



# **Tratamento Enzimático Oxidativo Avançado para Descoloração de Molécula Cromófora**

Priscila Santos Corrêa  
Suzana Guimarães de Lima

## **Projeto Final de Curso**

### **Orientadores:**

Eliana Mossé Alhadef, D.Sc.  
André Rodrigues Pereira, D.Sc.

Fevereiro de 2015



# TRATAMENTO ENZIMÁTICO OXIDATIVO AVANÇADO PARA DESCOLORAÇÃO DE MOLÉCULA CROMÓFORA

***Priscila Santos Corrêa***  
***Suzana Guimarães de Lima***

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção de grau de Engenheira de Bioprocessos e Engenheira Química.

Aprovado por:

---

Alfredo Jackson Telles Bosco, doutorando.

---

Francisca das C. S. S. Mihos, doutoranda.

---

Rosana Gouvêa Maurício, M.Sc.

Orientado por:

---

Prof.<sup>a</sup> Eliana Mossé Alhadef, D.Sc.

---

André Rodrigues Pereira, D.Sc.

Corrêa, Priscila.

De Lima, Suzana.

Tratamento Enzimático Oxidativo Avançado para Descoloração de Molécula Cromófora/ Priscila Corrêa, Suzana de Lima. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2015.

vi, 94 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2015.

Orientadores: Eliana Mossé Alhadeff e André Rodrigues Pereira.

1. Enzima. 2. *Horseradish Peroxidase* (HRP) 3. Corante Têxtil. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Eliana Mossé Alhadeff e André Rodrigues Pereira. I. Título.

Dedicamos este trabalho a todas as pessoas que tiveram a coragem de enfrentar os obstáculos inerentes ao caminho da superação.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Curie

# AGRADECIMENTOS

*Priscila Santos Corrêa*

À minha mãe Rosilene, por me direcionar segundo os seus princípios, por acreditar no meu potencial quando eu mesma o questionava, por cada palavra de apoio e incentivo, pela confiança e todo amor a mim dedicados e também pelas renúncias feitas em meu nome.

À minha irmã Daniele e ao meu “paidrasto” Marco, por toda paciência, compreensão, força e amor dedicados por todos esses anos, pelas risadas e momentos de descontração que tornaram os dias mais leves.

À minha namorada Amanda, por compreender minhas ausências e os momentos de desestabilidade emocional, por todo apoio, incentivo, carinho e amor que deram uma diferente perspectiva para as dificuldades que surgiram.

Aos meus amigos e parentes, pela compreensão na ausência, pelo apoio, suporte e por todos os momentos descontração.

Aos meus orientadores prof.<sup>a</sup> Eliana Alhadeff e André Pereira, pela orientação, apoio, conhecimento transmitido e tempo dedicado a este trabalho.

À professora Priscilla Amaral e as alunas do laboratório de biossensores Érica e Paula, pelas inúmeras vezes que gentilmente cederam espaço e equipamentos em seus laboratórios.

Ao A.J., Suzana e Giselle, pelo apoio, companheirismo, amizade e pelo incrível ambiente de trabalho.

À grande energia que rege o mundo, por sempre existirem novas possibilidades.

# AGRADECIMENTOS

*Suzana Guimarães de Lima*

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar e se fazer presente todos os dias de minha vida me dando saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Eliana e Osvaldo, por se doarem tanto em minha criação, pelo amor, carinho e apoio incondicional e por serem meus maiores exemplos, a eles a minha gratidão e amor eternos.

Aos meus irmãos, Bruno e Juliana, em especial à minha irmã, pelos conselhos, companheirismo e por me proporcionar o sentimento puro de fraternidade.

Aos meus queridos familiares, em especial minha avó Cenyra, pelo carinho, amor e presença em minha caminhada, pelos conselhos, apoio e, sobretudo, pelos ensinamentos.

Ao meu amor, pelo companheirismo, cumplicidade, amizade, paciência e amor.

Aos meus amigos, especialmente à Izabel, por me proporcionar a mais sincera e sólida amizade, pelos conselhos e ouvidos atentos.

À uma pessoa muito especial que entrou em minha vida cheia de conselhos e sorrisos, à você meu carinho e amizade, muitas lembranças e saudades, obrigada por me fazer ver a vida com olhos diferentes.

Aos amigos de estágio, especialmente à Camila e ao Henrique, por me alegrarem as manhãs.

À minha amiga e autora do projeto, Priscila, pela amizade, companheirismo, paciência e motivação durante essa jornada de muita dedicação e doação.

Aos meus orientadores, Eliana Alhadeff e André Pereira, pelo apoio e conhecimento transmitido.

À turma do laboratório, A.J., Giselle, Priscila e Amanda, por tornarem agradáveis e divertidas as ininterruptas horas de trabalho.



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

## **TRATAMENTO ENZIMÁTICO OXIDATIVO AVANÇADO PARA DESCOLORAÇÃO DE MOLÉCULA CROMÓFORA**

Priscila Santos Corrêa  
Suzana Guimarães de Lima  
Fevereiro, 2015

Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Eliana Mossé Alhadef, D.Sc.  
André Rodrigues Pereira, D.Sc.

O presente trabalho avaliou o desempenho da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) imobilizada em esferas de vidro (aminopropil) poroso ativado na descoloração do corante azul de metileno. Os experimentos de imobilização foram conduzidos à 30°C, com agitação constante de 60 rpm por 24 h em concentração enzimática relativa a aproximadamente 150 U/mL em pH 4, 6, 7 e 8. Os ensaios de descoloração em batelada foram conduzidos nas mesmas condições de temperatura e agitação utilizadas na imobilização por 3 horas, concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na faixa de 2-10 mg/L, concentração do corante têxtil azul de metileno na faixa de 5-20 mg/L e pH na faixa de 4-8, conforme planejamento experimental sugerido pelo software STATISTICA®. Ciclos em batelada de reutilização das enzimas foram realizados a partir dos resultados obtidos pelo planejamento experimental, obtendo-se aproximadamente 35% de descoloração no sexto ciclo (após 42 dias da imobilização) em pH 7,0 e aproximadamente 50% em pH 8,0 no quarto ciclo (após 14 dias da imobilização), sendo estes valores de reações conduzidas com a mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e corante. Nos ensaios em sistema contínuo, a condição ótima sugerida pelo planejamento experimental mostrou-se viável do ponto de vista técnico com uso de dois biorreatores em série, com descoloração em torno de 81% no primeiro e 97% após passar no segundo em 15 minutos de reação.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO II - OBJETIVOS</b> .....	2
<b>CAPÍTULO III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
III.1 - Corantes .....	3
III.1.1 - Evolução dos Corantes Sintéticos .....	4
III.1.2 - Constituição Química dos Corantes .....	5
III.1.3 - Corantes na Indústria Têxtil .....	6
III.1.3.1 - Tingimento e Fixação dos Corantes .....	7
III.1.4 - Classificação dos Corantes .....	9
III.1.4.1. - Quanto à Estrutura Química .....	9
III.1.4.2 - Quanto à Aplicação .....	11
III.1.4.3 - Quanto ao Modo de Fixação .....	11
III.1.4.4 - Classificação <i>Colour Index</i> .....	13
III.1.5 - Análise Mercadológica .....	15
III.1.6 - Impacto Ambiental .....	19
III.2 - Azul de Metileno: Propriedades e Aplicações .....	20
III.3 - Efluentes da Indústria Têxtil .....	23
III.3.1. Tratamento de Efluentes Têxteis .....	24
III.3.1.1 - Tratamentos Físico-Químicos .....	27
III.3.1.2 - Tratamentos Biológicos .....	30
III.3.1.3 - Tratamentos Enzimáticos .....	31
III.3.2. - Legislação Ambiental .....	32
III.4 - Peroxidases .....	33
III.4.1 - <i>Horseradish Peroxidase</i> .....	34
III.5 - Técnicas de Imobilização de Enzimas .....	37

III.5.1 - Métodos Irreversíveis de Imobilização .....	38
III.5.1.1 - Ligação Covalente ao Suporte .....	38
III.5.1.2 - Imobilização por Aprisionamento .....	39
III.5.1.3 - Imobilização por Ligações Cruzadas (Crosslinking) ...	40
III.5.2 - Métodos Reversíveis de Imobilização .....	41
III.5.2.1 - Adsorção ao Suporte .....	41
III.5.2.2 - Via Ligações Dissulfeto (S-S) .....	42
<b>CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
IV.1 - Tratamento da <i>Horseradish Peroxidase</i> (HRP) .....	43
IV.2 - Determinação da Atividade Enzimática .....	44
IV.3 - Dosagem de Proteína.....	45
IV.3.1 - Preparo do Reagente de Bradford.....	46
IV.3.2 - Preparo da Curva Padrão .....	46
IV.4 - Imobilização em Esferas de Vidro .....	46
IV.5 - Reações Enzimáticas com o Corante Azul de Metileno .....	48
IV.6 - Planejamento Experimental pelo Software STATISTICA® .....	49
IV.7 - Reações em Sistema Contínuo .....	50
<b>CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
V.1 - Avaliação da Descoloração do Azul de Metileno em pH 7,0. ....	53
V.2 - Avaliação da Absorbância Média ( $\lambda = 660$ nm) em diferentes concentrações do Azul de Metileno.....	54
V.3 - Avaliação do Planejamento Experimental Proposto pelo Software STATISTICA®.....	55
V.3.1 - Avaliação do Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática .....	55
V.3.2 - Avaliação da Eficiência de Imobilização em Diferentes pH's ....	56
V.3.3 - Avaliação dos Resultados Adquiridos pelo Software STATISTICA®.....	56

V.4 - Avaliação da Descoloração do Corante Azul de Metileno Reutilizando as Enzimas Imobilizadas.....	61
V.5 - Avaliação da Descoloração do Corante Azul de Metileno em Sistema Contínuo .....	65
V.5.1 - Teste Reutilizando a Amostra 2 (planejamento experimental) com um Microbiorreator .....	65
V.5.2 - Avaliação do Sistema Contínuo com um Biorreator em pH 7,0 .....	67
V.5.3 - Avaliação do Sistema Contínuo com dois Biorreatores em Série em pH 8,0 .....	67
V.6 - Avaliação dos Efeitos de Descoloração por Meios Não Enzimáticos .....	72
<b>CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
VI.1 - Sugestões de Continuidade do Trabalho .....	75
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Os mais importantes cromóforos. ....	4
FIGURA 2 – Estrutura química característica do grupo cromóforo de um azocorante. .....	5
FIGURA 3 - Interação iônica entre o corante (D) e os grupos amino da fibra da lã. ...	8
FIGURA 4 - Interação de hidrogênio entre o corante sulfonado e os grupos carboxilas da fibra de lã. ....	8
FIGURA 5 - Interação iônica entre o corante (D) e os grupos amino da fibra da lã. ...	9
FIGURA 6 - Maiores países exportadores de corantes e pigmentos entre os anos de 2010 a 2014. ....	16
FIGURA 7 - Maiores países importadores de corantes e pigmentos entre os anos de 2010 a 2014. ....	16
FIGURA 8 - Fórmulas estrutural (a) e espacial (b) do azul de metileno. ....	21
FIGURA 9 - Espectro de absorção no UV-Vis do azul de metileno em solução aquosa de $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em pH 5,5. ....	21
FIGURA 10 - Esquema do comportamento do azul de metileno em diferentes valores de pH. ....	22
FIGURA 11 - Esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativado tipicamente empregada para tratamento de efluente têxtil. ....	27
FIGURA 12 - Modelo de coagulação e floculação. ....	29
FIGURA 13 - Representação em 3D por cristalografia de raios-X da HRP isoenzima C. O grupo heme (vermelho) está localizado entre os átomos de cálcio (esferas azuis). ....	35
FIGURA 14 - Grupo prostético (heme) da HRP. ....	35
FIGURA 15 - Principais resíduos de aminoácidos do grupo prostético (heme). ....	36
FIGURA 16 - Métodos de imobilização enzimática. ....	38
FIGURA 17 - Ligação covalente entre a enzima e o suporte com (a) e sem (b) espaçador. ....	39
FIGURA 18 - Enzima imobilizada em uma matriz (a), fibra (b) e cápsula (c). ....	40
FIGURA 19 - Biocatalisadores imobilizados por ligação cruzada (a) e por ligação co- cruzada com moléculas inertes incorporadas (b). ....	41
FIGURA 20 - Biocatalisador ligado ao suporte por adsorção física. ....	41

FIGURA 21 - Biocatalisador ligado ao suporte por ligação iônica. ....	42
FIGURA 22 - Tratamento enzimático com membrana de diálise. ....	44
FIGURA 23 - Determinação de atividade enzimática - (1) Branco e (2) Complexo Vermelho Formado. ....	44
FIGURA 24 - Ativação das esferas de vidro. (1) início da reação com glutaraldeído 2,5% (v/v) e (2) após 1h de reação a 60 rpm. ....	48
FIGURA 25 – Sistema para a reação da enzima imobilizada com o corante azul de metileno. ....	49
FIGURA 26 - Enzima imobilizada retida no interior do microbiorreator. ....	51
FIGURA 27 - Sistema contínuo com um microbiorreator. ....	52
FIGURA 28 - Sistema contínuo com dois microbiorreatores em série. ....	52
FIGURA 29 - Percentual de descoloração do corante azul de metileno reutilizando a enzima imobilizada. ....	53
FIGURA 30 - Curva padrão do corante azul de metileno. ....	54
FIGURA 31 - Determinação de atividade enzimática em pH 4,0, 6,0 e 8,0. ....	55
FIGURA 32 - Gráfico de Pareto para a descoloração do corante azul de metileno em função dos valores da estatística do teste t de Student. ....	57
FIGURA 33 - Gráfico Trace plot para % descoloração em função das variáveis estatisticamente significativas. ....	58
FIGURA 34 - Superfície de resposta para o percentual de descoloração em função da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e do pH. ....	59
FIGURA 35 - Curvas de nível para o percentual de descoloração em função do pH e da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	60
FIGURA 36 - Resultados obtidos nos dois extremos das faixas estudadas. ....	61
FIGURA 37 - Ciclos de reutilização da enzima imobilizada em reações em pH 8,0 em dias após a imobilização. ....	62
FIGURA 38 - Sistema imobilizado antes (1) e após (2) reação (3h) com azul de metileno e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em tampão pH 8,0 (amostra 6) após 7 dias da imobilização. ....	62
FIGURA 39 - Ciclos de reutilização da enzima imobilizada em reações em pH 6,0 em dias após a imobilização. ....	63
FIGURA 40 - Sistema imobilizado antes (1) e após (2) reação (3h) com azul de metileno e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em tampão pH 6,0 após 7 dias da imobilização (a) amostra 1, (b) amostra 2 e (c) amostra 4. ....	63

FIGURA 41 - Ciclos de reutilização da enzima imobilizada em reações em pH 4,0 em dias após a imobilização. ....	64
FIGURA 42 - Sistema imobilizado antes (1) e após (2) reação (3h) com azul de metileno e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em tampão pH 4,0 após 7 dias da imobilização (a) amostra 5 e (b) amostra 7. ....	65
FIGURA 43 - Percentual de descoloração em sistema contínuo com enzima reutilizada. ....	66
FIGURA 44 - Percentual de descoloração no 2º ciclo em sistema contínuo com enzima reutilizada. ....	66
FIGURA 45 - Gráfico de colunas com o percentual de descoloração em sistema contínuo em pH 7,0. ....	67
FIGURA 46 - Descoloração do azul de metileno no primeiro (R1) e no segundo reator (R2). ....	68
FIGURA 47 - Descoloração global do azul de metileno no sistema contínuo com dois microbiorreatores. ....	69
FIGURA 48 - Solução de azul de metileno a ser tratada (1) Original na concentração de 20 mg/L (2) Amostras nos tempos 0, 15 e após 30 minutos de processo contínuo coletadas nos efluentes de cada microrreator (R1 e R2). ....	70
FIGURA 49 - Sistema contínuo com dois microbiorreatores em série após 3 horas de reação. ....	70
FIGURA 50 - Amostras após ciclo sem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1) pH 4,0 e (2) pH 8,0. ....	72
FIGURA 51 - Sobrenadante após reação a vazão (1) 1,36 mg/L e (2) 0,77 mg/L. ...	73

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Capacidade instalada de corantes e pigmentos. ....	18
TABELA 2: Produção e vendas declaradas de corantes e pigmentos. ....	19
TABELA 3: Importação e exportação de corantes e pigmentos. ....	19
TABELA 4: Estrutura e absorção UV- Vis características de azul de metileno e suas formas reduzidas comuns. ....	23
TABELA 5: Métodos de ligação covalente da enzima com o suporte: ativação da função hidroxil da matriz. ....	38
TABELA 6: Propriedades da enzima <i>horseradish peroxidase</i> . ....	43
TABELA 7: Planejamento experimental sugerido pelo software STATISTICA®. ....	50
TABELA 8: Eficiência de imobilização da HRP em esferas de vidro (aminopropil) em pH 7,0. ....	53
TABELA 9: Determinação de Atividade enzimática em diferentes valores de pH. ...	55
TABELA 10: Eficiência de imobilização da HRP em esferas de vidro (aminopropil) em diferentes pH's. ....	56
TABELA 11: Percentual de descoloração do corante Azul de metileno conforme planejamento experimental realizado no software STATISTICA®. ....	56
TABELA 12: Significância Estatística. ....	57
TABELA 13: Dados do Sistema Contínuo em Série. ....	68
TABELA 14: Desempenho na remoção de cor em relação à condução do processo: descontínuo x contínuo. ....	71
TABELA 15: Processo contínuo com um e com dois microrreatores em série. ....	72



## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

O crescimento cada vez mais expressivo das atividades industriais tem gerado grandes impactos ambientais, principalmente devido à poluição causada pelo descarte indevido de rejeitos. O comprometimento da qualidade de vida culminou na necessidade de tratamento, fiscalização e regulamentação dos efluentes industriais (FORGIARINI, 2006).

As indústrias têxteis geram rejeitos em diversas etapas do processo, como lavagem das fibras e no tingimento. São efluentes orgânicos e/ou inorgânicos corados muitas vezes recalcitrantes e tóxicos, ou seja, de difícil degradação e altamente poluidores. O grande problema deste setor está na fixação do corante nas fibras, estima-se que 10 a 20% do corante aplicado seja perdido como rejeito (GUARATINI; ZARONI, 2000), resultando em torno de 4% da produção por ano (POGGERE *et al.*, 2011).

O corante azul de metileno é um corante orgânico aromático, heterocíclico e solúvel em água, que tem vasta aplicação na produção de papel e em diversos materiais como nylons e poliésteres. É classificado como um corante básico ou também catiônico, pois libera cátions coloridos em solução aquosa (POGGERE *et al.*, 2011). Embora não seja considerado um composto com alto grau de periculosidade, a ingestão ou inalação pode acarretar problemas de saúde (BASTOS, 2014).

O tratamento de efluentes têxteis pode ser feito por métodos físico-químicos e bioquímicos combinados ou não. Os métodos bioquímicos tem sido os mais estudados atualmente, principalmente por serem menos nocivos ao meio ambiente quando comparados aos métodos químicos. A aplicação de processos biológicos utilizando microorganismos ou diretamente enzimas tem sido alternativas de grande potencial. No entanto, são métodos menos eficientes e mais demorados. (BASTOS, 2014).

## CAPÍTULO II – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a viabilidade de aplicação da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) imobilizada em esferas de vidro (aminopropil) na descoloração do corante azul de metileno. Este estudo foi desenvolvido com base nos trabalhos de Bastos (2014) e Alhadeff (2005), onde o primeiro avalia a HRP imobilizada em alginato de cálcio na descoloração do corante azul de metileno e o segundo utiliza a HRP imobilizada em esferas de vidro (aminopropil) como biossensor para detecção de etanol.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar a influência do pH na reação de descoloração do corante azul de metileno.
- Avaliar a influência da concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na reação de descoloração do corante azul de metileno.
- Avaliar a influência da concentração de azul de metileno na reação de descoloração do mesmo.
- Avaliar a viabilidade de reutilização do sistema enzimático imobilizado na reação de descoloração do corante azul de metileno.
- Avaliar a reação de descoloração do corante azul de metileno em batelada e em sistema contínuo.

## CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### III.1 - Corantes

Os corantes naturais são usados há milhares de anos, havendo evidências de seu uso no antigo Egito, China e Índia. No Brasil, os corantes naturais tem grande importância com a história do país, a começar pelo nome, originário da madeira pau-brasil, significativa fonte de corante vermelho no século XVI. O país também forneceu corante índigo, extraído da planta *Indigofera tinctoria*, durante grande parte do século XIX (ROSSI, 2008).

É classificada como corante toda substância química que absorve radiação na faixa da luz visível (380 - 780 nm) e a reflete em um determinado comprimento de onda, isto é, em uma cor específica (CRISTÓVÃO, 2010).

Estruturalmente, um dos únicos aspectos comuns a praticamente todos os corantes é a presença de um ou mais anéis benzênicos, conferindo aos corantes a facilidade de absorver radiação na faixa da luz visível, devido à circulação de elétrons pelos anéis (LIMA; PEREIRA; PINTO, 2015).

Os corantes podem ser obtidos de fontes naturais ou sintetizados em reações orgânicas por diferentes mecanismos. Podem ser inorgânicos, como o dióxido de titânio ou o óxido de ferro, ou orgânicos, como o azul de metileno (GALEMBECK; CSORDAS, 2004).

Até meados do século XIX, todos os corantes provinham de folhas, ramos, raízes, frutos ou flores de várias plantas e substâncias extraídas de animais (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Corantes podem ser separados em 20 - 30 grupos diferentes quanto a seus grupos cromóforos, os mais importantes são azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antraquinona, ftalocianina e corantes triarilmetano (Figura 1). Corantes azo representam cerca de 70% em relação ao peso do total da produção mundial anual (DOS SANTOS *et al.*, 2003). Estes corantes são seguidos, em termos de produção, pelos corantes de antraquinona (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

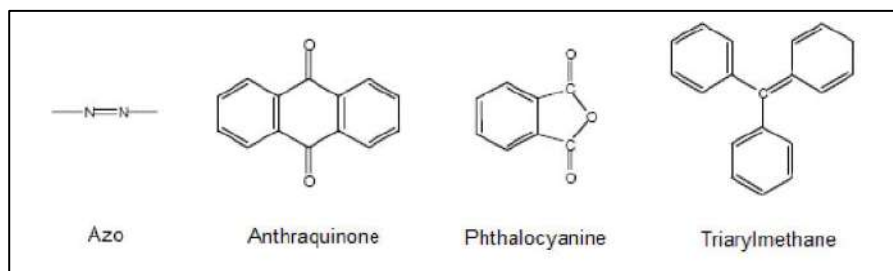


FIGURA 1 - Os mais importantes cromóforos.  
 Fonte: CRISTÓVÃO (2010).

### III.1.1 - Evolução dos Corantes Sintéticos

A indústria de corantes têxteis teve seu primeiro corante sintético descoberto apenas em 1856, na Inglaterra, por William Henry Perkin, embora tenha sua origem na Europa desde o século XVI. Devido a grande inovação tecnológica ocorrida por volta de 1915, a Alemanha manteve o monopólio sobre a produção de corante sintético até a Segunda Guerra Mundial. A indústria de corantes dos Estados Unidos é uma das maiores fontes exportadoras destes produtos, colocando no mercado aproximadamente 2.000 tipos diferentes de corantes sintéticos (TWARDOKUS, 2004). O Quadro 1 apresenta a evolução histórica de reações de síntese de corantes, conforme registros obtidos no período de 1856 a 1960.

QUADRO 1: Evolução dos corantes sintéticos.

Ano	Ocorrência
1856	Síntese da malveína (Perkin)
1858	Reação de diazotação (Griess)
1859	Síntese da magenta (Verguin)
1862	Reação de sulfonação (Nicholson)
1873	1º corante sulforoso (Croissant e Brentoniere)
1876	Síntese da crisoidina: 1º corante azo
1880	1º corante azóico (Thomas e Robert Holliday)
1884	1º corante direto: vermelho congo
1894	Síntese do índigo
1901	1º corante à tina
1922	Corantes indigosois (Tina pré-reduzida)
1924	Corantes dispersos
1935	Corantes de ftalocianina
1956	Corantes reativos: DCT
1960	Corantes catiônicos modificados

Fonte: Adaptado de TWARDOKUS, 2004.

### III.1.2 - Constituição Química dos Corantes

Os grupos funcionais presentes na estrutura química de um corante são de grande importância para a escolha do mesmo, sendo divididos em grupos cromóforos, auxocromos e solubilizantes (VIDART, 2013).

Os grupos cromóforos são responsáveis pela coloração do corante. Existem muitos grupos cromóforos utilizados na síntese de corantes, como o nitro ( $-\text{NO}_2$ ), azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ), nitroso ( $-\text{NO}$  ou  $=\text{N}-\text{OH}$ ), antraquinona ( $=\text{C}=\text{O}$  e  $=\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{C}=\text{O}$ ), etc (INOUE, 2008). Quando a luz atinge um cromóforo, a excitação de um elétron faz com que sejam emitidos fótons de uma cor específica. (HUNGER, 2003).

A Figura 2 apresenta a estrutura química do grupo cromóforo de um corante azo ou azocorante, que se caracteriza por apresentar um ou mais grupamentos  $-\text{N}=\text{N}-$  ligados a sistemas aromáticos (KUNZ *et al.*, 2002).

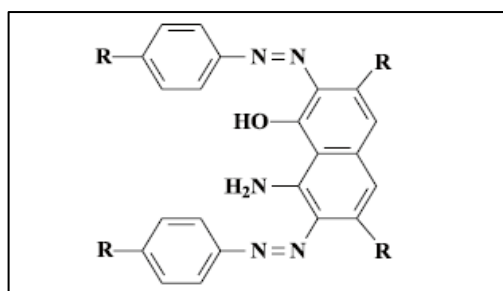


FIGURA 2 – Estrutura química característica do grupo cromóforo de um azocorante.  
Fonte: KUNZ *et al.* (2002).

Os grupos auxocromos são responsáveis pela intensidade da cor e pela fixação do corante em um material, desta forma, a sua presença na estrutura da molécula acarreta em um deslocamento no máximo de absorção. Os principais grupos auxocromos são amino ( $-\text{NH}_2$ ), hidroxila ( $-\text{OH}$ ), e seus derivados, ou radicais carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) e sulfônicos ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) (HUNGER, 2003; INOUE, 2008).

Os grupos solubilizantes proporcionam solubilidade permanente ou temporária. Em corantes ácidos, diretos e reativos, os grupos sulfônicos apresentam característica solubilizante permanente, em corantes catiônicos, as aminas quaternárias apresentam tal função. Grupos enólicos e cetônicos possibilitam solubilidade temporária à molécula de corante (ANDREAUS *et al.*, 2010).

Todos corantes reativos contêm grupos sulfonato de sódio ( $-\text{SO}_3\text{Na}$ ) para solubilização em meio aquoso. Assim, dissolvem em água formando ânion sulfonato

colorido e o cátion sódio. Muitos destes corantes apresentam um a quatro grupos sulfonatos (KIMURA, 2001).

### III.1.3 - Corantes na Indústria Têxtil

Corantes têxteis são compostos orgânicos aplicados em fibras, proporcionando diferentes colorações em condições de processos predeterminados. Os corantes impregnam as fibras e podem reagir com o material durante o processo de tingimento. Existe uma determinada categoria de corante para cada tipo de fibra. Para as fibras celulósicas, como o algodão, são aplicados os corantes reativos, diretos, azóicos e sulfurosos. São fatores decisivos para a seleção do corante as características técnicas que se quer atingir, como resistência à luz, à fricção e ao suor (CRQ IV, 2011).

Os azocorantes representam aproximadamente 60% dos corantes utilizados no mundo, sendo amplamente utilizados no tingimento de fibras têxteis (KUNZ *et al.*, 2002). O Quadro 2 apresenta as principais classes de corantes têxteis, os tipos de fibras que apresentam afinidade e a taxa de fixação característica de cada corante.

QUADRO 2: Descrição das principais classes de corantes têxteis.

<b>Classe de corantes</b>	<b>Método</b>	<b>Fibra tipicamente aplicada</b>	<b>Fixação típica (%)</b>
Ácido	Esgotamento/ "beck"/ contínuo (tapete)	Lã/ nylon	80 – 93
Básico	Esgotamento/ "beck"	Acrílicas/ algumas fibras de poliéster	97 – 98
Direto	Esgotamento/ "beck"/ contínuo	Algodão/ raion/ outras fibras celulósicas	70 – 95
Disperso	Esgotamento a alta temperatura contínuo	Poliéster/ acetato/ outras fibras sintéticas	80 – 92
Reativo	Esgotamento/ "beck"/ "cold pad batch"/ contínuo	Algodão/ outras fibras celulósicas/ lã	60 – 90
Sulfurosos	Contínuo	Algodão e outras fibras celulósicas	60 – 70
Tina	Esgotamento/ "package"/ contínuo	Algodão e outras fibras celulósicas	80 – 95

Fonte: Adaptado de EPA, 1997.

### III.1.3.1 -Tingimento e Fixação dos Corantes

A maior parte dos corantes é solúvel em água, então para a aplicação destes na indústria têxtil, comumente utiliza-se uma substância chamada mordente para possibilitar a fixação dos corantes à fibra dos tecidos no processo de tingimento. Os mordentes são formados por metais de transição que possuem a capacidade de se complexar com grupos característicos presentes nas estruturas das fibras, facilitando a fixação dos corantes. Exemplos são os sulfatos de cobre, ferro, alumínio e estanho. (LIMA; PEREIRA; PINTO, 2015).

Tingimento é o processo de coloração dos substratos têxteis, mediante a aplicação de corantes, de forma homogênea (CPRH, 2001). No decorrer do processo de tingimento três etapas são consideradas importantes: montagem, fixação e tratamento final. A fixação do corante à fibra é realizada através de reações químicas, da insolubilização do corante ou de derivados gerados e ocorre geralmente em distintas etapas ao longo das fases de montagem e fixação. O processo de tintura é finalizado com uma etapa de lavagem para retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado que não se fixou à fibra nas etapas anteriores (GUARATINI; ZANONI, 2000). O corante que não se agrega à fibra fica hidrolisado e torna-se inútil à tintura. O tempo de fixação depende da reatividade do corante, variando entre 60 e 90 minutos. A temperatura também varia para cada tipo de corante, entre 45°C e 60°C (CPRH, 2001).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), a forma de fixação da molécula do corante às fibras têxteis geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver essencialmente quatro tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van de Waals e covalentes.

- **Interações iônicas** - São tingimentos baseados em interações mútuas entre o centro positivo dos grupos amino presentes na fibra e a carga iônica negativa da molécula do corante ou vice-versa (Figura 3). A tintura da lã, seda e poliamida caracteriza este tipo de interação (GUARATINI; ZANONI, 2000).

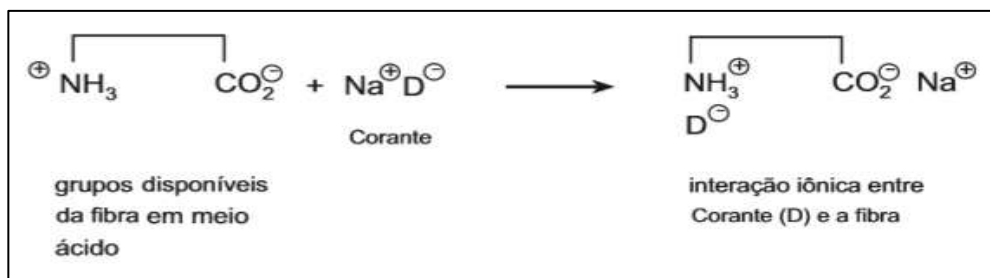


FIGURA 3 - Interação iônica entre o corante (D) e os grupos amino da fibra da lã.  
 Fonte: GUARATINI e ZANONI (2000).

- **Interações de Van der Waals** - São tingimentos baseados na interação oriunda da aproximação extrema entre orbitais  $\pi$  do corante e da molécula da fibra, as moléculas do corante interagem com a fibra por afinidade, sem formar uma ligação forte, sendo predominante em moléculas de corante lineares/longas e/ou achatadas, permitindo uma máxima aproximação à estrutura molecular da fibra. Este tipo de interação pode ser observada na tintura de poliéster e lã com corantes com alta afinidade por celulose (GUARATINI; ZANONI, 2000).
- **Interações de Hidrogênio** - São tingimentos derivados da ligação entre átomos de hidrogênio do corante e o par de elétrons livres de átomos doadores em centros presentes na fibra. Este tipo de interação é encontrada na tintura de lã, seda e fibras sintéticas como acetato de celulose (GUARATINI; ZANONI, 2000).

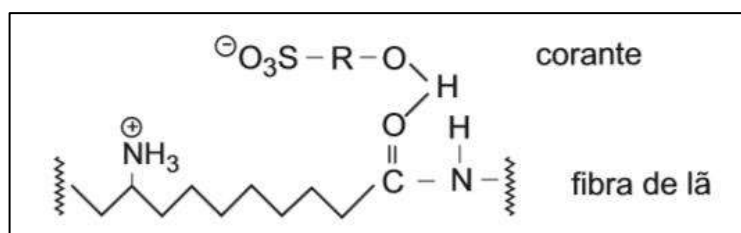


FIGURA 4 - Interação de hidrogênio entre o corante sulfonado e os grupos carboxilas da fibra de lã.  
 Fonte: GUARATINI e ZANONI (2000).

- **Interações Covalentes** - São tingimentos resultantes da formação de uma ligação covalente entre o grupo reativo da estrutura química do corante, ou grupo eletrofílico e resíduos nucleofílicos da fibra têxtil. Como exemplo podem



ser citadas as fibras de algodão que são passíveis de interagir com o corante através de ligações forte do tipo covalente (GUARATINI; ZANONI, 2000).

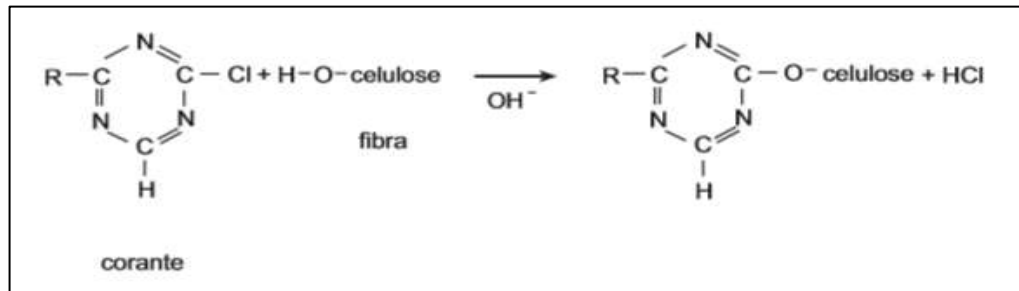


FIGURA 5 - Interação iônica entre o corante (D) e os grupos amino da fibra da lã.  
Fonte: GUARATINI e ZANONI (2000).

### III.1.4 - Classificação dos Corantes

Os corantes podem ser classificados segundo diferentes aspectos, como classes químicas, aplicações a que se destinam, origem, entre outros. Os corantes utilizados na indústria alimentícia, por exemplo, são usualmente classificados segundo sua origem (VELOSO, 2012).

Existem atualmente várias classes de corantes classificados segundo sua fixação, como ácido, direto, básico, de enxofre e reativos, sendo este o mais utilizado em nível mundial (KUNZ *et al.*, 2002).

#### III.1.4.1 - Quanto à Estrutura Química

O Quadro 3 apresenta corantes de acordo com suas respectivas classes químicas.

QUADRO 3: Classificação segundo as classes químicas.

Classificação segundo as classes químicas	
Classe	Classificação por aplicação
<b>Acridina</b>	Básicos, pigmentos orgânicos
<b>Aminocetona</b>	À tina, mordentes
<b>Antraquinona</b>	Ácidos, mordentes, à tina, dispersos, azoicos, 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 e naftóis
<b>Bases de oxidação</b>	Corantes especiais para tingimento de pelo, pelegos, cabelos
<b>Difenilmetano</b>	Ácidos, básicos e mordentes
<b>Estibeno</b>	Diretos, reativos e branqueadores ópticos
<b>Ftalocianina</b>	Pigmentos orgânicos, ácidos, diretos, azoicos, 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

Fonte: Adaptado de ABIQUIM, 2015.

Dentro das mesmas famílias e grupos existem corantes de várias cores, como se mostra no Quadro 4.

QUADRO 4: Cores de corantes por famílias e grupos.

Família e Grupo	Red	Green	Yellow	Blue	Orange	Brown	Purple
<b>Azo:</b>							
Monoazo	√		√		√	√	√
Diazo	√		√	√	√	√	
Azo Condensação	√		√		√	√	
Benzimidazolona	√		√		√	√	
<b>Policíclicos:</b>							
Antraquinona	√	√	√	√	√	√	√
Ftalocianinas		√		√			
Quinacridonas	√		√				√
Dioxazinas							√
Perilenos					√	√	
Isoindolinonas	√		√		√		
Indigóides				√		√	√

Fonte: CTB, 2015.

### III.1.4.2 - Quanto à Aplicação

O Quadro 5 apresenta os corantes e pigmentos segundo suas aplicações.

QUADRO 5: Classificação segundo a utilização por substrato.

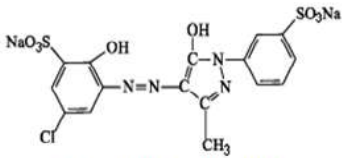
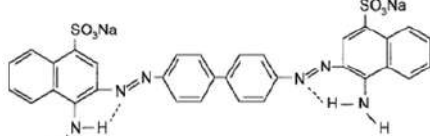
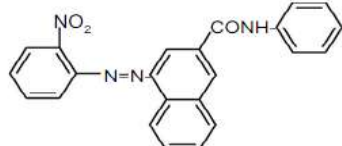
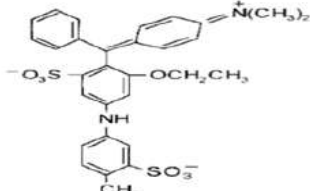
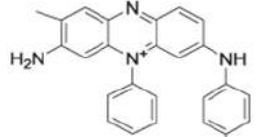
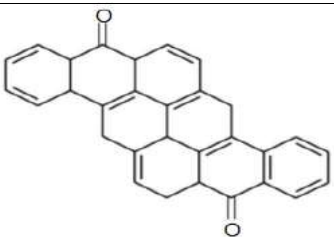
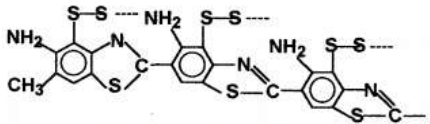
<b>Classificação segundo a utilização por substrato</b>	
<b>Classe</b>	<b>Principais campos de aplicação</b>
<b>Branqueadores ópticos</b>	Detergentes, fibras naturais, fibras artificiais, fibras sintéticas, óleos, plásticos, sabões, tintas e papel
<b>A cuba sulfurados</b>	Fibras naturais e fibras artificiais
<b>A tina</b>	Fibras naturais
<b>Ácidos</b>	Fibras naturais e fibras sintéticas
<b>Ao enxofre</b>	Couro, fibras sintéticas, lã, madeira e papel
<b>Azóicos</b>	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
<b>Básicos</b>	Couro, fibras sintéticas, lã, madeira e papel
<b>Diretos</b>	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
<b>Dispersos</b>	Fibras artificiais e fibras sintéticas
<b>Mordentes</b>	Alumínio anodizado, lã, fibras naturais e fibras sintéticas
<b>Reativos</b>	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
<b>Solventes</b>	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

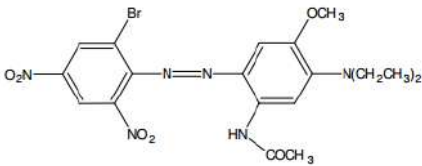
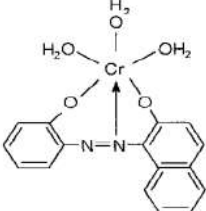
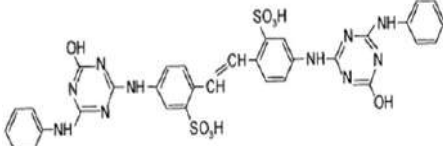
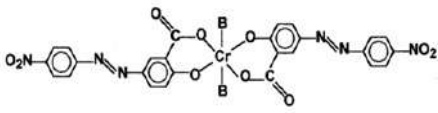
Fonte: ABIQUIM, 2015.

### III.1.4.3 - Quanto ao Modo de Fixação

Os principais grupos de corantes classificados pelo modo de fixação à fibra têxtil são apresentados a seguir (Quadro 6).

QUADRO 6: Classificação segundo o modo de fixação à fibra têtil.

Classificação segundo o modo de fixação		
Classes de corantes	Exemplo de estrutura química	Características
Reativos	 <p>vermelho reativo 183</p>	solúveis em água; caráter aniônico; utilizados em fibras celulósicas, protéicas e poliamidas; possuem grupo reativo capaz de formar ligação covalente com a fibra, conferindo maior estabilidade na cor.
Diretos	 <p>vermelho congo</p>	solúveis em água; caráter aniônico; utilizados em fibras de celulose; formam interações de Van der Waals com a fibra; conferem alto grau de fixação.
Azóicos	 <p>corante laranja azóico</p>	insolúveis em água; sintetizados sobre a fibra durante a tintura; requerem utilização de agente de acoplamento (afinidade pela fibra); utilizados em fibras de celulose; alto padrão de fixação.
Ácidos	 <p>corante ácido violeta</p>	solúveis em água; utilizados em fibras nitrogenadas e acrílicas; caráter aniônico; ligam-se através de troca iônica; extensa faixa de coloração e grau de fixação.
Básicos	 <p>corante básico malveina</p>	solúveis em água; corantes catiônicos; pouca afinidade pelo algodão, sendo necessária a utilização de mordentes.
à Cuba	 <p>corante laranja à tina 9</p>	corantes à tina ou corantes vat; insolúveis em água; solubilização em solução alcalina; utilizados em fibras de celulose; regeneração da forma original do corante sobre a fibra por oxidação após aplicação.
de Enxofre	 <p>corante enxofre laranja 1</p>	insolúveis em água; formam pontes de polissulfetos; aplicação semelhante a dos corantes à tina; geram resíduos altamente tóxicos.

<p><b>Dispersivos</b></p>	 <p><b>corante disperso azul 291</b></p>	<p>insolúveis em água; aplicados em suspensão; utilizados em fibras celulósicas e demais fibras hidrofóbicas; requerem agentes dispersantes no processo.</p>
<p><b>Pré-Metalizados</b></p>	 <p><b>corante pré-metalizado</b></p>	<p>fibras protéicas e poliamida; reagem formando complexos com íons metálicos; presença de metal pesado no rejeito.</p>
<p><b>Branqueadores</b></p>	 <p><b>corante fluorescente 32</b></p>	<p>diminuição da aparência amarelada das fibras em estado bruto; proporcionam reflexão por fluorescência em luz UV.</p>
<p><b>Mordentes</b></p>	 <p><b>corante mordente laranja 1</b></p>	<p>corantes ácidos; combinam-se com a fibra têxtil e com uma substância mordente simultaneamente; utilizados em fibras celulósicas, protéicas e poliamida.</p>

Fonte: Adaptado de GUARATINI e ZANONI (2000), KIMURA (2001) e LADCHUMANANANDASIVAM (2008).

#### III.1.4.4 - Classificação *Colour Index*

Considerando-se que corantes, pigmentos e branqueadores ópticos são compostos complexos, frequentemente é inviável expressá-los por uma fórmula química, visto que são misturas de vários compostos ou não possuem estrutura química definida. Por esse motivo, a nomenclatura química usual raramente é usada, preferindo-se utilizar os nomes comerciais (ABIQUIM, 2015).

Para identificar corantes semelhantes, comercializados com nomes distintos, utiliza-se o *Colour Index (CI)*, publicação da *American Association of Textile Chemists and Colourists* e da *Society of Dyers and Colorists*, que contém uma lista organizada de nomes e números para denominar os diversos tipos de corantes. Os números do *Colour Index* são atribuídos quando a estrutura química é definida e conhecida (ABIQUIM, 2015).

Conforme o *Colour Index*, os corantes e pigmentos podem ser classificados em 26 tipos, segundo os critérios das classes químicas, e em 20 tipos, segundo suas aplicações, além de algumas subdivisões (GUARATINI; ZANONI, 2000; ABIQUIM, 2015).

Conforme *The Society of Dyers and The Colourists and American Association of Textile Chemists and Colourists* (1956), a denominação dos corantes e pigmentos é dada por dois números de referência, o *Colour Index Generic Name (CIGN)*, que descreve os corantes por sua classe reconhecida (ácido, básico, disperso, mordente, etc), sua tonalidade e um número de série, como exemplificado no Quadro 7, e o *Colour Index Constitution Number (CICN)* que se refere à classe química.

QUADRO 7: Exemplos da nomenclatura adotada pelo *Colour Index*.

<b>Classes químicas</b>	<b>CICN</b>	<b>CIGN</b>
Nitro	10316	Acid Yellow 1
Quinolona	47010	Acid Yellow 2
Antraquinona	58255	Mordant Red 2
Antraquinona	58005	Mordant Red 3
Azo	11080	Disperse Orange 1
Azo	11005	Disperse Orange 3

Fonte: *Society of Dyers and Colourists and American Association of Textile Chemists and Colourists* (1956).

Existem ainda outros códigos para identificação de corantes, entre eles o CAS *NUMBER* e o Código Brasil (VELOSO, 2012).

O Quadro 8 registra a numeração *CICN* conforme as classes químicas dos corantes.

QUADRO 8: Classificação *Colour Index Constitution Number (CICN)* de acordo com as classes químicas.

<b>Classes químicas</b>	<b>CICN</b>
Nitroso	10000-10299
Nitro	10300-10999

Monoazo	11000-19999
Diazo	20000-39999
Estilbeno (Diaril eteno)	40000-40799
Diarilmetano	41000-41999
Triarilmetano	42000-44999
Xanteno	45000-45999
Acridina	46000-46999
Quinolina	47000-47999
Metino	48000-48999
Tiazol	49000-49399
Indamina	49400-49699
Indofenol	49700-49999
Azina	50000-50999
Oxazina	51000-51999
Tiazina	52000-52999
Aminocetona	56000-56999
Antraquinona	58000-72999
Indigóides	73000-73999
Ftalocianina	74000-74999
Corantes naturais	75000-76999
Pigmentos Inorgânicos	77000-77999

Fonte: *Society of Dyers and Colourists and American Association of Textile Chemists and Colourists* (2006).

### III.1.5 - Análise Mercadológica

As Figuras 6 e 7 apresentam, respectivamente, os 10 maiores países exportadores e importadores de corantes e pigmentos em geral, nos últimos 5 anos (2010 a 2014), de acordo com pesquisa realizada no Sistema *Alice Web* utilizando como filtro o capítulo 32 da Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM).

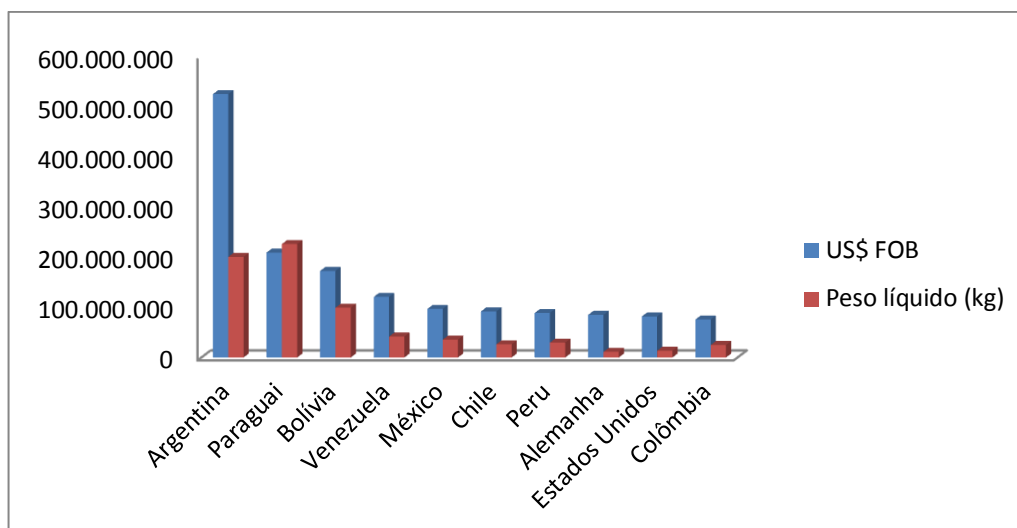


FIGURA 6 - Maiores países exportadores de corantes e pigmentos entre os anos de 2010 a 2014.  
 Fonte: Adaptado do Sistema *Alice Web* (2015).

Observa-se que os principais exportadores de corantes e pigmentos estão concentrados na América do Sul. A Argentina é a líder em vendas, com quantias, em US\$ FOB, que representam mais do dobro do valor exportado pelo Paraguai, o segundo maior exportador. Pode-se também observar que os corantes exportados pela Argentina provavelmente possuem maior valor agregado, visto que seu peso exportado é ligeiramente inferior, quando comparado aos corantes exportados pelo Paraguai.

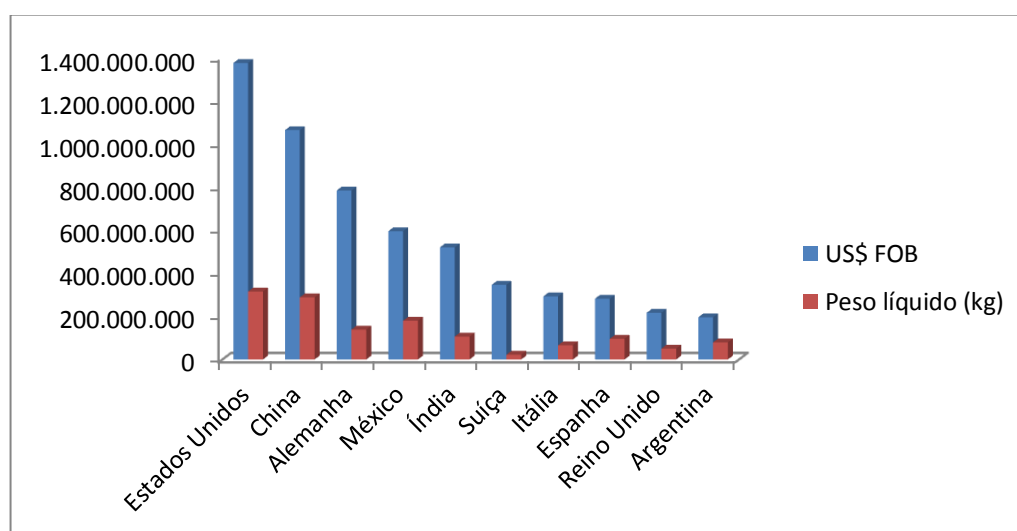


FIGURA 7 - Maiores países importadores de corantes e pigmentos entre os anos de 2010 a 2014.  
 Fonte: Adaptado do Sistema *Alice Web* (2015).



Observa-se que os Estados Unidos, China e Alemanha são os principais importadores de corantes e pigmentos, provavelmente de elevado valor agregado, com importações que alcançam aproximadamente 1,4 bilhões, cerca de 1,1 bilhões e de 0,8 bilhões de dólares, respectivamente.

Na Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM), os corantes estão classificados no capítulo 32 e nas posições 3203, 3204, 3205, 3206 e 3207, como pode ser observado no Quadro 9 (ABIQUIM, 2015).

QUADRO 9: Classificação dos corantes conforme a Nomenclatura Comum do Mercosul.

Capítulo	Posição	Mercadoria
32	3203	Matérias corantes de origem vegetal ou animal e preparações à base dessas matérias
	3204	Matérias corantes orgânicas sintéticas e preparações à base dessas matérias
	3205	Lacas corantes e suas preparações
	3206	Outras matérias corantes; produtos inorgânicos dos tipos utilizados como luminóforos
	3207	Pigmentos, opacificantes e cores preparados, composições vitrificáveis, engobos, esmaltes metálicos líquidos e preparações semelhantes, dos tipos utilizados nas indústrias da cerâmica, do esmalte e do vidro; fritas de vidro e outros vidros, em pó, em grânulos, em lamelas ou em flocos.

Fonte: Sistema *Alice Web*, 2015.

O Quadro 10 assinala as principais empresas produtoras de corantes e pigmentos no Brasil. As empresas, em sua maioria, são dependentes de produtos intermediários importados, como derivados de benzeno, tolueno e naftaleno, entre outros, e localizam-se, predominantemente, nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (GUARATINI; ZANONI, 2000).

QUADRO 10: Produtores nacionais de corantes e pigmentos.

<b>Empresa</b>	<b>Produtos</b>
A Chemical	Corantes ácidos, corantes básicos e corantes diretos
Bann Química	Corantes à tina
Basf	Pigmentos orgânicos, corantes básicos, agentes de branqueamento óptico
Brancotex	Pigmentos orgânicos
Cabot	Negro de Fumo
Clariant	Agentes de branqueamento óptico, corantes ácidos, corantes básicos, corantes à cuba, corantes diretos, corantes dispersos, corantes ao enxofre, corantes mordentes, corantes pré-metalizados, corantes reativos, pigmentos orgânicos
Columbian Chemicals	Negro de Fumo
Dry Color	Pigmentos orgânicos
DuPont	Dióxido de titânio
DyStar	Corantes azóicos, brancos óticos e dispersão de pigmentos
Lanxess	Pigmentos inorgânicos
Millennium/Cristal	Dióxido de titânio

Fonte: ABIQUIM, 2015.

A Tabela 1 exhibe as empresas nacionais produtoras de corantes e pigmentos e suas respectivas localizações, predominantemente no estado de São Paulo, e capacidades instaladas no ano de 2012.

TABELA 1: Capacidade instalada de corantes e pigmentos.

<b>Capacidade instalada (t/ano)</b>		
<b>Empresa</b>	<b>Localização</b>	<b>Capacidade instalada em 2012</b>
A CHIMICAL	SP	1.750
BANN	SP	n.d.
BASF	SP	4.790
BRANCOTEX	SP	30
CLARIANT	SP	n.d.
CLEOMAR	SP	120
DRY COLOR	SP	840
DYNATECH	SP	9.600
STAHL	RS	7.500
TEXPAL	SP	1.540
TRANSCOR	SP	1.200
<b>Total</b>		<b>27.370</b>

Fonte: Adaptado de Anuário da ABIQUIM 2013.

Produção e vendas declaradas, internas e externas, em toneladas por ano, entre os anos de 2008 e 2012 são expostas a seguir (Tabela 2), demonstrando que a maior parte da produção de corantes e pigmentos alimenta o mercado interno.

TABELA 2: Produção e vendas declaradas de corantes e pigmentos.

<b>Produção e vendas declaradas (t/ano)</b>			
<b>Ano</b>	<b>Produção</b>	<b>Vendas Internas</b>	<b>Vendas Externas</b>
2008	20.457,0	13.767,0	5.178,0
2009	17.907,0	13.251,0	4.759,0
2010	22.814,0	15.288,1	5.517,9
2011	20.235,0	12.981,0	5.296,0
2012	26.427,1	21.843,8	1.702,0

Fonte: Adaptado de Anuário da ABIQUIM 2013.

O setor nacional de corantes e pigmentos apresentou saldo da balança comercial expressivamente negativo nos últimos anos. As importações e exportações, em toneladas por ano e em dólares entre os anos de 2008 e 2012 são apontadas na Tabela 3.

TABELA 3: Importação e exportação de corantes e pigmentos.

<b>Importação e exportação (t/ano e US\$-fob)</b>				
<b>Ano</b>	<b>Importação</b>		<b>Exportação</b>	
	<b>t/ano</b>	<b>US\$1.000-fob</b>	<b>t/ano</b>	<b>US\$1.000-fob</b>
2008	37.363,4	250.746,8	9.795,7	67.491,4
2009	35.936,9	217.687,8	7.969,6	47.364,8
2010	47.880,4	301.689,0	8.999,0	68.620,4
2011	39.289,8	277.765,8	8.402,9	76.886,5
2012	42.521,1	295.128,1	7.798,9	63.163,9

Fonte: Adaptado de Anuário da ABIQUIM 2013.

### III.1.6 - Impacto Ambiental

A indústria têxtil apresenta perspectiva altamente favorável ao progresso do setor no Brasil. Entretanto, ainda que seja um setor fundamental na sociedade atual, a atividade têxtil é considerada de elevado impacto ambiental, sobretudo pela produção de volumes consideráveis de efluentes com altas cargas orgânicas e

corantes tóxicos, extremamente prejudiciais aos ecossistemas aquáticos (PELEGRINI *et al.*, 2005).

A poluição causada pelos efluentes têxteis provoca alterações nos ciclos biológicos, perturbando, sobretudo, processos de fotossíntese, além de constituir poluição visual. Somado a esta consideração, pesquisas na área biológica e ambiental tem revelado que algumas classes de corantes, em especial azocorantes e seus subprodutos, apresentam características carcinogênicas e/ou mutagênicas (KUNZ *et al.*, 2002).

Conforme Guaratini e Zanoni (2000), corantes sintéticos são comumente xenobióticos, desta forma os microorganismos presentes nos corpos d'água apresentam dificuldade na degradação destes compostos, de maneira que não possuem enzimas específicas para deteriorar tais compostos sob condições aeróbicas, e ainda sob condições anaeróbicas a degradação ocorre lentamente.

### III.2 - Azul de Metileno: Propriedades e Aplicações

O azul de metileno ou pela nomenclatura IUPAC, cloridrato de 3,7-bis (dimetilamino) 5-fenotiazina ou ainda pela denominação *Colour Index*, azul básico 9 e C.I. Constitution Number 52015 é um corante catiônico e básico, facilmente solúvel em água (ALMEIDA, 2005). E segundo Scotti *et al.* (2006), o corante foi sintetizado por Heinrich Caro em 1876. Algumas propriedades físico-químicas do azul de metileno podem ser observadas no Quadro 11. A Figura 8 mostra as fórmulas estrutural e espacial da molécula.

QUADRO 11: Propriedades físico-químicas do azul de metileno.

Fórmula molecular	$C_{16}H_{18}ClN_3S$
Massa molar	319,85 g/mol
Tamanho molecular	16 Å ou 1,6 nm
Solubilidade em água	$\geq 100$ mg/mL a 22°C
pH em solução aquosa	3 – 4,5

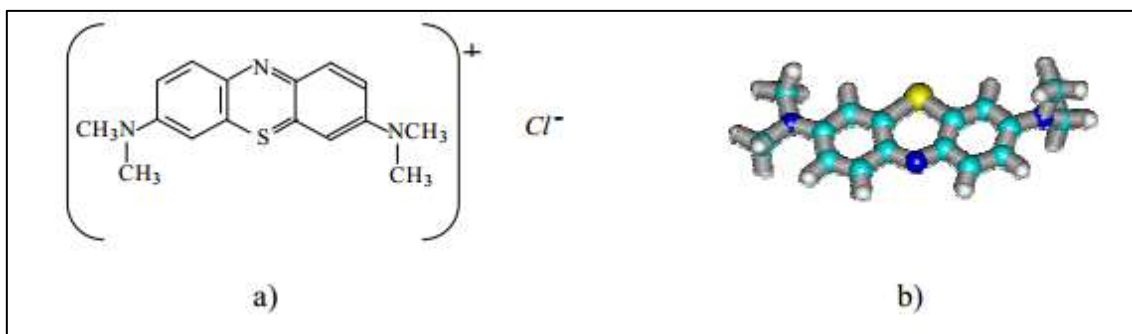


FIGURA 8 - Fórmulas estrutural (a) e espacial (b) do azul de metileno.  
Fonte: ALMEIDA (2005).

O corante azul de metileno apresenta baixa toxicidade, apresentando dose letal média ( $DL_{50}$ ) de 1180 mg/kg, contudo provoca efeitos adversos se inalado, causando dificuldade respiratória, ou ingerido, causando sensação de queimação na boca, náusea, vômito, diarreia e gastrite (ALMEIDA, 2005).

Segundo Almeida (2005), o azul de metileno (AM) se apresenta, preferencialmente, na forma de monômero em soluções aquosas com concentrações menores que  $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , e seu espectro no visível forma um pico em 664 nm. Também podem ser encontradas três outras espécies em solução, o monômero protonado, o dímero e o trímero.

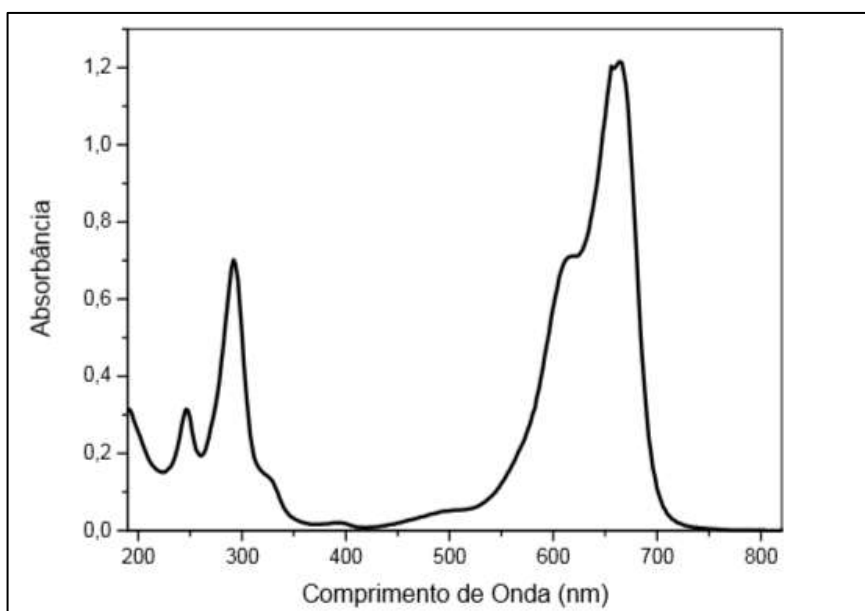


FIGURA 9 - Espectro de absorção no UV-Vis do azul de metileno em solução aquosa de  $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em pH 5,5.  
Fonte: ALMEIDA (2005).

Sintetizando, pode-se dizer que, o azul de metileno, apresenta-se nas seguintes formas (ALMEIDA, 2005):

- Mistura de monômeros e dímeros: em soluções aquosas com concentrações de  $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  a  $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .
- Mistura de dímeros e trímeros: em soluções aquosas com concentrações de  $5 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$  a  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .
- Preferencialmente trímeros: em soluções aquosas com concentrações acima de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .

O espectro do dímero apresenta pico em 605 nm e em 697 nm. Os espectros do monômero protonado e do trímero têm comprimentos de onda máximos em 741 nm e 580 nm, respectivamente (ALMEIDA, 2005).

O pH influencia a dissociação do azul de metileno em meio aquoso, no intervalo de pH de 1 a 11 o corante encontra-se na forma de monômero em soluções diluídas. Em soluções concentradas deve ser levada em consideração a tendência de aglomeração, tornando o sistema mais complexo (ALMEIDA, 2005).

A estrutura do azul de metileno em diferentes valores de pH é mostrada na Figura 10.

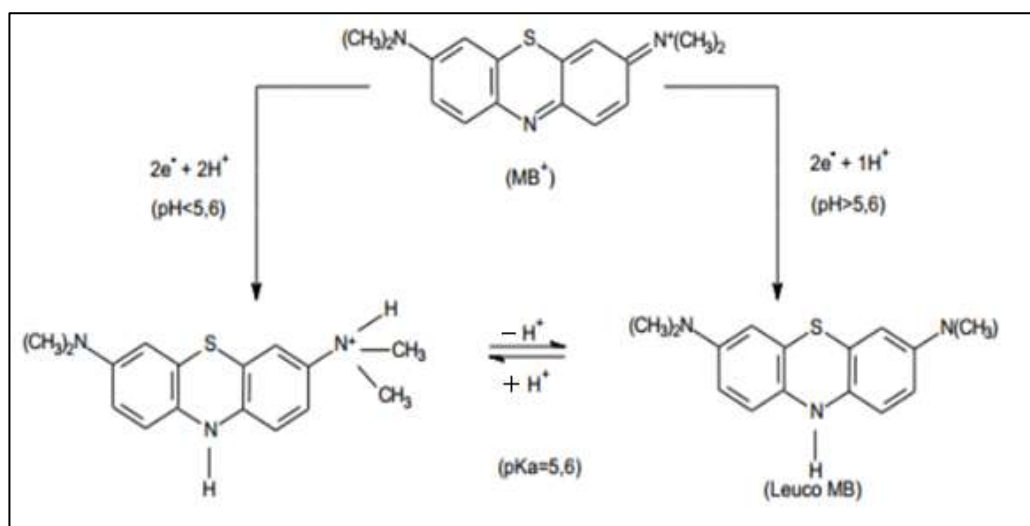


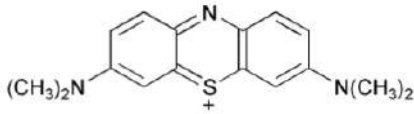
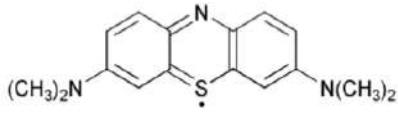
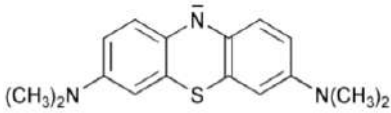
FIGURA 10 - Esquema do comportamento do azul de metileno em diferentes valores de pH. Fonte: Adaptado de SCOTTI et al. (2006).

Segundo Impert *et al.* (2002) a forma reduzida de azul de metileno (forma leuco) é incolor na ausência de oxigênio, porém é facilmente reoxidada por oxigênio

a azul de metileno, ou seja, sua forma original e colorida. Tendo recente aplicação como componente fundamental de uma extensa variedade de sensores óticos de oxigênio utilizados na indústria alimentar para embalagem de alimentos sob uma atmosfera modificada de nitrogênio ou dióxido de carbono.

As estruturas e as características espectroscópicas UV-Vis do azul de metileno e das suas formas reduzidas comuns são apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4: Estrutura e absorção UV- Vis características de azul de metileno e suas formas reduzidas comuns.

Espécies	Estrutura	Abreviação	pK <sub>a</sub>	λ <sub>máx</sub> (nm)
Azul de Metileno		AM <sup>+</sup>	0	660; 614; 292
Azul de Metileno semi-reduzido		AM <sup>•</sup>	-3; 2; 9	420
Azul de Metileno (forma Leuco)		AML	4,5; 5,8; 1,7	256

Fonte: Adaptado de IMPERT *et al*, 2002.

Segundo Hunger (2003), o corante azul de metileno é frequentemente utilizado na produção de papel e outros materiais como poliésteres e nylons.

Alguns corantes básicos possuem atividade biológica e são utilizados como anti-sépticos, um exemplo é a aplicação do azul de metileno em medicações indicadas para todas as infecções e inflamações agudas e crônicas das vias urinárias. O azul de metileno apresenta em sua composição a estrutura da fenotiazina, composto que está presente em antihistamínicos e antipsicóticos (HUNGER, 2003; LABORATÓRIO GROSS S.A., 2015).

### III.3 - Efluentes da Indústria Têxtil

O setor têxtil tem gerado grandes volumes de efluentes, sendo taxado atualmente como o mais poluente entre os setores industriais, devido não só ao volume gerado, mas também pela composição dos efluentes. Estes efluentes podem

causar graves problemas de contaminação ambiental (VANDEVIVERE; BIANCHI; VERSTRAETE, 1998; KUNZ *et al.*, 2002).

Além do efeito visual e tóxico dos corantes, os efluentes apresentam alta carga orgânica, ou seja, elevada DQO (demanda química de oxigênio) e muitos corantes são carcinogênicos e mutagênicos (PODGORNIK; POLJANSEK ; PERDIH, 2001; ACEMIOGLU, 2004).

A caracterização dos efluentes têxteis se torna complexa, devido à variedade de compostos utilizados nos diversos processos de beneficiamento das fibras têxteis, e conseqüentemente torna problemático o controle da poluição causada nos ambientes aquáticos por tais efluentes (PERES; ABRAHÃO, 1998). A natureza do efluente têxtil depende dos tipos de fibras e compostos químicos utilizados, assim como da tecnologia e dos processos industriais empregados. É considerável o consumo de água nesse setor, justificado pelas operações de lavagem, tingimento e acabamento dos tecidos (LEÃO *et al.*, 2002).

O maior problema no tratamento de efluentes têxteis concentra-se na presença de corantes, ainda que os efluentes apresentem também outros compostos, como agentes engomantes, ácidos orgânicos e inorgânicos e vários compostos orgânicos (PELEGRINI *et al.*, 2005).

### **III.3.1 - Tratamento de Efluentes Têxteis**

Os tratamentos de efluentes podem ser divididos em primários, secundários, terciários e avançados. Os tratamentos primários, de maneira geral, possibilitam a remoção de sólidos suspensos e matéria orgânica. Os tratamentos secundários removem principalmente sólidos suspensos e matéria orgânica biodegradável. Os tratamentos terciários e avançados combinam operações para fins específicos, geralmente aplicados com o objetivo de reciclagem de água e produtos (BELTRAME, 2000).

O Quadro 12 apresenta síntese dos processos de tratamento de efluentes.



QUADRO 12: Processos de tratamento de efluentes industriais.

<b>Tratamento</b>	<b>Tipo de Processo</b>	<b>Operação Unitária</b>
Primário	Físico	Equalização Gradeamento Clarificação/sedimentação Flotação
	Químico	Neutralização Coagulação/sedimentação
Secundário	Biológico	Lodos ativados Filtros biológicos Lagoas de estabilização
	Físico/Químico	Carvão ativado
Terciário	Químico	Coagulação/precipitação Ozonização Cloração
	Físico	Clarificação (carvão ativado) Ultrafiltração
Avançado	Físico	Osmose reversa Evaporação

Fonte: Adaptado de BELTRAME, 2000.

Os processos de tratamento mais empregados na indústria têxtil nacional são os primários e secundários, isto é, os tratamentos físico-químicos e biológicos. Os tratamentos terciários e avançados ainda são pouco empregados, devido ao maior custo, justificado por tecnologias mais avançadas (BELTRAME, 2000).

Diversos processos têm sido propostos para o tratamento de efluentes corados, como precipitação, floculação, coagulação, que apresentam elevada eficiência na remoção de material particulado, contudo ainda mostram-se deficientes para descoloração. Os tratamentos que envolvem adsorção com carvão ativado são significativamente eficientes, entretanto apresentam limitações na adsorção de corantes catiônicos, devido à superfície do carvão ser positiva.

Os processos citados anteriormente correspondem a métodos não destrutivos, o que representa considerável desvantagem, uma vez que, ainda que o volume de resíduos seja diminuído, a disposição das fases sólidas continua a ser uma questão sem solução.

A partir do Quadro 13 é possível observar algumas vantagens e desvantagens de alguns métodos que podem ser empregados no tratamento de efluentes têxteis.

QUADRO 13: Vantagens e desvantagens dos métodos de tratamentos de efluentes têxteis.

<b>Método</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Desvantagem</b>
Reagente Fenton	Efetiva descoloração de corantes	Geração de lodo
Ozonização	Aplicado no estado gasoso: não há a alteração no volume	Tempo de meia-vida curto (20 min)
Fotoquímico	Não há a produção de lodo	Formação de produtos
Carvão ativado	Boa remoção de uma ampla variedade de corantes	Bem expansivo
Turfa	Bom adsorvente devido à estrutura molecular	Baixas áreas de superfície de adsorção
Lascas de madeira	Boa capacidade de sorção de corantes ácidos	Requerem longos tempos de retenção
Filtração/ membrana	Remove todos os tipos de corantes	Produção de lodo concentrado
Troca iônica	Regeneração: não perde adsorvente	Não é efetivo para todos os corantes
Irradiação	Oxidação efetiva em escala laboratorial	Requer muito oxigênio dissolvido
Biodegradação aeróbica	Remoção de cor associada à de DQO	Tempos longos de retenção; baixa resistência à substâncias recalcitrantes
Biodegradação anaeróbica	Resistência para a maioria das estruturas complexas dos corantes; produção de biogás.	Longo período de aclimação
Biodegradação por algas, bactérias e fungos	Boa eficiência de remoção para pequenos volumes e baixas concentrações; alta especificidade para determinado corante.	Custo elevado; dificuldade na ampliação de escala
Enzimático	Catalisador biodegradável; suporta larga faixa de concentração de corante; ampla faixa de pH e temperatura; não requer aclimação de células e não propicia a formação de lodo.	Custo; estabilidade da enzima por longo tempo de processo.

Fonte: Adaptado de JODICKE (2001 *apud* FREITAS, 2002) e de CRISTÓVÃO (2010).

Os tratamentos biológicos ganham destaque, por serem processos destrutivos, ou seja, degradam as espécies de interesse no efluente. Os sistemas de lodos ativados representam os processos empregados com maior frequência no

tratamento de efluentes têxteis, este sistema apresenta o inconveniente de produzir um grande volume de lodo. A Figura 11 demonstra o esquema de tratamento de efluentes utilizando lodo ativado (KUNZ *et al.*, 2002).

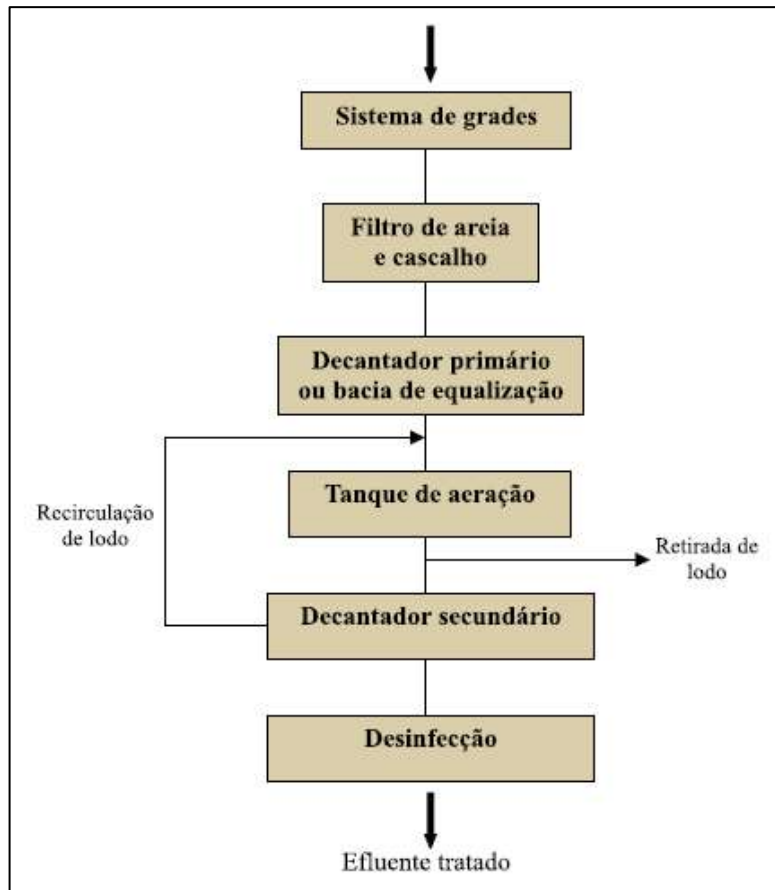


FIGURA 11 - Esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativado tipicamente empregada para tratamento de efluente têxtil.  
Fonte: KUNZ *et al.* (2002).

Geralmente, os processos de tratamento na indústria têxtil são baseados em tratamentos físico-químicos, seguidos de tratamento biológico via lodo ativado, apresentando elevada eficiência, removendo por volta de 80% dos corantes. Contudo, o acúmulo de lodo com alto teor de corantes adsorvidos, impede o reaproveitamento do lodo (KUNZ *et al.*, 2002).

### III.3.1.1 - Tratamentos Físico-Químicos

Tratamentos físico-químicos são apropriados para a remoção de material coloidal, matéria orgânica, cor, turbidez, odor, ácidos, sais, metais pesados e óleos.

Este tratamento também pode eliminar corantes dispersos (BRAILE; CAVALCANTI, 1993; PEREZ; ABRAHÃO, 1998).

O tratamento físico-químico se baseia na desestabilização da matéria coloidal, que representa grande parte dos poluentes do efluente, possibilitando a eliminação dos sólidos dissolvidos e em suspensão (HALLER, 1993).

Os tratamentos físico-químicos mais utilizados, segundo a literatura, em efluentes industriais são os abaixo descritos:

- **Coagulação e Floculação**

O processo de coagulação tem por objetivo aglomerar os poluentes, que se encontram na forma coloidal no efluente, em partículas maiores, de modo que possam ser removidas através de decantação ou filtração. A aglomeração ocorre em consequência de duas ações distintas: pela adição de produtos químicos que neutralizam forças elétricas superficiais e anulam forças repulsivas dos colóides, e pela formação de flocos (floculação) que sedimentam em determinada velocidade.

Os principais agentes coagulantes inorgânicos são o sulfato de alumínio, meta aluminato sódico, cloreto de alumínio, cloreto férrico, sulfato férrico, sulfato ferroso, sulfato cúprico e misturas desses componentes. Cada coagulante possui um ponto isoelétrico ótimo, isto é, um pH ótimo para máxima coagulação (LAGUNAS; LIS, 1998) .

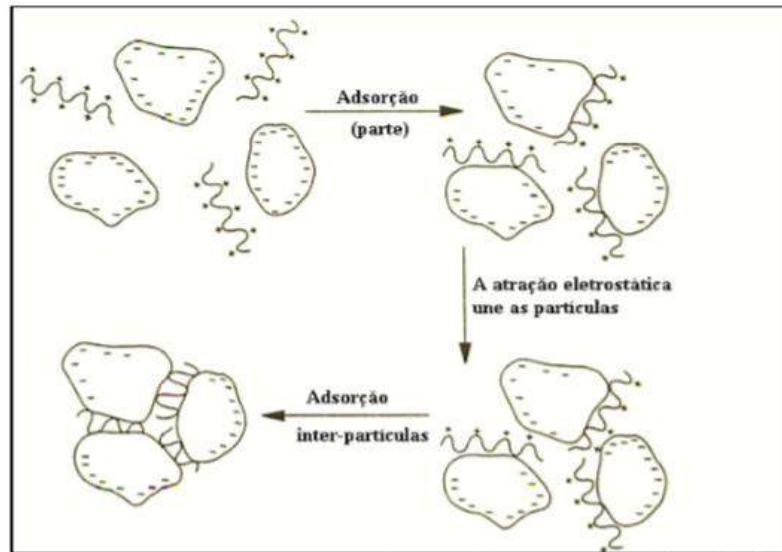


FIGURA 12 - Modelo de coagulação e floculação.  
 Fonte: NORMAN e SEDDON (1991).

- **Sedimentação**

O processo de sedimentação pode ser descrito como a deposição no fundo em consequência da gravidade, deste modo as partículas devem ser mais pesadas que a água, para serem removidas no fundo do lodo. Neste processo ocorre a remoção de 5 a 15% da DBO e 15 a 60% dos sólidos em suspensão (PERES; ABRAHÃO, 1998).

- **Flotação**

O processo de flotação é a separação do material em suspensão com auxílio de pressurização do efluente, permitindo a formação de bolhas que se agregam ao sólido suspenso, levando-o à superfície. Na superfície então, os sólidos são removidos com a ajuda de raspadores (PERES; ABRAHÃO, 1998).

A água obtida após o processo de flotação tem as seguintes características (GELSLECHTER, 2011):

DBO – redução de 55 a 90%

Cor – redução de 90 a 95%

Aspecto – incolor ou levemente colorida

Detergentes – redução de 60 a 70%

Óleos e graxas – redução de 96 a 99%

pH – entre 6.4 e 6.6

### **III.3.1.2 - Tratamentos Biológicos**

O tratamento biológico remove, pela ação de microorganismos, a matéria orgânica dissolvida, parte da matéria inorgânica e sólidos em suspensão. Os tratamentos podem ser realizados de modo aeróbio, como por lodo ativado, lagoa aerada, filtro biológico e anaeróbio, como por biodigestores, lagoas anaeróbias, filtro biológico, ou ainda pela combinação de ambos, a depender do tipo de microorganismo aplicado (GELSLECHTER, 2011).

Corantes têxteis são resistentes à degradação microbiana, então apenas uma pequena parte é degradada em tratamentos biológicos, sendo estes evidentemente ineficientes na descoloração dos efluentes.

O tratamento bioquímico ou biológico se apresenta como uma potencial alternativa para os inúmeros problemas ambientais decorrentes de resíduos industriais. Neste caso, o tratamento pode ser feito por intermédio de microrganismos em condições aeróbias e/ou anaeróbias (FORGIARINI, 2006).

Os tratamentos biológicos mais utilizados, segundo a literatura, em efluentes industriais são os descritos a seguir:

- **Lodo Ativado**

O tratamento de lodo ativado é constituído por massas ativas de microorganismos formadas pela aeração do efluente. Os microorganismos crescem, em razão da estabilização aeróbica da matéria orgânica. Em decantador ocorrem floculação e separação sólido-líquido. Parte do lodo retorna ao biorreator, e a outra parte é descartada, sendo concentrada com utilização de filtro-prensa, centrífuga, ou em leitos de secagem. Os microorganismos presentes no lodo ativado são: bactérias, fungos, protozoários e metazoários (PERES; ABRAHÃO, 1998).

- **Filtros Biológicos**

Este tratamento apresenta o mesmo princípio dos lodos ativados, a diferença ocorre na massa microbiana que se mantém suspensa no processo de lodo ativado, enquanto nos filtros biológicos se encontra fixa em suporte. O filtro é constituído de um meio filtrante e um depósito cilíndrico. É um sistema de tratamento no qual o esgoto passa por um leito recoberto com microorganismos e ar, acelerando o processo de digestão da matéria orgânica.

- **Lagoas Aeradas**

O tratamento em lagoas aeradas submete os efluentes à ação de consórcios de organismos, geralmente, de composição desconhecida, por vários dias. Neste tipo de tratamento, a remoção da toxicidade aguda ocorre com relativa facilidade. Contudo, outros parâmetros relevantes, como cor e toxicidade crônica, não são reduzidos com eficiência. Apresenta alguns problemas relativos a perdas de substratos tóxicos por volatilização e contaminação de lençóis freáticos por percolação (FREIRE *et al.*, 2000).

### **III.3.1.3 - Tratamentos Enzimáticos**

O tratamento de efluentes industriais por enzimas, que são substâncias orgânicas com ação biocatalítica, se apresenta como potencial alternativa e cada vez mais é reconhecido na remediação de poluentes específicos. As enzimas podem atuar em compostos recalcitrantes, removendo-os por precipitação ou transformando-os em outros produtos inócuos (FORGIARINI, 2006; SILVA *et al.*, 2012).

As enzimas podem também alterar as características de um determinado efluente, de modo a aumentar sua biodegradabilidade, ou contribuir na bioconversão dos efluentes. As principais oxirredutases, lacases e peroxidases apresentam potencial no tratamento de diversos compostos orgânicos, inclusive na descoloração de efluentes contendo corantes sintéticos. Estas enzimas atuam catalisando a transformação ou degradação de corantes aromáticos, tanto por precipitação quanto pela ruptura do anel aromático (SILVA *et al.*, 2012).

O Quadro 14 apresenta as principais enzimas com potencial aplicação no tratamento de efluentes corados.

QUADRO 14: Enzimas com Potencial Aplicação no Tratamento de Resíduos Corados.

<b>Enzima</b>	<b>Fonte</b>	<b>Aplicação</b>
Cloro-peroxidase	<i>Caldaromyces fumago</i>	Oxidação de compostos fenólicos
Heme-oxidase	Sangue	Oxidação de fenóis e aminas aromáticas
Lacase	Diversos fungos: <i>Rhizoctonia praticola</i> <i>Fomus annosus</i> <i>Trametes versicolor</i>	Oxidação de fenóis, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft, ligação de fenóis e animais com húmus
Lignina peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Oxidação de fenóis e compostos aromáticos, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft
Manganês peroxidase	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Oxidação de fenóis monoaromáticos e corantes aromáticos
Peroxidase	Raiz forte, tomate, soja, rabanete, <i>Coprinus macrorhizus</i>	Oxidação de fenóis, descoloração de efluentes de branqueamento Kraft, desaguamento de lodo
Tirosinase	Cogumelo	Oxidação de fenóis

Fonte: Adaptado de FORGIARINI, 2006.

Segundo Karam e Nicell (1997) (apud CRISTÓVÃO, 2010), a melhoria de processos de purificação e isolamento por recentes avanços biotecnológicos têm permitido a produção de enzimas mais baratas e disponíveis, além de terem elevadas especificidades e atividades catalíticas. Todas estas vantagens somadas as suas elevadas especificidades e atividades catalíticas com a possibilidade de projetar enzimas com propriedades exatamente desejadas por meio de engenharia genética e design computacional, sugerem potencial aplicação deste processo no tratamento de efluentes.

### III.3.2 - Legislação Ambiental

O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), órgão máximo que rege a legislação ambiental brasileira, estabelece na Resolução 357 de 2005 os padrões de lançamento para efluentes líquidos, a qual, posteriormente, foi complementada e



alterada pela Resolução 430 de 2011. A legislação brasileira estabelece que estados e municípios também possam ter suas próprias legislações, desde que não conflitem com a federal, mesmo sendo mais restritivas (CONAMA, 2005).

O Quadro 15 apresenta alguns dos parâmetros físico-químicos estabelecidos pela legislação federal (CONAMA) e pelas legislações estaduais de São Paulo, Rio de Janeiro, Santa Catarina e Pernambuco (CPRH, 2001).

QUADRO 15: Parâmetros para lançamento de efluentes líquidos têxteis.

Parâmetro	Unidade.	Federal	RJ		SP	SC	PE
		CONAMA 357	DZ-205	NT-202	Dec. Lei 8468	Dec. Lei 14250	Dec. Lei 7269
pH	-	5,0 - 9,0	-	5,0 - 9,0	5,0 - 9,0	6,0 - 9,0	5,0 - 9,0
Sólidos Sedimentáveis	mL/L	1,0	-	1,0	1,0	< 1,0	< 1,0
Sólidos Flutuantes	mg/L	Ausente	-	Ausente	-	-	Ausente
DBO <sub>5,20</sub>	%	-	-	-	Máx. 60 (redução de 80%)	60	-
DQO	mg/L	-	200	-	-	-	-
Cor	mg/L de Pt	75	-	Ausente	-	-	-

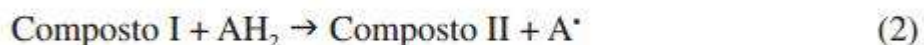
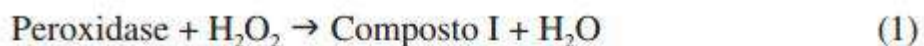
Fonte: CPRH, 2001.

### III.4 – Peroxidases

As enzimas peroxidases (EC.1.11.1.7) foram descobertas pelo cientista alemão Schönbein em 1863. Trata-se de oxidoredutases capazes de catalisar reações de oxidação de um grande número de fenóis e aminas aromáticas mediante presença de peróxido de hidrogênio (SUMNER; SOMERS, 1943).

As peroxidases podem ser divididas em 4 classes quanto à sua origem (bacteriana, fúngica, animal e de plantas), como também quanto à presença do grupo heme (hêmicas e não-hêmicas) (SCHMIDT, 2008). O grupo prostético (de natureza não-protéica) heme confere a estas proteínas uma cor característica e é constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro, no estado ferroso [Fe(II)] (STRYER, 1988). As peroxidases hêmicas catalisam a oxirredução de substratos utilizando o íon de ferro presente no grupo heme, enquanto as peroxidases não-hêmicas (peroxirredoxinas) utilizam cisteínas com atividade redox em seu centro ativo (SCHMIDT, 2008).

A catálise da transformação/degradação de corantes pode ocorrer por meio de precipitação ou ruptura do anel aromático, sendo o ciclo catalítico descrito abaixo (SILVA *et al.*, 2012):



No primeiro estágio do ciclo catalítico da peroxidase, ocorre a reação do sítio ativo da enzima com o peróxido de hidrogênio. Nesta etapa, o peróxido de hidrogênio é reduzido, formando água e o composto I. Este composto é uma forma intermediária reativa que apresenta um estado de oxidação mais elevado se comparado à enzima nativa. No segundo estágio, o composto I oxida uma molécula de substrato (AH<sub>2</sub>), neste caso o corante aromático, gerando uma espécie radicalar e o composto II. Por fim, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato, fazendo com que a enzima retorne a sua forma inicial. Na última etapa do ciclo catalítico, há a formação de radicais livres (AH·) que se difundem do sítio ativo da enzima para o meio da solução. Esses radicais são altamente reativos e tendem a iniciar uma reação espontânea em cadeia (SILVA *et al.*, 2012).

#### III.4.1 – *Horseradish Peroxidase*

A *Horseradish* (*Armoracia rusticana*) é uma planta perene pertencente ao gênero botânico a que pertence a raiz-forte. É cultivada em regiões temperadas e relativamente em larga escala, principalmente devido ao seu valor culinário e como componente de kits de diagnóstico clínico e para imunoenaios. Essa planta também é rica em peroxidase, enzima que em presença de peróxido de hidrogênio é capaz de oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Sendo esta enzima denominada *horseradish peroxidase* (HRP) ou peroxidase de raiz forte (VEITCH, 2004).

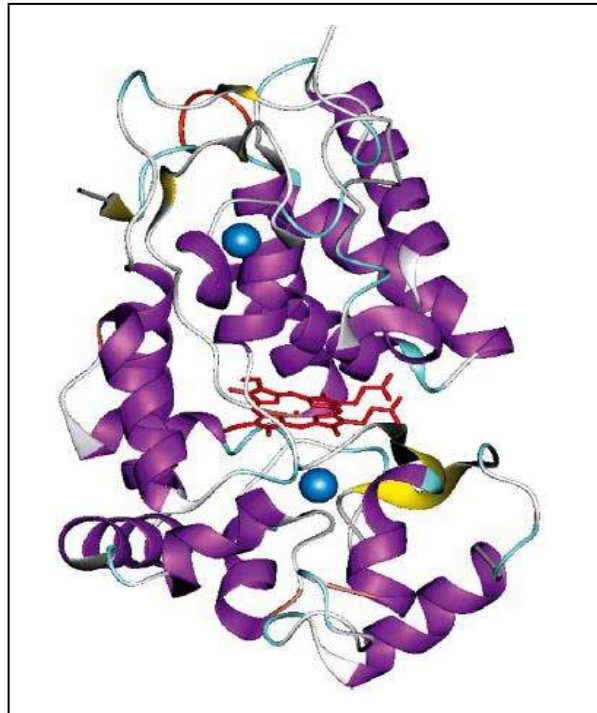


FIGURA 13 - Representação em 3D por cristalografia de raios-X da HRP isoenzima C. O grupo heme (vermelho) está localizado entre os átomos de cálcio (esferas azuis).  
Fonte: VEITCH (2004).

A HRP é uma glicoproteína globular que possui aproximadamente 81,0% de sua massa molar protéica (apoenzima) e o restante prostético (tipo *heme*) (Figura 13). O grupo heme possui um cofator (átomo de ferro) fortemente ligado ao sítio ativo da enzima (Figura 14). Este cofator encontra-se ligado a uma molécula de porfirina (anel orgânico heterocíclico) (FORGIARINI, 2006).

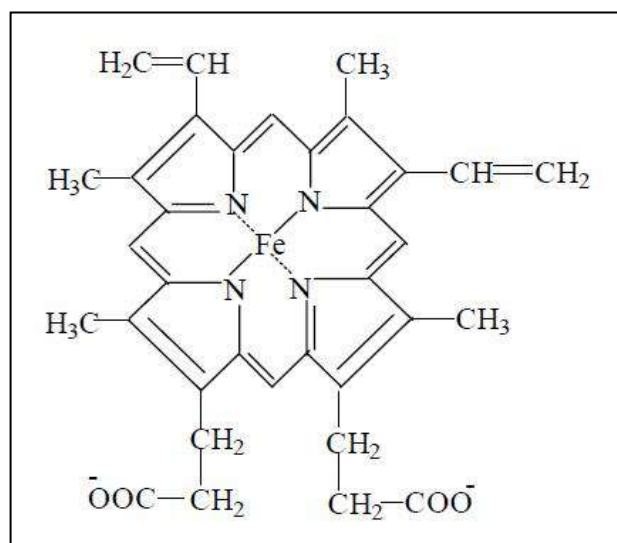


FIGURA 14 - Grupo prostético (heme) da HRP.  
Fonte: VEITCH (2004).

O grupo heme possui em seu entorno diversos resíduos de aminoácidos (Figura 15) que possuem determinadas funções dentro do ciclo catalítico da enzima. Como por exemplo: Arg 38 e His 42 que são essenciais na formação e estabilização do composto I (visto anteriormente) e ligação e estabilização de ligantes e substratos aromáticos e Phe 41, que previne o acesso do substrato ao ferro duplamente ligado ao oxigênio no composto I.

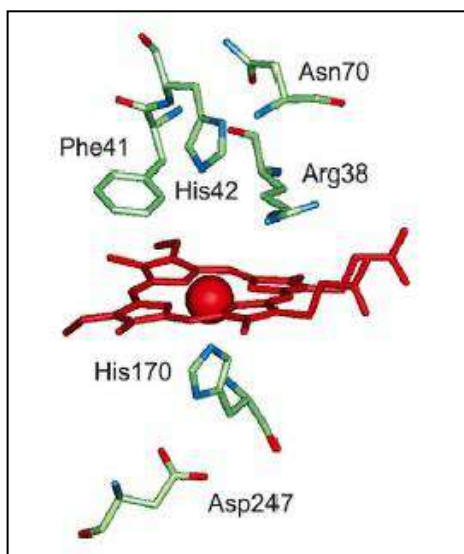


FIGURA 15 - Principais resíduos de aminoácidos do grupo prostético (heme).  
Fonte: VEITCH (2004).

Já foram identificadas e classificadas (ácidas, neutras e básicas) mais de 40 isoenzimas. Embora elas catalisem as mesmas reações, suas propriedades físico-químicas e cinéticas são bastante diferentes. No entanto, as enzimas utilizadas comercialmente são convencionalmente consideradas como se constituídas por apenas uma isoenzima ou que as atividades das isoenzimas são praticamente as mesmas, de forma que individualmente nenhuma interfira na atividade total (VEITCH, 2004).

Muitos estudos vem mostrando o uso potencial da HRP no tratamento de efluentes corados, assim como foi demonstrado que a imobilização enzimática melhora a performance da enzima quando comparada à sua forma livre. (BOURDILLON; BELEY, 1983; OLSSON; OGREN, 1983; VEITCH, 2013; KUMAR E GANESH, 2014)

### III.5 - Técnicas de Imobilização de Enzimas

Os catalisadores biológicos tem tido uma ampla participação tecnológica em diversos setores, tais como farmacêutico, têxtil, bioquímico, entre outros. No entanto, a enzima apresenta algumas restrições de utilização, como por exemplo, a sua relativa instabilidade, os altos custos de isolamento, a dificuldade técnica em se recuperar a enzima ativa após a reação quando esta é realizada em solução com a enzima em sua forma livre (BRENA *et al.*, 2006), bem como problemas de seletividade e inibição pelo meio ou pelo produto. (MATEO *et al.*, 2007). Para contornar estas problemáticas, a utilização de sistemas enzimáticos imobilizados tem sido cada vez mais objeto de interesse (Quadro 16), principalmente no que diz respeito à viabilidade econômica em aplicação em larga escala, devido ao aumento da estabilidade química e térmica da enzima nesta condição. (FORGIARINI, 2006).

Quadro 16: Evolução cronológica no estudo de enzimas imobilizadas.

Passo	Ano	Aplicação
Primeiro	1815	O uso empírico em processos tais como o ácido acético e o tratamento de águas residuais.
Segundo	1960s	Imobilização de uma única enzima: produção de L-aminoácidos, isomerização de glicose, etc.
Terceiro	1985-1995	Imobilização de várias enzimas incluindo a regeneração do cofator e imobilização celular.
Quarto	1995 – dias atuais	Desenvolvimentos multidisciplinares e aplicações para diferentes linhas de pesquisa e setores da indústria.

Fonte: Adaptado de BRENA *et al.*, 2006.

Brena *et al.*(2006) classificou os métodos de imobilização enzimática em dois grandes grupos: reversíveis e irreversíveis. Os métodos reversíveis incluem: adsorção ao suporte e via ligações dissulfeto (S-S). Já as irreversíveis são: aprisionamento, ligação cruzada (crosslinking) e por ligação covalente ao suporte. Conforme mostra o esquema a seguir:

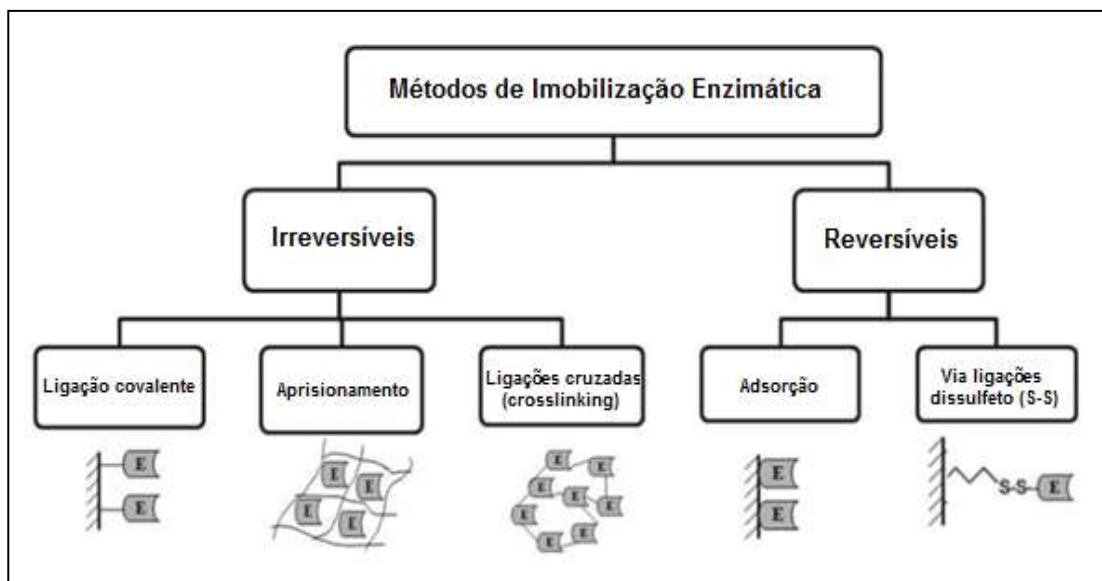


FIGURA 16 - Métodos de imobilização enzimática.  
Fonte: BRENA *et al.* (2006).

### III.5.1 – Métodos Irreversíveis de Imobilização

#### III.5.1.1 – Ligação Covalente ao Suporte

Método convencional para imobilização enzimática que se baseia na ligação covalente entre a enzima e o suporte. A ligação covalente é forte e estável e o material do suporte inclui poliacrilamida, vidro poroso, agarose, entre outros. Este método é utilizado principalmente quando não é necessária a presença da enzima no produto (GOBI *et al.*, 2012). A ligação é geralmente formada entre um grupo funcional, ativado por reagentes específicos (Tabela 5), presente na superfície do suporte e um grupo nucleofílico da enzima, o qual não é essencial para a atividade catalítica (D'SOUZA, 1999).

TABELA 5: Métodos de ligação covalente da enzima com o suporte: ativação da função hidroxil da matriz.

Método de Ativação	Grupo que Reage (com a Matriz Ativada)
Tresyl chloride, sulfonyl chloride	Tiol, amina
Brometo de Cianogênio	Amina
Bis oxiranos (epóxidos)	Tiol, Amina
Epicloridrina	Tiol, Amina
Glutaraldeído	Amina
Glicidol-Glioxil	Amina
N-Hydroxysuccinimidil	Amina

FONTE: Adaptado BRENA *et al.*, 2013.

A conexão entre o suporte e biocatalisador pode ser conseguida tanto por ligação direta quanto via ligação intercalada com comprimentos diferentes, por meio dos chamados espaçadores (Figura 17). A vantagem do uso de moléculas espaçadoras está no maior grau de mobilidade da enzima, que em determinadas condições pode apresentar maior atividade do que se fosse ligada diretamente ao suporte (COSTA *et al.*, 2005).

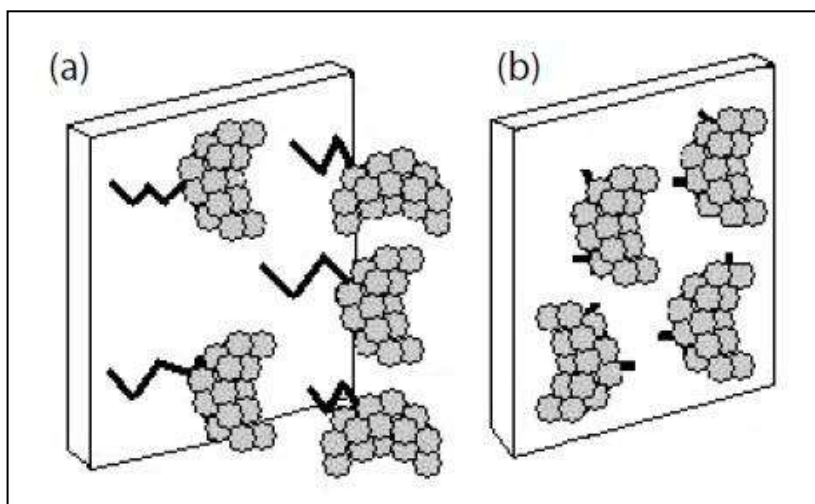


FIGURA 17 - Ligação covalente entre a enzima e o suporte com (a) e sem (b) espaçador.  
Fonte: COSTA *et al.* (2005).

### III.5.1.2 – Imobilização por Aprisionamento

Este método consiste na retenção da enzima em uma matriz polimérica, de forma que esta matriz permita que o substrato e os produtos passem por ela e a enzima continue retida. Neste caso, a enzima não está ligada a matriz ou membrana (BRENA *et al.*, 2013). Na verdade, esse aprisionamento pode ser obtido misturando a enzima com um polímero e depois reticulá-lo, de modo que este mude a sua estrutura e retenha a enzima. Já as enzimas microencapsuladas são formadas colocando-se uma solução enzimática dentro de uma membrana polimérica esférica semipermeável com controle de porosidade. (COSTA, *et al.*, 2005).

Os métodos de aprisionamento demandam que o tamanho dos poros da matriz escolhida seja bem reduzido, acarretando limitações na transferência de massa desses sistemas. Existem diversas matrizes utilizadas para a retenção da enzima, tais como géis, fibras e encapsulamento em menores escalas (Figura 18) (BRENA *et al.*, 2013).

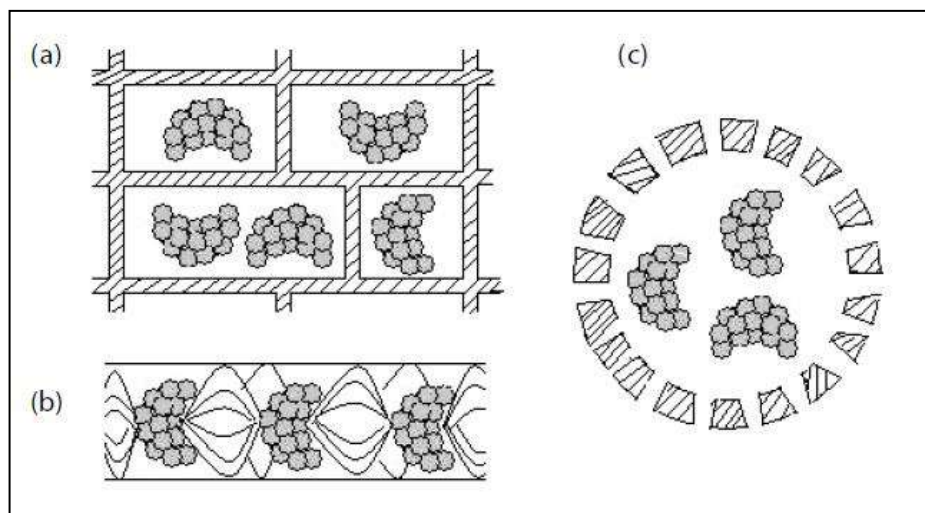


FIGURA 18 - Enzima imobilizada em uma matriz (a), fibra (b) e cápsula (c).  
 Fonte: COSTA *et al.* (2005).

### III.5.1.3 – Imobilização por Ligações Cruzadas (Crosslinking)

Este método se baseia na formação de ligações covalentes entre as enzimas por intermédio de reagente bi ou multifuncionais. A ligação cruzada (Figura 19a) entre enzima geralmente envolve o grupo amino da lisina, mas em alguns casos pode envolver os grupos sulfidríla da cisteína, hidroxila da tirosina ou imidazol da histidina. Há também a ligação co-cruzada, onde moléculas inertes são incorporadas a matriz polimérica a fim de melhorar a mecânica e a preparação da imobilização enzimática (Figura 19b). A maior vantagem deste método é a simplicidade do processo e as principais desvantagens são as limitações difusionais e perda de atividade enzimática, uma vez que a ligação cruzada e a ligação co-cruzada envolvem ligações covalentes que podem alterar a conformação da enzima (COSTA *et al.*, 2005)



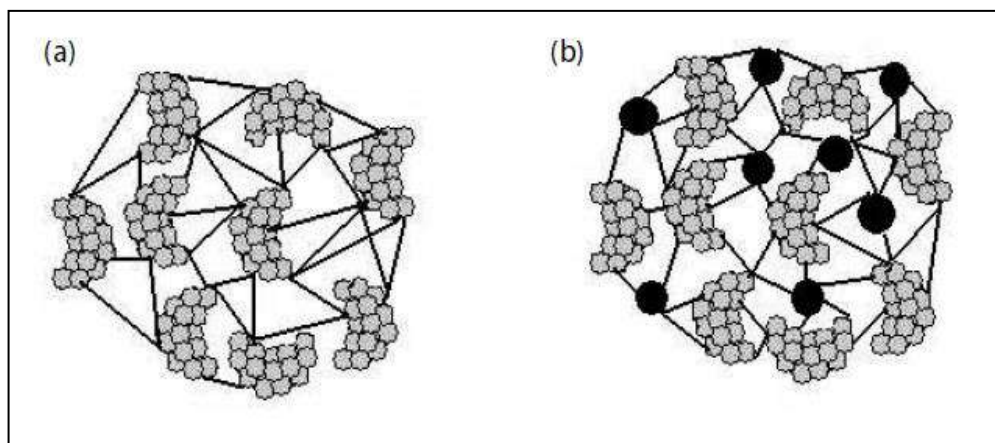


FIGURA 19 - Biocatalisadores immobilizados por ligação cruzada (a) e por ligação co-cruzada com moléculas inertes incorporadas (b).  
 Fonte: COSTA *et al.* (2005).

### III.5.2 – Métodos Reversíveis de Imobilização

#### III.5.2.1 – Adsorção ao Suporte

É o método mais simples de imobilização enzimática, pode ser feito por meio de adsorção física ao suporte (Figura 20) ou por meio de ligações iônicas (Figura 21) na superfície do suporte. A adsorção física pode ser obtida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou força de Van der Waals. Embora o método seja simples e com baixo custo operacional, por ser um método reversível, a interação entre a enzima e o suporte pode ser facilmente desfeita em determinadas condições que influenciam na força de ligação, como por exemplo, pH, temperatura, polaridade do solvente, entre outros (BRENA *et al.*, 2013).

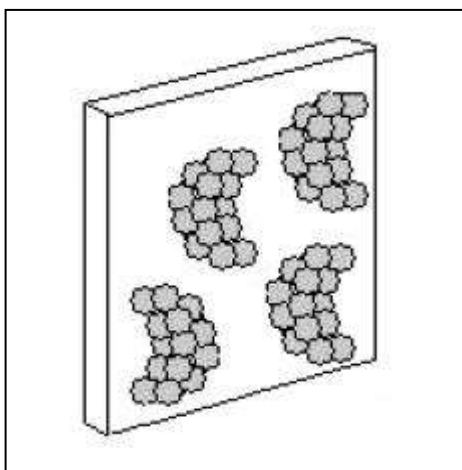


FIGURA 20 - Biocatalisador ligado ao suporte por adsorção física.  
 Fonte: COSTA *et al.* (2005).

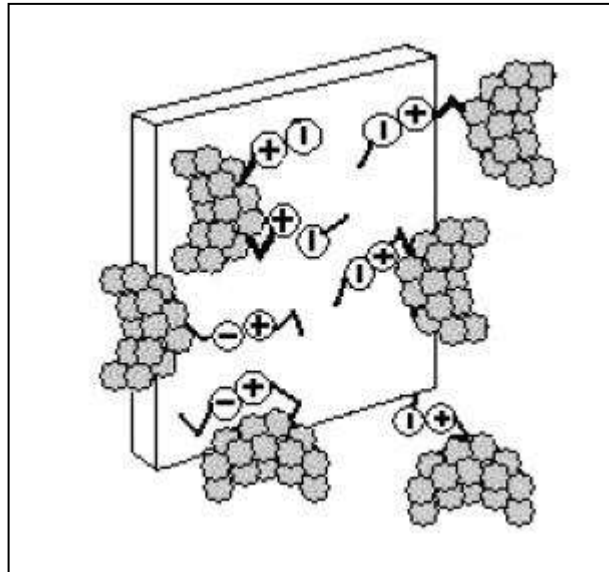


FIGURA 21 - Biocatalisador ligado ao suporte por ligação iônica.  
Fonte: COSTA *et al.* (2005).

### III.5.2.2 – Via Ligações Dissulfeto (S-S)

Este método é baseado na formação de uma ligação dissulfeto entre a matriz e a enzima. Embora esta seja uma ligação covalente estável, ela pode clivada com o uso de agentes redutores comuns. Mas esse é um método onde o rendimento de atividade é frequentemente alto (BRENA *et al.*, 2013).

## CAPÍTULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS

### IV.1 - Tratamento da *Horseradish Peroxidase* (HRP)

A enzima utilizada neste trabalho foi a *horseradish peroxidase* (HRP), gentilmente cedida pela Toyobo do Brasil LTDA, em sua forma liofilizada e com concentração 8,0 MU/Kg, cujas propriedades estão descritas na Tabela 6. A purificação foi realizada mediante adaptação do método recomendado pelo fabricante (TOYOBO DO BRASIL LTDA, 2012).

TABELA 6: Propriedades da enzima *horseradish peroxidase*.

Estabilidade	Estável a -20°C
Massa Molecular	~40,0000 kDa
pH ótimo	6 - 7
Temperatura ótima	45 °C
Estabilidade em pH	5,0 -10,0

Fonte: TOYOBO DO BRASIL, 2012.

A enzima veio misturada a terra diatomácea que funciona como um auxiliador filtrante. Fora pesada 4,0 g dessa mistura e suspensa em tampão fosfato pH 7,0. A suspensão foi filtrada em papel de filtro grau qualitativo (INLAB) de porosidade 6 µm e o filtrado foi tratado com membrana de diálise.

A membrana utilizada foi a membrana de diálise SPECTRUM® com espessura de parede 25 mm, diâmetro 16 mm e faixa de massa molar 12-14 kDa. O sistema foi imerso em água destilada em um becker de 4.000 mL (Figura 22), sendo a água trocada 3 vezes ao dia, e mantido sob refrigeração durante 3 dias. Por fim, a solução intramembranar foi recolhida e distribuída em diferentes volumes em diversos tubos Eppendorf® e armazenada em freezer (ALHADEFF, 2005).

Cada alíquota foi descongelada apenas uma vez, para medida de atividade enzimática, dosagem de proteína e nas reações de descoloração, a fim de minimizar o impacto de constantes variações de temperatura sobre a enzima.

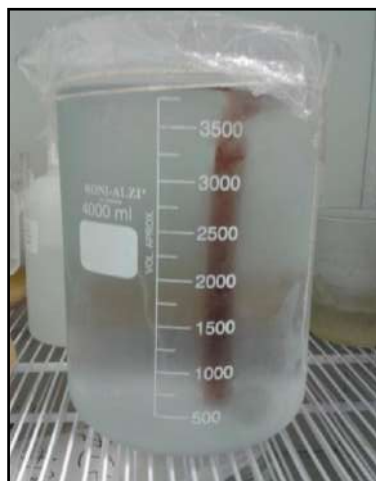


FIGURA 22 - Tratamento enzimático com membrana de diálise.

## IV.2 - Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi avaliada pelo método da 4-aminoantipiridina (Nicell e Wright, 1997). Foram adicionados sequencialmente 200  $\mu$ L do reagente fenólico (fenol 0,2 M), 3 mL de tampão fosfato pH 7,0, 200  $\mu$ L de 4-aminoantipirina e 400  $\mu$ L de  $H_2O_2$  ( $2 \times 10^{-3}$  M) para a leitura do branco no espectrofotômetro. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L da solução de HRP (diluída 400 vezes), e feita a leitura em triplicata no espectrofotômetro a 510 nm, durante 1,0 minuto (NICELL; WRIGHT, 1997).

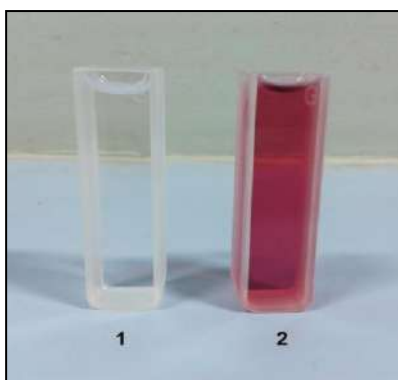


FIGURA 23 - Determinação de atividade enzimática - (1) Branco e (2) Complexo Vermelho Formado.

O método baseia-se na proporcionalidade entre coloração formada (Figura 23) e o consumo de peróxido de hidrogênio, sendo este segundo proporcional a HRP ativa no ensaio (BASTOS, 2014).

O complexo avermelhado (antipirilquinonimina) é formado conforme a equação a seguir:



Para o cálculo da atividade enzimática (em U/mL) conforme a Equação 2 (NICELL; WRIGHT, 1997) considerou-se uma unidade de atividade enzimática como sendo a taxa de consumo de peróxido de hidrogênio (em  $\mu\text{mol}$ ) durante 1,0 minuto de reação. A taxa de consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi acompanhada pela absorbância do complexo vermelho formado pela reação entre o radical hidroxila do fenol e a 4-aminoantipirina (BASTOS, 2014). A absorbância foi medida no espectrofotômetro UV (SHIMADZU UV SPECTROPHOTOMETER – Modelo UV-1800).

$$A \left( \frac{U}{mL} \right) = \left[ \frac{a \cdot V_c}{L \cdot \epsilon \cdot V_a} \right] \cdot f_D \cdot 60 \quad (2)$$

Onde:

A = atividade enzimática

a = coeficiente angular da reta ( $\Delta\text{absm/s}$ )

$V_c$  = volume total colocado na cubeta

L = largura da cubeta

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar ( $7.210 \text{ L/mol.cm}$ ) (NICELL; WRIGHT, 1997)

$V_a$  = volume da amostra

$f_D$  = fator de diluição

60 = conversão unidade de tempo

### IV.3 - Dosagem de Proteína

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O método consiste na interação entre o corante e os aminoácidos da proteína. Esta interação provoca o deslocamento do equilíbrio de reação, de modo que o corante se apresente em sua forma aniônica, que absorve fortemente no comprimento de onda de 595 nm (ZAIA *et al.*, 1998). Foram adicionados em sequência 40  $\mu\text{L}$  de amostra, 3,13 mL de água destilada e 800  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford e a absorbância foi lida após 5 minutos em espectrofotômetro a 595 nm (PEREIRA, 2014). No entanto, o preparo do reagente de Bradford implicou em uma dificuldade

de se manter a reprodutibilidade dos resultados. Com isso, para leituras posteriores foi utilizado o reagente de Bradford comercial da SIGMA®. Neste caso, foram adicionados 100 µL da amostra diluída e 3 mL do reagente, com a absorbância medida após 5 minutos de reação. Para o cálculo da concentração de proteína, foram feitas duas curvas padrão com albumina em diferentes concentrações e suas respectivas absorbâncias médias. Sendo o cálculo da concentração de HRP feito conforme a Equação 3 a seguir.

$$[HRP] = \frac{absm}{a} * f_D \quad (3)$$

Onde:

a = coeficiente angular da curva padrão de albumina

f<sub>D</sub> = fator de diluição da amostra

#### **IV.3.1 - Preparo do Reagente de Bradford**

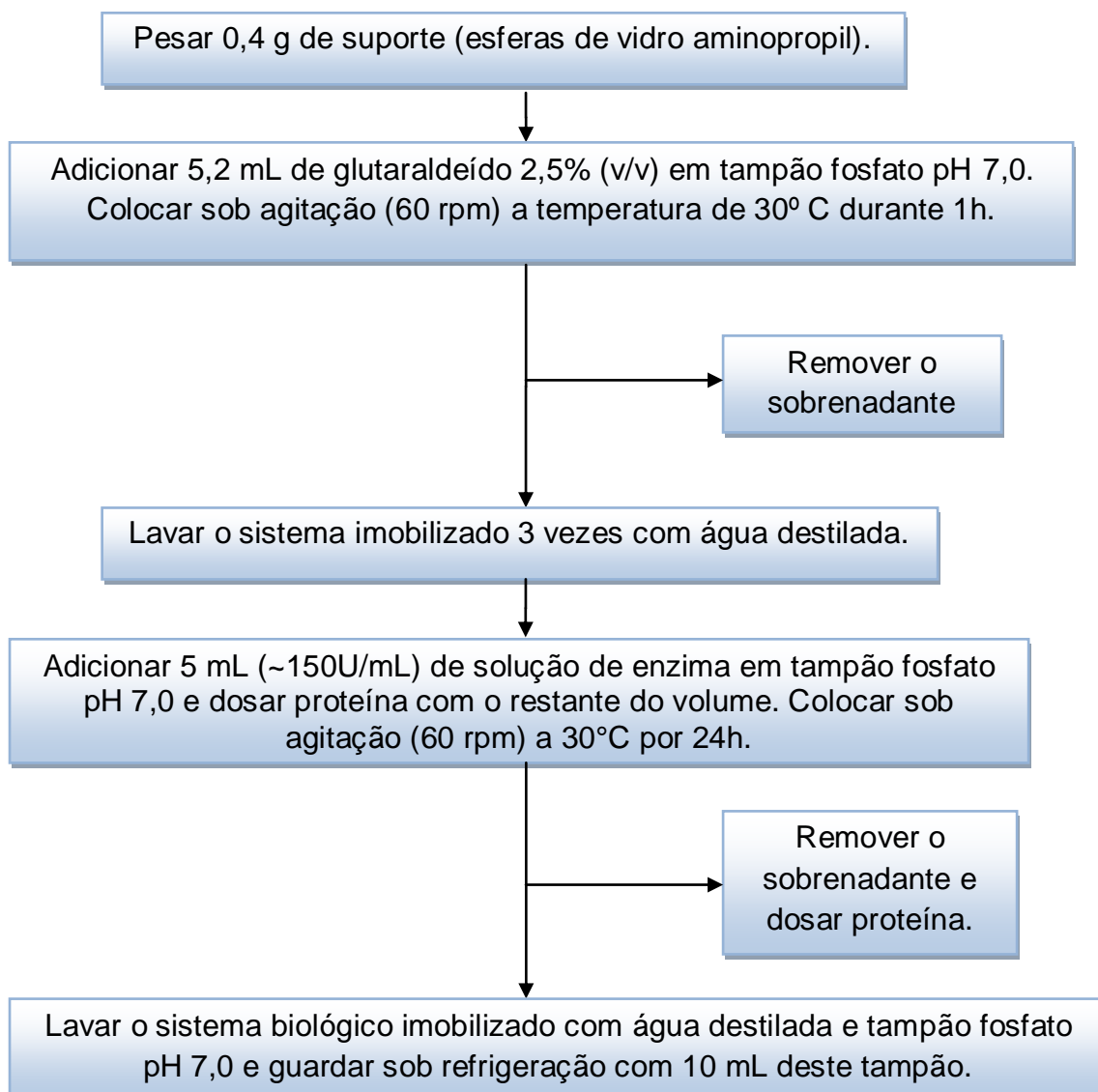
Primeiramente, foram dissolvidos 100 mg de Azul de Coomassie Azul G-250 (C<sub>47</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>S<sub>2</sub>) em 50 mL de etanol 95% e adicionados 100 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% (p/v), sendo esta solução avolumada para um volume final de 1.000 mL. Por fim, a solução foi filtrada 2 vezes em papel de filtro comum (BRADFORD, 1976).

#### **IV.3.2 - Preparo da Curva Padrão**

À partir de solução de albumina 1 mg/mL, foram preparadas as seguintes concentrações em tampão fosfato pH 7,0: 10, 50, 100, 150, 200 e 250 mg/L para a primeira curva padrão. Para a segunda, as concentrações foram de 250, 500, 750, 1.000 e 1.400 mg/L, conforme recomendação do fabricante (VETEC Química Fina®).

#### **IV.4 - Imobilização em Esferas de Vidro (aminopropil)**

A imobilização da *horseradish peroxidase* foi feita em micro esferas vidro aminopropil, conforme técnica descrita por Alhadeff (2005) adaptada no diagrama a seguir:



Foram utilizadas esferas de vidro (aminopropil) de porosidade 700 Å e 80-120 mesh. Para ativação dos grupos funcionais do suporte, fora utilizado glutaraldeído 2,5% (v/v), que introduz um grupo carbonila passível de reagir com os grupos nucleofílicos da enzima. (ZAIA *et al.*, 1998). Esse processo resulta em uma mudança de cor das esferas, conforme mostra a figura a seguir.

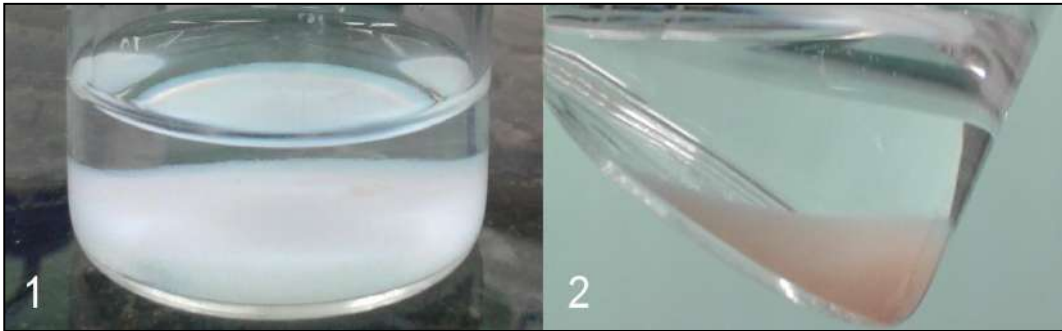


FIGURA 24 - Ativação das esferas de vidro. (1) início da reação com glutaraldeído 2,5% (v/v) e (2) após 1h de reação a 60 rpm.

A eficiência de imobilização foi calculada com os valores de concentração de proteína antes e após a imobilização, obtidos pelo método de Bradford, conforme a equação a seguir:

$$\text{Eficiência de imobilização (\%)} = \left( \frac{\text{Conc.antes} - \text{Conc.depois}}{\text{Conc.antes}} \right) * 100 \quad (4)$$

#### IV.5 – Reações Enzimáticas com o Corante Azul de Metileno

Todas as reações enzimáticas com o corante azul de metileno foram realizadas em um becker com volume final de solução 10 mL, contendo o corante, o respectivo tampão e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (colocados nesta sequência) em concentrações pré-definidas. As reações tiveram duração de 1 a 3h, com agitação constante de 60 rpm e 30°C (PEREIRA, 2014) na incubadora de bancada CIENTEC (modelo CT-712), conforme a Figura 25. As absorbâncias antes e depois da reação foram medidas no espectrofotômetro UV (SHIMADZU UV SPECTROPHOTOMETER – Modelo UV-1800) a 660 nm.





FIGURA 25 – Sistema para a reação da enzima imobilizada com o corante azul de metileno.

Primeiramente foram feitas reações teste (3 ciclos) com a *horseradish peroxidase* imobilizada em tampão fosfato pH 7,0 e concentração de Azul de metileno e peróxido de hidrogênio 10 e 6 mg/L, respectivamente. Estes valores foram baseados no trabalho anterior de Bastos (2014). O cálculo do percentual de descoloração foi feito conforme a Equação 5 (BASTOS, 2012):

$$\% \text{ descoloração} = \left( \frac{Absm \text{ inicial} - Absm \text{ final}}{Absm \text{ inicial}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Em seguida, foram feitos mais três ciclos com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de azul de metileno com a melhor configuração sugerida pelo planejamento experimental (visto posteriormente), mas mantendo a reação em pH 7,0.

#### IV.6 – Planejamento Experimental pelo Software STATISTICA®

Foi feito um planejamento experimental utilizando o software STATISTICA® a fim de investigar a condição ótima de operação, ou seja, a condição em que seja possível alcançar o maior percentual de remoção do corante. O planejamento utilizou o modelo fatorial fracionário (2<sup>k-p</sup>) com 3 pontos centrais, 3 variáveis dependentes, 3 variáveis independentes e p=1 (premissa assumida). (CALADO; MONTGOMERY, 2003). As variáveis independentes foram pH variando de 4 a 8,

concentração de corante (Azul de metileno) variando de 5-20 mg/L e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variando de 2 a 10 mg/L, sendo os experimentos propostos pelo software estão apresentados na Tabela 7. A determinação da faixa de concentração de Azul de metileno foi feita mediante a construção de uma curva padrão com as concentrações variando de 2,5 a 40 mg/L (Figura 30) e a absorbância lida em espectrofotômetro a 660 nm (NICELL; WRIGHt, 1997).

TABELA 7: Planejamento experimental sugerido pelo software STATISTICA®.

<b>Experimento</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg/L)</b>	<b>Corante (mg/L)</b>	<b>pH</b>
<b>1</b>	6,0	12,5	6,0
<b>2</b>	6,0	12,5	6,0
<b>3</b>	10,0	20,0	8,0
<b>4</b>	6,0	12,5	6,0
<b>5</b>	2,0	20,0	4,0
<b>6</b>	2,0	5,0	8,0
<b>7</b>	10,0	5,0	4,0

Após a realização dos experimentos sugeridos pelo planejamento, outras reações, com intervalo de sete dias, foram realizadas a fim de verificar a quantidade máxima de ciclos possíveis de serem feitos com a enzima mantendo um bom percentual de descoloração na melhor condição investigada pelo planejamento experimental.

#### **IV.7 – Reações em Sistema Contínuo**

Foram feitas reações para avaliar o desempenho do sistema biológico imobilizado em fluxo contínuo. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de corante utilizadas nessas reações seguiram a melhor condição obtida pelo planejamento experimental. Foram utilizadas imobilizações que já haviam reagido com o corante em batelada e novas imobilizações em pH 7 e 8, a fim de confrontar o pH ótimo sugerido pelo planejamento e o pH ótimo da enzima, avaliando em qual pH a enzima manteria por mais tempo um determinado percentual de descoloração. Na confecção do sistema contínuo foi utilizada uma placa de agitação magnética MARCONI® para homogeneizar a solução, uma bomba peristáltica PUMP drive PD5001 HEIDOLF® para manter a vazão de solução ao longo do sistema, dois microbiorreatores e uma

torneira de policarbonato de três vias para retirada da alíquota do primeiro microbiorreator em reações em série.

A Figura 26 apresenta um dos microbiorreatores de geometria cilíndrica, construído em acrílico, com 0,91 mL de volume útil (20 mm de altura e 7,6 mm de diâmetro interno), e relação altura / diâmetro interno igual a 2,6.



FIGURA 26 - Enzima imobilizada retida no interior do microbiorreator.

As reações em sistema contínuo totalizaram 3h, com alíquotas sendo retiradas da saída do(s) reator(es) de 15 em 15 minutos e as absorbâncias foram medidas no espectrofotômetro UV (SHIMADZU UV SPECTROPHOTOMETER – Modelo UV-1800) a 660 nm.

As Figuras 27 e 28 apresentam os sistemas utilizados neste trabalho nos experimentos conduzidos em processo contínuo para os testes com um único microbiorreator e os realizados com dois microbiorreatores em série.



FIGURA 27 - Sistema contínuo com um microbiorreator.

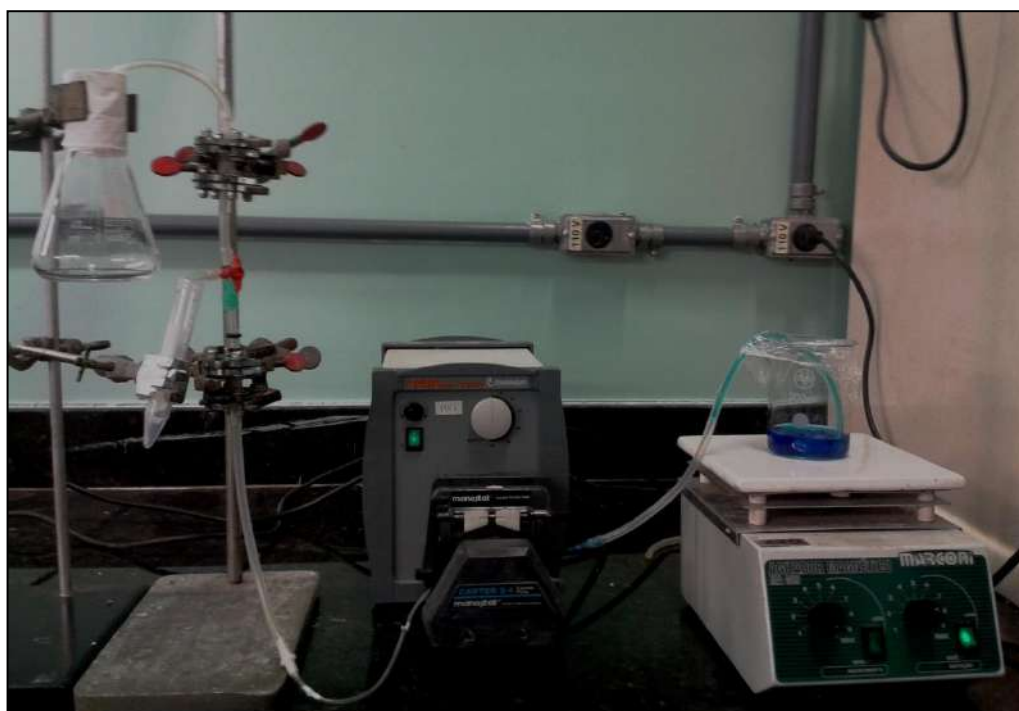


FIGURA 28 - Sistema contínuo com dois microbiorreatores em série.

O tempo de residência em cada microbiorreator foi determinado mediante a multiplicação da vazão de solução de corante passando pelo sistema pelo tempo que a primeira fração da solução de corante levou para percorrer o trajeto da entrada até a saída do respectivo microbiorreator contendo o lote de enzimas imobilizadas.

## CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### V.1 – Avaliação da Descoloração do Azul de Metileno em pH 7,0.

Foi realizado um experimento preliminar com a finalidade de investigar o desempenho da HRP, imobilizada em esferas de vidro, na descoloração do Azul de metileno conduzido em pH 7,0, na temperatura de 30°C, sob agitação constante a 60 rpm. Neste primeiro teste foram utilizados 10 mL de solução aquosa do corante (10 mg/L) e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6,0 mg/L). As concentrações de peróxido e de corante, bem como as condições do processo foram adaptados com base em estudos prévios para a enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio (BASTOS, 2014). A atividade da enzima concentrada calculada a partir da Figura A.1 (Apêndice A) e da Equação 2 foi de 952,0 U/mL e a atividade relativa à quantidade de enzima a ser imobilizada Figura A.2( apêndice A) foi de 119,8 U/mL. A eficiência de imobilização calculada à partir da curva padrão de albumina (Figura B.1 do Apêndice B) foi de 45,4% (Tabela 8). Nesta condição, o maior percentual total de descoloração foi de 54,0%, sofrendo um decréscimo de 14,0% em um terceiro ciclo de reação, após uma semana da imobilização (Figura 29).

TABELA 8: Eficiência de imobilização da HRP em esferas de vidro (aminopropil) em pH 7,0.

Amostra	[HRP]antes (mg/L)	[HRP]depois (mg/L)	Eficiência de imobilização (%)	mg HRP/ g suporte
pH 7,0	312,0	179,4	45,4	1,8

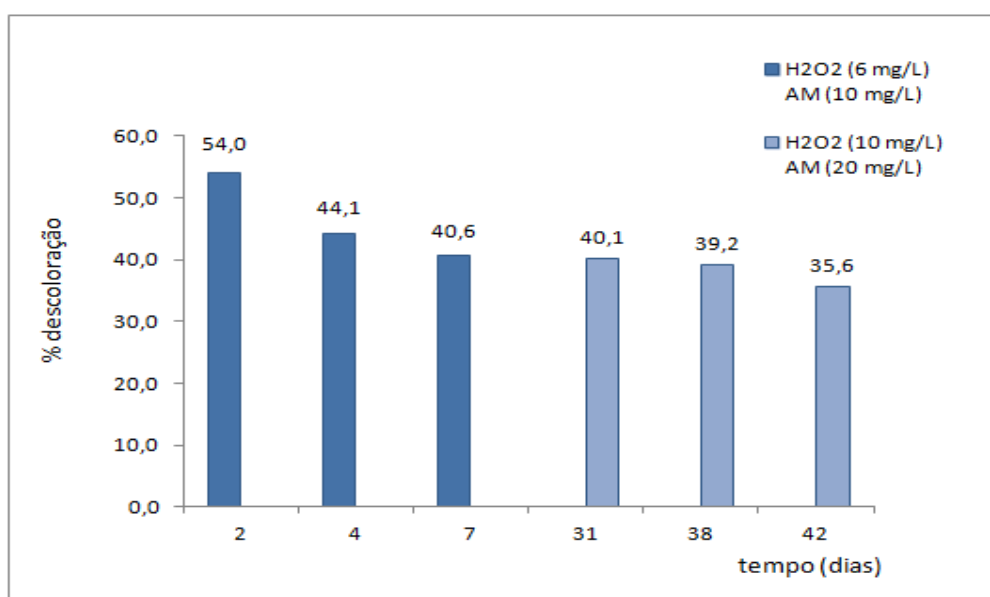


FIGURA 29 - Percentual de descoloração do corante azul de metileno reutilizando a enzima imobilizada.

Os resultados apresentados na Figura 29 reportam percentuais de remoção de cor superiores aos obtidos por Bastos (2014) trabalhando com a enzima imobilizada por envolvimento em gel de alginato de cálcio, em reação conduzida em tampão pH 5,0, a 30°C sob agitação a 100 rpm (12,5 %). Além disso, os resultados obtidos nos três últimos ciclos são bastante próximos e com um bom percentual de descoloração, chegando a 40,1% após um mês de imobilização, comprovando a viabilidade em se reutilizar a enzima em vários ciclos e corroborando com o resultado obtido com o planejamento experimental em termos de concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e corante.

## V.2 – Avaliação da Absorbância Média ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ) em diferentes concentrações do Azul de Metileno.

A curva padrão do azul de metileno no comprimento de onda de 660 nm (Figura 30) mostrou linearidade na faixa de 5-20 mg/L ( $R^2 = 0,9921$ ) e pouca variação na absorbância média em concentrações superiores a 20 mg/L. Portanto, esta faixa linear foi definida para ser avaliada no planejamento experimental pelo software STATISTICA®.

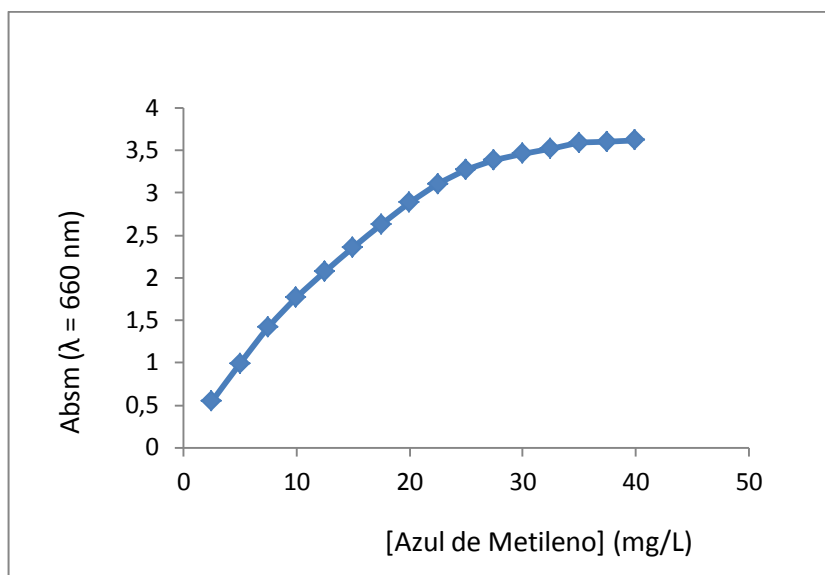


FIGURA 30 - Curva padrão do corante azul de metileno.

### V.3 – Avaliação do Planejamento Experimental Proposto pelo Software STATISTICA®.

#### V.3.1 – Avaliação do Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática.

O pH mostrou forte influência sobre a atividade enzimática, sendo possível visualizar a diferença na inclinação da reta, principalmente com relação ao pH 4,0, conforme mostra a Figura 31.

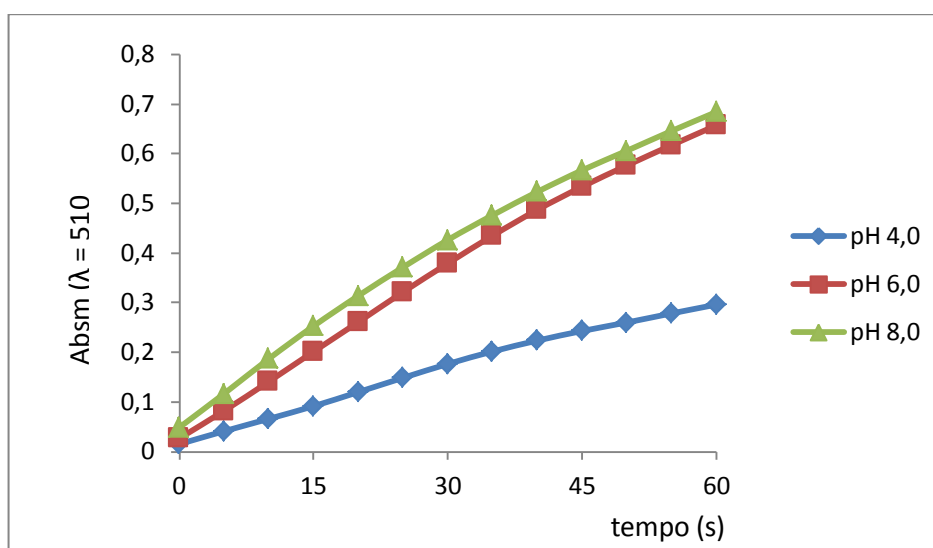


FIGURA 31 - Determinação de atividade enzimática em pH 4,0, 6,0 e 8,0.

A atividade enzimática em pH 6,0 e 8,0 foram próximas e superiores ao dobro da atividade em pH 4,0 (Tabela 9). Essa observação levou a utilização de um volume maior de enzima em pH 4,0, para a atividade ficar em torno de 150 U/mL conforme descrito na metodologia de imobilização enzimática.

TABELA 9: Determinação de Atividade enzimática em diferentes valores de pH.

pH	A (U/mL)
4,0	319,6
6,0	712,3
8,0	699,0

### V.3.2 – Avaliação da Eficiência de Imobilização em Diferentes Valores de pH.

Os maiores percentuais relativos à eficiência de imobilização foram de aproximadamente 45,2% e 43,4% e corroboram com o previamente observado na imobilização em pH 7,0 (45,4%). Estes resultados sugerem uma limitação na imobilização em esferas de vidro ativadas, uma vez que valores similares a estes foram verificados por Alhadeff (2005).

TABELA 10: Eficiência de imobilização da HRP em esferas de vidro (aminopropil) em diferentes pH's.

Experimento	[HRP]antes (mg/L)	[HRP]depois (mg/L)	Eficiência de imobilização (%)	mg HRP/ g suporte
1	2,4	1,4	43,4	2,6
2	2,4	1,6	32,2	2,0
3	2,4	1,3	45,2	2,7
4	2,4	1,4	40,9	2,5
5	3,6	2,7	23,8	2,1
6	2,4	1,5	38,3	2,3
7	3,6	3,0	17,2	1,5

### V.3.3 – Avaliação dos Resultados Adquiridos pelo Software STATISTICA®.

Os resultados obtidos pelos experimentos propostos pelo STATISTICA® estão expostos na tabela a seguir.

TABELA 11: Percentual de descoloração do corante Azul de metileno conforme planejamento experimental realizado no software STATISTICA®.

Experimento	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L)	AM (mg/L)	pH	Descoloração (%) (1h)	Descoloração (%) (2h)	Descoloração (%) (3h)
1	6,0	12,5	6,0	37,6	39,6	40,6
2	6,0	12,5	6,0	36,3	38,2	39,5
3	10,0	20,0	8,0	58,5	59,3	60,4
4	6,0	12,5	6,0	35,4	36,7	38,2
5	2,0	20,0	4,0	12,1	12,7	13,3
6	2,0	5,0	8,0	56,1	57,0	58,9
7	10,0	5,0	4,0	23,6	24,8	23,2

A partir dos dados acima, foi gerada uma tabela ANOVA (Tabela 12) mostrando quais são as variáveis com significância estatística na metodologia utilizada. Desta forma, por apresentarem valores de *p-level* (*p-valor*) superiores a 0,05, tanto a curvatura foi considerada estatisticamente não significativa e a



concentração de corante azul de metileno, marginalmente significativa. Já a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e principalmente o pH, foram as variáveis estatisticamente significativas. Um valor de *p-level* menor que 0,05 significa que se pode afirmar que essas variáveis são estatisticamente significativas com um erro inferior a 0,05.

TABELA 12: Significância Estatística.

Fator	<i>p-level</i>
Curvatura	0,311164
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,024562
Azul de Metileno	0,054444
pH	0,000781

Outra forma de visualizar a significância das variáveis é através do gráfico de Pareto (Figura 32).

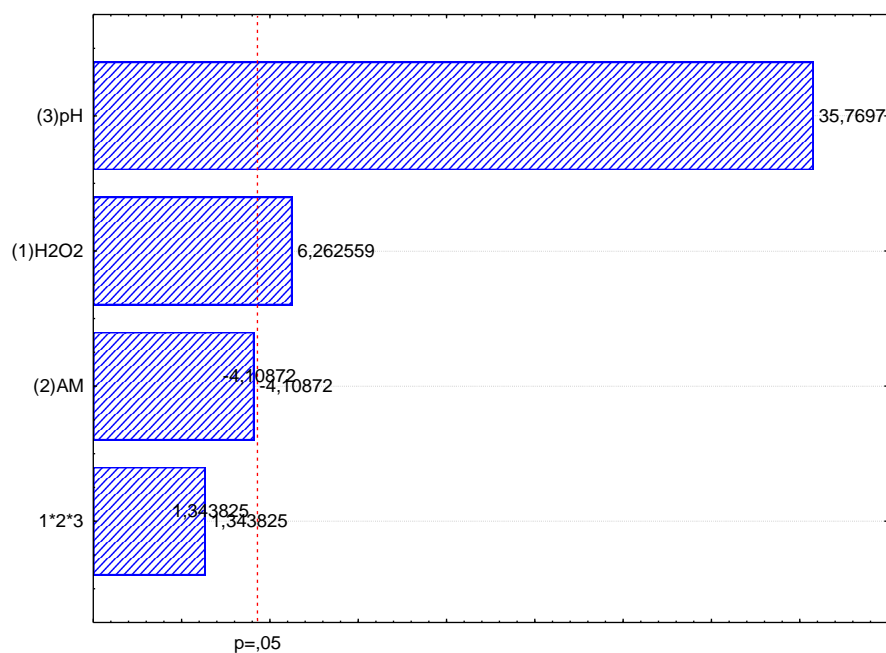


FIGURA 32 - Gráfico de Pareto para a descoloração do corante azul de metileno em função dos valores da estatística do teste t de Student.

Pelo gráfico de Pareto (Figura 32), observamos que o pH é indiscutivelmente a variável estatisticamente mais significativa seguida da concentração de peróxido de hidrogênio. A concentração de corante azul de metileno ficou muito próxima de ser considerada estatisticamente significativa, mas tanto essa variável quanto a interação entre as três variáveis independentes foram consideradas não significativas por não serem cortadas pela linha tracejada, onde  $p = 0,05$ . Sendo assim, com os coeficientes obtidos pelas variáveis significativas, podemos

estabelecer o modelo matemático para a descoloração do corante azul de metileno em função do pH e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Equação 6).

$$\% \text{ Descoloração} = 3,45 A + 19,72 B + 36,42 \quad (6)$$

Onde:

A: concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .

B: pH.

O modelo descreve um perfil linear, conforme podemos observar no gráfico *Trace plot* (Figura 33). Os resultados obtidos se ajustaram muito bem ao modelo, gerando um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) igual a 0,99851.

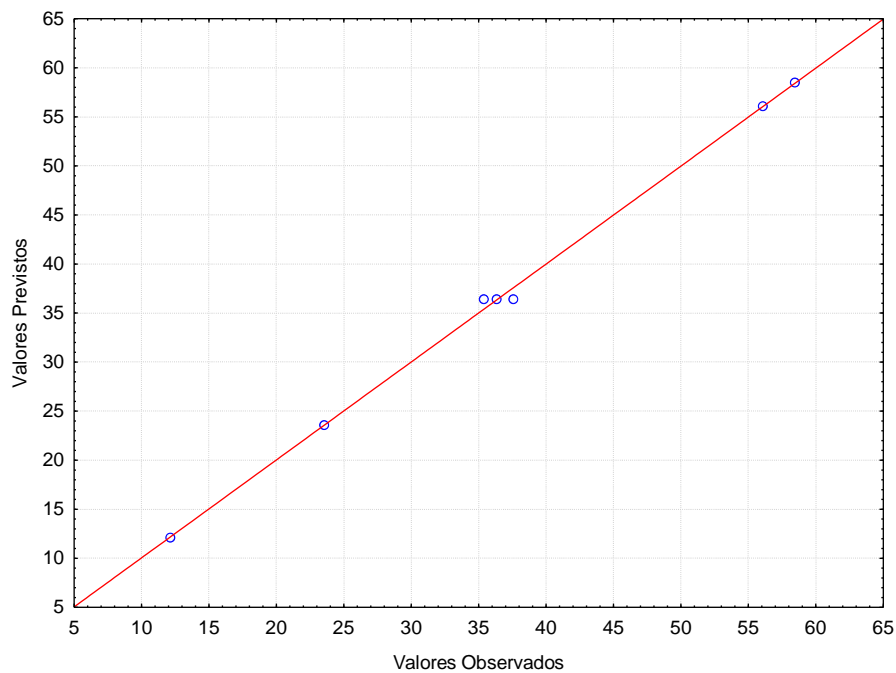


FIGURA 33 - Gráfico Trace plot para % descoloração em função das variáveis estatisticamente significativas.

Além da comparação entre valores previstos e os observados, também foi gerada uma superfície de resposta (Figura 34), mostrando a tendência de resposta esperada dentro das faixas estudadas.

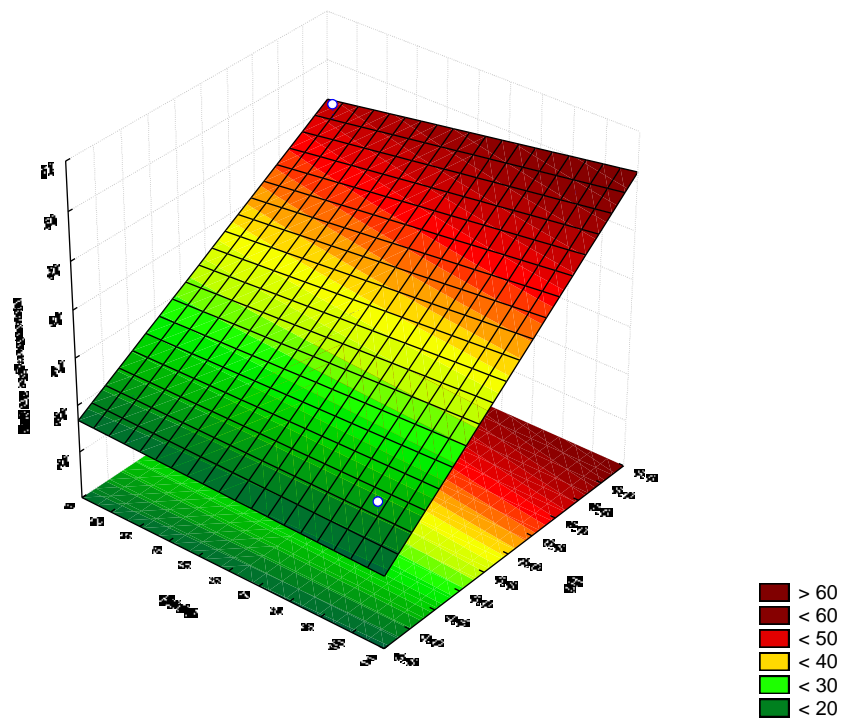


FIGURA 34 - Superfície de resposta para o percentual de descoloração em função da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do pH.

De modo a simplificar a visualização da tendência da variável de resposta (% descoloração), temos as curvas de nível (Figura 35) obtidas pelo rebatimento da superfície de resposta em um plano. Com isso, observa-se que a melhor resposta é obtida nos extremos, ou seja, no pH 8,0 e concentração 10 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

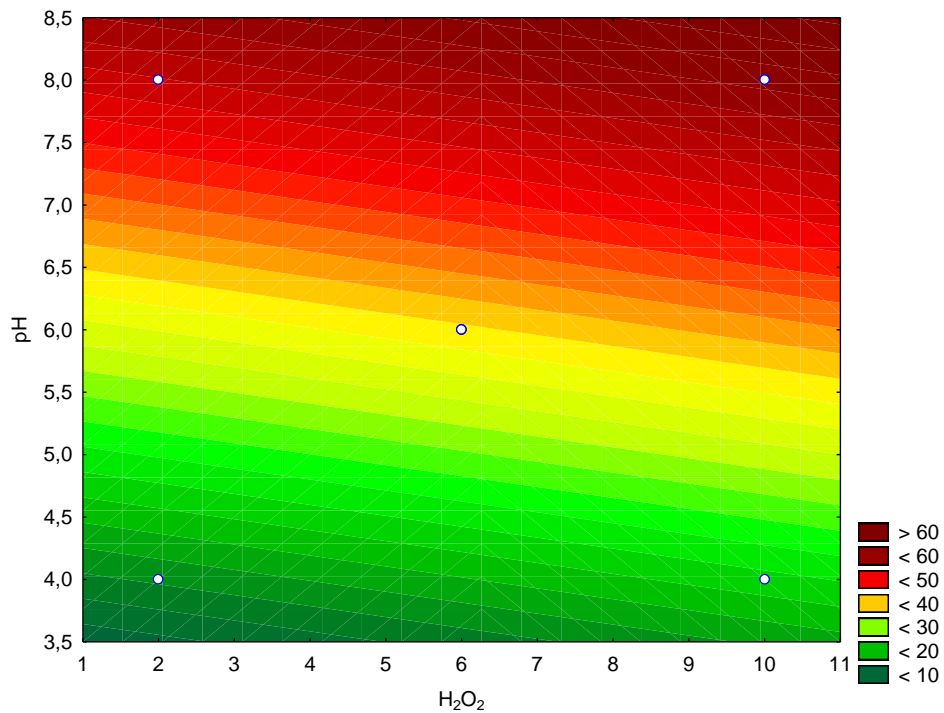


FIGURA 35 - Curvas de nível para o percentual de descoloração em função do pH e da concentração de  $H_2O_2$ .

No entanto, a Figura 36, mostra que em pH 8,0 o percentual de descoloração nos dois extremos das faixas de concentração do  $H_2O_2$  e do corante foi bastante próximo. Em escala de bancada essa diferença pode parecer irrelevante, mas avaliando em termos de escalas superiores a esta, a diferença acaba sendo significativa e, portanto, o resultado obtido pela superfície de resposta é tido como a melhor condição reacional.

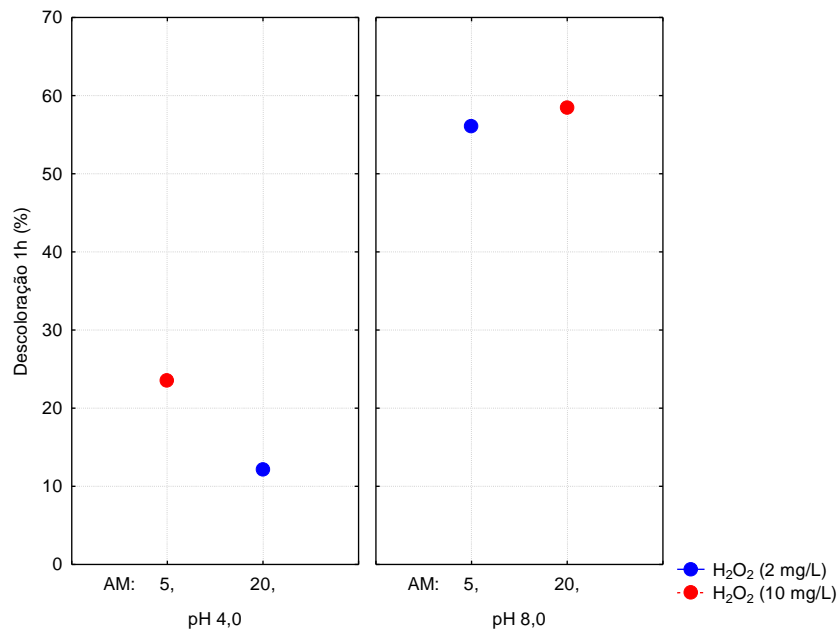


FIGURA 36 - Resultados obtidos nos dois extremos das faixas estudadas.

#### V.4 – Avaliação da Descoloração do Corante Azul de Metileno Reutilizando as Enzimas Imobilizadas.

Como o planejamento experimental mostrou as variáveis pH e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sendo as variáveis estatisticamente relevantes e com melhores resultados no extremo superior da faixa estudada, novos ciclos de reações com o intervalo de 7 dias foram feitos a fim de verificar a viabilidade de se reutilizar o sistema imobilizado nesta condição, conforme mostra a Figura 37. O tempo 0 representa a reação sugerida pelo planejamento experimental. As amostras em pH 8,0 (amostras 3 e 6) estão graficamente representadas em ordem crescente do número da amostra e todos os percentuais de descoloração medidos após 3 horas de reação.

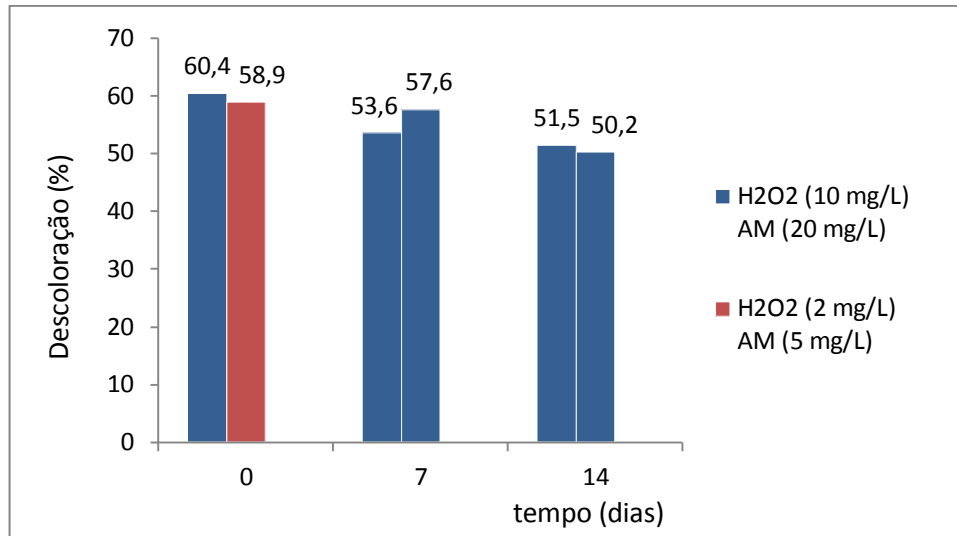


FIGURA 37 - Ciclos de reutilização da enzima imobilizada em reações em pH 8,0 em dias após a imobilização.

A primeira amostra apresentou queda de 8,9% no percentual de descoloração do primeiro ciclo em relação ao terceiro ciclo, realizado 14 dias depois nas mesmas condições operacionais. A segunda amostra apresentou uma queda próxima a primeira, em torno de 8,7%, sendo o primeiro ciclo realizado em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e corante (Figura 37).

A Figura 38 mostra o aspecto do sistema imobilizado após o 2º ciclo de reação em batelada em pH 8,0.



FIGURA 38 - Sistema imobilizado antes (1) e após (2) reação (3h) com azul de metileno e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão pH 8,0 (amostra 6) após 7 dias da imobilização.

Nas reações em pH 6,0 e 4,0 (Figuras 39 e 41), foi realizado apenas mais um ciclo em duplicata, após uma semana da imobilização, na condição ótima determinada pelo planejamento em 3 horas de reação. Mas devido as imobilizações designadas ao pH 6,0 terem sido feitas em triplicata, a última amostra investigou o extremo inferior da faixa estudada, que apresentou percentual de descoloração próximo ao do extremo superior no primeiro quando realizada em pH 8,0 (Figura 37).

Na Figura 39, estão apresentados os dois ciclos das amostras em pH 6,0, amostras 1, 2 e 4, respectivamente. Na condição ótima, a redução no percentual de descoloração ficou em torno de 4,0% e em relação a última amostra em diferente condição, a queda foi de 7,0% comparando com o primeiro ciclo.

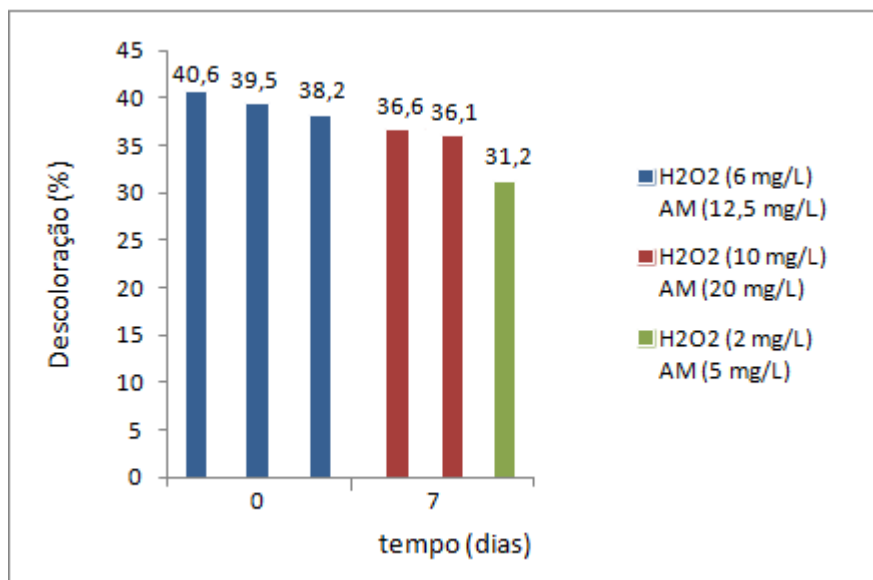


FIGURA 39 - Ciclos de reutilização da enzima imobilizada em reações em pH 6,0 em dias após a imobilização.

A Figura 40 apresenta as amostra 1, 2 e 4 em sequência antes e após o 2º ciclo de reação. Antes a coloração era praticamente a mesma e após o 2º ciclo, as amostras expostas a uma maior concentração de corante (amostras 1 e 2) ficaram com um tom azul mais escuro que a exposta a metade desta concentração (amostra 4), mostrando a influência da concentração do azul de metileno no processo de absorção/adsorção nas esferas de vidro.

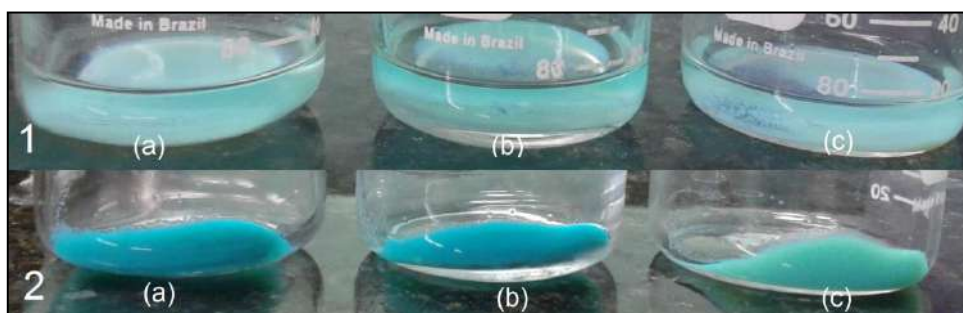


FIGURA 40 - Sistema imobilizado antes (1) e após (2) reação (3h) com azul de metileno e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão pH 6,0 após 7 dias da imobilização (a) amostra 1, (b) amostra 2 e (c) amostra 4.

Na Figura 41, estão apresentados os dois ciclos das amostras em pH 4,0, amostras 5 e 7, respectivamente. Na condição ótima, a redução no percentual de descoloração ficou em torno de 0,5% na primeira amostra e 10,3% na segunda, reforçando a grande influência do pH na reação de descoloração pela HRP imobilizada.

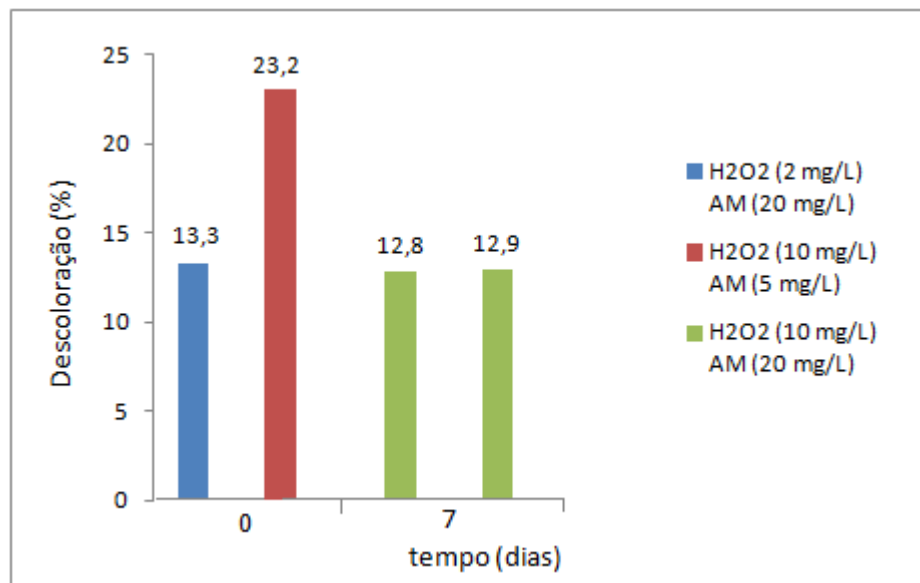


FIGURA 41 - Ciclos de reutilização da enzima imobilizada em reações em pH 4,0 em dias após a imobilização.

A Figura 42 mostra as amostras 5 e 7 em sequência antes e após o 2º ciclo de reação em pH 4,0. Após o 2º ciclo, as amostras passaram a apresentar uma tonalidade azul mostrando que não apenas o pH influencia nos processos de absorção/adsorção do corante nas esferas de vidro, como também as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do próprio corante.



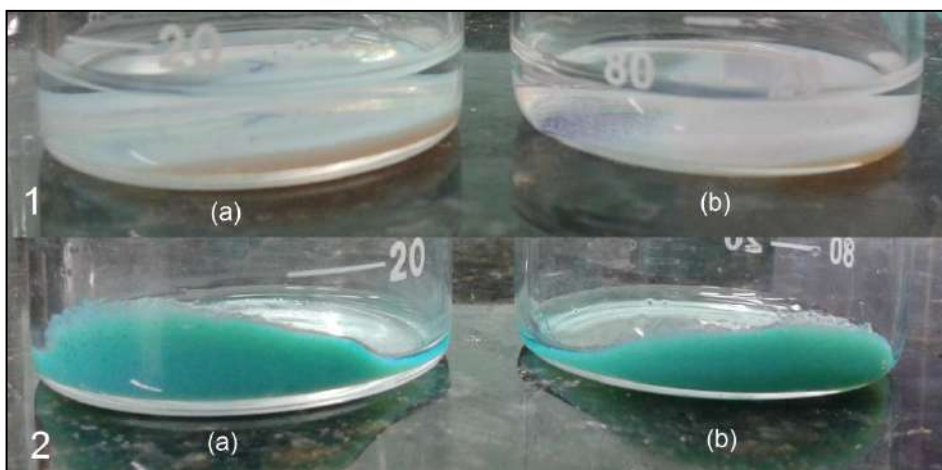


FIGURA 42 - Sistema imobilizado antes (1) e após (2) reação (3h) com azul de metileno e  $H_2O_2$  em tampão pH 4,0 após 7 dias da imobilização (a) amostra 5 e (b) amostra 7.

## V.5 – Avaliação da Descoloração do Corante Azul de Metileno em Sistema Contínuo.

### V.5.1 – Teste Reutilizando a Amostra 2 (planejamento experimental) com um Microbiorreator.

A amostra 2 havia sido previamente utilizada em dois ciclos de reações em pH 6,0 em batelada antes de ser testada no sistema contínuo. Nesta nova condição, a vazão de solução medida no sistema foi de 1,36 mL/min, com um tempo de residência de 11,4 s e 0,26 mL o volume “vazio” no interior do biorreator, ou seja, o volume não ocupado pelo sistema imobilizado. A Figura 43 mostra o comportamento do sistema contínuo, que apresenta a maior queda nos 15 minutos iniciais em torno de 20%, depois essa diferença vai reduzindo e entre 60 e 150 minutos apresenta uma relativa estabilidade na faixa de 16 a 20% de descoloração. Mas após esse período a descoloração fica bastante reduzida, seja pela decomposição do  $H_2O_2$  ao longo do sistema, como também pela redução da atividade enzimática ao longo do tempo de reação.

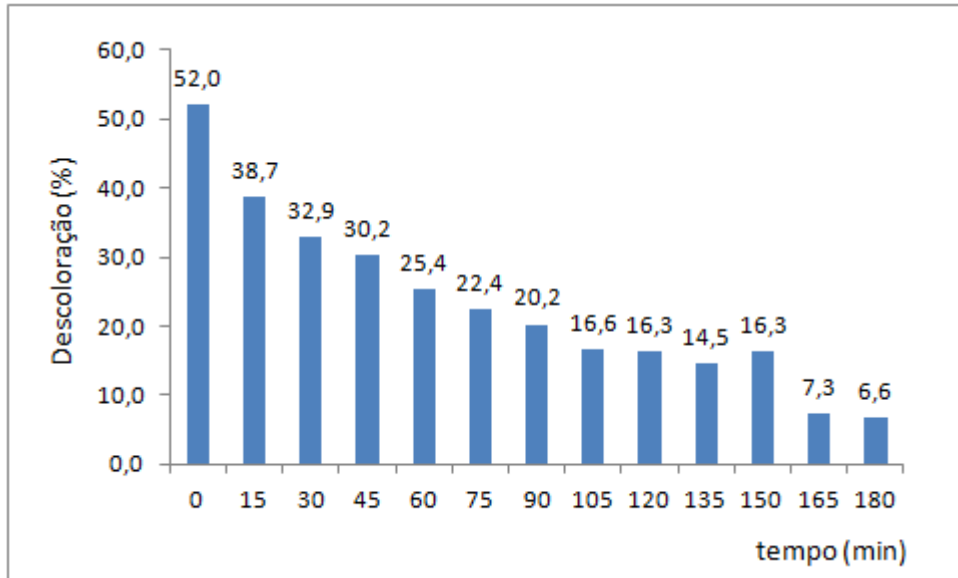


FIGURA 43 - Percentual de descoloração em sistema contínuo com enzima reutilizada.

Operando com uma vazão menor de 0,77 mL/min e um tempo de residência de 20,1 s, observa-se um aumento do percentual de descoloração inicialmente, porém verifica-se uma queda da remoção de cor nos primeiros 15 minutos de processo, em torno de 10% maior (Figura 44) que a obtida no primeiro ciclo, com o sistema mantendo uma descoloração próxima a 10% na maior parte do tempo.

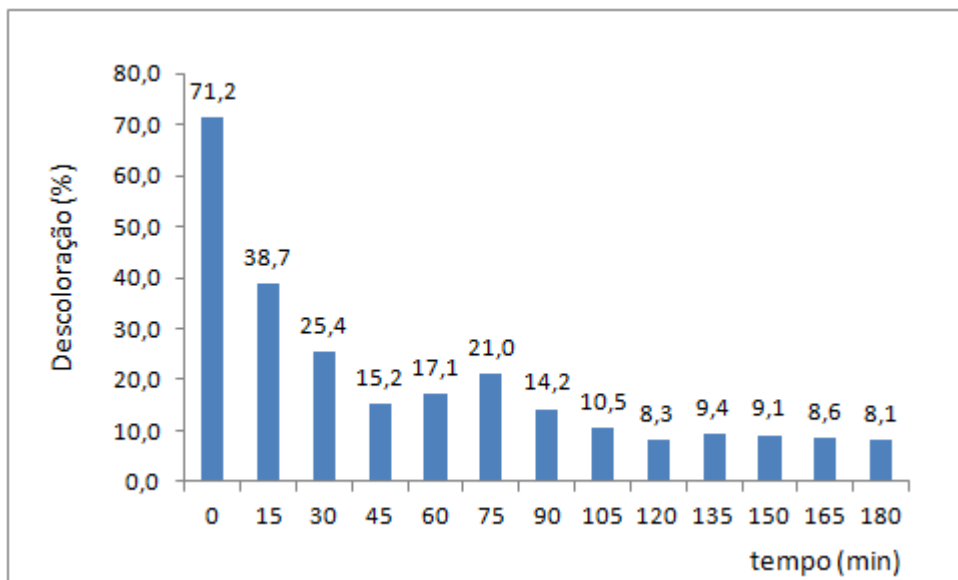


FIGURA 44 - Percentual de descoloração no 2º ciclo em sistema contínuo com enzima reutilizada.

### V.5.2– Avaliação do Sistema Contínuo com um Biorreator em pH 7,0.

Utilizando uma enzima recém imobilizada, com a mesma vazão do experimento anterior (0,77 mL/min) e tempo de residência de 13,1 s, a descoloração inicial foi próxima a 94% (Figura 45). No entanto, em pH 7,0, nos 15 minutos iniciais a descoloração teve percentual reduzido em quase 70%, se mantendo em valores bem menores que os apresentados pela enzima reutilizada em pH 8,0 (Figura 37). Este comportamento difere em muito do esperado, tendo em vista os resultados obtidos em pH 7,0 em bateladas sucessivas com reutilização do mesmo lote de enzimas imobilizadas por um período superior a 40 dias (6 ciclos) (Figura 29) .

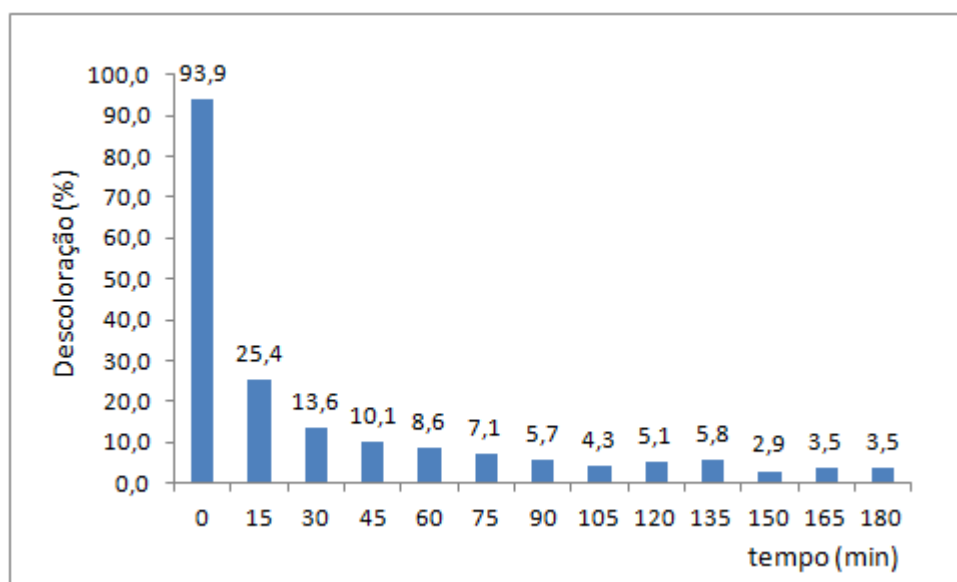


FIGURA 45 - Gráfico de colunas com o percentual de descoloração em sistema contínuo em pH 7,0.

### V.5.3 – Avaliação do Sistema Contínuo com dois Biorreatores em Série em pH 8,0.

Nesta série de experimentos conduzidos com um sistema constituído de dois microrreatores em série, com solução de azul de metileno em solução aquosa e pH 8,0, foram utilizados novos lotes de enzimas imobilizadas, recém preparadas, para recheiar os dois biorreatores trabalhando em série. Os dados apresentados na Tabela 13 indicam além da vazão de trabalho, os valores dos tempos de residência em cada câmara reacional e respectivos volumes de solução de corante que percolava os leitos catalíticos.

TABELA 13: Dados do Sistema Contínuo em Série.

Vazão (mL/min)	0,78
tresid R1 (s)	7,0
tresid R2 (s)	8,6
Vvazio R1 (mL)	0,09
Vvazio R2 (mL)	0,11

O percentual inicial de descoloração foi o mais elevado, em torno de 97%, em ambos biorreatores. Como o segundo biorreator recebeu uma carga com baixa coloração no primeiro momento, esse percentual se manteve após 15 minutos de reação. A redução no percentual no primeiro biorreator foi mais sutil quando comparada ao sistema com a enzima reutilizada em pH 8,0 e com a enzima em 1º ciclo em pH 7,0. Com a utilização de um segundo reator, a descoloração ao final das 3 horas de reação ficou em torno de 27% contra 10% do primeiro reator.

A Figura 46 apresenta os percentuais de remoção observados, com valores mais elevados de remoção percentual, quando comparados com os obtidos anteriormente.

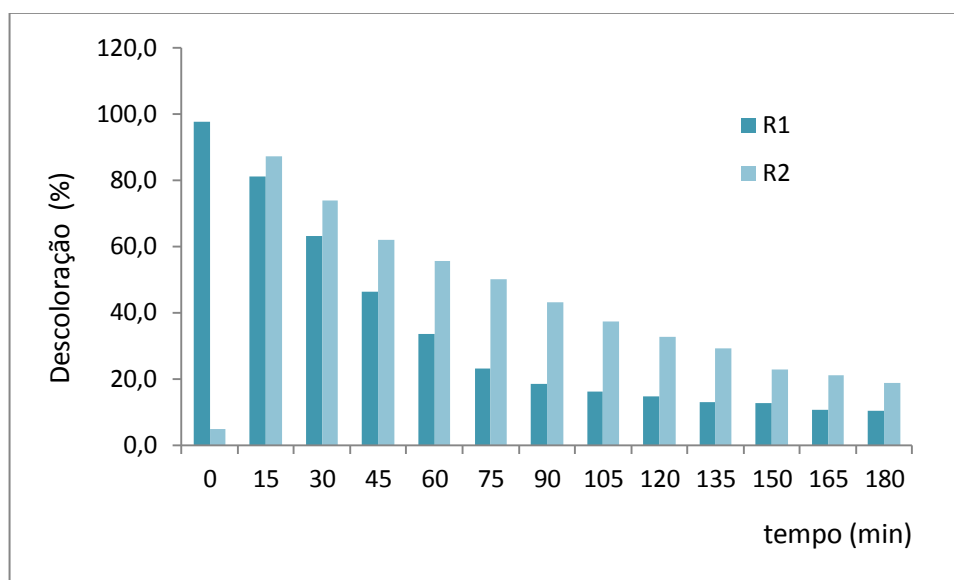


FIGURA 46 - Descoloração do azul de metileno no primeiro (R1) e no segundo reator (R2).

O percentual inicial de descoloração foi o mais elevado, em torno de 97%, em ambos microbiorreatores. Como o segundo biorreator recebeu uma carga com baixa coloração no primeiro momento, esse percentual se manteve após 15 minutos de reação. A redução no percentual no primeiro biorreator foi mais sutil quando

comparada ao sistema com a enzima reutilizada em pH 8,0 e com a enzima em 1º ciclo em pH 7,0. Com a utilização de um segundo reator, a descoloração ao final das 3 horas de reação ficou em torno de 27% contra 10% do primeiro reator.

A Figura 47 apresenta o desempenho global do sistema com dois microrreatores em série, onde pode ser observado um declínio mais suave da capacidade de remoção de cor ao longo das 3 horas de monitoramento. O percentual global de descoloração inicialmente de 98 %, permaneceu acima de 70 % na primeira hora de processo. Uma redução de aproximadamente 50% da capacidade de descoloração foi verificada com 100 minutos de procedimento contínuo.

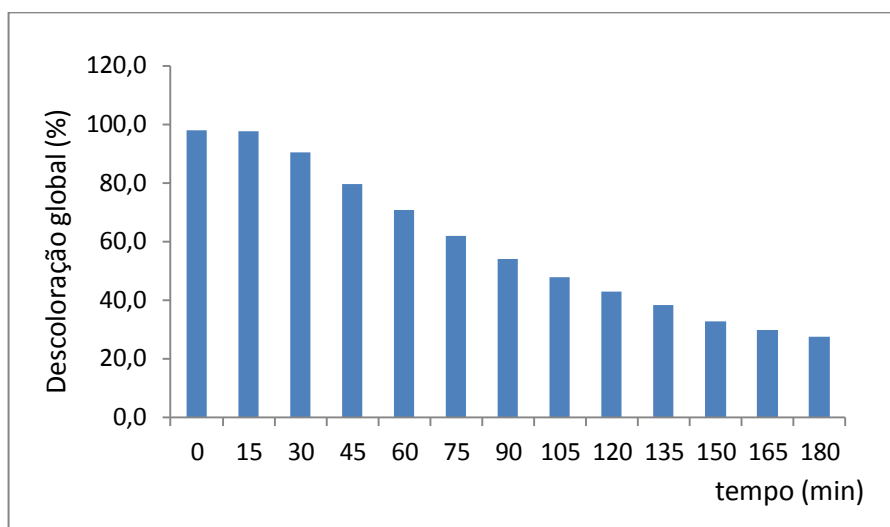


FIGURA 47 - Descoloração global do azul de metileno no sistema contínuo com dois microrreatores.

Na Figura 48 podem ser observadas amostras da solução preparada com 20 mg/L de azul de metileno (solução alimentada no sistema) e das coletadas nos efluentes do primeiro e do segundo microrreatores, para os tempos de coleta correspondentes a 0, 15 e 30 minutos de modo que a remoção de cor pode ser visualizada de forma qualitativa.

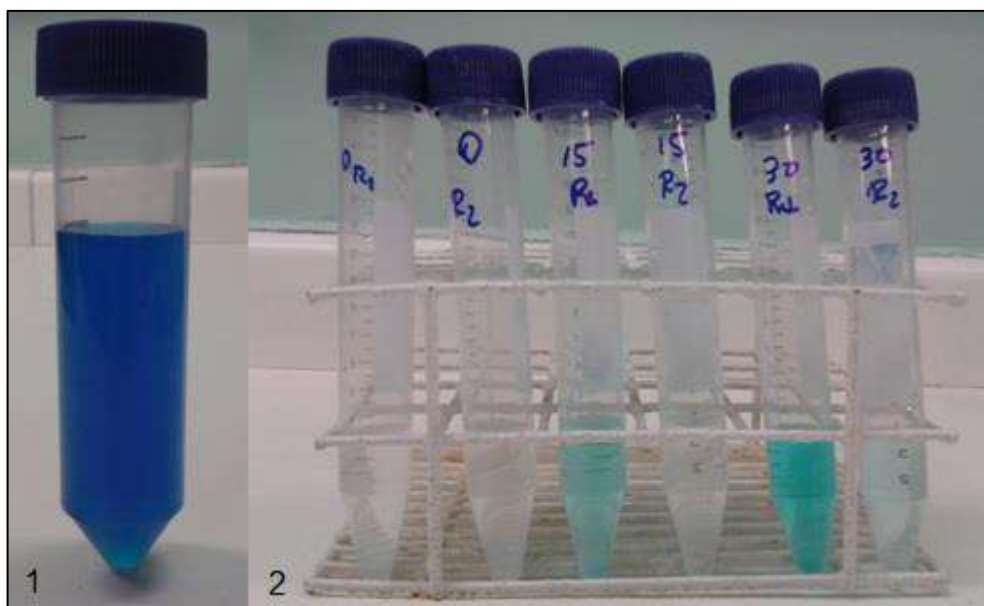


FIGURA 48 - Solução de azul de metileno a ser tratada (1) Original na concentração de 20 mg/L (2) Amostras nos tempos 0, 15 e após 30 minutos de processo contínuo coletadas nos efluentes de cada microrreator (R1 e R2).

O efluente tratado em tonalidade clara de cor azul pode ser observado em frasco de erlenmeyer utilizado para recolhimento da amostra na saída do segundo microrreator, após 3 horas de processo contínuo, conforme apresentado na Figura 49.

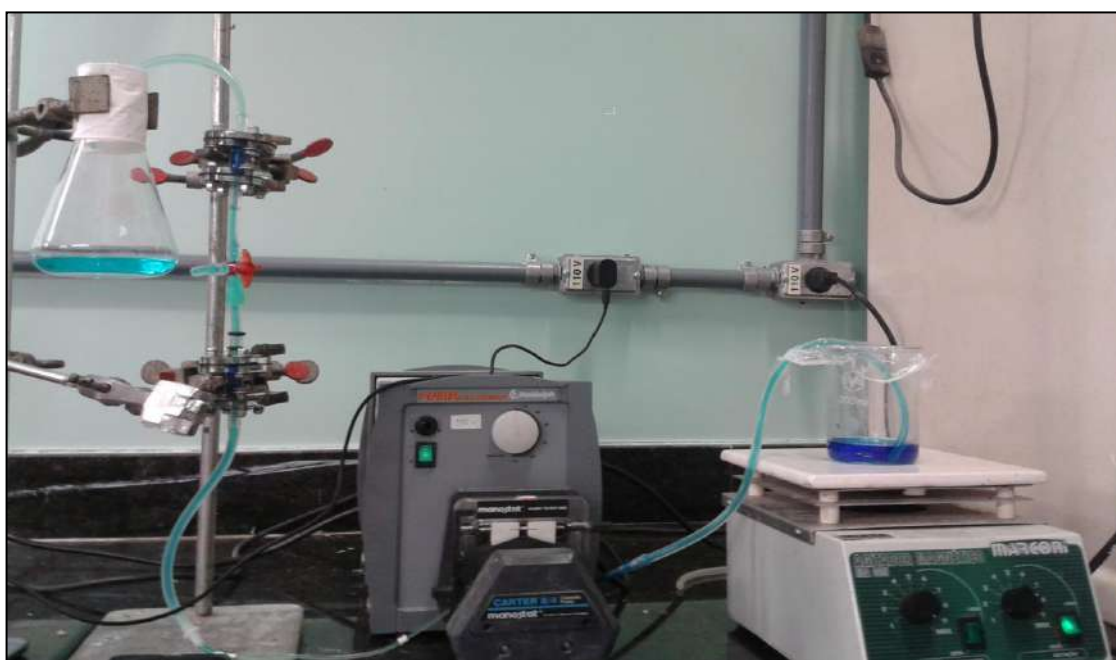


FIGURA 49 - Sistema contínuo com dois microrreatores em série após 3 horas de reação.

Na Tabela 14 podem ser observadas as performances do tratamento de descoloração da solução de azul de metileno com a enzima HRP imobilizada para as diferentes estratégias de condução do processo estudadas neste trabalho.

TABELA 14: Desempenho na remoção de cor em relação à condução do processo: descontínuo x contínuo.

Processo	nº de ciclos ou microrreatores / ciclos	vazão (mL/min)	Remoção (%) <sup>1</sup>
Batelada	1	-	58,5
Contínuo	1/1	1,36	25,4
	½	0,77	17,1
	2/1	0,78	≈71

<sup>1</sup> – após 60 minutos em pH 8,0, 10 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L, 20 mg AM/L.

Para as condições indicadas pelo planejamento de experimentos (pH 8,0, 10 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L, 20 mg AM/L) após 60 minutos de tempo reacional, as bateladas sequenciais apresentaram um desempenho relativamente estável após 5 ciclos e cerca de 16% de redução da capacidade de remoção da cor. Em processo contínuo foi possível obter uma remoção de cor superior a 70% operando com dois microrreatores em série após 60 minutos alimentação continuada, utilizando enzimas recém imobilizadas. Cabe ressaltar que nos experimentos conduzidos com um único microrreator, as enzimas imobilizadas já haviam sido previamente utilizadas em dois ciclos de testes em batelada, quando apresentaram percentuais de remoção de cor em torno de 39 % no primeiro ciclo (pH 6,0, 6,0 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 12,5 mg AM/L) e de 36% de remoção com 10 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 mg AM/L (segundo ciclo, após 7 dias). Estas esferas, reutilizadas em dois ciclos em processo descontínuo foram avaliadas quanto ao seu desempenho em sistema contínuo com um único microbiorreator, onde valores de redução percentual de cor de aproximadamente 20 % foram observados.

A performance do sistema contínuo está detalhado na Tabela 15.

TABELA 15: Processo contínuo com um e com dois microrreatores em série.

nº de microrreatores	vazão (mL/min)	Tempo de residência (s) <sup>d</sup>	Remoção (%) <sup>a</sup>
1 <sup>b</sup>	1,36	11,4	38,7
	0,77	20,1	38,7
2 <sup>b</sup>	1,15	9,1	25,4
	1,15	12,0	40,2
2 <sup>c</sup>	0,78	7,0	81,4
	0,78	8,6	97,6

<sup>a</sup> – após 15 minutos em pH 8,0, 10 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L, 20 mg AM/L.

<sup>b</sup> – enzimas imobilizadas utilizadas no planejamento de experimentos

<sup>c</sup> – enzimas imobilizadas, recém preparadas - primeiro ciclo.

<sup>d</sup> – determinado experimentalmente.

Após 15 minutos de processo foram observados os valores mais elevados de remoção percentual de cor. Para o sistema operando com enzimas recém imobilizadas foram observados percentuais de remoção de cor de cerca de 80 % no efluente do primeiro microrreator e de aproximadamente 97 % na saída do segundo.

#### V.6 – Avaliação dos efeitos de descoloração por meios não enzimáticos.

Os experimentos realizados em batelada na ausência de peróxido de hidrogênio e com concentração de azul de metileno 20 mg/L mostraram a influência do pH na absorção do corante nos poros das esferas de vidro. Em pH 4,0, aproximadamente 3% ficou retido nas esferas e em pH 8,0 aproximadamente 40%. Qualitativamente, esta diferença pode ser identificada pela coloração tanto das esferas quanto do sobrenadante (Figura 50).

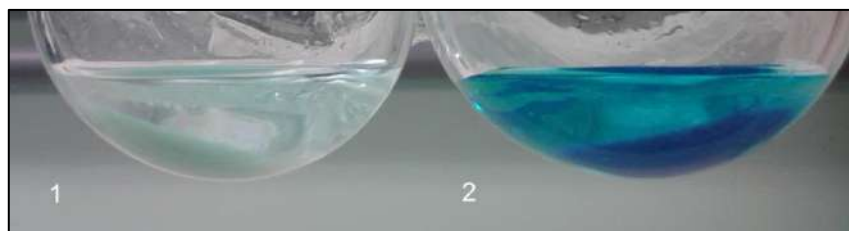


FIGURA 50 - Amostras após ciclo sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1) pH 4,0 e (2) pH 8,0.



O meio ácido ou básico pode alterar as cargas presentes nas esferas de vidro, nos aminoácidos da enzima e também do próprio corante, podendo ser uma das respostas para essa diferença de retenção.

Em ensaios em sistema contínuo foi observado um efeito creditado à vazão de alimentação aplicada. A operação com um valor mais elevado da vazão de trabalho possivelmente leva a uma condição de saturação em termos de adsorção, e que nas condições de manutenção adotadas neste trabalho (8°C em tampão fosfato pH 7,0) não foi observada a dessorção do azul de metileno.

Conforme mostra a Figura 51, quando um mesmo lote de enzimas imobilizadas é submetida às mesmas condições reacionais, exceto à vazão do sistema, o sobrenadante (solução tampão pH 7,0) em armazenamento pós-reacional apresenta características diferentes. Aparentemente, os efeitos de absorção/dessorção são minimizados quando se trabalha com vazões de alimentação mais elevadas.

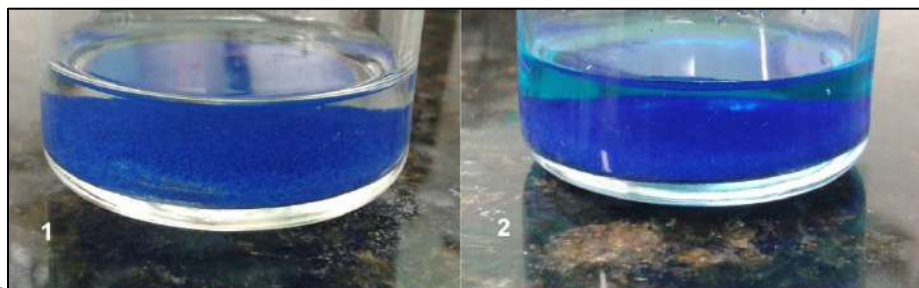


FIGURA 51 - Sobrenadante após reação a vazão (1) 1,36 mg/L e (2) 0,77 mg/L.

## VI – CONCLUSÕES

A viabilidade de utilização da HRP imobilizada em esferas de vidro (aminopropil) na descoloração de azul de metileno em batelada pode ser obtida mediante a minimização dos efeitos de absorção nas esferas de vidro. O sistema contínuo apresentou boa performance, reduzindo os efeitos de absorção quando realização em condição de maior vazão, com altos percentuais de descoloração nos primeiros 15 minutos e mantendo uma certa estabilidade de descoloração entre 60 e 150 minutos em pH 8,0.

Em batelada, a melhor condição obtida por meio do planejamento experimental do software STATISTICA® foi confirmada em experimentos posteriores, apresentando os maiores percentuais de descoloração, sendo inicialmente em torno de 60% e 50% em um quarto ciclo de reação no período de 14 dias.

Embora os percentuais de descoloração mais elevados tenham sido obtidos em reações em pH 8,0, quando esta é realizada em batelada a enzima tem um desempenho mais estável, com percentual de descoloração em torno de 40% um mês após a imobilização em reações realizadas em pH 7,0.

Em sistema contínuo, a condição ótima sugerida pelo planejamento experimental apresentou boa performance de descoloração quando utilizados dois biorreatores em série. A descoloração nos 15 minutos iniciais chegou a aproximadamente 97% e cerca de 48% em 100 minutos de processo contínuo.

## VI.1 – Sugestões de Continuidade do Trabalho

- Avaliar novas faixas de concentração de  $H_2O_2$ , pH e temperatura visando otimização do sistema em batelada e contínuo utilizando a HRP imobilizada em esferas de vidro (aminopropil).
- Avaliar os efeitos de absorção do corante azul de metileno nos poros das esferas de vidro.
- Avaliar a viabilidade de reutilização das enzimas imobilizadas em sistema contínuo em série.
- Avaliar o desempenho do sistema contínuo em série com diferentes vazões e com alimentação distinta de corante e peróxido de hidrogênio.
- Avaliar o desempenho de outros métodos de imobilização da HRP na descoloração de azul de metileno.
- Utilizar técnicas de caracterização do produto obtido ao fim da reação, a fim de identificar a formação de intermediários, subprodutos e a degradação efetiva do corante.
- Avaliar o desempenho da HRP em diferentes classes de corantes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM (Associação Brasileira da Indústria Química e Produtos Derivados), Anuário da Indústria Química, 2013.

———. **Corantes e Pigmentos**. 2015. Disponível em: <  
[http://abiquim.org.br/corantes/cor\\_classificacao.asp](http://abiquim.org.br/corantes/cor_classificacao.asp) >.

ACEMIOGLU, B. **Adsorption of Congo red from aqueous solution onto calcium-rich fly ash**. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 274, n. 2, p. 371-379, 2004.

ALHADEFF, E. M. **Projeto e Aplicação de Sistemas de Biossensores Integrados para Detecção de Etanol**. Tese de Doutorado em Ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

ALMEIDA, C. A. P. **Caracterização do lutito barro branco e avaliação de sua capacidade como adsorvente de corantes usando o azul de metileno como modelo**. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ANDREAUS, J. et al. **Application of cyclodextrins in textile processes**. *Quimica Nova*, v. 33, n. 4, p. 929-937, 2010.

BASTOS, A. **Aplicação da Enzima Horseradish Peroxidase (HRP) em Alginato de Cálcio para Descoloração de Azul de Metileno**. Monografia de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

BECHTOLD, T.; TURCANU, A.; SCHROTT, W. **Electrochemical decolourisation of dispersed indigo on boron-doped diamond anodes**. *Diam. Relat. Mat.*, v. 15, n. 10, p. 1513-1519, 2006.

BELTRAME, L. T. C. **Caracterização de efluente têxtil e proposta de tratamento**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. 18ª ed., São Paulo, CETESB, 1993.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. **Immobilization of Enzymes: A Literature Survey**. In *Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, 2<sup>nd</sup> edition, p. 15-30, 2006.

BOURDILLON, C.; BELEY, M. **Immobilization of the peroxidase enzyme on a rotating vitreous carbon electrode**. *Nouveau Journal De Chimie-New Journal of Chemistry*, v. 7, n. 8-9, p. 521-526, 1983.

CALADO, V. ; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de Experimentos Usando o Statistica**. Ed. E-papers. Rio de Janeiro, 2003.

CTB – Ciência e Tecnologia da Borracha. Disponível em: <<http://www.ctb.com.pt/>>  
Companhia Pernambucana do Meio Ambiente - CPRH. **Roteiro complementar de licenciamento e fiscalização para a tipologia têxtil**. CPRH/GTZ, 125p, Recife, 2001. Disponível em: < <http://www.cprh.pe.gov.br/downloads/roteiro-textil.pdf> >.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). **Resolução 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf> >

———. **Resolução 430, de 13 de maio de 2011**.

Conselho Regional de Química - V Região. **Corantes e pigmentos**. 2011. Disponível em: < [http://www.crq4.org.br/quimicaviva\\_corantespigmentos](http://www.crq4.org.br/quimicaviva_corantespigmentos) >.

COSTA, S. A.; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. **Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications**. In *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Ed. CRC Press LLC, 2005.

CRISTÓVÃO, R. O. **Degradation of dye-containing textile effluents by enzymatic catalysis**. Tese de Doutorado em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Porto, Porto, 2010.

DA SILVA, R. A. R. **Intercalação e caracterização do interestratificado caulinita-ilita com dmsO e aplicação em remoção de azul de metileno em meio aquoso - cinética e termodinâmica de adsorção**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2012.

DE OLIVEIRA, A. R. M. D.; SZCZERBOWSKI, D. **Quinine: 470 years of history, controversy and science development**. *Quím. Nova*, v. 32, n. 7, p. 1971-1974, 2009.

DOS SANTOS, A. B. et al. **The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55 degrees C) and mesophilic (30 degrees C) anaerobic treatments**. Journal of Biotechnology, v. 115, n. 4, p. 345-353, 2005.

DOS SANTOS, A. B. et al. **Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor**. Enzyme and Microbial Technology, v. 33, n. 7, p. 942-951, 2003.

D'SOUZA, S.F. **Immobilized Enzymes in Bioprocess**. Special Section: Fermentation – Science & Technology, v. 77, n. 1, p. 69-79, 1999.

EPA - Environmental Protection Agency. **Profile of the Textile Industry**. Washington, 1997.

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FREITAS, K. R. **Caracterização e reuso de efluentes do processo de beneficiamento da indústria têxtil**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. **Textile dyes**. Quím. Nova, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. **Cosméticos: A Química da Beleza**. 2004. Disponível em: < [http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL\\_cosmeticos.pdf](http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_cosmeticos.pdf) >.

GELSLECHTER, L. **Tratamento de efluentes têxteis**. Monografia em Engenharia Química. Universidade Regional de Blumenau - FURB, Blumenau, 2011.

GOBI, N.; NISHA, S.; KARTHICK, S.A. **A Review on Methods, Applications and Properties of Immobilized Enzyme**. Chemical Science Review and Letters, v.1, n.2, p.148-155, 2012.

HALLER, M. **Tratamento de efluentes**. São Paulo. Editora Brasil Têxtil Ltda, p.48-49, 1993.

HOU, H. M. et al. **Enhancement of laccase production by Pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye**. Process Biochem., v. 39, n. 11, p. 1415-1419, 2004.

HUNGER, K. **Industrial Dyes - Chemistry, Properties and Applications**. Germany. Wiley-VCH, 648p, 2003.

IMPERT, O. et al. **Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper(II)-halide species in acidic aqueous media**. Dalton Transactions, n. 3, p. 348-353, 2003.

INOUE, F. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação quantitativa de corantes têxteis em efluentes industriais**. Dissertação de Mestrado em Química dos Recursos Naturais. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

KIMURA, I. Y. **Remoção de corantes reativos contendo grupos vinilsulfona e triazina por adsorção e coagulação/floculação com quitosana**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

KUMAR, E.; GANESH, V. **Immobilization of Horseradish Peroxidase Enzyme on Nanoporous Titanium Dioxide Electrodes and Its Structural and Electrochemical Characterizations**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 174, n. 3, p. 1043-1058, 2014.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURAN, N. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis**. Química Nova, v. 25, n.1, p. 78-82, 2002.

LABORATÓRIO GROSS S. A. **Bula do medicamento Sepurin®**. Disponível em: <http://www.gross.com.br>

LADCHUMANANANDASIVAM, R. **Processos químicos têxteis - Tingimento Têxtil**. v. III, 2ª ed. 2008.

LAGUNAS, F. G.; LIS, M. J. **Tratamento de efluentes na indústria têxtil algodoeira**. Química Têxtil, São Paulo: ABQCT, p.6-15, 1998.

LEÃO, M. M. D. et al. **Controle ambiental na indústria têxtil: Acabamento de Malhas**. Belo Horizonte. Segrad. Editora e Gráfica, 356 p, 2002.

LIMA, A. L. S.; PEREIRA, M. H. G.; PINTO, L. H. P. A. C. **Corantes Sintéticos – A Química das Cores**. 2015. Disponível em: < <http://www.abqct.com.br/artigost/artigoesp14.pdf> >.

MATEO, C. et al. **Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques**. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

NEUMANN, MIGUEL G.; GUESSNER, F.; A. P. P. CIONE, R. A. SARTORI, C. C. SCHMITT CAVALHEIRO. **Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa**. Quím. Nova, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

NICELL, J.; WRIGHT, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 4, p. 302-310, 1997.

NORMAN, P. I.; SEDDON, R. **Pollution control in the textile industry - the chemical auxiliary manufacturer's role**. Journal of the Society of Dyers and Colourists, p.215-218, 1991.

OLSSON, B.; OGREN, L. **Optimization Of Peroxidase Immobilization And Of The Design Of Packed-Bed Enzyme Reactors For Flow-Injection Analysis**. Analytica Chimica Acta, v. 145, n. JAN, p. 87-99, 1983.

PELEGRINI-BRITO, N. N.; PATERNIANI, J. E. S.; PELEGRINI, R. T. **Água para consumo, um bem limitado**. V Fórum de estudos contábeis, Rio Claro, 2005.

PEREIRA, A. R. **Avaliação das Espécies Reativas do Oxigênio na Oxidação de Substância Recalcitrante**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

PERES, S. C.; ABRAHÃO, A. J. **Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis – Uma primeira abordagem**. Química Têxtil. p. 22 – 39, 1998.

PODGORNIK, H.; POLJANSEK, I.; PERDIH, A. **Transformation of Indigo carmine by Phanerochaete chrysosporium ligninolytic enzymes**. Enzyme and Microbial Technology, v. 29, n. 2-3, p. 166-172, 2001.

POGGERE, P. A. et al., **Azul de Metileno: Propriedades e Tratamentos**. Anais do III ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica. Tecnológica Federal do Paraná UTFPR campus Toledo, 2011.

ROSSI, T. **Corantes Naturais: Fontes, Aplicações e Potencial para Uso da Madeira**. 2008. Disponível em: < <http://www.ipef.br/tecprodutos/corantes.asp> >.

SCHMIDT, T. F. **Estudo da Interação da Peroxidase de Raiz Forte em Interfaces Nanoestruturadas**. Dissertação de Mestrado em Ciências e Engenharia dos Materiais. Universidade de São Paulo, 2008.

SCOTTI, R. et al. **Methylene blue immobilized in cellulose/TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> : Electrochemical properties and factorial design**. Quimica Nova, v. 29, n. 2, p. 208-212, 2006.



SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; TORRES, J. A. **Descoloração de Corantes Industriais e Efluentes Têxteis Simulados por Peroxidase de Nabo (*Brassica campestris*)**. Química Nova, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012.

SIMONCIC, P.; ARMBRUSTER, T. **Cationic methylene blue incorporated into zeolite mordenite-Na: a single crystal X-ray study**. Science Direct, p.87-95, 2005.

Sistema AliceWeb – Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>

SOARES, G. M. B. **Aplicação de Sistemas Enzimáticos à Degradação de Corantes Têxteis**. Tese de Doutorado em Engenharia Têxtil. Universidade do Minho, 2000.

STRYER, L. **Biochemistry**. Ed. W. H. Freeman and Company. 3<sup>rd</sup> edition. New York, 1988.

SUMNER, J. B.; SOMERS, G. F. **Chemistry and Methods of Enzymes**. Academic Press, Inc., Publishes. New York, 1943.

The Society of Dyers and Colourists and The American Association of Textile Chemists and Colourists. **Colour Index**. Second Edition, 1956.

———. **Colour Index International**, Fourth Edition Online, 2006. Disponível em: <[http://www.sdc.org.uk/wp-content/uploads/2013/02/CI\\_How2RegisterProducts.pdf](http://www.sdc.org.uk/wp-content/uploads/2013/02/CI_How2RegisterProducts.pdf)>

Toyobo do Brasil - Enzima Horseradish peroxidase doada pela: Toyobo do Brasil - Fábrica Bioquímica, Rua Padre Bento, 858, CEP: 12326-400, Salto, São Paulo, 2012.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

VANDEVIVERE, P. C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. **Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 72, n. 4, p. 289-302, 1998.

VEITCH, N. **Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme**. Phytochemistry, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.

VELOSO, L. A. **DOSSIÊ TÉCNICO - Corantes e pigmentos**. Instituto de Tecnologia do Paraná. 2012. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTcwOA>>.

VIDART, J. M. M. **Simulação da difusão de corantes reativos em fibras de algodão**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. V. V.; LICHTIG, J. **Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes**. Química Nova, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

## APÊNDICE A

### Curvas de atividade enzimática

Os cálculos de atividade enzimática no capítulo V foram realizados a partir dos coeficientes angulares obtidos pela construção de gráficos com a leitura da absorbância em 510 nm da amostra com os reagentes, como descreve o capítulo IV, durante 1 minuto em intervalos de 5 segundos.

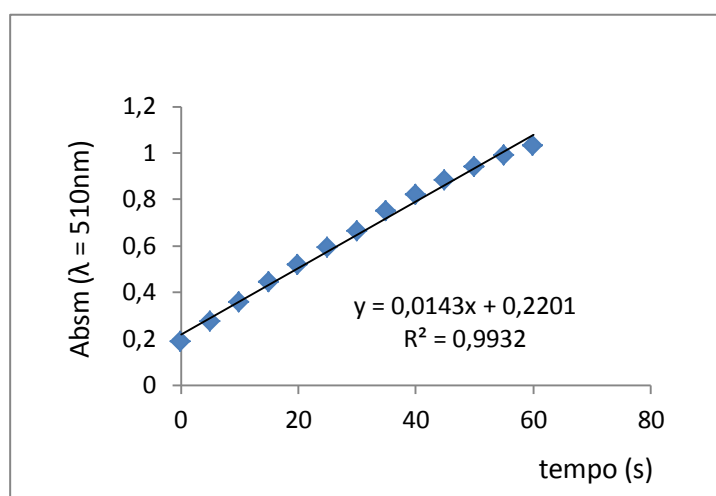


FIGURA A1 - Determinação da atividade enzimática da amostra concentrada. Curva  $Abs_m(\lambda = 510\text{ nm}) \times$  tempo (s) em tampão fosfato pH 7,0.

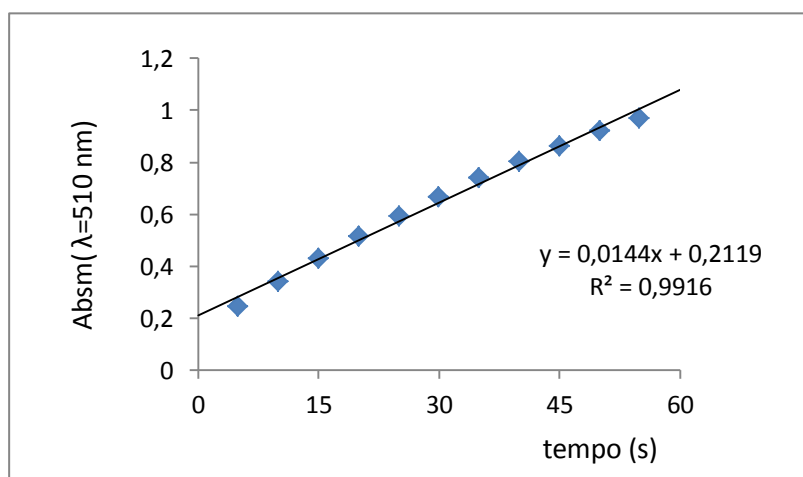


FIGURA A2 – Determinação da atividade enzimática amostra diluída. Curva  $Abs_m(\lambda = 510\text{ nm}) \times$  tempo (s) em tampão fosfato pH 7,0.

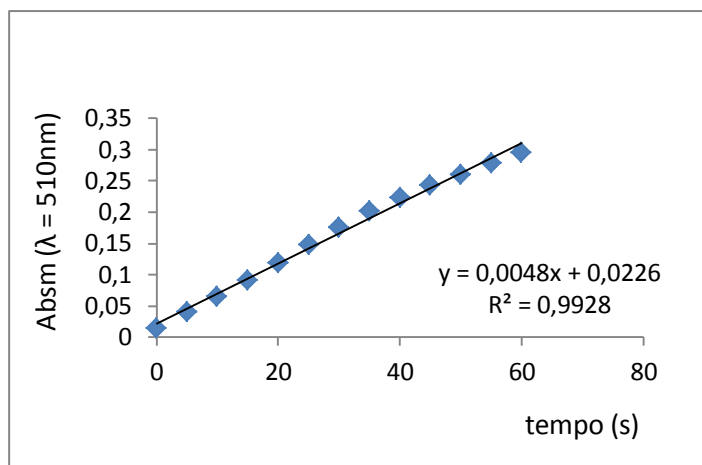


FIGURA A3 – Determinação da atividade enzimática. Curva  $Abs_m (\lambda = 510 \text{ nm})$  x tempo (s) em tampão fosfato pH 4,0.

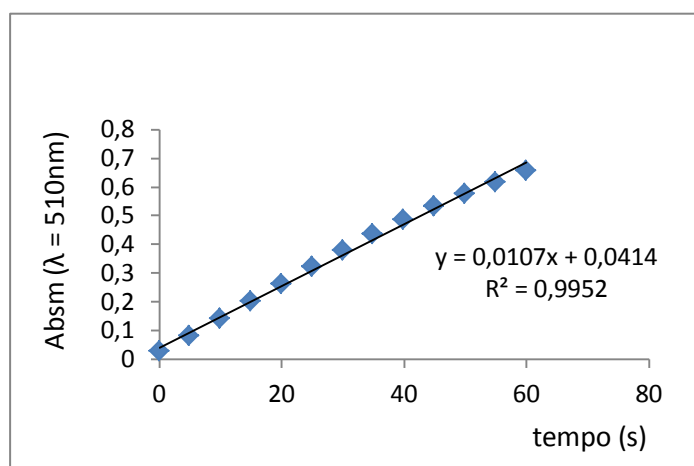


FIGURA A4 – Determinação da atividade enzimática. Curva  $Abs_m (\lambda = 510 \text{ nm})$  x tempo (s) em tampão fosfato pH 6,0.

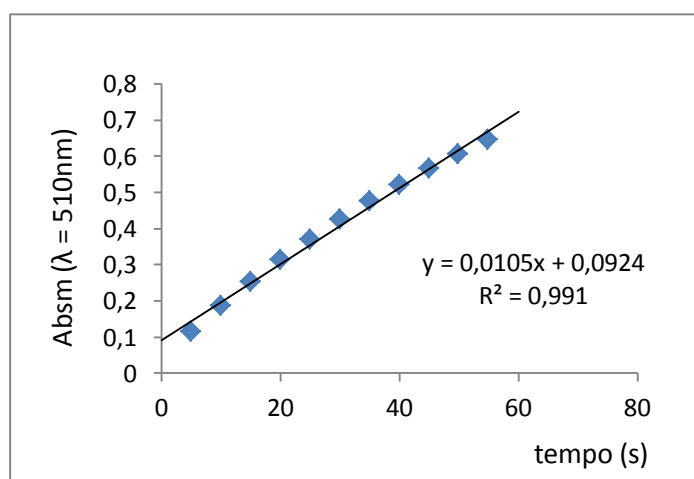


FIGURA A5 – Determinação da atividade enzimática. Curva  $Abs_m (\lambda = 510 \text{ nm})$  x tempo (s) em tampão fosfato pH 8,0.

## APÊNDICE B

### Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi feita a partir de uma curva padrão da absorbância em 595 nm de diferentes concentrações de albumina diluída em água, conforme descrito no capítulo IV. Sendo a primeira curva obtida com uso do reagente de Bradford preparado (Figura B1) e a segunda pelo reagente comercial (Figura B2).

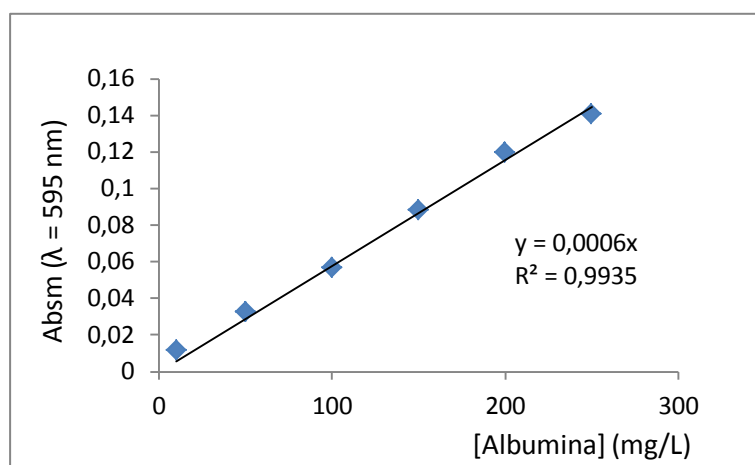


FIGURA B1 – Curva padrão I para dosagem de proteína.

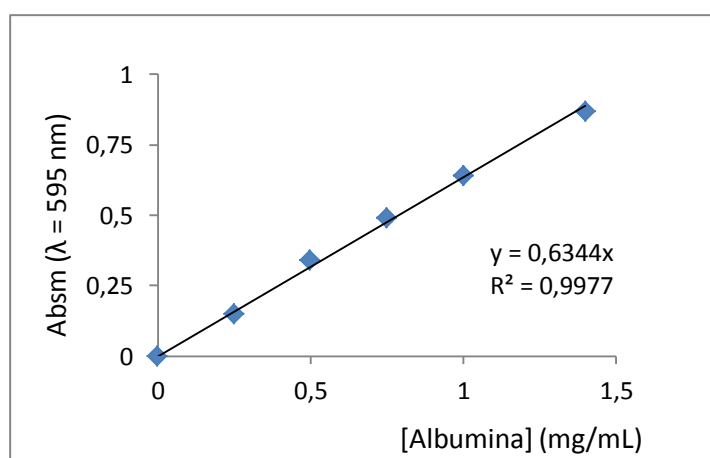


FIGURA B2 – Curva padrão II para dosagem de proteína.

## APÊNDICE C

### Análise qualitativa do sistema imobilizado após reação.

Sistema imobilizado após 3 horas de reação com azul de metileno e  $H_2O_2$  em diferentes pHs. Amostras 1(a) e 1(b) em pH 4,0; amostras 2(a), 2(b) e 2(c) em pH 6,0 e amostras 3(a) e 3(b) em pH 8,0. Qualitativamente é possível perceber a influência do pH e da concentração do corante na absorção deste nos poros da esfera de vidro.

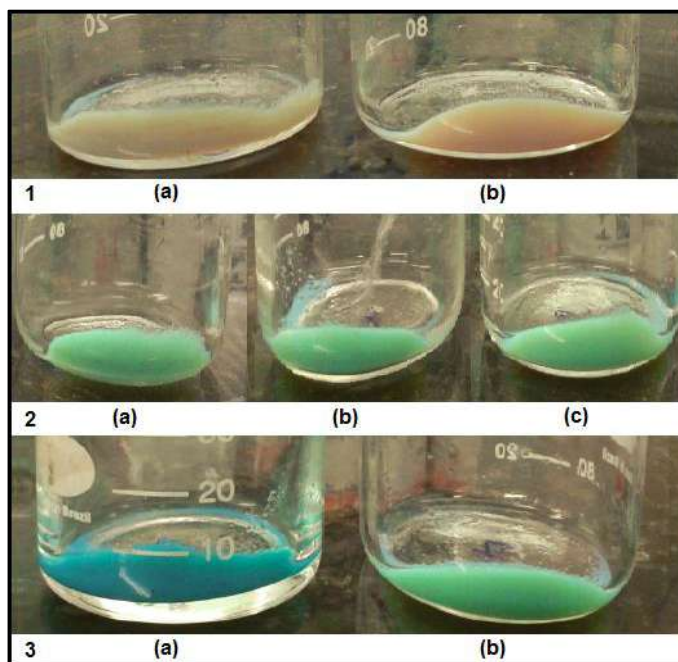


FIGURA C1 - Sistema Imobilizado após 3h de reação com azul de metileno e  $H_2O_2$  em diferentes pHs.