



**APLICAÇÃO DA ENZIMA HORSE RADISH  
PEROXIDASE (HRP) EM ALGINATO DE  
CÁLCIO PARA DESCOLORAÇÃO DE AZUL  
DE METILENO**

Aline Bastos

**Projeto Final de Curso**

**Orientadores:**

Eliana Mossé Alhadef, D.Sc.

André Pereira, M.Sc.

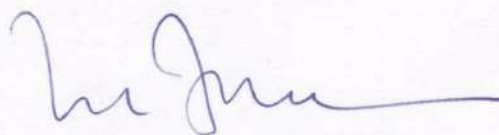
Fevereiro de 2014

**APLICAÇÃO DA ENZIMA HORSERADISH PEROXIDASE  
(HRP) EM ALGINATO DE CÁLCIO PARA  
DESCOLORAÇÃO DE AZUL DE METILENO**

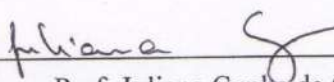
*Aline Bastos*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

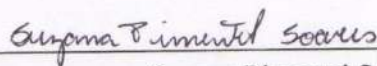
Aprovado por:



Prof. Lídia Yokoyama, D.Sc.

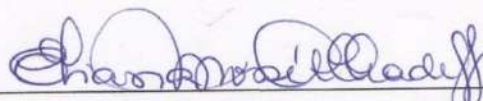


Prof. Juliana Cunha da Cruz, M.Sc.

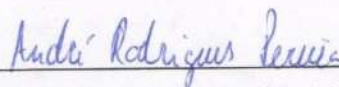


Suzana Pimentel Soares, B.Sc.

Orientado por:



Prof. Eliana Mossé Alhadef, D. Sc.



André Rodrigues Pereira, M. Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro de 2014

Bastos, Aline.

Aplicação da enzima horseradish peroxidase (HRP) em alginato de cálcio para descoloração de azul de metileno/ Aline Bastos.

Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.

vii, 60 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014.

Orientadores: Eliana Mossé Alhadef e André Rodrigues Pereira.

1.Enzima. 2. Horseradish Peroxidase (HRP) 3. Corante Têxtil. 4.Monografia.

(Graduação – UFRJ/EQ). 5. Eliana Mossé Alhadef e André Rodrigues Pereira.

I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo amor, dedicação e renúncias, que possibilitaram o início de tudo;

Aos meus familiares, que me apoiaram e compreenderam minhas ausências;

Ao meu namorado Douglas, por seu amor e maior compreensão neste momento de ansiedade e desestabilidade;

Aos meus amigos, pelos conselhos, apoio e incentivos;

Ao meu co-orientador, Me. André Rodrigues Pereira, por todos os ensinamentos, paciência e disponibilidade durante esse trabalho;

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Eliana Mossé Alhadef, por ter me aceitado e apoiado em um momento crítico e por todos os ensinamentos e orientação.

À Empresa Toyobo do Brasil pelo fornecimento da enzima utilizada neste trabalho.

Aos funcionários e professores da Escola de Química, por toda a ajuda e colaboração.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheira Química.

## **APLICAÇÃO DA ENZIMA HORSERADISH PEROXIDASE (HRP) EM ALGINATO DE CÁLCIO PARA DESCOLORAÇÃO DE AZUL DE METILENO**

Aline Bastos

Fevereiro, 2014

Orientadores: Prof<sup>ª</sup>. Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc.

André Rodrigues Pereira, M.Sc.

O presente trabalho avaliou o potencial da enzima horseradish peroxidase (HRP), imobilizada em gel de alginato de cálcio, na remoção de cor do corante têxtil azul de metileno. Os experimentos para a remoção de cor foram conduzidos a 30°C e pH 5,0; sob agitação constante a 100 rpm. Foram realizados ensaios preliminares com tempos de imobilização de 60 minutos, 120 minutos e 24 horas; concentração de enzima imobilizada de 25 e 50 U/mL; reutilização das esferas de HRP em alginato de cálcio em reações sequenciais e em reações conduzidas com 24 horas de diferença. O maior percentual de remoção de cor foi cerca de 23% e foi obtido com concentração de enzima de 50 U/mL, concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 6 mg/L e concentração do corante de 15 mg/L em ensaios preliminares. Nas condições estudadas, foi possível realizar dois ciclos de reutilização da enzima imobilizada, com intervalos de 24 horas entre cada ciclo. Para os testes de reutilização sequencial foi possível realizar apenas um ciclo. A viabilidade de utilização da HRP imobilizada, em gel de alginato de cálcio, para a descoloração do azul de metileno foi verificada através dos percentuais de remoção obtidos, comparados aos observados para os testes de controle (sem peróxido de hidrogênio e sem enzima).

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| CAPÍTULO II – OBJETIVOS .....   | 2  |
| CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 3  |
| III.1 A Indústria de corantes no Brasil .....   | 3  |
| III.2 Os Corantes e suas Propriedades .....   | 5  |
| III.2.1 Classificação quanto à estrutura química.....   | 6  |
| III.2.2 Formas de fixação do corante à fibra têxtil .....   | 10 |
| III.2.3 Classificação quanto ao modo de fixação à fibra têxtil .....  | 11 |
| III.3 Azul de Metileno: Propriedades e Aplicações .....   | 14 |
| III.4 Tratamentos de Resíduos e Efluentes de Corantes Químicos .....  | 15 |
| III.4.1 Legislação Ambiental aplicada ao reúso de água e ao lançamento de efluentes em recursos hídricos .....        | 16 |
| III.4.2 Tratamento de efluentes industriais .....   | 18 |
| III.4.3 Processos Oxidativos Avançados (POA) .....  | 20 |
| III.5 Tratamento Enzimático de Resíduos e Efluentes de Corantes Químicos .....  | 23 |
| III.6 Horseradish peroxidase (HRP) .....  | 25 |
| III.7 Técnicas de Imobilização de Enzimas .....   | 27 |
| CAPÍTULO IV – METODOLOGIA .....   | 33 |
| IV.1 Purificação da horseradish peroxidase (HRP) – Método adaptado da Toyobo do Brasil .....                          | 33 |
| IV.2 Avaliação da atividade enzimática da HRP .....   | 33 |
| IV.3 Cálculo da concentração de HRP para imobilização e reação com o corante .....                                    | 34 |
| IV.4 Imobilização da HRP: aprisionamento em gel de alginato de cálcio .....   | 35 |
| .....   | 36 |
| IV.5 Reações de descoloração do azul de metileno .....  | 36 |
| IV.6 Determinação do percentual (ou índice) de descoloração .....   | 38 |
| IV.7 Avaliação da descoloração de soluções com diferentes concentrações de azul de metileno .....                     | 38 |
| IV.8 Avaliação da descoloração de azul de metileno em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | 39 |
| IV.9 Avaliação da descoloração de azul de metileno em diferentes tempos de imobilização enzimática .....              | 39 |
| IV.10 Avaliação da descoloração de azul de metileno com reutilização da enzima HRP imobilizada .....                  | 40 |

|  |    |
|--|----|
| CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 41 |
| V.1 <i>Avaliação da descoloração de diferentes concentrações de azul de metileno</i> .....                               | 41 |
| V.2 <i>Avaliação da descoloração de azul de metileno em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i><br>42 |    |
| V.3 <i>Avaliação da descoloração do azul de metileno em diferentes tempos de imobilização enzimática</i> .....           | 43 |
| V.4 <i>Avaliação da descoloração do azul de metileno com reutilização da HRP imobilizada</i><br>46                       |    |
| CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....  | 51 |
| VI.1 <i>Propostas para continuação do trabalho</i> .....   | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 53 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| Figura 1 - Balança comercial do setor de corantes e pigmentos do Brasil [11].   | 3         |
| Figura 2 - A estrutura do azul de metileno [20].  | 15        |
| Figura 3 - Grupo prostético heme das peroxidases [17].  | 26        |
| Figura 4 - Estrutura tridimensional da HRP mostrando o grupo heme (de cor vermelha) no sítio ativo da molécula entre dois átomos de cálcio (esferas azuis) [17].  | 26        |
| Figura 5 - Membrana de Policarbonato fazendo a separação de compartimento – Compartimento A: Enzima e substrato; Compartimento B: saída do produto [59].  | 28        |
| Figura 6 - Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa aprisionando a enzima no interior da matriz; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas com enzimas aprisionadas [59]. | 30        |
| <b>Figura 8 - Preparação de nanopartículas de hidrogel. Nanopartículas contendo solução de Poli(etileno glicol) - Diacrilato (PEG-DA) [59].</b>   | <b>30</b> |
| Figura 7 - Aprisionamento em fibras [59].   | 30        |
| Figura 9 - Imobilização por interação iônica em polianilina negativamente carregada [59].   | 31        |
| Figura 10 - Imobilização covalente de Xerogel Organicamente Modificado (OMX) por múltipontos [59].  | 32        |
| Figura 11 - Imobilização por ligação cruzada “Cross-linking” [59].  | 32        |
| Figura 12 - Análise da atividade enzimática – (1) Início da reação e (2) Complexo Vermelho Formado [17].  | 34        |
| Figura 13 - Imobilização da HRP por aprisionamento em alginato de cálcio (Próprio autor, 2014).   | 35        |
| Figura 14 - Esferas contendo HRP após 120 minutos de imobilização (Próprio autor, 2014).  | 36        |
| Figura 15 - Solução de corante azul de metileno com concentração de 15 mg/L em tampão fosfato pH 5,0 [17].  | 37        |
| Figura 16 - Amostras durante a reação entre a HRP aprisionada e o azul de metileno (Próprio autor, 2014).   | 37        |
| Figura 17 - Esferas de HRP imobilizada, após 240 minutos de reação com o azul de metileno (Próprio autor, 2014).  | 37        |
| Figura 18 - Espectro de absorção do azul de metileno a 20 mg/L [17].  | 38        |
| Figura 20 - Esferas de HRP imobilizada, após o 3º ciclo de reação com o azul de metileno (Próprio autor, 2014).   | 48        |
| Figura 19 - Esferas armazenadas em água destilada, a 4°C, por 24 horas, após o primeiro ciclo de reação – (A) Tempo de imobilização de 120 minutos – (B) Tempo de imobilização de 60 minutos (Próprio autor, 2014).   | 48        |



## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Produtores de corantes no Brasil [12]. .....  | 4  |
| Tabela 2 - Classificação dos corantes, segundo a utilização por substrato [11]. .....  | 5  |
| Tabela 3 - Classificação dos corantes, segundo as classes químicas [11]. .....   | 6  |
| Tabela 4 - Resultados da descoloração de diferentes concentrações de azul de metileno. ....  | 41 |
| Tabela 5 - Resultados da descoloração de azul de metileno em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....                       | 43 |
| Tabela 6 - Resultados da descoloração de azul de metileno em diferentes tempos de imobilização enzimática. ....                                      | 44 |
| Tabela 7 - Resultados da descoloração de azul de metileno com etapas de lavagem das esferas antes da reação e centrifugação ao final da reação. .... | 45 |
| Tabela 8 - Resultados da descoloração de azul de metileno com reutilização das esferas de HRP com 24 horas de diferença. ....                        | 47 |
| Tabela 9 - Resultados da descoloração de azul de metileno, com reutilização das esferas de HRP no mesmo dia. ....                                    | 49 |

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

A importância dos corantes para a civilização humana é evidente e bem documentada. Os corantes sintéticos são extensivamente utilizados na indústria têxtil, gráfica, fotográfica e como aditivos em derivados de petróleo. Um número aproximado de 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente, o que representa um consumo anual de cerca de  $7 \times 10^5$  tons no mundo e 26.500 tons somente no Brasil [1]. Por serem de origem sintética e conterem estruturas moleculares aromáticas complexas, são inertes e de difícil biodegradação quando lançados no ambiente. Alguns são prejudiciais à vida aquática [2], podendo ser cancerígenos e tóxicos [3].

Assim, a descoloração de efluentes derivados de tingimentos, da fabricação de corantes, dos processos de acabamento na indústria têxtil e de indústrias semelhantes tornou-se um aspecto importante e desafiador no tratamento de águas residuais. Esses efluentes são conhecidos por conterem cor, grandes quantidades de surfactantes, sólidos dissolvidos e, possivelmente, metais pesados como cromo, níquel e cobre fundidos na interface estrutural dos corantes [4, 5]. Seu lançamento no ecossistema gera poluição, eutrofização e perturbações à fauna e ao ambiente aquático [6].

O azul de metileno é um dos corantes mais utilizados na indústria têxtil e apesar de não ser extremamente perigoso, pode ser prejudicial a humanos e animais, se ingerido ou inalado [7], por isso é essencial seu tratamento de resíduos, antes de serem lançados no meio ambiente. Devido às propriedades do azul de metileno, como a capacidade de reagir com substratos diversos, o tratamento de efluentes contendo este corante nem sempre é fácil. Além disso, os métodos tradicionais como adsorção, coagulação seguida de sedimentação e processos degradativos biológicos são pouco eficientes e exigem muito tempo de reação[8].

O uso de enzimas tem revelado uma importante aplicação na engenharia ambiental. As enzimas têm capacidade de ação em poluentes recalcitrantes específicos para removê-los por precipitação ou transformação em outros tipos de produtos. As vantagens do tratamento enzimático, comparadas ao convencional, são diversas e, portanto, pesquisas recentes têm focado no desenvolvimento de processos enzimáticos para o tratamento de solos, águas residuais, resíduos sólidos e resíduos perigosos [9].

## CAPÍTULO II – OBJETIVOS

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a viabilidade de aplicação da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) imobilizada em gel de alginato de cálcio para ensaios preliminares de descoloração do corante azul de metileno.

Essa pesquisa foi realizada em prosseguimento ao trabalho de Costa (2013), que efetuou a otimização das condições de reação para a descoloração do azul de metileno, utilizando HRP livre em solução. As condições ótimas obtidas para a HRP livre – tais como concentração de corante, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de HRP, pH e temperatura – foram utilizadas neste trabalho como ponto de partida para os ensaios preliminares realizados com a HRP imobilizada em gel de alginato de cálcio.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar o percentual de descoloração de soluções com diferentes concentrações de azul de metileno.
- Avaliar o percentual de descoloração de soluções de azul de metileno em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.
- Avaliar a influência do tempo de imobilização da enzima na descoloração de soluções de azul de metileno.
- Avaliar a influência da concentração de enzima na descoloração de soluções de azul de metileno.
- Verificar a viabilidade de reutilização das enzimas imobilizadas para a descoloração de soluções de azul de metileno.

## CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### III.1 A Indústria de corantes no Brasil

Desde o descobrimento do Brasil, sua história tem estado relacionada à produção de corantes. A começar pelo nome do país, uma vez que este é proveniente da madeira “Pau-Brasil”, fonte natural de corante avermelhado. Durante grande parte do século XIX, o Brasil também foi fonte principal do índigo natural (extraída da *Indigofera tinctoria*). A produção industrial de corantes sintéticos no país foi introduzida logo após a Primeira Guerra Mundial e atualmente supre 60% da sua demanda doméstica [10].

A utilização de corantes no Brasil concentra-se principalmente nos corantes reativos para fibras celulósicas, que hoje respondem por 57% do mercado, seguidos pelos corantes dispersos com 35%; poliamida com 3% e acrílico com 2% do mercado brasileiro. Os corantes sintéticos representam um consumo brasileiro per capita de aproximadamente 350 gramas de corantes por ano e o consumo brasileiro de fibra têxtil é estimado em 7,0 kg, por ano, por habitante, sendo ligeiramente maior do que a média mundial [10, 11].

Nos últimos anos, a importação de corantes no Brasil (Figura 1) tem apresentado aumentos anuais em torno de 20%, com exceção do ano de 2009. As exportações apresentam índices mais instáveis, com crescimento acentuado em 2010 e 2011, de acordo com a balança comercial<sup>1</sup> para o setor de corantes e pigmentos do Brasil, nos anos de 2006 a 2011 [11].



Figura 1 - Balança comercial do setor de corantes e pigmentos do Brasil [11].

<sup>1</sup>A balança comercial registra as importações e as exportações de bens e serviços.

Com pequenas exceções, as indústrias brasileiras fabricantes de corantes localizam-se basicamente no eixo Rio – São Paulo e a maioria depende de produtos intermediários importados tais como: derivados de benzeno, naftaleno, tolueno, etc [10, 11]. A Tabela 1 ilustra as principais empresas produtoras de corantes no Brasil [12].

**Tabela 1 - Produtores de corantes no Brasil [12].**

| <b>EMPRESA</b> | <b>TIPO DE PRODUTO</b>   |
|----------------|--|
| A CHIMICAL     | Corantes ácidos, corantes básicos, corantes diretos.   |
| BANN           | Corantes à tina.   |
| BASF           | Corantes básicos.  |
| BELA VISTA     | Corantes naturais.   |
| CLARIANT       | Corantes ácidos, corantes diretos, corantes ao enxofre, corantes pré-metalizados, corantes reativos. |
| DYNATECH       | Corantes ácidos, corantes azoicos, corantes básicos, corantes diretos.                               |
| EPA QUÍMICA    | Corantes naturais.   |
| FOSMIX         | Corantes naturais.   |
| GRIFFITH       | Corantes naturais.   |
| INGREDION      | Corantes naturais.   |
| STAHL          | Corantes solventes.  |
| TEXPAL         | Corantes reativos.   |

Para uma análise mais profunda das relações mercadológicas dos corantes no Brasil, é importante que se compreenda as bases de estrutura do parque industrial desse setor no país. Para tanto, pode-se afirmar que persistem como suas principais características [11]:

- Acentuada competitividade;
- Produção de vários corantes e pigmentos em unidades fabris que possuem grande flexibilidade de produção;
- Grande dependência de matérias-primas e tecnologias importadas.

Seguindo uma tendência mundial, a indústria de corantes no Brasil, responsável por pelo menos 5.000 empregos e alto rendimento financeiro, tem dedicado grande esforço para atender às regras de proteção ambiental, embora a aplicação destes

corantes no processo de tintura constitua efetivamente um grande problema, já que a maior parte destas indústrias são pequenas empresas, tornando difícil a atividade de fiscalização [10].

### III.2 Os Corantes e suas Propriedades

É classificada como corante ou pigmento toda substância química que absorve radiação na faixa da luz visível (380-780 nm) e a reflete em um determinado comprimento de onda, ou seja, em uma cor específica. Os corantes podem ser inorgânicos ou orgânicos, obtidos de fontes naturais ou sintetizados quimicamente e podem ser classificados de acordo com diversos parâmetros: estrutura química (antraquinona, azo e etc.); pelo modo que é fixado à fibra têxtil; solidez em geral; tipo de excitação eletrônica quando exposto à luz, dentre outros. A seguir, são apresentados os grupos classificados, segundo os parâmetros mais utilizados [8, 10, 13].

Pelo Colour Index, os corantes e pigmentos podem ser classificados em 26 tipos, segundo os critérios das classes químicas; e em 20 tipos, além de algumas subdivisões, do ponto de vista das aplicações, conforme apresentado nas tabelas 2 e 3 [11].

**Tabela 2 - Classificação dos corantes, segundo a utilização por substrato [11].**

| CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A UTILIZAÇÃO POR SUBSTRATO |   |
|--|---|
| Classe   | Principais campos de aplicação  |
| Branqueadores ópticos                            | Detergentes, fibras naturais, fibras artificiais, fibras sintéticas, óleos, plásticos, sabões, tintas e papel |
| <b>Corantes</b>                                  |   |
| À Cuba Sulfurados                                | Fibras naturais e fibras artificiais  |
| À Tina   | Fibras naturais   |
| Ácidos   | Alimentos, couro, fibras naturais, fibras sintéticas, lã e papel  |
| Ao Enxofre                                       | Fibras naturais   |
| Azóicos  | Fibras naturais e fibras sintéticas   |
| Básicos  | Couro, fibras sintéticas, lã, madeira e papel   |
| Diretos  | Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel  |
| Dispersos  | Fibras artificiais e fibras sintéticas  |
| Mordentes  | Alumínio anodizado, lã, fibras naturais e fibras sintéticas   |
| Reativos   | Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel  |
| Solventes  | Ceras, cosméticos, gasolina, madeira, plásticos, solventes orgânicos, tintas de escrever e vernizes           |
| <b>Pigmentos Orgânicos</b>                       | Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamperia têxtil e plásticos   |
| <b>Pigmentos Inorgânicos</b>                     | Tintas gráficas, tintas e vernizes, estamperia têxtil, plásticos e negro de fumo                              |

Tabela 3 - Classificação dos corantes, segundo as classes químicas [11].

| <b>CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO AS CLASSES QUÍMICAS</b> |  |
|--|--|
| <b>Classe</b>                                    | <b>Classificação por aplicação</b>   |
| <b>Acridina</b>                                  | Básicos, pigmentos orgânicos   |
| <b>Aminocetona</b>                               | À tina, mordentes  |
| <b>Antraquinona</b>                              | Ácidos, mordentes, à tina, dispersos, azóicos, básicos, diretos, reativos, pigmentos orgânicos |
| <b>Ao enxofre</b>                                | Enxofre, à cuba  |
| <b>Azina</b>                                     | Ácidos, básicos, solventes, pigmentos orgânicos  |
| <b>Azo</b>                                       | Ácidos, diretos, dispersos, básicos, mordentes, reativos                                       |
| <b>Azóico</b>                                    | Básicos, naftóis   |
| <b>Bases de oxidação</b>                         | Corantes especiais para tingimento de pelo, pelegos, cabelos                                   |
| <b>Difenilmetano</b>                             | Ácidos, básicos, mordentes   |
| <b>Estilbeno</b>                                 | Diretos, reativos, branqueadores ópticos   |
| <b>Ftalocianina</b>                              | Pigmentos orgânicos, ácidos, diretos, azóicos, à cuba, reativos, solventes                     |
| <b>Indamina e Indofenol</b>                      | Básicos, solventes   |
| <b>Indigóide</b>                                 | À tina, pigmentos orgânicos  |
| <b>Metina e Polimetina</b>                       | Básicos, dispersos   |
| <b>Nitro</b>                                     | Ácidos, dispersos, mordentes   |
| <b>Nitroso</b>                                   | Ácidos, dispersos, mordentes   |
| <b>Oxazina</b>                                   | Básicos, mordentes, pigmentos orgânicos  |
| <b>Quinolina</b>                                 | Ácidos, básicos  |
| <b>Tiazina</b>                                   | Básicos, mordentes   |
| <b>Tiazol</b>                                    | Branqueadores ópticos, básicos, diretos  |
| <b>Triarilmetano</b>                             | Ácidos, básicos, mordentes   |
| <b>Xanteno</b>                                   | Ácidos, básicos, mordentes, branqueadores ópticos, solventes                                   |

### *III.2.1 Classificação quanto à estrutura química*

Os corantes naturais são obtidos a partir de substâncias vegetais ou animais, com pouco ou nenhum processamento químico. São principalmente, do tipo mordente, embora existam alguns do tipo à tina, solventes, pigmentos, diretos e ácidos [14]. Não existem corantes naturais dispersos, azóicos ou ao enxofre. Entre as principais fontes para obtenção de corantes naturais estão as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos e bactérias). Os corantes naturais podem ser divididos nos seguintes grupos principais, de acordo com sua estrutura química [15]:

- **Compostos tetrapirrólicos:** Compreendem as clorofilas presentes em vegetais; o grupo Heme (sangue) e o grupo Bile (algas e cianobactérias), que apresentam em seu núcleo, a presença e o estado de oxidação de um íon metálico, importante no componente cromóforo. Estes compostos têm uma estrutura com anéis pirrólicos em disposições lineares ou cíclicas [15].
- **Compostos isoprenóides:** Também chamados de terpenóides, constituem uma grande família de compostos naturais, representados pelos carotenóides. Os carotenóides têm a estrutura básica de um tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. Este esqueleto básico pode ser modificado de diversas formas, como reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes e oxidação [15].

Os carotenóides hidrocarbonetos (contendo apenas carbono e hidrogênio) são chamados de carotenos, representados pelos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -caroteno, licopeno e bixina; e os derivados oxigenados, de xantofilas, representados pela capsorubina, capsantina criptoxantina, zeaxantina, xantofila e luteína. O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo, ou seja, confere a habilidade de absorver luz na região do visível. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados [15].

- **Derivados benzopiranos:** Derivados benzopiranos são metabólitos secundários heterocíclicos contendo oxigênio. Incluem as antocianinas, que são pigmentos encontrados apenas em vegetais e são dominantes em muitas frutas e flores. Pertencem ao grupo de compostos orgânicos denominados flavonóides. São capazes de absorver fortemente a luz na região do espectro visível, conferindo uma infinidade de cores entre o laranja, o vermelho, o púrpura e o azul, dependendo do pH do meio em que se encontram. A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos,



derivada do cátion 2-fenilbenzopirílio ou, mais simplificada, cátion flavílio. Em solução aquosa, as antocianinas se encontram comumente na forma de uma mistura de diferentes estruturas químicas em equilíbrio: cátion flavilium (vermelho), base anidra quinoidal (azul), pseudo-base carbitol (incolor), e chalcona (incolor ou levemente amarela) [15].

- **Compostos N-heterocíclicos:** Os compostos N-heterocíclicos, diferentes dos tetrapirróis, são metabólitos secundários das plantas e são representados pelas betalainas, presentes unicamente em vegetais. São um grupo de pigmentos amarelos, vermelhos e púrpuras, que incluem as betacianinas e as betaxantinas. As betalainas são compostos N-heterocíclicos solúveis em água, localizados nos vacúolos das plantas. As betalainas não pertencem ao grupo dos alcalóides, pois na natureza se apresentam na forma ácida, devido à presença de vários grupos carboxilas. Produzem coloração vermelha, amarela, *pink* e laranja em flores e frutas [15].

A estrutura geral das betalainas contém o ácido betalâmico acompanhado de um radical R1 ou R2. Estes radicais são uma representação geral para os possíveis substituintes desse ponto da estrutura, que podem ser de um simples hidrogênio a um complexo substituinte. A variação desses grupos é em função das diferentes fontes de onde podem ser obtidos esses pigmentos e determinam sua tonalidade e estabilidade. Desta forma, as betalainas podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo) [15].

Os corantes sintéticos são obtidos via síntese química e podem ser divididos em 20-30 grupos diferentes a respeito de seus cromóforos, que são tipicamente grupos de remoção de elétrons, responsáveis por conferir cor aos compostos. Também possuem o grupo auxocromo, que é um substituinte doador de elétrons e é responsável por intensificar a cor do cromóforo e proporcionar a solubilidade e aderência do corante para a fibra, tendo como grupos de maior destaque: NH<sub>2</sub>, -NR<sub>2</sub>, -NHR, -COOH, -SO<sub>3</sub>H, -OH e -OCH<sub>3</sub> [13, 16].

Os corantes sintéticos são em sua maioria xenobióticos, ou seja, microrganismos em rios e lagos não contêm enzimas específicas para degradação deste tipo de composto, sob condições na presença de ar e, mesmo sob condições anaeróbicas, a degradação do corante se processa muito lentamente [8].

Os principais grupos de corantes sintéticos, quanto à estrutura química, são: corantes azóicos (grupo cromógrafo azo:  $-N=N-$ ), largamente utilizados na indústria; corantes nitrados e nitrosos (grupo cromógrafo  $-NO_2$  ou  $-NO$ ); corantes do difenilmetano e do trifenilmetano (derivados aminados ou hidroxilados destes compostos); corantes antraquinônicos (derivam da antraquinona); corantes acridínicos, azídicos, oxazínicos e tiazínicos (derivam da acrinina, azinas, oxazinas e tiazinas); corantes xantênicos (derivam do xanteno); corantes indigóides e tio-indigóides (derivam do índigo e da púrpura-de-tiro) e corantes quinoleínicos (derivam da quinoleína) [13, 16].

- O grupo trifenilmetano ou triarilmetano é caracterizado por conter um átomo de carbono central e três radicais arila, que geralmente são grupos fenólicos. Sua estrutura é encontrada em diversos corantes como a fenolftaleína (resultante da condensação entre o fenol e o anidrido ftálico), o verde de bromocresol e o verde malaquita, etc [13, 16].
- A antraquinona é um composto de fórmula ( $C_{14}H_8O_2$ ), obtido pela condensação do anidrido ftálico com o benzeno. A introdução dos radicais OH,  $NH_2$ ,  $NR_2$ , fornece intermediários para a síntese dos corantes antraquinônicos [13, 16].
- O xanteno é um composto orgânico amarelo heterocíclico. Sua fórmula química é  $C_{13}H_{10}O$ . O xanteno é a base de uma classe de corantes, como a fluoresceína, as eosinas, e as rodaminas. Corantes de xanteno tendem a ser fluorescentes, dando corantes brilhantes, de amarelos rosados a vermelhos azulados [13, 16].
- A substância precursora do índigo, o indoxil, ou 3-hidroindol, está presente nas plantas e é oxidado pelo oxigênio atmosférico ao índigo, provavelmente por dimerização de um intermediário radicalar, o indol. Entre outros usos tornou-se famoso por dar a cor às calças "Jeans" [13, 16].

- Os azo corantes são uma classe de corantes orgânicos sintéticos que apresentam uma vasta variedade de cores. Além de ser constituída por compostos aromáticos, esta classe é caracterizada por apresentar uma ou mais ligações azo ( $N=N$ ), designando os corantes como monoazo, reconhecidos por conferir tonalidades mais vivas, os diazo, triazo e ainda os poliazo. Em geral a fabricação dos corantes azo é feita com acopulação de sais de diazônio com aminas, fenóis e outras substâncias gerando compostos hidroxiazo ou aminoazo. Os azo corantes apresentam uma vasta gama de tonalidades, das quais pode-se citar o amarelo, várias tonalidades de laranja, vermelho, marinho, azul, violeta e preto. Como exemplo de azo corantes tem-se o amaranto, Ponceau 4R, vermelho 40, azorrubina, tartrazina, amarelo crepúsculo, etc [13, 16].

Os corantes azo constituem a classe mais importante de substâncias que promovem cor. A versatilidade desta classe deve-se à facilidade com que os compostos azo podem ser sintetizados, e de fato quase todas as aminas aromáticas diazotizadas podem ser acopladas com qualquer sistema nucleofílico insaturado para fornecer o produto azo colorido. Se o composto resultante contiver uma amina primária, esta também pode ser diazotizada e acoplada, fornecendo um sistema de maior conjugação. Estendendo a conjugação, ou adicionando sistemas cíclicos maiores ou diferentes grupos doadores de elétrons, uma larga faixa espectral de cores pode ser obtida, com quase qualquer propriedade física ou química desejável [16].

### ***III.2.2 Formas de fixação do corante à fibra têxtil***

A forma de fixação da molécula do corante à fibra geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente 4 tipos de interações [10]:

- **Interações Iônicas** - São baseadas em interações mútuas entre o centro positivo dos grupos amino e carboxilatos presentes na fibra e a carga iônica da molécula do corante ou vice-versa. Exemplos característicos deste tipo de interação são encontrados na tintura da lã, seda e poliamida.

- **Interações de Van der Waals** - São tingimentos baseados na interação proveniente da aproximação máxima entre orbitais do corante e da molécula da fibra, de tal modo que as moléculas do corante são “ancoradas” firmemente sobre a fibra por um processo de afinidade, sem formar uma ligação propriamente dita. Esta atração é especialmente efetiva quando a molécula do corante é linear/longa e/ou achatada, e pode se aproximar o máximo possível da molécula da fibra. Exemplos característicos deste tipo de interação são encontrados na tintura de lã e poliéster e em corantes com alta afinidade por celulose.
- **Interações de Hidrogênio** - São tinturas provenientes da ligação entre átomos de hidrogênio covalentemente ligados no corante, e pares de elétrons livres de átomos doadores em centros presentes na fibra. Exemplos característicos deste tipo de interação são encontrados na tintura de lã, seda e fibras sintéticas como acetato de celulose.
- **Interações Covalentes** - São provenientes da formação de uma ligação covalente entre a molécula do corante contendo grupo reativo (grupo eletrofílico) e resíduos nucleofílicos da fibra. Exemplos característicos deste tipo de interação são tinturas de fibra de algodão.

### *III.2.3 Classificação quanto ao modo de fixação à fibra têxtil*

Os principais grupos de corantes classificados pelo modo de fixação são apresentados a seguir.

- **Corantes reativos:** são corantes contendo um grupo eletrofílico capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Este grupo de corantes apresenta como característica uma alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra [10].

- **Corantes diretos:** este grupo de corantes caracteriza-se como compostos solúveis em água, capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose, etc) através de interações de Van der Waals. A afinidade do corante é aumentada pelo uso de eletrólitos, pela planaridade na configuração da molécula do corante ou a dupla ligação conjugada que aumenta a adsorção do corante sobre a fibra. Esta classe de corantes é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo (diazó, triazo e etc.) ou pré-transformados em complexos metálicos [10].
- **Corantes azóicos:** são compostos coloridos, insolúveis em água, que são sintetizados sobre a fibra, durante o processo de tingimento. Nesse processo, a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento, que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água [10].
- **Corantes ácidos:** o termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras proteicas (lã, seda) e em fibras de poliamida sintética. No processo de tintura, o corante previamente neutralizado (solução contendo cloreto, acetato, etc.) se liga à fibra através de uma troca iônica envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato das fibras proteicas, na forma não protonada [10].
- **Corantes básicos ou catiônicos (básicos modificados):** os corantes básicos dividem-se em diversas classes químicas: azo, antraquinona, triarilmetano, triazina, oxima, acridina e quinolina. São solúveis em água e produzem soluções coloridas catiônicas, devido à presença de grupamento amino ( $\text{NH}_2$ ). Suas aplicações são direcionadas principalmente para as fibras acrílicas e, em casos especiais, para a lã, seda e acetato de celulose. Fornecem cores bastante vivas e algumas até mesmo fluorescentes de boa solidez [14, 17].

Já os antigos corantes básicos (catiônicos não modificados), devido à sua pouca solidez (principalmente à luz), hoje em dia, possuem utilização têxtil bastante

reduzida, tendo sofrido forte pressão do mercado quanto à segurança de seu manuseio, visto que grande parte dos mesmos utiliza a benzidina (CAS-92-87-5)<sup>2</sup> como matéria-prima, produto reconhecidamente carcinogênico [14].

- **Corantes à tina (VAT DYES):** é uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. Todos eles possuem, como característica química, a presença de um grupo cetônico (C=O) e são aplicados praticamente insolúveis em água. Porém, durante o processo de tintura eles são reduzidos com ditionito, em solução alcalina, transformando-se em um composto solúvel (forma leuco). O grupo cetônico toma a forma reduzida (C-OH), solúvel em água, e o corante passa a ter afinidade química com a fibra celulósica. O corante original, insolúvel, é recuperado por uma oxidação posterior [14, 17].
- **Corantes de enxofre:** é uma classe de corantes que após a aplicação se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos, os quais são altamente insolúveis em água. Em princípio são aplicados após pré-redução em banho de ditionito de sódio, que lhes confere a forma solúvel, são reoxidados subsequentemente sobre a fibra pelo contato com ar [10].
- **Corantes dispersivos:** constitui uma classe de corantes insolúveis em água, aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas, através de suspensão (partículas entre 1 a 4 micra). Durante o processo de tintura, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa sobre o acetato de celulose [10].
- **Corantes pré-metalizados:** são úteis principalmente para tintura de fibras protéicas e poliamida. Os corantes são caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição ortho em relação ao cromóforo azo. Neste tipo de tintura, explora-se a capacidade de interação entre o metal e os grupamentos funcionais portadores de pares de elétrons livres, como aqueles presentes nas fibras protéicas [10].

---

<sup>2</sup>O número CAS ou registro CAS (CAS number ou CAS registry number) de um composto químico é um número de registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service.

- **Corantes branqueadores:** as fibras têxteis no estado bruto por serem compostas primariamente de matérias orgânicos, apresentam como característica um aparência amarelada, por absorver luz particularmente na faixa de baixo comprimento de onda. A diminuição dessa tonalidade tem sido realizada na indústria ou na lavanderia pela oxidação da fibra com alvejantes químicos ou utilizando os corantes brancos também denominados de branqueadores ópticos ou mesmo branqueadores fluorescentes. Estes corantes apresentam grupos carboxílicos, azometino (N=CH) ou etilênicos (-CH=CH-), aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos que proporcionam reflexão por fluorescência na região de 430 a 440 nm quando excitados por luz ultravioleta [10].
- **Mordentes:** no grupo incluem-se muitos corantes naturais e sintéticos. O corante mordente se liga à fibra têxtil por meio de um mordente, que é uma substância associada ao tingimento com a função específica de manter a durabilidade da cor, conferindo maior resistência às lavagens e exposição ao sol [17].

### *III.3 Azul de Metileno: Propriedades e Aplicações*

O azul de metileno é um dos mais comuns dentre os corantes comerciais utilizados no processo de tingimento das indústrias têxteis [18]. É um corante básico, pertencente à classe das fenotiazinas. É orgânico, aromático, heterocíclico e solúvel em água ou álcool [8, 19]. Os corantes básicos são solúveis em água e produzem cátions coloridos em solução. Por isso, frequentemente, refere-se a eles como corantes catiônicos. Pelas características apresentadas, o azul de metileno torna-se um resíduo difícil de se tratar e, sendo catiônico, tem alta reatividade e capacidade de reagir com quase qualquer substrato [8].

O corante azul de metileno possui vastas aplicações, como a coloração de papel, tintura de cabelo temporária, tingimento de algodões, lãs, poliésteres, nylons, etc [7, 8]. Possui massa molar de 373,9 Da, que corresponde ao cloridrato de azul de metileno com três grupos de água [20] e sua estrutura está representada na Figura 4.

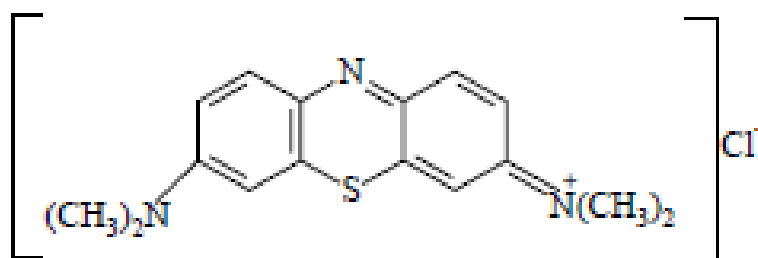


Figura 2 - A estrutura do azul de metileno [20].

O azul de metileno pode ser prejudicial, apesar de não ser extremamente perigoso [7]. Seu aquecimento pode gerar óxido de enxofre e óxido nítrico, além de causar efeitos toxicológicos em organismos aquáticos e na qualidade da água [8]. A exposição aguda ao corante pode causar aumento dos batimentos cardíacos, choque, formação de corpos de Heinz, cianose, icterícia e, em casos graves, quadriplegia e necrose tecidual em seres humanos [7]. Pode provocar queimaduras nos olhos, causando danos permanentes aos olhos de humanos e animais [21]. Se inalado, pode dar origem a curtos períodos de respiração rápida ou difícil e sua ingestão produz uma sensação de queimação, podendo causar náuseas, vômitos, diarreia e gastrite. A ingestão de uma superdosagem causa dor abdominal e no peito, dor de cabeça intensa, sudorese excessiva, confusão mental, micção dolorosa e meta-hemoglobinemia [22].

Devido a tais características e às graves consequências ambientais, citadas anteriormente, se torna essencial o tratamento de resíduos para a remoção do azul de metileno do processo efluente.

#### ***III.4 Tratamentos de Resíduos e Efluentes de Corantes Químicos***

Os efluentes provenientes da indústria de corantes ou de processos envolvendo tingimento têxtil, não tratados convenientemente, são uma das preocupações ecológicas mais emergentes. Deste modo, corantes altamente insolúveis – que requerem uma baixa solubilidade no processo de aplicação – apresentam menor biodisponibilidade do que corantes contendo grupos sulfônicos, os quais são mais solúveis, embora apresentem resíduos tóxicos na água de lavagem devido à baixa fixação [10].



Efluentes contendo corantes, normalmente, não são passíveis de tratamentos biológicos convencionais, devido à sua natureza recalcitrante e efeitos inibitórios [23]. Além disso, as cores fortes transmitidas para os ecossistemas aquáticos causam problemas estéticos, bem como problemas ecológicos sérios, tais como carcinogenicidade e inibição da fotossíntese bentônica. Por esses motivos, diversas técnicas – que serão apresentadas adiante – têm sido desenvolvidas para a remoção preferencial de corantes de águas residuais [24-27].

O grupo que atrai maior atenção é o de corantes contendo a função azo-aromático como cromóforo, os quais constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente. A biotransformação destes corantes pode ser responsável pela formação de aminas, benzidinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica [10].

A liberação de corantes no ambiente constitui apenas uma pequena proporção da poluição da água, mas os corantes são visíveis em pequenas quantidades, devido à sua luminosidade. Legislações governamentais mais severas têm forçado as indústrias têxteis a tratar seus efluentes com um padrão de qualidade cada vez maior, além de reduzir a quantidade e toxicidade das emissões; realizar a reciclagem e reúso de resíduos; promover a adaptação e otimização de processos de produção; e a substituição de matérias-primas tóxicas [14, 26].

#### ***III.4.1 Legislação Ambiental aplicada ao reúso de água e ao lançamento de efluentes em recursos hídricos***

Numa perspectiva de proteção da saúde humana, a Diretiva 2002/61/CE do Parlamento e Conselho Europeu da União Européia, proíbe a utilização de corantes azóicos perigosos e a comercialização de alguns artigos têxteis e de couro tingidos com aquelas substâncias. Esta Diretiva altera pela décima nona vez a Diretiva 76/769/CEE do Conselho, relativa às disposições legislativas, regulamentares e administrativas dos Estados-Membros respeitantes à limitação da colocação no mercado e da utilização de algumas substâncias e preparações perigosas [14, 28, 29].

A Diretriz de controle de carga orgânica em efluentes líquidos de origem industrial, instituída pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA), abrange os efluentes líquidos industriais, bem como os esgotos sanitários gerados pelas indústrias, quando tratados em conjunto com os efluentes industriais e estabelece, como parte integrante do Sistema de Licenciamento de Atividades Poluidoras – SLAP, exigências de controle de poluição das águas que resultem na redução de [30]:

- Matéria orgânica biodegradável de origem industrial;
- Matéria orgânica não biodegradável de origem industrial;
- Compostos orgânicos de origem industrial que interferem nos mecanismos ecológicos dos corpos d'água e na operação de sistemas biológicos de tratamento implantados pelas indústrias e pelas operadoras de serviços de esgoto.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), juntamente com o Conselho Nacional de Recursos Hídricos (CNRH) e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), aprovaram dispositivos que dispõem sobre o descarte de efluentes em corpos d'água, assim como o reúso de água, dentre os quais destacam-se [14, 31]:

- Resolução CONAMA nº 357/2005: dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
- Resolução CONAMA nº 430/2011: dispõe sobre condições, parâmetros, padrões e diretrizes para gestão do lançamento de efluentes em corpos de água receptores, alterando parcialmente e complementando a Resolução CONAMA nº 357/2005.
- Resolução CNRH nº 54/2005: estabelece modalidades, diretrizes e critérios gerais para a prática de reúso direto não potável de água, e dá outras providências.
- Resolução CONAMA nº 396/2008 – Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. No que se refere à disposição de efluentes, o art. 27 diz o seguinte:

“Art. 27. A aplicação e disposição de efluentes e de resíduos no solo deverão observar os critérios e exigências definidos pelos órgãos competentes e não poderão conferir às águas subterrâneas características em desacordo com o seu enquadramento.”

### *III.4.2 Tratamento de efluentes industriais*

De acordo com a NBR 9800:1987, efluente líquido industrial é o despejo líquido proveniente do estabelecimento industrial, compreendendo emanções de processo industrial, águas de refrigeração poluídas, águas pluviais poluídas e esgoto doméstico [14, 32].

O gerenciamento adequado dos efluentes é importante para minimizar impactos ambientais, o que exige a adoção de procedimentos específicos de coleta e tratamento. A escolha da tecnologia mais adequada para o tratamento de um efluente depende da análise detalhada dos tipos e características dos contaminantes que deverão ser eliminados ou minimizados, já que a maioria dos processos e operações unitárias de tratamento, com pequenas exceções, são aplicáveis para classes muito específicas de contaminantes. A opção por uma determinada técnica de tratamento ou por uma combinação entre duas ou mais técnicas é o que define um sistema de tratamento e deve fundar-se no conhecimento do potencial de cada técnica e dos mecanismos envolvidos na redução do contaminante de interesse [14]. Os processos de tratamento são reunidos em grupos distintos, apresentados a seguir .

- **Processos físicos:** são assim chamados em razão dos fenômenos físicos que ocorrem na remoção ou na transformação de poluentes das águas residuárias. Geralmente os mesmos são utilizados para separar sólidos em suspensão nas águas residuárias, mas também podem ser utilizados para equalizar e homogeneizar um efluente. Dentre os processos físicos destacam-se: a remoção de sólidos grosseiros, sedimentáveis e flutuantes; remoção da umidade de lodo; homogeneização e equalização de efluentes; diluição de águas residuárias [14].
- **Processos químicos:** são processos em que a utilização de produtos químicos é necessária para aumentar a eficiência da remoção de um elemento ou substância,

modificar seu estado ou estrutura, ou simplesmente alterar suas características químicas. A acidificação de um efluente visando a quebra de emulsão de certos óleos e graxas e o ajuste do pH de uma solução para a precipitação de metais na forma de óxidos e hidróxidos são exemplos de processos químicos de tratamento de águas residuárias. Quase sempre são utilizados conjugados a processos físicos e algumas vezes a processos biológicos. Os principais são: coagulação - floculação; precipitação química; oxidação; cloração; neutralização ou correção do pH [14].

- **Processos biológicos:** são assim denominados por dependerem da ação de microrganismos aeróbios ou anaeróbios. Os fenômenos inerentes à respiração e à alimentação desses microrganismos são predominantes na transformação da matéria orgânica, sob a forma de sólidos dissolvidos e em suspensão, em compostos simples como sais minerais, gás carbônico, água e outros. Os mais conhecidos são: lodos ativados e suas variações; filtros biológicos anaeróbios ou aeróbios; lagoas aeradas; lagoas de estabilização facultativas e anaeróbias; digestores anaeróbios de fluxo ascendente [14].

A maior parte das remoções de corantes ocorre por meios físico-químicos, como a coagulação química e a adsorção em carvão ativado. Tais métodos geralmente são muito caros e, ainda que os corantes sejam removidos, a acumulação de lamas concentradas cria um problema de eliminação. As técnicas de tratamento fundamentadas em processos de coagulação, seguidos de separação por flotação ou sedimentação, apresentam uma elevada eficiência na remoção de material particulado. No entanto, a remoção de cor em compostos orgânicos dissolvidos mostra-se deficiente. Tratamentos baseados em processos biológicos são frequentemente utilizados, já que permitem a transformação de compostos orgânicos tóxicos em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , nos processos aeróbios, ou  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$  nos anaeróbios, com custos relativamente baixos. Contudo, são procedimentos que requerem longo tempo de operação para que o efluente atinja os padrões exigidos. Existe a necessidade de encontrar tratamentos alternativos que sejam eficazes na remoção de corantes de grandes volumes de efluentes e que sejam de baixo custo, tais como sistemas biológicos ou de combinação dos sistemas [8, 25-27, 33, 34].

Os processos oxidativos merecem destaque, pois a oxidação química é um processo que demonstra grande potencial no tratamento de efluentes contendo compostos tóxicos não biodegradáveis. Através de reações químicas de oxidação pode-se degradar componentes orgânicos tóxicos, diminuir a intensidade de cor dos efluentes e ainda tem como vantagem o fato de destruí-los e não somente transferi-los de fase, como ocorre, por exemplo, com os métodos de precipitação, coagulação, floculação, sedimentação, dentre outros, que resultam em duas fases: uma composta pela água limpa e outra pelo resíduo contaminante concentrado. A mineralização do poluente por processos oxidativos convencionais pode ocorrer por métodos químicos e biológicos, por exemplo, com o uso de oxigênio, ozônio, cloro, hipoclorito de sódio, dióxido de cloro, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e bactérias, porém, os processos oxidativos convencionais mais utilizados, são a incineração e o tratamento biológico [35-37].

#### ***III.4.3 Processos Oxidativos Avançados (POA)***

Os processos oxidativos avançados (POA) têm sido extensivamente estudados devido ao seu potencial como alternativas ou complementos aos processos convencionais de tratamento de efluentes. Nestes estudos, têm se evidenciado a sua potencialidade, que se estabelece cada vez mais como uma tecnologia aplicável no tratamento de resíduos, águas industriais e na remediação de solos contaminados [36, 37].

Em geral, os processos oxidativos avançados são caracterizados pela formação de radicais hidroxilas ( $\cdot\text{OH}$ ) no meio reacional que atuam como oxidantes principais. Esses radicais apresentam um potencial de oxidação bastante elevado e são poucos seletivos, sendo capazes de reagir com praticamente todas as classes de compostos orgânicos, por mecanismos distintos, dependendo da estrutura do “composto-alvo”, permitindo a completa degradação destas substâncias, com taxas de mineralização da ordem de  $10^6$  a  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , pois o potencial padrão de redução do radical hidroxila é de  $E^0=2,8 \text{ V}$ , sendo muito superior ao dos oxidantes convencionais. Portanto, os processos oxidativos avançados se destacam pela possibilidade efetiva de serem utilizados na completa mineralização de componentes tóxicos e danosos [38-40].

Os processos oxidativos avançados podem ser classificados em dois grandes grupos: os sistemas homogêneos e os sistemas heterogêneos. Os homogêneos ocorrem em uma fase e envolvem reações com ozônio:  $O_3/UV$ ; com peróxido de hidrogênio:  $H_2O_2/UV$ ; e com  $H_2O_2/Fe^{2+}$  (Fenton). Não necessariamente a radiação UV é aplicada nestes sistemas, podendo-se utilizá-la ou não. Os sistemas heterogêneos se diferenciam dos homogêneos devido à presença de catalisadores semicondutores como, por exemplo, o dióxido de titânio ( $TiO_2$ ). Os principais métodos deste sistema são  $TiO_2/O_3/UV$ ;  $TiO_2/H_2O_2/UV$  e Eletro-Fenton. Os sistemas combinados  $TiO_2/UV/H_2O_2$  e  $Fe^{+2}/UV/H_2O_2$  são considerados um dos mais promissores para a remediação de águas contaminadas [35, 36].

A utilização da radiação UV e as propriedades semicondutoras do catalisador permitem a formação dos radicais hidroxilas e a consequente oxidação do efluente. Nesses sistemas homogêneos e heterogêneos, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é a fonte mais comum de radicais  $\cdot OH$ , seja por sua decomposição catalítica na presença de íons metálicos ou de óxidos semicondutores, ou ainda, por irradiação com luz ultravioleta (UV). O uso de peróxido de hidrogênio em processos industriais e em tratamento de efluentes não deixa resíduo e, por estas vantagens, é mais utilizado que o ozônio ( $O_3$ ) na degradação ou mineralização de produtos tóxicos, revelando-se de extrema importância [41]. Os processos oxidativos avançados apresentam as seguintes vantagens [35]:

- A área necessária para o sistema biológico pode ser reduzida e em alguns casos, eliminada;
- O peróxido de hidrogênio quando utilizado, se dissocia e não produz resíduo nocivo (“reagente limpo”);
- O processo é de fácil operação e de grande estabilidade.

E as desvantagens são as seguintes [35]:

- O peróxido de hidrogênio não é seletivo;
- Intermediários de reação podem ser mais tóxicos que o contaminante a ser tratado;
- A taxa de oxidação química é limitada pela taxa de formação dos radicais hidroxila e é dependente da matéria orgânica presente e da quantidade de oxidante adicionado ao sistema;
- Custo elevado do peróxido de hidrogênio.

### **Processos Oxidativos em Corantes Têxteis:**

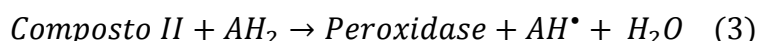
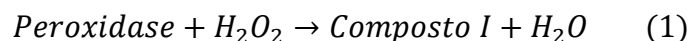
São diversas as pesquisas na literatura sobre a degradação de corantes têxteis, com elevada eficiência de remoção de cor. Por exemplo, no estudo da degradação do corante reativo índigo carmim, utilizando o sistema heterogêneo TiO<sub>2</sub>/UV, obteve-se 100% de remoção de cor [42]. No estudo da degradação do corante reativo orange 16 utilizando UV, foi obtido 100% de remoção de cor, em 100 minutos [43]. Na degradação do corante vermelho congo, utilizando o sistema homogêneo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, obteve-se 97% de remoção de cor em 5 minutos de reação [40].

Pode-se observar que a literatura descreve diversos processos de oxidação avançados que são bastante eficientes na remoção de cor dos efluentes da indústria têxtil, de forma rápida e eficiente [17, 40, 42, 43].

### **Processos Oxidativos Utilizando Enzimas:**

Os processos oxidativos enzimáticos envolvem reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxidação-redução e, por isso, as enzimas envolvidas neste processo oxidativo são as chamadas oxidorredutases [44]. Essas enzimas são classificadas em subclasses, pois atuam em diferentes grupos doadores ou receptores, sendo 22 subgrupos e as desidrogenases, redutases e oxidases são as mais comuns [45].

As peroxidases, que são um tipo de oxidorredutases, são utilizadas pelas indústrias para diversos fins. Por exemplo, no tratamento de diversos compostos orgânicos, incluindo corantes, nos quais podem catalisar a degradação dos tipos aromáticos, tanto por precipitação, quanto pela ruptura do anel aromático. As reações que compõem o ciclo catalítico da enzima são [46] :



No primeiro estágio do processo catalítico, ocorre a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é reduzido, produzindo água e o composto I, uma forma intermediária reativa, que apresenta um estado de oxidação mais

alto em comparação com a enzima nativa. No segundo estágio, o composto I oxida uma molécula de substrato ( $AH_2$ ), neste caso o corante aromático, gerando um substrato radicalar e o composto II. Finalmente, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato, fazendo com que a enzima retorne a sua forma inicial. Os radicais livres formados durante o ciclo ( $AH^\bullet$ ) difundem-se do sítio ativo da enzima para o meio da solução. Os radicais livres são reativos e tendem a iniciar uma reação onde as moléculas aromáticas são ligadas, formando um produto poliaromático com solubilidade reduzida ( $2AH^\bullet \rightarrow A_2H_{2(s)} \downarrow$ ), o que explicaria a precipitação do corante pela ação das peroxidases [46].

Na literatura, são encontrados diversos trabalhos realizados com as oxidorreduções, seja esta proveniente de microrganismos, do extrato bruto da enzima ou mesmo com a enzima pura, evidenciando a ótima eficiência das oxidorreduções. Por exemplo, no estudo da oxidação de azo corantes pela enzima peroxidase, proveniente do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, foi obtida uma eficiência de 99% na remoção do contaminante [1].

No estudo da oxidação de nove corantes têxteis, dos grupos reativos e dispersos, utilizando as enzimas lacases e peroxidases, provenientes dos fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, obteve-se eficiência de 98% na remoção de cor [47]. Na oxidação do corante Azul Lanaset 2R, utilizando a enzima *horseradish peroxidase* (HRP), foram obtidos 94% de remoção do poluente [44] e na oxidação de diferentes corantes têxteis pela enzima HRP, obteve-se remoção de 97% do corante Azul Drimaren CL-R [48].

### ***III.5 Tratamento Enzimático de Resíduos e Efluentes de Corantes Químicos***

O uso de enzimas tem revelado uma importante aplicação na engenharia ambiental. Enzimas de diversas fontes (fungos e plantas) têm sido utilizadas no tratamento de compostos à base de corantes [34]. A fonte e a natureza da enzima selecionada, juntamente com as condições do sistema, mostraram ter influência significativa sobre a performance geral na remoção de poluentes [49].



As enzimas têm capacidade de ação em poluentes recalcitrantes específicos para removê-los por precipitação ou transformação em outros tipos de produtos. Também são capazes de modificar as características de determinados resíduos para torná-los mais favoráveis ao tratamento ou auxiliar na conversão do material residual em produtos de valor agregado [9].

Um número considerável de pesquisas têm sido realizadas durante as últimas duas décadas para investigar as novas possibilidades oferecidas pelas enzimas no tratamento de resíduos. As razões para esse interesse são as seguintes [9]:

- 1) A taxa de introdução de xenobióticos e poluentes orgânicos recalcitrantes no meio ambiente está em ascensão, e está se tornando cada vez mais difícil alcançar o grau necessário de remoção destes poluentes, utilizando a química convencional e os processos biológicos. Portanto, existe a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos de tratamento que sejam mais rápidos, mais baratos e confiáveis e de mais simples implementação do que os processos atuais.
- 2) Existe um reconhecimento crescente de que as enzimas podem ser utilizadas para focar poluentes específicos como alvos para o tratamento.
- 3) Avanços biotecnológicos recentes permitiram a produção mais barata e mais acessível de enzimas, através de melhores procedimentos de isolamento e purificação.

A maioria dos processos de tratamentos de efluentes podem ser caracterizados como físico-químicos ou biológicos. O tratamento enzimático se encontra entre essas duas categorias tradicionais, pois envolve processos químicos baseados na ação de catalisadores biológicos. As vantagens potenciais do tratamento enzimático, quando comparado com o convencional, incluem [9]:

- Aplicação a compostos biorefratários.
- Operação sob concentrações altas e baixas de contaminantes.
- Operação em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade.
- Ausência de efeitos de choque de carga.
- Ausência de atrasos associados à aclimatização da biomassa.

- Redução no volume de lama (não há geração de biomassa).
- Facilidade e simplicidade no controle dos processos.

Diante dessas potenciais vantagens, diversas pesquisas têm focado no desenvolvimento de processos enzimáticos para o tratamento de solos, águas residuais, resíduos sólidos e resíduos perigosos [9].

A ação catalítica das enzimas é extremamente eficiente e seletiva, se comparada à catálise química, devido à taxas reacionais mais elevadas, condições de reação mais suaves e maior estereoespecificidade. São capazes de catalisar reações à temperaturas relativamente baixas e em toda a faixa de pH da fase aquosa. Apesar dos biocatalisadores serem largamente utilizados em diversas áreas, seu papel na solução de problemas ambientais foi evidenciado a pouco tempo. A combinação da catálise enzimática com a geração eletroquímica pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mostrou ser uma alternativa em potencial para processos tradicionais [4].

Foi demonstrado que enzimas extracelulares de fungos de raízes brancas como as peroxidases (*lignin peroxidase* (LiP), *horseradish peroxidase* (HRP) e *manganese peroxidase* (MnP)) e *pHenoxidase* (laccase) podem ser utilizadas para degradar e desintoxicar hidrocarbonetos poliaromáticos, bifenilos policlorados e certos corantes. As peroxidases parecem ser oxidantes superiores, catalisando a descoloração de corantes sintéticos [50].

### **III.6 *Horseradish peroxidase (HRP)***

A *horseradish peroxidase* (HRP) é, sem dúvida uma das enzimas mais estudadas no campo recente do tratamento enzimático de resíduos [9]. A HRP contém um grupamento heme (grupo prostético que consiste de um átomo de ferro contido no centro de um largo anel orgânico heterocíclico chamado porfirina) e utiliza peróxido de hidrogênio para oxidar uma ampla variedade de compostos aromáticos tóxicos, como fenóis, bifenóis, anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos relacionados [9, 51]. Os produtos de reação são polimerizados através de um processo não enzimático, que leva à formação de precipitados insolúveis em água, podendo ser facilmente removidos de águas residuais por sedimentação ou filtração [9].

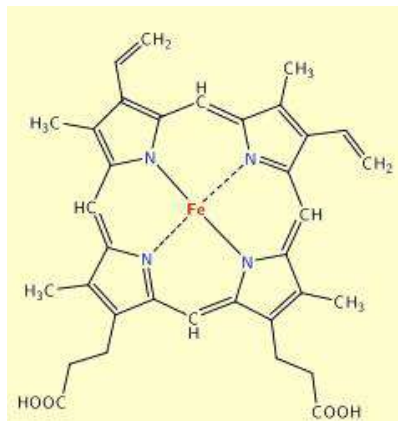


Figura 3 - Grupo prostético heme das peroxidases [17].

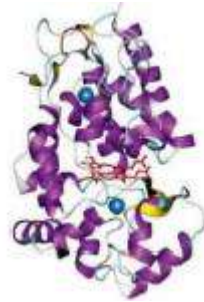
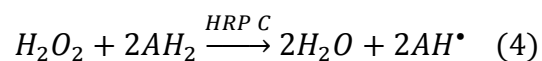


Figura 4 - Estrutura tridimensional da HRP mostrando o grupo heme (de cor vermelha) no sítio ativo da molécula entre dois átomos de cálcio (esferas azuis) [17].

A HRP pertence à classe III (peroxidases clássicas de plantas secretoras) da superfamília de peroxidases, que inclui peroxidases de bactérias, fungos e plantas [52]. Sua atividade enzimática é uma redução cíclica e oxidação do átomo de ferro do grupo hematina em meio adequado [4]. A maioria das reações catalisadas pela HRP pode ser expressa pela equação 4:



Na qual  $AH_2$  e  $AH^\bullet$  representam o substrato de redução e seu produto radical, respectivamente. Substratos de redução típicos incluem fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, indóis, aminas e sulfonatos [51].

A *horseradish peroxidase* é particularmente adequada para o tratamento de águas residuais, pois mantém sua atividade ao longo de uma ampla faixa de pH e temperatura [53]. Seu mecanismo de ação é relativamente bem compreendido e foi

modelado matematicamente [54]. A maioria das aplicações da HRP tem foco no tratamento de contaminantes fenólicos [53, 55, 56], mas seu uso no tratamento de anilinas, hidroxiquinolinas e arilaminas cancerígenas, como as benzidinas e naftilaminas, também tem sido demonstrado [55, 57].

Além disso, a HRP tem capacidade de coprecipitar certos contaminantes difíceis de remover, incluindo seus não-substratos, juntamente com compostos de mais fácil remoção, por induzir a formação de polímeros mistos, que se comportam de forma semelhante aos produtos poliméricos de compostos mais facilmente removíveis. Este fenômeno tem uma importante implicação prática para águas residuais que normalmente contêm poluentes diferentes [55].

A *horseradish peroxidase* vem sendo estudada há mais de um século e, nos últimos anos, foram descobertas novas informações sobre sua estrutura tridimensional, seus intermediários catalíticos, mecanismos de catálise e as funções de resíduos de aminoácidos específicos. A mutagênese sítio-específica e técnicas de evolução dirigida de proteínas são utilizadas rotineiramente para investigar a estrutura e função da HRP e oferecem a oportunidade de desenvolver enzimas projetadas para aplicações práticas em produtos naturais, síntese de produtos da química fina, diagnósticos médicos e biorremediação [51].

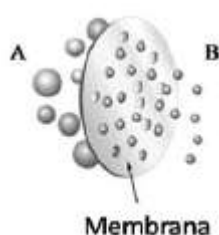
### ***III.7 Técnicas de Imobilização de Enzimas***

Apesar de serem capazes de catalisar uma grande variedade de compostos aromáticos na presença de peróxido de hidrogênio, algumas limitações impedem o uso da forma líquida ou livre dessas enzimas, pois sua estabilidade e capacidade catalítica diminui conforme a natureza complexa dos efluentes. Algumas dessas limitações podem ser contornadas com o uso de enzimas imobilizadas que podem ser utilizadas repetida e continuamente, como catalisadores de vida útil mais longa [58]. Uma das definições mais abrangentes de enzimas imobilizadas é a que considera imobilizadas “enzimas que estão fisicamente confinadas, ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente” [59].

A forma imobilizada das enzimas possui diversas vantagens sobre as enzimas solubilizadas, como maior estabilidade, menor custo quando reutilizada, facilidade na recuperação e purificação do produto, reciclabilidade, proteção da enzima contra desnaturantes, proteólises e suscetibilidade reduzida à contaminantes [58]. Essa metodologia tornou-se uma das estratégias para aumentar a estabilidade enzimática contra a inativação causada por diversos tipos de desnaturantes e aumentar a reutilização através de processos contínuos e em batelada. Outra vantagem é a facilidade de separação dos produtos solúveis de reação e do substrato não tratado [60].

Vários métodos de imobilização são conhecidos, sendo os mais clássicos:

- **Métodos para imobilização de enzimas solúveis:** nestes métodos, as enzimas mantêm sua solubilidade inalterada e são separadas do restante da solução por membranas semipermeáveis, fibras porosas ou membranas de ultrafiltração. De modo geral, neste processo ocorre a contenção da enzima livre em uma câmara ou compartimento, através do qual o substrato (reagente) passa e é convertido em produto. Deste modo, é possível utilizar continuamente a enzima, na sua forma nativa, por períodos prolongados de tempo. As membranas utilizadas neste tipo de imobilização variam muito em sua composição química e tamanho de poro, podendo ser de natureza química bem simples como as de policarbonato (Figura 5) ou mais complexas como as de compósitos de óxido de alumínio/polietilenoimina/polianilina [59].



**Figura 5 - Membrana de Policarbonato fazendo a separação de compartimento – Compartimento A: Enzima e substrato; Compartimento B: saída do produto [59].**

- **Imobilização sem modificação química da enzima:** neste método a enzima nativa é aprisionada em uma câmara por uma membrana ou fibra, que são impermeáveis à molécula de enzima, mas são amplamente permeáveis às moléculas de substrato ou produto. Trata-se de uma técnica extremamente

simples, em que a enzima não sofre qualquer alteração em seu micro-ambiente. No entanto, há algumas restrições a sua ampla aplicação, uma vez que os produtos da reação devem ser moléculas pequenas, capazes de passar através dos poros do sistema [59].

- **Imobilização com modificação química da enzima:** este método consiste primariamente em modificar quimicamente a molécula de enzima, através da ligação de compostos de massa molar variada sem, no entanto, alterar a solubilidade da enzima nativa ou sua atividade catalítica. Deste modo, a enzima modificada adquire massa molar e diâmetro maior, permitindo a sua retenção com o uso de membranas com porosidade elevada, as quais facilitam o processo de difusão entre os ambientes, seja do substrato, seja do produto [59].
- **Métodos para a preparação de enzimas insolúveis:** nos métodos de enzima insolúvel, a enzima sofrerá modificação em sua solubilidade, passando a operar em fase diferente daquela do solvente, onde estarão presentes os substratos e para onde, via de regra, deverão retornar os produtos da reação. Nestes métodos, a molécula de enzima sofre tanto modificação química como no seu microambiente [59].
- **Aprisionamento:** o método de aprisionamento consiste em aprisionar ou enclausurar a molécula de enzima dentro de uma matriz polimérica, de forma que seja possível a entrada do substrato e saída do produto, mas não da enzima. O método se subdivide, de acordo com o material utilizado, em aprisionamento em gel (Figura 6), no qual são utilizados materiais tais como o ágar, poliacrilamida, gelatina e alginato; e aprisionamento em fibra (Figura 7), em que o acetato de celulose é um exemplo típico. Uma terceira subdivisão diz respeito ao aprisionamento em nano/microcápsulas (Figura 8), no qual as enzimas são retidas dentro de membranas poliméricas, preparadas à partir de material semi-permeável que permitem a difusão do substrato e do produto [59].

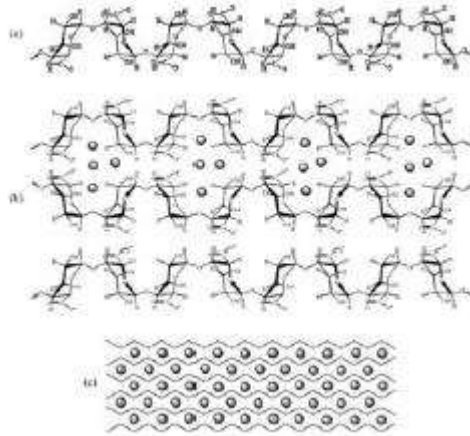


Figura 6 - Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa aprisionando a enzima no interior da matriz; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas com enzimas aprisionadas [59].

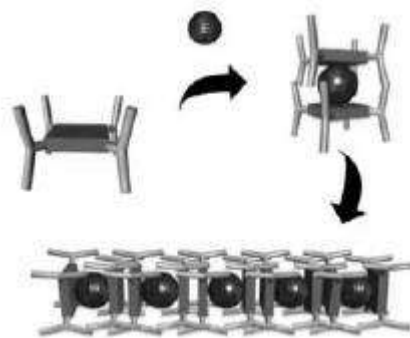


Figura 7 - Aprisionamento em fibras [59].

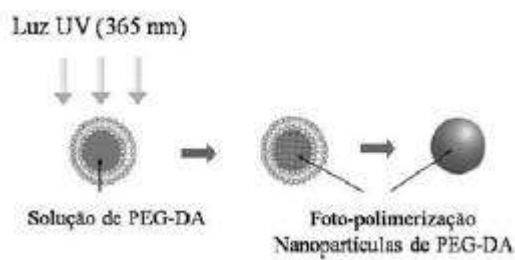


Figura 8 - Preparação de nanopartículas de hidrogel. Nanopartículas contendo solução de Poli(etileno glicol) - Diacrilato (PEG-DA) [59].

A imobilização com diferentes materiais poliméricos tem sido estudada, juntamente com sua aplicação no tratamento de diversos poluentes [58]. Os alginatos aparentam ser um dos polímeros mais adequados à tecnologia de imobilização por aprisionamento, devido às suas propriedades hidrofílicas, origem natural e estabilidade diante de condições experimentais extremas [60]. Entretanto, a seleção apropriada do material de encapsulamento específico para cada enzima e a otimização das condições de processos ainda estão em estágios iniciais de desenvolvimento [61].

- **Ligação ao suporte:** o método consiste na ligação da enzima a suportes insolúveis, gerando assim uma segunda fase diferente do meio reacional, onde a enzima se encontra fixada, e pode ser subclassificada de acordo com o tipo de ligação da enzima com o suporte [59].
- **Ligação ao suporte por adsorção:** neste método de imobilização, grupos superficiais do suporte interagem com grupos de superfície da enzima, através de atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals) ou ainda pontes de hidrogênio. O tipo predominante de interação depende da natureza química e propriedades superficiais do suporte e da enzima em questão [59].
- **Ligação Iônica:** no método de imobilização por força iônica, o suporte possui grupos funcionais ionizáveis característicos, os quais irão interagir especificamente com grupos da enzima (Figura 9). No processo, é possível que algum tipo de adsorção ocorra simultaneamente. Entretanto, a força da interação iônica é maior do que a de adsorção e, portanto, prevalece [59].

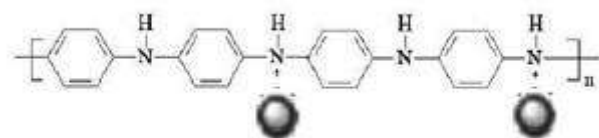


Figura 9 - Imobilização por interação iônica em polianilina negativamente carregada [59].

- **Ligação covalente ao suporte:** a imobilização de enzimas através da formação de ligações covalentes entre um grupo ligante da enzima e o suporte insolúvel é um dos métodos mais largamente utilizados e investigados. Este método emprega os mais variados tipos de ligação, sendo possível imobilizar uma

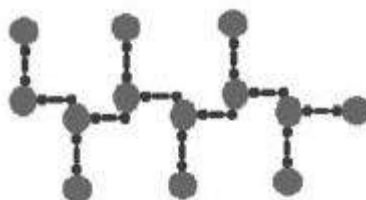


enzima através de qualquer um de seus grupos superficiais reativos. Assim sendo, há uma gama imensa de reações que podem ser utilizadas para imobilização via ligação covalente. Um dos métodos mais largamente utilizados para imobilização por ligação covalente é o uso de vidro ou materiais derivados de sílica. Nestes materiais é comum o tratamento para ampliação da quantidade de grupos reativos através de silanização, seguida de introdução do braço espaçador de glutaraldeído que atuará como ponto de ligação para a enzima (Figura 10) [59].



**Figura 10 - Imobilização covalente de Xerogel Organicamente Modificado (OMX) por multipontos [59].**

- **Ligação Cruzada ou Cross-linking:** a insolubilização de enzimas por este método envolve a formação de ligação covalente entre moléculas de enzima e reagentes bifuncionais de baixa massa molar, formando agregados unidos por ligações intermoleculares. Vários meios distintos são disponíveis para o preparo de derivados insolúveis de enzimas por ligação cruzada, usando reagentes bifuncionais de baixa massa molar. Um aspecto importante a ser ressaltado é o fato de que o método de ligação cruzada, tal qual descrito aqui, não envolve a associação da enzima com um suporte sólido. O produto da ligação de várias moléculas de enzimas através de reagentes bifuncionais é que se torna insolúvel e precipita, formando um agregado sólido cataliticamente ativo (Figura 11) [59].



**Figura 11 - Imobilização por ligação cruzada “Cross-linking” [59].**

## **CAPÍTULO IV – METODOLOGIA**

### ***IV.1 Purificação da horseradish peroxidase (HRP) – Método adaptado da Toyobo do Brasil***

A enzima utilizada foi a *horseradish peroxidase* (HRP) (EC 1.11.17), que foi gentilmente cedida pela Toyobo Do Brasil em sua forma liofilizada.

A enzima veio misturada com terra diatomácea e foi solubilizada, filtrada e tratada, antes do procedimento de medida da atividade enzimática. Pesou-se uma determinada massa de HRP, que foi solubilizada em tampão fosfato pH 7,0. A solução obtida foi filtrada em papel de filtro grau qualitativo (INLAB) com porosidade de 6 µm. O filtrado recolhido foi submetido ao processo de tratamento por diálise em membrana de celulose [62].

Foi utilizada uma membrana de diálise SPECTRUM® (*Spectra/Por molecular porous membrane tube* com espessura de parede de 25 mm, 16mm de diâmetro, faixa de massa molar 12000 – 14000 kDa). Após fechadas as extremidades, a membrana foi colocada em um becker de 2 litros, imersa em água deionizada, na geladeira por 24 horas. Ao final, a solução de enzima foi recolhida da membrana, colocada em tubos de polipropileno de 15 mL e armazenada em freezer. O descongelamento foi feito somente no momento da medição da atividade enzimática e utilização nas reações com o corante [62].

### ***IV.2 Avaliação da atividade enzimática da HRP***

A atividade enzimática foi avaliada pelo método da 4-aminoantipirina [63]. Em uma cubeta para DQO, foram adicionados 300 µL do reagente fenólico (fenol 0,2 M), 4,5 mL de tampão pH 7,0, 300 µL de 4-aminoantipirina e 600 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60 mg/L). Com esses reagentes, foi feita a leitura como o zero ou branco no espectrofotômetro. Em seguida foram adicionados 300 µL da solução de HRP, diluída 400 vezes, e feita a leitura no espectrofotômetro, por 1 minuto, a 510 nm [63].

Para o cálculo da atividade enzimática, considerou-se uma unidade de atividade enzimática como sendo a taxa de consumo de peróxido de hidrogênio (em µmol) durante 1,0 minuto de reação. A taxa de consumo foi acompanhada pela absorbância do

complexo vermelho formado pela reação entre o radical hidroxila do fenol e a 4-aminoantipirina. Este complexo tem absorção em 510 nm e a coloração formada é proporcional ao consumo de peróxido de hidrogênio [63]. A Figura 12 mostra o complexo vermelho após 1,0 minuto de reação. A absorbância foi medida com o espectrofotômetro da HACH modelo DR 2800.



Figura 12 - Análise da atividade enzimática – (1) Início da reação e (2) Complexo Vermelho Formado [17].

#### ***IV.3 Cálculo da concentração de HRP para imobilização e reação com o corante***

Primeiramente, foi definido o valor da massa de enzima imobilizada a ser adicionada em cada reação. Em seguida, multiplicou-se esse valor pela quantidade de reações necessárias, para se obter a massa total de esferas a serem preparadas. Como a densidade das esferas é  $1\text{g/cm}^3$ , a massa total de esferas foi igual ao volume de alginato preparado. Depois, definiu-se o valor de atividade da enzima a ser utilizada em cada reação e multiplicou-se esse valor pelo número de reações necessárias, obtendo-se a atividade total a ser preparada no alginato, que posteriormente foi dividida por cada meio reacional, através da adição da massa de esferas previamente definida. O cálculo do volume de enzima concentrada necessário para a obtenção da atividade total a ser imobilizada, foi realizado por meio da equação 5 [63].

$$\text{Atividade enz. conc.} \times \frac{\text{Volume de enz. conc.}}{\text{Volume de alginato}} = \text{atividade total imobilizada} \quad (5)$$

Por exemplo, para 5 g de esferas em cada reação e para 4 reações, foram preparadas no total 20 g de esferas, através da imobilização em 20 mL de alginato de cálcio. A atividade enzimática definida para cada meio reacional foi de 25 U/mL, que

multiplicada por 4 reações, resultou em um valor de atividade total de 100 U/mL. Como foram preparadas 20 g de esferas contendo no total 100 U/mL, sendo devidamente homogeneizadas, cada 5 g de esferas continha no total 25 U/mL e assim foi obtida a atividade enzimática estipulada para cada meio reacional. Ainda nesse exemplo, se a atividade da HRP concentrada – calculada pelo método da 4-aminoantipirina – foi de 2.000 U/mL, o volume de enzima concentrada a ser utilizado foi de 1 mL, calculado pelas equações x e x da seguinte forma:

$$2.000 \text{ U/mL} \times \frac{\text{Volume de enz. conc.}}{20 \text{ mL}} = 100 \text{ U/mL} \quad (6)$$

$$\text{Vol enz. conc.} = \frac{100 \times 20}{2.000} = 1 \text{ mL} \quad (7)$$

#### ***IV.4 Imobilização da HRP: aprisionamento em gel de alginato de cálcio***

Para o preparo do gel de alginato de cálcio foi dissolvida, de acordo com a concentração desejada, determinada massa em água destilada, até a formação de um gel homogêneo. Então, a HRP concentrada (volume previamente calculado) foi adicionada ao gel de alginato de cálcio, homogeneizada e a solução de gel e HRP foi gotejada em 100 mL de cloreto de cálcio (0,1 M), por meio de uma seringa (Figura 13). O sistema permaneceu em repouso por tempo determinado (de acordo com cada experimento) e ao final, as cápsulas foram retiradas e utilizadas nas reações com o azul de metileno [4].



**Figura 13 - Imobilização da HRP por aprisionamento em alginato de cálcio (Próprio autor, 2014).**



**Figura 14 - Esferas contendo HRP após 120 minutos de imobilização (Próprio autor, 2014).**

#### ***IV.5 Reações de descoloração do azul de metileno***

No presente trabalho foi utilizada uma solução sintética de corante básico azul de metileno adquirido na VETEC Química Fina. O peróxido de hidrogênio utilizado nas reações foi preparado a partir de uma solução comercial com concentração de 50% (v/v) ou 600 g/L.

Em um tubo de polipropileno de 50 mL, foram adicionados 20 mL de azul de metileno (15 mg/L), diluído em tampão fosfato pH 5,0; 200 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mg/L) e as cápsulas de HRP foram adicionadas, pesando-se por diferença, de modo que a atividade inicial do meio reacional fosse de 25 ou 50 U/mL, dependendo do experimento. Em seguida, a reação permaneceu em agitação, em um orbital shaker (“Nova Ética” modelo 430/RDBP), a 30°C por tempo e velocidade de agitação determinados de acordo com cada experimento e a cada 60 minutos foram retiradas alíquotas para análise da remoção de cor, por meio da leitura em espectrofotômetro [17].



**Figura 15 - Solução de corante azul de metileno com concentração de 15 mg/L em tampão fosfato pH 5,0 [17].**



**Figura 16 - Amostras durante a reação entre a HRP aprisionada e o azul de metileno (Próprio autor, 2014).**



**Figura 17 - Esferas de HRP imobilizada, após 240 minutos de reação com o azul de metileno (Próprio autor, 2014).**

#### IV.6 Determinação do percentual (ou índice) de descoloração

A análise da descoloração do azul de metileno foi realizada através da medida da absorvância em 660 nm antes e após o término da reação. O pico em 660 nm do azul de metileno é o de maior absorção de luz, sendo proporcional a cor do corante. A Figura 11 mostra o espectro de absorção de uma solução sintética do corante azul de metileno com uma concentração de 15 mg/L [17]. As leituras da absorvância foram realizadas no espectrofotômetro UV (SHIMADZU – Modelo UV MINI 1240).

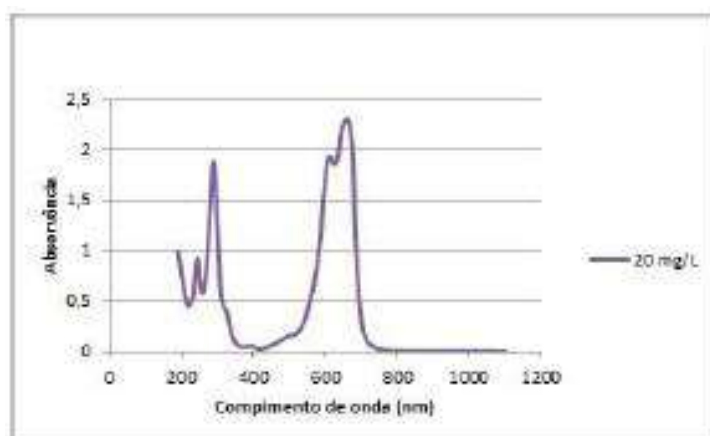


Figura 18 - Espectro de absorção do azul de metileno a 20 mg/L [17].

O percentual de descoloração foi calculado de acordo com a equação 8, na qual “ $A_i$ ” corresponde à absorvância da solução do corante, no início da reação e “ $A_f$ ” representa o valor da absorvância no final da reação.

$$\% \text{ descoloração} = \frac{(A_i - A_f) \times 100}{A_i} \quad (8)$$

#### IV.7 Avaliação da descoloração de soluções com diferentes concentrações de azul de metileno

Foram conduzidas reações para avaliar a descoloração de soluções de azul de metileno com concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg/L. A solução do corante foi preparada pela diluição em tampão fosfato pH 5,0. A HRP foi imobilizada em alginato de cálcio (1%) e a concentração inicial de enzima no meio reacional foi de 25 U/mL. O tempo de

repouso em cloreto de cálcio para a imobilização da HRP foi de 24 horas. A reação de descoloração foi mantida a 30 °C, por 60 minutos, e a velocidade de agitação foi de 200 rotações por minuto (rpm). Foram utilizados 6 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### ***IV.8 Avaliação da descoloração de azul de metileno em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

Foram conduzidas reações para avaliar a descoloração do azul de metileno (15 mg/L) em concentrações de 0, 6, 9 e 12 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A HRP foi imobilizada em alginato de cálcio (1%) e a concentração inicial de enzima no meio reacional foi de 50 U/mL. O tempo de repouso em cloreto de cálcio para a imobilização da HRP foi de 24 horas. A reação de descoloração foi mantida a 30 °C, por 180 minutos, e a velocidade de agitação foi de 200 rotações por minuto (rpm).

Além disso, foi realizado um experimento de controle, nas mesmas condições, porém com esferas de alginato de cálcio, sem enzimas, para avaliar o quanto de cor é removido somente por processos de adsorção do corante às esferas de alginato.

#### ***IV.9 Avaliação da descoloração de azul de metileno em diferentes tempos de imobilização enzimática***

Foram conduzidos experimentos para avaliar a descoloração do azul de metileno (15 mg/L) através da reação com esferas de HRP aprisionada em alginato de cálcio (2%) e tempos de repouso de 60 e 120 minutos em cloreto de cálcio para a imobilização. A concentração inicial de enzima no meio reacional foi de 25 U/mL. A reação de descoloração foi mantida a 30 °C, por 240 minutos, e a velocidade de agitação foi de 100 rpm. Foram utilizados 6 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As reações de controle foram conduzidas sem a adição de peróxido de hidrogênio, com todas as outras condições mantidas.

Em um experimento posterior, foi adicionada uma etapa de lavagem das esferas de HRP imobilizada, em água destilada, imediatamente antes da reação com o corante. No mesmo experimento, foi realizada uma etapa de centrifugação, a 5.000 rpm, por 10



minutos, ao final da reação. A imobilização foi feita em alginato de cálcio (2%), com tempos de repouso de 60 e 120 minutos em cloreto de cálcio para a imobilização e concentrações de enzima de 25 e 50 U/ml. A reação de descoloração foi mantida a 30°C, por 240 minutos, e a velocidade de agitação foi de 100 rpm. Foram utilizados 6 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As reações de controle foram conduzidas sem a adição de peróxido de hidrogênio, com todas as outras condições mantidas.

#### ***IV.10 Avaliação da descoloração de azul de metileno com reutilização da enzima HRP imobilizada***

Foram conduzidos experimentos para avaliar a descoloração do azul de metileno (15 mg/L) através da reação com esferas reutilizadas de HRP aprisionada em alginato de cálcio (2%) e tempos de repouso de 60 e 120 minutos em cloreto de cálcio para a imobilização. Foi realizada uma etapa de armazenamento das esferas em água destilada, a 4°C, por 5 dias, antes da primeira reação com o azul de metileno. Além disso, as mesmas esferas foram lavadas ao final de cada reação e armazenadas em água destilada, a 4°C, por 24 horas para a reutilização. A concentração inicial de enzima no meio reacional foi de 50 U/mL. As reações de descoloração foram mantidas a 30 °C, por 240 minutos e a velocidade de agitação foi de 100 rpm. Foram utilizados 6 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As reações de controle foram conduzidas sem a adição de peróxido de hidrogênio, com todas as outras condições mantidas.

Em um experimento posterior, foi avaliada a reutilização das esferas de HRP aprisionada em alginato de cálcio (2%), para a descoloração do azul de metileno, em ciclos de reações conduzidas no mesmo dia. A concentração inicial de enzima no meio reacional foi de 50 U/mL e o tempo de repouso em cloreto de cálcio para a imobilização foi de 120 minutos. As reações de descoloração foram mantidas a 30 °C, por 180 minutos e a velocidade de agitação foi de 100 rpm. As esferas foram lavadas em tampão fosfato pH 5,0 antes de cada reação. Foram utilizados 6 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as reações de controle foram realizadas sem a adição de peróxido de hidrogênio, com todas as outras condições mantidas.

## CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### V.1 Avaliação da descoloração de diferentes concentrações de azul de metileno

Os percentuais de remoção de cor apresentaram valores próximos para as soluções com concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg/L de azul de metileno, sendo 13,0%; 12,5%; 11,9% e 8,8%, respectivamente. Como as concentrações intermediárias (10 e 15 mg/L) resultaram em índices de descoloração muito próximos, a maior delas (15 mg/L) passou a ser utilizada como padrão nos experimentos posteriores. A maior concentração avaliada (20 mg/L) não foi utilizada como padrão, pois apresentou percentual de remoção de cor inferior à de 15 mg/L. Os resultados estão representados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Resultados da descoloração de diferentes concentrações de azul de metileno.**

| <b>Concentração do corante (mg/L)</b> | <b>Descoloração (%)</b> |
|---------------------------------------|-------------------------|
| 5                                     | <b>13,0</b>             |
| 10                                    | <b>12,5</b>             |
| 15                                    | <b>11,9</b>             |
| 20                                    | <b>8,8</b>              |

Os percentuais de remoção de cor obtidos nesse experimento foram inferiores aos obtidos no estudo de otimização da descoloração do azul de metileno, utilizando HRP livre no meio reacional (20 a 27%), em condições similares [17]. Esses resultados sugerem a ocorrência de uma diminuição da atividade enzimática no meio reacional, com a utilização de enzimas imobilizadas, devendo ser investigadas outras condições de reação para melhorias na performance de aplicação da HRP imobilizada.

## ***V.2 Avaliação da descoloração de azul de metileno em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

Neste experimento, a concentração de 50 U/mL de HRP apresentou 10% de remoção de cor, em 60 minutos de reação e 6 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Essa concentração de enzima foi utilizada para a comparação com o experimento anterior, no qual foi utilizado 25 U/mL, nas mesmas condições de reação e obtidos 12% de descoloração do azul de metileno. Ao contrário do esperado, não foram obtidos percentuais superiores de remoção de cor neste experimento. Esse resultado sugere que deve-se continuar investigando as condições da reação de descoloração do azul de metileno, para entender a dinâmica de atuação da HRP imobilizada.

As concentrações de 0, 6, 9 e 12 mg/L peróxido de hidrogênio, apresentaram como maiores percentuais de remoção de cor 6,5%; 10,7%; 8,4% e 6,3%, respectivamente. A reação com 6 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentou valores de remoção de cor superiores às outras concentrações avaliadas e portanto, passou a ser adotada como padrão nos experimentos posteriores. Esse resultado sugere que concentrações maiores de peróxido de hidrogênio podem diminuir a atividade enzimática, gerando percentuais menores de remoção de cor do azul de metileno.

Os índices de descoloração de 5,6%; 6,5% e 4,3% obtidos nas reações sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração igual a zero) e o índice médio de 5,0% obtido nas reações com esferas de alginato de cálcio, sem enzimas, sugerem a ocorrência de remoção de cor da solução de azul de metileno por adsorção do corante às esferas e não somente pela reação de catálise enzimática. Em relação ao tempo de reação, ao contrário do esperado, não foram obtidos maiores índices de descoloração, conforme aumentou-se o tempo. Esse resultado também sugere a ocorrência de remoção de cor por adsorção do corante às esferas de enzimas imobilizadas. Os resultados estão representados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Resultados da descoloração de azul de metileno em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

| <b>Descoloração (%)</b>                               |               |                |                |
|---|---------------|----------------|----------------|
| <b>Concentração H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L)</b> | <b>60 min</b> | <b>120 min</b> | <b>180 min</b> |
| <b>0</b>  | 5,6           | 6,5            | 4,3            |
| <b>6</b>  | 10,0          | 10,7           | 9,5            |
| <b>9</b>  | 7,6           | 7,8            | 8,4            |
| <b>12</b>   | 6,2           | 5,6            | 6,3            |

Os percentuais de remoção de cor obtidos nesse experimento foram inferiores aos obtidos no estudo de otimização da descoloração do azul de metileno, utilizando HRP livre no meio reacional (13% a 16%), em condições similares [17]. Esses resultados sugerem a ocorrência de uma diminuição da atividade enzimática no meio reacional, com a utilização de enzimas imobilizadas, devendo ser investigadas outras condições de reação para melhorias na performance de aplicação da HRP imobilizada.

### ***V.3 Avaliação da descoloração do azul de metileno em diferentes tempos de imobilização enzimática***

Neste experimento foi utilizada concentração de enzima de 25 U/mL e, conforme observado na Tabela 6, os maiores percentuais de remoção de cor foram obtidos com 240 minutos de reação, sendo respectivamente 16,9% e 16,2% para as esferas produzidas com 60 e 120 minutos de repouso em cloreto de cálcio para a imobilização. Esses resultados são superiores aos obtidos nas condições dos experimentos anteriores (11% e 12%), indicando que os tempos de imobilização de 60 e 120 minutos, concentração de alginato de cálcio de 2% e velocidade de agitação de 100 rpm são mais adequados para a remoção de cor por este método do que o tempo de imobilização de 24 horas, com 1% de alginato de cálcio e 200 rpm de velocidade de agitação.

Nos experimentos de controle (sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), foram obtidos índices de descoloração entre 8% e 10%, sendo inferiores aos obtidos nas reações com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que ocorreu remoção de cor por reações de catálise enzimática e não somente

por difusão e adsorção do corante às esferas de alginato de cálcio. O valor de 11% obtido com 240 minutos do teste de controle das esferas preparadas com 60 minutos de imobilização foi considerado discrepante em relação aos obtidos nos demais tempos de reação (entre 8,3% e 9,6% de remoção de cor em 60 a 180 minutos de reação) e por isso as condições deste teste foram refeitas no experimento posterior.

**Tabela 6 - Resultados da descoloração de azul de metileno em diferentes tempos de imobilização enzimática.**

|                       |                                      | Descoloração (%) |             |             |             |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------|-------------|-------------|-------------|
| Tempo de Imobilização | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) | 60 min           | 120 min     | 180 min     | 240 min     |
| 60 min                | 0                                    | 8,3              | 9,6         | 8,7         | 11,2        |
|                       | 6                                    | <b>12,7</b>      | <b>15,6</b> | <b>15,9</b> | <b>16,9</b> |
| 120 min               | 0                                    | 8,2              | 9,1         | 9,6         | 8,6         |
|                       | 6                                    | <b>12,9</b>      | <b>14,6</b> | <b>14,6</b> | <b>16,2</b> |

O experimento seguinte foi realizado com 25 U/mL de enzima e 60 minutos de imobilização para comparação com o teste de controle que apresentou um valor discrepante no experimento anterior. Também foram conduzidas reações com 50 U/mL de enzima para avaliar se o percentual de remoção de cor aumentaria com o dobro da concentração enzimática. Além disso, foi adicionada uma etapa de lavagem das esferas em água destilada, antes da reação com o corante, para avaliar se a retirada dos resíduos de cloreto de cálcio geraria um aumento dos percentuais de remoção de cor. Também foi realizada uma etapa de centrifugação ao final da reação com o corante, para avaliar se ocorreria remoção de cor por processos mecânicos resultantes da centrifugação.

Os resultados observados na Tabela 7 mostram valores uniformes para o teste de controle de 25 U/mL (1,1% de 120 a 240 minutos de reação), sem a ocorrência de um valor discrepante, como obtido no experimento anterior. Além disso, o maior percentual de remoção de cor obtido com essa concentração de enzima (11,4% após a centrifugação) foi inferior aos obtidos no experimento anterior com a mesma

concentração (de 12,7% a 16,9%), indicando que a etapa de lavagem das esferas com água destilada pode ter removido enzimas das esferas de alginato de cálcio, gerando índices menores de descoloração.

Para a concentração de 50 U/mL de enzima e 60 minutos de imobilização, os maiores percentuais de remoção de cor obtidos foram 14,6% com 60 minutos de reação e 17,4% após a centrifugação. Para as esferas preparadas com 120 minutos de imobilização, os maiores percentuais de remoção de cor obtidos foram 14,6% com 240 minutos de reação e 13,4% após a centrifugação. Esses valores são superiores ao obtido com 25 U/mL de enzima (11,4%) nas condições desse experimento, indicando conforme era esperado, que é possível obter índices maiores de descoloração com o aumento da concentração enzimática. Porém, esses valores são inferiores aos obtidos no experimento anterior (16,9% e 16,2%), no qual utilizou-se a metade da concentração enzimática (25 U/mL) e não foi realizada a lavagem das esferas antes da reação com o corante. Esse resultado sugere que a lavagem com água destilada pode ter removido enzimas das esferas de alginato de cálcio.

A etapa de centrifugação gerou percentuais de remoção de cor ligeiramente maiores em duas das três reações conduzidas. Em uma das reações o percentual obtido após a centrifugação foi menor (13,4%) do que o obtido com 240 minutos de reação (14,6%), indicando que não ocorre remoção de cor por processos mecânicos decorrentes da centrifugação. Portanto, os percentuais ligeiramente maiores obtidos após essa etapa, para duas das três reações, pode ser explicado pela ocorrência de adsorção do corante às esferas de alginato de cálcio. A Tabela 7 resume os resultados descritos.

**Tabela 7 - Resultados da descoloração de azul de metileno com etapas de lavagem das esferas antes da reação e centrifugação ao final da reação.**

| Descoloração (%)      |                     |             |             |             |             |             |                    |
|-----------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|
| Tempo de imobilização | Concentração de HRP | H2O2 (mg/L) | 60 min      | 120 min     | 180 min     | 240 min     | Após centrifugação |
| 60 min                | 25 U/mL             | 0           | 0,0         | 1,1         | 1,1         | 1,1         | 2,2                |
|                       |                     | <b>6</b>    | <b>7,5</b>  | <b>9,1</b>  | <b>9,1</b>  | <b>9,9</b>  | <b>11,4</b>        |
| 60 min                | 50 U/mL             | 0           | 4,6         | 4,6         | 3,6         | 3,6         | 6,6                |
|                       |                     | <b>6</b>    | <b>14,6</b> | <b>13,4</b> | <b>14,0</b> | <b>14,0</b> | <b>17,4</b>        |
| 120 min               | 50 U/mL             | 0           | 5,4         | 4,4         | 6,3         | 5,4         | 6,3                |
|                       |                     | <b>6</b>    | <b>12,7</b> | <b>12,7</b> | <b>14,0</b> | <b>14,6</b> | <b>13,4</b>        |

As mudanças nos tempos de imobilização, concentração de alginato de cálcio e velocidade de agitação, assim como as etapas de lavagem e centrifugação foram realizadas com base em estudos acadêmicos que obtiveram índices mais elevados de remoção de cor, utilizando HRP imobilizada [4, 64, 65].

O estudo de degradação do corante azo Amarelo-12, utilizando HRP imobilizada em gel de alginato de cálcio, em condições similares às deste experimento, obteve percentual de degradação de 52% [4]. Os estudos de degradação dos corantes azo *C.I. Acid blue 113* e *Acid Black 10 BX* também utilizaram HRP imobilizada em gel de alginato de cálcio, em condições similares às deste experimento e obtiveram 76% e 54% de degradação de corante, respectivamente [64, 65]. Esses resultados são superiores aos obtidos neste trabalho, sugerindo que as condições de reação utilizadas ainda não são adequadas à remoção de cor do azul de metileno e, portanto, devem continuar sendo investigadas.

#### ***V.4 Avaliação da descoloração do azul de metileno com reutilização da HRP imobilizada***

As esferas de HRP imobilizada utilizadas nesse experimento foram preparadas com 120 minutos de repouso em cloreto de cálcio (tempo de imobilização) e em seguida foram armazenadas em água destilada a 4°C, por 4 dias, antes da primeira reação com o corante. A concentração de enzima utilizada foi de 50 U/mL e os maiores percentuais de remoção de cor obtidos (Tabela 8) foram 25,1% com 120 minutos de reação e 24,5% após a centrifugação, no primeiro ciclo de reação (as esferas ainda não haviam sido utilizadas em reações com o corante). Esses resultados são superiores aos obtidos nos experimentos anteriores com a mesma concentração de enzima e as mesmas condições de reação e imobilização, indicando que a etapa de armazenagem em água destilada a 4°C, antes da reação com o corante, influencia positivamente a atuação da HRP imobilizada na remoção de cor do azul de metileno.

Após o primeiro ciclo de reação com o corante (240 minutos de reação e centrifugação) as esferas foram lavadas e armazenadas em água destilada a 4°C, por 24 horas, antes do segundo ciclo, que foi conduzido no dia seguinte ao primeiro. Os maiores percentuais de remoção de cor obtidos no segundo ciclo foram 8,2% com 180 e

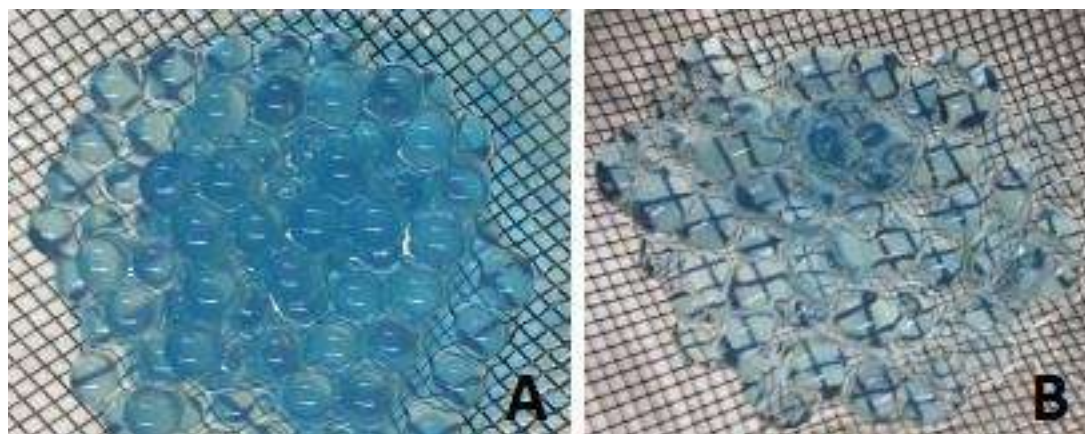
240 minutos de reação e 9,7% após a centrifugação. Esses valores são bastante inferiores aos obtidos no primeiro ciclo, indicando que a atividade enzimática diminuiu muito com a reutilização das enzimas imobilizadas, nas condições desse experimento. Após o segundo ciclo, as esferas foram lavadas e armazenadas em água destilada a 4°C, por 24 horas, antes do terceiro ciclo de reação, que foi conduzido no dia seguinte ao segundo. No terceiro ciclo, não houve diferença entre os índices de descoloração obtidos nos testes de controle sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e nos obtidos com a utilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que a enzima já havia perdido sua atividade. Os percentuais de remoção de cor obtidos no terceiro ciclo podem ser explicados pela ocorrência de adsorção do corante às esferas de alginato de cálcio. A Tabela 8 resume os resultados descritos.

**Tabela 8 - Resultados da descoloração de azul de metileno com reutilização das esferas de HRP com 24 horas de diferença.**

|                 | Descoloração (%)                     |             |             |             |             |                    |
|-----------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------|
|                 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) | 60 min      | 120 min     | 180 min     | 240 min     | Após centrifugação |
| <b>1º ciclo</b> | 0                                    | 13,2        | 14,2        | 12,9        | 12,6        | 13,2               |
|                 | <b>6</b>                             | <b>21,9</b> | <b>25,1</b> | <b>23,7</b> | <b>23,5</b> | <b>24,5</b>        |
|                 | Diferença entre o controle           | 8,6         | 10,9        | 10,8        | 11,0        | 11,3               |
| <b>2º ciclo</b> | 0                                    | 2,3         | 3,2         | 3,6         | 3,2         | 4,4                |
|                 | <b>6</b>                             | <b>6,2</b>  | <b>7,4</b>  | <b>8,2</b>  | <b>8,2</b>  | <b>9,7</b>         |
|                 | Diferença entre o controle           | 3,9         | 4,2         | 4,6         | 5,0         | 5,3                |
| <b>3º ciclo</b> | 0                                    | 5,3         | 8,7         | 5,3         | 10,9        | 7,9                |
|                 | 6                                    | 6,1         | 6,1         | 6,5         | 6,7         | 7,4                |
|                 | <b>Diferença entre o controle</b>    | <b>0,8</b>  | <b>-2,6</b> | <b>1,2</b>  | <b>-4,2</b> | <b>-0,5</b>        |



Foi realizada uma tentativa de reutilizar esferas de HRP imobilizada preparadas com 60 minutos de repouso em cloreto de cálcio (tempo de imobilização), porém essas esferas se romperam ao serem armazenadas em água destilada a 4°C, por 24 horas, após o primeiro ciclo de reação com o corante, o que inviabilizou a sua reutilização (Figura 19B). O mesmo não ocorreu com as esferas preparadas com 120 minutos de imobilização, que mantiveram sua estrutura inteira, mesmo após três ciclos de reação com o corante (Figura 19A).



**Figura 20 - Esferas armazenadas em água destilada, a 4°C, por 24 horas, após o primeiro ciclo de reação – (A) Tempo de imobilização de 120 minutos – (B) Tempo de imobilização de 60 minutos (Próprio autor, 2014).**



**Figura 19 - Esferas de HRP imobilizada, após o 3º ciclo de reação com o azul de metileno (Próprio autor, 2014).**

Por fim, foram realizados experimentos para avaliar a eficiência da reutilização das esferas de HRP imobilizada em ciclos de reação com o corante, realizados no mesmo dia, subsequentes um ao outro. O tempo de repouso das esferas em cloreto de cálcio para a imobilização foi de 120 minutos e a concentração de enzima utilizada foi 50 U/mL. No primeiro ciclo, o maior percentual de remoção de cor obtido foi 14,7% com 180 minutos de reação. Esse valor é inferior ao obtido no primeiro ciclo do experimento anterior (25,1%), que foi realizado nas mesmas condições de reação e imobilização, exceto pela etapa de armazenamento das esferas em água destilada a 4°C, por 5 dias, antes da primeira reação com o corante, que não foi realizada nesse experimento, já que as esferas foram utilizadas na reação logo em seguida ao término da imobilização. Esse é mais um indício de que essa etapa de armazenagem influencia positivamente a atuação da HRP imobilizada na remoção de cor do azul de metileno.

Após o primeiro ciclo de reação com o corante, as esferas foram lavadas em tampão fosfato pH 5,0 e logo em seguida inseridas na reação com uma nova solução de azul de metileno. Porém, no segundo ciclo não houve diferença entre os índices de descoloração obtidos nos testes de controle sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e nos obtidos com a utilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que a enzima já havia perdido sua atividade. Os percentuais de remoção de cor obtidos no segundo ciclo podem ser explicados pela ocorrência de adsorção do corante às esferas de alginato de cálcio. A Tabela 9 resume os resultados descritos.

**Tabela 9 - Resultados da descoloração de azul de metileno, com reutilização das esferas de HRP no mesmo dia.**

| <b>Descoloração (%)</b> |                                 |               |                |                |
|-------------------------|---------------------------------|---------------|----------------|----------------|
|                         | <b>H2O2 (mg/L)</b>              | <b>60 min</b> | <b>120 min</b> | <b>180 min</b> |
| <b>1º Ciclo</b>         | 0                               | 8,0           | 7,5            | 7,0            |
|                         | <b>6</b>                        | <b>12,9</b>   | <b>14,4</b>    | <b>14,7</b>    |
|                         | Diferença entre o branco        | 5,0           | 7,0            | 7,7            |
| <b>2º Ciclo</b>         | 0                               | 6,5           | 4,4            | 3,8            |
|                         | <b>6</b>                        | <b>2,1</b>    | <b>2,7</b>     | <b>3,2</b>     |
|                         | <b>Diferença entre o branco</b> | <b>-4,4</b>   | <b>-1,7</b>    | <b>-0,6</b>    |

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos de reutilização das enzimas imobilizadas, a condução de ciclos de reutilização em dias diferentes (2 ciclos de remoção de cor por catálise enzimática, com 24 horas de diferença entre um ciclo e o outro) é mais eficiente do que a condução de ciclos de reutilização no mesmo dia (ciclos subsequentes, mas só houve remoção de cor por catálise enzimática no primeiro ciclo). As condições de reação, imobilização e armazenagem das esferas para a reutilização da HRP imobilizada foram baseadas em estudos acadêmicos que obtiveram índices mais elevados de remoção de cor, utilizando a mesma enzima para a degradação de corantes azo. Porém esses estudos não especificam se a condução dos ciclos de reutilização das esferas foram realizados no mesmo dia ou com 24 horas de diferença [4, 64, 65].

O estudo de degradação do corante azo Amarelo-12, utilizando HRP imobilizada em gel de alginato de cálcio, em condições similares às deste experimento, obteve percentual de degradação de 52% e realizou 3 ciclos de reutilização das esferas, com perda de eficiência na remoção de cor [4].

O estudo de degradação do corante azo *C.I. Acid blue 113*, utilizando HRP imobilizada em gel de alginato de cálcio, em condições similares às deste experimento obteve percentual de degradação de 76% e realizou 5 ciclos de reutilização das esferas, com perda de eficiência na remoção de cor [64, 65].

O estudo de degradação do corante azo *Acid Black 10 BX*, utilizando HRP imobilizada em gel de alginato de cálcio, em condições similares às deste experimento obteve percentual de degradação de 54% e realizou 3 ciclos de reutilização das esferas, sem perdas significativas na eficiência da remoção de cor [64, 65].

Esses resultados são superiores aos obtidos neste trabalho, sugerindo que as condições de reação utilizadas ainda não são adequadas à remoção de cor do azul de metileno.

## CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

A viabilidade técnica de aplicação dessa metodologia foi verificada, pois foram observados índices de descoloração do azul de metileno, nas reações de HRP aprisionada em alginato de cálcio. Esses índices foram maiores do que os obtidos nos ensaios de controle (sem  $H_2O_2$ ), indicando a ocorrência de reações de descoloração por catálise enzimática.

A partir dos ensaios com 6, 9 e 12 mg/L de  $H_2O_2$ , a concentração de 6 mg/L apresentou índices de descoloração maiores do que as de 9 e 12 mg/L, indicando ser mais adequada do que estas, para as reações de remoção de cor do azul de metileno com HRP aprisionada em alginato de cálcio.

Os ensaios com concentrações de 25 e 50 U/mL de HRP imobilizada, indicam que há índices de descoloração maiores, conforme aumenta-se a concentração de enzima imobilizada na reação, diferentemente do que ocorre com o aumento da concentração de  $H_2O_2$ .

As esferas de HRP armazenadas durante alguns dias, em água destilada, a 4°C, após a imobilização e antes da reação com azul de metileno, apresentaram índices de descoloração maiores do que as que são utilizadas no mesmo dia em que ocorre a imobilização. Esses resultados sugerem que essa etapa de armazenagem influencia positivamente a atuação da HRP imobilizada na remoção de cor do azul de metileno.

Também conclui-se, a partir dos experimentos realizados, que cápsulas de HRP formadas com tempos de imobilização mais curtos (60 e 120 minutos) apresentam índices de descoloração maiores do que as formadas em tempos mais longos (24 horas), indicando serem mais adequados para os ensaios de remoção de cor do azul de metileno.

Para propósitos de reutilização das cápsulas de HRP em novas reações, o tempo de imobilização de 120 minutos mostrou ser mais adequado que o de 60 minutos, pois as esferas formadas com 60 minutos de imobilização se romperam, quando armazenadas à 4°C, em água destilada, 24 horas após o primeiro ciclo de reação. Até o final do terceiro ciclo, não houve rompimento das cápsulas formadas com 120 minutos de

imobilização, porém os índices de descoloração diminuem, conforme novos ciclos de reação são realizados.

Dos ensaios de reciclagem das cápsulas de HRP, conclui-se ainda que os ciclos de reação conduzidos com 24 horas de diferença, permitem maior frequência de reutilização (2 ciclos), do que os ciclos de reação conduzidos no mesmo dia (1 ciclo), podendo ser mais um indício de que a etapa de armazenagem em água destilada a 4°C influencia positivamente a atuação da HRP imobilizada na remoção de cor do azul de metileno.

### ***VI.1 Propostas para continuação do trabalho***

- Conduzir ensaios de otimização das condições de reação, tais como pH, temperatura, concentração de HRP, concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e concentração do corante, para a descoloração da solução de azul de metileno, utilizando HRP imobilizada em gel de alginato de cálcio.
- Avaliar o efeito do aumento da concentração do gel de alginato de cálcio na descoloração do azul de metileno.
- Avaliar a performance de outros métodos e materiais de imobilização de enzimas na descoloração do azul de metileno.
- Utilizar outros métodos de análise do produto das reações de descoloração, tais como HPLC, para verificar quais substâncias e subprodutos estão sendo formados e se realmente ocorre degradação do corante.
- Realizar experimentos para verificar a viabilidade do uso da HRP imobilizada na degradação do azul de metileno em modo de operação contínuo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kunz, A., Peralta-Zamora, P., de Moraes, S. G. and Durán, N. (2002) Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*. **25**(1) 78-82.
- [2] Ho, Y.-S., Chiang, T.-H. and Hsueh, Y.-M. (2005) Removal of basic dye from aqueous solution using tree fern as a biosorbent. *Process Biochemistry*. **40**(1) 119-124.
- [3] Hameed, B., Ahmad, A. and Latiff, K. (2007) Adsorption of basic dye (methylene blue) onto activated carbon prepared from rattan sawdust. *Dyes and Pigments*. **75**(1) 143-149.
- [4] Maddhinni, V. L., Vurimindi, H. B. and Yerramilli, A. (2006) Degradation of azo dye with horse radish peroxidase (HRP). *Journal of the Indian Institute of Science*. **86** 507-514.
- [5] Kannan, N. and Sundaram, M. M. (2001) Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption on various carbons—a comparative study. *Dyes and pigments*. **51**(1) 25-40.
- [6] Houas, A., Lachheb, H., Ksibi, M., Elaloui, E., Guillard, C. and Herrmann, J.-M. (2001) Photocatalytic degradation pathway of methylene blue in water. *Applied Catalysis B: Environmental*. **31**(2) 145-157.
- [7] Vadivelan, V. and Kumar, K. V. (2005) Equilibrium, kinetics, mechanism, and process design for the sorption of methylene blue onto rice husk. *Journal of Colloid and Interface Science*. **286**(1) 90-100.
- [8] Poggere, P. A., Davis, R., Montanher, S. F. and Lobo, V. S. (2011) Azul de metileno: propriedades e tratamentos. Anais do III ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR.
- [9] Karam, J. and Nicell, J. A. (1997) Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **69**(2) 141-153.

- [10] Guaratini, C. C. and Zanoni, M. V. B. (2000) Corantes têxteis. *Química nova*. **23**(1) 71-78.
- [11] ABIQUIM. (2012) Corantes e Pigmentos. Disponível em: <<http://abiquim.org.br/corantes/cor.asp>>, Acesso em: 2 fevereiro 2014.
- [12] ABIQUIM. Guia Da Indústria Química Brasileira 2013/2014.
- [13] Cristóvão, R. O. (2010) Degradation of dye-containing textile effluents by enzymatic catalysis. Dissertation presented for the degree of Doctor in Chemical and Biological Engineering by University of Porto, Chemical Engineering Department - University of Porto, Portugal.
- [14] Martins, L. M. (2011) Estudo da aplicação de processos oxidativos avançados no tratamento de efluentes têxteis visando o seu reúso. Dissertação de Mestrado., Universidade Federal Do Piauí (UFPI).
- [15] (2009) Dossiê de Corantes. Revista Food Ingredients Brasil, v.9 40-59.
- [16] Benincá, C. (2012) Degradação do corante alimentício ponceau 4r e tratamento de efluente de uma indústria de alimentos utilizando processos oxidativos avançados. Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – PPGEAL - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- [17] Costa, R. S. (2013) Utilização da enzima horseradish peroxidase (hrp) na degradação de substâncias recalcitrantes. Monografia do Projeto de Conclusão de Curso, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Departamento de Biofísica - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.
- [18] Zara, R. F. and Weber, V. (2012) Ferro zero: uma alternativa para a preservação de recursos hídricos. *Revista de Estudos Ambientais*. **14**(2) 67-74.
- [19] de Almeida Schiavo, D., Perez, E. F. and Kubota, L. T. (2000) Estudo eletroquímico do azul de metileno adsorvido sobre sílica gel quimicamente modificada com óxido de nióbio. *Química Nova*. **23**(6) 833.

- [20] Doğan, M., Alkan, M., Türkyilmaz, A. and Özdemir, Y. (2004) Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption onto perlite. *Journal of hazardous materials*. **109**(1) 141-148.
- [21] Hameed, B., Din, A. M. and Ahmad, A. (2007) Adsorption of methylene blue onto bamboo-based activated carbon: kinetics and equilibrium studies. *Journal of hazardous materials*. **141**(3) 819-825.
- [22] Ghosh, D. and Bhattacharyya, K. G. (2002) Adsorption of methylene blue on kaolinite. *Applied Clay Science*. **20**(6) 295-300.
- [23] Stolz, A. (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **56**(1-2) 69-80.
- [24] Chen, J. and Zhu, L. (2007) Heterogeneous UV-Fenton catalytic degradation of dyestuff in water with hydroxyl-Fe pillared bentonite. *Catalysis Today*. **126**(3) 463-470.
- [25] Forgacs, E., Cserhati, T. and Oros, G. (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment international*. **30**(7) 953-971.
- [26] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology*. **77**(3) 247-255.
- [27] Patel, R. and Suresh, S. (2006) Decolourization of azo dyes using magnesium–palladium system. *Journal of hazardous materials*. **137**(3) 1729-1741.
- [28] União Europeia. Diretiva 76/769/CEE do Conselho, de 27 de Julho de 1976., Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/%20LexUriServ.do?uri=CELEX:31976L0769:PT:HTML>>, Acesso em: 2 fevereiro 2014.
- [29] Diretiva 2002/61/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 19 de julho de 2002., Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/>



LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:243:0015:0018:PT:PDF>, Acesso em: 2 fevereiro 2014.

[30] INEA. (2007) DZ-205.R-6 - Diretriz De Controle De Carga Orgânica Em Efluentes Líquidos De Origem Industrial. Disponível em: <<http://www.inea.rj.gov.br/cs/groups/public/documents/document/zwew/mde0/~edisp/inea0014060.pdf>>, Acesso em: 2 fevereiro 2014.

[31] Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resoluções e outros atos - Legislação Ambiental. Acesso em: 2 fevereiro 2014, Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/>>.

[32] ABNT Catálogo - Norma Técnica - ABNT NBR 9800:1987. Disponível em: <<http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=005381>>, Acesso em: 2 fevereiro 2014.

[33] Sye, W. F., Lu, L. C., Tai, J. W. and Wang, C. I. (2008) Applications of chitosan beads and porous crab shell powder combined with solid-phase microextraction for detection and the removal of colour from textile wastewater. *Carbohydrate Polymers*. **72**(3) 550-556.

[34] Harazono, K., Watanabe, Y. and Nakamura, K. (2003) Decolorization of azo dye by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and by its manganese peroxidase. *Journal of bioscience and bioengineering*. **95**(5) 455-459.

[35] Moura, H., Rocha, O., Cavalcanti, D. and Silva, V. (2009) Avaliação de HPA na remediação de borra de petróleo utilizando processos oxidativos avançados. Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica.

[36] Paz, D. S. Síntese e caracterização do composto TiO<sub>2</sub> dopado com nitrogênio e estudo de sua atividade fotocatalítica sob luz visível e irradiação solar.

[37] Teixeira, C. and JARDIM, W. d. F. (2004) Processos oxidativos avançados: conceitos teóricos. *Caderno temático*. **3** 83.

- [38] de Freitas, A. M., Sirtori, C. and Peralta-Zamora, P. G. (2008) Avaliação do potencial de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas com geosmina e 2-mib. *Química Nova*. **31**(1) 75.
- [39] Melo, C. F. (2010) Conversão do biocida triclosan catalisada por enzimas oxidativas e avaliação da remoção da atividade antibacteriana Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- [40] Salgado, B. C. B., Nogueira, M. I. C., Rodrigues, K. A., SAMPAIO, G., Buarque, H. and Araújo, R. (2009) Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro*. **14** 1-8.
- [41] da Silva, S. R., Tonholo, J. and Zanta, C. L. P. (2004) Aplicação de Processos Oxidativos Avançados no Tratamento de Água Produzida de Petróleo.
- [42] Vautier, M., Guillard, C. and Herrmann, J.-M. (2001) Photocatalytic degradation of dyes in water: case study of indigo and of indigo carmine. *Journal of Catalysis*. **201**(1) 46-59.
- [43] Bilgi, S. and Demir, C. (2005) Identification of photooxidation degradation products of CI Reactive Orange 16 dye by gas chromatography–mass spectrometry. *Dyes and pigments*. **66**(1) 69-76.
- [44] Forgiarini, E. (2006) Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima Horseradish peroxidase (HRP). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina.
- [45] Jesus, S. A. R. (2011) Novas bases têxteis para novas exigências sociais, a sustentabilidade das fibras sintéticas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Arquitectura da Universidade Técnica de Lisboa.

- [46] Silva, M. C., Corrêa, A. D., Torres, J. A. and Amorim, M. T. S. P. (2012) Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). *Q. Nova*. **35**(5) 889-894.
- [47] Rosolen, L. A., Monteiro, R. T., Dellamatrice, P. M. and Kamida, H. M. (2004) Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. *Química Têxtil*(76) 44-52.
- [48] Silva, M. R. (2008) Estudo da enzima Horseradish peroxidase (HRP) no descoramento dos corantes têxteis Azul Drimaren X-3LR, Azul Drimaren X-BLN, Rubinol Drimaren X-3LR e Azul Drimaren CL-R. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
- [49] Onder, S., Celebi, M., Altikatoglu, M., Hatipoglu, A. and Kuzu, H. (2011) Decolorization of Naphthol Blue Black using the horseradish peroxidase. *Applied biochemistry and biotechnology*. **163**(3) 433-443.
- [50] Deveci, T., Unyayar, A. and Mazmanci, M. A. (2004) Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funalia trogii* ATCC 200800. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **30**(1) 25-32.
- [51] Veitch, N. C. (2004) Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. **65**(3) 249-259.
- [52] Welinder, K. G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*. **2**(3) 388-393.
- [53] Nicell, J., Bewtra, J., Biswas, N., St. Pierre, C. and Taylor, K. (1993) Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from aqueous solution. *Canadian Journal of Civil Engineering*. **20**(5) 725-735.
- [54] Nicell, J. A. (1994) Kinetics of horseradish peroxidase-catalysed polymerization and precipitation of aqueous 4-chlorophenol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **60**(2) 203-215.

- [55] Klibanov, A. M., Alberti, B., Morris, E. and Felshin, L. (1980) Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *J. Appl. Biochem.:(United States)*. **2**(5).
- [56] Klibanov, A. M., Tu, T.-m. and Scott, K. P. (1983) Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science*. **221**(4607) 259-261.
- [57] Klibanov, A. M. and Morris, E. D. (1981) Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme and Microbial Technology*. **3**(2) 119-122.
- [58] Zille, A., Tzanov, T., Gübitz, G. M. and Cavaco-Paulo, A. (2003) Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnology letters*. **25**(17) 1473-1477.
- [59] Fernandes, K. F., Lima, C. S. and Lopes, F. M. (2010) Técnicas de Imobilização de Enzimas. *Revista Processos Químicos*.
- [60] Boucherit, N., Abouseoud, M. and Adour, L. (2012) Degradation of disperse dye from textile effluent by free and immobilized Cucurbita pepo peroxidase. *EPJ Web of Conferences*. EDP Sciences.
- [61] Gholami-Borujeni, F., Mahvi, A. H., Naseri, S., Faramarzi, M. A., Nabizadeh, R. and Alimohammadi, M. (2011) Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. *Res J Chem Environ*. **2** 217-222.
- [62] Toyobo do Brasil - Enzima Horseradish peroxidase doada pela: Toyobo Do Brasil - Fábrica Bioquímica, Rua Padre Bento, 858, CEP: 12326-400, Salto, São Paulo, 2012.
- [63] Nicell, J. A. and Wright, H. (1997) A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*. **21**(4) 302-310.

[64] Mohan, S. V., Prasad, K. K., Rao, N. C. and Sarma, P. (2005) Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*. **58**(8) 1097-1105.

[65] Preethi, S., Anumary, A., Ashokkumar, M. and Thanikaivelan, P. (2013) Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. *SpringerPlus*. **2**(1) 1-8.