



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL**  
*CAMPUS ERECHIM*  
**CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

**NATALIA KLANOVICZ**

**VALORAÇÃO DE PEROXIDASES NÃO COMERCIAIS VISANDO APLICAÇÃO EM  
REAÇÕES DE INTERESSE AMBIENTAL**

**ERECHIM  
2019**

**NATALIA KLANOVICZ**

**VALORAÇÃO DE PEROXIDASES NÃO COMERCIAIS VISANDO APLICAÇÃO EM  
REAÇÕES DE INTERESSE AMBIENTAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal da Fronteira Sul  
*Campus* Erechim como parte das exigências  
para obtenção do título de Engenheira  
Ambiental e Sanitarista.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helen Treichel  
Coorientador: Prof. Dr. Anderson André Genro Alves Ribeiro

**ERECHIM  
2019**

**NATALIA KLANOVICZ**

**VALORAÇÃO DE PEROXIDASES NÃO COMERCIAIS VISANDO APLICAÇÃO EM  
REAÇÕES DE INTERESSE AMBIENTAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal da Fronteira Sul  
*Campus* Erechim como parte das exigências  
para obtenção do título de Engenheira  
Ambiental e Sanitarista, defendido e aprovado  
em banca examinadora em 09/07/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helen Treichel (Orientadora)**  
UFFS - Erechim

**Prof. Dr. Anderson André Genro Alves Ribeiro (Coorientador)**  
UFFS - Erechim

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Teresinha Hartmann**  
UFFS - Erechim

**Prof. Me. Alan Rempel**  
UFFS - Erechim

Erechim/RS, julho de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão infinita ao universo e suas energias, sem as quais eu não teria chegado onde e como cheguei.

À minha família, Mãe, Pai, Carol, Mônica, Artur e Jess, minha base sólida que por tantas vezes acompanharam meus avanços nessa jornada chamada vida de mais longe do que eu gostaria. Que deram os principais impulsos para que esse caminho fosse próspero e leve. Mãe e pai, a vocês que por muitas vezes deixaram de lado a própria vida pelas filhas, minha eterna gratidão. Irmãs, o universo não poderia ter designado melhores mentoras para me ensinar tanto sobre tudo.

Ao acolhimento recebido pela minha mentora de vida científica e símbolo da força da pesquisa brasileira, Prof<sup>a</sup>. Helen, agradeço por abraçar minhas ideias, me inspirar diariamente dando o exemplo e me ensinar o caminho e o amor pelo trabalho. Costumo dizer que não sei se eu escolhi ser pesquisadora ou se a pesquisa me escolheu, mas todo amor que hoje sinto à arte de fazer ciência devo à equipe LAMIBI, que me ensinou tanto e se tornou minha segunda casa. Agradecimento especial à Frumi, que me apresentou ao grupo, me norteou no início da jornada e tornou-se uma grande mentora na pesquisa e na vida, à Thami, um ser com um coração tão imenso sempre disposta a auxiliar, conversar e ouvir e à Tia Gis, que tornou o ambiente de trabalho tão leve e com uma energia contagiante. Às minhas queridas voluntárias, Andressa e Leti, pela paciência e seriedade com que me acompanharam durante este trabalho. Saibam que ele é nosso.

Um agradecimento especial ao Prof. Anderson, por topar o desafio de construir este projeto e por ter feito eu me apaixonar por física ainda lá no 2º semestre. A todos meus professores da graduação, imensamente grata por terem me guiado nesse curso lindo e ampliado minha visão de mundo e de ecossistema, por terem me mostrado que a Engenharia está em absolutamente tudo e é incrível. Aos meus professores do ensino fundamental e médio, do cursinho pré-vestibular e de inglês, que formaram a base do meu conhecimento e me prepararam para a vida acadêmica, minha mais profunda gratidão.

Aos amigos que encontrei até aqui durante essa jornada vida, que fizeram parte da construção do meu ser, da minha existência. Não posso deixar de citar minha Ine, com quem aprendi a lutar por uma causa que não é minha, mas que é nossa, com quem aprendi sobre amizade incondicional e sobre empatia. Muito grata também às meninas da Casa das Belas, que me acolheram em Erechim e me deram um lar quando eu só buscava uma casa, em especial à Poly, um elo tão forte que formei e um daqueles que preciso manter em minha vida. Às Necs, pela amizade de anos mantida por meio de suporte emocional diário. A todos meus colegas de graduação, com os quais aprendi tanto e compartilhei momentos de angústia, atrasos e correria, comprovando que estamos de fato num curso de Engenharia. Obrigada pela paciência e pela parceria nos finais de semana fazendo trabalhos e listas de exercícios.

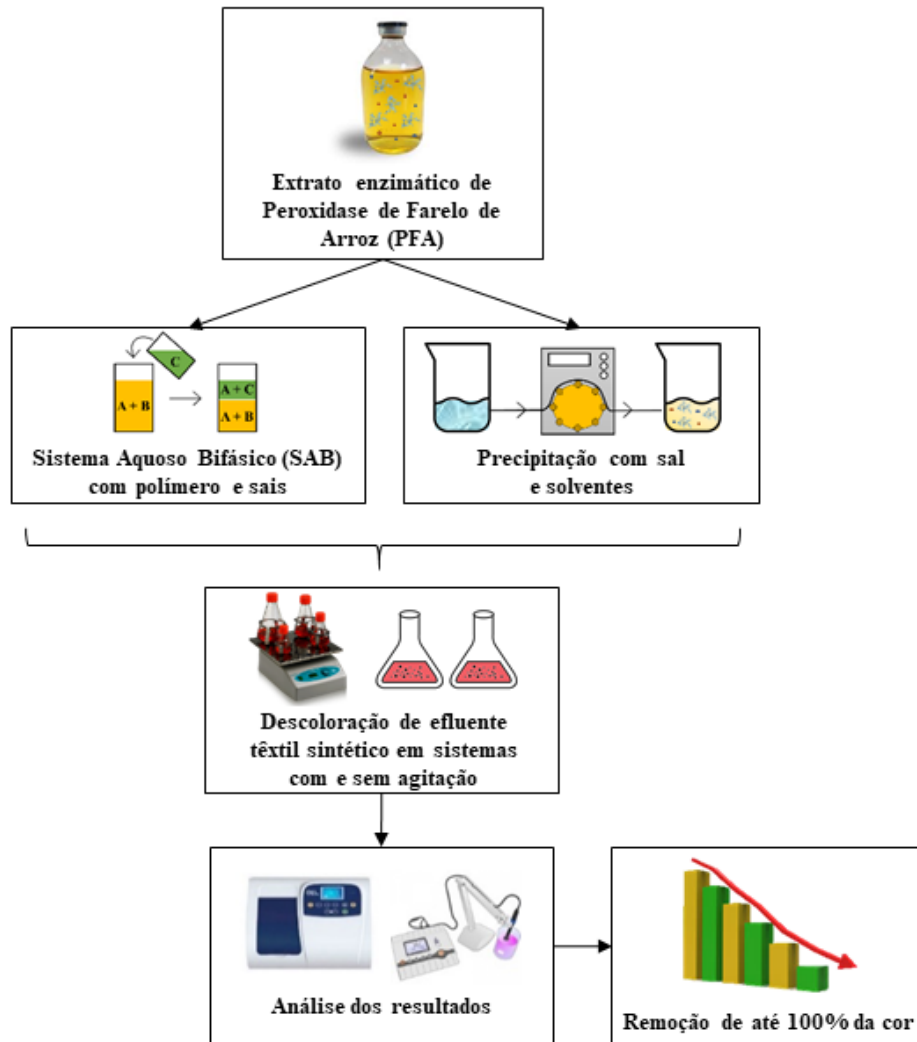
Ao Dindo e ao Felipe, que finalizaram sua missão cedo demais, me ensinaram tanto e partiram deste mundo.

Por último, mas não menos importante, a todos LGBTQ+, feministas e ambientalistas, por quem e com quem eu vou me manter firme na busca de tornar esse mundo melhor e mais equilibrado. Suas lutas e causas são minhas também.

*“you do not just wake up and  
become the butterfly”.*

(growth is a process – Rupi Kaur)

## RESUMO GRÁFICO



## RESUMO

As enzimas são, em sua maioria, proteínas responsáveis por realizar catálise de uma vasta gama de reações bioquímicas em diversos sistemas vivos. Os parâmetros que mais interferem nessas reações são concentração de substrato, pH e temperatura. Devido a vantagens como atuação em condições ambientais brandas, baixa agressividade ao meio ambiente e alta especificidade, as enzimas ganham cada vez mais espaço em processos industriais. A peroxidase é uma delas, apresentando capacidade de oxidar diversos substratos de forma estável. O estudo de técnicas de concentração enzimática de peroxidases não comerciais vem se tornando relevante para que suas propriedades catalíticas sejam potencializadas e para que reações de interesse ambiental sejam desenvolvidas. Diante disso, o objetivo deste trabalho é caracterizar as propriedades catalíticas da peroxidase de farelo de arroz (PFA), valorá-la por meio de técnicas de concentração e analisar sua inserção em processos de tratamento de águas residuais da indústria têxtil, cujas atividades trazem problemas para a saúde humana e ambiental. Na caracterização do extrato enzimático bruto foi analisada a resistência da enzima em diferentes condições de temperatura e pH, a qual demonstrou possibilidades de aplicação em processos que podem ocorrer entre 20 e 70°C e em uma faixa de pH entre 4 e 8 sem que ocorra a desnaturação da enzima. O maior potencial de redução obtido (+0,325 V vs EPH) correspondeu à PFA submetida a um pH de 5,5 e temperatura de 25°C. Nessa condição, analisou-se a estabilidade da atividade enzimática, que teve um decaimento maior dentro de 24 horas de reação, e o potencial redox e pH, que se mantiveram praticamente constantes durante todo tempo de reação. Em seguida, a valoração da enzima foi realizada por meio de concentração enzimática, sendo possível aumentar em até 2,9 vezes a atividade enzimática específica (AE) por meio de Sistema Aquoso Bifásico (SAB) com polietilenoglicol e cloreto de sódio e em até 1,9 vezes por meio de Precipitação Enzimática com acetona e cloreto de sódio. A inserção da PFA em processos oxidativos avançados também foi analisada, criando configurações para sua aplicação em efluente têxtil sintético visando degradação e remoção de corantes. Foi possível obter até 100% de remoção de cor aplicando PFA após precipitação em sistema com agitação, apresentando às indústrias têxteis uma alternativa economicamente e ambientalmente viável para o tratamento de efluentes. Com isso, as técnicas de valoração de peroxidases e sua aplicação em efluente têxtil demonstram-se promissoras e com potencial para serem exploradas em processos industriais, tendo em vista que a peroxidase de farelo de arroz demonstrou afinidade com corantes.

Palavras-chave: Coprodutos agroindustriais. Peroxidases. Concentração enzimática. Processos oxidativos avançados. Indústria têxtil.

## ABSTRACT

The enzymes are mainly proteins responsible for catalyze a wide range of biochemical reactions in several living systems and the parameters that most interfere in these reactions are substrate concentration, pH and temperature. Due to advantages such as action in mild environmental conditions, low aggressiveness to the environment and high specificity, enzymes are gaining space in industrial processes. Peroxidase is one of them, presenting the ability to oxidize several substrates in a stable way. The study of enzymatic concentration techniques of non-commercial peroxidases is becoming relevant in order to improve its catalytic properties and to develop environmental interest reactions. Therefore, this work aim to characterize the catalytic properties of rice bran peroxidase (RBP), to evaluate it through concentration techniques and to analyze its insertion in wastewater treatment processes of the textile industry, whose activities cause problems for human and environmental health. In the crude enzyme extract characterization, its resistance was analyzed in different temperature and pH conditions, which demonstrated application possibilities in processes that can occur between 20 and 70°C and in a pH range between 4 and 8 without occurring enzyme denaturation. The highest reduction potential (+0.325 V *vs* SHE) corresponded to RBP submitted to a pH 5.5 and a temperature 25°C. In this condition, the enzymatic activity had a larger decay within 24 hours of reaction and the redox potential and pH remained practically constant. Then, the enzyme valuation was carried out through enzymatic concentration, being possible to increase the specific enzymatic activity by up to 2.9 times through Aqueous Two-Phase System (ATPS) with polyethylene glycol and sodium chloride and up to 1.9 times through Precipitation with acetone and sodium chloride. The RBP insertion in advanced oxidative processes was also analyzed, creating configurations for its application in synthetic textile effluent with degradation and dye removal purpose. It was possible to obtain up to 100% color removal applying RBP precipitated in shaker system, giving to the textile industries an economically and environmentally viable alternative to treat effluents. Thus, the peroxidase valuation techniques and its application in textile effluent are promising and have the potential to be exploited in industrial processes, since rice bran peroxidase has demonstrated affinity with dyes.

**Keywords:** Agroindustry co-products. Peroxidases. Enzymatic concentration. Advanced oxidative process. Textile industry.



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>17</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 17        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                      | 17        |
| <b>3. METODOLOGIA.....</b>   | <b>18</b> |
| 3.1 OBTENÇÃO DA ENZIMA .....   | 18        |
| 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ENZIMÁTICAS.....                 | 19        |
| 3.2.1 <i>Quantificação da atividade enzimática</i> .....             | 19        |
| 3.2.2 <i>Medida do potencial de redução e do pH</i> .....            | 19        |
| 3.2.3 <i>Determinação da estabilidade enzimática</i> .....           | 20        |
| 3.3 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA .....                                    | 20        |
| 3.3.1 <i>Sistema Aquoso Bifásico (SAB) com polímero e sais</i> ..... | 21        |
| 3.3.2 <i>Precipitação com sal e solventes</i> .....                  | 23        |
| 3.4 APLICAÇÃO EM PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAS) .....         | 23        |
| 3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS .....                           | 24        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                               | <b>25</b> |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO EXTRATO BRUTO.....            | 25        |
| 4.2 VALORAÇÃO POR MEIO DE CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA .....              | 28        |
| 4.2.1 <i>Sistema Aquoso Bifásico (SAB)</i> .....                     | 28        |
| 4.2.2 <i>Precipitação enzimática</i> .....                           | 33        |
| 4.3 APLICAÇÃO EM PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS .....                | 38        |
| 4.3.1 <i>Viabilidade das configurações de processo</i> .....         | 43        |
| <b>5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>         | <b>46</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                              | <b>48</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As enzimas são, em sua maioria, biopolímeros proteicos responsáveis por realizar catálise de reações bioquímicas. Essas reações são conhecidas como catálise enzimática e são essenciais para os sistemas vivos por aumentarem a velocidade e manterem o equilíbrio de reações. Para que ocorram, um substrato deve estar disponível para que se ligue ao sítio ativo da enzima, sendo esse um bolsão delimitado por resíduos de aminoácidos. Quando isso ocorre, forma-se o complexo enzima-substrato e seu estudo é importante para entender a cinética da reação e seus mecanismos (Abedi et al., 2011; Nelson e Cox, 2012).

A atividade catalítica de enzimas pode depender apenas de seus próprios resíduos do sítio ativo ou pode necessitar de componentes adicionais. Conhecidos como cofator e coenzima, esses componentes são necessários para formar o complexo enzima-substrato e realizar a catálise, formando o complexo enzima-produto. Os cofatores e coenzimas podem ser íons inorgânicos, moléculas orgânicas ou moléculas metalorgânicas complexas. Além disso, as enzimas são biomoléculas com alta especificidade de substrato e podem ser desnaturadas e ter sua atividade perdida caso submetidas a um ambiente com a qual não tenham afinidade. Por isso, é importante conhecer sua sequência de aminoácidos e suas singularidades tendo em vista a grande diversidade de enzimas encontradas na natureza (Abedi et al., 2011; Nelson e Cox, 2012).

Para isso, os mecanismos de uma reação bioquímica envolvendo enzimas pode ser modelado por meio de cinéticas, sendo essa uma importante ferramenta para entender rotas reacionais e interações moleculares. Além disso, o conhecimento da sua cinética reflete na otimização de processos para sua aplicação. Basicamente, as enzimas seguem algumas etapas na conversão de um substrato em um produto: ao entrar em contato com o substrato, a enzima livre irá se ligar e formar o complexo enzima-substrato, posteriormente forma o complexo enzima-produto para enfim dessorver esse produto e voltar a ser uma enzima livre. Essas etapas são reversíveis, ou seja, a reação pode ocorrer nos dois sentidos (Abedi et al., 2011). Os fatores que apresentam maior interferência nessa cinética são concentração de substrato, influenciando na velocidade da reação, faixa de pH e faixa de temperatura, interferindo na atividade e estabilidade catalítica (Nelson e Cox, 2012; Medina et al., 2017).

Muitas vezes, existem diversas enzimas capazes de catalisar uma mesma reação. As inúmeras vantagens apresentadas por essas biomoléculas fizeram com que o interesse em

aplicações industriais aumentasse e o mercado global de enzimas crescesse rapidamente, competindo com os catalisadores químicos. Dentre as vantagens competitivas podem ser citadas sua atuação em condições ambientais brandas, sua baixa agressividade ao meio ambiente e sua alta especificidade. Atualmente, diversos processos nas indústrias químicas, alimentícias, farmacêuticas, agrícolas e de combustíveis já utilizam enzimas comerciais (Abedi et al., 2011). Os setores que mais se destacam nesse ramo são detergentes, processamento de amido, tratamento de água residuais, descoloração de efluentes, kits médicos, entre outros (Medina et al., 2017). Uma das enzimas que vem atraindo interesse de pesquisadores são as peroxidases, a qual possui o grupo prostético heme contendo um composto de ferro bivalente ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Battistuzzi et al., 2010).

Conhecidas como heme peroxidases, as propriedades catalíticas dessas enzimas a colocam no grupo de oxirredutases pela sua capacidade de oxidar e reduzir diversos tipos de substratos, incluindo corantes, componentes fenólicos, estruturas aromáticas e frações de lignina. Além disso, a alta estabilidade e a termoresistência confere às peroxidases vantagens de aplicação perante outras enzimas (Medina et al., 2017). As principais fontes dessa biomolécula são microrganismos, animais e plantas. Porém, o custo de produção e extração muitas vezes se torna alto e inviável para algumas aplicações, sendo uma das alternativas extraí-las de coprodutos de plantas e obter peroxidases não comerciais (Battistuzzi et al., 2010; Medina et al., 2017). O trabalho de Marques et al. (2017) mostra essa tendência, no qual a aplicação dessa enzima extraída de farelo de arroz na descoloração de efluente têxtil, por meio de um processo simples e de baixo custo, demonstrou-se eficiente e viável.

Ao contrário das enzimas comerciais, as não comerciais apresentam um grau de impureza devido sua fonte de extração conter diversas biomoléculas agregadas. Com isso, uma ampla diversidade de classes de enzimas é encontrada em um mesmo subproduto (Marques, 2016). Isso faz com que processos com interesse em uma classe específica de enzima, além de extraí-la, terá o custo de concentrá-la para aumentar sua eficiência catalítica e sua afinidade com substratos. A escolha do método para concentrar a enzima e aumentar sua atividade específica é uma etapa importante e deve considerar a aplicação desejada, os custos envolvidos, a escalabilidade, o rendimento e a reprodutibilidade (Rudrappa et al., 2007; Zeng et al., 2013; Gautério et al., 2015; Preczeski et al., 2018).

A maior parte dos estudos publicados envolvendo purificação de peroxidases utilizam processos cromatográficos que conferem um elevado grau de pureza. No entanto, esses

processos são de difícil escalonamento e possuem um custo elevado para aplicações industriais (Sonkar et al., 2015). Para minimizar esses custos, a otimização de metodologias rápidas, com poucas operações unitárias e eficazes para o processo de concentração enzimática são desejáveis e representam uma área de pesquisa de grande interesse (Ishihara e Yamamoto, 2005; Ruiz-Ruiz et al., 2012). Neste sentido, algumas técnicas como Sistema Aquoso Bifásico (SAB) e Precipitação Enzimática vem ganhando espaço e se tornando arranjos adequados para purificação e recuperação de biomoléculas (Vilter, 1990; Cole, 1991; Raghavarao, Guinn e Todd, 1998; Andrews, Schmidt e Asenjo, 2005).

O mecanismo do SAB envolve a incompatibilidade mútua de dois polímeros ou de um polímero e um sal acima de uma determinada concentração. Como o próprio nome sugere, essa incompatibilidade resulta em um sistema bifásico, formando a fase de topo e de fundo. No caso de um arranjo composto por polietilenoglicol (PEG) e sal, um comportamento previsível é a afinidade da enzima pelo PEG, fazendo com que a biomolécula se agregue na fase de topo e na fase de fundo reste apenas as impurezas e o sal. Essa técnica apresenta vantagens como facilidade na recuperação da enzima, tempo de processamento curto, baixo consumo de energia, confiabilidade no aumento de escala, entre outras (Baskir, Hatton e Suter, 1989; Hatti-Kaul, 2000; Asenjo e Andrews, 2011).

Já a técnica de precipitação, apesar de também permitir a aplicação de sal, apresenta outro mecanismo para atingir a molécula alvo e concentrá-la. Por conta de sua constante dielétrica baixa, os solventes orgânicos são aplicados nesse arranjo como agente precipitante para conduzir a formação de agregados com a enzima, promovendo assim sua separação com os demais compostos do meio. Outro agente precipitante que pode ser empregado em combinação com os solventes são os sais, os quais tem a função de aumentar a força iônica (Cortez e Pessoa Jr., 1999). Assim como o SAB, a Precipitação Enzimática é considerada uma forma eficaz de atingir certo grau de purificação (Gill, Manhas e Singh, 2006; Cui et al., 2007).

No entanto, não existem protocolos que sejam universais na aplicação dessas técnicas de concentração enzimática. Ou seja, os agentes e parâmetros dos processos devem ser ajustados experimentalmente para cada arranjo, tendo o cuidado de medir sua eficiência por meio da diminuição ou aumento de atividade enzimática em relação à enzima bruta. Essa medida indicará possíveis desnaturações ou remoções de impurezas do extrato enzimático (Cortez e Pessoa Jr., 1999).

Apesar de sua vasta variedade de fontes e das diferenças entre métodos de extração e de purificação, todas as heme peroxidases compartilham de uma mesma rota catalítica no momento em que entram em contato com seu substrato. Essa rota é baseada em três etapas redox: Na primeira etapa, ocorre a ligação entre enzima, substrato e cofator, que para a peroxidase é o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nessa reação o cofator é reduzido a água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e a enzima é oxidada formando o Componente I, o qual possui um composto de ferro trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ), liberando 2 elétrons ( $e^-$ ). Na segunda etapa, uma molécula de substrato é oxidada formando o Componente II, o qual continua possuindo um composto de  $\text{Fe}^{3+}$ , e ocorre a redução de 1  $e^-$  e a formação de 1 átomo de hidrogênio ( $\text{H}^+$ ). Na terceira e última etapa, uma segunda molécula de substrato é oxidada e o Componente I é reduzido, restando dessa reação o composto de  $\text{Fe}^{3+}$  e o Componente II. Além disso, a última etapa forma  $\text{H}_2\text{O}$  e libera 1  $e^-$  para o meio (Everse J., Everse K. E. e Grisham, 1990; English e Tsapralis, 1995; Banci, 1997; Smith e Veitch, 1998; Dunford, 1999; Nakayama e Amachi, 1999; Veitch e Smith, 2001; Battistuzzi et al., 2010).

As etapas descritas acima formam duplas redox denominadas Componente I/  $\text{Fe}^{3+}$ , Componente I/Componente II e Componente II/  $\text{Fe}^{3+}$ . O conhecimento das características dessas duplas é importante pois tem alta influência no comportamento termodinâmico e na cinética da reação catalítica. Ou seja, para determinar o poder oxidativo das peroxidases é necessário conhecer o potencial redox, também denominado potencial de redução ( $E_{\text{red}}$ ), dessas duplas, fatores que estão fortemente interligados (Hayashi e Yamazaki, 1979; English e Tsapralis, 1995; Farhangrazi et al., 1995; Dunford, 1999; Furtmüller et al., 2006; Zederbauer et al., 2007; Battistuzzi et al., 2010).

No geral, o que é medido dessa enzima é o potencial de redução da dupla  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , na qual o primeiro componente é proveniente da reação descrita acima em três etapas e o segundo provém do grupo heme presente na peroxidase. Esse potencial é altamente influenciado pelo pH no qual a reação ocorre, sendo que baixos valores de pH favorecem a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  e, quanto maior o  $E_{\text{red}}$ , maior será a velocidade da catálise enzimática (Goodin et al., 1991; Zhang et al., 2002; DiCarlo, Vitello e Erman, 2007; Battistuzzi et al., 2010).

Battistuzzi et al. (2010) trazem em seu trabalho diversas peroxidases das quais os valores do potencial redox já foram determinados experimentalmente. Os valores variam de -0,320 Volts *versus* Eletrodo Padrão de Hidrogênio (V *vs* EPH), para peroxidase de pepino, até +0,167 V *vs* EPH, para manganase peroxidase imobilizada. O sinal negativo significa que está

ocorrendo uma reação de oxidação (perda de elétrons) e o positivo uma reação de redução (ganho de elétrons). A unidade de medida usada para esse tipo de grandeza eletroquímica deve ter relação com o instrumento utilizado e sua escala, para que o resultado obtido seja a diferença de potencial (ddp) entre o valor medido e o referencial. O mais usual é adotar o eletrodo de Ag/AgCl como instrumento de medida, pela sua simplicidade e fácil operação, e o EPH como escala de referência, por seu valor ser fixado em 0 V (Skoog et al., 2013; Brown et al., 2017).

Apesar de muitas peroxidases já terem sido amplamente estudadas, algumas não foram caracterizadas ainda neste sentido, principalmente aquelas extraídas de coprodutos. Com isso, surge a necessidade de entender os mecanismos de atuação e os condicionantes reacionais dessas enzimas. O conhecimento de seu processo catalítico pode potencializar aplicações industriais de forma a aproveitar ao máximo seu poder oxidativo. Neste contexto, surge o desafio de desenvolver reações de interesse ambiental, utilizando os mecanismos descritos acima pelas peroxidases, em busca de proporcionar às indústrias soluções eficientes e de baixo custo e minimizar seus impactos no ecossistema.

Essas reações podem envolver substratos presentes em águas residuais de diferentes processos industriais, com os quais as peroxidases possuem afinidade para transformá-los, minimizando seus impactos ambientais. Alguns desses componentes que já vem sendo estudados são corantes, microtoxinas, matéria orgânica dissolvida, fenóis, entre outros (Steevensz et al., 2009; Al-Ansari et al., 2010; Li et al., 2016). Diante disso, surge o cenário da indústria têxtil e seus processos, que têm sido considerados agentes causadoras de diversos problemas para o meio ambiente. As principais preocupações giram em torno da variedade de produtos químicos envolvidos nesta indústria e a água consumida, sendo necessários cerca de 200 litros para produzir 1 kg de tecido.

Os processos têxteis geram grande quantidade de efluentes contendo sólidos dissolvidos, agentes químicos, traços de metais, odor, cor, entre outros agentes poluentes, o que o torna tóxico e perigoso para a saúde humana e ambiental (Eswaramoorthi et al., 2008; Ntuli et al., 2009; Ghaly et al., 2014; Yusuf, 2018). A concentração de corante nas águas residuais da indústria têxtil pode chegar a 250 mg/L, sendo assim responsável pela cor intensa desse efluente. Quando descartados incorretamente em recursos hídricos, os corantes podem bloquear a penetração da luz solar, inibir processos biológicos e elevar a demanda bioquímica de oxigênio (DBO). Além disso, os efluentes químicos podem causar doenças ao homem e aos animais, como náuseas, dermatites e mutações genéticas (Reife e Freeman, 1996; Greijer et al.,

2001; Nese, Sivri e Toroz, 2007; Wamburguh e Chianelli, 2008; Ghaly et al., 2014; Yusuf, 2018).

Os corantes da classe azo, encontrados em efluentes de coloração vermelha, representam em torno de 70% do volume de produção de todos os corantes orgânicos no mundo. Embora já sejam conhecidos os problemas de saúde ambiental causados pelos efluentes têxteis, não existe uma legislação internacional que determine parâmetros de descarga em corpos hídricos. Muitos países estabelecem seus próprios valores de parâmetros em leis, como Estados Unidos, União Europeia, Canadá, Austrália e Brasil. Outros países determinam esses limites como valor recomendado, como Índia, Paquistão e Malásia (Bafana, Devi e Chakrabarti, 2011; Yusuf, Shabbir e Mohammad, 2017; Yusuf, 2018).

A legislação dos países acaba sendo mais uma das preocupações existentes em relação à indústria têxtil, especialmente quando dados compilados pela *World Trade Organization* (Organização Mundial do Comércio, em tradução livre) - WTO (2018) - mostram que China, União Europeia e Índia, juntas, representaram 66,3% das exportações mundiais de têxteis no ano 2017. O Brasil se encontra entre os 15 países com uma indústria têxtil desenvolvida e consolidada no mercado global. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (Abit), apenas em 2017 o país teve uma produção média de 1,3 milhão de toneladas de têxteis com cerca de 27,5 mil indústrias desenvolvendo essa atividade.

Segundo os relatórios da WTO (2018), os cinco maiores exportadores de têxteis em 2017 foram China, União Europeia, Índia, Estados Unidos e Turquia. Realizando uma comparação entre esses poucos países, já é possível observar que a legislação tem várias diferenças nas restrições de descarga de efluentes têxteis em recursos hídricos. O parâmetro demanda química de oxigênio (DQO) é exemplo dessa constatação, no qual os Estados Unidos são mais restritivos que a Índia. Além disso, nos parâmetros cor e temperatura a legislação da União Europeia e da Turquia não reportam um limite e outros países sim. Em alguns desses países menos restritivos, como na União Europeia, por exemplo, seria possível aplicar um processo de tratamento simples em efluentes têxteis para cumprir a lei, muitas vezes deixando de lado a toxicidade dos produtos químicos (Ghaly et al., 2014; ZDHC, 2016).

Nesse sentido, os processos oxidativos avançados (POAs) vem ganhando espaço para o tratamento dessas águas residuais, apresentando um potencial de remoção de até 79% de DQO. Além disso, os POAs podem ser desenvolvidos a qualquer temperatura e pressão e tem

a vantagem de não produzir componentes secundários (Rodríguez, 2003; Montaña, 2007; Eswaramoorthi et al., 2008; Ghaly et al., 2014). O mecanismo de ação dos POAs em corantes baseia-se na oxidação e destruição desses componentes por meio da produção de radicais  $\text{OH}^\circ$ . A taxa de oxidação dos componentes pode ser aumentada por meio da otimização do processo, encontrando a concentração ideal do radical e do poluente alvo (Al-Kdasi et al., 2004; Eswaramoorthi et al., 2008; Ghaly et al., 2014).

Devido ao seu uso potencial no tratamento de efluentes da indústria têxtil, os processos oxidativos avançados vem sendo investigados intensamente nas últimas duas décadas. Diversas tecnologias podem ser aplicadas nesses processos, sendo a ozonização, a fotocatalise semicondutora, a combinação UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  e o ultrassom exemplos que vem sendo utilizados com sucesso na descoloração de corantes azo (Song et al., 2007; Kasiri e Khataee, 2012; Narayanasamy e Murugesan, 2014; Karthikeyeni et al., 2015; Babar et al., 2017; Hassaan e Nemr, 2017; Lai, Hsu e Lin, 2017). Dessa forma, as propriedades oxirredutoras das peroxidases confere a essas enzimas a possibilidade de sua inserção em POAs para tratar efluente têxtil.

A peroxidase de raiz forte, por exemplo, já vem sendo utilizada para degradação de poluentes orgânicos (Voncina e Majcen-Le-Marechal, 2003; Malani, Khanna e Moholkar, 2013). A peroxidase de soja também vem sendo aplicada com eficácia na remoção de matéria orgânica dissolvida, sendo que, na presença de peróxido de hidrogênio, gera radicais fenoxila que podem se unir e formar oligômeros maiores, podendo ser facilmente separados por filtração ou sedimentação. Estudos também relatam a aplicação da peroxidase de soja na remoção de fenóis em águas residuais de alcatrão mineral e de efluentes de refinarias (Steevensz et al., 2009; Al-Ansari et al., 2010; Li et al., 2016).

Portanto, buscando a valoração de peroxidases não comerciais e a inserção dessas enzimas em reações de interesse ambiental, propõe-se neste estudo avaliar suas propriedades catalíticas, visando sua aplicação na degradação de corantes têxteis e abrindo novas perspectivas para inserção de processos oxidativos avançados no tratamento de águas residuais de forma eficiente e sustentável.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o comportamento de peroxidases não comerciais, extraídas de coprodutos agroindustriais, perante diferentes condições reacionais visando sua aplicação em reações de interesse ambiental.

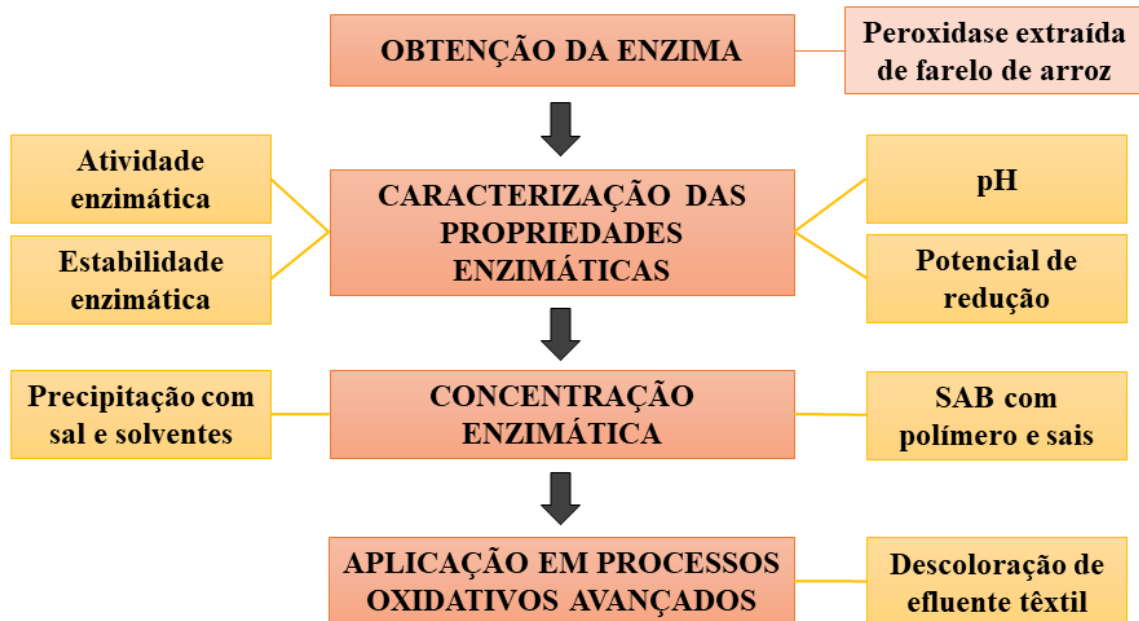
### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar propriedades catalíticas de peroxidases extraídas de coprodutos agroindustriais;
- Avaliar o comportamento das peroxidases em diferentes meios reacionais e condições de temperatura e pH;
- Aplicar as técnicas de concentração enzimática Sistema Aquoso Bifásico (SAB) e Precipitação Enzimática;
- Avaliar a aplicação de peroxidases na degradação de corantes têxteis em processos oxidativos avançados.

### 3. METODOLOGIA

As metodologias utilizadas para realização deste trabalho serão abordadas neste item, seguindo a sequência de processos esquematizados no fluxograma abaixo. A descrição dos processos será apresentada no decorrer deste tópico.

**Figura 1.** Fluxograma demonstrando a metodologia em etapas realizada neste trabalho.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 3.1 OBTENÇÃO DA ENZIMA

A enzima peroxidase, utilizada neste projeto, foi extraída de farelo de arroz e disponibilizada pela Escola de Química e Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) *Campus Carreiros*.

A extração da peroxidase deste coproduto agroindustrial ocorreu em condições baseadas no método descrito por Cardinali et al. (2011), no qual o meio tamponante extrator fosfato de sódio, a uma concentração de 10 mmol/L e pH 5,2, foi adicionado ao farelo, seguido de agitação mecânica por 60 minutos a temperatura ambiente para rompimento da estrutura celular e solubilização proteica. O extrato enzimático bruto foi então centrifugado a 3220 x g por 10 minutos a uma temperatura de 4°C e o sobrenadante obtido deste processo foi filtrado e disponibilizado para realização deste trabalho.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ENZIMÁTICAS

O meio reacional padrão em que a peroxidase de farelo de arroz (PFA) é submetida e tem sua atividade enzimática medida foi determinado por Devaiah e Shetty (2009), contendo 1 mL de extrato enzimático, 2 mL de água destilada, 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM, 0,5 mL de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. Esse meio reacional se encontra a um pH de aproximadamente 5,5 e é submetido a temperatura de 25°C em banho termostático durante 20 minutos.

A partir deste método, foram realizadas variações nos valores de pH e temperatura em busca de submeter a peroxidase a condições extremas e analisar as respostas atividade enzimática (AE) e potencial de redução ( $E_{red}$ ).

#### 3.2.1 *Quantificação da atividade enzimática*

Após submeter a peroxidase e seu meio reacional ao banho termostático, a transmitância dos compostos oxidados foi quantificada em espectrofotômetro UV-VIS a um comprimento de onda de 470 nm (Khan e Robinson, 1994).

A atividade enzimática foi estimada por meio da reação de oxidação do substrato guaiacol a tetraguaiacol, caracterizado pela coloração laranja. A unidade de atividade específica da enzima peroxidase foi definida como a massa de proteína capaz de causar um aumento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto (Garda-Buffon e Badiale-Furlong, 2010).

Os resultados de quantificação enzimática foram expressos em U/mL, sendo U a unidade internacional adotada para atividade enzimática, representando a quantidade de enzima, em mililitros, necessária para catalisar uma reação com velocidade de conversão de 1 micromol por minuto (Motamed, Ghaemmaghami e Alemzadeh, 2009).

#### 3.2.2 *Medida do potencial de redução e do pH*

Os valores de potencial de redução e pH foram obtidos de forma direta por meio do medidor de bancada pH/mV da marca HANNA Instruments, modelo HI 2221.

Este equipamento possui um eletrodo de Ag/AgCl, o qual quantifica o potencial de oxirredução (ORP), ou seja, o estado geral de uma solução que possui habilidade de oxidar ou reduzir químicos (HANNA Instruments, 2017).

O valor de ORP obtido por meio do eletrodo foi convertido para milivolt *versus* Eletrodo Padrão de Hidrogênio (mV *vs* EPH), a unidade de medida usual para este tipo de grandeza eletroquímica (Skoog et al., 2013; Brown et al., 2017), conforme a Equação 1.

$$E_{red} = E_{Ag/AgCl} + 222 \text{ mV} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

$E_{red}$  = Potencial de redução na escala de referência (mV *vs* EPH);

$E_{Ag/AgCl}$  = Potencial de redução medido com o eletrodo de Ag/AgCl (mV).

### 3.2.3 Determinação da estabilidade enzimática

Os testes para verificar a estabilidade enzimática foram realizados a partir da escolha das condições de temperatura e pH com os resultados mais favoráveis na etapa de submissão do meio reacional a condições extremas. Além de escolher pelas respostas de AE e  $E_{red}$ , o acesso a dados da literatura foi essencial para determinar condições de temperatura e pH favoráveis ao processo de oxidação de corantes.

A partir disso, a enzima foi submetida ao meio reacional e deixada em reatores abertos com controle de temperatura. Em um intervalo de tempo, escolhido a partir do monitoramento dos resultados, foram realizadas coletas para determinar as respostas dos itens 3.2.1 e 3.2.2. A partir desses dados foi possível obter o comportamento de cada parâmetro com o passar do tempo.

## 3.3 CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Duas técnicas diferentes de concentração enzimática de baixo custo foram aplicadas na peroxidase de farelo de arroz com o objetivo de aumentar sua atividade enzimática, seu potencial de redução e valorar a enzima.

Para determinar se houve remoção de impurezas do extrato enzimático e afinidade do mesmo com a técnica aplicada, a atividade enzimática foi determinada antes e após aplicação das técnicas de acordo com a metodologia de Devaiah e Shetty (2009), descrita no item 3.2.1. Além disso, para calcular o Fator de Purificação (FP), a concentração de proteína no extrato antes e após a concentração enzimática foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976). Os valores de Atividade Específica (AE) e FP foram obtidos por meio das Equações 2 e 3.

$$AE = \frac{At}{[P]} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo:

AE= Atividade Específica do extrato (U/mg);

At= Atividade enzimática do extrato (U/mL);

[P] = Concentração de proteína no extrato (mg/mL).

$$FP = \frac{AE_{EC}}{AE_{EB}} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

FP= Fator de Purificação (adimensional);

$AE_{EC}$ = Atividade Específica do extrato concentrado (U/mg);

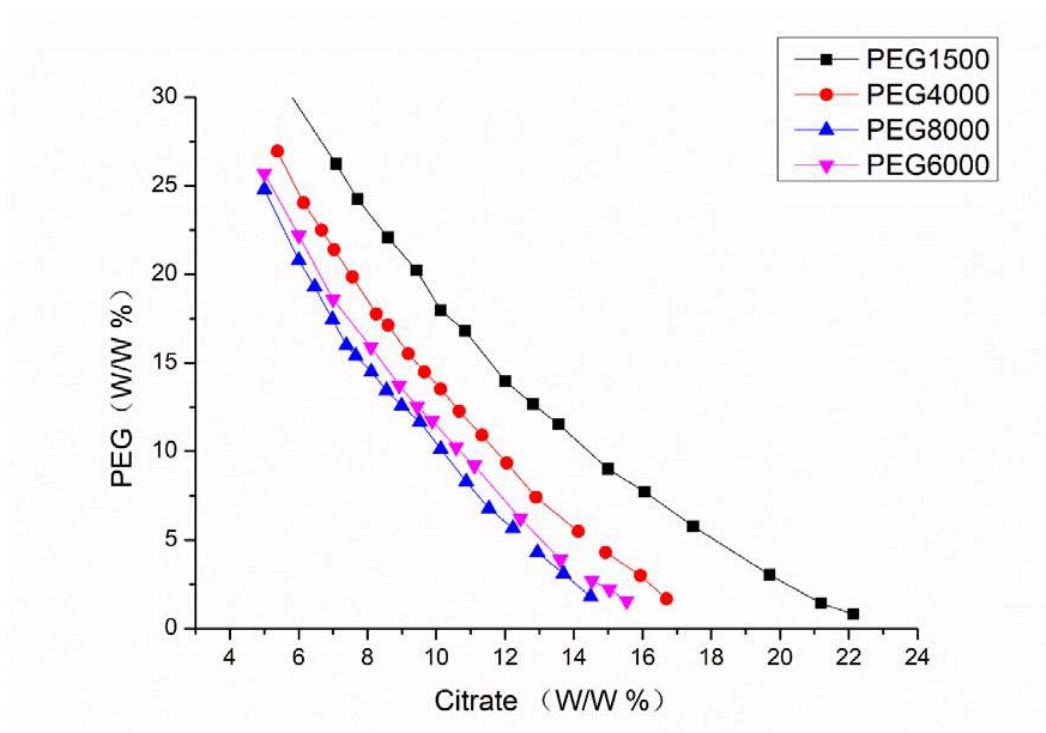
$AE_{EB}$ = Atividade Específica do extrato bruto (U/mg).

### 3.3.1 Sistema Aquoso Bifásico (SAB) com polímero e sais

Testes preliminares do Sistema Aquoso Bifásico (SAB) foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Albertsson (1986). A técnica utiliza combinação de polímeros e sais em concentrações críticas com o objetivo de formar duas fases hidrofílicas, denominadas fases de topo (T) e de fundo (F) (Targovnik, Cascone e Miranda, 2012).

Para determinar essas concentrações críticas, diversas referências bibliográficas foram consultadas e testadas. Por meio dos testes, escolheu-se adaptar o método descrito por Du et al. (2019), no qual constam curvas binodais, ou seja, diagramas de fases para o sistema polímero/sal com a finalidade de prever a composição das duas fases (Figura 2).

**Figura 2.** Curva binodal adotada para este estudo.



Fonte: Du et al., 2019.

Nos testes preliminares, o sistema foi preparado com uma solução 50% peso/volume (p/v) de polietilenoglicol (PEG), variando sua massa molar em 400, 1500 e 6000, e outra solução 40% p/v de sal com pH fixado em 6, estando de acordo com a faixa ótima de atividade enzimática do extrato (Feltrin, 2013). Diversos ensaios foram realizados variando as concentrações das soluções e do extrato enzimático no sistema.

Dois procedimentos metodológicos distintos foram realizados nos testes preliminares, sendo um deles apenas homogeneizando o sistema em vórtex e outro com homogeneização e posterior centrifugação a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Após estes procedimentos, o sistema foi mantido em banho de gelo durante 20 minutos e então a resposta atividade enzimática foi analisada em ambas fases do sistema.

Na sequência, Delineamentos Compostos Centrais (DCCs) foram realizados variando a composição do sistema em pontos da curva binodal, utilizando 3 diferentes sais (cloreto de sódio, fosfato de sódio e fosfato de potássio), com o objetivo de melhorar o processo e analisar a afinidade da PFA por meio da resposta fator de purificação. As variáveis investigadas nos delineamentos foram concentração de PEG, variando de 15 a 25% peso/peso (p/p), concentração de sal, variando de 14 a 22% p/p, e pH do sal, variando de 4 a 8.

### 3.3.2 Precipitação com sal e solventes

Testes preliminares da técnica de precipitação enzimática foram desenvolvidos de acordo com o método de Preczeski et al. (2018), fixando a concentração de cloreto de sódio em 0,8 mol/L, a concentração de solvente orgânico em 80% e a vazão da bomba peristáltica em 10 mL/min. As fases sobrenadante (S) e precipitado (P) foram coletadas, sendo que P foi dissolvido em 5 mL de tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,5, de acordo com Feltrin et al. (2017).

Nos testes preliminares foi realizado um procedimento de *screening*, também denominado triagem, testando alguns solventes em condições com e sem sal. Os solventes testados foram acetona, etanol, N-propílico, Iso-propílico, Iso-butílico e Tert-butílico e a resposta atividade enzimática específica foi analisada por meio do Teste de Tukey.

Na sequência, a precipitação de PFA foi potencializada com um DCC, com o objetivo de avaliar a influência da vazão da bomba peristáltica, variando entre 4,6 e 12,4 mL/min, da concentração salina, variando entre 0,36 e 0,84 mol/L, e da concentração de solvente, variando entre 48,1 e 81,9%, nos resultados de fator de purificação.

### 3.4 APLICAÇÃO EM PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAS)

O extrato enzimático bruto e concentrado por meio de Precipitação e de SAB foi estudado quanto à sua aplicabilidade em POAs para degradação de cor de efluente têxtil sintético.

A aplicação foi realizada de acordo com Marques et al. (2017), no qual o meio reacional foi composto por 3 mL de extrato enzimático, 40 mg/L de peróxido de hidrogênio 30% e o restante de efluente sintético, formando um volume final de 100 mL. O efluente foi preparado diluindo diferentes corantes (vermelho, amarelo, azul e marrom) em água destilada em uma concentração de 100 mg/L.

Os ensaios dos testes preliminares foram submetidos à um ambiente com temperatura constante de 25°C em configurações sem e com agitação em *shaker* orbital (160 rpm). Em seguida, testes foram realizados para determinar a curva de remoção de cor em relação ao tempo com o objetivo de indicar o tempo de início e de estabilização do processo de degradação do corante sintético. Além disso, foram acompanhados o pH e o potencial de redução do meio reacional.

A remoção de corante do efluente foi quantificada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 455 nm e por meio da Equação 4 foi determinado o percentual de remoção.

$$CR = \frac{ABS_C \cdot ABS_T}{ABS_C} \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo:

CR= Corante removido (%);

$ABS_C$ = Absorbância do controle (meio reacional sem enzima);

$ABS_T$ = Absorbância do tratamento (meio reacional com enzima).

### 3.5 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

O tratamento estatístico dos dados obtidos no decorrer deste trabalho foi realizado no software *Protimiza Experimental Design* - <http://experimental-design.protimiza.com.br/> (Rodrigues e Iemma, 2014).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO EXTRATO BRUTO

A primeira etapa da caracterização do extrato bruto neste trabalho foi realizada em busca de verificar a interferência das variáveis pH do tampão e temperatura do banho ao qual a peroxidase de farelo de arroz (PFA) foi submetida para reagir com seu substrato, neste caso o guaiacol. As respostas atividade enzimática e potencial de redução são mostradas na Tabela 1, na qual é possível verificar a resistência dessa enzima perante diferentes condições de temperatura e pH.

**Tabela 1.** Análise da atividade enzimática (AE) e do potencial de redução ( $E_{red}$ ) da peroxidase de farelo de arroz em meio reacional submetido à diferentes condições.

| Ensaio             | Variáveis    |                           | Respostas                   |                                  |
|--------------------|--------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
|                    | pH do tampão | Temperatura do banho (°C) | Atividade enzimática (U/mL) | Potencial de redução (mV vs EPH) |
| Controle*          | 5,5          | 25                        | -                           | 215,70                           |
| Condição padrão    | 5,5          | 25                        | 605                         | 324,60                           |
| Condições extremas | 4            | 20                        | 134                         | 301,80                           |
|                    | 4            | 70                        | 393                         | 320,70                           |
|                    | 8            | 20                        | 333                         | 297,10                           |
|                    | 8            | 70                        | 689                         | 296,60                           |

\*Ensaio realizado sem a presença do extrato enzimático.

Fonte: Elaborada pela autora.

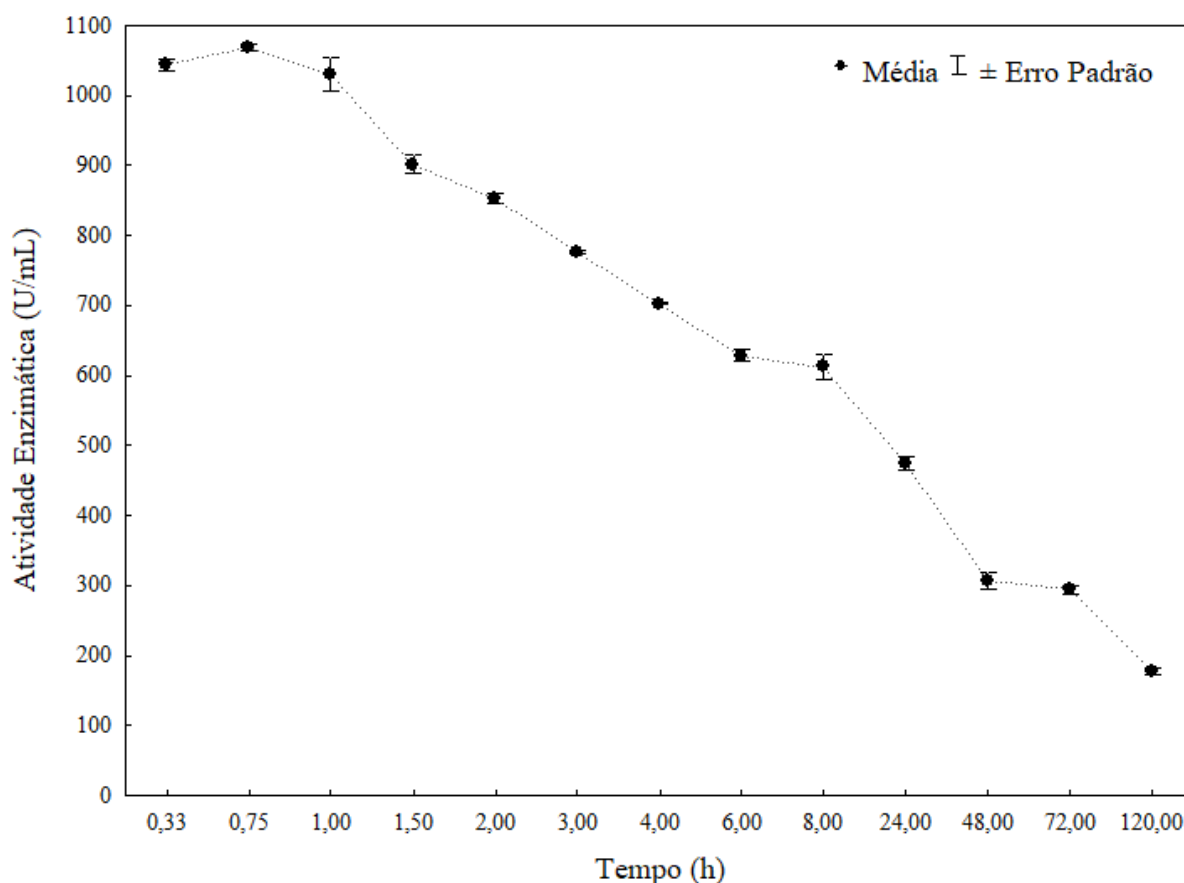
A PFA demonstrou-se uma enzima com possibilidades de aplicação em processos que podem ocorrer de 20 até 70°C e em uma faixa de pH de 4 até 8 sem que ocorra a desnaturação da enzima, conforme indica a Tabela 1. Valores superiores ou inferiores não foram testados, sendo necessário estudos adicionais caso o processo de aplicação da enzima mantenha condições reacionais fora da faixa estudada.

O ensaio controle realizado sem a presença da PFA comparado ao restante dos ensaios que continham PFA indica que a enzima, após reagir com seu substrato, confere ao meio reacional um acréscimo no valor do potencial de redução, ou seja, o poder oxidativo do meio é aumentado. A importância de aumentar o poder oxidativo reflete na velocidade da reação bioquímica de transformação do substrato em produto. Ou seja, quanto maior for o potencial de redução, maior será a velocidade com que a enzima se ligará na molécula alvo de interesse no processo. Valores de pH baixos favorecem o aumento do potencial de redução, porém esse é apenas um dos fatores envolvidos no aumento da velocidade catalítica, sendo importante atentar também para a temperatura e a concentração de substrato (Goodin et al., 1991; Zhang et al., 2002; DiCarlo, Vitello e Erman, 2007; Battistuzzi et al., 2010).

Todos os valores de  $E_{red}$  medidos na peroxidase de farelo de arroz neste estudo foram positivos, o que indica que a enzima, durante sua interação com o guaiacol, está doando elétrons ao meio e sendo oxidada (Skoog et al., 2013; Brown et al., 2017). Na literatura, o maior valor de poder oxidativo positivo relatado até então é de +0,167 V *vs* EPH, obtido na manganase peroxidase imobilizada (Battistuzzi et al., 2010). Como pode ser observado na Tabela 1, a PFA apresenta valores mais altos (até +0,325 V *vs* EPH), o que abre perspectivas de aplicações dessa enzima em diversos processos oxidativos.

A Figura 3 a seguir mostra o comportamento da atividade enzimática com o passar do tempo. A PFA foi mantida em ambiente controlado com temperatura de 25°C e submetida em meio reacional padrão com pH do tampão 5,5, sendo essa a segunda etapa da caracterização do extrato enzimático. A escolha de determinar a estabilidade da enzima nessa condição tem relação com a obtenção do maior potencial de redução no ensaio condição padrão, conforme Tabela 1, tendo o valor de 324,60 mV *vs* EPH, e um dos maiores valores de atividade enzimática (605 U/mL). Além disso, para reações de interesse ambiental e aplicações da enzima nessa área, é interessante que os processos ocorram em temperatura ambiente e pH próximo à neutralidade.

**Figura 3.** Estabilidade enzimática da peroxidase de farelo de arroz em meio reacional na condição padrão (pH 5,5 e temperatura 25°C).



Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios de estabilidade foram desenvolvidos em duplicata e a primeira medida da atividade enzimática do extrato bruto foi realizada após 20 minutos de reação, conforme determina a metodologia de Devaiah e Shetty (2009), quando a PFA apresentava  $1044,2 \pm 13,0$  U/mL. Neste mesmo instante de tempo foram medidos  $E_{red}$  e pH do meio reacional, os quais apresentavam valores de  $391,4 \pm 3,6$  mV vs EPH e  $4,21 \pm 0,10$ .

Na curva apresentada na Figura 3 é possível observar o decaimento da atividade enzimática com o passar do tempo, sendo que em 24 horas o valor já havia caído mais da metade ( $475,0 \pm 14,1$  U/mL) e em 120 horas estava em  $178,3 \pm 7,1$  U/mL. Apesar do decaimento de atividade, a PFA não desnaturou, ou seja, sua atividade não chegou ao valor zero, mesmo após ficar reagindo durante 5 dias em condições controladas. Esses resultados reforçam a característica de alta resistência dessa enzima e sua ampla possibilidade de aplicações, tendo

em vista que a PFA é capaz de se manter ligada ao substrato e reagindo por, no mínimo, 120 horas.

Além dos resultados da estabilidade de atividade terem se demonstrado promissores, observações interessantes foram feitas nos resultados do acompanhamento do potencial de redução e do pH. Durante os 5 dias de monitoramento do comportamento da PFA, o potencial de redução se manteve numa faixa entre  $391,4 \pm 3,6$  e  $404,7 \pm 0,2$  mV vs EPH e o pH se manteve numa faixa entre  $3,98 \pm 0,00$  e  $4,21 \pm 0,10$ . Estes resultados indicam a facilidade em manter o extrato enzimático bruto em condições sem variações bruscas durante processos reacionais.

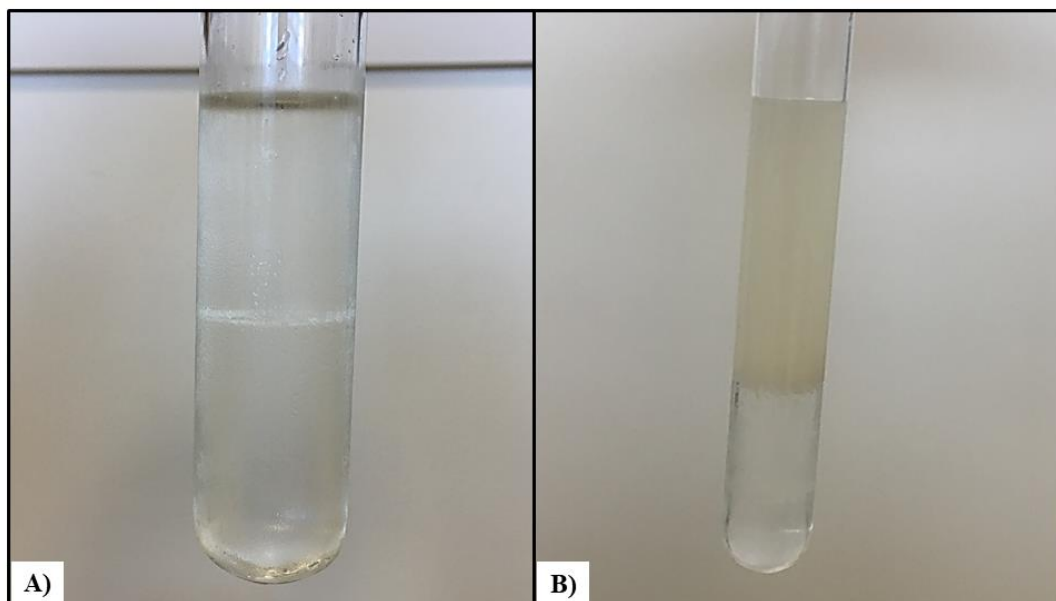
Diversos estudos já relataram essa tolerância e estabilidade da peroxidase extraída de plantas, sendo que o aumento de atividade dessa enzima é um indicador ambiental de que a planta está sob condições de stress (Pandey et al., 2017). Por meio desses mecanismos de defesa, as peroxidases extraídas de coprodutos, como o farelo de arroz, apresentam resistência para serem submetidas a diversas condições sem desnaturar, o que pode ser observado nos resultados deste estudo de caracterização.

## 4.2 VALORAÇÃO POR MEIO DE CONCENTRAÇÃO ENZIMÁTICA

### 4.2.1 Sistema Aquoso Bifásico (SAB)

Após diversos testes preliminares de composição para o sistema PEG/sal variando a massa molar do PEG e o tipo do sal utilizado, sendo esses cloreto de sódio, fosfato de sódio e fosfato de potássio, algumas escolhas para a continuação do estudo foram feitas. As escolhas basearam-se na observação visual da formação de duas fases, conforme Figura 4, que somente ocorreu com o PEG 1500, e da medida de atividade enzimática específica, que teve aumento quando utilizada apenas homogeneização em vórtex sem a etapa de centrifugação, fazendo com que o processo fosse mais rápido.

**Figura 4.** Separação das fases de topo e de fundo na técnica SAB com o sistema polímero/sal (A) e com o sistema polímero/sal na presença de peroxidase de farelo de arroz (B).



Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode-se observar na Figura 4B, após a inserção da peroxidase de farelo de arroz no sistema a fase de topo tem um rendimento em volume maior que a fase de fundo. Além disso, a coloração da fase de topo indica que a enzima foi concentrada e os resultados de fator de purificação confirmam isso. De acordo com Asenjo e Andrews (2011), este é um comportamento previsível no SAB, tendo em vista que a fase de topo é menos polar e a afinidade entre enzima e polímero faz com que estes se agreguem, restando na fase de fundo apenas as impurezas contidas no extrato enzimático e o sal.

As respostas dos testes preliminares foram relevantes para que um DCC fosse planejado aplicando apenas o PEG 1500 e os três tipos de sal no procedimento de concentração enzimática, analisando por meio disso a interferência das variáveis concentração de PEG, concentração de sal e pH da solução salina nas respostas de FP, conforme Tabela 2. Assim como nos testes preliminares, nos ensaios do DCC a PFA também se concentrou na fase de topo e, por esse motivo, os resultados da fase de fundo foram desconsiderados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Matriz do Delineamento Composto Central (DCC) com os valores codificados e reais e as respectivas respostas em termos de fator de purificação (FP) na fase de topo.

| Ensaio                | Variáveis   |             |                      | Respostas de FP  |                  |                     |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------------|------------------|------------------|---------------------|
|                       | PEG (% p/p) | Sal (% p/p) | pH da solução salina | Cloreto de sódio | Fosfato de sódio | Fosfato de potássio |
| <b>Extrato bruto*</b> | -           | -           | -                    | 1,0              | 1,0              | 1,0                 |
| <b>1</b>              | -1 (15)     | -1 (14)     | -1 (4)               | 2,2              | 0,6              | 2,3                 |
| <b>2</b>              | +1 (25)     | -1 (14)     | -1 (4)               | 2,4              | 2,0              | 0,5                 |
| <b>3</b>              | -1 (15)     | +1 (22)     | -1 (4)               | 0,0              | 0,3              | 0,5                 |
| <b>4</b>              | +1 (25)     | +1 (22)     | -1 (4)               | 0,0              | 0,7              | 0,5                 |
| <b>5</b>              | -1 (15)     | -1 (14)     | +1 (8)               | 2,7              | 1,5              | 0,4                 |
| <b>6</b>              | +1 (25)     | -1 (14)     | +1 (8)               | 0,7              | 1,4              | 0,5                 |
| <b>7</b>              | -1 (15)     | +1 (22)     | +1 (8)               | 0,6              | 1,5              | 0,4                 |
| <b>8</b>              | +1 (25)     | +1 (22)     | +1 (8)               | 0,4              | 1,6              | 0,4                 |
| <b>9</b>              | 0 (20)      | 0 (18)      | 0 (6)                | 2,9              | 1,2              | 0,6                 |
| <b>10</b>             | 0 (20)      | 0 (18)      | 0 (6)                | 2,1              | 1,3              | 0,6                 |
| <b>11</b>             | 0 (20)      | 0 (18)      | 0 (6)                | 2,0              | 1,1              | 0,6                 |

\*AE = 3368 U/mg.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por meio do valor de referência do fator de purificação (Tabela 2, linha 3), determinado como 1,0, é possível verificar se a atividade enzimática específica (AE) da peroxidase aumentou, em valores maiores que a referência, ou diminuiu, em valores menores que a referência, após aplicação da técnica de concentração. Para todos os sais aplicados, foi possível obter um aumento de até 2 vezes na atividade da PFA, demonstrando sua afinidade com a técnica e sua versatilidade na escolha dos reagentes.

Entretanto, na Tabela 2 é possível observar que para cada sal é necessário ajustar os parâmetros do processo para obter a melhor resposta de FP. Para o cloreto de sódio a melhor resposta foi obtida no ensaio do ponto central (FP de 2,9), para o fosfato de sódio a melhor condição é o ensaio 2 obtendo-se FP igual a 2,0 e para o fosfato de potássio apenas no ensaio 1 foi possível obter concentração enzimática com um FP de 2,3.

De acordo com Asenjo e Andrews (2012), entre as configurações possíveis em sistemas aquosos bifásicos para aumentar a concentração enzimática, uma delas diz respeito aos tipos de íons presentes no sistema e a força iônica do sal. Quanto maior for a força iônica do sistema, maior será o efeito de *salting-out*, entendido como o fenômeno de expulsão da proteína da fase com alta concentração de sal (Skoog et al., 2013), que no caso do SAB está na fase de fundo. Em consequência disso, ocorre a concentração da enzima na fase de topo, efeito observado neste estudo.

Dentre os sais utilizados para concentrar a PFA, é possível observar na Tabela 2 a predominância de fatores de purificação maiores quando utilizado o cloreto de sódio, o que pode ser explicado por meio de sua maior liberação de íons no sistema, promovendo o *salting-out* da enzima para a fase de topo.

Os valores de purificação enzimática obtidos neste estudo com o sistema aquoso bifásico são considerados satisfatórios visando aplicação industrial. É importante destacar também que a reprodutibilidade de resultados é um dos maiores desafios encontrados na técnica de separação bifásica com polímero e sais.

Os resultados da Tabela 2 receberam tratamento estatístico e, com isso, somente no SAB com fosfato de sódio houve validação do modelo com 95% de confiança. Na Tabela 3 é possível observar as curvas de contorno mostrando o comportamento do FP quando ocorrem variações de processo e a equação que descreve o modelo estatístico.

Como pode ser observado nas curvas de contorno da Tabela 3, maiores concentrações de PEG e menores concentrações de sal compondo o sistema aquoso bifásico resultam em maiores purificações da PFA. Esse comportamento vai de encontro ao comportamento de proteínas em sistemas bifásicos, descrito no trabalho de Asenjo e Andrews (2012), no qual é relatada a afinidade dessas biomoléculas com a fase menos polar e mais hidrofóbica, neste caso o PEG, e os materiais particulados com a fase mais polar, ou seja, a fase de fundo na qual fica concentrado o sal. Com isso, a presença de maiores concentrações de polímero no sistema fará com que a enzima se concentre mais e o FP aumente.

Em relação ao pH, a enzima demonstrou afinidade com uma faixa ampla, variando de 4 até 8, permanecendo com valores de FP acima de 1,0, desde que as condições citadas anteriormente em relação à concentração de reagentes sejam mantidas.

**Tabela 3.** Curvas de contorno com a influência das variáveis do processo do SAB com fosfato de sódio no resultado de FP.

| Variáveis do processo                      | Respostas  |
|--|--|
| pH vs concentração de PEG                  |  |
| pH vs concentração de sal                  |  |
| Concentração de sal vs concentração de PEG |  |
| Equação do modelo                          | $Y_1 = 1,20 + 0,22 X_1 - 0,17 X_2 + 0,30 X_3 - 0,10 X_1 X_2 - 0,22 X_1 X_3 + 0,23 X_2 X_3$ |
| R <sup>2</sup>                             | 0,92   |

Y<sub>1</sub> – Fator de purificação; X<sub>1</sub> – Concentração de PEG; X<sub>2</sub> – Concentração de sal; X<sub>3</sub> – pH do sal.

Fonte: Elaborada pela autora.



Essas características de processo fazem com que as indústrias que forem aplicar a enzima após concentração por SAB tenham liberdade de escolher o pH mais adequado para o processo desejado de aplicação, mas fiquem restritas em relação à quantidade de reagentes, precisando estabelecer valores na faixa entre 14 a 17% (p/p) de sal e 21 a 25% (p/p) de polietilenoglicol para obtenção de aumento na atividade enzimática da peroxidase de farelo de arroz.

#### 4.2.2 *Precipitação enzimática*

Por meio de um *screening* desenvolvido com vários solventes na presença e ausência de cloreto de sódio, com o objetivo de avaliar qual condição tem maior afinidade com a peroxidase de farelo de arroz, foi possível observar uma atividade enzimática específica de 10385,5 U/mg quando a PFA foi precipitada com acetona na presença de sal, conforme mostra a Tabela 4. É possível afirmar com 95% de confiança que este valor foi significativamente diferente das demais condições, segundo Teste de Tukey.

**Tabela 4.** *Screening* de solventes e condição de sal para precipitação de PFA e resultado do Teste de Tukey.

| <b>Solvente</b>      | <b>Condição de sal</b> | <b>Média de atividade enzimática específica ± desvio padrão (U/mg) *</b> |
|----------------------|------------------------|--|
| <b>Acetona</b>       | Ausência               | 4002,0 <sup>e,g,k</sup> ± 33,9   |
|                      | Presença               | 10385,5 ± 1034,5   |
| <b>Etanol</b>        | Ausência               | 4550,0 <sup>e,h</sup> ± 169,7  |
|                      | Presença               | 6079,5 <sup>i,h</sup> ± 975,1  |
| <b>N-propílico</b>   | Ausência               | 4360,5 <sup>e,h</sup> ± 531,0  |
|                      | Presença               | 7259,0 <sup>i</sup> ± 536,0  |
| <b>Iso-propílico</b> | Ausência               | 2591,0 <sup>c,d,e,f,g,h</sup> ± 91,9                                     |
|                      | Presença               | 647,0 <sup>a,c,j</sup> ± 0,0   |
| <b>Iso-butílico</b>  | Ausência               | 2268,0 <sup>c,d,f,j,k</sup> ± 41,0                                       |
|                      | Presença               | 474,0 <sup>a,j</sup> ± 60,8  |
| <b>Tert-butílico</b> | Ausência               | 3083,5 <sup>d,e,f,k</sup> ± 71,4   |
|                      | Presença               | 3176,5 <sup>b,e,g,k</sup> ± 888,8  |

\*Letras diferentes discriminam tratamentos significativamente diferentes entre si com 95% de confiança no Teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pela autora.

As respostas do *screening* e o tratamento estatístico dos dados demonstram resultados relevantes para continuar o estudo utilizando apenas acetona na presença de sal, condição na qual a resposta atividade enzimática específica foi superior ao restante das condições com diferença significativa no Teste de Tukey. A partir desses resultados no procedimento de concentração enzimática, o estudo seguiu analisando a inferência das variáveis concentração de sal, concentração de solvente e vazão de bombeamento nas respostas de fator de purificação (FP), por meio do DCC apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Matriz do Delineamento Composto Central (DCC) com os valores codificados e reais e as respectivas respostas em termos de fator de purificação (FP) nas fases sobrenadante e precipitado.

| Ensaio                | Variáveis      |                              |                             | Respostas de FP |             |
|-----------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------|-------------|
|                       | Vazão (mL/min) | Concentração de solvente (%) | Concentração de sal (mol/L) | Sobrenadante    | Precipitado |
| <b>Extrato bruto*</b> | -              | -                            | -                           | 1,0             | 1,0         |
| <b>1</b>              | -1 (4,6)       | -1 (48,1)                    | -1 (0,36)                   | 1,9             | 0,9         |
| <b>2</b>              | +1 (12,4)      | -1 (48,1)                    | -1 (0,36)                   | 0,4             | 1,4         |
| <b>3</b>              | -1 (4,6)       | +1 (71,9)                    | -1 (0,36)                   | 0,1             | 1,0         |
| <b>4</b>              | +1 (12,4)      | +1 (71,9)                    | -1 (0,36)                   | 0,1             | 1,1         |
| <b>5</b>              | -1 (4,6)       | -1 (48,1)                    | +1 (0,84)                   | 0,9             | 0,2         |
| <b>6</b>              | +1 (12,4)      | -1 (48,1)                    | +1 (0,84)                   | 0,4             | 0,4         |
| <b>7</b>              | -1 (4,6)       | +1 (71,9)                    | +1 (0,84)                   | 0,2             | 1,0         |
| <b>8</b>              | +1 (12,4)      | +1 (71,9)                    | +1 (0,84)                   | 0,1             | 1,1         |
| <b>9</b>              | 0 (8,5)        | 0 (60,0)                     | 0 (0,60)                    | 0,4             | 1,6         |
| <b>10</b>             | 0 (8,5)        | 0 (60,0)                     | 0 (0,60)                    | 0,3             | 1,1         |
| <b>11</b>             | 0 (8,5)        | 0 (60,0)                     | 0 (0,60)                    | 0,3             | 1,9         |

\*AE = 2878 U/mg.

Fonte: Elaborada pela autora.

Quando se desenvolve o processo de precipitação, é possível obter as fases sobrenadante (S) e precipitado (P). O rendimento em volume de S é maior que o rendimento de P. A Tabela 5 mostra que em diferentes condições de processo é possível concentrar a enzima em ambas fases do sistema. Exemplo deste comportamento é o ensaio 1, no qual um FP de 1,9 foi obtido na fase S e o ensaio 11 do ponto central, no qual um FP de 1,9 foi obtido na fase P. O rendimento do processo é um importante requisito para a posterior aplicação da enzima pois interfere em seu custo. Sendo assim, a versatilidade de concentrar a PFA tanto no sobrenadante quanto no precipitado confere à técnica de precipitação vantagens operacionais.

Porém, assim como no SAB, no método de precipitação a reprodutibilidade é um requisito de processo difícil de ser alcançado. No entanto, ambos métodos de concentração

enzimática apresentam um ótimo custo benefício, tendo em vista que pesquisas recentes utilizando métodos caros para purificar a PFA, como a cromatografia, não atingiram FPs superiores a 14,1 (Gautério et al., 2015; Feltrin et al., 2017; Gautério et al., 2017). Também é importante destacar que aplicações em áreas ambientais, como em processos oxidativos avançados, não requerem alto grau de pureza, mas sim uma alta afinidade com o substrato alvo.

O tratamento dos resultados da matriz do DCC foi realizado para obter curvas de contorno do comportamento do FP quando ocorrem variações de processo na precipitação enzimática. A análise estatística indica que somente na fase sobrenadante foi possível validar o modelo com 95% de confiança. A Tabela 6 mostra a equação do modelo e as curvas de contorno, sendo possível observar que menores concentrações de acetona e de cloreto de sódio resultam em melhores FPs. Além disso, a vazão mínima da bomba (em torno de 4 mL/min) aumenta a concentração enzimática.

**Tabela 6.** Curvas de contorno com a influência das variáveis do processo de precipitação no resultado de FP do sobrenadante.

| Variáveis do processo                           | Respostas  |
|---|--|
| Concentração de solvente vs vazão               |  |
| Concentração de sal vs vazão                    |  |
| Concentração de sal vs concentração de solvente |  |
| Equação do modelo                               | $Y_1 = 0,46 - 0,26 X_1 - 0,39 X_2 - 0,11 X_3 + 0,24 X_1 X_2 + 0,11 X_1 X_3 + 0,14 X_2 X_3$ |
| R <sup>2</sup>                                  | 0,92   |

Y<sub>1</sub> – Fator de purificação; X<sub>1</sub> – Vazão; X<sub>2</sub> – Concentração de solvente; X<sub>3</sub> – Concentração de sal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em processos desenvolvidos em larga escala, o comportamento das curvas de contorno mostrados na Tabela 6 indicam que esse método de purificação por meio de precipitação pode ser considerado economicamente viável, tendo em vista que a precipitação enzimática é um processo simples e requer baixas concentrações de reagentes de baixo custo. Entretanto, para obter os melhores resultados de FP o bombeamento deve ser mantido entre 4 a 6 mL/min, podendo se tornar um processo lento. Dessa forma, os custos do processo podem aumentar por meio de um maior gasto energético para manter a bomba operando durante um maior período de tempo.

#### 4.3 APLICAÇÃO EM PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Neste trabalho foram avaliadas configurações de processos oxidativos com peróxido de hidrogênio na presença de peroxidase, sendo esta enzima um agente oxidante capaz de degradar diversas moléculas. O objetivo dos processos desenvolvidos foi atingir os corantes presentes em águas residuais da indústria têxtil, que conferem cor e geram problemas para a saúde humana e para o meio ambiente (Eswaramoorthi et al., 2008; Ntuli et al., 2009; Ghaly et al., 2014; Medina et al., 2017; Yusuf, 2018).

Em testes preliminares, a aplicação do extrato bruto de PFA foi realizada de acordo com a configuração determinada nos estudos de Marques et al. (2017). Porém, visando reduzir o número de operações unitárias do processo, ou seja, as etapas básicas atreladas ao POA de remoção de cor, uma mudança foi realizada na metodologia de aplicação. Nesses testes iniciais testou-se a aplicação sem agitação do sistema, e isso fez com que o tempo de reação tivesse que aumentar, porém resultados satisfatórios foram obtidos.

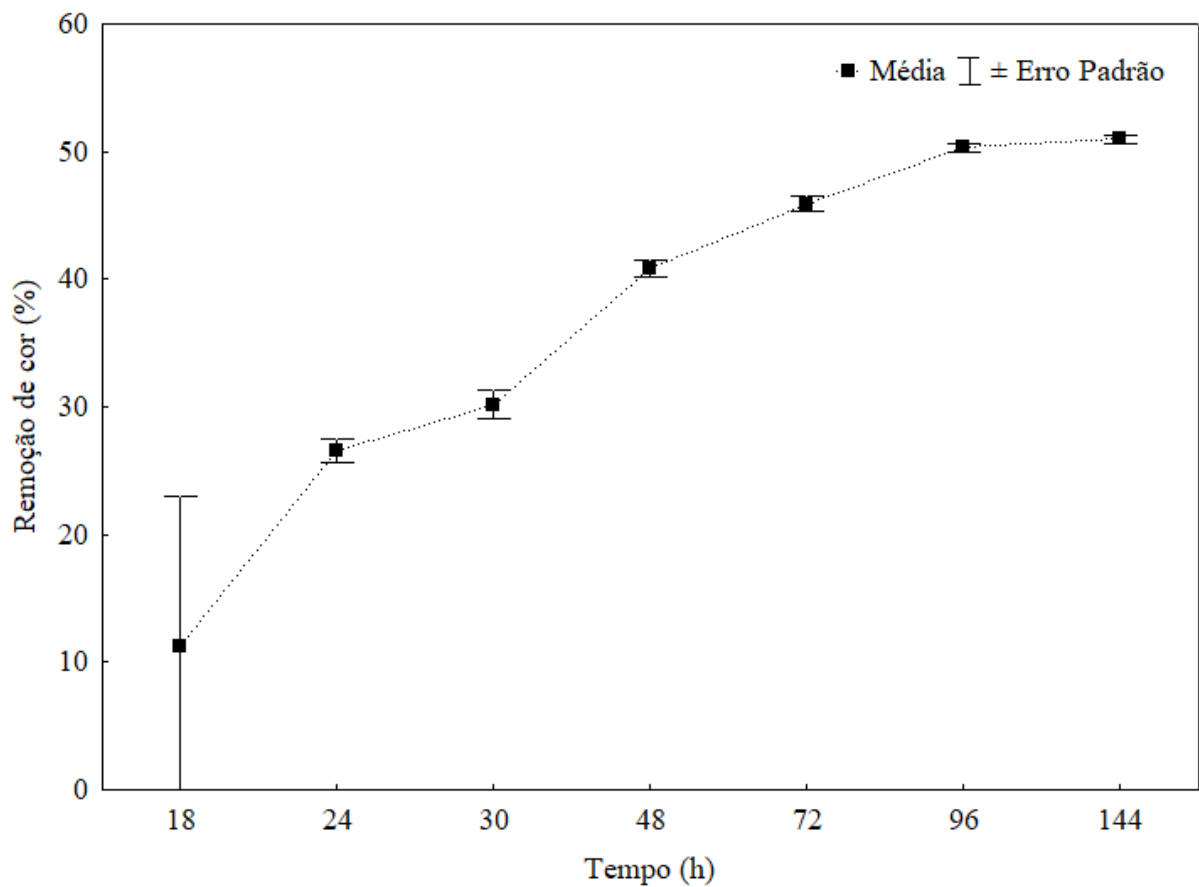
Além disso, dentre os diferentes corantes testados, apenas o de coloração vermelha, que se enquadra na categoria de corantes azo, apresentou resultados de remoção de cor, mesmo após a enzima passar pelos processos de concentração SAB e Precipitação Enzimática. No estudo de Marques et al. (2017), também foram realizados testes com diversos corantes e a PFA apresentou afinidade apenas com a coloração vermelha.

Diversos estudos também relatam o mesmo comportamento na aplicação de peroxidases da classe das plantas como sendo efetivas apenas na descoloração de corantes azo. O mecanismo de atuação dessas peroxidases em estruturas azo pode ser similar ao mecanismo de polimerização por meio de radicais livres na degradação de fenóis, tendo em vista que os corantes azo apresentam uma estrutura complexa contendo ao menos um grupo aromático. Esse

grupo torna-se um possível substrato com o qual a peroxidase tem afinidade (Klibanov, Tu e Scott, 1983; Chivukula, Spadaro e Renganathan, 1995; Tatsumi, Wada e Ichikawa, 1996; Bhunia, Durani e Wangikar, 2001; Pandey et al., 2017).

Os corantes azo, por sua vez, estão entre os mais utilizados na indústria têxtil e dão aos tecidos uma coloração intensa e brilhante quando comparados a outras classes de corantes (Ghaly et al., 2014). Sendo assim, o estudo seguiu utilizando apenas esse corante.

**Figura 5.** Curva de remoção de cor de efluente sintético vermelho com aplicação de POA sem agitação na presença do extrato enzimático bruto de PFA.



Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 5 é possível observar o comportamento da degradação de cor do efluente têxtil sintético, preparado em laboratório em uma concentração de corante de 100 mg/L, em POA com extrato bruto de peroxidase de farelo de arroz. No sistema sem agitação, a redução de cor iniciou após 18 horas de reação. Com o passar do tempo, a cor do efluente continuou reduzindo até chegar em  $50,99 \pm 0,47\%$  de remoção em 144 horas.

Os resultados obtidos com a aplicação do extrato enzimático bruto sustentaram a continuação de testes em sistema com e sem agitação para a PFA após aplicação das técnicas de concentração enzimática. Para a enzima concentrada por meio de SAB, os ensaios preliminares de remoção de cor foram realizados testando os 3 sais (cloreto de sódio, fosfato de sódio e fosfato de potássio) com e sem agitação. Apenas o SAB com fosfato de potássio em POA sem agitação teve resultados satisfatórios na degradação de cor, conforme mostra a Tabela 7 abaixo. Para verificar a influência do fator de purificação na redução de cor, os ensaios 1 e 10 (ponto central) do DCC (Tabela 2) foram aplicados no efluente.

**Tabela 7.** Resultados da aplicação de PFA, concentrada por meio de SAB com fosfato de potássio, na remoção de cor de efluente têxtil vermelho em sistema sem agitação com temperatura constante (25°C).

| <b>Tempo (h)</b> | <b>Ensaio</b> | <b>FP</b> | <b>Degradação de cor (%)</b> |
|------------------|---------------|-----------|------------------------------|
| <b>24</b>        | Controle*     | -         | 0                            |
|                  | 1             | 2,3       | 42,50                        |
|                  | Ponto central | 0,6       | 0                            |
| <b>48</b>        | Controle*     | -         | 0                            |
|                  | 1             | 2,3       | 46,21                        |
|                  | Ponto central | 0,6       | 0                            |

\*Ensaio sem enzima, contendo apenas peróxido de hidrogênio e efluente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos resultados da Tabela 7 é possível observar que de 24 para 48 horas de reação, a degradação de cor não apresenta mudança significativa. Além disso, apenas com a aplicação do ensaio 1, no qual o maior FP foi obtido, houve a degradação do corante, indicando a relevância do aumento da atividade enzimática para o POA.

Um acompanhamento da remoção de cor com o passar do tempo foi realizado para o ensaio 1 e indicou que o processo de degradação inicia em 12 horas de reação e estabiliza em 48 horas. Sendo assim, para atingir resultados satisfatórios de remoção de cor de efluente têxtil, nas condições determinadas na Tabela 7, o mantimento da reação em temperatura constante de 25°C em repouso é suficiente durante 24 horas para obter até 42,50% de degradação de corante vermelho do efluente.



Já as condições de desenvolvimento de POA para remoção de cor com a enzima concentrada por meio de Precipitação foram diferentes. Em ensaios preliminares, apenas o sistema com agitação teve resultados satisfatórios na degradação de corante vermelho, como pode ser observado na Tabela 8. A verificação da influência do fator de purificação na remoção de cor foi realizada comparando as fases sobrenadante e precipitado de um mesmo ensaio do DCC (ensaio 11 do ponto central), escolha sustentada a partir da observação dos fatores de purificação e dos parâmetros de processo na Tabela 5.

**Tabela 8.** Resultados da aplicação de PFA precipitada em POA para remoção de cor de efluente têxtil vermelho em sistema com agitação com temperatura constante (25°C).

| Tempo (h) | Ensaio            | FP  | Degradação de cor (%) |
|-----------|-------------------|-----|-----------------------|
| 5         | Controle*         | -   | 0                     |
|           | Fase sobrenadante | 0,3 | 10,59                 |
|           | Fase precipitado  | 1,9 | 0                     |
| 24        | Controle*         | -   | 0                     |
|           | Fase sobrenadante | 0,3 | 100                   |
|           | Fase precipitado  | 1,9 | 61,06                 |

\*Ensaio sem enzima, contendo apenas peróxido de hidrogênio e efluente.

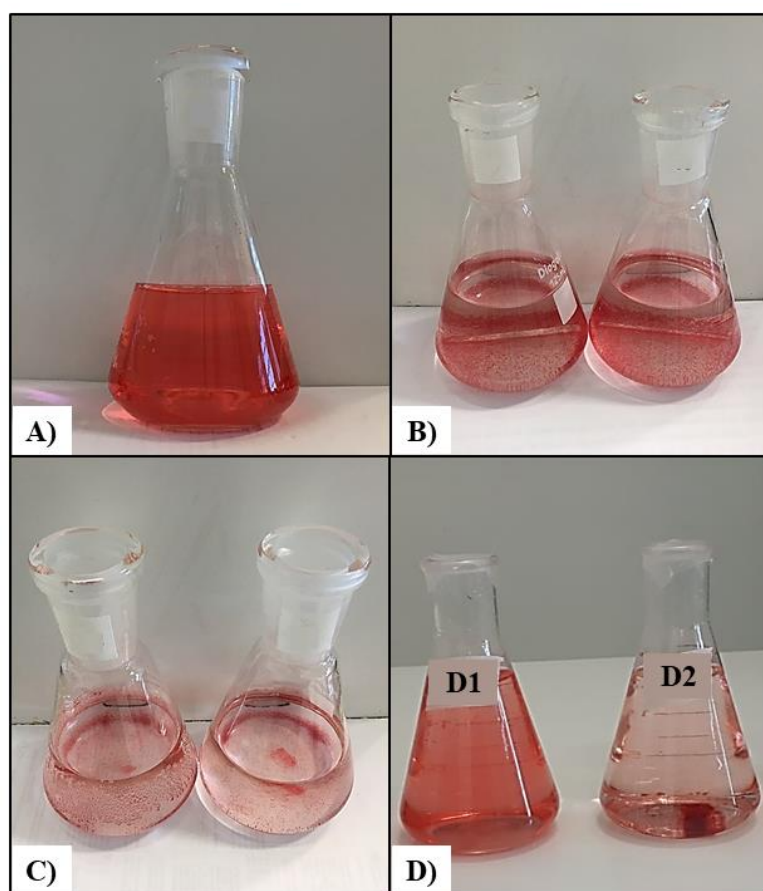
Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado nos resultados da aplicação na Tabela 8, a remoção de cor não foi satisfatória em 5 horas de reação no sistema *shaker*, tempo dos melhores resultados no estudo de Marques et al. (2017) em condições semelhantes. Apenas a fase sobrenadante apresentou remoção de cor de 10,59% em relação ao controle. Por isso, o tempo de reação foi aumentado para 24 horas, com ótimos resultados de até 100% de remoção de cor na fase sobrenadante e 61,06% na fase precipitada.

Como pode-se observar na Tabela 8, não é possível determinar uma relação entre degradação de cor e valor de FP, mas sim uma maior afinidade do corante com a fase sobrenadante, a qual é composta principalmente por enzima e solvente orgânico. É possível assumir, por meio dos resultados, que durante a Precipitação Enzimática ocorre uma transformação bioquímica nas propriedades da enzima em contato com o agente precipitante, fazendo com que a peroxidase aumente sua afinidade com a substância alvo e com isso degrade os corantes azo presentes no efluente.

Em todas as diferentes configurações de POAs desenvolvidas neste trabalho, para degradação de corante azo de efluente sintético vermelho, foi possível visualizar a formação de partículas sólidas de corante. Ao manter os ensaios em repouso, essas partículas decantaram e acumularam no fundo do Erlenmeyer. Os ensaios com maiores valores de degradação de cor tiveram esse fenômeno mais perceptível, como pode ser observado na Figura 6 a seguir.

**Figura 6.** Comparação visual entre o ensaio controle (A) e os ensaios aplicando extrato enzimático bruto (B), extrato concentrado por meio do SAB (C) e extrato concentrado por meio de Precipitação Enzimática (D) fase precipitado (D1) e fase sobrenadante (D2).



Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento de formação de partículas capazes de sedimentar e serem removidas por filtração nos POAs com peroxidase de farelo de arroz desenvolvidos nesse trabalho vão de encontro com estudos aplicando peroxidase de soja na remoção de matéria orgânica dissolvida (Steevensz et al., 2009; Al-Ansari et al., 2010; Li et al., 2016), tornando fácil e viável a separação entre efluente tratado e partículas de corante. Em relação a outros estudos recentes desenvolvidos com peroxidases extraídas de farelo de arroz, a sua aplicação em POA para remoção de cor apresentou resultados de até 48,51% para efluente sintético vermelho (Golunski


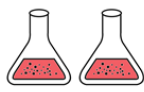


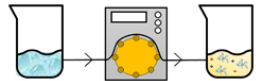

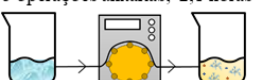

et al., 2017; Marques et al., 2017), reforçando a viabilidade de indústrias que trabalham com corantes têxteis adotar as configurações de processos com uso de enzimas não comerciais apontadas nesse trabalho para tratar suas águas residuais.

Embora sejam conhecidos os problemas para a saúde humana e ambiental causados pelo descarte de efluentes têxteis em recursos hídricos com cor intensa, alguns dos países com destaque mundial na indústria têxtil não tem em sua legislação exigências restringindo uma quantidade de cor permitida. O Brasil faz parte dessa lista, tendo restrições em diversos parâmetros, como pH, temperatura e DBO, mas não citam em sua legislação a cor (CONAMA, 2011; Ghaly et al., 2014; ZDHC, 2016; Yusuf, 2018).

#### 4.3.1 Viabilidade das configurações de processo

Diferentes configurações apresentadas neste trabalho indicam possibilidades de degradação de corantes presentes em águas residuais com resultados satisfatórios aplicando peroxidase de farelo de arroz. Na Figura 7 é possível observar um resumo das principais configurações, as quais se destacaram entre as outras pelo seu percentual de remoção de cor de efluente têxtil sintético vermelho e pelo tempo necessário para desenvolver as etapas do POA.

**Figura 7.** Comparação entre configurações de concentração enzimática e de aplicação de PFA em processos oxidativos avançados para remoção de cor de efluente sintético vermelho.

| Configuração   | Processos com peroxidase para remoção de cor de efluente têxtil sintético  |  | Resultados   |
|----------------|--|--|--|
| Configuração 1 | <p>Extrato enzimático bruto</p>   | <p>Aplicação em sistema sem agitação</p> <p>1 operação unitária; 72 horas</p>  | <p>1 operação unitária</p> <p>72,0 horas</p> <p>45,9% de remoção de cor</p>    |
| Configuração 2 | <p>Concentração enzimática através de SAB</p> <p>6 operações unitárias; 1,2 horas</p>           | <p>Aplicação em sistema sem agitação</p> <p>1 operação unitária; 24 horas</p>  | <p>7 operações unitárias</p> <p>25,2 horas</p> <p>42,5% de remoção de cor</p>  |
| Configuração 3 | <p>Concentração enzimática através de Precipitação</p> <p>6 operações unitárias; 2,1 horas</p>  | <p>Aplicação em sistema sem agitação</p> <p>1 operação unitária; 48 horas</p>  | <p>7 operações unitárias</p> <p>50,1 horas</p> <p>25,9% de remoção de cor</p>  |
| Configuração 4 | <p>Concentração enzimática através de Precipitação</p> <p>6 operações unitárias; 2,1 horas</p>  | <p>Aplicação em sistema com agitação</p> <p>1 operação unitária; 24 horas</p>   | <p>7 operações unitárias</p> <p>26,1 horas</p> <p>100,0% de remoção de cor</p> |

Fonte: Elaborada pela autora.

As configurações de processo na Figura 7 foram numeradas de 1 a 4 e são apresentadas no sentido horizontal (em linhas). Ao final de cada linha, é possível verificar os resultados obtidos por meio do POA aplicando peroxidase de farelo de arroz, relatando o número total de operações unitárias envolvidas, o tempo gasto total para realizar todo processo e o percentual de remoção de cor obtido. Na coluna central é possível observar quais os procedimentos realizados em cada uma das configurações. Cabe ressaltar que o tempo e o número de operações necessários para extração da enzima do farelo de arroz não foram contabilizados na Figura 7, tendo em vista que, para realização deste estudo, o extrato enzimático bruto foi fornecido pela Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) *campus* Carreiros.

Na Configuração 1 (Figura 7, linha 2) constam os resultados da aplicação do extrato bruto de PFA em efluente sintético em sistema sem agitação, com a qual é possível obter 45,9% de remoção de cor em 72 horas de POA com apenas 1 operação unitária. É possível obter uma remoção de cor semelhante (42,5%) por meio da Configuração 2 (Figura 7, linha 3), na qual a aplicação da enzima concentrada por meio de SAB em sistema sem agitação envolveu, no total, 7 operações unitárias e 25,2 horas desenvolvendo os procedimentos. O maior tempo gasto nesta configuração está na aplicação em efluente, pois o processo de concentração enzimática é rápido. Entretanto, o SAB envolve a maior parte das operações unitárias desta configuração, o que faz com que a Configuração 2 tenha um custo mais elevado para ser desenvolvida do que a Configuração 1.

A Configuração 3 (Figura 7, linha 4) apresenta diversas desvantagens em relação as demais configurações apresentadas. Apesar de conter o mesmo número total de operações unitárias que a Configuração 2, o tempo gasto é de 50,1 horas, um dos processos mais lentos, e a remoção de cor é baixa (25,9%). Tanto a Configuração 3 quanto a Configuração 4 (Figura 7, linha 5) envolvem a concentração da enzima por meio de Precipitação, procedimento que envolve 6 operações unitárias e leva 2,1 horas para ser desenvolvido. A principal diferença dessas configurações encontra-se na aplicação em efluente, sendo que em sistema com agitação (Configuração 4) é possível obter 100% de remoção de cor em um tempo total de processo de 26,1 horas.

Em um POA desenvolvido em larga escala, visando aplicações práticas na indústria têxtil, a comparação entre configurações se torna importante pois pode refletir diretamente nos custos do processo. Esses custos envolvem o tempo gasto de operação do sistema, a mão de

obra necessária, os reagentes e os equipamentos utilizados, entre outros fatores. Quanto menor for o número de operações envolvidas e o tempo gasto no processo, maior é a tendência de que seu custo seja reduzido.

Nos cenários projetados na Figura 7, é possível indicar que as configurações 1 e 4 para o processo de remoção de cor de efluente têxtil são as de menor custo, tendo em vista apenas os fatores analisados, e com percentual de degradação de corante satisfatórios. É importante ressaltar que a Configuração 4 possui um custo benefício interessante tendo em vista sua eficiência de remoção de 100% de cor e seu curto tempo de processo, apenas 26,1 horas. Além disso, destaca-se que os estudos apresentados foram desenvolvidos em pequena escala, com volumes de até 100 mL de efluente.

## 5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os processos oxidativos avançados desenvolvidos neste estudo mostram uma grande perspectiva para o mercado têxtil, sendo possível obter até 100% de remoção de cor do efluente com configurações de processo de baixo custo, fácil escalabilidade e eficiente para o tratamento de águas residuais têxteis. A peroxidase também contribuiu na formação de partículas sólidas de corante, com possibilidade de decantar e serem removidas por processo de filtração.

O poder oxidativo da peroxidase extraída de farelo de arroz de até +0,325 V vs EPH aponta que o investimento em sua valoração e sua inserção em reações de interesse ambiental tem grande potencial, tendo em vista sua estabilidade térmica, sua ampla faixa de atuação em diferentes valores de pH e sua afinidade com diversos substratos. Processos de valoração como concentração enzimática por meio de Sistema Aquoso Bifásico e Precipitação Enzimática, com o objetivo de aumentar a atividade enzimática e a velocidade catalítica das reações, são de interesse em aplicações industriais pelo seu baixo custo e fácil operação. Ambas técnicas de concentração foram aplicadas na peroxidase de farelo de arroz e tiveram resultados satisfatórios, aumentando a atividade enzimática específica em até 2,9 vezes.

Para cenários futuros de valoração e de aplicação de peroxidase de farelo de arroz em reações de interesse ambiental, outros estudos devem ser desenvolvidos visando aprimorar os processos oxidativos avançados envolvendo enzimas e inseri-los na indústria ampliando sua escala de operação. Tendo isso em vista, recomenda-se como trabalhos futuros:

- Caracterizar a peroxidase de farelo de arroz após passar por processos de concentração enzimática, avaliando sua tolerância térmica, sua faixa ótima de pH e sua estabilidade em relação à atividade enzimática;
- Ampliar a escala dos processos de concentração enzimática, investigando assim a escalabilidade do Sistema Aquoso Bifásico e da Precipitação Enzimática;
- Otimizar o processo de aplicação da enzima em efluente têxtil, investigando parâmetros de processo como temperatura, pH e concentração de peróxido de hidrogênio, de enzima e de efluente no meio reacional;
- Testar sistemas reacionais como ultrassom e microondas em busca de acelerar o processo de degradação do corante presente no efluente e reduzir o tempo gasto no processo oxidativo avançado;

- Avaliar as interações bioquímicas entre peroxidase e corantes azo, buscando entender os mecanismos de formação de compostos secundários potencialmente tóxicos;

- Avaliar a toxicidade do efluente após receber tratamento com peroxidase de farelo de arroz em diferentes configurações de processo e sugerir diluições para descarga do efluente tratado de forma segura em recursos hídricos.

Por fim, as técnicas de valoração de peroxidases não comerciais e sua inserção em processos oxidativos avançados demonstram-se promissoras e com potencial para serem exploradas em processos industriais, tendo em vista que a peroxidase de farelo de arroz demonstrou afinidade com corantes. Os estudos indicados acima são de grande importância para que possam ser oferecidos às indústrias processos utilizando enzimas não comerciais atrelando baixo custo com segurança para a saúde humana e para o meio ambiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedi, D.; Zhang, L.; Pyne, M.; Chou, C. P. Chapter Enzyme Biocatalysis. In: *Comprehensive Biotechnology*. 2 ed.: **Elsevier B.V.**, p. 15-24, 2011.
- Al-Ansari, M. M.; Modaressi, K.; Taylor, K. E.; Bewtra, J. K.; Biswas, N. Soybean peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of phenols in coal-tar wastewater: comparison of additives. **Environmental Engineering Science**, v. 27, p. 967-975, 2010.
- Albertsson, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3 ed.: **Wiley-Interscience**, 346 p., 1986.
- Al-Kdasi, A.; Idris, A.; Saed, K.; Guan, C. T. Treatment of textile wastewater by advanced oxidation processes - A review. **Global Nest: the International Journal**, v. 6, p. 222-230, 2004.
- Andrews, B. A.; Schmidt, A. S.; Asenjo, J. A. Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 380-390, 2005.
- Asenjo, J. A.; Andrews, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8826-8835, 2011.
- Asenjo, J. A.; Andrews, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, p. 1-10, 2012.
- Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção (Abit). **Perfil do Setor, 2018**. Disponível em: <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>>. Acesso em: 21 mai. 2019.
- Babar, S. B.; Gavade, N. L.; Park, J.; Garadkar, K. M.; Bhuse, V. M. Effect of leavening agent on structural and photocatalytic properties of ZnO nanorods. **Journal of Materials Science: Materials and Electronics**, v. 28, p. 8372-8381, 2017.
- Bafana, A.; Devi, S. S.; Chakrabarti, T. Azo dyes: past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, p. 350-371, 2011.
- Banci, L. Structural properties of peroxidases. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 253-263, 1997.
- Baskir, J. N.; Hatton, T. A.; Suter, U. W. Protein partitioning in two-phase aqueous polymer systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 541-558, 1989.
- Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Bortolotti, C. A.; Sola, M. Redox properties of heme peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 21-36, 2010.
- Bhunia, A.; Durani, S.; Wangikar, P. P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 562-567, 2001.



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.

Brown, T. L.; LeMay, H. E. Jr.; Bursten, B. E.; Murphy, C. J.; Woodward, P. M.; Stoltzfus, M. W. Chemistry: The central Science. 14 ed.: **Pearson**, 1248 p., 2017.

Cardinali, A.; Tursi, N.; Ligoro, 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 Biochemistry**, v. 3, p. 395-340, 2011.

Chivukula, M.; Spadaro, J. T.; Renganathan, V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. **Biochemistry**, v. 34, p. 7765-7772, 1995.

Cole, K. D. Purification of plasmid and high molecular mass DNA using PEG-salt two-phase extraction. **Biotechniques**, v. 11, p. 22-24, 1991.

CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília, 2011.

Cortez, E. V.; Pessoa Jr., A. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 277-283, 1999.

Cui, L.; Du, G.; Zhang, D.; Liu, H.; Chen, J. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 612-618, 2007.

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.

DiCarlo, C. M.; Vitello, L. B.; Erman, J. E. Effect of active site and surface mutations on the reduction potential of yeast cytochrome c peroxidase and spectroscopic properties of the oxidized and reduced enzyme. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 603-613, 2007.

Du, P.; Sun, P.; Sun, S.; Dong, J.; Dong, H.; Liu, R.; Guo, H.; Mu, K.; Liu, Z. Separation and purification of foot-and-mouth disease virus by multiple-stage aqueous two-phase extraction system, **Process Biochemistry**, v. 77, p. 143-150, 2019.

Dunford, H. B. Heme peroxidases. 1 ed.: **John Wiley and Sons**, 507 p., 1999.

English, A. M.; Tsapralis, G. Catalytic structure-function relationships in heme peroxidases. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 43, p. 79-125, 1995.

Eswaramoorthi, S.; Dhanapal, K.; Chauhan, D. Advanced in Textile Waste Water Treatment: The Case for UV-Ozonation and Membrane Bioreactor for Common Effluent Treatment Plants in Tirupur, Tamil Nadu, India. **Environment with People's Involvement & Coordination in India**, India, 2008.

Everse, J.; Everse, K. E.; Grisham, M. B. Peroxidases in Chemistry and Biology. 1 ed.: **CRC Press**, 272 p., 1990.

Farhangrazi, Z. S.; Fossett, M. E.; Powers, L. S.; Ellis Jr., W. R. Variable-Temperature Spectroelectrochemical Study of Horseradish Peroxidase. **Biochemistry**, v. 34, p. 2866-2871, 1995.

Feltrin, A. C. P. Aplicação de Peroxidase para degradação de Deoxinivalenol. **Universidade Federal do Rio Grande**, Rio Grande, 2013.

Feltrin, A. C. P.; Garcia, S. O.; Caldas, S. S.; Primel, E. G.; Badiale-Furlong, E.; Buffon, J. G. Characterization and application of the enzyme peroxidase to the degradation of the mycotoxin DON. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, p. 777-783, 2017.

Furtmüller, P. G.; Zederbauer, M.; Jantschko, W.; Helm, J.; Bogner, M.; Jakopitsch, C.; Obinger, C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 199-213, 2006.

Garda-Buffon, J.; Badiale-Furlog, E. Kinetics deoxynivalenol degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 21, p. 710-714, 2010.

Gautério, G. V.; Fernandes, S. S.; Molon, F. O.; Figueira, F. S.; Buffon, J. G.; Kalil, S. J. Purification of Peroxidase from Rice Bran Using Expanded-Bed Ion-Exchange Chromatography. **Adsorption Science and Technology**, v. 33, p. 153-164, 2015.

Gautério, G. V.; Malta, D. S.; Reginatto, L.; Feltrin, A. C. P.; Garda-Buffon, J.; Kalil, S. J. Use of partially purified peroxidase of agricultural by-product rice bran in deoxynivalenol reduction. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 1998-2008, 2017.

Ghaly, A. E.; Ananthashankar, R.; Alhattab, M.; Ramakrishnan, V. V. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Journal of Chemical Ecology**, v. 5, 1000182, 2014.

Gill, P. K.; Manhas, R. K.; Singh, P. Purification and properties of a heat-stable exoinulinase isoform from *Aspergillus fumigatus*. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 894-902, 2006.

Golunski, S. M.; Scapini, T.; Moskovski, T. A.; Marques, C. T.; Camargo, A. F.; Preczeski, K. P.; Dalla Rosa, C.; Baldissarelli, D. P.; Mulinari, J.; Venturin, B.; Vargas, G. D. L. P.; Buffon, J. G.; Mossi, A. J.; Treichel, H. Commercial and noncommercial peroxidases activity under ultrasound and microwave treatment: a pretreatment to improve wastewater treatment. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1890-1895, 2017.

Goodin, D. B.; Davidson, M. G.; Roe, J. A.; Mauk, A. G.; Smith, M. Amino acid substitutions at tryptophan-51 of cytochrome c peroxidase: effects on coordination, species preference for cytochrome c, and electron transfer. **Biochemistry**, v. 30, p. 4953-4962, 1991.

Greijer, H.; Karlson, L.; Lindquist, S.; Hagfeldt, A. Environmental aspect of electricity generation from a nanocrystalline dye sensitized solar cell system. **Renewable Energy**, v. 23, p. 27-39, 2001.

**HANNA Instruments: Brasil Exp. e Imp. LTDA**, 2017. Disponível em <<https://hannainst.com.br/>>. Acesso em: 20 out. 2018.

Hassaan, M. A.; Nembr, A. E. Advanced oxidation processes for textile wastewater treatment. **Internacional Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 2, p. 85-93, 2017.

Hatti-Kaul, R. A. Aqueous Two-phase Systems: Methods and Protocols. 1 ed.: **Humana Press**, 454 p., 2000.

Hayashi, Y.; Yamazaki, I. The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 9101-9106, 1979.

Ishihara, T.; Yamamoto, S. Optimization of monoclonal antibody purification by ion-exchange chromatography. Application of simple methods with linear gradient elution experimental data. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, p. 99-106, 2005.

Karthikeyeni, S.; Vijayakumar, T. S.; Vasanth, S.; Ganesh, A.; Vignesh, V.; Akalya, J.; Thirumurugan, R.; Subramanian, P. Decolourisation of direct orange S dye by ultrasonication using iron oxide nanoparticles. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 10, p. 199-208, 2015.

Kasiri, M. B.; Khataee, A. R. Removal of organic dyes by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process: modelling and optimization. **Environmental Technology**, v. 33, p. 1417-1425, 2012.

Khan, A. A.; Robinson, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, p. 407-410, 1994.

Klibanov, A. M.; Tu, T.-M.; Scott, K. P. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. **Science**, v. 221, p. 259-261, 1983.

Lai, W. W.; Hsu, M.; Lin, A. Y. The role of bicarbonate anions in methotrexate degradation via UV/TiO<sub>2</sub>: mechanisms, reactivity and increased toxicity. **Water Research**, v. 112, p. 157-166, 2017.

Li, J.; Peng, J.; Zhang, Y.; Ji, Y.; Shi, H.; Mao, L.; Gao, S. Removal of triclosan via peroxidases-mediated reactions in water: Reaction kinetics, products and detoxification. **Journal of Hazardous Materials**, v. 310, p. 152-160, 2016.

Malani, R. S.; Khanna, S.; Moholkar, V. S. Sonoenzymatic decolourization of anazo dye employing immobilized horseradish peroxidase (HRP): a mechanistic study. **Journal of Hazardous Materials**, v. 256, p. 90-97, 2013.

Marques, C. T. Aplicação de peroxidases não comerciais extraídas dos farelos de arroz e soja na descoloração de efluentes. **Universidade Federal da Fronteira Sul**, Erechim, 2016.

Marques, C. T.; Golunski, S. M.; Venturin, B.; Camargo, A. F.; Scapini, T.; Baldissarelli, D.; Modkovski, T. A.; Preczeski, K. P.; Dalla Rosa, C.; Vargas, G. D. L. P.; Buffon, J. G.; Rosin, C. K.; Arenzon, A.; Mossi, A. J.; Treichel, H. Removal of a red dye using noncommercial peroxidase extracted from rice bran. **Environmental Quality Management**, v. 27, p. 25-31, 2017.

Medina, J. D. C.; Woiciechowski, A. L.; Guimarães, L. R. C.; Karp, S. G.; Soccol, C. R. Chapter Peroxidases. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. 1 ed.: **Elsevier B.V.**, p. 217-232, 2017.

Montaño, J. G. Combination of Advanced Oxidation Processes and Biological Treatment For Commercial Reactive Azo Dyes Removal. **University of Barcelona**, Barcelona, 2007.

Motamed, S.; Ghaemmaghami, F.; Alemzadeh, I. Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase: Purification and Characterization. **Industrial Engineering Chemical Research**, v. 48, p. 10614-10618, 2009.

Nakayama, T.; Amachi, T. Fungal peroxidase: its structure, function, and application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, p. 185-198, 1999.

Narayanasamy, L.; Murugesan, T. Degradation of alizarin yellow R using UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> advanced oxidation process. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 33, p. 482-489, 2014.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6 ed.: **W. H. Freeman**, 1340 p., 2012.

Nese, T.; Sivri, N.; Toroz, I. Pollutants of Textile Industry Wastewater and Assessment of its Discharge Limits by Water Quality Standards. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 7, p. 97-103, 2007.

Ntuli, F.; Ikhu-Omoregbe, D.; Kuipa, P. K.; Muzenda, E.; Belaid, M. Characterization of Effluent from Textile Wet Finishing Operations. **Proceedings of the World Congress of Engineering and Computer Science**, v1, 2009.

Pandey, V. P.; Awasthi, M.; Singh, S.; Tiwari, S.; Dwivedi, U. N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 6, 1000308, 2017.

Preczeski, K. P.; Kamanski, A. B.; Scapini, T.; Camargo, A. F.; Modkovski, T. A.; Rossetto, V.; Venturin, B.; Mulinari, J.; Golunski, S. M.; Mossi, A. J.; Treichel, H. Efficient and low-cost alternative of lipase concentration aiming at the application in the treatment of waste cooking oils. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 851-857, 2018.

Raghavarao, K. S. M. S.; Guinn, M. R.; Todd, P. Recent developments in aqueous two-phase extraction in bioprocessing. **Separation and Purification Methods**, v. 27, p. 1-49, 1998.

Reife, A.; Freeman, H. Environmental Chemistry of Dyes and Pigments. 1 ed.: **John Wiley and Sons**, 352 p., 1996.

Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F. Experimental design and process optimization. 1 ed.: **CRC Press**, 336 p., 2014.

Rodríguez, M. Fenton and UV-vis Based Advanced Oxidation Processes in Wastewater Treatment: Degradation, Mineralization and Biodegradability Enhancement. **University of Barcelona**, Barcelona, 2003.

Rudrappa, T.; Lakshmanan, V.; Kaunain, R.; Singara, N. M.; Neelwame, B. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). **Food Chemistry**, v. 105, p. 1312-1320, 2007.

Ruiz-Ruiz, F.; Benavides, J.; Aguilar, O.; Rito-Palomares, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1-13, 2012.

Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Fundamentals of Analytical Chemistry. 9 ed.: **Cengage Learning**, 1072 p., 2013.

Smith, A. T.; Veitch, N. C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, p. 269-278, 1998.

Song, S.; Ying, H.; He, Z.; Chen, J. Mechanism of decolorization and degradation of CI direct Red 23 by ozonation combined with sonolysis. **Chemosphere**, v. 66, p. 1782-1788, 2007.

Sonkar, K. S.; Pachauri, M.; Kumar, A.; Shukla, A.; Patel, M.; Jagannadham, M. V. Heme-peroxidase from medicinal plant *Artocarpus lakoocha*: Purification, characterization and wound healing studies. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 180-190, 2015.

Steevensz, A.; Al-Ansari, M. M.; Taylor, K. E.; Bewtra, J. K.; Biswas, N. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 761-769, 2009.

Targovnik, A. M.; Cascone, O.; Miranda, M. V. Extractive purification of recombinant peroxidase isozyme c from insect larvae in aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 199-205, 2012.

Tatsumi, K.; Wada, K.; Ichikawa, H. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 126-130, 1996.

Veitch, N. C.; Smith, A. T. Horseradish peroxidase. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 107-162, 2001.

Vilter, H. Aqueous two-phase extraction of plant enzymes from sources containing large amounts of tannins and anionic mucilages. **Bioseparation**, v. 1, p. 283-292, 1990.

Voncina, D. B.; Majcen-Le-Marechal, A. Reactive dye decolorization using combined ultrasound/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Dyes Pigments**, v. 59, p. 173-179, 2003.

Wamburguh, D.; Chianelli, R. R. Indigo dye waste recovery from blue denim textile effluent: a by-product synergy approach. **New Journal of Chemistry**, v. 32, p. 2189-2194, 2008.

WTO. World trade statistical review 2018. **World Trade Organization**, Switzerland, 2018.

Yusuf, M. Handbook of Textile Effluent Remediation. 1 ed.: **Jenny Stanford Publishing**, 434 p., 2018.

Yusuf, M.; Shabbir, M.; Mohammad, F. Natural colorants: historical, processing and sustainable prospects. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, p. 123-145, 2017.

ZDHC. Textile Industry Wastewater Discharge Quality Standards: Literature Review. Zero Discharge of Hazardous Chemicals Programme. **Leaders in Advancing Environmental Responsibility**, 2016.

Zederbauer, M.; Furtmüller, P. G.; Brogioni, S.; Jakopitsch, C.; Smulevich, C.; Obinger, C. Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 571-584, 2007.

Zeng, G.; Zhao, M.; Huang, D.; Lai, C.; Hurang, C.; Wei, Z.; Xu, P.; Li, N.; Zhang, C.; Li, F.; Cheng, M. Purification and biochemical characterization of two extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for lignin biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 166-172, 2013.

Zhang, Z.; Chouchane, S.; Magliozzo, R. S.; Rusling, J. F. Direct voltammetry and enzyme catalysis with *M. tuberculosis* catalase-peroxidase, peroxidases and catalase in lipid films. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 163-170, 2002.