

REMOÇÃO DE FENOL DE EFLUENTES INDUSTRIAIS UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO DE *Agaricus bisporus*

Kameda, E.¹, Langone, M.A.P.² e Coelho, M.A.Z.¹

¹Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Bloco E, Lab 113. Cidade Universitária – 21949-900. RJ, RJ – Brasil, e-mail: alice@eq.ufrj.br¹

²Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Pav. Haroldo Lisboa da Cunha, 3º andar sala 310, Rua São Francisco Xavier, 524 CEP: 20550-013. RJ, RJ – Brasil, e-mail: langonem@uerj.br

Resumo – Os fenóis são poluentes tóxicos encontrados em diversos efluentes industriais, principalmente os provenientes da indústria de petróleo. Estas substâncias acarretam vários riscos à saúde humana. A enzima tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma polifenol oxidase presente em diversos seres vivos, tais como o cogumelo *Agaricus bisporus*. O tecido do fungo apresenta grande disponibilidade da enzima, provendo extratos com alta atividade sem a necessidade de uma extensiva purificação. O extrato de tirosinase é capaz de transformar fenóis em produtos menos solúveis em água, o que prova seu potencial como biocatalisador em aplicações envolvendo a biomodificação de fenóis ou a biorremediação de efluentes contendo fenóis. O presente trabalho propõe a utilização do extrato bruto do cogumelo *Agaricus bisporus* na remoção de fenol em efluentes sintéticos da indústria de petróleo. O extrato bruto foi utilizado em reações enzimáticas em meio aquoso contendo soluções de fenol sem controle de pH. A concentração inicial de fenol em todos os meios de reação foi 100 mg/L e concentrações enzimáticas de 50, 100, 200 e 400 U/mL foram testadas. As reações com 200 U/mL e 400 U/mL de atividade enzimática conduziram a uma remoção de 90% do fenol. A toxicidade para as amostras contendo 100 ppm de fenol tratadas e não tratadas com o extrato enzimático foi analisada utilizando bioensaios com *Artemia salina* (crustáceo) e *Brachydanio rerio* (peixe). A amostra tratada mostrou-se menos tóxica.

Palavras-Chave: tirosinase, biorremediação, fenol, tratamento de efluentes, tratamento enzimático, toxicidade

Abstract – Phenols are toxic pollutants found in several industrial wastes, mainly in oil industry. These substances impose several risks to human health. Tyrosinase (EC 1.14.18.1) is a polyphenol oxidase found in several life forms, like in the mushroom *Agaricus bisporus*. In this fungal tissue, the enzyme is readily available leading to high activity extracts needing no extensive purification. The tyrosinase extract is able to modify phenols in non-soluble reaction products, proving its potential as a biocatalyst for applications involving biomodification of phenols or bioremediation of phenol-polluted water. The purpose of this work was to employ the crude extract from the *Agaricus bisporus* mushroom in the removal of phenol from a synthetic oil industry wastewater. The crude extract was used in enzymatic reactions employing aqueous phenol solutions without pH control. The initial phenol concentration in all substrate solutions was 100 mg/L and different enzymatic concentrations of 50, 100, 200 and 400 U/mL were tested. Both reactions, with 200 U/mL and 400 U/mL enzymatic activity, lead to 90% of phenol removal. The treated and not treated samples toxicity were measured using *Artemia salina* (crustacean) e *Brachydanio rerio* (fish) bioassays. The final effluent shown to be less toxicity than the polluted water.

Keywords: tyrosinase; bioremediation; phenol, wastewater treatment, enzymatic treatment, toxicity

1. Introdução

A indústria do petróleo e gás produz efluentes contendo inúmeros poluentes que liberados no ambiente são responsáveis por impactos de proporções imprevisíveis. Os fenóis são tóxicos, e são potencialmente nocivos à saúde humana (Wu *et al.*, 1997). Além disso, são compostos de alta solubilidade e muitos de seus derivados são considerados poluentes perigosos. A quantidade e a qualidade dos efluentes variam muito de acordo com a tecnologia e os processos de produção empregados. Os fenóis estão presentes na composição de águas residuárias de muitos tipos de indústrias, onde pode-se destacar os efluentes provenientes da produção de petróleo e gás. A concentração de fenóis nos efluentes industriais varia muito, podendo estar entre 0 a 22 mg/L para água de produção de petróleo e gás (Hansen e Davies, 1994), ou ainda variar entre 100 a 1000mg/L para outros processos industriais (Wu *et al.*, 1993 *apud* Ibrahim et al., 2001). Uma vez que a legislação brasileira permite que um efluente de descarte de qualquer fonte poluidora tenha uma concentração limite máxima de fenóis de $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (CONAMA,1992), a remoção de fenóis em efluentes industriais é um problema prático importante.

O tratamento biológico de resíduos tradicionalmente empregado é o que utiliza populações de microrganismos. Apesar de apresentar vários aspectos favoráveis pelo seu baixo custo, sua autoreplicação e, normalmente, pela completa mineralização da matéria orgânica nos sistemas aeróbios, a toxicidade dos compostos fenólicos pode prejudicar o funcionamento do sistema através da inibição do metabolismo dos microrganismos. Este efeito inibitório ou tóxico limita a concentração de fenóis a ser tratada. As enzimas são catalisadores biológicos com grande potencial em aplicações no tratamento de resíduos. O tratamento enzimático de águas residuárias oferece as vantagens de ser um processo seletivo de remoção de poluentes devido a sua especificidade, de operar em uma ampla faixa de concentração do contaminante, não havendo necessidade de aclimatação da biomassa, e de facilitar o controle do processo, entre outras (Dúran e Esposito, 2000). O princípio do tratamento enzimático é a transformação dos fenóis em substâncias menos solúveis em água, que se polimerizam e formam compostos poliméricos insolúveis (Wada *et al.*, 1995).

A tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma polifenol oxidase, também chamada de catecol oxidase ou monofenol monoxigenase, presente em vários seres vivos, principalmente no cogumelo *Agaricus bisporus*. Esta enzima é capaz de catalisar a oxidação de fenóis utilizando apenas o oxigênio molecular como oxidante (Ikehata e Nicell, 2000), como mostra a Figura 1. O presente trabalho apresenta a utilização do extrato de tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* na remoção de fenol. O extrato enzimático apresentou boa eficiência na remoção do contaminante sem a necessidade de purificação.

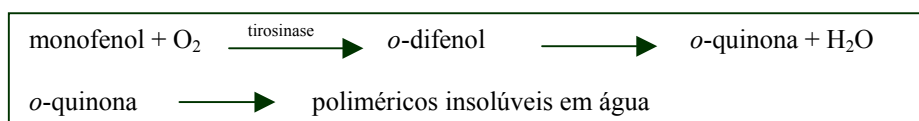


Figura 1: Mecanismo de remoção de fenol por tirosinase (Cammarota, 1998)

A toxicidade é um parâmetro de qualidade da água obtido através de testes biológicos. Estes testes utilizam diversos organismos como peixes, invertebrados ou bactérias. O grau de toxicidade é avaliado através do efeito da concentração que determina amostra causa nos organismos-teste escolhidos num determinado intervalo de tempo (Silva, 2002). A avaliação da toxicidade foi feita através da toxicidade aguda, que é a resposta severa e rápida dos organismos aquáticos a um determinado intervalo de 0 a 96 horas. Um dos parâmetros desta avaliação é a CL50, que corresponde à concentração que causa o efeito de letalidade a 50% da população testada (FEEMA, 1993) Os organismos testados neste trabalho foram o crustáceo *Artemia salina* e o peixe *Brachydanio rerio*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Atividade Enzimática da Tirosinase

O extrato de tirosinase foi obtido pela extração de cogumelos *Agaricus bisporus* de acordo com Kameda *et al.* (2002). A atividade enzimática do extrato foi determinada pelo método adaptado de Campos *et al.* (1996). Em um bécher contendo 5,5 mL de solução 0,2 M de tampão fosfato de sódio em pH 6,0 e 1,5 mL de solução 0,2 M de L-tirosina, adicionou-se 1mL da amostra do extrato enzimático previamente diluído (1:10) no mesmo tampão. A variação de absorvância foi lida a 280 nm, em espectrofotômetro HACH DR4000UV, em intervalos de 30 s durante 999 s.

2.2. Determinação de Fenol

O fenol foi determinado através do método colorimétrico descrito no “*Standard methods for examination of water and wastewater*” (APHA, 1992). Adiciona-se 250 µL de hidróxido de amônio 0,5 N às amostras de 10 mL ou 10 mL de água destilada (branco). O pH é ajustado para 7,9 ($\pm 0,1$) pela adição de cerca de 100 µL de tampão fosfato de potássio (pH 6,8). Depois adiciona-se 100 µL de solução de 4-AAP (4-aminoantipirina) a 2% (p/v) e 100 µL de solução de ferricianeto de potássio 8% (p/v), após 15 minutos a absorvância é lida em espectrofotômetro HACH DR4000UV em $\lambda = 500\text{nm}$.

As amostras foram previamente filtradas em cartuchos C18 PR-COLA para remoção de possíveis interferentes (Bevilaqua, 2000).

2.3. Condições de Reação

As reações de remoção de fenol foram realizadas a temperatura de 30°C, com agitação de 200 rpm, volume reacional de 250 mL em erlemeyer de 500 mL e o substrato foi um efluente sintético com concentração de 100 ppm de fenol. As dosagens foram inicialmente feitas no tempo inicial igual a 0 h e nos intervalos de 3, 6, 9, 15 e 24 h. A reação foi paralisada pela inativação da enzima pela adição de 170 µL de H₃PO₄ 8,5% (p/v). As reações foram realizadas com concentrações enzimáticas de 50, 100, 200 e 400 U/mL.

2.4. Toxicidade Aguda

Os bioensaios avaliaram o efeito agudo das amostras através da exposição dos organismos-teste por um período de 48 horas. As amostras consistiam no efluente não tratado (fenol 100 ppm) e no efluente tratado (reação contendo 100 ppm de fenol e 200 U/ml de tirosinase, após 9 horas). Os testes foram realizados pelo Laboratório de Poluição de Águas – COOPE/UFRJ com *Artemia salina*, microcrustáceo marinho, e *Brachydanio rerio*, peixe de água doce. Os procedimentos para cada organismo foram de acordo com os descritos por Silva (2002). O valor da CL50 (concentração da amostra que causou letalidade a 50% dos organismos expostos) foi calculado pelo método de Sperman–Karber, que fornece um intervalo de confiança de 95% (Hamilton *et al.*, 1977).

3. Resultados e Discussão

As reações foram realizadas com concentrações enzimática de 50, 100, 200 e 400 U/mL. As amostras foram inicialmente retiradas em intervalos de 3 em 3 horas, durante 24h. A Figura 2 demonstra que a maior parte do poluente foi removido nas primeiras 3 horas de tratamento. Posteriormente não foi observada uma significativa redução da concentração de fenol, provavelmente devido ao fenômeno conhecido como inativação suicida, na qual enzima é inativada de forma irreversível pelo próprios produtos da reação (Escribano *et al.*, 1989).

Aparentemente o aumento da concentração enzimática de 200 U/mL para 400 U/mL não apresentou melhoria no processo de remoção de fenol pelo que demonstra a Figura 2. Assim sendo, a reação com concentração enzimática de 200 U/mL pode ser considerada como a mais adequada para remoção de fenol.

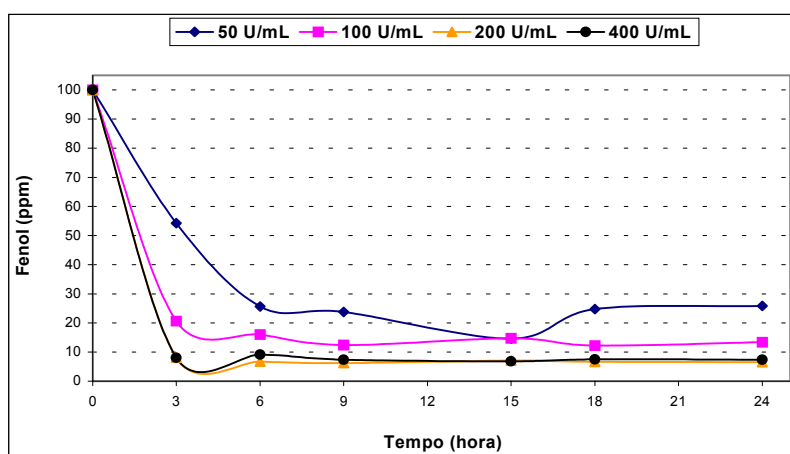


Figura 2: Remoção de fenol em diferentes concentrações enzimática

Para as condições de reação anteriormente citadas, foram calculadas as taxas iniciais de remoção de fenol através de um ajuste polinomial dentro do intervalo de 0 a 6 horas para cada concentração enzimática utilizada, como pode ser observado na Figura 3. A Tabela 1 apresenta as taxas calculadas para cada sistema.

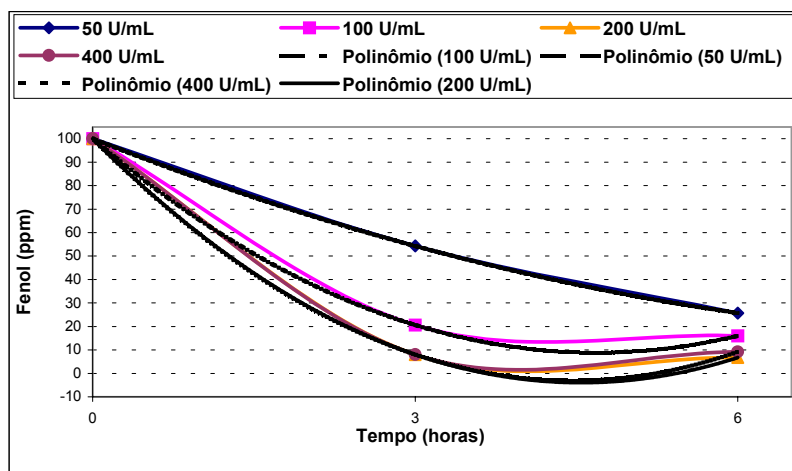


Figura 3: Ajuste polinomial para cálculo das taxas iniciais de reação.

Tabela 1: Cálculo das taxas de remoção de fenol (ppm/h)

Concentração enzimática	Taxa de remoção de fenol
50 U/mL	$\frac{d[Fenol]}{dt} = 1,9028t - 18,094$
100 U/mL	$\frac{d[Fenol]}{dt} = 8,309t - 38,922$
200 U/mL	$\frac{d[Fenol]}{dt} = 10,068t - 45,75$
400 U/mL	$\frac{d[Fenol]}{dt} = 10,3402t - 46,156$

A partir das taxas de remoção de fenol para cada concentração enzimática calculadas no ponto 3 horas, obteve-se uma relação entre a taxa geral de remoção de fenol pelo extrato enzimático e a atividade do complexo enzimático, conforme demonstrado na Figura 4. É possível concluir que até a concentração de 200 U/mL do extrato de tirosinase proveniente de *Agaricus bisporus* já é suficiente para saturar o sistema enzima-substrato, considerando uma concentração inicial de fenol de 100 ppm.

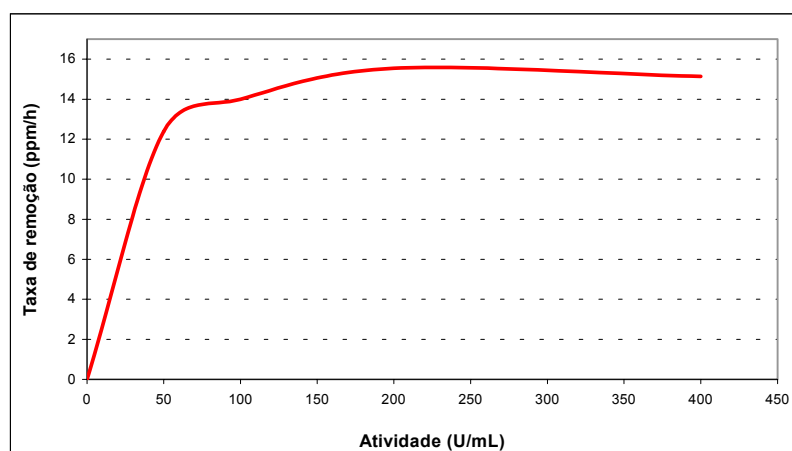


Figura 4: Taxa de remoção de fenol (calculada em 3 horas de processo) em função da concentração enzimática.

Ao final de todas as reações observou-se a formação de um precipitado escuro, praticamente preto. O mesmo tipo de precipitado escuro foi relatado em alguns trabalhos (Atlow *et al.*, 1984, Bevilaqua, 2000). Contudo, esse precipitado não foi observado em outros estudos realizados com tirosinase (Davis e Burns, 1990, Wada *et al.* 1995, Ikehata e Nicell, 2000). As razões pelas quais nem sempre ocorre o precipitado não são claras para os diferentes autores. Supõe-se que a sua formação estaria relacionada à presença de proteínas contaminantes. O fato é que neste trabalho, assim como nos experimentos realizados por Atlow *et al.* (1984) e Bevilaqua (2000), utilizou-se um extrato bruto de tirosinase, que continha diversas proteínas diferentes da tirosinase.

O grau de toxicidade do efluente sintético contendo 100 ppm de fenol antes e após o tratamento enzimático com 200 U/mL de tirosinase foi determinado a partir do teste de toxicidade aguda. Os resultados dos testes de toxicidade estão na Tabela 2. Os valores de CL50 (%) numericamente menores são os resultados mais tóxicos e os numericamente maiores são os menos tóxicos. Ressalta-se que a diferença entre os resultados apresentados para cada espécie é devido às próprias diferenças interespecíficas, além das diferenças de habitat de cada espécie, uma vez que *Artemia salina* é uma espécie marinha e *Brachydanio rerio* é dulcícola. Observa-se que o fenol é tóxico tanto para *Artemia salina* como para *Brachydanio rerio* e que a toxicidade diminuiu após o tratamento enzimático, evidenciando a viabilidade do sistema de tratamento enzimático proposto.

Tabela 2: Resultado do teste de toxicidade aguda (CL50)

Amostra	<i>Artemia salina</i> CL50 (%)	<i>Brachydanio rerio</i> CL50 (%)
Sem tratamento (fenol 100 ppm)	39,38 %	23,49 %
Com tratamento enzimático (Após 9 horas de reação)	71,47 %	85,84 %

4. Conclusões

O presente trabalho propõe um processo de remoção enzimática de fenol para efluentes industriais. As condições empregadas assemelham-se às condições reais dada a ausência do controle de pH, visto que a maioria das reações relatadas na literatura utiliza meio reacional tamponado (Atlow *et al.*, 1984; Wada *et al.* 1993; Ikehata e Nicell, 2000; Bevilaqua, 2000), apresentando níveis de remoção de fenol acima de 95%.

A utilização de 200 U/mL de tirosinase permitiu a remoção de fenol de 90% em 3 horas de reação. De acordo com o estudo cinético realizado, 200 U/mL de atividade enzimática conduzem a saturação do sistema enzima-substrato.

Os testes de toxicidade para duas espécies de organismos (*Artemia salina* e *Brachydanio rerio*) ratifica a toxicidade do fenol e mostra a viabilidade do tratamento enzimático, considerando a diminuição da toxicidade da amostra enzimaticamente tratada.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a bolsa cedida pela CAPES para E. Kameda e ao Laboratório de Poluição de Águas – COOPE/UFRJ pela realização dos testes de toxicidade.

6. Referências

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. In: *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*; Greenberg, A.E.; Clesceri, L.S. and Eaton, A.D., Eds., 18th ed., USA, 1992.
- ATLOW, S. C., BONADONNA-APARO, L., KLIBANOV, A. M. Dephenolization of industrial wastewater catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol. Bioeng* v. 26, p. 599-603, 1984.
- BEVILAQUA, J. V. Utilização de Tirosinase de *Agaricus bispora* no Tratamento de Efluente Contendo Fenóis. *M.Sc. dissertation, COOPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil*, 2000.
- CAMMAROTA, M. C. Tratamento enzimático de efluentes industriais: Aplicação da enzima polifenol oxidase na remoção de compostos fenólicos. *Exame Geral de Conhecimentos, Instituto de Química/UFRJ*, 1998.
- CAMPOS, C. F., SOUZA, P. E. A., COELHO, J. V. Chemical Composition, Enzyme Activity and Effect of Enzyme Inactivation on Flavor Quality of Green Coconut Water *J. of Food Proc. and Pres.* v. 20, p. 487-500, 1996.

- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). *Resoluções CONAMA 1984/1991*. 4. ed. Brasília, DF. 1992.
- DAVIS, S., BURNS, R., G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.32, p. 721-726, 1990.
- DURÁN, N., ESPOSITO, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B: Environmental* v. 28, p. 83-89, 2000.
- ESCRIBANO J., TUDELA, J., GRACÍA-CARMONA, F. e GARCÍA-CANOVAS, F. A kinetic study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions. *Biochem. J.*, v. 262, p. 597-603, 1989.
- FEEMA. Método de Determinação do Efeito Agudo Letal Causado por Efluentes Líquidos em Peixes da Espécie *Brachydanio rerio* – Método Estático. *FEEMA*, Rio de Janeiro, Brasil, MF-456 ed., 1993.
- HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., THURSTON, R. V. Trimmed Sperm-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, v. 11, p. 714-719, 1977.
- HANSEN, B. R., DAVIES, R. H. Review of potencial technologies for the removal of dissolved components from produced water. *Trans. IChemE* v. 72 part A, p. 176-188, 1994.
- IKEHATA, K., NICELL, J. A. Characterization of tyrosinase for treatment of aqueous phenol. *Biores. Technol.*, v. 74, p. 191-199, 2000.
- KAMEDA, E., LANGONE, M. A. P., COELHO, M. A. Z., Optimization of tyrosinase extraction method from *Agaricus bispora*. In: *International Congress on Biocatalysis*, Hamburgo, Alemanha, jul., 2002.
- SILVA, A. C. Tratamento do Percolado de Aterro Sanitário e Avaliação de Toxicidade do Efluente Bruto e Tratado. *M.Sc. dissertation, COOPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2002.*
- WADA, S., ICHIKAWA, H., TATSUMI, K. Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and coagulant. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 45, p. 304-309, 1995.
- WU, Y., TAYLOR, K. E., BISWAS, N., BEWTRA, J. K. Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. *Water Res.* v. 31, n. 11, p. 2699-2704, 1997.
- WU, Y., TAYLOR, K. E., BEWTRA, J. K., BISWAS, N. Optimization of reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in presence of polyethylene glycol. *Water Res. (GB)* v. 27 pp. 1701, 1993 apud IBRAHIM, M., S., Ali, H. I., Taylor, K. E., Biswas, N., Bewtr, J. K. Enzyme-catalyzed removal of phenol from refinery wastewater: feasibility studies. *Water Env. Res.* v. 73, n. 2, p. 165-172, 2001.