

## **IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS HRP EM NANOFOLHAS DE ÓXIDO DE GRAFENO E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE 2,4-DICLOROFENOL.**

Diego Hoefling Souza<sup>1</sup>, Felipe Broilo<sup>2</sup>, Everton Skoronski<sup>3</sup>

<sup>2</sup> Acadêmico do Curso de Engenharia Ambiental - CAV - bolsista PROBIC/UDESC.

<sup>3</sup> Acadêmico do Curso de Engenharia Ambiental – CAV.

<sup>1</sup> Orientador, Departamento de Engenharia Ambiental - CAV - everton.skoronski@udesc.br.

Palavras-chave: *Horseradish Peroxidase*. Óxido de Grafeno. Imobilização Enzimática.

Fenóis são poluentes orgânicos com alto teor de toxicidade que tendem a persistir e acumular-se no ambiente. Geralmente estão presentes em efluentes oriundos de atividades industriais, tais como as de indústrias de papel e celulose, petroquímicas e têxteis. A presença de fenóis na água pode conduzir à formação de novos compostos durante processos de desinfecção e de oxidação. Salienta-se o uso do cloro, uma vez que este reage muito rapidamente com os fenóis e podem ser formados clorofenóis. Entre os clorofenóis, destaca-se, o 2,4-diclorofenol (2,4 DCP), elemento persistente e prejudicial aos seres vivos, que além de formado em processos de cloração, também pode estar presente no ambiente como um subproduto do ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D), composto encontrado em herbicidas utilizados em áreas de agricultura. Tratamentos biológicos convencionais são muitas vezes insuficientes para a remediação desses compostos fenólicos, principalmente quando apresentam concentrações acima de 100 ppm. Estas altas concentrações inviabilizam a biodegradação, pois conferem toxicidade aos microrganismos. Neste sentido, torna-se cada vez mais importante o estudo e desenvolvimento de métodos alternativos que sejam eficientes no tratamento destes contaminantes. A oxidação do 2,4-DCP, catalisada por enzimas oxidativas, como a *Horseradish Peroxidase* (HRP) vem, recentemente, apresentando-se como uma alternativa interessante. Entretanto, a utilização de enzimas livres está relacionada a um alto custo e fraca estabilidade operacional, já que, a partir da sua aplicação, sua recuperação e reutilização não são possíveis. O uso de um meio suporte adequado, que possibilite a imobilização dessas enzimas, torna-se fundamental para superar essas limitações. O óxido de grafeno, por ser um material de grande área superficial, pode proporcionar a imobilização de um grande número de enzimas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade da bioconversão de 2,4-DCP a partir da imobilização da enzima HRP em nanofolhas de grafeno e sua estabilidade operacional mediante aplicação em ciclos reacionais. Os experimentos foram realizados com a enzima *Horseradish Peroxidase*, comercializada, em sua forma livre, pela Toybo do Brasil. Esta foi imobilizada em nanofolhas de grafeno (xGnP®, *Grade M* - 25  $\mu\text{m}$ ), distribuídas pela XG Sciences (EUA), com espessura média de 6 a 8 nm e diâmetro médio de 25  $\mu\text{m}$ . A imobilização da enzima na superfície do óxido de grafeno foi realizada por meio de processos físicos e químicos. Para a imobilização química, as nanofolhas de grafeno foram acidificadas e convertidas para uma estrutura com terminal aldeído através da sua reação com glutaraldeído em solução a 1 %. Em ambos os processos, utilizou-se solução enzimática com concentração de 3,6 g/L, preparada em tampão fosfato de pH 6. A escolha do tampão foi realizada a partir de

experimentos prévios, sendo o pH 6 o que proporcionou maior estabilidade para a imobilização enzimática. A 8 mL desta solução foram adicionadas 40 mg de grafeno. O sistema foi submetido à agitação em aparelho de ultrassom, com frequência de 40 kHz, a 25 °C. Com base em ensaios preliminares, o tempo de 2 horas foi suficiente para que o sistema atingisse o equilíbrio. A amostra final foi centrifugada, durante 5 minutos, com velocidade de 5000 rpm, de modo a separar a enzima imobilizada no grafeno do meio aquoso. A determinação das condições otimizadas para catálise, tanto da enzima livre quanto imobilizada ocorreu por meio do contato com solução de 2,4-diclorofenol 100 mg/L em *vials* de 8 mL. Foram utilizados como parâmetros os fatores pH (3 a 10), temperatura (20 a 60 °C) e a dosagem de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5% utilizada no processo (0 a 150 µL). O pH foi ajustado com solução tampão fosfato e as reações foram conduzidas sob agitação em ultrassom. Além disso, foram realizados testes de modo a verificar a estabilidade operacional da enzima imobilizada frente a vários ciclos reacionais. A concentração de 2,4-diclorofenol remanescente no meio foi determinada por meio de análise colorimétrica de fenóis totais, empregando-se 4-aminoantipirina como reagente. De acordo com os experimentos realizados, observou-se que o intervalo de pH ótimo para a HRP imobilizada não sofreu grandes alterações, quando comparado ao da enzima livre. Contudo, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade de bioconversão em um amplo intervalo de pH (4 a 9). Ocorreram quedas de eficiência nas condições extremas (pH 3 e 10), sobretudo, devido a desnaturação da enzima. No intervalo de temperatura avaliado, tanto a HRP imobilizada quanto a livre, obtiveram eficiência de remoção de fenol superior a 80%. Esta semelhança se deve à enzima imobilizada não ter sua estrutura tridimensional alterada, uma vez que possui baixa afinidade com o suporte e é capaz de manter suas características operacionais. A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disponibilizada para o processo se mostrou fundamental, por este ser o substrato responsável por ativar a reação enzimática, de modo a produzir radicais peroxidase que atacam os clorofenóis e formam radicais livres. Foi verificado que ocorreu um aumento na eficiência de bioconversão entre as dosagens de 10 e 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a partir disto, esta se manteve próxima aos 90%. O excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode inibir a atividade da enzima. No entanto, para o intervalo estudado, não foi observado esse comportamento. Quanto a estabilidade operacional da HRP imobilizada frente a vários ciclos reacionais, observou-se que após 5 ciclos a atividade da enzima apresentou elevada redução, com relação a atividade observada no primeiro ciclo. Estes resultados indicam que as interações físicas entre enzima e suporte tornam limitada sua aplicabilidade, uma vez que a enzima está sujeita ao processo de desorção. Entretanto, no processo de imobilização química, esta queda na atividade não é justificada pela desorção, visto que enzima e suporte estariam ligados por meio de ligação covalente. Desta forma, o aperfeiçoamento do processo de imobilização química, de modo a possibilitar maior estabilidade operacional tem grande importância, uma vez que a HRP imobilizada em óxido de grafeno torna possível a bioconversão de 2,4-DCP com eficiência satisfatória. Estudos neste sentido já estão em andamento para viabilizar a aplicabilidade do processo em grande escala.