



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

**CAMPUS ERECHIM**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**CAMILA TORBES MARQUES**

**APLICAÇÃO DE PEROXIDASES NÃO COMERCIAIS EXTRAÍDAS DOS  
FARELOS DE ARROZ E SOJA NA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES**

**ERECHIM - RS**

**2016**

**CAMILA TORBES MARQUES**

**APLICAÇÃO DE PEROXIDASES NÃO COMERCIAIS EXTRAÍDAS DOS  
FARELOS DE ARROZ E SOJA NA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Helen Treichel e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gean Delise Vargas.

ERECHIM - RS

2016

# **UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**

Avenida General Osório, 413 D.

CEP: 89802-265

Caixa Postal 181

Bairro Jardim Itália

Chapecó - SC

Brasil

**CAMILA TORBES MARQUES**

**APLICAÇÃO DE PEROXIDASES NÃO COMERCIAIS EXTRAÍDAS DOS  
FARELOS DE ARROZ E SOJA NA DESCOLORAÇÃO DE EFLUENTES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS. Para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, defendido em banca examinadora em \_\_\_\_/\_\_\_\_/2016.

Orientador (as): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helen Treichel

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gean Delise Leal Pasquali Vargas

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helen Treichel – UFFS

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gean Delise Leal Pasquali Vargas – UFFS

---

Dr<sup>a</sup>. Simone Maria Golunski - UFFS

---

Prof. Dr. Altemir José Mossi – UFFS

Erechim/RS, 23 de março de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

A minhas orientadoras queridas, Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Gean Vargas e Helen Treichel, pela confiança e oportunidade de termos trabalhado juntas, pela disponibilidade e dedicação ao nosso trabalho, pelo incentivo, carinho, amizade e acolhimento ao longo desses dois anos.

A toda equipe de bolsistas de iniciação científica dos laboratórios de Microbiologia e Efluentes da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), pela dedicação diária e grande ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Aos laboratórios de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e de Ecotoxicologia do Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela parceria e colaboração direta a este trabalho.

A FAPERGS, pela bolsa concedida.

Aos meus pais e irmãs pelo grande incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida, e por tudo que sempre fizeram, com muito amor, por mim.

E a Deus, pela vida, por eu estar exatamente onde estou, pelas pessoas que coloca em meu caminho, e principalmente, pela paciência de me ouvir em todos os momentos.

## RESUMO

O presente trabalho investigou a aplicação das enzimas peroxidases não comerciais, extraídas de subprodutos de atividades agroindustriais (farelos de arroz e soja), na descoloração de um efluente sintético, o qual utilizou um corante têxtil em sua composição. Para tal, as enzimas foram submetidas ao contato com o efluente em agitador orbital, utilizando diferentes condições, a fim de avaliar a concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o volume de extrato enzimático ótimos para a reação de descoloração, através do uso da metodologia de planejamento experimental. Foi necessário adicionar  $H_2O_2$  para iniciar a reação de descoloração, pois a enzima peroxidase depende do  $H_2O_2$  para se tornar ativa. O uso da enzima peroxidase extraída de farelo de arroz (AT: 27,25 U/mL) quando em contato com o efluente sintético, resultou em aproximadamente 46% de remoção de cor, quando foram utilizados maiores volumes de extrato enzimático (15 mL) em menores concentrações de  $H_2O_2$  (20 e 40 mg/L) em 5h de reação. Para a enzima peroxidase extraída de farelo de soja não foram obtidos resultados satisfatórios de descoloração do efluente sintético. A partir dos resultados obtidos também foram analisados outros parâmetros do efluente sintético, a fim de investigar as modificações ocorridas no mesmo através do tratamento enzimático, onde foi possível observar, ao final do processo, que além da remoção de cor, a temperatura estava na faixa ambiente (25°C), o pH em torno de 7, a turbidez foi reduzida em aproximadamente 36%, os sólidos totais e fixos foram encontrados em menores quantidades e a concentração de  $H_2O_2$  residual foi de apenas 0,5 mg/L. Os dados obtidos neste estudo sugerem que a enzima peroxidase obtida através de uma fonte não comercial (farelo de arroz) possui potencial na descoloração de efluentes, já que seu processo de obtenção é fácil e viável economicamente se compararmos com sua fonte comercial. Neste contexto o trabalho realizado é extremamente relevante, uma vez que devido aos altos custos das enzimas comerciais, cada vez mais se faz necessário à descoberta por outras fontes enzimáticas mais baratas, e que possam ser alternativas promissoras aos tratamentos convencionais de efluentes.

Palavras chave: Enzimas. Peroxidases. Farelo de arroz. Efluentes.

## ABSTRACT

This study investigated the use of non-commercial peroxidases extracted from by-products of agro-industrial activities (rice and soy bran) in the discoloration of a synthetic effluent, which used a textile dye in its composition. To this, the enzymes were subjected to contact with the effluent in an orbital shaker using different conditions in order to evaluate the optimum concentration of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the optimum volume of enzymatic extract for the discoloration reaction, by the use of experimental design methodology. It was necessary to add  $H_2O_2$  to start the discoloration reaction because the enzyme peroxidase depends on  $H_2O_2$  to become active. The use of peroxidase enzyme extracted from rice bran (AT: 27.25 U/mL) when in contact with the synthetic effluent resulted in approximately 46% color removal when larger volumes of enzyme extract (15 mL) in smaller concentrations of  $H_2O_2$  (20 and 40 mg/L) were used in 5h reaction. For the peroxidase extracted from soybean bran, satisfactory results were not obtained for the discoloration of the synthetic effluent. From the obtained results, other parameters of the synthetic effluent were also analyzed in order to investigate the changes that occurred in it due to the enzymatic treatment. It was possible to observe at the end of the process, that besides color removal, the temperature was in the environment range ( $25^\circ C$ ), pH of around 7, the turbidity was reduced by approximately 36%, total and fixed solids were found in lesser amounts and the residual  $H_2O_2$  concentration was only 0.5 mg/L. The data from this study suggest that the peroxidase enzyme obtained from a non-commercial source (rice bran) has potential in effluents discoloration, since its obtaining process is easy and economically viable when compared to its commercial source. In this context, the study is extremely relevant, since due to the high cost of commercial enzymes, more and more it is necessary to discover other cheaper enzyme sources, which might be promising alternatives to conventional wastewater treatment.

Key words: Enzymes. Peroxidases. Rice bran. Wastewater.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do corante direto vermelho congo. ....	27
Figura 2. Perfil de eluição obtido a partir de cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100, das PFA (a) e PFS (b) .....	35
Figura 3. Superfície de resposta gerada através de delineamento composto central rotacional (DCCR) $2^2$ , para a descoloração do efluente sintético com a PFA.....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis e variáveis utilizadas no planejamento experimental da PFA.....	32
Tabela 2. Níveis e variáveis utilizadas no planejamento experimental da PFS.....	32
Tabela 3. Composição química dos farelos de arroz e soja.....	33
Tabela 4. Atividade específica de PFA e PFS após o processo de purificação. ....	35
Tabela 5. Propriedades das peroxidases não comerciais extraídas a partir de FA e FS.....	36
Tabela 6. Matriz do planejamento experimental, com os valores reais e codificados, em função da remoção de cor do efluente sintético (%) com a PFS (AT: 72,65 U/mL). ....	37
Tabela 7. Matriz do planejamento experimental DCCR 2 <sup>2</sup> , com os valores reais e codificados em função da remoção de cor do efluente sintético (%) com a PFA (AT: 27,25 U/mL).....	39
Tabela 8. Análise de variância para a avaliação da significância estatística do modelo proposto para a remoção de cor (%) do efluente sintético a partir de PFA. .	40
Tabela 9. Porcentagem de remoção de cor após o tratamento enzimático do efluente sintético com a PFA. ....	42
Tabela 10. Caracterização do efluente sintético antes e após o tratamento enzimático com a PFA. ....	47

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Objetivos .....	12
1.1.1. <b>Objetivo Geral</b> .....	12
1.1.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
2.1. Enzimas .....	14
2.1.1. <b>Peroxidases</b> .....	15
2.1.1.1. Extração da enzima peroxidase.....	16
2.2. Tratamento de efluentes .....	17
2.2.1. <b>Corantes</b> .....	18
2.2.2. <b>Biodegradação de Corantes</b> .....	20
2.2.3. <b>Tratamento de efluentes com enzimas</b> .....	21
2.3. Considerações Finais.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1. Matéria-prima .....	25
3.1.1. <b>Caracterização da fonte enzimática</b> .....	25
3.1.2. <b>Extração da enzima peroxidase</b> .....	25
3.1.3. <b>Purificação da enzima peroxidase</b> .....	26
3.1.4. <b>Medida da atividade específica da enzima peroxidase</b> .....	26
3.1.5. <b>Método de solubilização das peroxidases não comerciais</b> .....	27
3.2. Caracterização do efluente sintético .....	27
3.2.1. <b>pH</b> .....	28
3.2.2. <b>Cor</b> .....	28
3.2.3. <b>Turbidez</b> .....	28
3.2.4. <b>Demanda química de oxigênio (DQO)</b> .....	29
3.2.5. <b>Demanda bioquímica de oxigênio (DBO<sub>5</sub>)</b> .....	29
3.2.6. <b>Sólidos solúveis totais e fixos</b> .....	29
3.3. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio residual.....	30
3.4. Determinação da toxicidade do efluente sintético .....	30
3.5. Tratamento do efluente sintético com a enzima peroxidase extraída dos farelos de arroz e soja.....	31

3.6. Caracterização do efluente sintético pós-tratamento enzimático .....	32
3.7. Análise estatística .....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1. Caracterização química dos subprodutos utilizados para extração da enzima peroxidase .....	33
4.2. Extração e purificação da enzima peroxidase a partir dos subprodutos farelo de arroz e farelo de soja .....	34
4.3. Descoloração do efluente sintético com peroxidase extraída de farelo de soja.....	37
4.4. Descoloração do efluente sintético com peroxidase extraída de farelo de arroz.....	38
4.5. Caracterização do efluente sintético pós-tratamento enzimático .....	46
5. CONCLUSÃO .....	51
6. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS .....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil, o contexto da problemática ambiental vem sendo amplamente discutido pela sociedade. O crescimento demográfico, a crescente demanda por recursos e a utilização inadequada dos mesmos são o motivo de tais discussões, pois o conjunto destes acontecimentos tem causado problemas ambientais sérios nos diferentes ecossistemas. A consequência da demanda crescente por recursos é o aumento das atividades industriais, levando ao aumento da quantidade de efluentes gerados pelos diversos processos (ROCHA, 2011).

A partir do constante desenvolvimento de novas tecnologias, cada vez mais esses efluentes possuem em sua composição compostos orgânicos xenobióticos e persistentes, associando os sistemas produtivos com a queda da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos, frequentemente observada no país. Dentre estes compostos, os corantes azoicos merecem destaque, por possuírem estruturas químicas complexas de difícil degradação, por serem muito utilizados em atividades dos mais diferentes setores, e, principalmente, porque seus processos de produção requerem a utilização de grandes quantidades de água (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Como a principal função de um corante é conferir cor ao seu substrato, a principal característica de águas residuárias que contenham estes compostos é, portanto, a forte coloração. A cor em pequenas concentrações no efluente afeta a transparência, prejudicando a fotossíntese e modificando a solubilidade dos gases presentes prejudicando a flora e a fauna aquática. Já em grandes quantidades pode alterar os ciclos biológicos e por conta de sua elevada toxicidade, pode até mesmo possuir potencial carcinogênico e mutagênico (NGUYEN; JUANG, 2013).

Existem vários métodos físico-químicos aplicados em tratamento de efluentes contaminados (adsorção, coagulação, precipitação, oxidação, etc.), porém estes podem ser considerados ineficientes, porque podem gerar quantidade significativa de lodo, que por sua vez poderá causar poluição, considerando que, muitas vezes, estes métodos apenas transferem os contaminantes de fase, ou seja, os contaminantes continuam presentes no lodo (GIORDANO, 2003).

Neste sentido, uma das alternativas promissoras para o tratamento deste tipo de efluente é a biodegradação a partir da utilização de enzimas aliadas aos processos de tratamento convencionais já aplicados. Os processos enzimáticos podem ser empregados como tratamento primário de efluentes reduzindo a carga para um sistema de tratamento biológico, ou como tratamento terciário, removendo os compostos biorrefratários (BHUNIA *et al.*, 2002).

As vantagens principais de tratamentos enzimáticos estão na possibilidade de obtenção de enzimas de diversas fontes (a partir de micro-organismos, plantas e subprodutos de atividades agroindustriais), e na sua alta especificidade, atuando diretamente nos compostos. Além disso, os processos de tratamento no qual se utilizam enzimas são, normalmente, simples e de fácil controle, pois, dependendo, elas podem atuar em temperaturas próximas da ambiente e em alguns casos até em pH neutro (CORREA *et al.*, 2012).

A enzima peroxidase, pertencente à classe das oxidorreduções, já vem sendo a algum tempo utilizada, em pesquisas, na remoção de poluentes orgânicos de águas residuárias. Esta classe é caracterizada por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio, enquanto um doador de elétrons é oxidado. O grande potencial em sua utilização deve-se ao fato de possuírem baixa especificidade podendo atuar em uma diversidade de substratos. Diversos estudos já relataram o potencial das peroxidases em tratamento de efluentes que possuam contaminantes fenólicos, pesticidas, surfactantes, metais pesados, cianetos, bem como, na descoloração de efluentes (DURÁN, 2003; NICELL *et al.*, 1993; KARAM; NICELL, 1997; JORDAN; MULLEN, 2007).

Porém, muitas vezes, a utilização de fontes comerciais dessas enzimas, como por exemplo, a peroxidase de raiz forte (*Horseradish peroxidase*) torna este processo inviável economicamente. Neste contexto, considerando que o Brasil possui uma variedade de atividades agroindustriais e que estas produzem grandes quantidades de subprodutos, tem-se um grande potencial de fontes de enzimas que podem ser obtidas por procedimentos simples de extração. Com isso, o presente trabalho propõe a utilização de peroxidases não comerciais, extraídas de subprodutos de atividades agroindustriais locais (farelos de arroz e soja) no tratamento de um efluente sintético colorido, para avaliar sua descoloração e quebra

de cadeias mais complexas, visando melhorar a qualidade do efluente bem como aumentar a eficiência de tratamentos posteriores.

## 1.1. Objetivos

### 1.1.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho das enzimas peroxidases extraídas dos farelos de arroz e soja na descoloração de efluentes.

### 1.1.2. Objetivos Específicos

- 1- Realizar a extração e purificação da peroxidase presente nos farelos de arroz e soja.
- 2- Aplicar as enzimas obtidas através dos farelos, no tratamento de um efluente sintético colorido.
- 3- Avaliar a concentração de peróxido de hidrogênio necessária à ativação enzimática.
- 4- Caracterizar o efluente sintético, em termos de cor, turbidez, temperatura, pH, DQO, DBO<sub>5</sub>, sólidos solúveis totais e fixos e toxicidade.
- 5- Verificar o desempenho das peroxidases extraídas dos farelos de arroz e soja em conjunto com o peróxido de hidrogênio, na descoloração do efluente sintético.
- 6- Determinar as possíveis alterações nas amostras do efluente sintético submetidas ao tratamento enzimático observando os parâmetros do efluente anteriormente caracterizado.

7- Comparar e analisar os resultados dos tratamentos realizados com os parâmetros iniciais do efluente.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados conceitos relacionados à enzima peroxidase, à biodegradação de corantes a partir dessa enzima e ao tratamento enzimático de efluentes, importantes à pesquisa realizada neste trabalho.

### 2.1. Enzimas

Enzimas são proteínas, compostas por longas cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Conhecidas como biocatalisadores, as enzimas exercem as funções vitais de controle dos processos que transformam os nutrientes em energia e material celular e, participam dos processos de quebra de nutrientes complexos em nutrientes mais simples (AITKEN, 1993; ZANOTTO, 2003).

Quando comparadas com os catalisadores químicos as enzimas apresentam algumas vantagens por serem específicas e atuarem em condições brandas de pH e temperatura. Com isso, as indústrias passaram a ter interesse na utilização desses biocatalisadores, devido à alta atividade catalítica se comparadas com os catalisadores convencionais, e também por atuarem com alta eficiência em condições reacionais simples (MESSIAS, 2005; SANTOS, 2007).

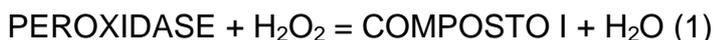
Além disso, estão presentes em todas as células vivas, podendo ser encontradas em células animais, vegetais e também em micro-organismos. Grande parte das enzimas de origem vegetal pode ser produzida a partir de subprodutos de atividades agroindustriais, como por exemplo, a peroxidase que pode ser extraída de farelo de arroz e soja, casca de soja, raízes de nabo, entre outros (ZANOTTO, 2003).

A atividade de uma enzima é expressa em unidade internacional de atividade enzimática (U), e descreve a quantidade de substrato que é convertido em produto por unidade de tempo em condições determinadas ( $1U = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$ , ou seja, a quantidade de enzima necessária para catalisar a transformação de  $1 \mu\text{mol}$  de

substrato por minuto em condições ótimas) (MOTAMED; GHAEMMAGHAMI, ALEMZADEH, 2009).

### 2.1.1. Peroxidases

Peroxidases (POD) (EC: 1.11.1.7) são proteínas que pertencem ao grupo das oxidorredutases, esta classe de enzimas é caracterizada por depender do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) para se tornar ativa. Portanto, possuem atividade típica nas reações de oxidação de compostos fenólicos com presença de peróxido de hidrogênio, sendo capazes de catalisar a redução do peróxido e também a oxidação de diversos substratos orgânicos e inorgânicos (IKEHATA, 2004). O ciclo catalítico dessa enzima consiste nas seguintes etapas:



O processo catalítico inicia quando o sítio ativo da enzima reage com o  $H_2O_2$ , e este, é reduzido formando  $H_2O$  e o composto I (1). O composto I é uma forma intermediária reativa que possui um estado de oxidação mais alto quando comparado com a enzima nativa. Logo em seguida, o composto I oxida uma molécula de substrato ( $AH_2$ ), formando uma molécula reativa do mesmo ( $AH\bullet$ ) e o composto II (2). O composto II oxida outra molécula de substrato, formando outra molécula reativa do mesmo,  $H_2O$  e a enzima na sua forma nativa (3). Os compostos reativos ( $AH\bullet$ ) formam um composto aromático na forma polimerizada (dímero)  $A_2H_{2(s)}$ , estes permanecem solúveis na reação podendo ser oxidados novamente, resultando em cadeias poliméricas longas ( $A_3H_3$ ,  $A_4H_4$ , etc.), gerando um aumento na redução da solubilidade (NICELL *et al.*, 1995; HINER *et al.*, 2001).

As POD são produzidas por uma grande variedade de plantas e micro-organismos, e possuem potencial de aplicação nos mais diferentes processos industriais, devido ao fato desta enzima conter características peculiares, como possuir potencial biológico para poder substituir os processos químicos

convencionais por processos bioquímicos, os quais utilizam insumos renováveis (PASSARD *et al.*, 2005; IKEHATA *et al.*, 2005; MANU *et al.*, 2009; HAMID *et al.*, 2009).

A partir de diversos estudos, surgiram propostas de aplicação desta enzima em tratamentos de águas contaminadas contendo compostos fenólicos e aminas aromáticas, remoção de peróxidos em produtos alimentícios, descoloração de corantes sintéticos e efluentes da indústria têxtil, entre outras. A sua utilização pode ser dada como alternativa quando os métodos convencionais de tratamento não forem eficientes devido à natureza do efluente (NICELL *et al.*, 1993; AGOSTINI *et al.*, 2002; DURÁN, 2003; JULSING *et al.*, 2008).

#### 2.1.1.1. Extração da enzima peroxidase

As peroxidases podem ser encontradas em uma ampla gama de fontes vegetais. Com isso, a verificação das diferentes fontes dessas enzimas pode viabilizar os custos de sua produção para posterior aplicação em processos industriais. No Rio Grande do Sul, destacam-se duas principais culturas, o arroz (*Oryza sativa L.*) e a soja (*Glycine max (L) Merrill*), as quais são potenciais fontes dessas enzimas.

Segundo a estimativa da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2015) na safra 2015/2016 o estado será responsável pela produção de 8.250 (oito milhões, duzentos e cinquenta mil toneladas) de arroz, correspondendo a 86,7% da produção total da região sul e 67,74% da produção nacional de arroz. Para soja, a produção estimada para o mesmo período é de 14.980 (quatorze milhões, novecentos e oitenta mil toneladas), representando 42% da produção regional e 14,5% da produção nacional de soja.

As enzimas POD são encontradas nos farelos de arroz e soja, que são gerados no processamento destes grãos. O farelo de arroz é um subproduto do beneficiamento do arroz, que representa aproximadamente 10% do peso total do grão e é obtido através do seu polimento. Este subproduto é a cutícula entre a casca e o grão de arroz. Já o farelo de soja é um subproduto do processo de extração do óleo de soja, que é fonte de proteínas. Estes subprodutos apresentam alto valor

nutritivo, sendo empregados basicamente na produção de ração animal (KHAN *et al.*, 2011).

O potencial destes subprodutos foi descoberto a partir de estudos realizados onde foram observados que em suas composições haviam alta concentração proteica, contendo diversas classes de enzimas (lipases, peroxidases, catalases, lipoxigenases, etc.), que podem ser empregadas em diversas atividades comerciais (INDIANI *et al.*, 2000; CAO *et al.*, 2009).

Considerando a utilização de dois subprodutos, que são gerados em grande escala, uma vez que são oriundos de atividades intensivamente realizadas no país, e que estes possuem grande potencial de fonte de proteínas, especialmente peroxidases, que este trabalho propõe a utilização da enzima peroxidase extraída a partir dos farelos de arroz e de soja.

## 2.2. Tratamento de efluentes

As atividades industriais podem utilizar a água para diversos fins, desde lavagens de equipamentos até diretamente nas etapas do processo industrial. A água que não é incorporada ao produto ou perdida por evaporação torna-se contaminada por resíduos ao longo do próprio processo industrial, resultando em efluentes líquidos. Os efluentes ao serem despejados, carregam seus poluentes aos corpos d'água, podendo alterar a qualidade da mesma. Atualmente a contaminação de águas naturais é considerada um dos grandes problemas da sociedade (KUNZ *et al.*, 2002).

Poluição hídrica é qualquer alteração física, química ou biológica da qualidade original de um corpo hídrico, que seja capaz de ultrapassar os padrões estabelecidos para a classe determinada, conforme o seu uso principal (CONAMA, 2005).

A composição de um efluente será dependente da atividade da qual este é gerado, e considerando a alta tecnologia empregada nos diferentes setores industriais, cada vez mais os efluentes serão sintéticos e de complexidade elevada. Além disso, as atividades industriais aumentam proporcionalmente ao crescimento

populacional, fazendo com que, diariamente, grandes volumes de efluentes sejam gerados (GIORDANO, 2003).

Os sistemas de tratamento de efluentes possuem como princípio básico transformar os poluentes dissolvidos e os poluentes em suspensão em gases inertes e/ou em sólidos sedimentáveis para que seja possível a posterior separação das fases sólida e líquida. Estes podem ser físicos (peneiramento, separação de óleos e gorduras, sedimentação, flotação), químicos (floculação, cloração, clarificação, oxidação e/ou precipitação química) ou biológicos (lodos ativados, filtros biológicos, lagoas anaeróbias, biodigestores, filtros anaeróbios). Além destes, existem outros processos avançados de tratamentos, que podem ser: adsorção, eletrodialise, troca iônica, filtração rápida, osmose inversa, entre outros (JORDÃO E PESSOA, 1995; GIORDANO, 2003).

Normalmente em um efluente são utilizados vários tipos de tratamentos, de modo a causar menor impacto ao corpo receptor. Porém, considerando a complexidade dos compostos presentes nos efluentes, os sistemas de tratamentos muitas vezes tornam-se ineficientes, ou no caso dos processos avançados, podem até mesmo ser inviáveis economicamente, fazendo com que sejam necessários métodos alternativos de tratamentos, que consigam de fato degradar estes poluentes para que não interfiram no funcionamento natural dos ecossistemas aquáticos.

### 2.2.1. Corantes

Corantes são compostos orgânicos intensamente coloridos que, quando aplicados a seus substratos (alimentos, cosméticos, plásticos, materiais têxteis, entre outros) lhe conferem cor. Com a grande utilização de corantes em diversas atividades, estima-se que anualmente sejam produzidos em torno de 700 mil toneladas de 10 mil tipos de corantes no mundo. Estes corantes normalmente apresentam estruturas moleculares complexas, podendo envolver até 500 reações intermediárias durante seus processos de síntese (BANAT *et al.*, 1996; ZANONI; CARNEIRO, 2001; ABIQUIM, 2015).

A estrutura molecular de um corante pode ser dividida em duas partes, o grupo cromóforo e o grupo auxiliar. O grupo cromóforo é o que dá a cor ao composto através da absorção de energia radiante, e pode ser classificado em azo, antraquinona, nitro, entre outros. O grupo auxiliar é o que permite a afinidade do corante pela fibra têxtil, natural ou sintética. Usualmente a classificação dos corantes se dá através da forma como eles se fixam a fibra, podendo ser: reativos, básicos, ácidos, diretos, dispersivos, azoicos, de enxofre, a cuba, pré-metalizados e branqueadores (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Os corantes azoicos são compostos coloridos sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Neste processo a fibra serve como agente de acoplamento, solúvel em água e que apresenta grande afinidade pela celulose. Ao adicionar um sal diazônio nesta reação, ele reage com o agente de acoplamento já fixado a fibra, formando um corante insolúvel em água (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Os corantes diretos são caracterizados por serem mais solúveis em água, e por sua capacidade de tingir fibras de celulose por meio de interações de Van der Waals. Estes corantes apresentam em suas estruturas mais de um grupamento azo (diazó, triazo, etc.) (VELOSO, 2012).

Estima-se que mais de 50% de todo o corante produzido e comercializado no mundo pertença à classe dos corantes azoicos. Essa classe de corantes é caracterizada por apresentar em sua estrutura um ou mais grupamentos azo ( $-N=N-$ ) que estão ligados a sistemas aromáticos, o que faz com que estes compostos sejam resistentes e de difícil degradação química e/ou biológica (KUNZ; ZAMORA 2002; HUNGER, 2003).

Corantes com estruturas mais simples terão taxas de degradação maiores. Por outro lado, é justamente esta complexidade das moléculas, que tornam esta classe de corantes de difícil degradação. Um dos motivos de sua vasta utilização está relacionado principalmente a sua facilidade de produção, sua grande diversidade de cores, que apresentam mais brilho e intensidade, se comparado com outros grupos, à simplicidade de sua síntese e ainda, o processo de tingimento pode ser realizado de várias formas, não sendo necessário o uso de máquinas especiais, tornando-os mais viáveis economicamente. Este tipo de corante é o mais utilizado

pela indústria têxtil, e conseqüentemente é muito evidente em efluentes deste setor (PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003)

### 2.2.2. Biodegradação de Corantes

Os tratamentos convencionais para os efluentes contendo corantes azoicos, normalmente são processos que utilizam produtos químicos e lodos ativados. Porém como estes compostos são estáveis e de natureza xenobiótica não são totalmente degradados por estes processos (MUKESH; KUMAR, 2005).

Compostos xenobióticos são substâncias químicas, geralmente de origem sintética, estranhas ao sistema biológico e com elevada dificuldade de degradação devido a sua natureza recalcitrante. Tanto os compostos xenobióticos quanto seus metabolitos podem ser tóxicos e/ou mutagênicos e/ou cancerígenos, podendo causar danos à saúde humana (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Neste sentido, surge o interesse no tratamento de efluentes contendo corantes. Muitos corantes são produzidos a partir de benzidina, por exemplo, que é uma substância cancerígena. Além disso, durante o processo de degradação, os corantes azoicos podem se transformar em aminas e compostos intermediários com potencial carcinogênico. Muitos dos corantes azo com potencialidade cancerígena foram proibidos de serem produzidos. Porém em países menos desenvolvidos, como o Brasil, Argentina, México, entre outros, ainda se produzem corantes à base de benzidinas, por conta de seu potencial econômico (BANAT *et al.*, 1996; GUARATINI; ZANONI, 2000).

Além dos problemas relacionados diretamente a saúde humana, há problemas imediatos em consequência do lançamento de efluentes contendo corantes em corpos d'água, pois estes compostos, mesmo em pequenas concentrações, prejudicam a penetração da luz, impedindo a fotossíntese, e ainda, como são tóxicos eles afetam a solubilidade dos gases, podendo ocorrer efeitos nocivos sobre a biota aquática local (FU; VIRARAGHAVAN, 2001; KUNZ; ZAMORA, 2002; PEARCE; LLOYD; GUTHRIE, 2003).

A presença de corantes em efluentes, também pode reduzir em até 50% do crescimento microbiano nos lodos ativados, causando a redução da taxa de degradação dos demais compostos presentes, retardando o próprio processo de tratamento (LEDAKOWICZ; GONERA, 1998).

Como os processos convencionais de tratamento de efluentes não conseguem remover os corantes em sua totalidade, a tentativa de eliminar ou reduzir o percentual destes compostos no meio ambiente é de extrema importância (HUNGER, 2003).

Os processos de descoloração de efluentes mais comumente empregados pelas indústrias são adsorção, precipitação, eletroquímica, fotoquímica, degradação química, entre outros. Alguns destes tem se mostrado eficientes, porém são processos complexos e, muitas vezes, não viáveis economicamente (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Em contrapartida os processos de biodegradação com enzimas são atualmente uma área promissora para o tratamento deste tipo de efluente, pois como os corantes azoicos são compostos xenobióticos, necessitam de enzimas específicas que possam degradá-los. Além disso, processos que utilizam enzimas em poluentes específicos vêm sendo amplamente pesquisados, pois através de avanços biotecnológicos, os processos de produção, extração e purificação de enzimas estão cada vez mais baratos e fáceis de realizar. Vários autores constataram que a destruição oxidativa de compostos coloridos poderá ser estimulada através da utilização de enzimas oxidativas (BHUNIA *et al.*, 2002; REGALADO *et al.*, 2004).

### **2.2.3. Tratamento de efluentes com enzimas**

A utilização de enzimas no tratamento de águas residuais industriais foi inicialmente proposta em 1930. A partir disso este processo tem sido bastante investigado porque é uma alternativa ao tratamento convencional que tem apresentado diversas vantagens, como o reconhecimento crescente da capacidade que as enzimas possuem para atuar sobre poluentes específicos no tratamento de

efluentes, bem como, diversos estudos onde as enzimas são produzidas através de procedimentos de isolamento e purificação de micro-organismos, ou também, obtidas a partir de subprodutos de atividades agroindustriais, agregando viabilidade econômica em sua utilização (DORS, 2006; YOUSEFI, HAMID-REZA, 2010; JAMAL et al., 2010; CORREA et al., 2012).

O interesse no tratamento enzimático de efluentes vem aumentando, pois, tem se observado, o aumento da concentração de poluentes orgânicos xenobióticos e persistentes nos efluentes, o que diminui a possibilidade da utilização de tratamentos químicos convencionais de maneira eficiente. Além disso, como as enzimas são catalisadores biológicos, apresentam vantagens potenciais quando utilizadas no tratamento de efluentes, porque podem ser aplicadas em processos com baixa ou alta concentração de poluentes; podem operar ao longo de uma ampla gama de pH, temperatura e salinidade; não há casos de efeitos de choques por carga de poluentes; não há necessidade de aclimatação de biomassa; apresentam redução no volume de lodo; e ainda há a facilidade e/ou simplicidade de controlar o processo. Enquanto os catalisadores inorgânicos possuem ácidos, bases, metais pesados e óxidos metálicos, as enzimas possuem alta especificidade, o que nos processos industriais é muito útil, porque este tipo de tratamento produz quantidades mínimas de subproduto, resultando no melhoramento qualitativo e quantitativo dos efluentes (AITKEN, 1993; KARAM; NICELL, 1997; HAMID-REZA, 2010).

Dentre os diversos tipos de aplicações potenciais de enzimas em tratamento efluentes, pode-se citar: efluentes que possuem contaminantes fenólicos, pesticidas, surfactantes, metais pesados ou cianetos, resíduos da indústria de celulose e papel, bem como da indústria alimentícia e têxtil, na desidratação de lodos, na degradação de pectina, entre outros (JORDAN; MULLEN, 2007).

Nestes processos, as enzimas podem atuar tanto na remoção de compostos recalcitrantes por precipitação, quanto na transformação destes compostos em outros produtos inócuos. Estes biocatalisadores podem modificar as características de um composto tornando-o mais receptivo ao tratamento aplicado posteriormente (KARAM; NICELL, 1997; DURÁN; ESPOSITO, 2000).

O potencial da enzima POD em tratamentos de efluentes originou-se através da *Horseradish Peroxidase* (HRP), também conhecida por peroxidase de raiz forte,

uma enzima de origem vegetal, encontrada na *Amoracia rusticana*, uma planta muito cultivada e colhida em países de clima frio. Vários estudos demonstram a eficiência da HRP na quebra de compostos azo aromáticos, em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O sistema HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é conhecido por conseguir degradar diversos compostos azoicos e fenólicos.

A partir disso, encontram-se na literatura trabalhos que relatam a eficiência desta enzima na descoloração de corantes e/ou efluentes. Forgiarini (2006) utilizou HRP na descoloração dos corantes Turqueza Remazol G133% e Azul Lanaset 2R, obtendo remoções de cor de aproximadamente, 59% e 94%, respectivamente. Além disso, a enzima foi avaliada também para descoloração de um efluente têxtil, onde foram obtidos 52% de eficiência.

Silva (2008) em seu trabalho avaliou o potencial da enzima HRP na descoloração dos corantes têxteis: Azul Drimaren X-3LR, Azul Drimaren X-BLN, Rubinol Drimaren X-3LR e Azul Drimaren CL-R, obtendo após o tratamento enzimático, os percentuais de remoção de cor de 99, 77, 94 e 97%, respectivamente.

No entanto, estes estudos demonstram a importância de conhecer a dosagem ótima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e POD, o pH e temperatura de reação ótimos, a afinidade e tempo de contato com determinado substrato, a concentração de corante, entre outros, para então, desenvolver um sistema de tratamento de efluentes com POD viável técnica e economicamente. É neste contexto, que surge o interesse em novas fontes de POD, e que sejam obtidas por processos fáceis e de baixo custo, permitindo sua utilização como biocatalisador ambiental, uma vez que a HRP por ser produzida em pequena escala, possui custo elevado, inviabilizando sua utilização em tratamento de efluentes (MOHAN *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005).

### 2.3. Considerações Finais

Considerando que as atividades dos setores de arroz e soja são intensamente exploradas no país, em especial na região sul, e que com isso, são gerados grandes quantidades de subprodutos (farelos de arroz e soja), que possuem potencial fonte

de enzimas peroxidases. E ainda, que a enzima HRP já possui potencial conhecido na descoloração de efluentes, porém devido ao seu alto valor de mercado não é viável economicamente para ser aplicada em processos de tratamento de efluentes, é de extrema importância à avaliação de fontes não comerciais dessa enzima na descoloração de efluentes.

Além disso, como na literatura atual existem poucos trabalhos que avaliam o potencial das enzimas POD extraídas de fontes não comerciais na descoloração de efluentes, principalmente se tratando de farelos de arroz e soja, acredita-se que os resultados obtidos neste trabalho vêm a contribuir com a busca por alternativas de tratamento de efluentes, que sejam capazes de eliminar/reduzir os compostos recalcitrantes e persistentes dos mesmos, uma vez que os tratamentos convencionais sozinhos tem se mostrado inviáveis e/ou ineficientes para tal.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Matéria-prima**

As amostras de farelos de arroz (FA) e soja (FS) foram adquiridas no comércio local, acondicionadas em embalagem apropriada à temperatura de 4°C até sua utilização. As peroxidases não comerciais foram extraídas, a partir dos farelos, e purificadas em parceria com o Laboratório de Micotoxinas da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS.

##### **3.1.1. Caracterização da fonte enzimática**

Segundo a metodologia oficial A.O.A.C. (2000), foram determinados os teores de umidade a partir do método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C (método nº 935.29); de lipídios através da extração com éter de petróleo de acordo o método nº 920.85; a determinação de cinzas pelo método nº 923.03, através de incineração das amostras em mufla a 550°C; o conteúdo proteico a partir do método de micro-kjeldahl, nº 920.87 e o teor de fibra bruta pelo método nº 991.43.

Os percentuais de carboidratos foram estimados por diferença na composição final, considerando o somatório dos teores de lipídios, proteínas, cinzas, umidade e fibra alimentar total.

##### **3.1.2. Extração da enzima peroxidase**

A extração da POD a partir dos farelos foi otimizada por Feltrin (2013) através do método descrito por Cardinali et al. (2011), onde 50 mL do meio tamponante extrator com concentrações de 0,040 mol L<sup>-1</sup> pH 5 e 0,010 mol L<sup>-1</sup> pH 4,7 foi adicionado a 5g dos farelos de arroz e soja, respectivamente, seguidos de agitação

mecânica (100 rpm) por 60 min. E logo após, centrifugados a 3220 x g por 10 min. a uma temperatura de 4°C.

### 3.1.3. Purificação da enzima peroxidase

A purificação partiu da filtração dos extratos enzimáticos e precipitação da enzima POD com acetona, método proposto por Boer *et al.* (2006). Ao filtrado foi adicionado 10 mL de acetona (1:3), a mistura foi mantida durante 24 horas a 8°C, seguida de centrifugação a 3220 x g, 4°C durante 40 min. O precipitado foi então dissolvido com tampão fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> pH 5 (FA) e pH 6 (FS).

A solução tampão contendo o extrato enzimático pré-purificado foi eluída por coluna cromatográfica de exclusão molecular com dimensões de 1,5 cm de diâmetro x 30 cm de altura, empacotada com Sephadex G-100 da Sigma-Aldrich, por um período de 24 h (FELTRIN, 2013).

### 3.1.4. Medida da atividade específica da enzima peroxidase

A atividade da enzima foi avaliada através da metodologia de Devaiah e Shetty (2009), onde se observa a ação da enzima em 1 mL do extrato enzimático, adicionando 2 mL de água destilada, 0,5 mL de guaiacol 1%, 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08% e 1,5 mL de tampão fosfato de sódio de pH 5,5 e 5,0 (5 mM), para as POD de farelo de arroz e soja, respectivamente. A reação foi realizada em banho termostático a 25°C por 20 minutos (POD de farelo de arroz) e a 35°C por 10 minutos (POD de farelo de soja). A transmitância dos compostos oxidados foi obtida em espectrofotômetro a 470 nm. A atividade enzimática após o processo de purificação foi estimada em termos de atividade específica, através da reação de oxidação do substrato a tetraguaiacol caracterizado pela coloração laranja.

A medida de atividade específica da POD teve como base a determinação do teor de proteína solúvel (mg/mL) no meio, quantificada de acordo Lowry (1951), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

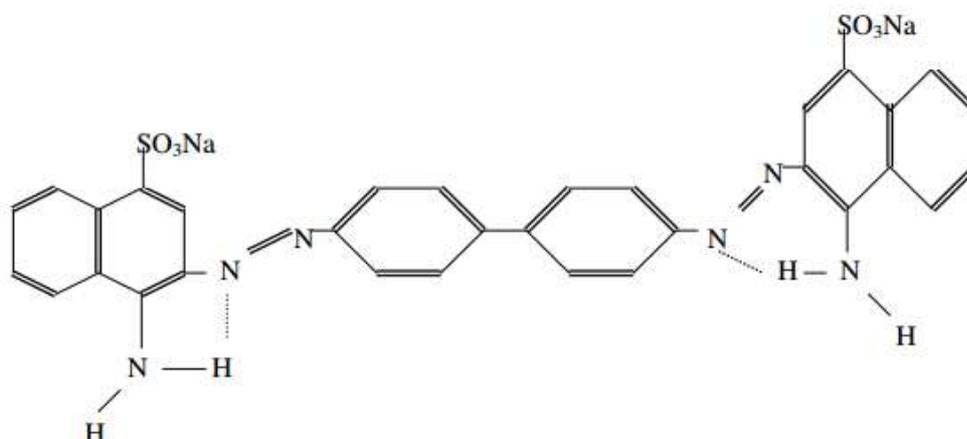
Uma unidade de atividade específica da enzima POD foi definida como a massa de proteína capaz de causar um aumento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto por mg de proteína (GARDA-BUFFON, BADIALE-FURLONG, 2010).

### 3.1.5. Método de solubilização das peroxidases não comerciais

Foram pesados 0,3g e 0,5g dos extratos enzimáticos de farelo de arroz e soja, respectivamente, e adicionados a 10 mL de tampão fosfato de pH 7,5 e 7,0, para os farelos de arroz e soja, respectivamente, ambos de 5 mM. O extrato solubilizado foi submetido ao tratamento do efluente sintético colorido (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011).

## 3.2. Caracterização do efluente sintético

A escolha da concentração do efluente sintético utilizada, baseou-se na literatura (MOHAM *et al.*, 2005; FORGIARINI, 2006), sendo de 100mg/L do corante vermelho 09 (figura 1) TINGECOR GUARANY IND. E COM.LTDA., de composição: cloreto de sódio, corante direto e dispersante, em água destilada.



**Figura 1. Estrutura do corante direto vermelho congo.**

(GUARATINI; ZANONI, 2000).

As análises utilizadas na caracterização do efluente, pH, cor, turbidez, DQO, DBO<sub>5</sub>, sólidos solúveis totais e fixos foram realizadas através da metodologia descrita no Standard Methods (AWWA, 1995).

### **3.2.1. pH**

O pH do efluente foi medido através do método potenciométrico, indicado pelo Standard Methods (AWWA, 1995). Sendo o medidor de pH utilizado um modelo Micronal B – 474.

### **3.2.2. Cor**

A análise de cor das amostras permitiu avaliar a remoção de sólidos dissolvidos presentes no efluente, e foi determinada em espectrofotômetro digital Modelo 724, através da leitura da absorbância a 455 nm, sendo expressa em mgPtCo/L (AWWA, 1995).

### **3.2.3. Turbidez**

A análise da turbidez das amostras de efluentes foi realizada, de acordo com o Standard Methods (AWWA, 1995), com o objetivo de avaliar a presença de sólidos em suspensão, estas foram feitas em espectrofotômetro, usando como comprimento de onda 450 nm, e expressas em Unidade Formazina de Turbidez (FTU).

#### **3.2.4. Demanda química de oxigênio (DQO)**

As análises da demanda química de oxigênio (DQO) do efluente sintético e das amostras após o tratamento foram realizadas utilizando o método colorimétrico de refluxo fechado segundo Standard Methods (AWWA, 1995).

Como, observou-se que o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) residual interfere na análise da DQO das amostras pós-tratamento, utilizou-se para a correção deste interferente, a realização de medidas periódicas de DQO em soluções de peróxido de hidrogênio, procedimento este similar ao adotado por Lin e Lo em 1997. Os valores de DQO encontrados foram então descontados dos resultados obtidos nas análises. Este procedimento foi adotado no sentido de verificar a DQO do tratamento enzimático em si, considerando que em tratamentos reais, a quantidade de  $H_2O_2$  residual seria eliminada (através de sistemas de tratamentos combinados) antes da deposição do efluente aos corpos d'água.

#### **3.2.5. Demanda bioquímica de oxigênio (DBO<sub>5</sub>)**

A determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>5</sub>) das amostras do efluente sintético foi realizada através do Método 5210 B, segundo Standard Methods (AWWA, 1995).

#### **3.2.6. Sólidos solúveis totais e fixos**

A determinação da quantidade de sólidos solúveis totais e fixos foi realizada através do método 2540 B, segundo Standard Methods (AWWA, 1995).

### 3.3. Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio residual

A determinação da concentração de peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$  foi realizada por permanganimetria, procedimento adaptado de Baccan (1979) onde a amostra contendo  $H_2O_2$  é titulada em meio ácido com permanganato de potássio ( $KMnO_4$ ).

A solução continha 25 mL da amostra, 50 mL de água destilada e 2 mL de ácido sulfúrico (HCl) concentrado. Sendo esta titulada com a solução padrão de  $KMnO_4$  0,0349 mol/L, sob agitação e aquecimento, até a coloração do  $KMnO_4$  persistir por, pelo menos, 30 segundos. A massa de  $H_2O_2$  presente na amostra foi obtida através da equação 1:

$$m_{H_2O_2} = MM \times n \quad (1)$$

Onde: m = massa de  $H_2O_2$  (g/mol).

MM = massa molar do  $H_2O_2$ .

n = número de mols do  $H_2O_2$ .

### 3.4. Determinação da toxicidade do efluente sintético

A toxicidade do efluente colorido antes e após o tratamento enzimático foi realizado de acordo com o método OECD 236 - *Fish Embryo Toxicity* - FET - Test (OECD 236, 2013), onde os embriões dos peixes (o organismo teste utilizado foi o *Danio rerio*, um peixe de água doce, originário da Ásia, pertencente à família *Cyprinidae*) são transferidos para placas de petri, contendo concentrações diferentes do efluente (12,5%, 25%, 50%, 75% e 100%), controle positivo e negativo.

A partir disso, são observados a cada 24h parâmetros como: coagulação, ausência de somito, não desprendimento da cauda e ausência de batimento cardíaco. Ao final do período de exposição (96h), foi determinada a toxicidade aguda com base nos resultados dos itens avaliados e a CL50 foi calculada. A CL50;96h (concentração letal mediana que causa efeito agudo/letalidade a 50% de um grupo

de organismos) foi calculada pelo método computadorizado Trimmed Spearman-Kärber, versão 1.5 (Hamilton *et al.*, 1977) com intervalo de confiança de  $p \leq 0,05$ . Todos os ensaios foram realizados em parceria com o laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ECOTOX/UFRGS).

### 3.5. Tratamento do efluente sintético com a enzima peroxidase extraída dos farelos de arroz e soja

Estudos indicaram que as temperaturas de 25°C e 35°C foram ótimas para a atividade máxima das enzimas, extraídas dos farelos de arroz e soja, respectivamente, bem como o pH ótimo em 5,5 para a POD de farelo de arroz e 5,0 para a POD de farelo de soja (FELTRIN, 2013). Estes parâmetros otimizados foram utilizados durante os estudos de tratamento real.

A amostra de efluente sintético (0,1 L) foi submetida a tratamento com as enzimas em diferentes condições, em agitador orbital a 160 rpm. Foram estudados períodos de até 24h em agitação, porém o aumento da remoção de cor do efluente sintético foi observado até 5h, permanecendo constante até 24h. Com isso nos demais ensaios foram utilizados 5h em agitação. As amostras foram inicialmente analisadas para remoção de cor, com leitura de absorbância em espectrofotômetro a 455 nm. A quantidade de corante degradado (R) foi calculado através da equação 2, a seguir:

$$R(\%) = \frac{ABS_{inicial} - ABS_{final}}{ABS_{inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:  $ABS_{inicial}$  = Absorbância inicial

$ABS_{final}$  = Absorbância final

### 3.6. Caracterização do efluente sintético pós-tratamento enzimático

O efluente sintético colorido pós-tratamento enzimático foi caracterizado, de acordo com os itens 3.2, 3.3 e 3.4.

### 3.7. Análise estatística

Na etapa de tratamento do efluente em diferentes condições reacionais, a metodologia de planejamento de experimentos foi utilizada, sendo que os níveis inseridos nas respectivas matrizes foram definidos após experimentos preliminares (Tabelas 1 e 2), onde a concentração de  $H_2O_2$  e o volume de extrato enzimático foram as variáveis independentes e a remoção de cor, a variável dependente.

**Tabela 1. Níveis e variáveis utilizadas no planejamento experimental da PFA.**

Variáveis	Níveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Volume de Enzima (mL)		0,18	1	3	5	5,82
[ $H_2O_2$ ] (mg/L)		40	50	75	100	110

**Tabela 2. Níveis e variáveis utilizadas no planejamento experimental da PFS.**

Variáveis	Níveis	-1	0	1
Volume de Enzima (mL)		1	2	3
[ $H_2O_2$ ] (mg/L)		50	75	100

Após a execução dos experimentos os mesmos foram tratados estatisticamente seguindo a ferramenta estatística. Nas demais etapas, os resultados foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos processos de extração e purificação da enzima peroxidase (POD) a partir dos farelos de arroz (FA) e soja (FS), bem como os resultados obtidos no tratamento enzimático do efluente sintético com a peroxidase de farelo de arroz (PFA) e a peroxidase de farelo de soja (PFS), além das análises físico-químicas do efluente sintético antes e após o tratamento.

### 4.1. Caracterização química dos subprodutos utilizados para extração da enzima peroxidase

A composição química dos subprodutos de atividades agroindustriais FA e FS, utilizados para a extração da enzima POD está representada na tabela 3 a seguir:

**Tabela 3. Composição química dos farelos de arroz e soja.**

Amostra	Umidade (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Fibras (%)	Carboidratos *
FA	10,4 ±1,2	14,6 ±5,4	10,4 ±0,6	20,8 ±0,9	3,5 ±5,3	40,3
FS	9,8 ±1,5	48,9 ±1,4	5,7 ±3,3	16,0 ±0,9	3,9 ±4,2	15,7

\*carboidratos estimados por diferença.

Fonte: adaptado de FELTRIN, 2013.

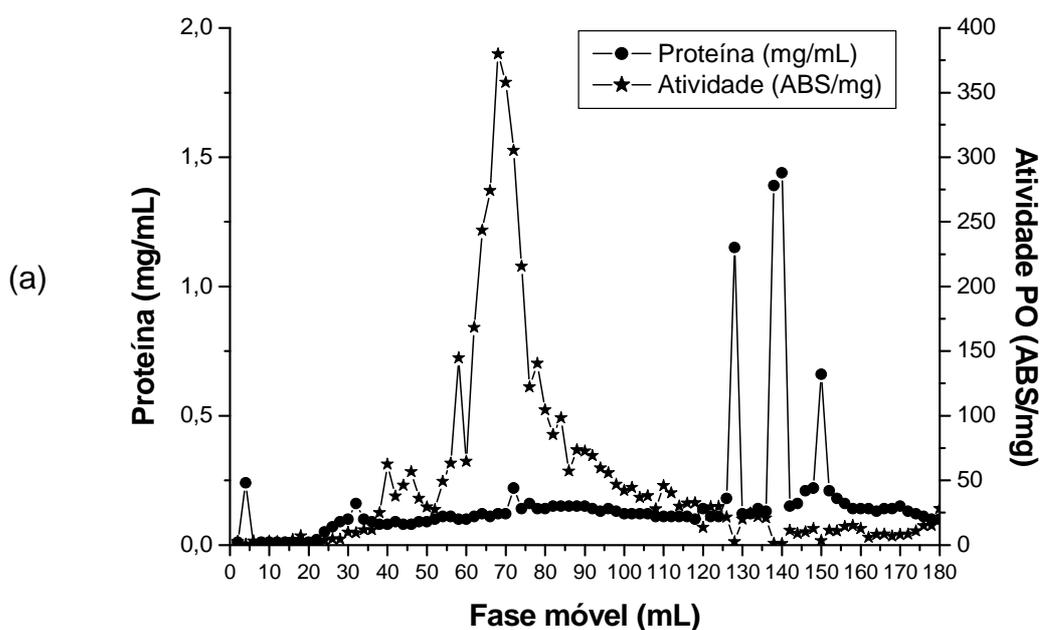
De acordo com a caracterização dos subprodutos, pode-se observar a maior quantidade de lipídios em FA, 4,8% a mais que em FS. Por outro lado, o FS apresentou alto percentual de proteína, tornando este subproduto uma fonte potencial da enzima peroxidase. A composição encontrada em ambos os subprodutos está dentro da faixa descrita na literatura (HUANG *et al.*, 2005;

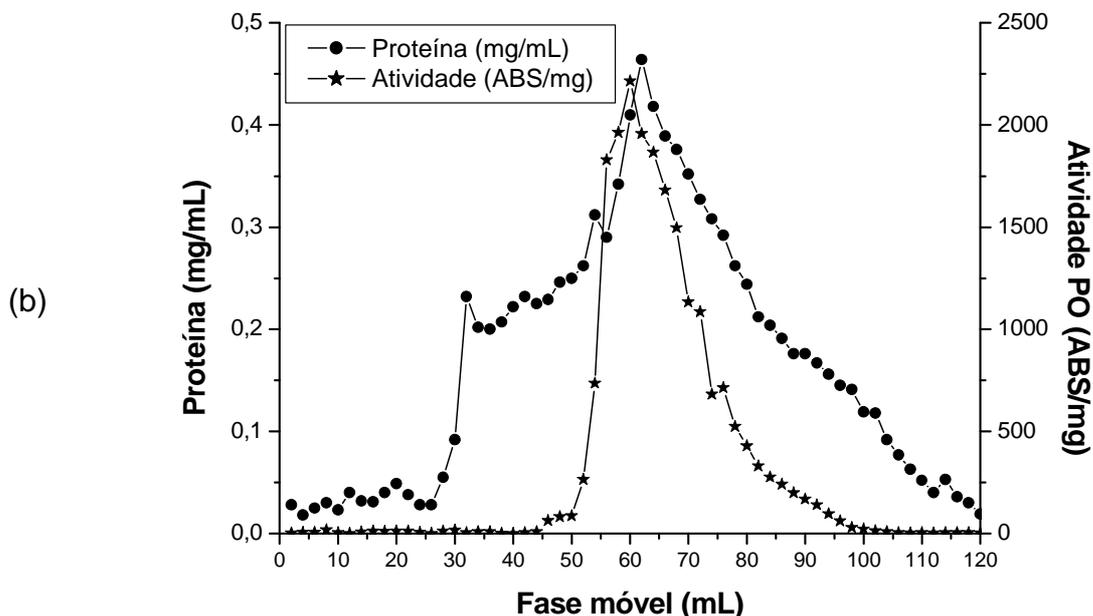
REDONDO-CUENCA *et al.*, 2006; MOONGNGARM; DAOMUKDA; KHUMPIKA, 2012; KADER *et al.*, 2012).

#### 4.2. Extração e purificação da enzima peroxidase a partir dos subprodutos farelo de arroz e farelo de soja

Após o procedimento de extração otimizado a partir de Feltrin (2013) o extrato bruto obtido de ambas as enzimas foi submetido à precipitação com acetona, para posteriormente ser purificado.

No processo de eluição cromatográfica busca-se a fração proteica onde exista a maior atividade enzimática com a menor possível concentração de proteínas. Através da figura 2 pode-se observar que nos intervalos de 56 a 88 mL e 22 a 45 mL de fase móvel encontram-se as maiores atividades da PFA e PFS, respectivamente. Nestes intervalos foram recolhidas alíquotas e reunidas para determinação do fator de recuperação (REC) e de purificação (FP) (Tabela 4).





**Figura 2. Perfil de eluição obtido a partir de cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100, das PFA (a) e PFS (b)**

**Tabela 4. Atividade específica de PFA e PFS após o processo de purificação.**

Fonte	Etapa de purificação	Atividade Total ( $U_t$ )	Proteína Total (mg)	Atividade Específica ( $U/mg^{-1}$ )	Fator de REC (%)	FP
FA	Extrato bruto	51103,00	1475,00	34,65	100	1,00
	Precipitação	14331,70	593,10	24,16	28	0,70
	Sephadex G-100	10446,15	146,15	71,48	20	2,06
FS	Extrato bruto	137731,00	760,00	181,23	100	1,00
	Precipitação	116424,00	198,80	585,63	84	3,23
	Sephadex G-100	27474,34	115,18	238,53	20	1,32

Fonte: adaptado de FELTRIN, 2013.

O fator de purificação mínimo necessário para considerar uma etapa de purificação eficiente é 1, no entanto, na etapa da precipitação por acetona em PFA este valor foi menor 1, provavelmente porque a acetona não possui composição adequada para remover os inibidores presentes no extrato enzimático. Porém como durante o processo de purificação observa-se um pico de atividade máxima da enzima POD, sugere-se que seria necessário aplicar em conjunto outra estratégia para concentração de proteínas. Já para PFS o processo de purificação está dentro da faixa considerada eficiente.

Estes resultados demonstram que o Sephadex G-100, em termos de REC, foi capaz de remover alguns componentes de baixa massa molecular importantes para a atividade enzimática. O que está em conformidade com a literatura, por exemplo, Mdluli (2005) que obteve um percentual de recuperação de 25% para POD de *Sclerocarya birrea* (fruta africana), após 3 etapas de purificação, e Manu e Rao (2009), que após 4 etapas de purificação alcançaram uma recuperação de 17% de POD de farelo de trigo.

De acordo com os métodos de extração e purificação utilizados, as propriedades e características das POD de FA e FS, estão dentro das faixas encontradas por Feltrin (2013), conforme a tabela 5.

**Tabela 5. Propriedades das peroxidases não comerciais extraídas a partir de FA e FS.**

	PFA	PFS
Massa Molecular	41 kDa	34 kDa
pH ótimo	5,5	5,0
Temperatura ótima	25°C	35°C
Estabilidade em pH	5,0*	6,0*
(*em temperatura de refrigeração)		
Estabilidade térmica	0°C (até 48 dias)	0°C (até 72 dias)

Fonte: adaptado de FELTRIN, 2013.

#### 4.3. Descoloração do efluente sintético com peroxidase extraída de farelo de soja

De acordo com experimentos preliminares, foram determinadas diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$  (50, 75 e 100 mg/L) para volumes diferentes de enzima (1, 2 e 3 mL), fixando o pH do efluente em 5 (pH ótimo da PFS) e mantendo constante o volume final de reação de 0,1L, em agitador orbital à 160 rpm e 35°C. As leituras de absorvância foram realizadas até 5h. A partir dessas condições foi realizado um delineamento composto central  $2^2$ , totalizando 7 experimentos realizados em triplicatas, onde a concentração de  $H_2O_2$  e o volume de extrato enzimático foram as variáveis independentes, e a remoção de cor, a variável dependente (Tabela 6).

**Tabela 6. Matriz do planejamento experimental, com os valores reais e codificados, em função da remoção de cor do efluente sintético (%) com a PFS (AT: 72,65 U/mL).**

Ensaio	Volume de enzima (mL)	[ $H_2O_2$ ] (mg/L)	Remoção de cor (%)
1	-1 (1)	-1 (50)	6,7
2	1 (3)	-1 (50)	3,9
3	-1 (1)	1 (100)	9,3
4	1 (3)	1 (100)	0,0
5	0 (2)	0 (75)	1,7
6	0 (2)	0 (75)	2,8
7	0 (2)	0 (75)	1,7

Através do delineamento composto central  $2^2$ , fica evidente que a maior remoção ocorreu quando a concentração de  $H_2O_2$  era maior (100 mg/L) e o volume de extrato enzimático menor (1 mL), indicando que somente o  $H_2O_2$  estava agindo sobre o efluente, e que quantidades maiores de enzima interferiam negativamente nesse processo.

O farelo de soja apresentou maior percentual de proteínas, se comparado com o farelo de arroz. Além disso, a atividade específica da PFS foi maior que a da PFA. No entanto, de acordo com os experimentos realizados, a PFS não apresentou resultados satisfatórios quanto à remoção de cor do efluente sintético estudado. Isto sugere que a PFS não tem afinidade pelo substrato utilizado, pois os corantes possuem estruturas químicas diferentes. Porém dada sua alta atividade e viabilidade econômica de sua produção, é importante investigar outros tipos de substratos, pois os resultados indicam que a PFS possui especificidade bastante elevada, agregando grande potencial em sua utilização.

#### 4.4. Descoloração do efluente sintético com peroxidase extraída de farelo de arroz

O pH do efluente foi fixado em 5,5 (pH ótimo da PFA) mantendo constante o volume final de reação de 0,1L, em agitador orbital à 160 rpm e 25°C. As leituras de absorbância foram realizadas até 5h. Baseado nessas condições foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$ , totalizando 11 experimentos realizados em triplicatas (Tabela 7).

**Tabela 7. Matriz do planejamento experimental DCCR 2<sup>2</sup>, com os valores reais e codificados em função da remoção de cor do efluente sintético (%) com a PFA (AT: 27,25 U/mL).**

Ensaio	Volume de enzima (mL)	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mg/L)	Remoção de cor (%)		
			Experimental	Predito*	
1	1 (-1)	50 (-1)	16,0	20,1	±4,1
2	5 (1)	50 (-1)	32,9	37,1	±4,2
3	1 (-1)	100 (1)	24,1	24,5	±0,4
4	5 (1)	100 (1)	38,4	39,0	±0,6
5	0,18 (-1,41)	75 (0)	14,6	12,3	±2,2
6	5,82 (1,41)	75 (0)	37,1	34,5	±2,5
7	3 (0)	40 (-1,41)	39,8	34,8	±4,9
8	3 (0)	110 (1,41)	39,1	39,2	±0,1
9	3 (0)	75 (0)	29,4	30,9	±1,5
10	3 (0)	75 (0)	32,0	30,9	±1,0
11	3 (0)	75 (0)	31,3	30,9	±0,3

\*valores preditos com ± desvio padrão.

De acordo com o planejamento foi possível observar que os maiores percentuais de remoção de cor ocorreram nos ensaios 7 e 8, onde utilizou-se 3 mL de volume de enzima e a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram os extremos 40 mg/L e 110 mg/L, respectivamente. Os resultados sugerem que o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não influencia diretamente na reação, até mesmo podendo reduzir a remoção de cor do efluente, se em excesso.

A análise estatística dos dados experimentais permitiu a validação do modelo empírico para a remoção de cor do efluente sintético a partir da enzima POD extraída de FA em função do volume de extrato enzimático e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas. A equação 3 apresenta os modelos codificados para a remoção de cor a partir de PFA:

$$Y_{\text{CALC}} = 30,91 + 7,88V - 3,75V^2 + 1,58[\text{H}_2\text{O}_2] + 3,08[\text{H}_2\text{O}_2]^2 - 0,65V[\text{H}_2\text{O}_2] \quad (3)$$

Sendo  $Y_{\text{CALC}}$  a remoção de cor (%),  $V$  o volume de extrato enzimático e  $[H_2O_2]$  a concentração de  $H_2O_2$  utilizadas no tratamento do efluente sintético, respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para a validação do modelo matemático codificado, com um coeficiente de correlação ( $R$ ) elevado de 0,90 (Tabela 8). O valor de  $F_{\text{calculado}}$  indica a significância do modelo e foi maior que o encontrado em  $F_{\text{tabelado}}$ . Os dados obtidos foram tratados estatisticamente, utilizando um intervalo de confiança de 95%. Os valores de  $R$  e  $F$  mostraram que o modelo da Equação (modelo matemático) foi capaz de representar os dados experimentais das variáveis em análise para tratamento do efluente sintético com a PFA.

**Tabela 8. Análise de variância para a avaliação da significância estatística do modelo proposto para a remoção de cor (%) do efluente sintético a partir de PFA.**

	SQ	GL	QM	F calculado
Regressão	703,0	5	140,60	<b>9,2</b>
Resíduo	75,87	5	15,17	
Total	778,91	10		

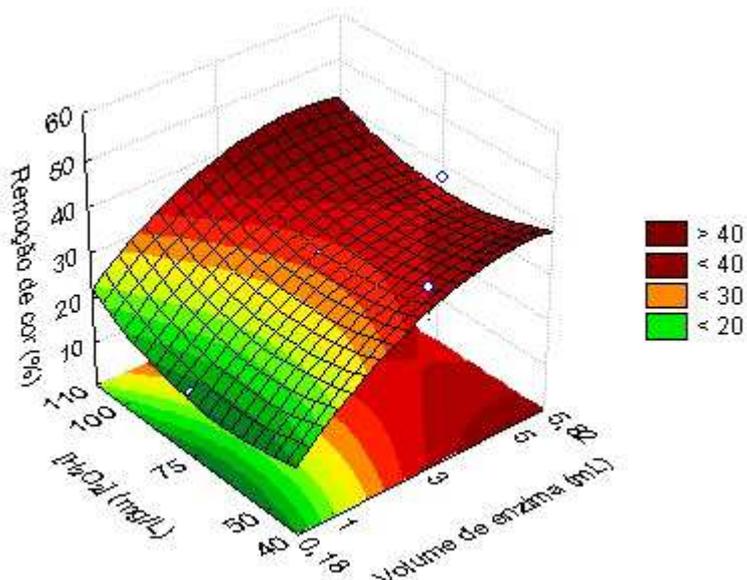
SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; QM = quadrados médios;

$F_{\text{tabelado}}_{5,5 \ 95\%} = 5,05$

Neste trabalho a análise foi realizada pelo teste estatístico de Fisher para a variância. Este teste indica o significado de cada um dos fatores controlados sobre o modelo testado. O valor de  $F$  foi obtido da razão entre a média dos quadrados da regressão e a média dos quadrados do resíduo.

A superfície de resposta gerada a partir do modelo validado para a remoção de cor do efluente sintético a partir de PFA está apresentada na Figura 3. Na análise estatística dos dados, o parâmetro volume de enzima foi significativo positivo ( $p < 0,05$ ), indicando que quanto maior o volume de enzima utilizado na reação, maior será a resposta em termos de remoção de cor do efluente sintético. Já a

concentração de  $H_2O_2$  não foi significativa, indicando que o  $H_2O_2$  não influencia diretamente na reação.



**Figura 3. Superfície de resposta gerada através de delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$ , para a descoloração do efluente sintético com a PFA.**

De acordo com a superfície de resposta gerada observa-se que nos ensaios onde foram utilizados os maiores volumes de enzima, mesmo combinados a menores concentrações de  $H_2O_2$  já obtivemos as maiores remoções de cor do efluente. Este resultado sugere que ao utilizarmos maiores volumes de enzima em pequenas concentrações de  $H_2O_2$  iremos obter maiores e/ou iguais percentuais de remoção de cor, se comparar aos ensaios onde se utilizam o mesmo volume de enzima em maiores concentrações de  $H_2O_2$ . Este resultado confirma a importância da otimização da concentração de  $H_2O_2$  neste tipo de reação, pois se sabe que  $H_2O_2$  em excesso inibe a atividade da POD, no entanto, se em pequenas quantidades pode limitar a taxa de reação (WU et al., 1994).

Com isso foram realizados testes nas mesmas condições anteriores: Temperatura: 25°C, 160 rpm, pH do efluente sintético: 5,5 e tempo de reação de 5h, porém com volumes de enzima de 8, 10 e 15 mL e concentração de  $H_2O_2$  de 20 e

40 mg/L, a fim de verificar as indicações da superfície de resposta gerada. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, e submetidos posteriormente aos testes de variância e Tukey, respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 9. Porcentagem de remoção de cor após o tratamento enzimático do efluente sintético com a PFA.**

Condições			
Ensaio	Volume de extrato enzimático	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	Médias *
1	8 mL	20 mg/L	28,45 ± 1,8 <sub>c</sub>
2		40 mg/L	36,16 ± 2,9 <sub>b</sub>
3	10 mL	20 mg/L	35,92 ± 0,9 <sub>b</sub>
4		40 mg/L	40,86 ± 3,5 <sub>b</sub>
5	15 mL	20 mg/L	42,69 ± 3,5 <sub>a, b</sub>
6		40 mg/L	48,51 ± 2,5 <sub>a</sub>

\*Resultados expressos como média ± desvio padrão; médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de tukey a 5% de probabilidade de erro. Os valores das médias são relativos aos experimentos das análises realizadas em triplicata.

A partir dos testes, foi possível perceber que os ensaios 2, 3 e 4 independente do volume de extrato enzimático e da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, estatisticamente obtiveram o mesmo resultado em termos de remoção de cor do efluente. Já, os ensaios 4 e 5, os quais utilizaram 10 mL de extrato enzimático em 40 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 15 mL de extrato enzimático em 20 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, também obtiveram estatisticamente os mesmos percentuais de remoção de cor, indicando que o aumento do volume de enzima deverá ser proporcional a diminuição da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio reacional. E os ensaios 5 e 6, onde utilizou-se o maior volume de extrato enzimático (15 mL), apresentaram respostas de remoção de cor estatisticamente iguais, significando que a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de fato, age de maneira secundária na reação.

Obeve-se através destes ensaios, maior remoção de cor em menores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 e 40 mg/L), como o planejamento já havia sugerido, porém o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deverá estar presente na reação. É importante salientar que

experimentos preliminares ao planejamento foram realizados com ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (somente o efluente sintético e a enzima peroxidase de ambos os farelos,) e também contendo somente o efluente sintético e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, onde não se obteve remoção de cor em nenhum dos casos.

Através destes resultados podemos constatar que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é importante na reação para ativar os sítios ativos da POD, porém o restante da conversão em produto ocorre em função da enzima com o substrato (corante) somente.

Numa reação enzimática sabe-se que quanto maior a concentração de substrato maior será a taxa de reação, até o momento em que os sítios ativos da enzima estiverem saturados de substrato, fazendo com que a taxa de reação permaneça constante. Ou seja, elevando o volume de enzima, num ambiente com elevadas concentrações de substrato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os sítios ativos da enzima provavelmente estarão saturados ao ponto em que a taxa de reação permanecerá constante, e não haja maior remoção de cor (SILVA, 2011).

Neste trabalho, a concentração de substrato (corante) utilizada em todos os ensaios foi de 100 mg/L, visando a maior remoção de cor do efluente, quando combinada com elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, provavelmente saturava os sítios ativos da enzima POD, fazendo com que os níveis de descoloração não aumentassem. Já quando o volume de enzima e substrato estavam em elevadas concentrações, porém combinados a menores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os sítios ativos da enzima não saturavam, podendo converter mais substrato em produto, aumentando a taxa de remoção de cor do efluente.

A precipitação do substrato (corante) pela enzima POD pode ser explicada através do ciclo da reação de oxidação que ocorre nesta classe de enzimas. Neste ciclo formam-se constantemente radicais livres, os quais se deslocam do sítio ativo da enzima para o meio da solução. Com isso, estas moléculas reativas tendem a iniciar uma reação em cadeia, na qual as moléculas aromáticas formadas vão se ligando e formando um produto poliaromático com solubilidade reduzida, precipitando o corante (NICELL, 1994; HINER et al., 2001).

Silva *et. al.* (2012), avaliaram o potencial de descoloração de efluente contendo corantes têxteis por peroxidase de nabo (*Brassica campestris ssp.*

*rapifera*). Os corantes utilizados foram Turqueza Remazol G 133% (CTR) e Remazol Brilliant Blue (RBBR) na concentração de 50 mg/L. A remoção de cor obtida para os efluentes sintéticos contendo os corantes CTR e RBBR foi de 37 e 58%, respectivamente.

Corrêa *et al.* (2012), avaliaram o potencial da peroxidase extraída de nabo em descolorir o corante reativo de ftalocianina Azul Reativo 21, onde obtiveram 57,7% de remoção de cor, utilizando uma atividade enzimática de 20,3 U/mL em 50 min. de reação.

Silva (2011) investigou a descoloração de corantes puros, hidrolisados e efluente sintético a partir de POD de nabo. Os corantes puros utilizados foram Turqueza Remazol G 133%, Remazol Brilliant Blue R, Levafix Brilliant Green ESBA-RG21, Remazol vermelho ultra RGB, Remazol brilliant Orange 3R e Acid Blue 62, obtendo remoção de cor de 58%, 66%, 66%, 5,5%, 9%, 47%, respectivamente. Os corantes hidrolisados foram o turqueza remazol g 133% e o remazol brilliant blue R (50mg/L), com adição de NaOH ( $2 \text{ g/L}^{-1}$ ) em pH 7, e obtiveram 53% (1h) e 69% (85 min. de reação), respectivamente. O efluente sintético foi preparado com os corantes turqueza remazol g 133% e o remazol brilliant blue R, com a adição de NaCl,  $\text{NaCO}_3$  e agentes molhante e sequestrante, onde foi possível a descoloração de 37% (95min) e 58% (90min), respectivamente.

Nouren e Bhatti (2014) avaliaram o potencial da POD extraída da casca de limão (Citrus Limon) na descoloração do corante violeta básico 3. Onde obtiveram 96,34% de remoção de cor quando utilizaram 42 U/mL de POD, 0,25 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,5 mM de ácido p-cumárico, pH 4,5, temperatura de 45°C e tempo de reação de 5 minutos.

Corrêa *et al.* (2009), propuseram a descoloração de um efluente sintético contendo o corante Remazol Brilliant Blue R com POD obtida através de casca de soja (31,87 U/mL), alcançando 53% de remoção de cor no tempo de reação de 7,5 minutos. Os mesmos autores testaram a descoloração do corante puro, onde obtiveram 79% de remoção de cor no mesmo tempo de reação. Eles apontaram que o decréscimo de remoção de cor do efluente em comparação ao corante puro deve-se provavelmente a presença de auxiliares químicos de tingimento, como agentes dispersantes e sequestrantes, entre outros.

Nos casos acima citados podemos perceber que, tanto as porcentagens de descoloração quanto as taxas de degradação ocorreram em velocidades diferentes, indicando que a especificidade das POD não comerciais é dependente da estrutura química de cada corante, suas estruturas e/ou peso molecular e também da posição dos grupos substituintes no anel aromático (SILVA et al., 2012).

Outro fator que pode estar relacionado à baixa biodegradabilidade de alguns corantes frente à POD é a concentração de enzima e corante bem como a presença de mediadores (agentes dispersantes, sequestrantes, molhantes, etc.), que podem acelerar ou reduzir as taxas de descoloração (SILVA, 2011).

Neste sentido, também é possível observar que os maiores percentuais de remoção de cor são obtidos quando se utilizam como substrato, corantes puros. Quando se utilizam auxiliares químicos e sais, por exemplo, a eficiência do tratamento enzimático é reduzida, pois estas espécies envolvidas no meio reacional podem se ligar fortemente, influenciando diretamente a especificidade enzima-substrato, além de poder formar outros produtos ou até mesmo desativar a enzima. Neste trabalho, o corante utilizado, que pode ser facilmente adquirido, e, portanto, muito utilizado em processos domésticos, já contém em sua composição sais e dispersantes, o que de uma forma bem simples, pode simular parte de um efluente têxtil comum.

Ao compararmos com trabalhos da literatura que utilizam outras fontes dessa enzima, é possível afirmar que as POD encontradas apresentam características muito distintas podendo possuir afinidade por diversos tipos de substratos. É importante destacar que a grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura que propõe a descoloração de corantes e/ou efluentes a partir de peroxidases utilizam corantes azuis em suas reações, onde se encontram os maiores percentuais de remoção de cor. Neste trabalho foi testada a descoloração do efluente sintético contendo o corante azul em sua composição, e não houve remoção de cor, indicando que a peroxidase não comercial estudada (PFA) não possui afinidade com corantes azuis. Em contrapartida, as peroxidases em geral apresentam pouca afinidade com corantes vermelhos, e neste caso, foi com o corante vermelho que obtivemos os maiores percentuais de remoção de cor. Essa variedade de diferentes POD é muito importante, porque possibilita encontrar, de maneiras simplificadas de obtenção,

POD específicas para vários substratos, como por exemplo, os inúmeros tipos de corantes existentes.

Além disso, as condições reacionais para o tratamento enzimático de efluentes a partir de POD dependerão das relações enzima:substrato:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma vez que essa classe de enzimas precisa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para tornar-se ativa. Porém, neste trabalho, através dos ensaios realizados foi possível confirmar que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é totalmente secundário na reação, podendo ser aplicado em pequenas doses, apenas para ativar os sítios ativos da PFA.

#### 4.5. Caracterização do efluente sintético pós-tratamento enzimático

Como, ao adicionar mais enzima na reação (15 mL), em 20 e 40 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os percentuais de remoção de cor foram estatisticamente iguais, e, ainda considerando que a utilização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deve ser mínima, pois ao final do processo não deve existir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual, ou ter o mínimo possível, as demais análises do efluente foram realizadas nas condições de 15 mL de extrato enzimático em 20 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a fim de investigar as mudanças nas características do efluente sintético colorido após o tratamento enzimático. Todas as análises foram efetuadas em triplicatas.

A especificidade da enzima POD está na remoção de cor do efluente, porém as possíveis alterações que este biocatalisador também promova ao efluente serão determinantes para a sua aplicação real em processos de tratamento. Para isso o efluente sintético foi caracterizado antes e depois do tratamento enzimático (Tabela 10).

**Tabela 10. Caracterização do efluente sintético antes e após o tratamento enzimático com a PFA.**

Efluente sintético têxtil [corante] = 100 mg/L		
	Sem tratamento enzimático	Após tratamento enzimático*
Ph	5,4	7,3
Temperatura	24,6 °C	26,6 °C
Condutividade	201,7 µs/cm	415,7 µs/cm
Cor	717,497 mgPtCo/L	402,805 mgPtCo/L
Turbidez	145,359 FTU	94,214 FTU
DQO	198,07 mg/L <sup>-1</sup>	337,8 mg/L <sup>-1</sup>
DBO <sub>5</sub>	195 mg/L <sup>-1</sup>	240 mg/L <sup>-1</sup>
Sólidos Totais	0,5 mg/L	0,3 mg/L
Sólidos Fixos	0,2 mg/L	0,16 mg/L
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] residual	**	0,5 mg/L

\*ensaios com 15 mL de PFA, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 20 mg/L, T = 25°C e tempo de reação de 5h. \*\* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionado aos ensaios no começo do processo na concentração de 20 mg/L.

Onde foi possível observar que o pH do efluente ao final do processo alcançou a neutralidade (7,3) este aumento no pH da reação deve-se ao fato do extrato enzimático bruto ter sido diluído em tampão fosfato de pH 7,5, e que a temperatura permaneceu em torno dos 25°C (temperatura ambiente), parâmetros positivos tendo em vista sua posterior deposição aos corpos d'água.

Além disso, houve redução de aproximadamente 36% da turbidez, o que é de extrema importância já que este parâmetro está relacionado ao grau de clareza das águas e conseqüentemente a incidência de luz solar na mesma. A quantidade de sólidos totais e fixos foi reduzida para 0,3mg/L e 0,16mg/L, respectivamente, confirmando a característica dos tratamentos enzimáticos de produzirem poucos volumes de lodo, se comparado aos tratamentos convencionais de efluentes.

A quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual encontrada ao final do processo foi muito pequena (apenas 0,5 mg/L), o que pode ser retirado do efluente em tratamentos

subsequentes. E a remoção de cor foi de 43,9%, comprovando a reprodutibilidade dos resultados anteriormente obtidos.

Ao analisarmos especificamente estes parâmetros, podemos afirmar que não houve grandes mudanças no efluente sintético pós-tratamento, o que pode ser considerado mais uma vantagem do tratamento enzimático, uma vez que tende a não causar grandes interferências, quando combinado a outros processos, podendo ser utilizado em conjunto com outras técnicas de tratamento de efluentes.

Porém, outros parâmetros devem ser considerados em tratamentos de efluentes, os quais também foram analisados neste trabalho. Como a condutividade que aumentou de 201,7  $\mu\text{s}/\text{cm}$ , no efluente bruto (antes do tratamento), para 415,7  $\mu\text{s}/\text{cm}$  pós-tratamento enzimático com PFA. Isto provavelmente ocorreu devido à quebra das ligações do substrato (corante) promovida pela enzima POD, pois o processo de degradação do corante pode aumentar o número de moléculas orgânicas dissolvidas, ocasionando esse aumento na condutividade do efluente (MARMITT et al., 2010).

Foi realizada também a análise da  $\text{DBO}_5$ , um parâmetro muito importante, pois vai indicar a quantidade de oxigênio consumido durante o processo de degradação bioquímica da matéria orgânica no efluente, no período de incubação de cinco dias. Neste caso houve um pequeno aumento da  $\text{DBO}_5$  de 195  $\text{mg}/\text{L}^{-1}$  (antes do tratamento) para 240  $\text{mg}/\text{L}^{-1}$  pós-tratamento enzimático. Este resultado indica que houve a quebra de moléculas recalcitrantes presentes no efluente, ou seja, a enzima POD foi capaz de quebrar algumas moléculas complexas de seu substrato (corante) (ANGELIS et al., 1998).

No entanto, como o tratamento enzimático do efluente envolve a adição de um extrato vegetal que contem alto conteúdo de carbono, a análise da DQO também é de extrema importância. Onde foi possível observar um aumento significativo da DQO de 198,07  $\text{mg}/\text{L}^{-1}$  antes do tratamento, para 337,8  $\text{mg}/\text{L}^{-1}$  após o tratamento enzimático. Este aumento pode estar relacionado ao fato do efluente sintético utilizado conter em sua composição auxiliares químicos, como dispersantes.

Cristóvão *et al.* (2009) realizaram o tratamento enzimático de um efluente sintético, contendo corantes reativos, utilizando lacase, e também obtiveram ao final do processo o aumento da DQO de 394 para 3.383 mg/L<sup>-1</sup>.

Silva *et al.* (2012) obtiveram um aumento da DQO de 56,4 mg/L<sup>-1</sup> para 238,8 mg/L<sup>-1</sup> após o tratamento enzimático com peroxidase de nabo, e relataram que esse aumento da DQO final pode ser decorrente do corante residual que fica na solução e/ou dos produtos de baixo peso molecular formados durante o tratamento enzimático do efluente.

A DBO<sub>5</sub> e a DQO são parâmetros que devem ser analisados em conjunto, pois quanto maior a proximidade entre seus valores (relação DBO<sub>5</sub>:DQO), maior será a biodegradabilidade do efluente (CETESB, 2009). Neste caso os valores da DQO são maiores que os da DBO<sub>5</sub>, indicando que o tratamento enzimático reduziu a biodegradabilidade desse efluente.

Foram realizados testes de toxicidade, através do método FET (*Fish Embryo Toxicity*), devido ao fato do tratamento enzimático do efluente sintético com PFA ser basicamente a degradação de um corante que possui cadeias complexas em sua estrutura molecular as quais estão sendo quebradas pela enzima peroxidase, podendo gerar produtos de caráter tóxico ou não.

Os resultados obtidos da amostra do efluente sintético antes do tratamento enzimático não apresentaram toxicidade pelo método FET. Já a amostra do efluente sintético após o tratamento com a enzima peroxidase apresentou toxicidade com uma CL<sub>50</sub>;96h (concentração letal) de 78,76% (73,5% a 84,4%). Os efeitos letais foram observados nas concentrações de 75% e 100% do efluente tratado. Apesar de não terem sido considerados nos cálculos da CL<sub>50</sub>, foram também observados, nas concentrações de 50% e 75% do efluente tratado, atraso no desenvolvimento dos embriões em relação ao grupo controle. Portanto, o tratamento enzimático do efluente sintético com a PFA apresentou toxicidade elevada pelo método FET.

Forgiarini (2006) avaliou em seu trabalho a toxicidade do corante turqueza remazol G 133% - CTR (na concentração de 100mg/L), utilizando o microcrustáceo (*Artemia salina*) antes e depois do tratamento com a HRP (*Horseradish peroxidase*),

onde obteve antes do tratamento uma CL50 de 87,5% e após o tratamento enzimático a CL50 foi de 60,7%, aumentando a toxicidade.

Silva (2011) também avaliou a toxicidade do corante turqueza remazol G 133%, antes e após o tratamento enzimático com a peroxidase de nabo, porém utilizando como bioindicador sementes de alface (*Lactuca sativa*) e obteve um aumento de 74,60% na toxicidade pós-tratamento. O autor realizou análises HPLC (High performance liquid chromatography) concluindo que este aumento é decorrente da formação (durante o tratamento) de metabólitos mais tóxicos do que a molécula parental.

De acordo com a literatura e como o efluente sintético antes do tratamento não apresentou toxicidade, os resultados deste trabalho sugerem que os intermediários formados durante o processo de degradação do corante pela enzima PFA são tóxicos e necessitam ser investigados quanto a sua composição.

Além disso, o tratamento enzimático de efluentes deve ser considerado em conjunto com os processos convencionais de tratamentos já utilizados, combinados aos tratamentos biológicos, com o objetivo de melhorar de fato a qualidade do efluente, para que este possa ser despejado em segurança aos corpos receptores.

## 5. CONCLUSÃO

Através do procedimento otimizado de extração da enzima peroxidase a partir dos farelos de arroz e soja, foram obtidas as atividades específicas de 27,25 U/mL e 72,65 U/mL, respectivamente. A PFA quando submetida ao contato com o efluente sintético, obteve os melhores percentuais de descoloração do efluente (aproximadamente 45,6%), quando se utilizou 15 mL de extrato enzimático, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 20 mg/L, em agitador orbital (160 rpm) a 25°C por 5 horas. Já a PFS não foi capaz de remover cor do efluente, mostrando que não possui afinidade com o tipo de corante utilizado neste trabalho.

Em relação às análises físico-químicas do efluente sintético após o tratamento enzimático com PFA, foi possível perceber que a enzima foi capaz de melhorar alguns parâmetros analisados, como pH, turbidez, sólidos totais e fixos, entre outros, preparando-o até mesmo para tratamentos posteriores.

Já os resultados dos testes de toxicidade demonstraram que o tratamento enzimático do efluente sintético com a PFA apresentou toxicidade elevada pelo método FET.

O potencial dessas enzimas tem sido demonstrado na remoção de corantes puros, reduzindo a descoloração, quando se adicionam agentes sequestrantes ou dispersantes, sais, etc. O que explica os percentuais de remoção alcançados neste trabalho, uma vez que o efluente sintético utilizado continha outros compostos além do próprio corante. Além disso, devido à simplicidade do processo de tratamento empregado e a viabilidade econômica da obtenção da POD a partir de farelo de arroz, o grande volume de enzima utilizado neste trabalho é vantajoso, uma vez que, a partir do método de solubilização, 10 mL de enzima, corresponde a apenas 0,3g de extrato enzimático.

Mesmo a HRP possuindo potencial de remoção de poluentes maior do que os encontrados pelas POD de outras fontes, o seu alto valor de mercado requer a possibilidade de utilização dessa enzima a partir fontes mais baratas. Neste contexto que a pesquisa por novas fontes e formas simplificadas de extração, purificação e aplicação de POD é de extrema importância.

Com isso, a partir do tratamento enzimático do efluente sintético com POD extraída de um subproduto da atividade agroindustrial (FA), foi possível confirmar o potencial das enzimas oxidoredutases não comerciais na degradação de corantes têxteis.

## 6. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

- Aprofundar os conhecimentos sobre as estruturas químicas e comportamento frente aos substratos das POD extraídas dos farelos de arroz e soja.
- Investigar outros tipos de substratos (corantes) em tratamento de efluentes com PFA e PFS.
- Estudar as possíveis espécies químicas formadas durante o tratamento enzimático, bem como no processo de degradação dos corantes, através de análises HPLC, a fim de verificar a toxicidade das mesmas.
- Aplicar métodos de imobilização da POD em suportes sólidos, para que seja possível remover a cor do efluente, e facilmente separá-la da reação, podendo ser reutilizada diversas vezes.
- Combinar o pré-tratamento enzimático a partir de PFA e/ou PFS com tratamentos biológicos subsequentes.
- Aplicar o tratamento enzimático com PFA e/ou PFS em efluentes e/ou sistemas de tratamento de efluentes reais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM, Associação Brasileira da Indústria Química. Corantes e pigmentos. Disponível em: [www.abiquim.org.br/corantes](http://www.abiquim.org.br/corantes). Acesso em 08/06/2015.

AGOSTINI, E.; HERNANDEZ-RUIZ, J.; ARNAO, M. B.; MILRAND, S. R.; TIGIER, H. A.; ACOSTA, M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 35, 2002.

AITKEN, M. D. Waste Water Applications of Enzyme: opportunities and obstacles. *The Chemical Engineering Journal*, v. 52, 1993.

ANGELIS, D. F.; CORSO, C. R.; BIDOIA, E. D. et al. Eletrólise de resíduos poluidores I - efluente de uma indústria liofilizadora de condimentos. *Química Nova*, v. 21, n.º. 1, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 16. Ed. Washington: AOAC International, 1995.

AWWA. STANDARD METHODS for the Examination of Water and Wastewater. 19th edition. Publication Office American Public Health Association, Washington. APHA, AWWA, WEF. 1995.

BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. *Química Analítica Quantitativa Elementar*. São Paulo: Edgard Blücher, p. 245. 1979.

BANAT, I. M. et al.; Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, v. 58, p. 217-227, 1996.

BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 72, 2002.

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.

CARDINALI, A.; TURSI, N.; LIGORIO, A.; GIUFFRIDA, M. G.; NAPOLITANO, L.; CALIANDRO, R.; SERGIO, L.; VENERE, D. D.; LATTANZIO, V.; SONNANTE, G. Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 49, p. 395-403, 2011.

CETESB, COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo – Série de relatórios. Governo do estado de São Paulo – Secretaria do Meio Ambiente. 2009.

CORRÊA, A. D.; SILVA, M. C.; TORRES, J. A. Descoloração de efluente têxtil sintético por peroxidase de soja como proposta de tratamento combinado ao processo anaeróbico. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil. 2009.

CORREA, A.D.; SILVA, M.C.; AMORIM, T.S.P.; PARPOT, P.; TORRES, J.A.; CHAGAS, P.M.B. Decolorization of the phthalocyanine reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.77, 2012.

CRISTÓVÃO, R. O. et al. Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase. *Bioresource Technology*, Texas, v. 100, p. 1094-1099, 2009.

DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 94, p. 119-126, 2009.

DURÁN, N. Applications of Oxidative Enzymes in Waste Treatment. *Wastewater Treatment Using Enzymes 2*, p. 41-51, 2003.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.28, p. 83-99, 2000.

FARIAS, S. Utilização da enzima Horseradish Peroxidase na lavagem pós-tingimento para remoção de corante reativo não fixado às fibras de algodão. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2013.

FELTRIN, A. C. P. Aplicação de Peroxidase para degradação de Deoxinivalenol. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande, Programa de pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande, 2013.

FORGIARINI, E. Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP). Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2006.

GARDA-BUFFON, J; KUPSKI, L; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 31, p. 198-203, 2011.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes Têxteis. *Química Nova*, v. 23, p. 71-78, 2000.

GIORDANO, G. Análise e formulação de processos para tratamento dos chorumes gerados em aterros de resíduos sólidos urbanos. 2003. 257 f. Tese de Doutorado (Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - PUC, Rio de Janeiro, 2003.

HAMID M.; REHMAN K. Potential application of peroxidases. *Food chemistry*, v.115, p. 1177-1186. 2009.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology*. v. 11, p. 714–719, 1977.

HINER, A. N. P. et al. Catalase-like oxygen production by horseradish peroxidase must predominantly be an enzyme-catalyzed reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, v. 392, n. 2, p. 295-302, 2001.

HUNGER, K. *Industrial Dyes: chemistry, properties, applications*. Frankfurt, Germany. Weinheim: Wiley-VHC, p. 660, 2003.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Recent Developments in the Production of Extracellular Fungal Peroxidases and Laccases for Waste Treatment, *Journal of Environmental Engineering and Science*, v. 03, p. 1-19, 2004.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; QIDWAI, T. Potential of peroxidase enzyme from *Trichosanthes dioica* to mediate disperse dye decolorization in conjunction with redox mediators. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.66, p.177–181, 2010.

JORDAN, S.N., MULLEN, G.J. Enzymatic hydrolysis of organic waste materials in a solid-liquid system, *Waste Management*, v. 27, p. 1820-1828. 2007.

JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. Tratamento de Esgotos Domésticos, concepções clássicas de tratamento de esgotos domésticos, 3ª ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995.

KARAM, J.; NICELL, J. Potential Application of Enzymes in Waste Treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.69, p. 141-153, 1997.

KIM, G.Y.; LEE, K.B.; CHO, S.H.; SHIM, J.; MOON, S.H. Electro enzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *Journal of Hazardous Materials*, v.126, p 183-188, 2005.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. P.; Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v. 25, p. 78-82, 2002.

MARMITT, S.; PIROTTA, L. V.; STÜLP, S. Aplicação de fotólise direta e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. *Química Nova*, v. 33, n°. 2, p. 384-388, 2010.

MOHAN, S.V.; PRASAD, K.K.; RAO, N.C.; SARMA P.N. Acid azo dye degradation by free and immobilized *Horseradish* peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*, V. 58, p. 1097 – 1105, 2005.

MOTAMED, S.; GHAEMMAGHAMI, F.; ALEMZADEH, I. Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase: Purification and Characterization. *Industrial Engineering Chemical Research*, v. 48, p. 10614–10618, 2009.

MUKESH, Doble; KUMAR, Anil; Biotreatment of industrial effluents. 336 p. fev, 2005.

NGUYEN, T. A.; JUANG, R-S. Treatment of waters and wastewaters containing sulfur dyes: A review. Chemical Engineering Journal, v. 219, p.109–117, 2013.

NICELL, J. A.; BEWTRA, J. K.; BISWAS, N.; TAYLOR, K. E. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. Water Research, v. 27, p. 1629–1639. 1993.

NICELL, J. A. Kinetics of horseradish peroxidase-catalyzed polymerization and precipitation of aqueous 4-clorofenol. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, London, v. 60, n. 2, p. 203-215, 1994.

NOUREN, S.; BHATTI, H. N. Mechanistic study of degradation of basic violet 3 by Citrus Limón peroxidase and phytotoxicity assessment of its degradation products. Biochemical Engineering Journal 95. 9-19. 2015.

OECD. Guideline for Testing of Chemicals, 203, Fish, acute toxicity test. Available at: <http://www.oecd.org>, 1992.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Report, v. 24, p. 255–26. 2005.

PEARCE, C. I.; LLOYD, J. R.; GUTHRIE, J. T.; The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. Dyes and Pigments, v. 58, p. 179-196, 2003

REGALADO, C.; GÁRCIA-ALMENDÁREZ, B.E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M.A. Biotechnological applications of peroxidases. Phytochemistry Reviews 3, p. 243–256, 2004.

ROCHA, J.M. Sustentabilidade em Questão. Jundia-SP: Paco editorial, 2011.

SILVA, M. C. C.; TORRES, A. D.; AMORIM, J. A.; PESSOA, M. T. S. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (Brassica campestris). Química nova, v. 35, 2012.

SILVA, M. C. Degradação de corantes e remediação de efluentes têxteis por extrato bruto de peroxidase de nabo. Tese (Doutorado em Agroquímica e Agrobioquímica) - Universidade Federal de Lavras, Programa de pós-graduação em Agroquímica, Lavras, MG, 2011.

SILVA, M. R. Estudo da enzima Horseradish peroxidase (HRP) no descoramento dos corantes têxteis Azul Drimaren X-3LR, Azul Drimaren X-BLN, Rubinol Drimaren X-3LR e Azul Drimaren CL-R. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em Química, Rio de Janeiro, 2008.

UNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G; DURÁN, N. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. Química Nova, v. 25, p. 78-82, 2002.

VELOSO, L. de A. Corantes e Pigmentos. Dossiê Técnico. Instituto de Tecnologia do Paraná. p. 15-20, 2012.

YOUSEFI, V.; HAMID-REZA, K. Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by Coprinus cinereus peroxidase. International Biodeterioration & Biodegradation, v.64, p.245-252, 2010.

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. Ciência Hoje, v. 9, n. 174, p. 61-64, agosto 2001.

ZANOTTO, S.P. Utilização de enzimas e microrganismos para a obtenção de compostos opticamente ativos. 2003. 123 f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2003.

WU, J. et al. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition mode on enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. The Canadian Journal of Chemical Engineering, Ottawa, v. 72, n. 5, 1994.