsa de graduação.

7. Referências

- AITKEN M.D., MASSEY I.J., Chen T., HECK P.E. Characterization of reaction products from enzyme-catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Res* v.28, n. 9, p 1879-1889, 1993.
- CARMICHAEL R., FEDORAK M.P., PICKARD M.A. Oxidation of phenols by Chloroperoxidase *Biochemistry letters*, v. 7, n.4., p 289-294, 1985.
- LA ROTTA, C.E.H., BON E.P.S. 4-Chlorphenol degradation by chloroperoxidase from *C. fumago* – Formation of insoluble products, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 98-100. p. 191-203, 2002.
- VAN DEN BERG, A.J.J.,LABADIE, R.P. Quinones. In:HARBORNE, J.B. (ed). *Methods in plant biochemistry*.v.1. London Academic, cap 13, p.451-491, 1989.