



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**JANAINA DUARTE BAUMER**

**REMOÇÃO DE COR E DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE DE  
SOLUÇÕES DE CORANTES TÊXTEIS DEGRADADOS PELA  
ENZIMA HORSERADISH PEROXIDASE (HRP)**

**FLORIANÓPOLIS  
2015**



JANAINA DUARTE BAUMER

**Remoção de Cor e Determinação da Toxicidade de Soluções de  
Corantes Têxteis Degradados pela Enzima Horseradish peroxidase  
(HRP)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte integrante dos requisitos exigidos para obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza

Coorientadores: Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger e Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Baumer, Janaina Duarte

Remoção de Cor e Determinação da Toxicidade de Soluções de Corantes Têxteis Degradados pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP) / Janaina Duarte Baumer ; orientador, Antônio Augusto Ulson de Souza ; coorientador, Gilmar Sidnei Erzinger ; coorientador, Agenor Furigo Jr. – Florianópolis, SC, 2015

192 p.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. Indústria têxtil. 3. Corantes. 4. Horseradish peroxidase. 5. Toxicidade. I. Ulson de Souza, Antônio Augusto. II. Erzinger, Gilmar Sidnei. III. Furigo Jr., Agenor. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. V. Título.

JANAINA DUARTE BAUMER

**Remoção de Cor e Determinação da Toxicidade de Soluções de  
Corantes Têxteis Degradados pela Enzima Horseradish peroxidase  
(HRP)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como parte integrante dos requisitos exigidos para obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

---

Orientador: Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Coorientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Coorientador: Prof. Dr. Gilmar Sidney Erzinger  
Universidade da Região de Joinville  
BANCA EXAMINADORA

---

Prof.ª Dra. Débora de Oliveira  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.ª Dra. Heloísa Lima Brandão  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. André Lourenço Nogueira  
Universidade da Região de Joinville

---

Prof.ª Dra. Sandra Medeiros Westrupp  
Universidade da Região de Joinville



*“Insanidade é continuar fazendo  
sempre a mesma coisa e esperar  
resultados diferentes”*

Albert Einstein



## AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por me guiar por toda essa caminhada.

Aos professores Antônio Augusto Ulson de Souza, Agenor Furigo Júnior e Gilmar Erzinger pela orientação e dedicação.

Ao Prof. Lineu Fernando Del Ciampo por todo apoio e incentivo.

Ao Edevilson, secretário do programa de pós-graduação em Engenharia Química, pelo profissionalismo e atenção.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSC, que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

Ao LABMASSA/UFSC, ao Laboratório de Fotobiologia/UNIVILLE e ao Laboratório de Meio Ambiente/UNIVILLE pela infraestrutura disponível para a realização deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, em especial, Cláudia H. G. Correia e Aline S. Coan pelo auxílio na parte experimental e ao colega Luciano Henrique Pinto.

Aos amigos, pela amizade acima de tudo.

Aos meus pais e meu irmão pelo amor, apoio e incentivo. Tudo que sou é graças a vocês.

Ao meu marido que esteve presente em todos os momentos, dando o incentivo e o apoio necessário.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.



## RESUMO

A indústria têxtil é responsável pela geração de grandes quantidades de efluentes, os quais possuem elevada concentração de corantes. Estes corantes, em geral, são de difícil tratamento e, quando lançados no ambiente, podem provocar sérios efeitos adversos. Os sistemas oxidativos, dentre eles os sistemas que utilizam enzimas, vêm sendo muito estudados como alternativa para o tratamento de efluentes têxteis, dada a capacidade de degradação de compostos cromóforos, e por não demandarem insumos químicos de elevado impacto ambiental, quando comparado aos processos tradicionalmente utilizados na indústria têxtil. Entretanto, estudos têm mostrado que alguns processos oxidativos podem gerar compostos mais tóxicos que a espécie química inicial. Neste trabalho, foi estudada a remoção de cor de soluções de corantes têxteis (Azul Turquesa Remazol G, Preto Remazol B133%, Azul Brilhante Remazol, Vermelho Brilhante Remazol 3BS-A 150% e Vermelho CQ4BL) utilizando a enzima Horseradish peroxidase (HRP). Foi avaliada a toxicidade destas soluções de corante antes e após o processo de degradação enzimática, frente aos organismos testes: o microcrustáceo *Daphnia magna*, a alga *Euglena gracilis* e a bactéria *Vibrio fischeri*. A enzima HRP promoveu remoção de cor em 95% das soluções do corante têxtil Azul Brilhante, 90% do Azul Turquesa Remazol G, 87% corante Preto Remazol B133% e apenas 20% do Vermelho CQ4BL. Para o corante Vermelho Brilhante não foi observada nenhuma remoção de cor. A toxicidade aguda de todos os corantes têxteis estudados, frente aos organismos *D. magna* e *V. fischeri*, aumentou após o tratamento enzimático. As soluções de corante Azul Brilhante Remazol e Preto Remazol foram as que apresentaram maior toxicidade aguda frente à *D. magna* (FT 16) e ao *V. fischeri*, (FT 32) após o tratamento enzimático, respectivamente. No teste de toxicidade com a alga *Euglena gracilis* o rendimento fotossintético não foi inibido por nenhum dos corantes. Nos testes crônicos utilizando o organismo *D. magna*, o corante Vermelho CQ4BL foi o único que não alterou a fecundidade do organismo teste.

**Palavras-chave:** Indústria têxtil, Corantes, Horseradish peroxidase, Toxicidade.



## ABSTRACT

The textile industry is responsible for the generation of large amounts of effluent, which have high charge dyes. These dyes are usually difficult to treat and when released into the environment may cause serious adverse effects. The oxidative systems, including systems that use enzymes have been widely studied as an alternative for the treatment of textile effluents, in view of the degradation ability of the chromophores compounds and does not demand it chemical inputs high environmental impact when compared to the processes traditionally used in the textile industry. However, studies have shown that some oxidative processes can generate more toxic compounds than initial chemical species. In this work, the color removal of textile dyes solutions using horseradish peroxidase (HRP) (Remazol Turquoise Blue G - Blue 21, Remazol Black B 133% - Reactive Black 5, Remazol Brilliant Blue - Reactive Blue 19, Remazol Brilliant Red 3BS 150% - Reactive Red 239 and Red CQ4BL - Red 195). The toxicity of such dye solutions was evaluated before and after the enzymatic degradation process to compared to the test organisms: micro crustacean *Daphnia magna*, the algae *Euglena gracilis* and bacteria *Vibrio fischeri*. The HRP enzyme promoted color removal in 95% solutions of the textile Brilliant Blue dye, 90% Remazol Turquoise Blue G, Remazol Black B 133% dye 87% and only 20% Red CQ4BL. For Brilliant Red 3BS 150% dye was not observed any color removal. In all textile dyes were evaluated studied the acute toxicity of indicator organisms, *D. magna* and *V. fischeri* which were observed in the increased toxicity after enzymatic treatment. The Remazol Brilliant Blue dye solutions and the Remazol Black B 133%, showed the highest toxicity against organism *D. magna* (16 FT) and *V. fischeri*, (FT 32) after enzymatic treatment, respectively. In toxicity tests with algae *Euglena gracilis* photosynthetic yield was not inhibited by any of the dyes. In chronic tests using the *D. magna*, the dye Red CQ4BL was the only one that did not affect the fertility of the test organism.

**Keywords:** Textile industry, dyes, Horseradish peroxidase, toxicity



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Grupo prostético heme das peroxidases; B) Estrutura tridimensional da HRP mostrando o grupo heme (de cor vermelha) no sítio ativo da molécula entre dois átomos de cálcio (esferas azuis).....	42
Figura 2. Ciclo catalítico da peroxidase.....	43
Figura 3. Cultura de <i>Vibrio fischeri</i> sob luz negra.....	57
Figura 4. Exemplar de <i>Euglena gracilis</i> (A) e seu esquema estrutural (B).....	59
Figura 5. Exemplar de <i>Daphnia magna</i> (A) e seu esquema estrutural (B).....	61
Figura 6. Exemplar de <i>Danio rerio</i> .....	63
Figura 7. Estrutura química do corante Azul Brilhante Remazol (Reactive Blue 19).....	69
Figura 8. Estrutura química do corante Azul Turqueza Remazol G (Reactive Blue 21).....	70
Figura 9. Estrutura química do corante Preto Remazol B133% (Reactive Black 5).....	70
Figura 10. Estrutura química do corante Vermelho CQ4BL (Reactive Red 195).....	71
Figura 11. Estrutura química do corante Vermelho Brilhante Remazol (Reactive Red 239).....	71
Figura 12. Reação de conversão do ABTS no cátion ABTS <sup>+</sup> catalisado pela HRP.....	74
Figura 13. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> com três repetições no ponto central para o corante Azul Brilhante Remazol utilizando como resposta a velocidade inicial.....	91
Figura 14. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> com três repetições no ponto central para o corante Azul Brilhante Remazol utilizando como resposta à remoção de cor (%).....	91
Figura 15. Diagrama do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> do corante Azul Brilhante Remazol para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.....	92
Figura 16. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brilhante por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.....	93
Figura 17. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brilhante por tempo para concentração de enzima de 5,26 U/mL.....	95
Figura 18. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brilhante por tempo para concentração de enzima de 10,52 U/mL.....	95
Figura 19. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brilhante por tempo para concentração de enzima de 15,79 U/mL.....	96

Figura 20. Ciclo catalítico das hemeperoxidases .....	97
Figura 21. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Brillhante à temperatura de 20 °C.....	98
Figura 22. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Brillhante à temperatura de 30 °C.....	98
Figura 23. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Brillhante à temperatura de 40 °C.....	99
Figura 24. Influência da temperatura e do pH na remoção de cor do corante Azul Brillhante no tempo de 60 min.....	99
Figura 25. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Azul Brillhante variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	101
Figura 26. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Azul Brillhante variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	101
Figura 27. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Azul Brillhante para o tempo de 60 min.....	103
Figura 28. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> com três repetições no ponto central para o corante Azul Turqueza utilizando como resposta a velocidade inicial.....	105
Figura 29. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> com três repetições no ponto central para o corante Azul Turqueza utilizando como resposta à remoção de cor (%)......	105
Figura 30. Diagrama do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> do corante Azul Turqueza para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.....	106
Figura 31. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.....	107
Figura 32. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para concentração de enzima de 5,26 U/mL.....	108
Figura 33. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para concentração de enzima de 10,52 U/mL.....	109
Figura 34. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para concentração de enzima de 15,79 U/mL.....	109
Figura 35. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Turqueza à temperatura de 20 °C.....	110
Figura 36. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Turqueza à temperatura de 30 °C.....	111

Figura 37. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Turqueza à temperatura de 40 °C.....	111
Figura 38. Influência da temperatura e do pH na remoção de cor do corante Azul Turqueza no tempo de 60 min.....	112
Figura 39. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Azul Turqueza variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	113
Figura 40. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Azul Turqueza variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	114
Figura 41. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Azul Turqueza para o tempo de 60 min.....	115
Figura 42. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> com três repetições no ponto central para o corante Preto Remazol utilizando como resposta a velocidade inicial.....	117
Figura 43. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> com três repetições no ponto central para o corante Preto Remazol utilizando como resposta à remoção de cor (%)......	118
Figura 44. Diagrama do planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> do corante Preto Remazol para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.....	119
Figura 45. Gráfico de remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.....	120
Figura 46. Gráfico de remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para concentração de enzima de 21,04 U/mL.....	121
Figura 47. Gráfico de remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para concentração de enzima de 31,56 U/mL.....	121
Figura 48. Gráfico remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para concentração de enzima de 42,08 U/mL.....	122
Figura 49. Influência do pH na remoção de cor do corante Preto Remazol em pH à temperatura de 20 °C.....	123
Figura 50. Influência do pH na remoção de cor do corante Preto Remazol em pH à temperatura de 30 °C.....	123
Figura 51. Influência do pH na remoção de cor do corante Preto Remazol em pH à temperatura de 40 °C.....	124
Figura 52. Influência da temperatura e do pH na remoção de cor do corante Preto Remazol no tempo de 60 min.....	124
Figura 53. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Preto Remazol variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	125

Figura 54. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Preto Remazol variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	126
Figura 55. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Preto Remazol para o tempo de 60 min.....	127
Figura 56. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial $2^4$ com três repetições no ponto central para o corante Vermelho CQ4BL utilizando como resposta a velocidade inicial.....	129
Figura 57. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial $2^4$ com três repetições no ponto central para o corante vermelho CQ4BL utilizando como resposta à remoção de cor (%). ....	129
Figura 58. Diagrama do planejamento fatorial $2^4$ do corante Vermelho CQ4BL para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.....	130
Figura 59. Gráfico de remoção de cor do corante Vermelho CQBL por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.....	131
Figura 60. Gráfico de remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL por tempo para concentração de enzima de 21,04 U/mL.....	132
Figura 61. Gráfico de remoção de cor do corante vermelho CQ4BL por tempo para concentração de enzima de 31,56 U/mL.....	132
Figura 62. Gráfico de remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL por tempo para concentração de enzima de 42,08 U/mL.....	133
Figura 63. Influência do pH na remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL à temperatura de 20 °C.....	134
Figura 64. Influência do pH na remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL à temperatura de 30 °C.....	134
Figura 65. Influência do pH na remoção de cor do Corante Vermelho CQ4BL à temperatura de 40 °C.....	135
Figura 66. Influência da temperatura e do pH na remoção de cor do Corante Vermelho CQ4BL no tempo de 60 min.....	135
Figura 67. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Vermelho CQ4BL variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	136
Figura 68. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Vermelho CQ4BL variando a concentração de peróxido de hidrogênio.....	137
Figura 69. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Vermelho CQ4BL para o tempo de 60 min.....	138

Figura 70. Representação gráfica do estudo da cinética de descoloração dos corantes têxteis segundo o modelo de pseudo-segunda ordem a) Corante Azul Brilhante, b) Corante Azul Turqueza, c) Corante Preto Remazol d) Corante Vermelho CQ4BL.....	141
Figura 71. Espectro da solução de corante Azul Brilhante antes e após o tratamento enzimático.....	142
Figura 72. Proposta de mecanismo de transformação biocatalítica do corante Azul Brilhante por <i>A. Flavus</i> .....	143
Figura 73. Espectro da solução de corante Azul Turqueza antes e após o tratamento enzimático.....	143
Figura 74. Metabólitos sugeridos por Silva <i>et al.</i> (2012) para degradação do corante Azul Turqueza pela HRP.....	144
Figura 75. Espectro da solução de corante Preto Remazol antes e após o tratamento enzimático.....	144
Figura 76. Espectro da solução de Corante Vermelho CQ4BL antes e após o tratamento enzimático.....	145
Figura 77. CE <sub>50</sub> dos corantes têxteis antes e após tratamento frente ao bioindicador <i>Daphnia magna</i> .....	149
Figura 78. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre o rendimento fotossintético da alga <i>E. gracilis</i> em 2 dias.....	152
Figura 79. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre o rendimento fotossintético da alga <i>E. gracilis</i> em 7 dias.....	153
Figura 80. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre a taxa de transporte de elétrons (ETR) da alga <i>E. gracilis</i> em 2 dias.....	154
Figura 81. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre a taxa de transporte de elétrons (ETR) da alga <i>E. gracilis</i> em 7 dias.....	154
Figura 82: Número de <i>Daphnia magna</i> adultas sobreviventes expostas as amostras no período de 21 dias.....	157
Figura 83. Número médio de filhotes produzidos por <i>Daphnia magna quando</i> expostas as amostras do corante Azul Brilhante antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias.....	158
Figura 84. Número médio de filhotes produzidos por <i>Daphnia magna quando</i> expostas as amostras do corante Azul Turqueza antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias.....	159
Figura 85. Número médio de filhotes produzidos por <i>Daphnia magna quando</i> expostas as amostras do corante Preto Remazol antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias.....	160

Figura 86. Número médio de filhotes produzidos por *Daphnia magna* quando expostas as amostras do corante Vermelho CQ4BL antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias.....161

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura e classificação das enzimas.....	41
Tabela 2: Limites Máximos estabelecidos pela portaria 017/2002 (FATMA) de Toxicidade Aguda para os microcrustáceos – <i>D. magna</i> (Straus, 1820) e para as bactérias bioluminescentes – <i>V. fisheri</i> , dos efluentes de diferentes categorias.....	67
Tabela 3. Descrição dos corantes estudados.....	72
Tabela 4. Propriedades da enzima Horseradish peroxidase (HRP).....	72
Tabela 5. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial $2^4$ .....	76
Tabela 6. Planejamento experimental dos fatores de maior influência para remoção dos corantes.....	77
Tabela 7. Condições das reações do estudo da influência da quantidade de enzima nas reações de remoção de cor.....	78
Tabela 8. Condições das reações do estudo cinético da degradação enzimática dos corantes e otimização da quantidade de peróxido de hidrogênio.....	79
Tabela 9. Condições das reações do estudo cinético da degradação enzimática dos corantes e otimização do pH e da temperatura.....	80
Tabela 10. Condições ótimas das reações de descoloração de soluções dos corantes têxteis 50 mg/L.....	82
Tabela 11. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial $2^4$ .....	89
Tabela 12. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Azul Brilhante em função das condições de reação.....	90
Tabela 13. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Azul Turquesa remazol em função das condições de reação.....	104
Tabela 14. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Preto Remazol em função das condições de reação.....	116
Tabela 15. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL em função das condições de reação.....	128
Tabela 16. Melhores condições das reações de descoloração de soluções dos corantes têxteis a 50 mg/L e rendimentos máximos obtidos .....	140
Tabela 17. Constantes cinéticas das reações de remoção de cor.....	140
Tabela 18. Fator de toxicidade dos corantes têxteis (nas concentrações de 100 mg/L) antes e após tratamento frente ao bioindicador <i>Daphnia magna</i> .....	146
Tabela 19. $CE_{50}$ dos corantes têxteis antes e após tratamento frente ao Bioindicador <i>Daphnia magna</i> .....	148
Tabela 20. Fator de toxicidade dos corantes têxteis (na concentração: 100 mg/L) antes e após tratamento frente ao bioindicador <i>Vibrio fischeri</i> .....	151



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas  
Abs – Absorbância  
CE<sub>50</sub> – Concentração efetiva média  
CENO – Concentração de efeito não-observado  
CEO – Concentração de efeito observado  
CL<sub>50</sub> – Concentração letal média  
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente  
COT - Carbono Orgânico Total  
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio  
DP – Desvio padrão  
DQO - Demanda Química de Oxigênio  
ETR – Taxa de transporte de elétrons  
FATMA – Fundação do Meio Ambiente  
FD - Fator de Diluição  
FD<sub>bi</sub> – Fator de diluição para o *Vibrio fischeri*  
FD<sub>d</sub> – Fator de diluição para *Daphnia magna*  
FT – Fator de toxicidade  
HRP - Horseradish peroxidase  
PAM - *Fluorímetro* de Amplitude Modulada  
R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação  
T – Temperatura.  
TL<sub>50</sub> – Limite de tolerância mediana  
[E] – Concentração de enzima  
[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] – Concentração de peróxido de hidrogênio



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
3.1 Industria Têxtil.....	35
3.1.1 Efluentes Têxteis.....	35
3.1.2 Corantes Têxteis.....	36
3.1.2.1 Classificação dos Corantes têxteis.....	37
3.2 Tratamento de Efluentes/Corantes Têxteis.....	38
3.2.1 Tratamento de Efluentes/Corantes por Processos enzimáticos.....	39
3.3 Enzimas.....	40
3.3.1 Classificação das Enzimas.....	41
3.3.2 Peroxidases.....	41
3.3.2.1 Peroxidases no Tratamento de Corantes Têxteis.....	43
3.3.2.2 Condições Ótimas da Atividade da Enzima Horseradish Peroxidase (HRP).....	45
3.3.2.3 Toxicidade dos Efluentes/Corantes Tratados com a HRP.....	45
3.4 Ecotoxicologia Aquática.....	46
3.4.1 Histórico e Conceitos.....	46
3.4.2 Princípios dos Testes Ecotoxicológicos.....	51
3.4.3 Testes de Toxicidade Aguda.....	51
3.4.4 Testes de Toxicidade Crônica.....	52
3.4.5 Organismos Utilizados.....	53
3.4.5.1 Bactérias - <i>Vibrio fischeri</i> .....	56
3.4.5.2 Algas – <i>Euglena gracilis</i> .....	58
3.4.5.3 Microcrustáceos – <i>Daphnia magna</i> .....	60
3.4.5.4 Peixes – <i>Danio rerio</i> .....	62
3.4.6 Expressão dos Resultados.....	64
3.4.7 Legislação.....	65
<b>4 MATERIAIS E MÉTOOS.....</b>	<b>69</b>
4.1. Materiais.....	69
4.1.1. Corantes.....	69
4.1.2. Enzima.....	72
4.1.3 Organismos-teste.....	72
4.1.3.1 <i>Euglena gracilis</i> - Organismos e Manutenção.....	73
4.1.3.2 <i>Daphnia magna</i> - Organismos e Manutenção.....	73

4.1.3.3 <i>Vibrio fischeri</i> - Organismos e Manutenção.....	74
4.2. Determinação da Atividade Enzimática da Horseradish Peroxidase.....	74
4.3 Espectro de Absorção UV-Vis dos Corantes.....	74
4.4 Determinação da Velocidade Inicial e da Redução de Cor.....	75
4.5 Estudos de Remoção de cor .....	75
4.6 Estudo dos Fatores de Maior Influência para Remoção dos Corantes.....	76
4.7 Estudo Cinético da Degradação Enzimática dos Corantes .....	77
4.7.1 Avaliação da Influência da Concentração de Enzima.....	77
4.7.2 Avaliação da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio .....	78
4.7.3 Avaliação da Influência do pH e da Temperatura .....	79
4.7.3.1 Estudo da Cinética de Degradação .....	80
4.7.3.1.1 Estudo da Cinética de Degradação – Primeira Ordem.....	80
4.7.3.1.2 Estudo da Cinética de Degradação – Segunda Ordem.....	81
4.7.3.1.3 Estudo da Cinética de Degradação – Pseudo Primeira Ordem.	81
4.7.3.1.4 Estudo da Cinética de Degradação – Pseudo Segunda Ordem.	81
4.7.4 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante.....	82
4.7.5 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante.....	82
4.8 Testes de Toxicidade.....	83
4.8.1 Teste de Toxicidade Aguda utilizando o Organismo <i>Daphnia magna</i> .....	83
4.8.2 Teste de Toxicidade Aguda utilizando o Organismo <i>Vibrio fischeri</i> .....	81
4.8.3 Teste de Eficiência Fotossintética no PAM utilizando o Organismo <i>Euglena gracilis</i> .....	84
4.8.4 Teste de Toxicidade Crônica utilizando o Organismo <i>Daphnia magna</i> .....	85
4. 9 Análise Estatística.....	86
4.9.1 Determinação da Concentração Efetiva Média (CE <sub>50</sub> ).....	86
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
5.1 Estudos de Remoção de Cor do Corante Azul Brilhante.....	89
5.1.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção de Cor do Corante Azul Brilhante.....	89
5.1.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Azul Brilhante Remazol.....	93
5.1.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Azul Brilhante.....	94

5.1.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Azul Brillhante Remazol.....	97
5.1.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Azul Brillhante Remazol.....	100
5.1.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Azul Brillhante Remazol.....	102
5.2 Estudos de Remoção de Cor do Corante Azul Turqueza.....	104
5.2.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção de Cor do Corante Azul Turqueza.....	104
5.2.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Azul Turqueza.....	107
5.2.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Azul Turqueza.....	108
5.2.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Azul Turqueza.....	110
5.2.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Azul Turqueza.....	113
5.2.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Azul Turqueza.....	114
5.3 Estudos de Remoção de Cor do Corante Preto Remazol.....	116
5.3.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção de Cor do Corante Preto Remazol.....	116
5.3.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Preto Remazol.....	119
5.3.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Preto Remazol.....	120
5.3.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Preto Remazol.....	123
5.3.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Preto Remazol.....	125
5.3.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Preto Remazol.....	126
5.4 Estudos de Remoção de Cor do Corante Vermelho CQ4BL.....	127
5.4.1 Estudo dos Fatores de Maior influência na Remoção de Cor do Corante Vermelho CQ4BL.....	127
5.4.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Vermelho CQ4BL.....	130
5.4.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Vermelho CQ4BL.....	132

5.4.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Vermelho CQ4BL.....	133
5.4.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Vermelho CQ4BL....	136
5.4.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Vermelho CQ4BL.....	138
5.5. Estudos de Remoção de Cor do Corante Vermelho Brilhante.....	139
5.5.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção do Corante – Vermelho Brilhante.....	139
5.6 Estudo Cinético da Degradação Enzimática dos Corantes.....	139
5.7 Espectros das Soluções antes e após o Tratamento Ótimo.....	142
5.8 Testes de Toxicidade.....	146
5.8.1 Teste agudo utilizando o organismo <i>Daphnia magna</i> .....	146
5.8.2 Teste agudo utilizando o organismo <i>Vibrio fischeri</i> .....	150
5.8.3 Teste de eficiência fotossintética no PAM utilizando o organismo <i>Euglena gracilis</i> .....	152
5.8.4 Teste de toxicidade crônica utilizando o organismo <i>Daphnia magna</i> .....	155
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>163</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>183</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>187</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>189</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os efeitos das ações antrópicas representam uma grande preocupação com a poluição e as consequentes mudanças do ecossistema do planeta (AZEVEDO; CHASIN, 2009).

Dentro do contexto do fenômeno da poluição ambiental, cabe à indústria têxtil um lugar de destaque, principalmente, em função de seu elevado consumo de água e da geração de grandes volumes de resíduos, contendo elevada carga orgânica e intensa coloração, proveniente dos corantes que, muitas vezes, apresentam potencial carcinogênico e mutagênico (SOUZA, 2006).

De acordo com Baban *et al.* (2003) cerca de 10 a 15% do total de corante usado nos processos de tingimento não se fixam às fibras e são eliminados nos efluentes. Estes corantes têxteis, quando lançados no ambiente causam grande impacto, principalmente por serem de difícil degradação (PEIXOTO *et al.*, 2013).

Devido à preocupação com o impacto ambiental e a necessidade da utilização de corantes pelas indústrias têxteis durante os últimos anos, vários estudos têm surgido para desenvolver novas tecnologias que permitam degradar compostos presentes em rejeitos industriais têxteis (REIS, 2009; PEIXOTO *et al.*, 2013).

No que diz respeito ao tratamento de efluentes, os processos oxidativos vêm sendo vistos como uma tecnologia promissora, pois promovem a degradação de substâncias orgânicas recalcitrantes aos processos tradicionais. Dentro desta classe de tratamento, destacam-se os processos enzimáticos. Cada vez mais é reconhecido o uso das enzimas em processos de remediação para tratamento de poluentes específicos. Estas podem atuar em compostos recalcitrantes para removê-los por precipitação ou transformação em outros produtos, de fácil biodegradação (DURAN; ESPOSITO, 2000). Recentes publicações têm reportado alta eficiência de algumas enzimas no tratamento de efluentes, principalmente, lacases e peroxidases (SILVA *et al.*, 2012; PACHECO; SOARES, 2014, ALMEIDA *et al.*, 2012). Entretanto, é importante destacar que estes processos podem gerar compostos intermediários potencialmente mais tóxicos que os compostos originais presentes no efluente.

Tradicionalmente, o monitoramento de efluentes tem sido realizado através dos parâmetros físico-químicos, entretanto, estes parâmetros são indicadores globais, pois através destes não é possível a determinação química de todos os componentes existentes na amostra de água para avaliar possíveis efeitos aos seres vivos (CUBAS; MORAES,

2011; RUBINGER, 2009). Com o objetivo de suprir estas limitações e complementar os resultados de análises físico-químicas, têm sido desenvolvidos e aplicados ensaios com organismos vivos como indicadores de efeitos tóxicos (CUBAS e MORAES, 2011; RUBINGER, 2009; FENT, 2003).

Segundo Silva Filho *et al.* (2007) a formação de metabólitos durante a degradação de corantes pode ser monitorada por meio dos testes que utilizam organismos sensíveis às substâncias tóxicas como bioindicadores. O estabelecimento de correlações entre a toxicidade de compostos presentes em efluentes e a toxicidade do efluente após um tratamento, frente a organismos indicadores nos ensaios biológicos, é uma ferramenta muito útil que permite avaliar a remoção de substâncias tóxicas (DAMATO *et al.*, 2006).

De acordo com Cubas e Moraes (2011) não há uma necessária relação entre os valores de parâmetros físico-químicos e avaliações de toxicidade, sendo assim, é de fundamental importância a realização de ensaios de toxicidade, presentes na legislação e ainda não adicionados na grade analítica na maioria das empresas. Os testes de toxicidade estão presentes tanto na legislação nacional (CONAMA), que discorre sobre testes agudos e crônicos, quanto na legislação Estadual (FATMA), em que são citados somente os testes agudos.

Costa *et al.* (2008) enfatizam que os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais, pois possuem funções distintas e complementares. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito destas substâncias sobre sistemas biológicos.

Muitas espécies vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade. Dentre os principais grupos de organismos utilizados em ensaios laboratoriais, destacam-se: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas, oligoquetas, peixes e bactérias, representando os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). De acordo com Gomes (2007), diferentes espécies possuem susceptibilidades diferentes, de acordo com o seu metabolismo, hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento e muitos outros aspectos. Para uma avaliação mais adequada, Guimarães *et al.* (2004) recomendam o uso de uma bateria de ensaios que utilizem organismos representantes de diferentes níveis da cadeia alimentar.

Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos

(RUBINGER, 2009). Entretanto, os testes crônicos são importantes e complementares aos testes agudos, pois a ausência de efeito agudo não caracteriza ausência de efeito sobre a biota (BRENTANO, 2006).

Tendo em vista que os processos oxidativos podem gerar compostos mais tóxicos que a substância inicial, e que as análises físico-químicas não conseguem prever o potencial tóxico desses compostos, é de fundamental importância avaliar a toxicidade de substâncias e efluentes frente a organismos-teste.

Os estudos sobre a degradação de corantes por enzimas peroxidases presentes na literatura, em geral, são superficiais, e, os estudos sobre os compostos gerados na degradação destes corantes ainda são bastante escassos, mesmo para os corantes mais utilizados pelas indústrias. Sendo que, não foi encontrado nenhum estudo a respeito da toxicidade crônica dos corantes estudados.

Este trabalho traz um estudo detalhado sobre os fatores que influenciam na remoção de cor de soluções de quatro corantes comumente utilizados pela indústria têxtil pela enzima Horseradish peroxidase (HRP), e caracteriza toxicologicamente as soluções de corantes e seus produtos de degradação.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo estudar a remoção de cor de soluções dos corantes têxteis (Azul Turquesa Remazol G - Blue 21, Preto Remazol B133% - Reative Black 5, Azul Brilhante Remazol - Reactive Blue 19, Vermelho Brilhante Remazol 3BS-A 150% - Reactive Red 239 e Vermelho CQ4BL - Red 195) utilizando a enzima Horseradish peroxidase (HRP) e avaliar a toxicidade resultante deste processo.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a influência da concentração de enzima, concentração de peróxido de hidrogênio, pH, temperatura e concentração de corante nas reações de degradação de corantes utilizando a enzima HRP;
- Determinar as melhores condições de reação para a remoção de cor das soluções de corantes com o uso da HRP;
- Realizar o estudo da cinética de degradação das soluções de corante, determinando o modelo cinético que o represente;
- Caracterizar toxicologicamente os corantes antes e após o tratamento enzimático, através de testes de toxicidade aguda, frente aos organismos: *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Euglena gracilis*, e testes de toxicidade crônica, frente ao microcrustáceo *Daphnia magna*.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Indústria Têxtil**

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confeção (ABIT, 2012), a indústria têxtil é o segundo maior empregador da indústria de transformação no Brasil, perdendo apenas para alimentos e bebidas (juntos), e representa 16,4% dos empregos e 5,5% do faturamento da Indústria de Transformação. Existem cerca de 30 mil empresas formais em todo o País; sendo este o quarto maior parque produtivo de confecção do mundo e o quinto maior produtor têxtil.

Santa Catarina é o segundo maior polo têxtil e do vestuário do Brasil. Neste polo, está estabelecida a maior empresa brasileira fabricante de camisetas de malha e a segunda maior do mundo, sendo, também, o maior produtor de linhas para crochê e fitas elásticas da América Latina, destacando-se na produção de artigos de cama, mesa e banho. A região do Vale do Itajaí e o Norte catarinense se destacam no segmento têxtil bem como no de confecções. Neste último, acrescenta-se também a região Sul de Santa Catarina (FIESC, 2011).

A indústria têxtil cresceu muito nos últimos anos e apresenta significativa importância para a economia do Brasil, com geração de riquezas e empregos. Porém, ela se destaca, também, pelo elevado consumo de água e pela geração de grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental (FREIRE; FREITAS, 2010; KUNZ *et al.*, 2002).

##### **3.1.1 Efluentes Têxteis**

De acordo com Forgiarini (2006), do ponto de vista ambiental, a indústria têxtil apresenta grande potencial de poluição, dado o elevado consumo de corantes durante a etapa de tingimento, e ao consumo de aditivos (ligantes, fixadores, antiespumantes, espessantes, amaciantes, resinas, antiestáticos, antichamas e antifungos) durante as etapas de pré-tingimento e armazenagem.

A Indústria Têxtil é uma das grandes geradoras de poluição através de seus efluentes aquosos altamente coloridos (GONÇALVES, 2007). Os efluentes provenientes dessa indústria apresentam, além de elevados níveis de coloração, alta demanda química de oxigênio (DQO) e sólidos suspensos. Dentre estes, o problema da coloração, em especial,

tem atraído a atenção de pesquisadores, ambientalistas e governos (FORGIARINI, 2006).

Quando não tratados adequadamente, os efluentes têxteis podem modificar o ecossistema, diminuindo a transparência da água e a penetração da radiação solar, o que pode modificar a atividade fotossintética e a solubilidade dos gases (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

A implementação de Leis e Normas Ambientais cada vez mais restritivas, e a criação de mercados cada vez mais competitivos vem exigindo que as empresas sejam mais eficientes do ponto de vista produtivo e ambiental, ou seja, o aumento da produção industrial deverá estar aliado a um menor gasto de insumos e menor geração de poluentes (FREIRE e FREITAS, 2010).

Os principais compostos recalcitrantes presentes no efluente têxtil são representados pelos corantes sintéticos, entre os quais, os corantes azo são considerados os mais prejudiciais devido ao seu caráter mutagênico e carcinogênico (KUNZ *et al.*, 2002).

### **3.1.2 Corantes Têxteis**

A origem dos corantes têxteis é incerta, mas há indicações de seu uso pelo homem desde os primórdios das civilizações. Sua presença foi detectada em amostras de tecidos de tumbas egípcias e antigos hieróglifos datados de 2500 a.C (ZANONI; CANEIRO, 2001).

Atualmente, mais de 90% dos corantes empregados são sintéticos. A maior parte dos corantes fabricados vai para a indústria têxtil; mas as indústrias de artefatos de couro ou de papel, indústrias alimentícias, de cosméticos, tintas e plásticos também são usuários importantes (ALMEIDA, 2006).

A molécula do corante utilizada para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo, responsável pela cor, e o grupo funcional que permite a fixação nas fibras do tecido (DURÁN; ESPÓSITO, 2000; KUNZ *et al.*, 2002).

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes, como: antraquinona, nitro e azo. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azocorantes, grupo caracterizado por apresentarem um ou mais grupamentos  $-N=N-$  ligados a aromáticos (KUNZ *et al.*, 2002; VASQUES, 2008).

### 3.1.2.1 Classificação dos Corantes têxteis

A classificação dos corantes quanto à sua fixação na fibra, segundo Guarantini e Zanoni (2000) é dada por:

- **Corantes Reativos** - são corantes contendo um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras proteicas, e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm o grupamento azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila (clorotriazina) e sulfatoetilsulfonila (vinilsulfona) como grupos reativos. Neste tipo de corante, a reação química se processa diretamente através da substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose

Este grupo de corantes apresenta como característica uma alta solubilidade em água e o estabelecimento de uma ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corante, em que o processo de coloração se opera através de ligações de maior intensidade.

- **Corantes Diretos** - Este grupo de corantes caracteriza-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose (algodão, viscose, etc.) através de interações de Van der Waals.

A afinidade do corante é aumentada pelo uso de eletrólitos, pela planaridade na configuração da molécula do corante ou a dupla ligação conjugada que aumenta a adsorção do corante sobre a fibra. Esta classe de corantes é constituída, principalmente, por corantes contendo mais de um grupo azo (díazo, triazo e etc.) ou pré-transformados em complexos metálicos.

- **Corantes Ácidos** - O termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm importância fundamental no método de aplicação do corante em fibras proteicas (lã, seda) e em fibras de poliamida sintética. No processo de tintura, o corante previamente neutralizado (solução contendo cloreto, acetato, hidrogenossulfato, etc.) se liga à fibra através de uma troca iônica envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato das fibras proteicas, na forma não-protonada. Estes corantes caracterizam-se por substâncias com

estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, quetanimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação.

- **Corantes de Enxofre** - É uma classe de corantes que, após a aplicação, se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos (- Sn-), os quais são altamente insolúveis em água. Em princípio, são aplicados após pré-redução em banho de ditionito de sódio, o que lhes confere a forma solúvel, são reoxidados, subsequentemente, sobre a fibra pelo contato com ar. Estes compostos têm sido utilizados, principalmente, na tintura de fibras celulósicas, conferindo cores preta, verde oliva, azul marinho e marrom, apresentando boa fixação. Entretanto, estes corantes, usualmente, apresentam resíduos altamente tóxicos.
- **Corantes Azóicos** - São compostos coloridos, insolúveis em água, que são, na realidade sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Neste processo, a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento (e.g. naftol), que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio (RN<sub>2</sub><sup>+</sup>) provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água.

O fato de usar um sistema de produção do corante diretamente sobre a fibra, através da combinação de um corante precursor sem grupos sulfônicos e a formação de um composto solúvel, permite um método de tingimento de fibras celulósicas (especificamente alongadas) com alto padrão de fixação e alta resistência contra luz e umidade.

Corantes azoicos compreendem uma importante classe de compostos orgânicos sintéticos. Representam cerca de 50% da produção mundial de corantes e são amplamente utilizados em diferentes tipos de indústrias, tais como curtumes, indústrias têxteis, alimentícias, de cosméticos e de papel, sendo a indústria têxtil o maior consumidor (SLEIMAN *et al.*, 2007).

### 3.2 Tratamento de Efluentes/Corantes Têxteis

A indústria têxtil tem sido alvo de muitas pesquisas, principalmente, no que concerne ao tratamento de seus efluentes. Efluentes têxteis apresentam alta complexidade, pois possuem diferentes composições físicas e químicas, grande diversidade de corantes

sintéticos e distintas potencialidades de toxicidade, tornando-os um dos mais difíceis de tratamento e um dos mais poluentes (MARTINS *et al.*, 2011).

Na grande maioria das vezes, estações convencionais de tratamento biológico de efluentes possuem remoção insuficiente de corantes, uma vez que são substâncias orgânicas não biodegradáveis. Desse modo, a remoção necessária da matéria orgânica e da cor, para atendimento da legislação ambiental, exige a implantação de unidades de tratamento mais caras, tais como floculação-precipitação, adsorção em carvão ativado, evaporação, oxidação química, combinados ou não ao processo biológico. Entretanto, muitas dessas tecnologias somente transferem o corante de fase, não resolvendo essencialmente o problema (MARCELINO *et al.*, 2103). Apesar destes sistemas apresentarem uma eficiência relativamente alta, apresentando bons resultados na redução carbonácea e permitindo a remoção de, aproximadamente, 80% da carga de corantes, eles têm como inconveniente a alta produção de lodo, a necessidade de disponibilização de grandes áreas para implantação do processo de tratamento e de aterros sanitários industriais para disposição do lodo. O problema relacionado com o acúmulo de lodo torna-se crítico, uma vez que o teor de corantes adsorvido é bastante elevado, impedindo qualquer possibilidade de reaproveitamento. Diante do conhecimento do perigo potencial que esses efluentes têxteis apresentam para o meio ambiente, faz-se necessário o desenvolvimento de processos alternativos e eficientes de tratamento. (KUNZ *et al.*, 2002; HASSEMER; SENS, 2002).

De acordo com Chacko e Subramaniam (2011), a remoção de cor, especialmente a partir de efluentes têxteis, tem sido um grande desafio ao longo das últimas décadas, pois, até agora não existe um tratamento único e economicamente atraente que pode efetivamente decorar esses efluentes. Sendo assim, o estudo e desenvolvimento de processos alternativos e de alta eficiência para o tratamento de efluentes industriais é de extrema importância (KUNZ *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2012).

### **3.2.1 Tratamento de Efluentes/Corantes Têxteis por Processos Enzimáticos**

A utilização de enzimas no tratamento de efluentes têxteis, comparados aos processos ditos convencionais, oferece, como principais vantagens, a aplicação a compostos tóxicos ou recalcinantes e a operacionalidade em faixas mais amplas de concentração de

contaminantes, de pH, de temperatura ou de salinidade. Outras vantagens são a ausência de produção de biomassa, a não ocorrência de variações bruscas da carga orgânica e a ausência de período de aclimação (FORGIARINI, 2006, ANSELMO *et al.*, 2008). Couto e Toca-Herrera (2006) destacam que a procura de tecnologias de oxidação eficientes e verdes aumentou o interesse na utilização de enzimas para substituir os convencionais métodos não biológicos.

Recentemente, a abordagem enzimática tem atraído muito interesse na descoloração/degradação de corantes têxteis e outros corantes industrialmente importantes de águas residuais (HUSAIN, 2006). O'Brien e O'Fagain (2000) destacam que a abordagem enzimática tem muitas vantagens em relação aos procedimentos convencionais (tais como extração por solventes e adsorção em carvão ativado), que são eficazes mas que demandam alto custo, incompleta purificação, a formação de subprodutos perigosos e aplicabilidade apenas a uma gama de concentração limitadas.

A maior parte dos processos de degradação de poluentes orgânico envolve reações de oxidação, sendo então natural que as enzimas ligadas a esta classe despertem um interesse especial por parte dos pesquisadores (ANSELMO *et al.*, 2008).

### 3.3 Enzimas

Enzimas são catalizadores biológicos que aumentam a velocidade das reações químicas ao diminuírem a energia de ativação. As enzimas são, em sua maioria, proteínas. Essas proteínas são formadas por sequências de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. A variedade de aminoácidos existentes e sua combinação são responsáveis pela grande diversidade das enzimas.

As enzimas, como catalisadores biológicos, apresentam diversas vantagens relativas aos seus congêneres químicos, em particular a região e estereoseletividade que conduzem à formação de produtos enantiomericamente puros. Estes biocatalisadores são também eficientes do ponto de vista energético, pois operam a temperaturas e pressões moderadas (CABRAL *et al.*, 2003).

De acordo com Devlin (2011) as enzimas são catalisadores eficientes, que atuam não só aumentando a velocidade de conversão de substrato em produto, mas também reconhecendo uma estrutura química específica na presença de estruturas semelhantes, para produzir um produto específico.

### 3.3.1 Classificação das Enzimas

Em 1883 para a designação de enzimas, o Duclaux propôs o uso do sufixo “ase” para acrescentar a um termo que designa a substância a qual atua esta enzima. Esta é a base de um sistema de nomenclatura usado até hoje (CABRAL *et al.*, 2003).

Em 1961, a comissão para enzimas (Enzyme Commission – EC) da União Internacional de Bioquímica estabeleceu uma classificação e nomenclatura de enzimas, que desde então, têm sido regularmente revisadas (CABRAL *et al.*, 2003).

As enzimas são divididas em seis grupos, de acordo com o tipo de reação que catalisam, conforme a tabela 1. Cada um desses grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade (BORZANI *et al.*, 2001).

Tabela 1. Nomenclatura e classificação das enzimas

1º dígito	Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
1	Oxido-redutase	Reação de oxi-redução
2	Transferase	Transferência de 1 átomo ou grupo entre moléculas
3	Hidrolase	Reações de hidrólise
4	Liase	Remoção de um grupo de uma molécula (sem ser por hidrólise)
5	Isomerase	Reações de isomerização
6	Ligase	Reações de síntese acopladas à hidrólise de 1 molécula de ATP

Cada enzima possui um código que contém 4 elementos precedidos das letras EC. O primeiro dígito indica a classe à qual a enzima pertence, e os seguintes referem-se respectivamente à subclasse, subsubclasse e ao ordenamento da enzima dentro da categoria (CABRAL *et al.*, 2003).

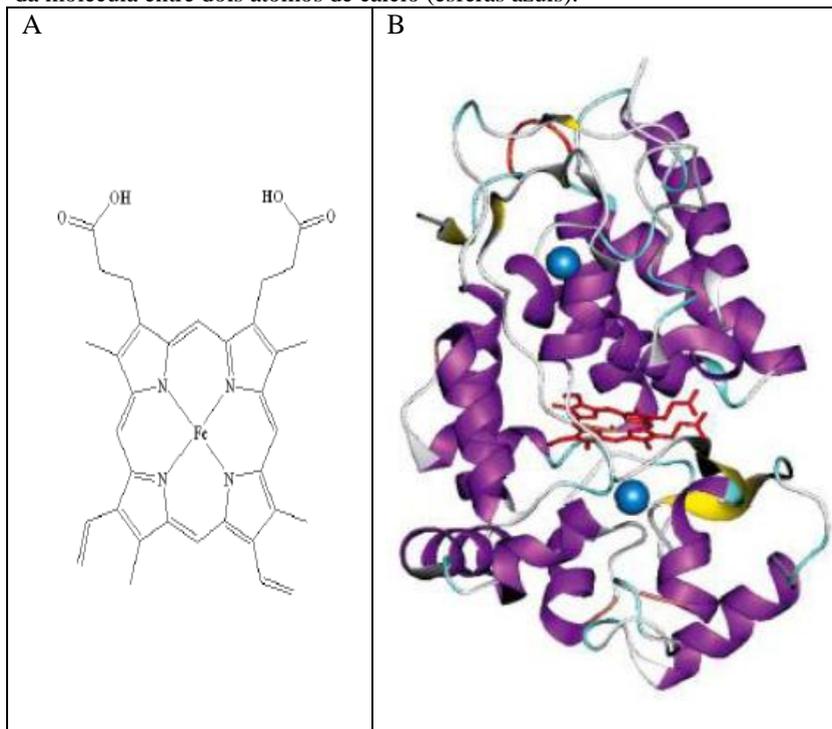
### 3.3.2 Peroxidases

As peroxidases são hemoproteínas produzidas por microrganismos e por plantas que catalisam reações de oxidação e requerem a presença de peróxidos, como o peróxido de hidrogênio.

Incluem-se neste grupo a peroxidase de rábano silvestre (Horseradish peroxidase - HRP) de origem vegetal e as lignina-poroxidases (LiP), as cloro-peroxidases (CPO) e as manganês-peroxidases (MnO) que são, em geral, de origem fúngica, geralmente dos fungos classificados como fungos de decomposição branca (ANSELMO *et al.*, 2008). A fonte comercial mais utilizada de peroxidase é a raiz forte, que é geralmente cultivada e colhida em países de clima frio (MACIEL *et al.*, 2006).

A peroxidase de raiz forte ou a HRP (EC 1.11.1.7) é a peroxidase vegetal mais conhecida e melhor caracterizada até o momento. É uma glicoproteína heme que contém ferro (III) protoporfirina IX como o grupo prostético e possui massa molecular de 40000 g/mol (DUNFORD, 1999; MONTIBELLER, 2012). A estrutura da enzima está apresentada na Figura 1.

Figura 1. A) Grupo prostético heme das peroxidases; B) Estrutura tridimensional da HRP mostrando o grupo heme (de cor vermelha) no sítio ativo da molécula entre dois átomos de cálcio (esferas azuis).

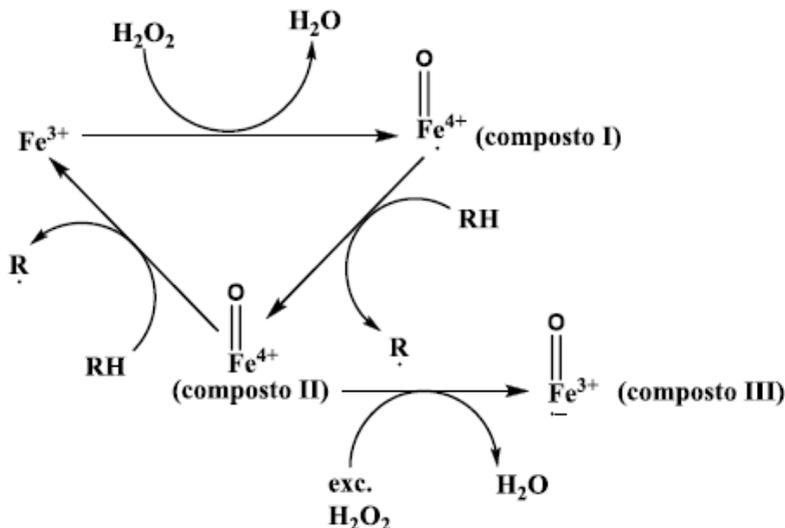


Fonte: VEITCH, 2004.

O ciclo catalítico da HRP ocorre por meio de um mecanismo complexo em três etapas, conforme apresentado na Figura 2. Na primeira etapa, a enzima nativa na forma férrica é oxidada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando um composto oxidado intermediário (Composto-I) na forma oxi-ferril. Na segunda etapa a forma oxidada da enzima (Composto-I) é então reduzida à sua forma nativa (Composto-II) pela transferência de um elétron do substrato (ex: lignina) formando um radical livre. Na terceira etapa a transferência de elétron de uma molécula de substrato para enzima faz com que esta retorne a sua forma inicial. O (composto III) refere-se à forma inativa da enzima (NICELL; WRIGHT, 1997; SCHMITT, 2010; FORGIARINI, 2006).

Os radicais livres formados durante o ciclo são reativos e tendem a iniciar uma reação espontânea, em cadeia, em que as moléculas aromáticas são ligadas formando um produto poliaromático com solubilidade reduzida ( $2\text{AH}\cdot \rightarrow \text{A}_2\text{H}_{2(\text{s})} \downarrow$ ), o que explicaria a precipitação do corante pela ação de peroxidases (SILVA, 2012).

Figura 2. Ciclo catalítico da peroxidase.



Fonte: FORGIARINI, 2006.

### 3.3.2.1 Peroxidases no Tratamento de Corantes Têxteis

A baixa especificidade e o alto potencial redox das peroxidases permitem o seu uso na degradação de muitos compostos poluentes

orgânicos, como compostos aromáticos organoclorados, corantes sintéticos, pesticidas, resíduos industriais das refinarias de petróleo e da indústria de polpa e de papel, dentre outros (ANSELMO *et al.*, 2008). De acordo com Bhunia *et al.* (2001) a peroxidase de rábano (HRP) é conhecida por degradar certos compostos orgânicos recalcitrantes, como fenóis e fenóis substituídos.

Bhunias *et al.* (2001) mostraram pela primeira vez que a HRP é eficaz em degradar e precipitar corantes azóicos industrialmente importantes. A HRP mostrou especificidade para uma larga variedade de corantes azo: azul remazol, violeta remazol, azul cibacron, vermelho cibacron e violeta cristal.

Os estudos de Mohan *et al.* (2005) e Maddhinni *et al.* (2006) mostraram a capacidade da enzima HRP em degradar corantes na fase aquosa. Ambos os estudos investigaram a remoção de corantes catalisada por HRP extraída a partir de raízes de rábano. Mohan *et al.* (2005) utilizaram um azo corante ácido (Acid Black 10 BX) e o Maddhinni *et al.* (2006) utilizaram o corante direto amarelo 12.

Forgiarin (2006) avaliou o potencial da enzima HRP, para a descoloração dos corantes: Turqueza Remazol G 133%, Azul Lanaset 2R e Preto Remazol B e de um efluente têxtil. Os percentuais de redução de cor encontrados foram de 59% em 45 min para corante Turqueza Remazol G 133%, 94% em 5 min para o Azul Lanaset 2R, o corante Preto Remazol B não apresentou descoloração superior a 10% e para o efluente têxtil obteve-se uma redução de cor de 52%.

Silva (2008) realizou o descoramento dos corantes têxteis: Azul Drimaren X-3LR (DMBLR), Azul Drimaren X-BLN (DMBBLN), Rubinol Drimaren X-3LR (DMR) e Azul Drimaren CL-R (RBBR) utilizando a enzima HRP, os percentuais de descoramento alcançados foram de 99, 77, 94 e 97%, respectivamente.

Silva *et al.* (2010) utilizaram HRP extraída de nabo (*Brassica campestris ssp. rapifera*) para avaliar o grau de remoção de cor de efluentes sintéticos. Os corantes reativos Turqueza Remazol G 133% (CTR) e Remazol Brilliant Blue (RBBR) na concentração de 50 mg/L apresentaram descoloração de 37 e 58%, respectivamente. A remoção da cor de uma tricomia de corantes reativos contendo Remazol Brilliant Blue R, Remazol Vermelho Ultra (RVU) e Remazol Brilliant Orange 3R na concentração total de 50 mg/L foi de 40%.

Zhang *et al.* (2012) utilizaram HRP industrializada na degradação do corante Orange II atingindo degradação de 95,8%. Os estudos realizados por Jamal *et al.* (2011) utilizando peroxidases de diferentes fontes indicam que os sistemas com estas enzimas podem ser

criados para descolorir um amplo espectro de corantes têxteis e não-têxteis, e misturas de corantes sob diversas condições.

### 3.3.2.2 Condições Ótimas da Atividade da Enzima HRP

O desempenho da reação catalisada por HRP para a remoção do corante é dependente do tempo de reação, concentração de corante, concentração de enzima, concentração de  $H_2O_2$  e pH da fase aquosa (MOHAN *et al.*, 2005)

Diferentes estudos indicam diferentes condições ótimas para remoção de cor de corantes têxteis utilizando a enzima HRP. As condições ótimas para degradação de azo corantes por HRP encontradas por Mohan *et al.* (2005) foram pH 2, tempo de 90 min, concentração de peróxido de hidrogênio de 0,6  $\mu\text{L/L}$  e concentração de enzima de 4,41 U/mL.

Nos estudos de Bhunia *et al.* (2000), a atividade ótima da enzima ocorreu em pH 2,5.

As condições ótimas de atuação da enzima HRP encontradas por Forgiarin (2006) para o corante Turqueza Remazol G 133% foram: pH na faixa de 4,0 a 5,0, quantidade de enzima de  $5 \times 10^{-3}$  mL de enzima/mL de solução (29,85 U/mL),  $2 \times 10^{-3}$  mmol/L de  $H_2O_2$ , concentração de corante de 100 mg/L e temperatura de 30°C.

As melhores condições reacionais encontradas por Silva (2008) para os corantes estudados (Azul Drimaren X-3LR, Azul Drimaren X-BLN, Rubinol Drimaren X-3LR e Azul Drimaren CL-R) foram: concentração do corante: 120 mg/L, temperatura: 35 °C, concentração de  $H_2O_2$ : 0,55 mM e tempo de reação: 1 hora.

Zhang *et al.* (2012) encontraram como condições ótimas de descoloramento do corante Orange II pela enzima HRP: pH 9,0, tempo de reação 40 min, HRP 0,80 U / mL, e 0,70 mM de  $H_2O_2$ .

### 3.3.2.3 Toxicidade dos Efluentes/Corantes Tratados com a Enzima HRP

Silva (2008) avaliou a toxicidade dos corantes Azul Drimaren X-3LR (DMBLR), Azul Drimaren X-BLN (DMBBLN), Rubinol Drimaren X-3LR (DMR) e Azul Drimaren CL-R (RBBR) antes e após o tratamento enzimático utilizando *Daphnia pulex* e *Artemia salina* como bioindicadores de toxicidade. Os resultados toxicológicos utilizando

*Daphnia pulex* não foram conclusivos, indicando que esse bioindicador não foi adequado para avaliar a toxicidade dos corantes estudados. Nos experimentos com a *Artemia salina* foi possível observar uma redução da toxicidade para os corantes DMBLR, DMR e RBBR após tratamento enzimático, e um aumento da toxicidade não significativo para o corante DMBBLN.

Forgiarin (2006) avaliou a toxicidade, antes e após o tratamento enzimático, por HRP, de corantes e de um efluente têxtil, empregando-se os microcrustáceos *Artemia salina* e *Daphnia magna* e o teste de inibição do crescimento da raiz de cebola (*Allium cepa*). A avaliação da toxicidade dos corantes têxteis evidenciou uma toxicidade mais elevada após o tratamento enzimático. A toxicidade do efluente têxtil apresentou uma redução após o tratamento enzimático, frente a todos os testes avaliados.

Os resultados dos estudos citados acima mostraram que o uso de um processo de tratamento enzimático utilizando a enzima HRP é uma abordagem viável para a degradação de muitos corantes têxteis, entretanto as condições ótimas encontradas são bastante divergentes e não se tem um consenso sobre o grau de toxicidade dos produtos resultantes deste tratamento enzimático.

### **3.4 Ecotoxicologia Aquática**

#### **3.4.1 Histórico e Conceitos**

A preocupação com a presença e a detecção de agentes tóxicos em ecossistemas aumentou drasticamente nos últimos anos, principalmente no ambiente aquático. A contaminação aquática por muito tempo foi avaliada utilizando somente as análises químicas como ferramenta, mas muitos anos de experiência demonstraram a inadequação de tal abordagem (MARTINS *et al.*, 2007).

Diante disto, foram desenvolvidos os estudos a respeito dos efeitos causados por substâncias químicas aos organismos vivos. Estes estudos têm sido chamados por alguns autores de toxicologia aquática e/ou ecotoxicologia, e os ensaios têm sido chamados de testes toxicológicos, testes ecotoxicológicos, testes de toxicidade aquática ou ainda de bioensaio ou ensaios biológicos.

Os primeiros testes de toxicidade com efluentes industriais foram realizados entre 1863 e 1917, porém somente na década de 1930 foram implementados alguns testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos, com o objetivo de estabelecer a toxicidade de

substâncias químicas e despejos líquidos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Segundo Rand, Wells e McCarty (1995) a ecotoxicologia é muitas vezes utilizada de forma equivocada como sinônimo de Ecotoxicologia ambiental. Enquanto a ecotoxicologia ambiental engloba aos efeitos de compostos químicos ambientais e outros agentes sobre os seres humanos, a ecotoxicologia estuda os efeitos desses compostos sobre ecossistemas e seus componentes não humanos (AZEVEDO; CHASIN, 2009; RAND, WELLS; MCCARTY, 1995).

A ecotoxicologia é uma ciência jovem em comparação com a toxicologia nos mamíferos. Enquanto o objetivo da toxicologia para os mamíferos é a de proteger os seres humanos da exposição à substâncias tóxicas e materiais em concentrações que são, ou podem estar, associadas a efeitos adversos, o objetivo da ecotoxicologia é proteger as populações e comunidades de várias espécies da exposição à diversas substâncias tóxicas em concentrações que são, ou podem estar, associadas a efeitos adversos (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

A ecotoxicologia apresenta-se como uma ciência multidisciplinar que engloba várias áreas de estudo, principalmente ecologia, biologia e química (orgânica, analítica e bioquímica), mas também anatomia, genética, fisiologia, microbiologia, ciências dos solos, das águas e atmosféricas, epidemiologia, matemática, estatística, física e direito (PERIN, 2005; RUBINGER, 2009).

De acordo com PERIN (2005) a ecotoxicologia é uma ciência que procura dar respostas às perguntas que surgem quando se tenta prever o destino da qualidade de vida humana ante o impacto dos compostos tóxicos provenientes da atividade antrópica. PRITCHARD (1993) destaca que desde a sua criação, a toxicologia aquática tem proporcionado uma visão crítica sobre o estado do meio ambiente e tem servido como alerta aos perigos potencialmente causados por poluentes ambientais.

Martins *et al.* (2007) e Costa *et al.* (2008) destacam que a utilização de métodos biológicos para a avaliação da contaminação aquática tem se mostrado uma alternativa importante, uma vez que somente com as análises químicas não é possível avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes. Magalhães e Pereira Filho (2008) afirmam que somente os sistemas biológicos (organismos ou partes deles) podem detectar os efeitos tóxicos das substâncias.

Os parâmetros de soma, utilizados nas análises químicas, como DQO (Demanda Química de Oxigênio), DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e COT (Carbono Orgânico Total) contribuem de forma

restrita na caracterização química das águas, pois estas análises abrangem diferentes grupos de substâncias com características e comportamentos químicos semelhantes, entretanto não permitem distinguir as substâncias individuais e nem avaliar os efeitos das substâncias sobre os seres vivos (KNIE; LOPES, 2004). Estas análises fornecem apenas parte do conhecimento necessário para avaliar o potencial tóxico de poluentes. (FENT, 2003).

Do ponto de vista analítico e econômico seria inviável a determinação química de todas as substâncias presentes num efluente industrial, visto que são amostras de natureza química complexa, constituídos por uma grande variedade de substâncias químicas. Mesmo com a identificação e a quantificação dessas substâncias não seria possível estimar os efeitos que elas apresentam sobre a biota, pois a atividade biológica de uma substância pode depender de suas interações com os outros componentes do efluente. Até mesmo a combinação de substâncias não tóxicas isoladamente podem, em conjunto, afetar as condições de vida dos organismos (COSTA *et al.*, 2008; RUBINGER, 2009).

Por não haver uma necessária relação entre os valores de parâmetros físico-químicos e avaliações de toxicidade, é de fundamental importância a realização de ensaios de toxicidade, presentes na legislação e ainda não adicionados na grade analítica na maioria das empresas (CUBAS; MORAES 2011). No estudo realizado por Cubas e Moraes 2011, as amostras de efluentes que apresentaram valores dos parâmetros físico-químicos adequadas as legislações ambientais, foram as que apresentaram maior fator de toxicidade. COSTA *et al.* (2008) enfatizam que os testes de toxicidade não substituem as análises químicas tradicionais, pois possuem funções distintas e complementares. Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos. Além das propriedades físico-químicas das substâncias, deve-se considerar a magnitude, a duração e a frequência da exposição, as vias de introdução e a suscetibilidade dos organismos (AZEVEDO; CHASIN, 2009).

Os testes de toxicidade, segundo Rodrigues *et al.* (2009), apresentam-se como ferramentas importantes em estudos ambientais devido às limitações existentes nos estudos baseados em evidências puramente químicas, das quais destacam-se: a elevada variedade de substâncias presentes em efluentes líquidos, baixa capacidade de detecção analítica e as interferências pelos fenômenos químicos de antagonismo e sinergismo que dificultam, sobretudo no processo de

interpretação de resultados. Cubas e Moraes (2011) destacam que a principal vantagem dos ensaios de toxicidade com relação às análises químicas está no fato de que os testes de toxicidade levam em consideração as interações dos compostos e/ou efluentes analisados entre si e com o meio ambiente.

De acordo com Knie e Lopes (2004) e Rodrigues *et al.* (2009) algumas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em níveis inferiores aos limites de detecção analítica. Sendo assim, evidências biológicas, ecotoxicológicas, químicas, físicas e físico-químicas devem ser empregadas de forma integrada, para a obtenção de informações objetivas, que subsidiem as decisões nas ações de proteção do meio ambiente. Rodrigues *et al.* (2009) destaca que os testes ou ensaios de toxicidade são instrumentos da área de Ecotoxicologia, que devem ser utilizados para a integração de dados biológicos, químicos e físico-químicos.

Os testes de ecotoxicidade podem ser utilizados para demonstrar a probabilidade de toxicidade de uma fonte de poluição para a biota dentro de um corpo de água receptor. Baseando-se no pressuposto de que se um agente é tóxico para uma ou mais espécies em um sistema de teste, é provavelmente tóxico para importantes componentes do ecossistema e, portanto, capaz de causar impacto ambiental negativo (MAGALHÃES; PEREIRÃO FILHO, 2008). De acordo com Knie e Lopes (2004) os bioensaios permitem deduções indiretas sobre o potencial tóxico de substâncias para o meio ambiente e, com muita cautela, do seu perigo para o homem.

A ecotoxicologia representa uma ferramenta poderosa para advertir sobre a contaminação dos ambientes aquáticos e o comprometimento da manutenção da vida aquática (MAGRIS *et al.*, 2006).

Para Brentano (2006) considera-se como objetivos da ecotoxicologia avaliar a toxicidade de poluentes em laboratório e no meio ambiente; compreender os mecanismos de ação de substâncias tóxicas e avaliar o risco que substâncias ou compostos químicos tóxicos apresentam para o meio ambiente.

De acordo com Gomes (2007) os objetivos dos estudos de ecotoxicidade, incluem:

- comparação de sensibilidade específica de vários organismos aos mesmos poluentes;
- determinação dos efeitos estimulantes ou inibidores de diferentes substâncias e efluentes;
- avaliação da bioacumulação de substâncias;

- avaliação da biodegradação de substâncias e de efluentes;
- hierarquização de poluentes ou fontes de poluição prioritárias;
- monitorização da qualidade das águas.

Kníe e Lopes (2004) atribuem, ainda, as seguintes utilizações para os testes ecotoxicológicos:

- avaliação do risco potencial de substâncias químicas ao meio ambiente;
- fiscalização de efluentes;
- licenciamento de produtos químicos;
- avaliação dos efeitos causados por acidentes com produtos químicos;
- controle da eficiência de estações de tratamento de águas residuárias;
- identificação de fontes poluidoras;
- investigação de sinergismos e antagonismos de substâncias;
- avaliação, por meio de eluatos, de solos contaminados;
- avaliação, por meio de eluatos, da aptidão de resíduos sólidos para disposição em aterros.

Perin (2005) destaca que os ensaios de toxicidade são ferramentas úteis, que permitem determinar uma relação causa-efeito, mas como todos os testes tem suas limitações, não são, no geral, suficientemente realistas, pois os resultados obtidos são válidos somente sob condições ambientais utilizadas em laboratório e não nos permitem estender as conclusões a outras espécies ou a outros sistemas naturais complexos existentes no meio ambiente. Em testes de toxicidade em laboratório a bioacumulação em cadeias alimentares não é considerada e os efeitos sobre as populações ou respostas da comunidade podem diferir daqueles apresentados no meio ambiente (FENT, 2003). O fato dos testes serem executados em ambiente artificial, como um laboratório, não permite, sob avaliação cientificamente correta, extrapolar os resultados diretamente ao ecossistema, ficando restrito unicamente ao organismo-teste específico e às condições que levaram ao resultado do ensaio, as extrapolações devem ser feitas com cautela (KNIE; LOPES, 2004).

Segundo Silva (2002) já foi evidenciado na literatura que os organismos-teste reagem de forma diferente para um mesmo composto, em testes realizados em laboratório ou em meio natural, portanto, a utilização de métodos de ensaio, que se aproximem das condições reais, pode trazer respostas mais precisas do efeito causado ao ecossistema.

### 3.4.2 Princípios dos Testes Ecotoxicológicos

Os testes de toxicidade para avaliar os efeitos causados à(s) espécie(s) teste consistem na exposição dos organismos aquáticos representativos do ambiente a várias concentrações de uma ou mais substâncias, ou a fatores ambientais, durante um determinado período de tempo (RUBINGER, 2009).

O grau da toxicidade pode ser avaliado através do efeito que a dose ou concentração de uma certa substância causará a determinado organismo num dado intervalo de tempo. Esses efeitos podem ser classificados em agudos e crônicos de acordo com tempo de exposição do organismo teste à substância (SILVA, 2002).

Os testes de toxicidade podem produzir como resposta uma variedade de critérios, como o número de organismos mortos (ou sobreviventes), número de organismos imóveis, sucesso reprodutivo (de produção de ovos e eclodibilidade), características do corpo (comprimento e peso), condição de órgãos, número de anormalidades teratogênicas ou incidência de tumores, indução ou inibição da atividade de enzimas, e número e abundância de espécies em uma comunidade ecológica (RAND; WELLS; McCARTY, 1995)

### 3.4.3 Testes de Toxicidade Aguda

Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos (RUBINGER, 2009).

Os testes de toxicidade aguda são utilizados para determinar a toxicidade relativa de uma amostra sobre um organismo aquático selecionado mediante a exposição de curto prazo a várias concentrações da substância em estudo. O tempo de exposição geralmente compreende 24-48h (dependendo do ciclo de vida do organismo) (BRENTANO, 2006; RAND; WELLS; MCCARTY, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2009). Para Rubinger (2009) o intervalo de tempo destes testes, em geral, é de 0 a 96 h. O teste agudo com *Daphnia magna dura* 48 h (ABNT 2004a) e com o peixe *Danio rerio dura* 96 h (ABNT 2004b)

Nos testes de toxicidade aguda normalmente o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação do organismo que a anteceda, como o estado de imobilidade (MAGALHÃES; PEREIRÃO FILHO, 2008). Critérios comuns para determinar os efeitos agudos em peixes são a mortalidade, para invertebrados, imobilidade e perda de equilíbrio, e

para algas o crescimento (RAND; WELLS; McCARTY, 1995). Os efeitos observados nos testes agudos são imediatos e geralmente irreparáveis (KNIE; LOPES, 2004).

Os ensaios agudos são, como regra geral, relativamente baratos e fáceis de realizar, por este motivo têm sido muito empregados em programas de monitoramento de rotina (BRENTANO, 2006; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2008). Perin (2005) ressalta que os efeitos agudos despertam grande interesse em casos de poluição causadas por acidentes.

### 3.4.4 Teste de Toxicidade Crônica

Na década de 1960, a necessidade de avaliar, mais acuradamente, o potencial de risco de substâncias tóxicas à biota aquática em longo prazo proporcionou o desenvolvimento de testes de toxicidade crônica (RUBINGER, 2009).

Os testes crônicos, de acordo com Brentano (2006) são importantes e complementares aos testes agudos, pois a ausência de efeito agudo não caracteriza ausência de efeito sobre a biota. O fato de que um produto químico não apresentar efeitos adversos sobre os organismos aquáticos em teste de toxicidade aguda não indica necessariamente que não é tóxico para esta espécie e para outras (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

Testes de toxicidade crônica permitem a avaliação dos possíveis efeitos adversos da substância química sob condições de exposição em longo prazo numa concentração subletal (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

A toxicidade crônica corresponde à resposta a um estímulo prolongado ou contínuo, por um longo período de tempo, podendo abranger parte ou todo ciclo de vida do organismo (COSTA; DALBERTO, 2010; GOMES, 2007; SILVA, 2002). De acordo com Rand, Wells e McCarty (1995) em um ensaio de toxicidade crônica completa, o organismo teste é exposto a um ciclo inteiro de reprodução (ex. ovo de ovo) em, geralmente, cinco concentrações dos materiais de teste. De modo geral esses efeitos são subletais e são observados em situações em que as concentrações do agente tóxico permitem a sobrevivência do organismo, embora afetem uma ou várias de suas funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação (COSTA; DALBERTO, 2010). Os ensaios de toxicidade crônica mais difundidos mundialmente são os com *Daphnia*

*sp.*, com duração de 21 dias, e com *Ceriodaphnia sp.*, de 7 dias de duração (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006).

A execução de um teste crônico permite revelar um efeito mais sensível sobre os organismos, em longo prazo, devido a agentes tóxicos presentes em pequenas doses e se mostra apropriado quando os testes agudos não revelam toxicidade. A ação lenta de poluentes sobre a biocenose é um aspecto importante a ser considerado (BRENTANO, 2006).

### **3.4.5 Organismos Utilizados**

Nos ensaios de toxicidade aquática para obter resultados relevantes e ecologicamente significativos não apenas o teste apropriado, mas também, os organismos apropriados devem ser utilizados (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

De acordo com Pritchard (1993) os organismos aquáticos têm desempenhado papéis importantes como sistemas de alerta e monitoramento de cargas poluentes no meio ambiente. No entanto, eles têm potencial para fazer ainda mais, podendo ser utilizados também como ferramentas essenciais no estabelecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos da toxicidade.

Seja qual for o organismo teste selecionado estes devem pertencer a lotes homogêneos e de mesma idade, devendo ser mantidos em aclimatação por uma semana antes do início do teste, nas mesmas condições de água e temperatura a serem utilizadas no experimento. Os organismos devem estar livres de doenças ou malformações, não devendo receber tratamento contra doenças durante o teste ou nas duas semanas anteriores ao mesmo (RUBINGER, 2009).

Várias espécies vêm sendo empregadas internacionalmente em testes de toxicidade, gerando subsídios importantíssimos para uma melhor avaliação e caracterização dos efeitos agudos e crônicos de diversos agentes tóxicos (MAGALHÃES; PEREIRÃO FILHO, 2008).

Uma das limitações encontradas para o emprego de organismos vivos como indicadores de toxicidade é a diferença de sensibilidade apresentada pelos organismos frente aos compostos químicos ou efluentes. Alguns esforços têm sido feitos com o objetivo de encontrar uma espécie de organismo que seja sensível a todos ou a maior parte dos compostos químicos. Porém, tais trabalhos têm mostrado a diferença entre as respostas de toxicidade obtidas para um mesmo composto sobre organismos de espécies diferentes (GOMES, 2007). A sensibilidade das espécies varia muito entre os diferentes grupos taxonômicos perante as

mesmas substâncias químicas, e mesmo dentro de um táxon, existem diferenças consideráveis de sensibilidade entre as espécies (KNIE; LOPES, 2004).

Normalmente, em decorrência da diferente sensibilidade das espécies-testes, vários bioensaios são usados paralelamente, em forma de bateria de testes para aumentar a probabilidade de detectar os efeitos nocivos das substâncias químicas (KNIE; LOPES, 2004).

Diferentes espécies possuem suscetibilidades diferentes aos compostos químicos de acordo com seu aparato metabólico, com seus hábitos alimentares, seu comportamento, fase de desenvolvimento, dentre outros aspectos. Organismos estressados em função de exposição prévia a outros agentes tóxicos também podem ser mais suscetíveis aos compostos químicos (SILVA; SANTOS, 2007). Segundo PERIN (2005) a resposta de um organismo a um agente estressor está ligada também ao patrimônio genético, às condições de bem-estar no momento da chegada do estressor e a capacidade de o indivíduo conseguir se defender das ações tóxicas. Indivíduos jovens e imaturos geralmente são mais suscetíveis aos agentes químicos do que adultos, provavelmente em função das diferenças no grau de desenvolvimento dos mecanismos de detoxificação (SILVA; SANTO, 2007).

De acordo com Gomes (2007) os fatores ambientais definidos pelas características bióticas e abióticas podem alterar a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático. Os fatores bióticos incluem o tipo de organismo (alga, inseto ou peixe, etc.), estágio de desenvolvimento (larva, juvenil, adulto), tamanho, estado nutricional e de saúde e alterações sazonais no estado fisiológico. Os fatores abióticos que podem atuar modificando a toxicidade incluem todas as características físicas e químicas da água que circunda o organismo vivo, como a temperatura, o pH, o teor de oxigênio dissolvido na água, a salinidade e a dureza, o conteúdo de matéria orgânica e material particulado em suspensão e a velocidade de escoamento da água.

O efeito tóxico de um efluente sobre um organismo de determinada espécie não pode ser simplesmente extrapolado para outras espécies (GOMES, 2007). Para uma avaliação mais adequada recomenda-se o uso de uma bateria de ensaios que utilizem organismos representantes de diferentes níveis da cadeia alimentar (GUIMARÃES *et al.*, 2004). De acordo com Umbuzeiro *et al.* (2010) quanto mais dados toxicológicos forem gerados sobre uma substância, menores serão os fatores de incerteza, e, portanto mais precisos os critérios de qualidade adotados.

De acordo com Knie e Lopes (2004) os principais critérios na escolha de um organismo-teste incluem:

- Disponibilidade: O sistema de teste deve estar sempre disponível, desta forma, deve ser possível cultivar ou manter os organismos-teste sob condições controladas no próprio laboratório;
- Sensibilidade: Os organismos devem ter uma sensibilidade equilibrada a um largo espectro de substâncias. Os organismos hipersensíveis podem provocar resultados falsos-positivos, causados por fenômenos não relevantes à toxicidade da amostra, como uma eventual mudança na temperatura;
- Reprodutibilidade: A reação de um sistema biológico à uma substância nociva deve ser reproduzível sob as mesmas condições;
- Padronizabilidade: As condições de cultura ou manejo dos organismos-teste e o método do teste devem ser padronizados, de modo a permitir realizar o mesmo experimento em outros laboratórios e obter resultados comparáveis;
- Praticabilidade: Biotestes devem ser efetuados de maneira a racionalizar o gasto de tempo, espaço físico e recursos humanos e materiais;
- Rapidez: O tempo compreendido entre o contato do organismo-teste com a amostra até a provocação de uma reação mensurável deve ser o mais curto possível. Este intervalo tem um papel importante principalmente no *screening* de substâncias químicas ou efluentes, no atendimento de acidentes ou na sua aplicação como sistema de alerta na forma de biomonitores.
- Justiciabilidade: Os resultados dos testes ecotoxicológicos, quando aplicados no licenciamento e na fiscalização, devem ser concludentes, e diante da justiça, incontestáveis. Para este quesito contribuem a reprodutibilidade e a padronização do teste.

Considerando-se a dificuldade em encontrar uma espécie com todas as características desejáveis, existem muitas espécies padronizadas que podem ser utilizadas, sendo extremamente importante a realização de bioensaios com espécies representativas do ambiente de estudo, pois respondem melhor as condições encontradas nos ambientes naturais onde vivem. (MAGALHÃES; PEREIRÃO FILHO, 2008; RAND; WELLS; McCARTY, 1995). Segundo Gomes (2007) e Magalhães e Pereira Filho (2008) a padronização dos organismos bioindicadores é um fator de fundamental importância em programas de monitoramento, pois torna possível a comparação dos resultados entre laboratórios do mundo inteiro.

Alguns cientistas defendem a utilização exclusiva de espécies nativas ou endêmicas para avaliar a qualidade de águas ou efluentes, entretanto, de acordo com Knie e Lopes (2004) o uso de espécies locais levaria à utilização de muitos métodos e organismo diferentes num mesmo país como o Brasil. A utilização de testes diferentes para cada região traria problemas como: a não compatibilidade na comparação dos resultados e a dificuldade para o poder legislativo em elaborar e aplicar leis uniformes para todo o país.

Normalmente, os efeitos tóxicos diretos na sobrevivência, crescimento ou reprodução são determinados por meio de bactérias, algas, pulgas d'água e peixes (FENT, 2003). Magalhães e Pereirão Filho (2008) citam como principais grupos de organismos utilizados em ensaios laboratoriais: microalgas, microcrustáceos, equinóides, poliquetas e oligoquetas, que representam os mais diversos ecossistemas e níveis tróficos.

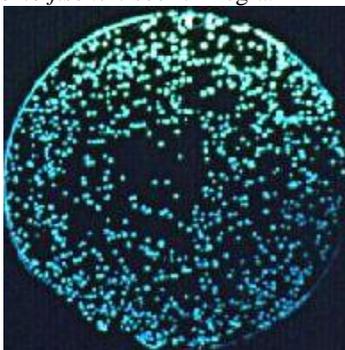
De acordo com Perin (2005) não é de se surpreender que o único consenso até agora encontrado seja que não existe uma única espécie apta a descrever todos os efeitos de todas as possíveis substâncias tóxicas. Desta forma, necessita-se utilizar, para cada caso de estudo, uma variedade de organismos-teste, realizando experimentos com pelo menos uma bactéria, uma alga e um invertebrado, por exemplo.

#### **3.4.5.1 Bactérias – *Vibrio Fischeri***

De acordo com Rubinger (2009) as bactérias utilizadas como organismos-teste podem ser agrupadas como decompositores dentro da cadeia trófica de ecossistemas aquáticos. Estes organismos atuam na degradação de substâncias orgânicas resultantes de organismos mortos ou de seus metabólitos em substâncias mais simples, de forma que estas possam ser facilmente reassimiladas por organismos produtores e também pelos consumidores do tipo filtradores.

*Vibrio fischeri* (Figura 3) é uma bactéria marinha luminescente, gram-negativa e anaeróbia facultativa. Em condições ambientais favoráveis, emite luz naturalmente, necessitando para isto oxigênio em concentrações acima de 0,5 mg/L (KNIE; LOPES, 2004).

Figura 3. Cultura de *Vibrio fischeri* sob luz negra.



Fonte: [http://www.biology.pl/bakterie\\_sw/bac\\_mf\\_en.html](http://www.biology.pl/bakterie_sw/bac_mf_en.html)

O ensaio de toxicidade aguda com *V. fischeri* foi desenvolvido por Bulich em 1979 e patenteado comercialmente pela Beckman Instruments Inc., em 1982, como Sistema Microtox® (HAMADA, 2008). Neste ensaio uma cultura das bactérias é exposta à amostra do teste por um período de 15 min, e a quantidade de luz que emitida pelas bactérias é medida por um fotômetro especial. Quanto mais tóxica a amostra, menor será a quantidade de luz produzida pelas bactérias (UMBUZEIRO; RODRIGUES, 2004).

Os testes, de acordo com a CETESB (2001) devem ser realizados de forma a se obter uma curva dose-resposta estatisticamente aceitável, que permita a interpolação dos valores de CE20 e CE50, que são as concentrações efetivas do agente tóxico que causam, respectivamente 50% e 20% de redução na quantidade de luz emitida pelo microrganismo-teste (*V. fischeri*), após sua exposição a esse agente durante um determinado período de tempo.

De acordo com Umbuzeiro e Rodrigues (2004) o teste tem uma escala de sensibilidade similar à de outros biotestes aquáticos de toxicidade, como os feitos com a espécie de água doce *Pimephales promela* (peixe-isca), com a *Daphnia* (pulga d'água), e com a espécie *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris).

Diversas vantagens do procedimento podem ser indicadas: requer somente volumes pequenos de amostra (5 mL); as bactérias são de fácil conservação e armazenamento; é muito rápido (15 min) e reproduzível. A desvantagem do método, dado que as bactérias são organismos marinhos, é a necessidade de adicionar solução osmótica para fins de ajuste ao testar amostras com menos de 2% de salinidade, o

que pode interferir na resposta tóxica de algumas espécies químicas (UMBUZEIRO; RODRIGUES, 2004).

### 3.4.5.2 Algas - *Euglena gracilis*

As algas em um ecossistema aquático fazem parte do grupo de produtores primários, os seja, são à base do ciclo de vida aquático. Participam da manutenção do equilíbrio destes ambientes através de suas funções em ciclagem de nutrientes dos ciclos biogeoquímicos, em especial nos do carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício. Também fazem parte da dieta de vários outros tipos de organismos, tanto aquáticos quanto terrestres (RUBINGER, 2009).

Como espécies representativas do nível trófico inferior, as algas são organismos ecologicamente importantes, pois servem como fonte de alimento fundamental para outras espécies aquáticas e ocupam, assim, uma posição única entre os produtores primários: são um elo importante na cadeia alimentar e essenciais à “economia” dos ambientes aquáticos como alimento (VIDOTTI; ROLLENBERG, 2004).

A utilidade das algas como organismo-teste tem por base o seu curto ciclo de vida, facilitando os estudos de exposição com várias gerações, além das altas taxas de crescimento, da facilidade em manter culturas no laboratório e da capacidade de crescer em meios sintéticos bem definidos (GOMES, 2007).

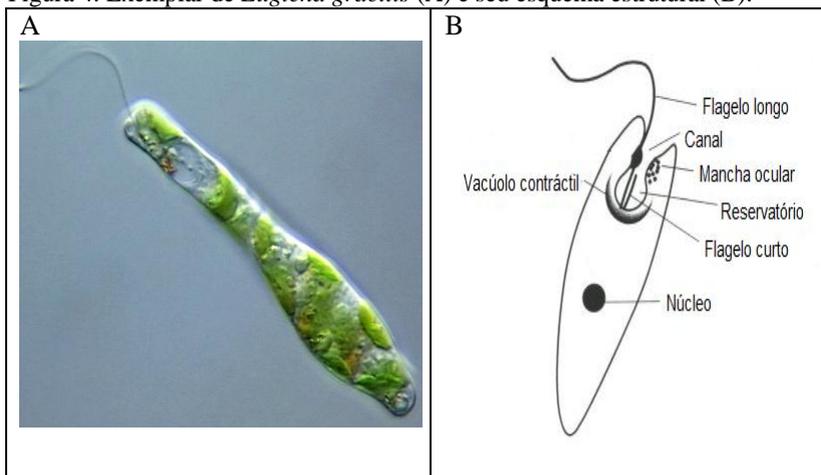
De acordo com Vidotti e Rollenberg (2004) é preciso potencializar os recursos científicos, tecnológicos e financeiros, coordenando os esforços nas áreas ligadas à utilização das algas e à pesquisa básica, para que as propriedades destes organismos possam ser plenamente aproveitadas, priorizando a qualidade da vida humana e respeitando os ecossistemas.

As algas denominadas euglenas são pertencentes ao filo *Euglenophyta*. Estes organismos estão presentes quase que exclusivamente em águas doces e possuem uma única célula com uma película externa de constituição proteica. As euglenas podem ser autótrofas, produzindo açúcares através da fotossíntese, ou heterótrofas, consumindo partículas alimentares por fagocitose. Estas algas apresentam muitos plastos contendo clorofilas a e b e carotenos, e armazenam óleos e polissacarídeos como reserva (REVIERS, 2006; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

Euglena é um gênero de algas unicelulares da divisão Euglenozoa da classe Euglenophyceae, dentre as, cerca de, 1000 espécies existentes destaca-se a *Euglena gracilis* (Figura 4) (REVIERS,

2006). Este organismo controla a sua posição vertical na coluna de água, utilizando gravi e fototaxia (NTEFIDOU *et al.*, 2003).

Figura 4. Exemplar de *Euglena gracilis* (A) e seu esquema estrutural (B).



Fonte A: <http://www.fcps.edu/islandcreekes/ecology/euglena.htm>

Fonte B: Adaptado de: <http://light.simanonok.com/>

A *E. gracilis* tem sido usado extensivamente para avaliar os efeitos adversos das diferentes substâncias tóxicas e estressores ambientais (AZIZULLAH, RICHTER; HÄDER, 2011). Entretanto devido ao fato da Euglena ser um flagelado de água doce seu uso é limitado à água potável e corpos de água levemente salobra (KUHN *et al.*, 2006). Einicker-Lamas *et al.* (2002) afirmam que a *E. gracilis* é um excelente modelo para o estudo da intoxicação por metais pesados nas células eucarióticas e que seria muito interessante o desenvolvimento de um sistema de bio-monitorização dos efluentes das indústrias, a fim de minimizar as agressões ao meio ambiente, utilizando este organismo como um dos bioindicadores.

A fotossíntese realizada pela alga *E. gracilis* pode ser utilizada como parâmetro ecológico em testes para monitorar a toxicidade de água e efluentes, uma vez que responde com sensibilidade às mudanças ambientais. Parâmetros relacionados a fotossíntese podem ser medidos com o auxílio de fluorímetros de amplitude modulada, comumente chamados de PAM. O PAM, fornece medições rápidas e precisas de diversos parâmetros fotossintéticos associados à fluorescência da clorofila *a* (MINARDI, 2012).

De acordo com Pinto (2012) o princípio de medição do PAM é baseado em mudanças no nível de fluorescência da clorofila a, associada ao fotossistema II (PSII), após a aplicação de pulsos de luz saturada.

A utilização desta técnica permite a elaboração de Curvas Rápidas de Luz (RLC), na qual variações na fluorescência emitida em resposta aos crescentes pulsos de luz podem estimar a Taxa de Transporte de Elétrons (ETR) do PSII (WHITE; CRITCHLEY 1999) e também o rendimento da atividade fotossintética, conhecido como “Yield” (Y).

Tais métodos permitem a determinação de diversos parâmetros de fluorescência da clorofila a, de forma rápida e não invasiva, os quais podem ser usados com sucesso para detectar alterações metabólicas em diversas espécies (BAKER e ROSENQVIST, 2004).

#### **3.4.5.3 Microcrustáceos - *Daphnia magna***

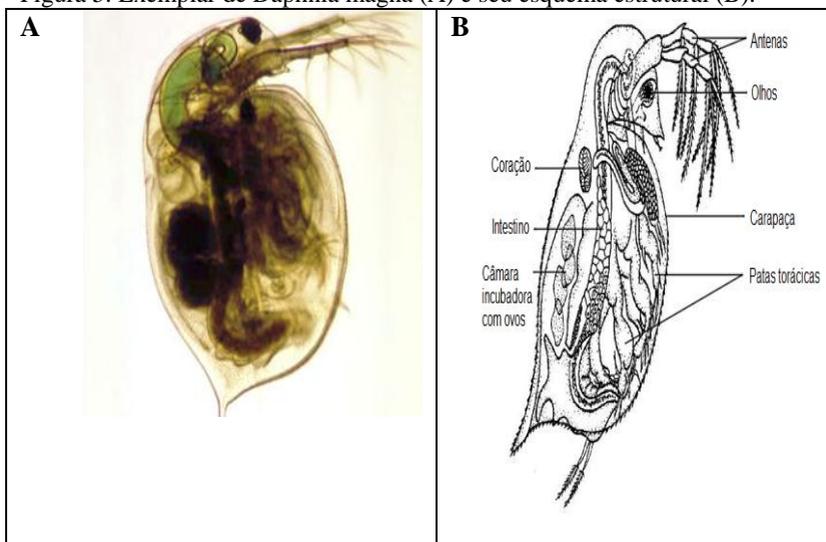
O emprego de *Daphnia spp.* como organismo indicador, de acordo com Damato *et al.* (2006) é uma prática bastante comum em estudos de efluentes industriais uma vez que estas podem apresentar sensibilidade muito elevada a um agente tóxico ou poluente específico.

A *Daphnia* é um artrópode de pequenas dimensões, os indivíduos adultos atingem de 5 a 6 mm, enquanto os pequenos chegam a apenas 1 mm (PERIN, 2005). São conhecidas muitas espécies de água doce e poucas marinhas.

O gênero *Daphnia* é o grupo mais antigo e mais comumente utilizados em ensaios de toxicidade. Dentro deste gênero, as espécies *Daphnia similis* e *Daphnia magna* têm sido as mais utilizadas em testes de toxicidade aguda e crônica (BREATRICI, 2006).

De acordo com Ruppert e Barbes (1996) *apud* Flohr *et al.* (2012) a *Daphnia magna* (Figura 5) é classificada taxonomicamente no filo Arthropode, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca e subordem Cladocera. As daphnias são comumente conhecidas como pulga d' água.

Figura 5. Exemplar de *Daphnia magna* (A) e seu esquema estrutural (B).



Fonte A: <http://www.mblaquaculture.com/content/organisms/daphnids.php>

Fonte B: Adaptado de

<http://www.odec.ca/projects/2010/patexa2/Daphnia%20Magna.htm>

*D. magna* faz parte do subgênero *Ctenodaphnia*, o qual foi reportado possuir 10 cromossomos ( $2n=20$ ) (BEATON; HEBERT, 1994). De acordo com Routtu *et al.* (2010) não possui cromossomos sexuais, sendo a determinação do sexo induzida por fatores ambientais, de modo que o mesmo genótipo pode ser tanto masculino quanto feminino.

*Daphnia magna* é um microcrustáceo planctônico de água doce que atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares (CUBAS; MORAES, 2011; KNIE; LOPES, 2004). Estes organismos são componentes importantes da cadeia alimentar, servindo de alimento para larvas e crustáceos bentônicos e peixes planctófagos (SILVA, 2002).

Em condições normais a *D. magna* se reproduz por partenogêneses. Uma população adulta é constituída por fêmeas adultas e jovens de várias idades, cuja bagagem genética é igual (PERIN, 2005). O fato dos descendentes serem geneticamente idênticos favorece a uniformidade de respostas nos ensaios, eliminando um parâmetro importante quando se trabalha com organismos vivos, que é a variável

genética (KNIE e LOPES, 2004; PERIN, 2005). De acordo com Cubas e Moraes (2011) outras vantagens da escolha deste organismo como organismo teste incluem: facilidade de cultivo e manutenção de culturas, necessidade de pequena infraestrutura, ciclo de vida curto (o que permite utilizar as *daphnias* em testes crônicos), reprodução frequente (que garante suprimento constante) e a sensibilidade (esta espécie reage sensivelmente à ampla gama de agentes nocivos) (BRENTANO, 2006; KNIE; LOPES, 2004).

A reprodução sexuada (que significa a possibilidade de troca de informações genéticas) acontece como resposta a estímulos ambientais negativos (como por exemplo: variações na temperatura e no fotoperíodo, excesso ou falta de alimento e superpopulação), pelos quais alguns organismos neonatos sob influência hormonal tornam-se machos morfologicamente semelhantes, mas de dimensões muito reduzidas, corpo mais afilado e nado mais rápido, que acasalam com as fêmeas adultas (KNIE; LOPES, 2004; PERIN, 2005). De acordo com Ruppert, Fox e Barnes (1996) os ovos fertilizados são grandes, e só são produzidos dois em uma ninhada, um de cada ovário, sendo que as paredes da câmara incubatória são transformadas em uma cápsula protetora em forma de sela que recebe o nome de efípodo. Estes efípodos afundam ou aderem a objetos podendo suportar o ressecamento, o congelamento e até mesmo a passagem pelo intestino dos peixes e das aves e dos mamíferos que se alimentam de peixes. O efípio se desenvolve sozinho quando as condições ambientais forem favoráveis.

Na maior parte dos testes agudos e crônicos de toxicidade aquática utilizando a *D. magna* a resposta observada é o número de indivíduos imóveis. De acordo com Knie e Lopes (2004) são considerados imóveis os indivíduos aparentemente mortos, aqueles incapazes de nadar na coluna d'água até 15 segundos após leve agitação do recipiente e os que estão flutuando na superfície, ainda que apresentem movimento.

#### **3.4.5.4 Peixes – *Danio rerio***

Os ensaios com peixes como organismos-teste visam em geral compreender como um agente tóxico afeta organismos de maior grau de estruturação como os vertebrados. Os organismos testes mais frequentemente utilizados são espécies autóctones pertencentes à família *Characidae*; as espécies *Pimephales promelas* e *Danio rerio*,

*Brachydanio rerio* da família *Cyprinidae* e a espécie *Poecilia reticulata* da família *Poeciliidae* (RUBINGER, 2009).

O *Danio rerio* (Figura 6) é uma espécie de peixe tropical, ovípara, onívora, de comprimento médio de 4 a 5 cm, sendo vulgarmente conhecida como paulistinha, pois suas cores lembram a bandeira paulista, ou zebrafish (peixe zebra), por seu padrão de coloração, prateado com listras azul-escuras, apresentando no dorso a cor verde-oliva (ABNT, 2004b; KNIE; LOPES, 2004).

Figura 6. Exemplar de *Danio rerio*.



Fonte: <http://www.fishchannel.com/images/fish-news/zebra-danio-da-500.jpg>

Esta espécie é originária da Índia e do Paquistão, sendo comum em diversas partes do mundo, no Brasil, é uma espécie exótica, vendida como ornamental (ABNT, 2004b). Esse peixe pode ser encontrado em cardumes em pequenos e grandes rios, águas estagnadas, campos alagados de arroz, e canais, mas também é abundante nos arroios dos contrafortes das montanhas (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

De acordo com Knie e Lopes (2004) o *D. rerio* vive em média 3 anos. Estes peixes apresentam comportamento pacífico e são muito ativos. Na natureza vivem em cardumes, e por isso podem ser mantidos, sem problemas, em número relativamente grande num mesmo aquário. É uma espécie simples de obter, econômica, de fácil manutenção e, sob condições apropriadas, consegue proporcionar um grande número de ovos transparentes e não aderentes e de fácil manuseamento. Uma fêmea tem posturas de aproximadamente 50 a 200 ovos por dia (ANDRADE, 2004). Pough, Janis e Heiser, (2008) destacam que a habilidade natural do “zebrafish” de viver sob uma ampla variedade de condições ambientais torna fácil a sua domesticação em cativeiro.

O ensaio de toxicidade aguda com *D. rerio* baseia-se, em geral, na exposição de peixes adultos a uma amostra por um período de 48

horas, podendo ser prolongado até 96 horas. A resposta observada é o número de organismo morto.

Com base em ensaios ecotoxicológicos com agentes químicos diferenciados, Bertoletti (2009) afirma que espécies de peixes introduzidas, como o *D. rerio* e o *Poecilia reticulata*, podem substituir as espécies nativas nos ensaios de ecotoxicidade aguda com peixes para substâncias ou efluentes líquidos.

Segundo Cazarin *et al.* (2004) existe uma tendência mundial para reavaliar a utilização de animais nos experimentos, concretizada a partir de um programa denominado de 3Rs (Reduction, Refinement, Replacement), que objetiva além de diminuir o número de animais, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo*, neste contexto, atualmente é recomendado a aprovação de Comitê de Ética em pesquisas que utilizem peixes.

### 3.4.6 Expressão dos Resultados

No início do desenvolvimento dos testes de toxicidade aguda, os dados foram expressos como o limite de tolerância mediana (TL<sub>50</sub>) a concentração de material de teste ao qual 50% dos organismos de ensaio sobreviver durante um tempo de exposição especificado (em geral, 24-96 h). Este termo tem sido substituído por concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) ou Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>) (RAND; WELLS; McCARTY, 1995).

A CL<sub>50</sub> é uma indicação da concentração que causa efeito letal em 50% dos organismos após um determinado período de exposição. Já a CE<sub>50</sub> indica a concentração que causa imobilidade a 50% dos organismos após um determinado período de exposição (DIAS *et al.*, 2006; MAGALHÃES; PEREIRÃO FILHO, 2008).

A CE<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub> é determinada através de métodos estatísticos (como interpolação gráfica, Probitas ou Trimmed Spearman-Kärber). Quando se tratar de amostras de concentração conhecida os valores devem ser expressos em mg/L e no caso de amostras de concentração desconhecida, como efluentes líquidos, por exemplo, os valores devem ser expressos em porcentagem (%) (KNIE; LOPES, 2004).

Perin (2005) ressalta que a determinação do valor de CL<sub>50</sub> não é suficiente para garantir que uma substância não provoque danos, faz-se necessário estima a dose correspondente a uma mortalidade tolerável.

Os resultados podem ser expressos também em Fator de toxicidade (FT). O FT é representado por um número inteiro, o qual corresponde a menor diluição da amostra que não cause efeito tóxico

aos organismos (ABNT, 2004). O valor de FT para o organismo teste *Daphnia magna* é determinado através da observação direta da mobilidade do organismo na série de diluições-teste, não sendo necessários cálculos estatísticos. O FT corresponde à menor diluição da amostra em que não ocorre a imobilidade em mais de 10% dos organismos. (KNIE; LOPES, 2004). De acordo com a USEPA (2002) a maior concentração de amostra em que a sobrevivência não é significativamente diferente do controle pode ser chamada, também, por concentração de efeito adverso não observado - NOAEC.

Segundo Knie e Lopes (2004), para as bactérias *V. fischeri*, o FT é a primeira diluição onde a porcentagem de inibição da luminescência é inferior a 20%.

### **3.4.7 Legislação**

No Brasil, os ensaios ecotoxicológicos já fazem parte de exigências presentes tanto na legislação federal como na estadual. O órgão federal que define as diretrizes da política nacional do Meio Ambiente é o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA e o órgão estadual responsável, dentre outras atividades, pela fiscalização e que busca evitar que recursos naturais como florestas, rios e todo tipo de mananciais de água, dunas, areia e argila, entre outros, sejam degradados ou explorados irracionalmente é a FATMA (Fundação do Meio Ambiente). A FATMA é o órgão ambiental da esfera estadual do Governo de Santa Catarina que tem como missão maior garantir a preservação dos recursos naturais do estado.

As análises ecotoxicológicas já eram citadas na Resolução CONAMA 357/2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. A Resolução CONAMA 357/2005 determina que as possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados na mencionada Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigados utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos ou outros métodos cientificamente reconhecidos.

A partir de 2011, entrou em vigor a Resolução CONAMA 430/2011 que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes e foi criada com o intuito de complementar e alterar parcialmente a Resolução CONAMA 357/2005. Na seção II do Capítulo II que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes é

estabelecido, no Art. 18, que o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de ecotoxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Além disto, no § 1º consta que nos ensaios ecotoxicológicos devem ser utilizados organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos, sendo que no § 4º é afirmado que a critério do órgão ambiental, com base na avaliação dos resultados de série histórica, poderá ser reduzido o número de níveis tróficos utilizando para os testes de ecotoxicidade, para fins de monitoramento.

A portaria nº017/02 da FATMA estabelece, entre outras providências, os limites máximo de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens. O artigo 2º estabelece que a toxicidade aguda do efluente deverá ser realizada em laboratório, mediante a elaboração de testes ecotoxicológicos padronizados, cujos resultados deverão ser expressos em fator de diluição (FD), o qual representa a primeira de uma série de diluições de uma amostra na qual não se observa efeitos tóxicos agudos aos organismos-testes. Na Tabela 2 estão apresentados os limites máximos de toxicidade aguda dos efluentes de diferentes origens, expressos em FD, para o microcrustáceo *D. magna* e para bactéria bioluminescente *V. fisheri*.

A portaria nº017/02 da FATMA estabelece também que para as atividades não inseridas na Tabela 2 ficam estabelecidos os limites máximos de toxicidade aguda o FDD e FDbI de 8 (12,5%).

Tabela 2: Limites Máximos estabelecidos pela portaria 017/2002 (FATMA) de Toxicidade Aguda para os microcrustáceos – *D. magna* (Straus, 1820) e para as bactérias bioluminescentes – *V. fischeri*, dos efluentes de diferentes categorias.

Origem dos Efluentes		Limites Máximos de Toxicidade Aguda para <i>Daphnia magna</i>	Limites Máximos de Toxicidade Aguda para <i>Vibrio fischeri</i>
Categoria da atividade	Subcategoria da atividade	FDD	FDbl
Metal mecânica	Siderurgia,	4	6
	Metalurgia	4	6
	Galvanoplastia	16	8
Alimentícia	Frigoríficos, Abatedouros,	2	4
	Laticínios, Cerealistas,		
	Bebidas, Fecularias,		
	Alimentos		
Esgotos domésticos e/ou hospitalares		I	4
Resíduos urbanos	Efluentes de Aterros Sanitários	8	16
Papel e Celulose		2	4
Couros, peles e produtos similares		4	6
Química	Agroquímica, Petroquímica,	2	4
	Produtos químicos não especificados ou não classificados		
Têxtil	Beneficiamento de fibras naturais e sintéticas, confecção e tinturaria	2	2
Farmacêutica		2	4

FONTE: Adaptada de Fatma 017/02. FDD - Fator de Diluição para *Daphnia magna*./FDbl - Fator de Diluição para *Vibrio fischeri*/FD = 1 – amostra bruta não tóxica.

Conforme apresentado anteriormente foram encontrados alguns estudos na literatura científica sobre a remoção de cor dos corantes têxteis pela enzima HRP, entretanto as condições ótimas de remoção de cor e os resultados de rendimento encontrados para as reações foram bastante variáveis. Além disto, os estudos encontrados foram superficiais, não abordando de forma abrangente a influência dos vários fatores que afetam o rendimento destas reações. Quanto aos estudos de toxicidade dos corantes, foram encontrados apenas estudos da toxicidade aguda com relação ao corante Azul Brillhante Remazol e Azul Turqueza, os quais utilizavam a *Daphnia magna*, *Artemia salina* e/ou *Allium cepa* (cebola). Sendo que, nenhum estudo crônico com os corantes estudados foi encontrado.

Portanto, com esta pesquisa, espera-se apresentar de forma mais ampla a influência dos diferentes fatores nas reações de remoção de cor de quatro importantes corantes têxteis pela enzima HRP e trazer uma significativa contribuição com relação a questões ambientais e a utilização e o tratamento de corantes têxteis. Dando especial atenção à toxicidade que os produtos de degradação destes corantes podem apresentar, de forma a garantir que seu descarte em efluentes têxteis não sejam um risco à biota aquática e que não cause um dano ambiental.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

#### 4.1.1. Corantes

No desenvolvimento do trabalho foram utilizados os corantes reativos: Azul Turquesa Remazol G (Reactive Blue 21), Preto Remazol B133% (Reactive Black 5), Azul Brilhante Remazol (Reactive Blue 19), Vermelho Brilhante Remazol 3BS-A 150% (Reactive Red 239) e Vermelho CQ4BL (Reactive Red 195). Suas estruturas químicas estão apresentadas nas Figuras 7 a 11.

Os quatro primeiros corantes foram cedidos pela empresa têxtil Karsten e o último pela empresa têxtil Döhler S.A. Foram solicitados, a estas empresas, corantes de ampla utilização em processos de tingimento, e que tivessem estrutura química conhecida. Na Tabela 3 estão apresentadas as principais características dos corantes estudados.

Figura 7. Estrutura química do corante Azul Brilhante Remazol (Reactive Blue 19).

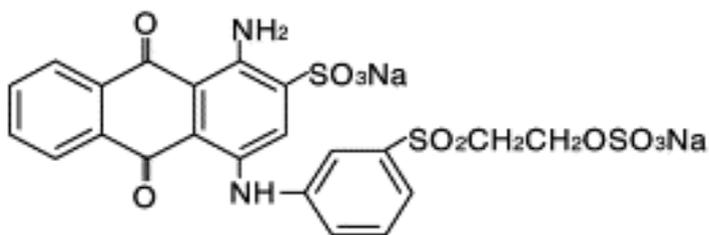


Figura 8. Estrutura química do corante Azul Turquesa Remazol G (Reactive Blue 21).

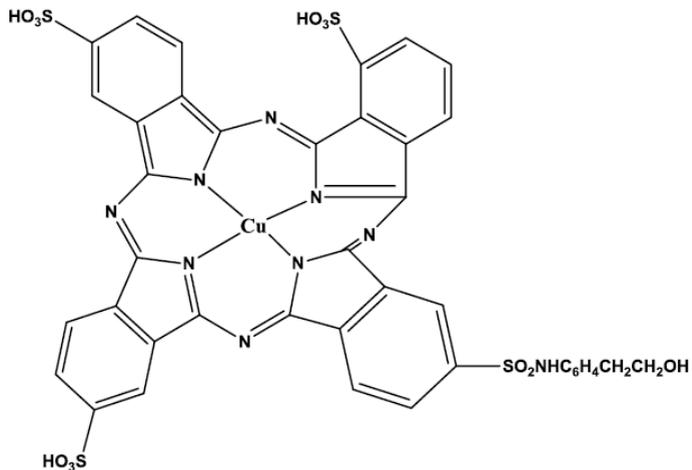


Figura 9. Estrutura química do corante Preto Remazol B133% (Reactive Black 5).

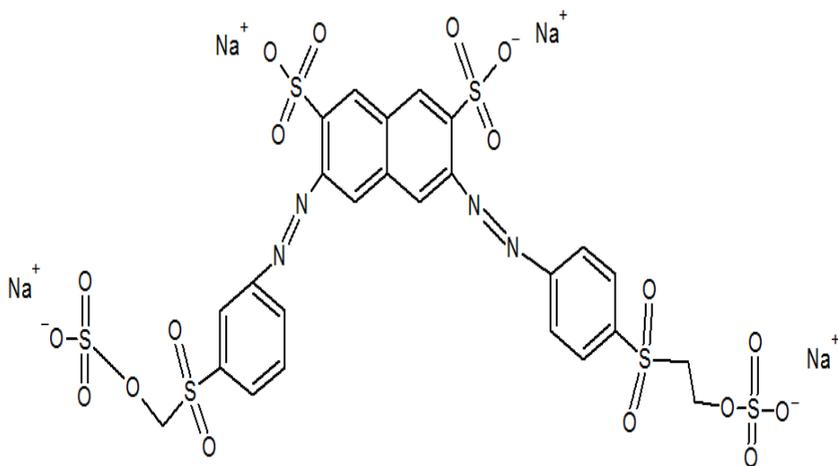


Figura 10. Estrutura química do corante Vermelho CQ4BL (Reactive Red 195).

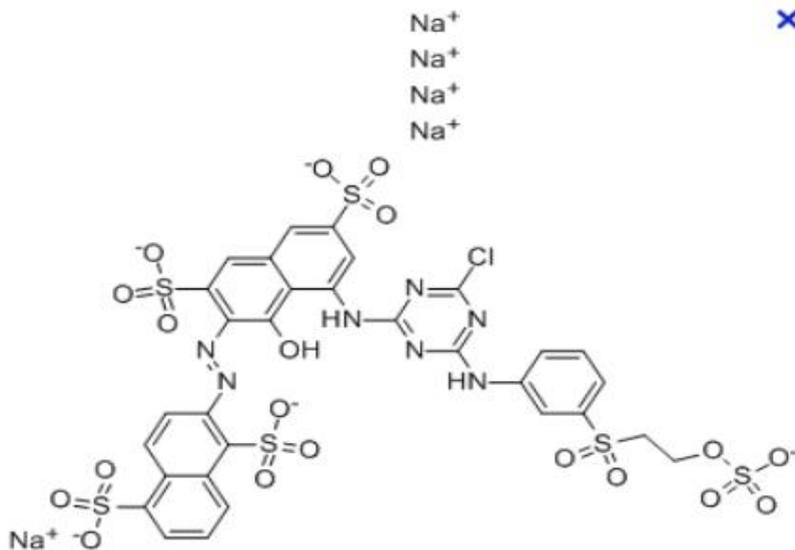


Figura 11. Estrutura química do corante Vermelho Brilhante Remazol (Reactive Red 239).

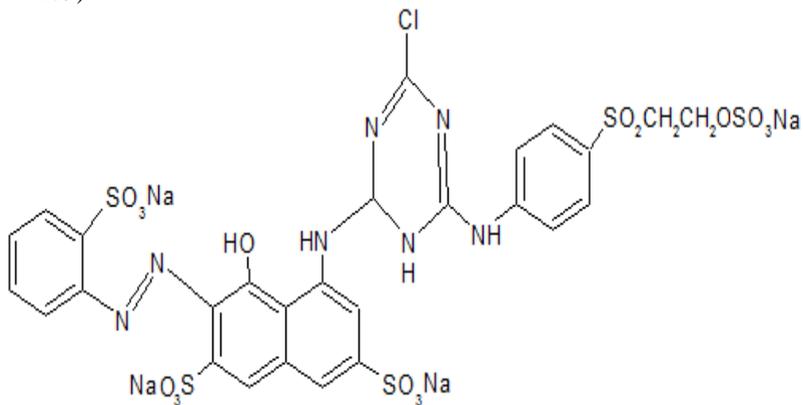


Tabela 3. Descrição dos corantes estudados.

Corantes		Classificação		
Nome usual	Nome oficial	Quanto ao modo de fixação à fibra	Quanto à estrutura química	Massa molar (g/mol)
Azul Brilhante	Reactive Blue 19	Reativo	Antraquinona	626
Azul Turqueza	Reactive Blue 21	Reativo	Ftalocianina	1079
Preto Remazol B133%	Reactive Black 5	Reativo	Azo	991
Vermelho CQ4BL	Reactive Red 195	Reativo	Azo	1136
Vermelho Remazol	Reactive Red 239	Reativo	Azo	1085

#### 4.1.2. Enzima

A enzima utilizada foi a Horseradish peroxidase (HRP), gentilmente doada pela Toyobo do Brasil (2012). A ficha técnica da enzima está apresentada no Anexo A. As principais características desta enzima são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades da enzima Horseradish peroxidase (HRP).

Estabilidade	Estável em - 20 °C (por pelo menos 1 ano) Aproximadamente 40.000
Massa molecular	6-7
pH ótimo	45 °C
Temperatura ótima	5-10 (25 °C, 20 h)
Estabilidade em pH	Abaixo 50 °C (pH 6, 10 min)
Estabilidade térmica	

FONTE: TOYOBO DO BRASIL, 2012.

### 4.1.3 Organismos-teste

Para os testes de toxicidade aquática, foram utilizados o microcrustáceo *Daphnia magna*, a alga *Euglena gracilis* e a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri*.

#### 4.1.3.1 *Euglena gracilis* - Organismos e Manutenção

As cepas de *E. gracilis* foram cultivadas no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia da UNIVILLE utilizando culturas obtidas a partir da coleção de cultura de algas da Universidade de Göttingen, Alemanha (cepa Z).

O cultivo e os testes foram realizados com cepas de *E. gracilis* em meio mineral e orgânico preparado conforme descrição feita por Checcuci *et al.* (1976). A manutenção da cultura ocorreu à temperatura de 20 °C com foto período de 12 h sob exposição da luz 20 W m<sup>2</sup>.

#### 4.1.3.2 *Daphnia magna* - Organismos e Manutenção

A metodologia de cultivo do organismo-teste *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) seguiu o preconizado pela NBR 12.713 (ABNT, 2004a), de acordo com os procedimentos descritos por Brentano (2006), com algumas modificações.

Os organismos-teste foram cultivados em água natural, com pH variando de 7,0 a 8,0 e dureza variando de 175 a 225 mg/L CaCO<sub>3</sub>.

A água reconstituída, após preparada, foi mantida sob aeração para solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH.

Os organismos foram mantidos em lotes de até 25 adultos por litro, em recipiente de 4.000 mL, com fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 18°C a 22°C.

Para manutenção da cultura, foram utilizados organismos com até 60 dias. Como alimento, utilizou-se a alga verde **Desmodesmus subspicatus**, fornecendo a quantidade de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/mL por organismo adulto, diariamente, ou com intervalo de, no máximo, dois dias consecutivos.

### 4.1.3.3 *Vibrio fischeri* - Organismos e Manutenção

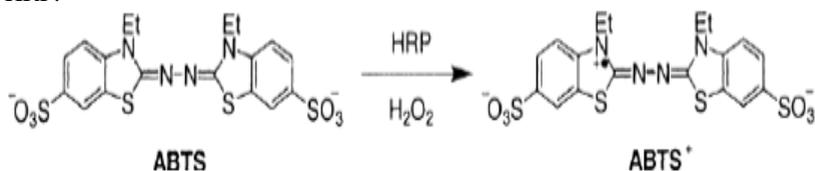
Foi utilizada a bactéria liofilizada *V. fischeri* da marca Bioluz, UMWELT Ltda., a qual foi hidratada no momento do teste com água purificada.

## 4.2. Determinação da Atividade Enzimática da Horseradish Peroxidase (HRP)

A atividade do extrato enzimático foi determinada de acordo com a metodologia utilizada por Farias (2013), utilizando como substrato ABTS [ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)].

O ABTS é oxidado pela enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio, formando o cátion ( $\text{ABTS}^+$ ), conforme apresentado na Figura 12. A velocidade de formação deste cátion é proporcional à atividade enzimática, podendo ser monitorada por espectrofotometria UV-Vis a 420 nm.

Figura 12. Reação de conversão do ABTS no cátion  $\text{ABTS}^+$  catalisado pela HRP.



FONTE: KADNIKOVA; KOSTIC, 2002.

A reação de oxidação foi conduzida utilizando 2,19 mL de tampão fosfato pH 6 ( $0,05 \text{ molL}^{-1}$ ), 0,300 mL de extrato enzimático, 0,255 mL de ABTS 20 mM e 0,255 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 10 mM. Monitorou-se a oxidação do substrato durante 5 min, em um espectrofotômetro a 420 nm ( $\epsilon_{420\text{nm}} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS em seu radical cátion por minuto.

## 4.3 Espectro de Absorção UV-Vis dos Corantes

Foram obtidos os espectros de absorvância na região da luz - Visível de 400 a 800 nm (em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo 1601PC), de soluções dos corantes a 50 mg/L, a mesma concentração

utilizada na maior parte dos experimentos. A concentração de corante 50 mg/L foi escolhida por ser uma concentração de corante tipicamente encontrada nas águas residuais de indústrias têxteis (CRISTÓVÃO, 2010).

Após serem encontradas as melhores condições de remoção de cor de cada corante, os espectros de absorvância foram novamente obtidos.

#### 4.4 Determinação da Velocidade Inicial e da Redução de Cor

A determinação de redução de cor em percentual foi calculada através da fórmula utilizada por Agarry e Ajani (2011):

$$\text{Descoloração} = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:  $Abs_i$  é a absorvância da solução inicial e  $Abs_f$  é a absorvância da solução final (após o tratamento).

As absorvâncias das soluções do corante Azul Brillante Remazol foram determinadas em 593 nm, do corante Azul Turqueza em 621 nm, do corante Preto Remazol em 597 nm e do corante Vermelho CQ4BL em 541 nm.

A velocidade inicial de remoção de cor foi calculada conforme a equação:

$$V_{\text{inicial}} = \frac{1 - Abs_{10 \text{ min}} / Abs_i}{10 \text{ min}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:  $Abs_{10 \text{ min}}$  é a absorvância da solução após 10 min de reação.

#### 4.5 Estudos de Remoção de Cor

Os experimentos de remoção de cor foram realizados em condições de batelada em erlenmeyers de 125 mL com volume reacional de 100 mL e concentração de corante de 50 mg/L (exceto nos estudos de influência da concentração do corante)

Para os estudos foram variadas as condições de reação: concentração de enzima, concentração de peróxido de hidrogênio, pH e temperatura conforme os planejamentos experimentais.

O pH das soluções foi mantido com 10 mL de solução tampão dos tampões citrato pH 3, citrato-fosfato pH 4 ou 5, ou fosfato pH 6,0, 7,0 ou 8,0, em concentração 0,05 mol/L. A temperatura foi mantida com banho termostatizado, e os resultados expressos como média  $\pm$  Desvio Padrão

Todos os experimentos de remoção de cor, exceto o planejamento fatorial  $2^4$ , foram realizados em triplicatas.

#### 4.6 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção dos Corantes

A fim de determinar a influência de inúmeras variáveis nos resultados de um determinado processo ou sistema, uma ferramenta eficaz é a aplicação de um planejamento experimental.

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central, gerado pelo software Statistica 7.0, como primeiro passo em busca das melhores condições experimentais para a remoção de cor dos corantes têxteis pela enzima HRP. Os fatores analisados e os níveis estão especificados na Tabela 5. Os valores utilizados para os níveis foram escolhidos com base em testes preliminares.

Tabela 5. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial  $2^4$ .

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
[E] - Concentração de Enzima (U/mL)	2,10	21,04	39,97
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] - Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	$3 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$
pH	4	5	6
T (°C)	20	30	40

Os 4 fatores foram analisados em dois níveis e com triplicata no ponto central, totalizando 19 experimentos, conforme indicado na Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento experimental dos fatores de maior influência para remoção dos corantes.

Ensaio	Fatores			
	[E]	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	pH	Temperatura
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	1	-1
4	1	1	1	-1
5	-1	-1	-1	-1
6	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	1	1
12	1	1	1	1
13	-1	-1	-1	1
14	1	-1	-1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

A velocidade inicial (em 10 min) e a porcentagem de remoção de cor em 60 min foram utilizadas como resposta. Os resultados obtidos foram tratados com o auxílio do programa Statistica (7.0) para obtenção do Gráfico de Pareto e do diagrama do planejamento experimental.

Este planejamento foi realizado para os cinco corantes estudados. A partir deste momento, em virtude dos resultados obtidos, os demais testes de remoção de cor dos corantes seguiram de maneiras diferentes. O corante Vermelho Brillhante, por não apresentar remoção de cor neste estudo, não foi utilizado nas demais análises.

## 4.7 Estudo Cinético da Degradação Enzimática dos Corantes

### 4.7.1 Avaliação da Influência da Concentração de Enzima

De acordo com os resultados obtidos na etapa anterior, 4.6, foi realizada a avaliação da influência da quantidade de enzima nas reações.

Neste estudo, a concentração de enzima foi variada em cinco diferentes valores, mantendo as outras variáveis do processo constantes, conforme a Tabela 7.

Tabela 7. Condições das reações do estudo da influência da quantidade de enzima nas reações de remoção de cor.

	<b>Azul Brilhante</b>	<b>Azul Turqueza</b>	<b>Preto Remazol</b>	<b>Vermelho CQ4BL</b>
Concentração de Enzima (U/mL)	2,63	2,63	10,52	10,52
	5,26	5,26	21,04	21,04
	10,52	10,52	31,56	31,56
	15,79	15,79	42,08	42,08
	21,04	21,04	52,60	52,60
Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	$2 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^{-4}$
pH	6	4	4	4
Temperatura (°C)	25	25	25	25

Para os corantes Preto Remazol e Vermelho CQ4BL, por não terem alcançados resultados satisfatórios de remoção de cor no planejamento experimental (com o corante Preto Remazol foi obtido no máximo 77,7% e como corante Vermelho CQ4BL, 19,1%) optou-se por estudar concentrações mais altas de enzima.

As absorbâncias das soluções foram medidas por 300 min, sendo que nos primeiros 120 min, foram feitas leituras a cada 10 min e, a seguir, de 30 em 30 min.

#### **4.7.2 Avaliação da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio**

Foram selecionadas 3 concentrações de enzima e cada uma destas concentrações foi estudada com seis diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, conforme a Tabela 8. As demais condições do estudo foram as mesmas utilizadas no item 4.7.1.

Tabela 8. Condições das reações do estudo cinético da degradação enzimática dos corantes e otimização da quantidade de peróxido de hidrogênio.

	Concentração de Enzima (U/mL)	Concentração H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM x 10 <sup>-5</sup> )
Azul Brilhante	5,26 10,52 15,79	1,25
		2,50
		5,00
		10,00
		20,00
		40,00
Azul Turqueza	5,26 10,52 15,79	1,25
		2,50
		5,00
		10,00
		20,00
		40,00
Preto Remazol	21,04 31,56 42,08	1,25
		2,50
		5,00
		10,00
		20,00
		40,00
Vermelho CQ4BL	31,56 42,08 52,60	1,25
		2,50
		5,00
		10,00
		20,00
		40,00

#### 4.7.3 Avaliação da Influência do pH e da Temperatura

Neste experimento, foram estudadas a influência da temperatura e do pH sobre a remoção de cor pela enzima HRP. Foram estudadas as seguintes temperaturas: 20, 30 e 40 °C, em pH 3, 4, 5, 6, 7, e 8, totalizando 18 experimentos para cada corante.

As demais condições utilizadas nestes experimentos foram as consideradas ótimas em relação aos experimentos anteriores. As condições encontram-se especificadas na Tabela 9.

Tabela 9. Condições das reações do estudo cinético da degradação enzimática dos corantes e otimização do pH e da temperatura.

		Azul Brilhante	Azul Turqueza	Preto Remazol	Vermelho CQBL
Concentração de Enzima (U/mL)		10,5	5,25	31,56	21,56
Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)		1 x 10 <sup>-4</sup>	2,5 x 10 <sup>-5</sup>	5 x 10 <sup>-5</sup>	5 x 10 <sup>-5</sup>

Foram feitas leituras de absorbância das soluções em intervalos de 10 min por um período de tempo total de 60 min.

#### 4.7.3.1 Estudo da Cinética de Degradação

Para os estudos da cinética de degradação, foram utilizadas as condições de reação: concentração de enzima, concentração de peróxido de hidrogênio, pH e temperatura que apresentaram melhor descoloração em 60 min no experimento anterior. As reações foram acompanhadas minuto a minuto durante os 10 min iniciais e, a seguir, em intervalos de 10 min até um tempo total de 60 min.

##### 4.7.3.1.1 Estudo da Cinética de Degradação – Primeira Ordem

Os processos de primeira ordem simples são caracterizados pela velocidade da reação ser diretamente proporcional à concentração de apenas um dos reagentes (A), descrita matematicamente pela equação 3.

$$-r_A = \frac{-dC_A}{dt} = kC_A \quad (\text{Equação 3})$$

Separando e integrando, obtém-se a equação 4.

$$\ln C_A = \ln C_0 - kt \quad (\text{Equação 4})$$

onde C<sub>0</sub>: concentração inicial, C<sub>A</sub>: concentração no tempo t e k: a constante de velocidade da reação.

Desta forma, um gráfico de ln [C<sub>A</sub>] contra t resulta em uma reta de inclinação negativa e com coeficiente angular -k.

#### 4.7.3.1.2 Estudo da Cinética de Degradação – Segunda Ordem

No caso da cinética de degradação de segunda ordem, a Equação 5 representa a relação matemática entre concentração e tempo de reação

$$-r_A = \frac{-dC_A}{dt} = k_2 C_A^2 \quad (\text{Equação 5})$$

Separando e integrando, obtém-se a equação 6.

$$\frac{1}{C_A} = \frac{1}{C_0} + kt \quad (\text{Equação 6})$$

Um gráfico de  $1/C_A$  contra  $t$  resulta em uma reta crescente com coeficiente linear  $1/C_0$  e coeficiente angular  $k$ .

#### 4.7.3.1.3 Estudo da Cinética de Degradação – Pseudo Primeira Ordem

Segundo El Haddad *et al.* (2014), a Equação que descreve o modelo de pseudo primeira ordem é:

$$\text{Log}(C_A - C_e) = \text{Log}(C_0 - C_e) - (K_1'/2,303)t \quad (\text{Equação 7})$$

onde,  $C_e$  é a concentração de corante no equilíbrio.

Um gráfico de  $\log(C_A - C_e)$  contra  $t$  resulta em uma reta crescente.

#### 4.7.3.1.4 Estudo da Cinética de Degradação – Pseudo Segunda Ordem

Ainda de acordo com El Haddad *et al.* (2014), a Equação 8 descreve o modelo de pseudo primeira ordem.

$$\frac{t}{C_A} = \frac{1}{K_2'/C_e^2} + \frac{1}{C_e} t \quad (\text{Equação 8})$$

Se o processo corresponder a uma cinética de pseudo segunda ordem, o gráfico  $t/C_A$  em função de  $t$  fornecerá uma relação linear, na qual  $C_e^2$  e  $K_2'$  poderão ser determinados a partir do coeficiente angular e do coeficiente linear do gráfico.

O método utilizado para a determinação da ordem de reação foi o do ajuste da melhor reta obtida entre os modelos de primeira ordem e de segunda ordem.

#### 4.7.4 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio: Concentração de Corante

Estudou-se as concentrações de corante de 25 mg/L e 100 mg/L. Cada uma destas concentrações foram avaliadas utilizando a quantidade de peróxido de hidrogênio considerada ótima (Tabela 10), e quantidade proporcional (concentração de corante: concentração de peróxido de hidrogênio) ou seja, a quantidade considerada ótima para as soluções a 50 mg/L. As demais condições dos ensaios foram as consideradas ótimas para as soluções de corante a 50 mg/L. Foram lidas as absorvâncias das soluções em intervalos de 10 min por 60 min.

Tabela 10. Melhores condições das reações de descoloração de soluções dos corantes têxteis a 50 mg/L.

		<b>Azul Brilhante</b>	<b>Azul Turqueza</b>	<b>Preto Remazol</b>	<b>Vermelho CQ4BL</b>
Concentração de Enzima (U/mL)		10,5	5,25	31,56	21,04
Concentração de $H_2O_2$ (mM)		$1 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$
pH		6	4	4	4
Temperatura (°C)		30	30	40	30

#### 4.7.5 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante sobre as Condições da Reação

Foi avaliada a influência da concentração de corante na remoção de cor em 60 min. As concentrações de corante estudadas foram: 12,5; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 mg/L e as demais condições utilizadas são as mesmas descritas na Tabela 10.

## 4.8 Testes de Toxicidade

Antes da realização dos ensaios de toxicidade, as amostras foram submetidas a ajuste de pH para 6,0-7,0 com HCl ou NaOH. As amostras utilizadas no teste com *V. fischeri* tiveram sua salinidade ajustada.

### 4.8.1 Teste de Toxicidade Aguda utilizando o Organismo *Daphnia magna*

O teste agudo com o organismo-teste *Daphnia magna* seguiu o descrito na NBR 12.713 (ABNT, 2004a), sendo utilizados neonatos de *Daphnia magna*, com 2 a 26 h de idade.

Cada amostra foi testada utilizando 6 diluições na razão 2. Cada diluição foi preparada em duplicata da seguinte forma: colocou-se 25 mL da solução teste em um béquer, em seguida, adicionou-se 10 organismos, incubou-se por 48 h e então observou-se a quantidade de organismos imóveis.

No controle e como diluente foi usado água de diluição, também chamada meio ISO, descrito na norma ISO 6341 (ISO, 1996). Para o controle dos testes, a imobilidade aceita foi de, no máximo, 10%.

Mensalmente, os organismos-teste *D. magna* passaram pelo teste de sensibilidade frente à substância de referência, dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), visando garantir a validação dos testes realizados.

Os resultados foram expressos em Fator de Diluição (FD), que equivale à menor diluição em que a imobilidade é superior a 10% e em  $CE_{50}$ , que indica a concentração que causa imobilidade a 50% dos organismos testados.

O parâmetro FD é utilizado para o enquadramento dos efluentes nos Estados de Santa Catarina (Portaria 017/02 FATMA) e Paraná (Portaria 019/06 IAP).

### 4.8.2 Teste de Toxicidade Aguda utilizando o Organismo *Vibrio fischeri*

No ensaio de toxicidade com a bactéria *V. fischeri*, compara-se a medição de sua luminescência natural antes e após um intervalo de exposição a uma amostra. Na presença de substâncias tóxicas, a intensidade da luz diminui devido à inibição de processos metabólicos da célula (PARVEZ *et al.*, 2006).

O teste foi realizado de acordo com a ABNT NBR 15411-3:2012, utilizando como tempo de exposição 30 min. Foram testadas 7 diluições na razão 2, utilizando como diluente solução de NaCl 2%. Os resultados foram expressos em Fator de Diluição (FD), que equivale à menor diluição dentre uma série de diluições analisadas, na qual a inibição da luminescência é inferior a 20%.

### **4.8.3 Teste de Eficiência Fotossintética no PAM utilizando o Organismo *Euglena gracilis***

Os parâmetros relacionados à fotossíntese foram medidos através de um fluorímetro de amplitude de pulso modulada WATER-PAM, Walz, Effeltrich, Alemanha. Este equipamento faz leituras de fluorescência relacionadas à clorofila *a* do fotossistema II. De acordo com Pinto (2012) o princípio de medição do PAM é baseado em mudanças no nível de fluorescência da clorofila, após a aplicação de pulsos de luz saturada. As culturas testadas foram adaptadas no escuro por 1 h antes dos testes.

Foram feitas diluições 1: 2 de alga (*Euglena gracilis*) e das soluções de corante (100 mg/L) antes e após o tratamento. Estas soluções foram submetidas à análise no PAM após 2 e 7 dias de incubação.

Para as análises foram retirados 5 mL de amostra, as quais foram transferidas para a cubeta do equipamento PAM. As amostras foram, então, submetidas à emissão dos pulsos de luz saturante para avaliação da atividade fotossintética.

A emissão de um pulso de luz saturante permite detectar a fluorescência máxima  $F_m$ , indicando redução completa do receptor de elétrons no fotossistema II (FSII). A Luz-resposta das curvas foi determinada para todas as amostras antes e após o tratamento. As algas foram expostas a intensidade da iluminação crescente (gerado por uma lâmpada halógena interna) em 10 passos de 0 a  $3111 \text{ molm}^2/\text{s}$ . Após 20 s de cada etapa de iluminação, um pulso saturante foi aplicado e o rendimento fotossintético do fotossistema II ( $F_o$  (fluorescência inicial) /  $F_m$  (fluorescência máxima)) e a ETR (taxa de transporte de elétrons) foram medidos automaticamente (PINTO, 2012).

Em seguida, os dados foram plotados contra o PAR incidente (radiação fotossinteticamente ativa em  $\text{molm}^2/\text{s}$ ).

#### 4.8.4 Teste de Toxicidade Crônica utilizando o Organismo *Daphnia magna*

O teste de toxicidade crônica foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por Brentano (2006). Para realização dos testes, foram utilizados organismos da espécie *Daphnia magna* jovens, com 2 a 26 h de idade.

Os organismos foram separados em 9 grupos com 10 indivíduos cada. Os grupos foram denominados: Controle, Azul Brilhante, Azul Brilhante após o tratamento, Azul Turqueza, Azul Turqueza após o tratamento, Vermelho CQ4BL, Vermelho CQ4BL após o tratamento, Preto Remazol e Preto Remazol após o tratamento. Cada ensaio foi realizado com 3 concentrações de amostra (1, 5 e 10 mg/L), exceto o controle (em que foi utilizado somente água reconstituída - meio M4). Todas as diluições necessárias foram realizadas com meio M4. Os ensaios foram acompanhados por 21 dias.

Para cada ensaio, utilizaram-se 10 réplicas, dispendo individualmente 10 organismos jovens de *Daphnia magna* em recipientes plásticos de 50 mL. Cada recipiente recebeu 25 ml de solução-teste. Os testes foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, com fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ . Os organismos foram alimentados três vezes por semana, em dias intercalados, sendo fornecido como alimento a alga clorofícea *Scenedesmus subspicatus*. Os organismos foram acompanhados durante o teste com observações três vezes por semana, nos mesmos dias em que eram alimentados. Nestes momentos observavam-se a sobrevivência e número de jovens gerados por fêmea. Nas leituras, a partir da primeira semana também substituía-se a solução-teste.

Visando avaliar a toxicidade das amostras testadas, dois parâmetros foram analisados na execução do teste: longevidade e fecundidade. A longevidade foi avaliada pela sobrevivência, expressando o número de daphnias sobreviventes no período. A fecundidade foi avaliada pela contagem total dos neonatos gerados pelas fêmeas, e então, foi calculada a média de filhotes produzidos por fêmea. Para o cálculo desta média, no caso de haver morte de adultas, não considerou-se esta mãe e excluiu-se o número de filhotes que ela produziu até então. No caso de existir um macho entre os organismos-teste adultos que estavam sendo testados, apenas os dados de avaliação da longevidade foram utilizados como resultado, não incluindo este indivíduo nos cálculos de fecundidade.

## 4. 9 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos de remoção de cor foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), seguidos pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ) com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., USA). Nos testes de planejamento experimental, este mesmo software foi utilizado para análise e representação dos resultados. Para os cálculos da LC50 dos experimentos de toxicidade foi utilizado o programa SigmaPlot 12.

### 4.9.1 Determinação da Concentração Eficaz Média ( $CE_{50}$ )

Os dados referentes aos ensaios agudos deste trabalho foram tratados de acordo com Gelber *et al.* (1985) onde, estima-se a concentração da substância-teste que causa efeito a 50% (porcentagem que oferece uma maior reprodutibilidade e uma estimativa pontual) da população alvo testada, durante um período de tempo indeterminado.

Para a determinação da concentração eficaz média ( $CE_{50}$ ) foi utilizada a Equação 9 que interpreta os dados experimentais (TAHEDL; HÄDER, 1999; WILLEMANN, 2002; MILLÁN DE KUHN *et al.*, 2006).

$$y = \frac{y_0}{1 + \left( \frac{c}{CE_{50}} \right)^b} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde  $y$  é a variável de resposta (porcentagem de organismos mortos),  $c$  é a concentração da substância,  $y_0$  é a resposta quando a concentração tende a infinito e  $b$  é um fator de escala.

Os dados foram processados usando o software Sigma-Plot para o Windows SP. 12, (Systat Software Inc.). Este modelo corresponde à Equação 10, proposta por Emmens (TAHEDL; HÄDER, 1999) para interpretar as relações concentração-efeito.

$$SS = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2 \quad (\text{Equação 10})$$

O software ajusta os valores de uma regressão não linear. O programa Sigma-Plot utilizado para elaborar o gráfico e obter a curva sigmoidal, usa o algoritmo de Levenberg-Marquardt (Equação 2) para

determinar os parâmetros das variáveis independentes que dão o melhor ajuste entre a equação e os dados. Este algoritmo determina os valores dos parâmetros iterativamente, de modo que a soma das diferenças ao quadrado entre os valores observados e preditos da variável dependente é minimizada, sendo  $i$  o valor observado e  $y_i$  o valor previsto. Os parâmetros  $CE_{50}$ ,  $b$  e  $y_0$  (ver Equação 9) são otimizados para minimizar algoritmo (SS). Os intervalos de confiança do conjunto de parâmetros otimizados são calculados a partir da matriz de covariância com um nível de erro de 5%.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos de Remoção de Cor do Corante Azul Brillante

#### 5.1.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção de Cor do Corante – Azul Brillante

O corante conhecido como Azul Brillante Remazol (Reactive Blue 19) é um corante antraquinona vinilsulfona, bastante resistente à oxidação química devido à sua estrutura antraquinona ser estabilizados por ressonância (FANCHIANG e TSENG, 2009). Sendo assim, alguns estudos têm sido realizados com enzimas, fungos e bactérias com objetivo de remover ou degradar este corante.

O objetivo deste estudo foi conhecer as variáveis mais importantes do processo de remoção de cor do corante Azul Brillante pela enzima HRP. Os fatores analisados e os níveis estão especificados na Tabela X, e na Tabela 11 são mostrados todos os ensaios conforme a matriz do planejamento fatorial e os respectivos valores de velocidade inicial (em 10 min) e porcentagem de remoção de cor, em 60 min.

Tabela 11. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2<sup>4</sup>.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
[E] - Concentração de Enzima (U/mL)	2,10	21,04	39,97
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] - Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	3 x 10 <sup>-5</sup>	2 x 10 <sup>-4</sup>	3 x 10 <sup>-4</sup>
pH	4	5	6
T (°C)	20	30	40

Tabela 12. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Azul Brillhante em função das condições de reação.

Experimento	[E]	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	pH	T	Velocidade inicial (min <sup>-1</sup> )	Remoção de cor (%)
1	-1	-1	-1	-1	0,0284	33,10
2	1	-1	-1	-1	0,0406	37,40
3	-1	1	-1	-1	0,041	51,50
4	1	1	-1	-1	0,0904	89,30
5	-1	-1	1	-1	0,0177	33,80
6	1	-1	1	-1	0,0423	34,40
7	-1	1	1	-1	0,0145	44,40
8	1	1	1	-1	0,0863	93,40
9	-1	-1	-1	1	0,0027	6,00
10	1	-1	-1	1	0,053	51,10
11	-1	1	-1	1	0,0061	6,10
12	1	1	-1	1	0,0902	88,10
13	-1	-1	1	1	0,0174	44,10
14	1	-1	1	1	0,005	48,50
15	-1	1	1	1	0,0127	37,30
16	1	1	1	1	0,0879	95,50
17	0	0	0	0	0,0888	94,60
18	0	0	0	0	0,089	94,40
19	0	0	0	0	0,0892	94,80

Sendo, [E]: concentração de enzima, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]: concentração de peróxido de hidrogênio e T: temperatura.

Os Gráficos de Pareto, nas Figuras 13 e 14, mostram os efeitos das variáveis experimentais para as respostas: velocidade inicial e remoção de cor (%), respectivamente. O diagrama de Pareto ilustra, graficamente, a influência das variáveis independentes sobre as variáveis respostas, considerando-se significativas aquelas em que as colunas horizontais ultrapassam as linhas tracejadas, representativas para intervalo de confiança de 95 % (p<0,05).

Figura 13. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante Azul Brilhante Remazol utilizando como resposta a velocidade inicial.

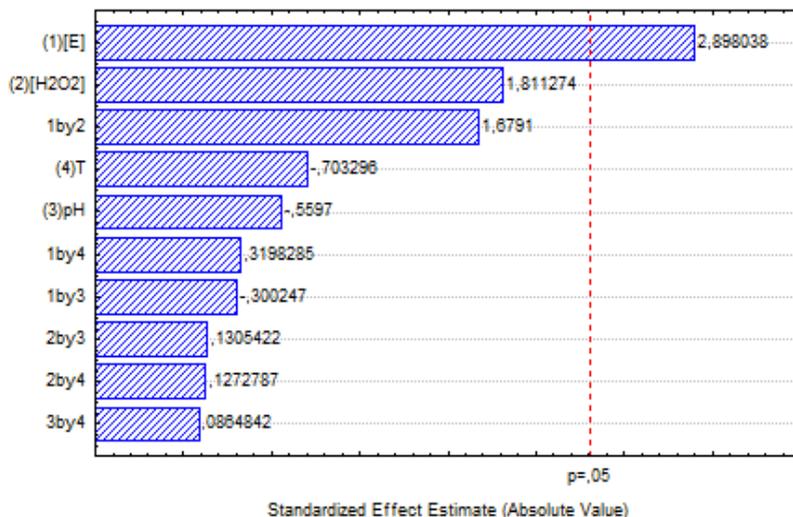
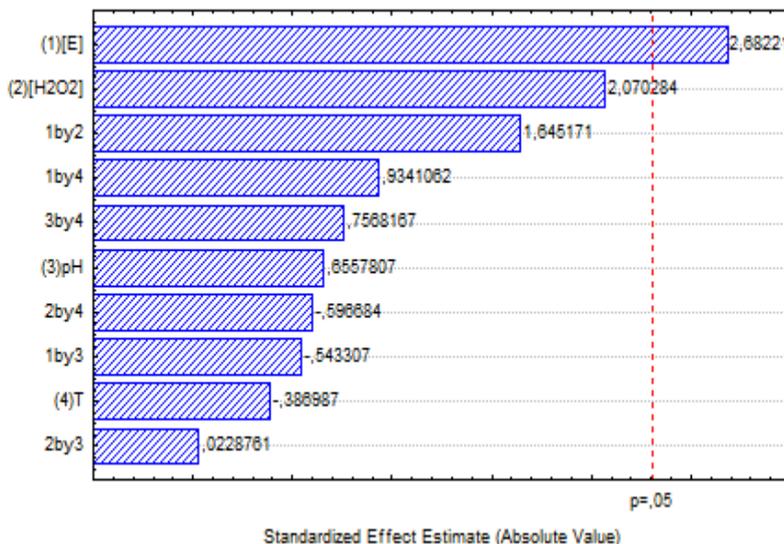


Figura 14. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante Azul Brilhante Remazol utilizando como resposta à remoção de cor (%).



Para o corante Azul Brillhante, a única variável que influenciou significativamente a velocidade inicial de remoção de cor e a remoção de cor em 60 min, no planejamento experimental utilizado, foi a concentração de enzima.

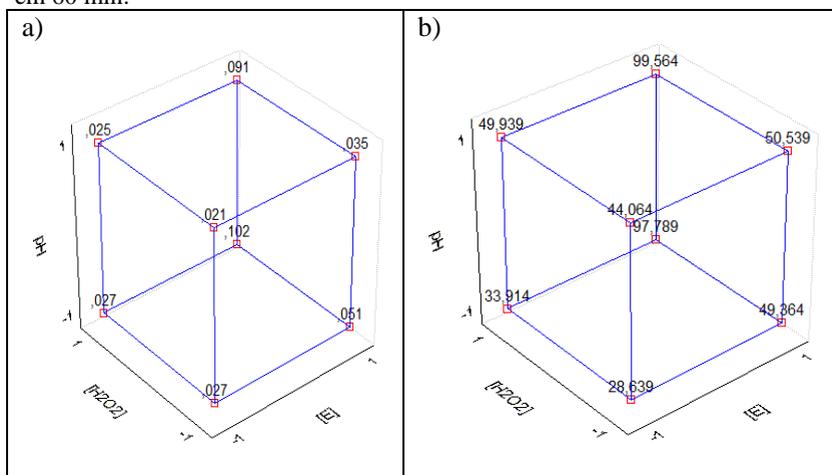
Como os fatores pH e temperatura não apresentaram influência na remoção de cor dentro da faixa do estudo utilizada no planejamento inicial, para os demais testes foi utilizado pH 6, por ser mais próximo à neutralidade, e a temperatura de 25 °C (exceto nos experimentos em que o objetivo era avaliar a influência do pH e da temperatura nas reações de remoção de cor).

Embora esteja bem estabelecido que a atividade das enzimas é dependente do pH e da temperatura, para os valores estudados no planejamento inicial, estas variáveis não demonstraram efeitos significativos.

O coeficiente de determinação obtido foi igual a 0,678, sendo assim, esta equação não conseguiu descrever de forma satisfatória os resultados experimentais.

A análise dos valores das respostas é facilitada usando o diagrama do planejamento fatorial da Figura 15. Para análise do diagrama, como só podem ser utilizados três efeitos, descartou-se a temperatura, pois a soma de seus efeitos para as duas variáveis resposta analisadas foi a menor.

Figura 15. Diagrama do planejamento fatorial  $2^4$  do corante Azul Brillhante Remazol para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.

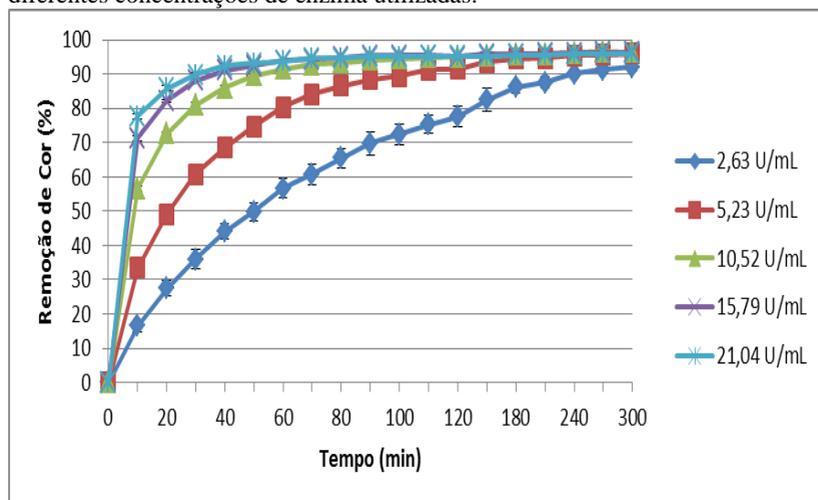


Para a variável resposta velocidade inicial, os maiores resultados foram obtidos utilizando a concentração de enzima e a concentração de peróxido de hidrogênio no nível +1 e o pH no nível -1. Ao avaliar a variável resposta remoção de cor em 60 min, os melhores resultados foram obtidos utilizando a concentração de enzima, a concentração de peróxido de hidrogênio e o pH nos níveis +1. Estes resultados indicam que, com a utilização de pH 4, a descoloração inicial ocorre de forma mais rápida, entretanto a eficiência da remoção de cor em 60 min é maior em pH 6.

### 5.1.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Azul Brillante Remazol

A concentração de enzima é um fator que apresenta grande significância nos processos de remoção de cor, determinando a velocidade da reação e não a descoloração em si. De modo geral, quanto maior a concentração de catalisador mais rápida é a reação. A influência da concentração de enzima foi avaliada em cinco níveis, mantendo os outros fatores constantes (pH 6, temperatura de 25 °C e concentração de peróxido de hidrogênio de  $2 \times 10^{-4}$  mM), os resultados estão expressos na Figura 16.

Figura 16. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brillante por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.



É possível observar que a cinética da reação é influenciada pela concentração de enzima, entretanto para as duas concentrações mais altas de enzima não foi possível observar diferenças nas remoções de cor alcançadas a partir de 30 min. A partir de 60 min de reação os resultados de remoção de cor obtidos com as concentrações de enzima: 10,52, 15,79 e 21,04 U/mL foram estatisticamente iguais entre si, e ultrapassaram 90% de descoloração. A concentração de enzima 5,23 U/mL teve seus resultados estatisticamente iguais a este grupo somente após 180 min de reação.

Para a avaliação da influência da quantidade de peróxido de hidrogênio, foram utilizadas as concentrações de enzima de 5,26, 10,52, 15,79 U/mL. A concentração de enzima de 2,63 U/mL não foi utilizada por ter levado a uma reação muito lenta, e a concentração de 21,04 U/mL por apresentar cinética de reação semelhante às soluções com 15,79 U/mL.

### **5.1.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Azul Brillante**

Como a atividade da HRP é dependente de peróxido de hidrogênio, torna-se fundamental estudar sua influência nas reações. Uma quantidade muito baixa deste reagente pode limitar a eficiência da reação, e o excesso de peróxido de hidrogênio no meio reacional, como demonstrado por Silva (2008), Mohan *et al.* (2005), Souza *et al.* (2007) e Pereira *et al.* (2015), pode inibir a atividade enzimática. De acordo com Kalsoom *et al.* (2013), concentrações elevadas de peróxido de hidrogênio são prejudiciais para o processo, provavelmente, por danificar a própria enzima.

Para o estudo da influência da quantidade de peróxido de hidrogênio nas reações, foram utilizadas soluções com 5,26 U/mL, 10,52 U/mL e 15,79 U/mL de enzima, variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio em 6 níveis (Figuras 17, 18 e 19).

Figura 17. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brilhante por tempo para concentração de enzima de 5,26 U/mL.

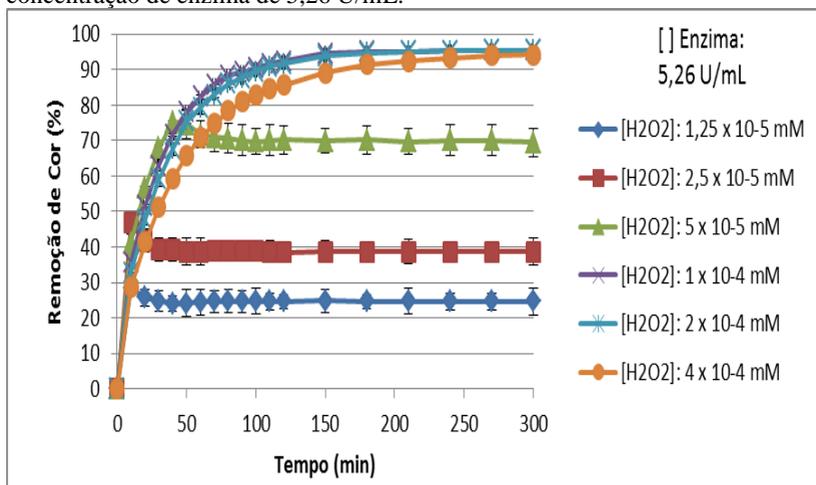


Figura 18. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brilhante por tempo para concentração de enzima de 10,52 U/mL.

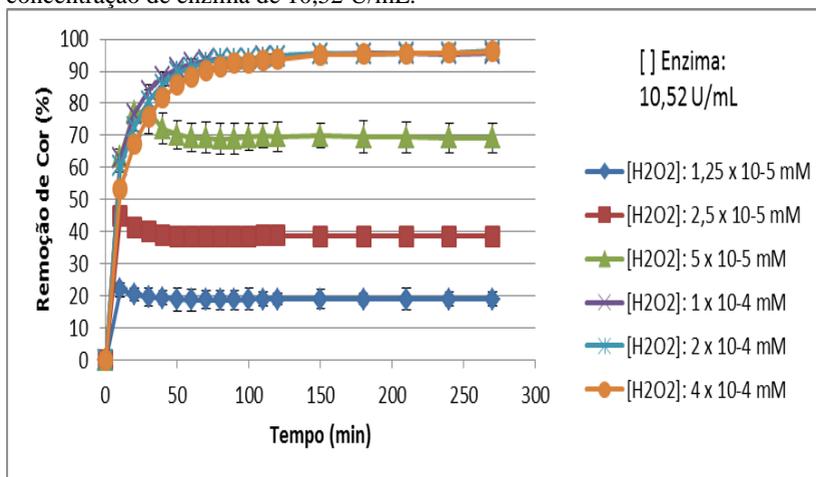
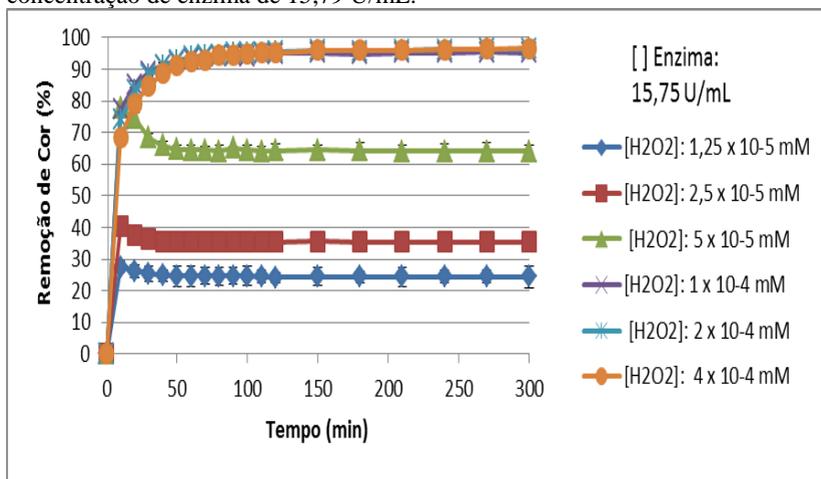


Figura 19. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Brillhante por tempo para concentração de enzima de 15,79 U/mL.



Concentrações de peróxido de hidrogênio iguais ou inferiores a  $5 \times 10^{-5}$  mM mostraram-se insuficientes para promover altas remoções de cor do corante Azul Brillhante, independentemente da quantidade de enzima utilizada.

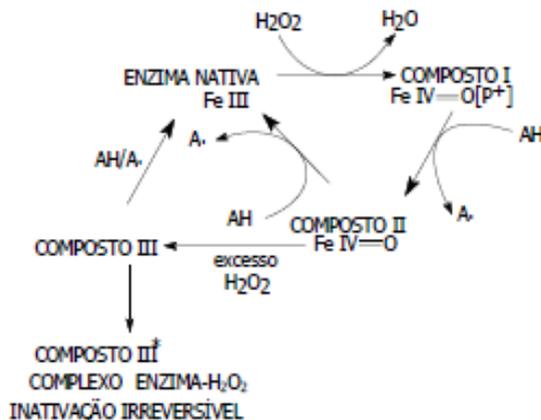
A concentração de enzima mostrou-se ser um fator determinante sobre a influência da concentração de peróxido de hidrogênio nas reações de remoção de cor. Apenas com a utilização de 5,26 U/mL de enzima foi possível observar a inibição que pode acontecer pelo excesso de peróxido de hidrogênio. Com esta concentração de enzima, até o tempo de 180 min, a remoção de cor das soluções com  $4 \times 10^{-4}$  mM de peróxido de hidrogênio foi significativamente menor do que nas soluções que possuíam metade ou um quarto desta concentração.

Quando são utilizadas baixas concentrações de peróxido de hidrogênio, tem-se um pico máximo de descoloração e, em seguida, uma queda no rendimento da reação. Quanto maior a quantidade de enzima, mais rápido é consumido o peróxido de hidrogênio e mais rápida é a queda no rendimento da reação.

De acordo com Hong-Mei e Nicell (2008), a susceptibilidade da enzima HRP à inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio pode estar relacionada com a produção de formas cataliticamente inativas chamadas *verdohaemoprotein* (P-670) e compostos III. A inativação pode ser, também, causada devido à interação de enzimas com radicais

livres produzidos durante a reação catalítica e produtos poliméricos oriundos da junção subsequente desses radicais livres. A Figura 20 apresenta o ciclo catalítico da HRP demonstrando o efeito do peróxido de hidrogênio na ativação e inativação desta enzima.

Figura 20. Ciclo catalítico das hemeperoxidases



Fonte: Odier; Artaud, 1992.

Foi escolhido como melhor tratamento as seguintes condições de reação: 10,5 U/mL de enzima e  $1 \times 10^{-4}$  mM de peróxido de hidrogênio. Nestas condições, foi possível obter descolorações acima de 90% em 60 min. No estudo da influência do pH e da temperatura das reações de descoloração foram utilizadas estas condições.

#### 5.1.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Azul Brillante Remazol

O aumento da temperatura tende a aumentar a velocidade das reações, entretanto, a temperaturas elevadas, acima da temperatura ótima, as enzimas podem desnaturar e, conseqüentemente perder sua atividade. Efeito semelhante pode ocorrer com relação ao pH, onde pHs extremos tendem a desnaturar as proteínas. Além disto, uma mesma enzima pode ter diferentes pHs e temperaturas ótimas para diferentes substratos. Desta forma, é importante estudar as melhores condições de reação para os diversos substratos possíveis.

Os resultados do estudo da influência do pH e da temperatura para o corante Azul Brillante estão apresentados nas Figuras 21 a 24.

Figura 21. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Brillante à temperatura de 20 °C.

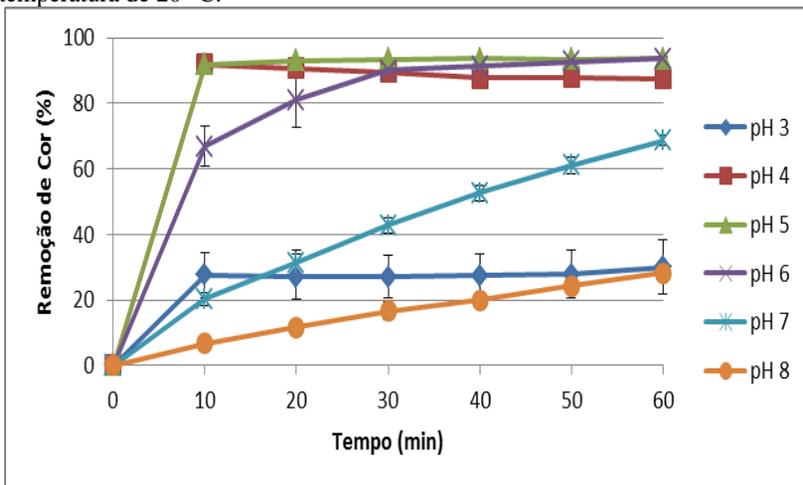


Figura 22. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Brillante à temperatura de 30 °C.

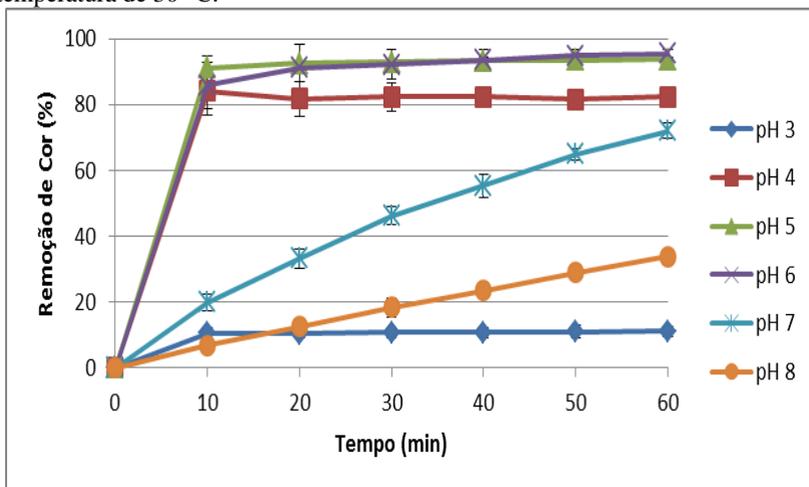


Figura 23. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Brillante à temperatura de 40 °C.

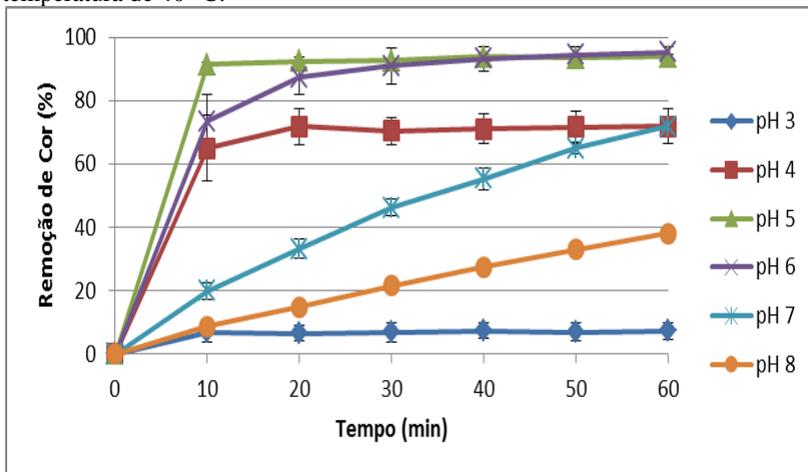
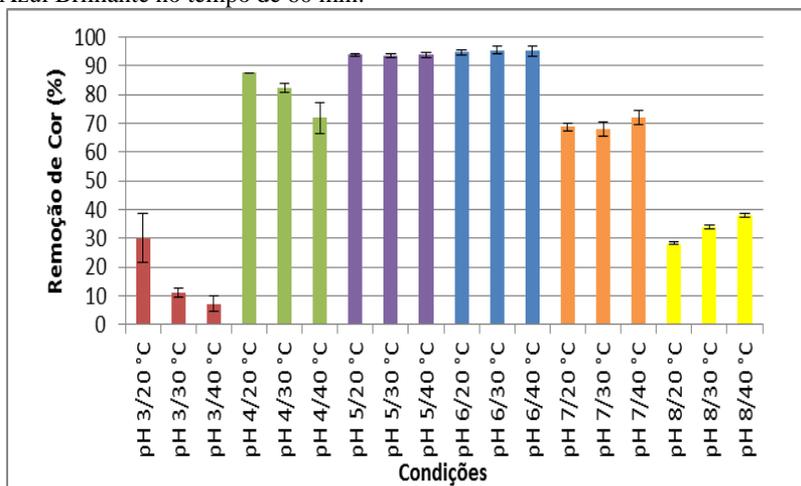


Figura 24. Influência da temperatura e do pH na remoção de cor do corante Azul Brillante no tempo de 60 min.



A cinética de remoção de cor deste corante é fortemente influenciada pelo pH do meio. Para o fator temperatura, não é possível estabelecer um padrão de influência, já que apresentou influência no rendimento das reações em apenas alguns pHs. Dependendo do pH do

meio de reação, o aumento de temperatura irá influenciar positiva ou negativamente, ou não provocará alteração no rendimento da reação. Em pH 5, independe da temperatura utilizada, foram obtidas remoções de cor superiores a 90% em 10 min de reação. Ao utilizar pH 6, foram alcançadas remoções de cor superiores a 90% somente a partir de 30 min. Para os pHs 3 e 4, o aumento de temperatura ocasionou a diminuição da remoção de cor; em pH 8, o aumento de temperatura ocasionou um aumento na eficiência de remoção de cor, e nos pHs, 5 e 6, que obtiveram as maiores remoções de cor, a temperatura não influenciou a remoção de cor final das soluções.

Com base nestes resultados, e nos resultados dos experimentos anteriores, foram escolhidas como melhores condições para as reações de remoção de cor do corante Azul Brilhante a 50 mg/L: 10,5 U/mL de enzima,  $1 \times 10^{-4}$  mM de peróxido de hidrogênio, pH 5 ou 6 e temperatura de 20 ou 30 °C. Para fins de padronização, utilizou-se a temperatura de 30 °C e o pH 6 foi escolhido por estar mais perto da neutralidade. Nestas condições, alcançou-se uma remoção de cor maior que 90% aos 30 min de reação, e de cerca de 96% após 60 min.

Outros estudos já abordaram a descoloração do corante Azul Brilhante pela HRP. Silva *et al.*, (2010) obtiveram 58% de descoloração e Silva *et al.* (2012) alcançaram cerca de 66% de remoção de cor deste corante. Ambos os estudos foram realizados com soluções deste corante a 50 mg/L e com a HRP extraída de nabo (*Brassica campestris ssp. rapifera*).

### **5.1.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Azul Brilhante Remazol**

Para estudar a influência da relação concentração de peróxido de hidrogênio:concentração de corante sobre as condições da reação foram variadas a concentração do corante para 25 e 100 mg/L. Para cada concentração foram realizados dois experimentos, um utilizando a mesma quantidade de peróxido de hidrogênio da solução ótima,  $1 \times 10^{-4}$  mM, e o segundo usando a mesma proporção concentração de corante/concentração de peróxido utilizado na solução ótima. Nas Figuras 25 e 26 estão representados os resultados obtidos. As demais condições da reação foram as definidas como as melhores condições para remoção do corante Azul Brilhante.

Figura 25. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Azul Brilhante variando a concentração de peróxido de hidrogênio.

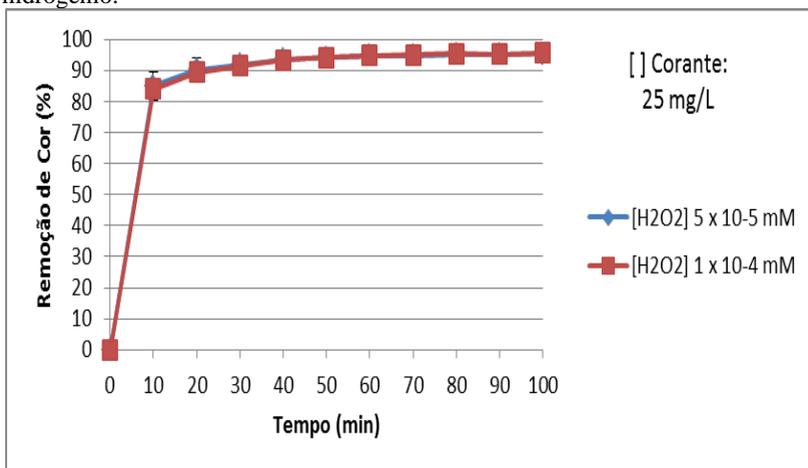
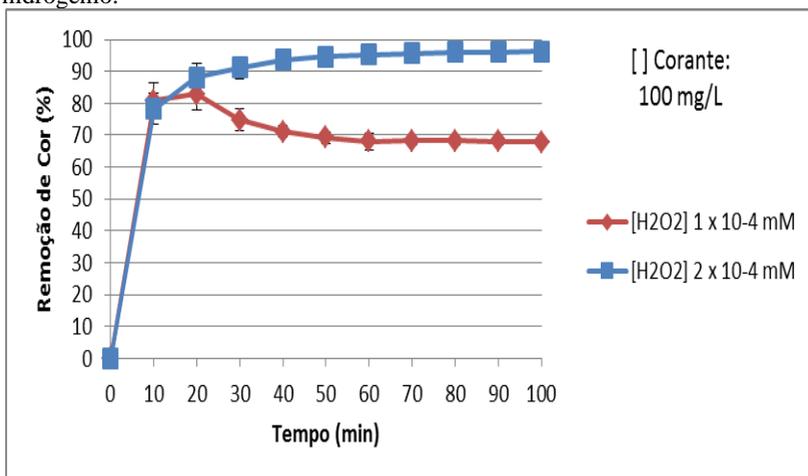


Figura 26. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Azul Brilhante variando a concentração de peróxido de hidrogênio.



Nas soluções com concentração de corante de 25 mg/L, ambas as concentrações de peróxido de hidrogênio testadas produziram remoções de cor estatisticamente iguais em todos os tempos estudados,

por este motivo não é possível observar no gráfico os pontos referentes a concentração de peróxido de hidrogênio de  $5 \times 10^{-5}$  mM. Para as soluções com concentração de corante de 100 mg/L a baixa concentração de peróxido de hidrogênio,  $1 \times 10^{-4}$  mM, foi incapaz de produzir alta descoloração.

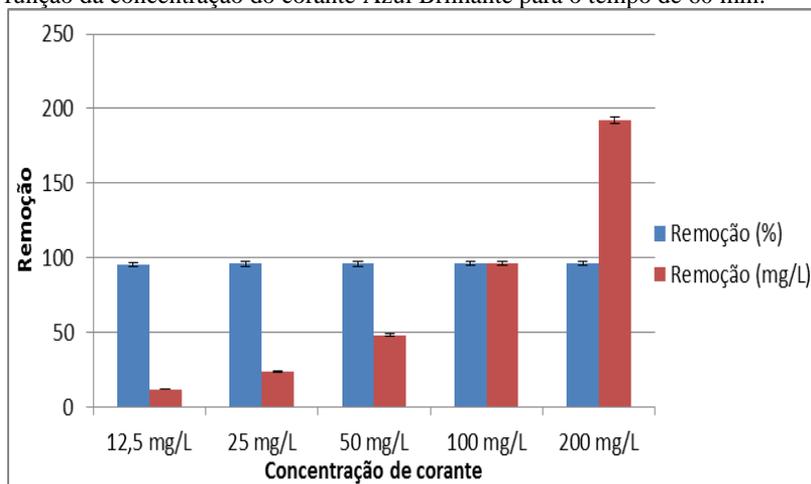
A concentração de peróxido de hidrogênio requerida para ter um alto rendimento de reação de descoloração do corante Azul Brillante mostrou-se ser dependente da concentração de corante utilizada. Desta forma, para obter altos rendimentos de descoloração pode-se usar,  $5 \times 10^{-5}$  mM de peróxido de hidrogênio para descolorir soluções de concentração de corante de 25 mg/L e  $2 \times 10^{-4}$  mM de peróxido de hidrogênio se a concentração de corante for de 100 mg/L, o que indica uma relação peróxido de hidrogênio (mM)/Concentração de corante (g) igual a 0,002 mM/g de corante azul brilhante.

### **5.1.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Azul Brillante Remazol**

A concentração do substrato presente na reação afeta diretamente as reações mediadas por enzimas. Se o valor de concentração de enzima é mantido constante e a concentração do substrato é aumentada gradualmente, a velocidade da reação deverá aumentar e atingir o valor máximo. Uma vez que a saturação é atingida (velocidade máxima da enzima,  $V_{max}$ ), qualquer outra adição de substrato não irá aumentar a velocidade de reação (KALSOOM *et al.*, 2013).

Os resultados do estudo da influência da concentração do corante Azul Brillante na eficiência da remoção de cor são apresentados na Figura 27. Cada uma destas concentrações foi avaliada utilizando a quantidade de enzima, pH e temperatura definidas como melhores condições nos experimentos anteriores, e quantidade de peróxido de hidrogênio proporcional (concentração de corante: concentração de peróxido de hidrogênio) a quantidade considerada ótima para as soluções a 50 mg/L.

Figura 27. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Azul Brillhante para o tempo de 60 min.



De acordo com Rauf e Ashraf (2012), geralmente, concentrações mais elevadas de corantes afetam adversamente os processos de descoloração à base de enzimas puras, e podem afetar negativamente o crescimento microbiano e diminuir a eficiência dos processos de degradação de corantes à base de microorganismos. Este efeito de inibição não foi encontrado nestes experimentos. A remoção de cor em porcentagem foi estatisticamente igual em todas as concentrações de corantes estudadas. Para as concentrações de 12,5 a 200 mg/L, quanto maior a concentração de corante utilizada maior a quantidade de corante removido (mg/L).

A relação entre a concentração de corante e a quantidade de corante removido (mg/L), nas condições usadas no estudo, pode ser representada por uma função linear, onde a concentração de corante removido é diretamente proporcional a concentração de corante na amostra, com equação:  $y = 0,971x + 0,0483$  (Equação 12)  $R^2 = 1$  (gráfico apresentado no Apêndice C).

## 5.2 Estudos de Remoção de Cor do Corante Azul Turqueza

### 5.2.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção do Corante – Azul Turqueza

Na Tabela 13, são mostrados todos os ensaios conforme a matriz do planejamento fatorial e os respectivos valores de velocidade inicial (em 10 min) e porcentagem de remoção de cor para o corante Azul Turqueza.

Tabela 13. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Azul Turqueza remazol em função das condições de reação.

<b>Experimento</b>	<b>[E]</b>	<b>[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]</b>	<b>pH</b>	<b>T</b>	<b>Velocidade inicial (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Remoção de cor (%)</b>
1	-1	-1	-1	-1	0,05849	55,78
2	1	-1	-1	-1	0,07546	84,19
3	-1	1	-1	-1	0,05697	58,05
4	1	1	-1	-1	0,07515	83,13
5	-1	-1	1	-1	0,03546	20,06
6	1	-1	1	-1	0,04682	51,22
7	-1	1	1	-1	0,03485	15,05
8	1	1	1	-1	0,04591	48,48
9	-1	-1	-1	1	0,05621	9,57
10	1	-1	-1	1	0,07652	86,47
11	-1	1	-1	1	0,05591	7,14
12	1	1	-1	1	0,07424	85,87
13	-1	-1	1	1	0,03773	27,96
14	1	-1	1	1	0,05000	50,91
15	-1	1	1	1	0,03561	16,87
16	1	1	1	1	0,04682	60,33
17	0	0	0	0	0,06061	70,45
18	0	0	0	0	0,06091	68,24
19	0	0	0	0	0,06121	65,93

Os Gráficos de Pareto, nas Figuras 28 e 29, respectivamente, mostram os efeitos das variáveis experimentais para as respostas: velocidade inicial e remoção de cor (%).

Figura 28. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante Azul Turqueza utilizando como resposta a velocidade inicial.

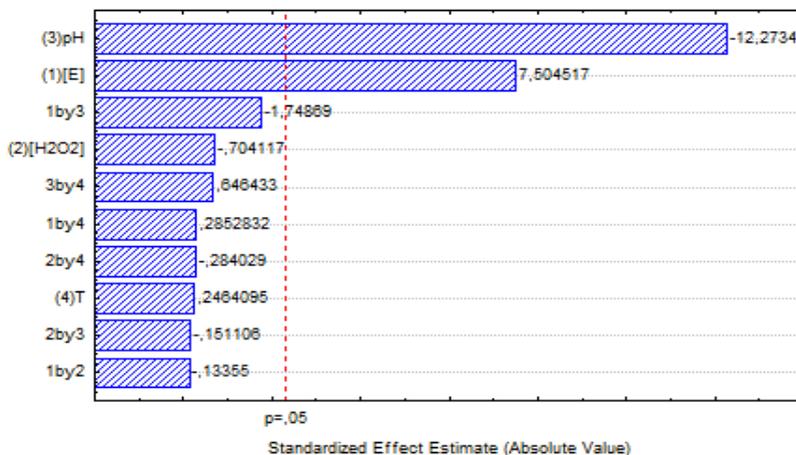
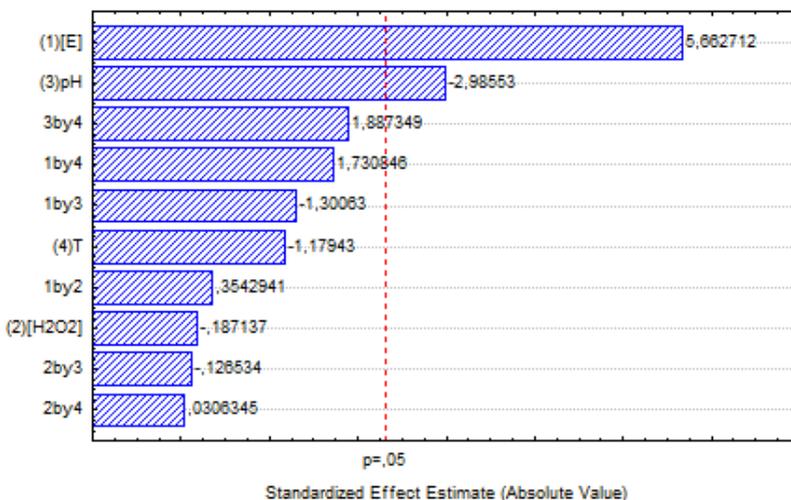


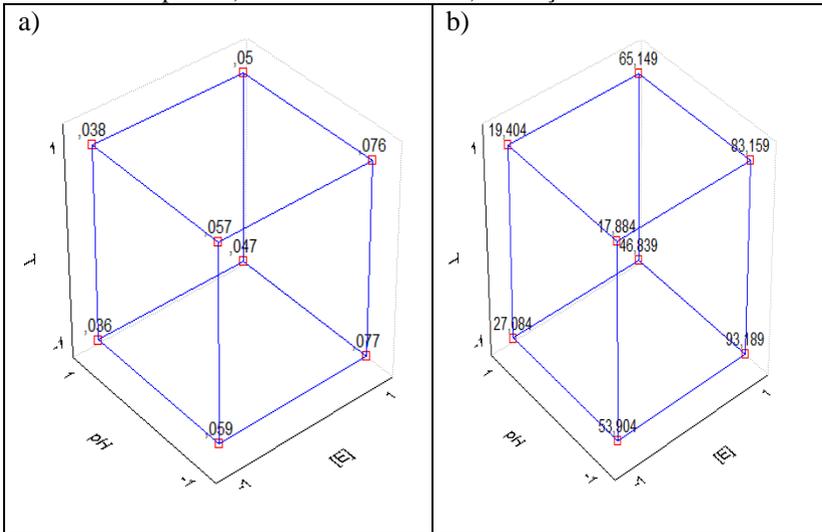
Figura 29. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante Azul Turqueza utilizando como resposta à remoção de cor (%).



Para o corante Azul Turqueza, a variável que mais influenciou a velocidade inicial de remoção de cor foi o pH e, em seguida, a concentração de enzima. Já para a variável resposta remoção de cor em 60 min, a variável de maior influência foi a concentração de enzima, seguida pelo pH. Em ambas as variáveis respostas analisadas, a concentração de enzima e o pH apresentaram efeitos significativos, sendo que, a concentração de enzima apresentou efeito positivo e o pH efeito negativo. Desta forma, para os demais testes utilizando o corante Azul Turqueza, o pH utilizado foi 4 e a temperatura escolhida, por não apresentar influência significativa, foi de 25 °C.

A análise dos valores das respostas é facilitada usando o diagrama do planejamento fatorial da Figura 30.

Figura 30. Diagrama do planejamento fatorial  $2^4$  do corante Azul Turqueza para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.



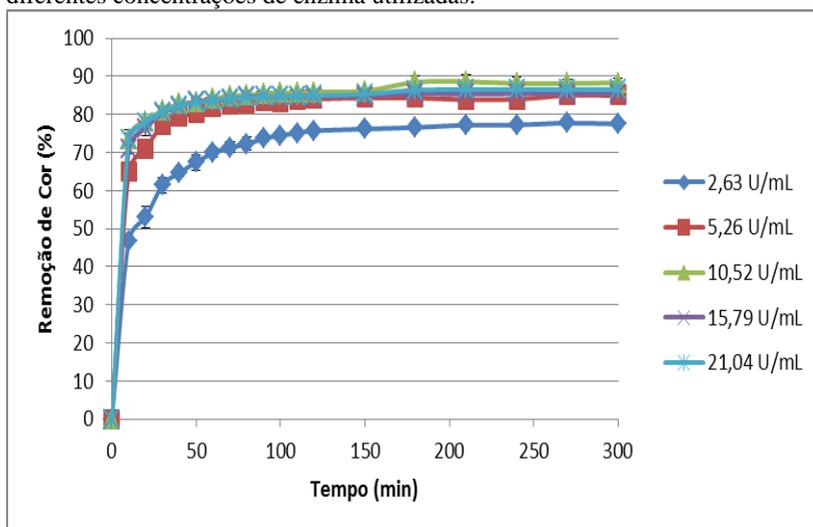
Para análise do diagrama foram utilizados somente os três efeitos de maior significância, descartando, portanto, a concentração de peróxido de hidrogênio. Da mesma forma que ocorreu com o corante Azul Brillante, os maiores resultados de velocidade inicial e de remoção de cor ficaram próximos a maior concentração de enzima e ao menor pH.

## 5.2.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Azul Turqueza Remazol

A influência da concentração de enzima foi avaliada em cinco níveis, mantendo constantes os outros fatores que, possivelmente, afetam o processo (pH 4, temperatura de 25 °C e concentração de peróxido de hidrogênio de  $2 \times 10^{-4}$  mM), os resultados estão expressos na Figura 31.

Devido ao pH ter apresentado uma significativa influência nas reações de remoção de cor do corante Azul Turqueza, este parâmetro foi fixado em 4 para este experimento. A temperatura não se mostrou um fator de grande influência no planejamento inicial, desta forma, utilizou-se a temperatura de 25 °C.

Figura 31. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.



Com a concentração de enzima 2,63 U/mL foi obtida uma remoção de cor de 77,5% ( $\pm 0,71$ ), as demais concentrações ficaram entre 85-89 % ao final da reação (300 min). A cinética de remoção de cor para os tratamentos com 10,52 U/mL, 15,79 U/mL e 21,04 U/mL foram bastante semelhantes em todos os tempos analisados, sendo que uma remoção de cor maior que 80% foi obtida após 30 min para estes tratamentos. Para o tratamento 5,26 U/mL remoção de cor desta magnitude foi obtida só em 50 min.

Da mesma forma com o que ocorreu com o corante Azul Brillhante, no estudo posterior (estudo da influência da concentração de peróxido de hidrogênio – Corante Azul Turqueza), foram utilizadas as concentrações de enzima de 5,26, 10,52, 15,79 U/mL. A concentração de 2,63 U/mL não foi utilizada por apresentar cinética de reação muito lenta, e a concentração de 21,04 U/mL por apresentar cinética de reação semelhante às soluções com 15,79 U/mL.

### 5.2.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Azul Turqueza

Nas Figuras 32, 33 e 34, estão apresentados os resultados do estudo da influência da concentração de peróxido de hidrogênio.

Figura 32. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para concentração de enzima de 5,26 U/mL.

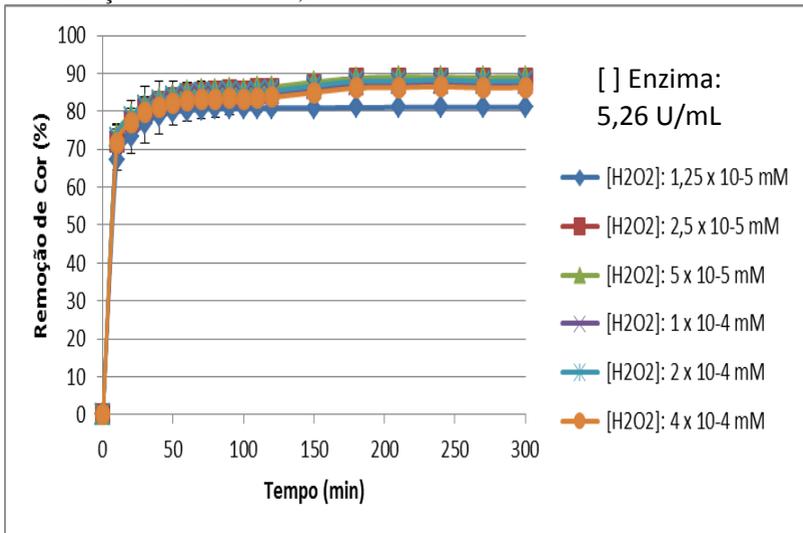


Figura 33. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para concentração de enzima de 10,52 U/mL.

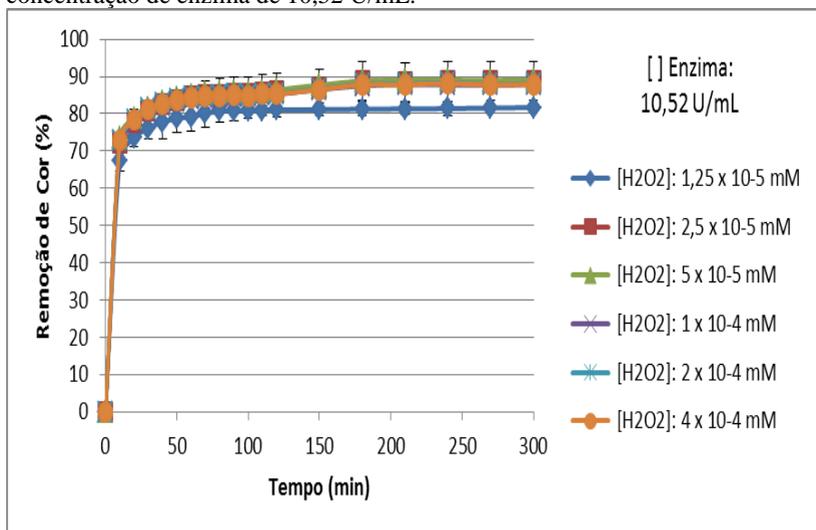
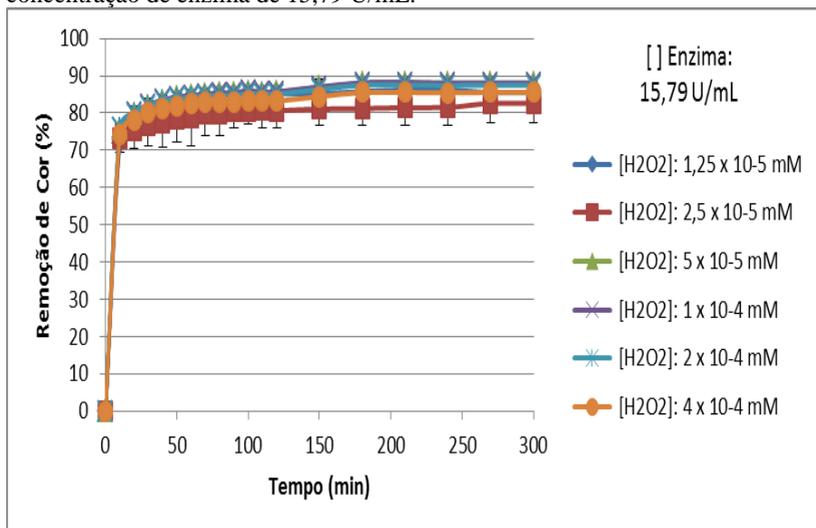


Figura 34. Gráfico de remoção de cor do corante Azul Turqueza por tempo para concentração de enzima de 15,79 U/mL.



Souza *et al.* (2007) observaram a inibição da atividade da enzima peroxidase em concentrações de peróxido de hidrogênio acima de  $2 \times 10^{-3}$  mmol/L, na descoloração de soluções a 100 mg/L do corante têxtil Azul Turqueza Remazol G 133% pela enzima HRP. No presente estudo, não foi verificado o efeito inibidor de altas concentrações do peróxido de hidrogênio, mas foi possível chegar aos valores limites em que aumentos na concentração deste reagente não resultam em melhores resultados.

Foi escolhido, como melhor tratamento, a reação com as seguintes condições: 5,26 U/mL de enzima e  $2,55 \times 10^{-5}$  mmol/L de peróxido de hidrogênio, pois com estas condições foi possível obter descolorações acima de 80% em 60 min utilizando pequenas quantidades de enzima e de peróxido de hidrogênio. No estudo da influência do pH e da temperatura nas reações de descoloração foram utilizadas estas condições.

#### 5.2.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Azul Turqueza Remazol

Os resultados do estudo da influência do pH e da temperatura para o corante Azul Turqueza estão apresentados nas Figuras 35 a 38. Foram utilizadas as condições: 5,26 U/mL de enzima e  $2,55 \times 10^{-5}$  mmol/L de peróxido de hidrogênio.

Figura 35. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Turqueza à temperatura de 20 °C.

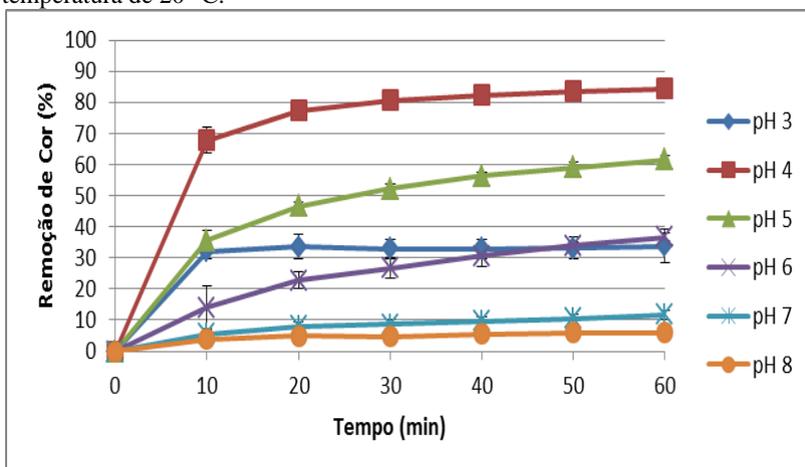


Figura 36. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Turqueza à temperatura de 30 °C.

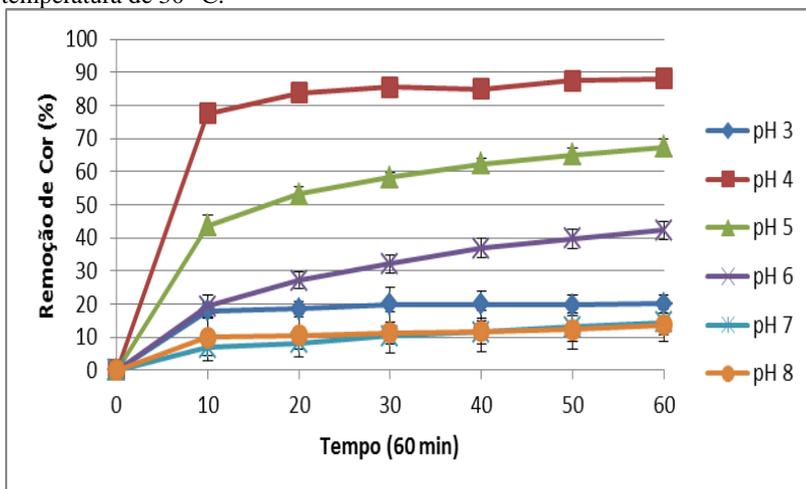


Figura 37. Influência do pH na remoção de cor do corante Azul Turqueza à temperatura de 40 °C.

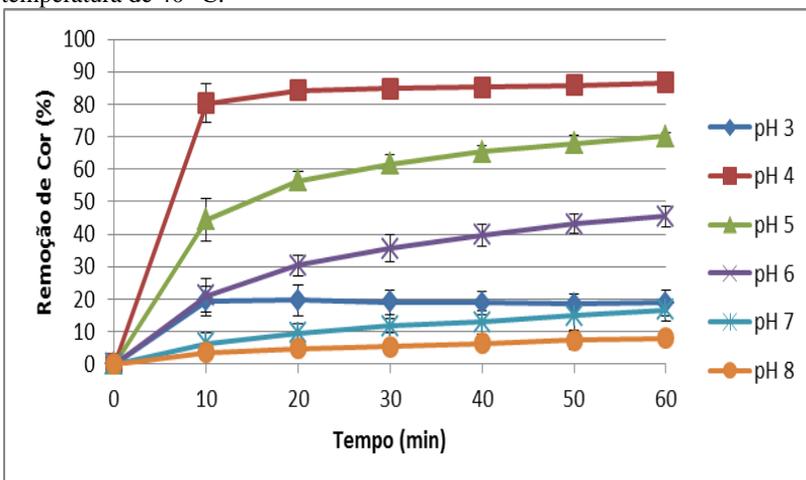
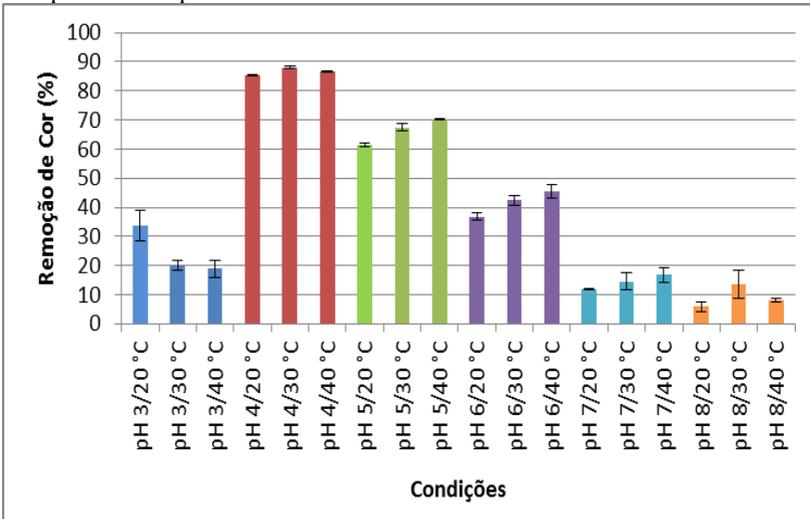


Figura 38. Influência da temperatura e pH na remoção de cor do corante Azul Turquesa no tempo de 60 min.



De forma similar ao que ocorreu com o corante Azul Brillante, a cinética de remoção de cor do corante Azul Turquesa é fortemente influenciada pelo pH do meio. Entretanto, a temperatura da reação apresentou influência no rendimento das reações em apenas alguns pHs. Quando utilizados os pHs 4 e 7, as remoções de cor em 60 min não foram influenciadas significativamente pela temperatura. Em pH 3, os melhores resultados foram obtidos a 20 °C, em pH 5 a 40 °C, em pH 6 a 30 e 40 °C (significativamente iguais) e em pH 8 a 30 °C.

As melhores remoções de cor foram obtidas com pH 4, independente da temperatura utilizada. As remoções de cor em pH 4 no tempo de 60 min para as temperaturas 20, 30 e 40 °C foram, respectivamente 85,43 ( $\pm 1,28$ ), 88,01 ( $\pm 0,43$ ), 86,59 ( $\pm 2,32$ ), sendo estes resultados estatisticamente iguais entre si (teste Tukey,  $\alpha$ : 0,05). Portanto, foram eleitos como melhores condições de reação os valores de 5,26 U/mL de enzima,  $2,55 \times 10^{-5}$  mmol/L de peróxido de hidrogênio, pH 4 e, por fim de padronização, temperatura de 30 °C.

Silva *et al.* (2012) conseguiram uma descoloração de cerca de 60% ( $\pm 2,6$ ) de soluções do corante Azul Turquesa a 50 mg/L com a enzima HRP em 60 min, utilizando concentração de enzima de 20,3 U/mL, pH 7 e temperatura de 30 °C. Souza *et al.* (2007) obtiveram 59% de descoloração do mesmo corante em 45 min (utilizando como condições reacionais; pH 4, concentração de corante 100 mg/L,

concentração de enzima 29,85 U/mL e concentração de peróxido de hidrogênio de  $2 \times 10^{-3}$  mmol/L). No trabalho de Farias (2013), que utilizou a enzima HRP na descoloração de soluções do corante Azul Turqueza a 30 mg/L, foi obtida uma descoloração de 79% em 1 hora de reação utilizando concentração de enzima 29,85 U/mL, concentração de peróxido de hidrogênio 100  $\mu$ M, pH 4 e temperatura de 20 °C.

### 5.2.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Azul Turqueza Remazol

Nas Figuras 39 e 40 estão apresentados os resultados de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L e 100 mg/L do corante Azul Turqueza.

Figura 39. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Azul Turqueza variando a concentração de peróxido de hidrogênio.

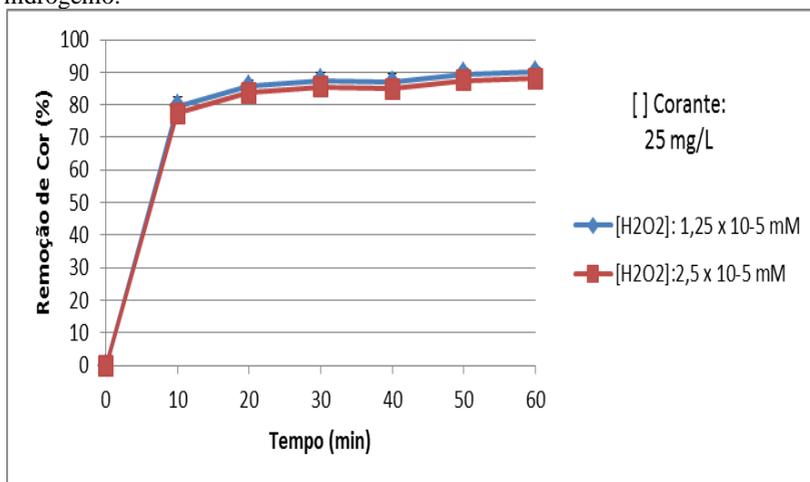
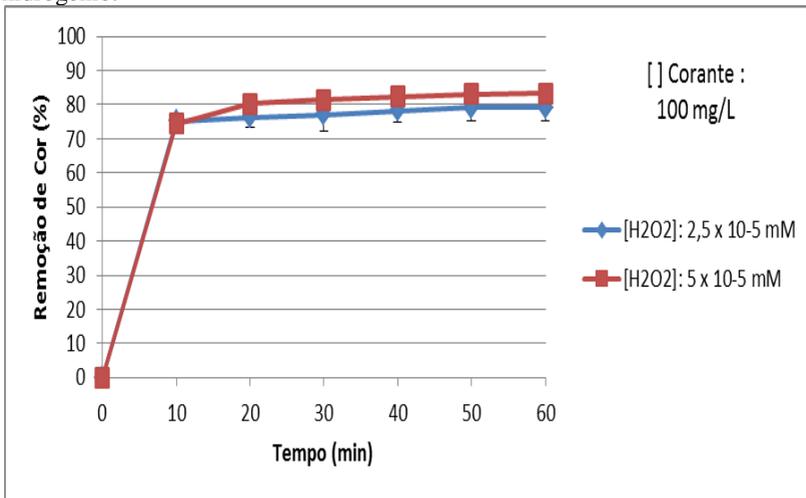


Figura 40. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Azul Turquesa variando a concentração de peróxido de hidrogênio.

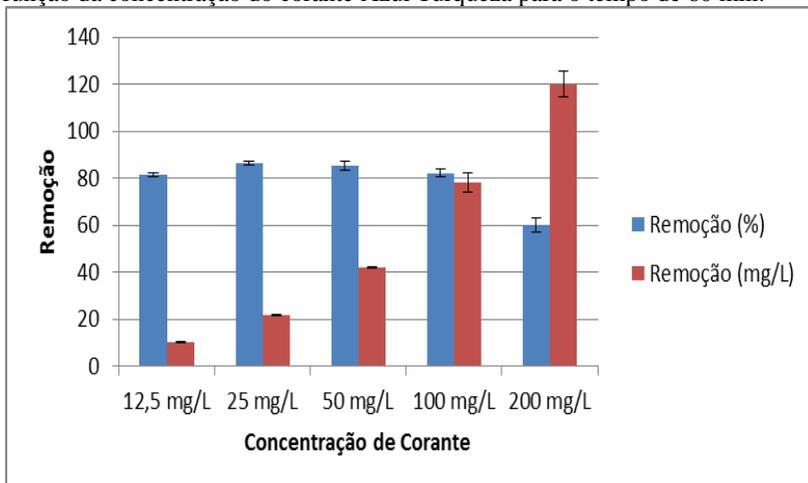


Nas concentrações estudadas, 25 e 100 mg/L, as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, ao contrário do que ocorreu com o corante Azul Brillhante, não produziram respostas de remoção de cor significativamente diferentes. Para o estudo posterior, optou-se por utilizar concentrações proporcionais de peróxido de hidrogênio em relação a concentrações de corante, mesmo não havendo evidências da necessidade, apenas para assegurar que a concentração de peróxido de hidrogênio não seja o limitante da reação.

### 5.2.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Azul Turquesa Remazol

Os resultados do estudo da influência da concentração do corante Azul Turquesa na eficiência da remoção de cor são apresentados na Figura 41.

Figura 41. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Azul Turqueza para o tempo de 60 min.



As melhores remoções de cor foram obtidas com as concentrações de corante de 25 e 50 mg/L, sendo que as concentrações de corante entre 12,5 mg/L e 100 mg/L produziram remoções de cor significativamente iguais das soluções com concentração de corante de 50 mg/L.

Ao realizar a reação enzimática com 200 mg/L do corante Azul Turqueza, não foi possível obter altos valores de remoção de cor, em porcentagem, no tempo de 60 min, entretanto a enzima mostrou-se bastante eficiente na remoção do corante (em mg/L).

A relação entre a concentração de corante Azul Turqueza e a quantidade de corante removido (mg/L), nas condições usadas no estudo, assim como o comportamento observado com o corante Azul Brilhante pode ser representada por uma função linear. A equação que representa a relação entre a concentração de corante Azul Turqueza e a quantidade de corante removido (mg/L) é:  $y = 0,5582x + 9,7212$  (Equação 14) com  $R^2 = 0,9712$  (gráfico apresentado no Anexo C).

### 5.3 Estudos de Remoção de Cor do Corante Preto Remazol

#### 5.3.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção do Corante – Preto Remazol

Na Tabela 14, são mostrados todos os ensaios conforme a matriz do planejamento fatorial e os respectivos valores de velocidade inicial (em 10 min) e porcentagem de remoção de cor para o corante Preto Remazol.

Tabela 14. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Preto Remazol em função das condições de reação.

Experimento	[E]	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]	pH	T	Velocidade	Remoção de cor
					inicial (min <sup>-1</sup> )	(%)
1	-1	-1	-1	-1	0,0204	10,20
2	1	-1	-1	-1	0,0953	51,50
3	-1	1	-1	-1	0,0272	11,43
4	1	1	-1	-1	0,1225	75,15
5	-1	-1	1	-1	0,0034	1,22
6	1	-1	1	-1	0,0136	7,69
7	-1	1	1	-1	0,0050	1,16
8	1	1	1	-1	0,0122	6,33
9	-1	-1	-1	1	0,0340	13,82
10	1	-1	-1	1	0,1702	72,00
11	-1	1	-1	1	0,0354	13,27
12	1	1	-1	1	0,1769	77,70
13	-1	-1	1	1	0,0231	6,36
14	1	-1	1	1	0,0497	16,73
15	-1	1	1	1	0,0088	2,30
16	1	1	1	1	0,0272	7,21
17	0	0	0	0	0,0361	19,67
18	0	0	0	0	0,0279	18,56
19	0	0	0	0	0,0340	16,14

As remoções de cor alcançadas no planejamento inicial com o corante Preto Remazol ficaram abaixo das remoções obtidas com os corantes Azul Brilhante e Azul Turqueza, sugerindo, portanto, que a degradação deste corante pela enzima peroxidase seja mais difícil, ou, exija condições não abordadas no planejamento inicial.

Os Gráficos de Pareto, nas Figuras 42 e 43 mostram os efeitos das variáveis experimentais para as respostas: velocidade inicial e remoção de cor (%), respectivamente

Figura 42. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante Preto Remazol utilizando como resposta a velocidade inicial.

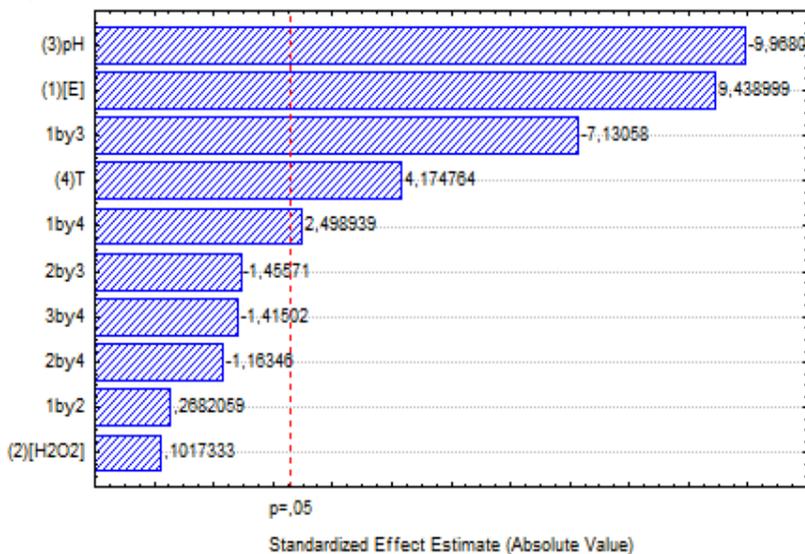
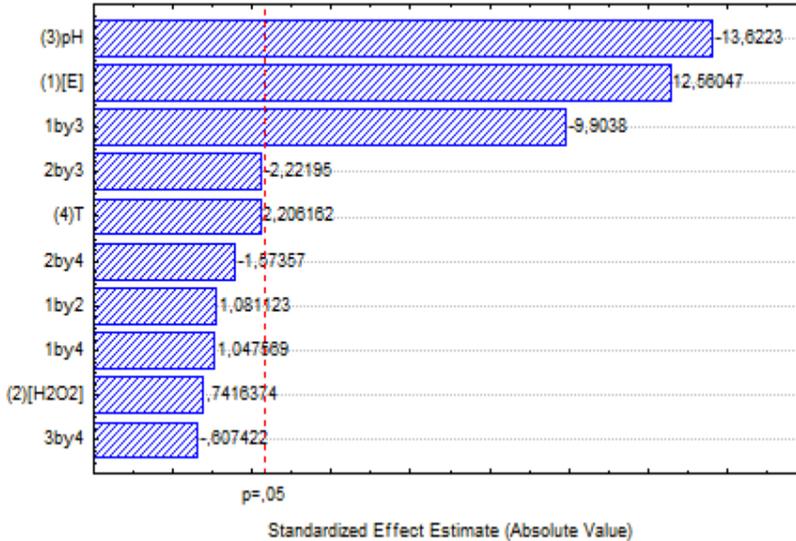


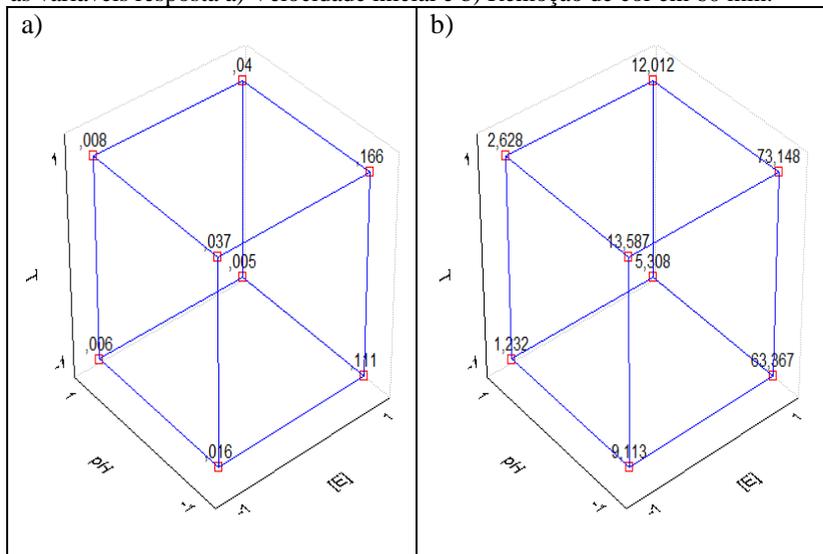
Figura 43. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante Preto Remazol utilizando como resposta a remoção de cor (%).



As variáveis que mais influenciaram as reações foram o pH, que apresentou efeito negativo, a concentração de enzima, efeito positivo, e a interação entre as variáveis concentração de enzima e pH. Para a resposta velocidade inicial de remoção de cor a temperatura apresentou efeito positivo.

A análise dos valores das respostas é facilitada usando o diagrama do planejamento fatorial da Figura 44.

Figura 44. Diagrama do planejamento fatorial  $2^4$  do corante Preto Remazol para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.



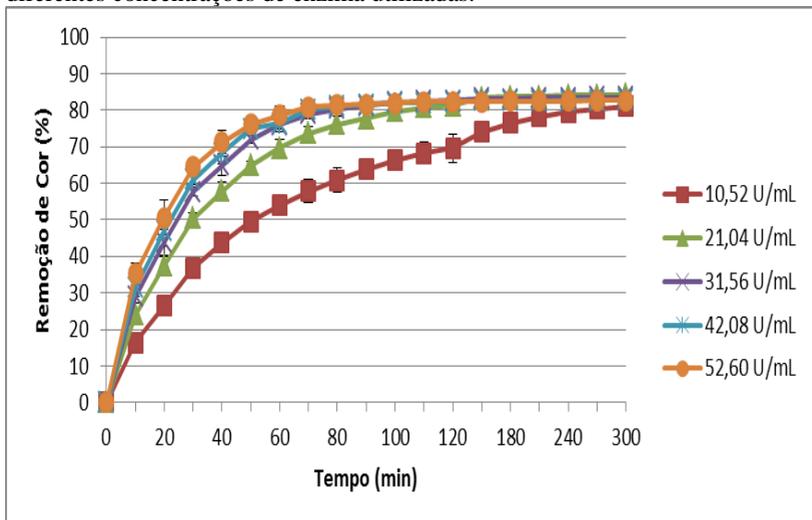
O mesmo comportamento observado com o corantes Azul Turquesa foi observado com o corante Preto Remazol, os maiores resultados de velocidade inicial e de remoção de cor ficaram próximos a maior concentração de enzima e ao menor pH.

### 5.3.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Preto Remazol

A influência da concentração de enzima foi avaliada em cinco níveis, mantendo os outros fatores que afetam o processo constantes (pH 4, temperatura de 25 °C e concentração de peróxido de hidrogênio de  $2 \times 10^{-4}$  mM), os resultados estão na Figura 45.

De forma semelhante ao ocorrido com o corante Azul Turquesa, foi fixado o pH em 4 para este experimento, devido a este valor de pH ter apresentado melhores resultados de remoção de cor do corante Preto Remazol. A temperatura não se mostrou um fator de grande influência no planejamento inicial, desta forma, utilizou-se a temperatura de 25 °C.

Figura 45. Gráfico de remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.



A menor quantidade de enzima utilizada produziu os menores índices de remoção de cor, em todos os tempos analisados. As concentrações iguais ou acima de 31,56 U/mL produziram remoções de cor significativamente iguais a partir de 60 min, enquanto a concentração de 21,04 U/mL igualou este grupo somente após 100 min.

Para os estudos posteriores utilizaram-se as concentrações de enzima de 21,04, 31,56 e 42,08 U/mL. A concentração de enzima 10,52 U/mL não foi utilizada por apresentar cinética de descoloração muito lenta e a concentração de enzima de 52,60 U/mL por apresentar cinética semelhante à concentração 42,08 U/mL.

### 5.3.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Preto Remazol

Nas Figuras 46, 47 e 48 estão apresentados os resultados do estudo da influência da concentração de peróxido de hidrogênio nas reações de remoção da cor do corante Preto Remazol, com diferentes concentrações de enzima.

Figura 46. Gráfico de remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para concentração de enzima de 21,04 U/mL.

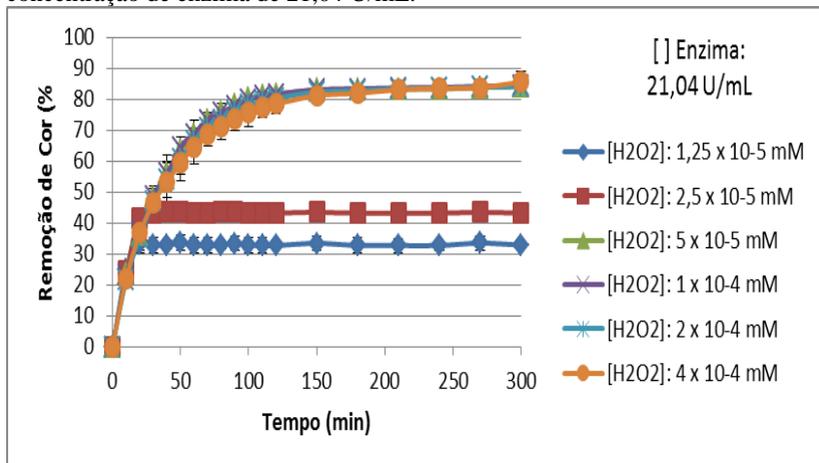


Figura 47. Gráfico de remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para concentração de enzima de 31,56 U/mL.

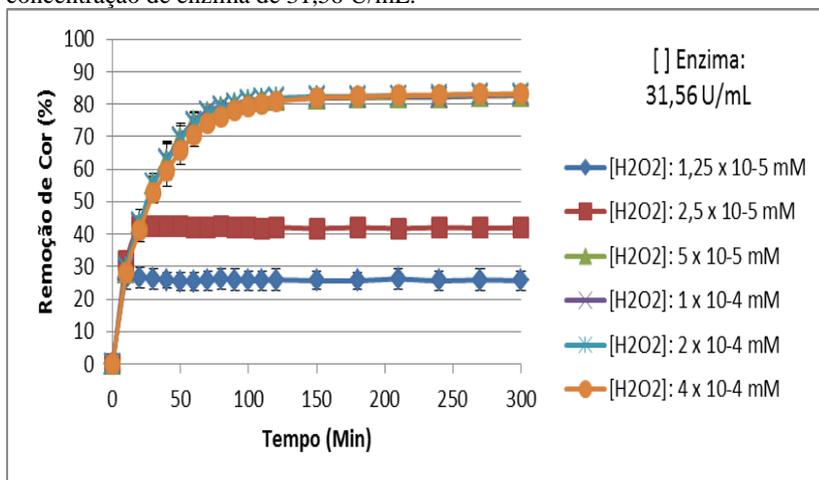
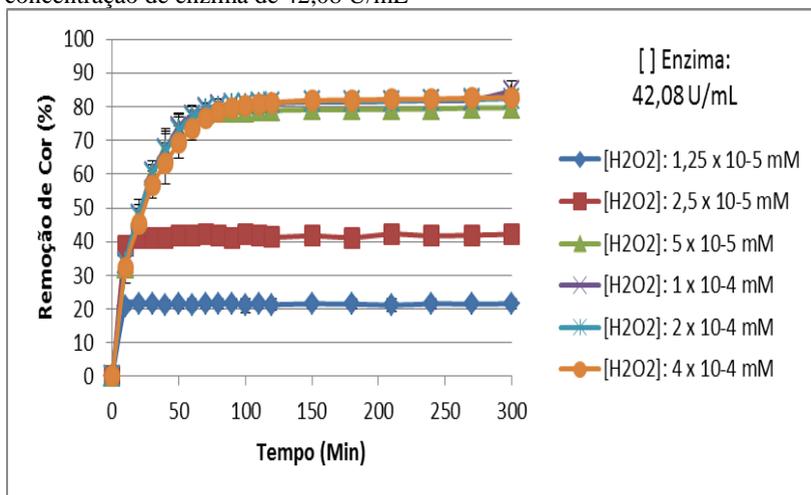


Figura 48. Gráfico remoção de cor do corante Preto Remazol por tempo para concentração de enzima de 42,08 U/mL



Em todas as concentrações de enzima estudadas as concentrações de peróxido de hidrogênio de  $1,25 \times 10^{-5}$  mM e  $2,5 \times 10^{-5}$  mM não foram suficientes para obter altas remoções de cor. Para as concentrações de enzima entre 21,04 e 42,08 U/mL, a utilização de concentrações de peróxido de hidrogênio entre  $5 \times 10^{-5}$  mM e  $4 \times 10^{-4}$  mM não alteraram a cinética de remoção de cor.

Com a utilização de 21,04 U/mL obteve-se remoções de cor entre 64 e 68%, já com a utilização de 31,56 U/mL as remoções de cor alcançadas foram de 70 a 74%. A utilização de 42,08 U/mL não apresentou remoções de cor significativamente superior as obtidas com 31,56 U/mL de enzima, para este corante nos tempos estudados.

As condições escolhidas para a realização dos próximos ensaios foram concentração de enzima 31,56 U/mL e concentração de peróxido de hidrogênio de  $5 \times 10^{-5}$  mM.

Da mesma forma com o ocorrido com o corante Azul Turquesa, no presente estudo não foi verificado o efeito inibidor de altas concentrações do peróxido de hidrogênio, mas foi possível chegar aos valores limites em que aumentos na concentração deste reagente não resultam em melhores resultados.

### 5.3.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Preto Remazol

Nas Figuras, 49, 50 e 51 estão apresentados os resultados dos estudos da influência do pH e da temperatura nas reações de remoção de cor do corante Preto Remazol. Na Figura 52 estão apresentados os resultados de remoção de cor em 60 min.

Figura 49. Influência do pH na remoção de cor do corante Preto Remazol em pH à temperatura de 20 °C.

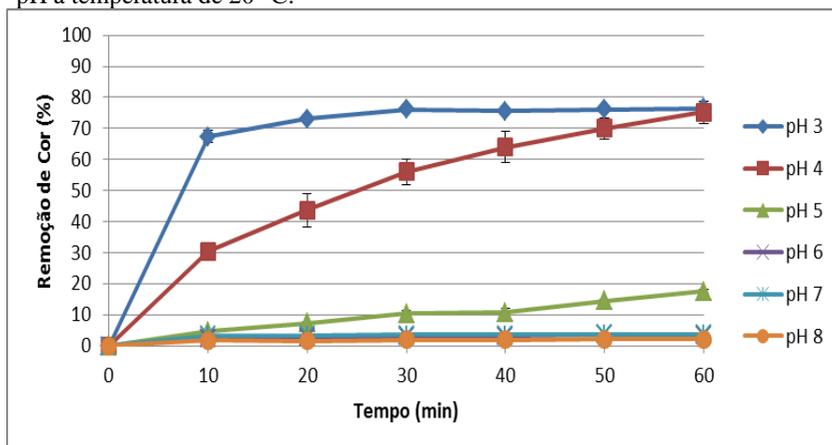


Figura 50. Influência do pH na remoção de cor do corante Preto Remazol em pH à temperatura de 30 °C.

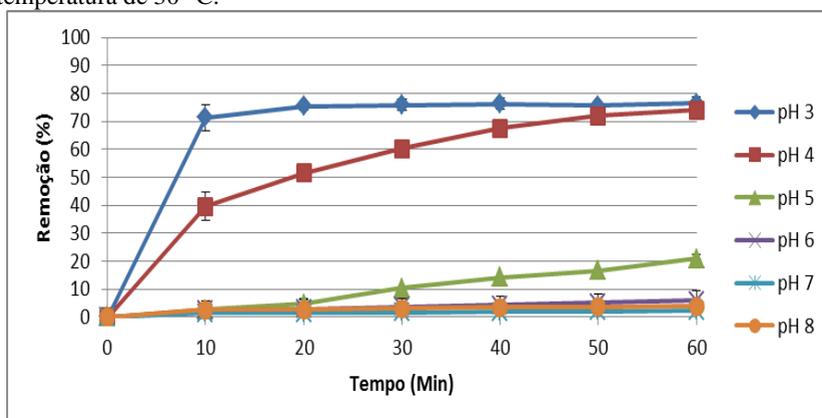


Figura 51. Influência do Ph na remoção de cor do corante Preto Remazol em pH à temperatura de 40 °C.

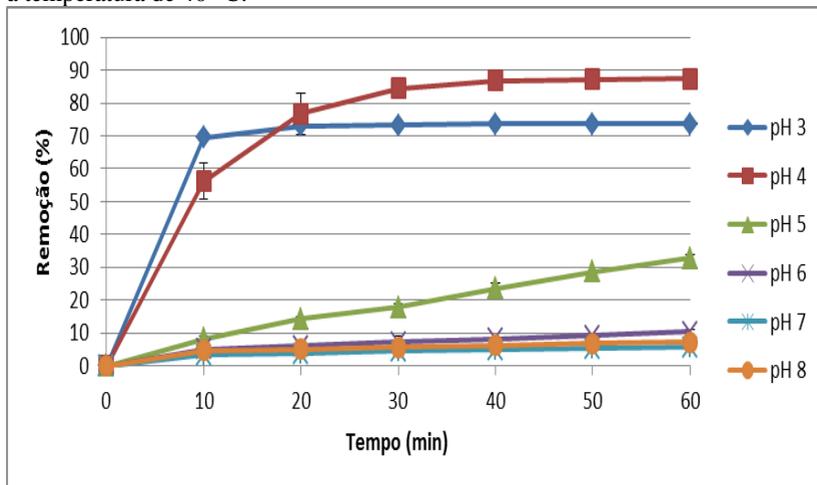
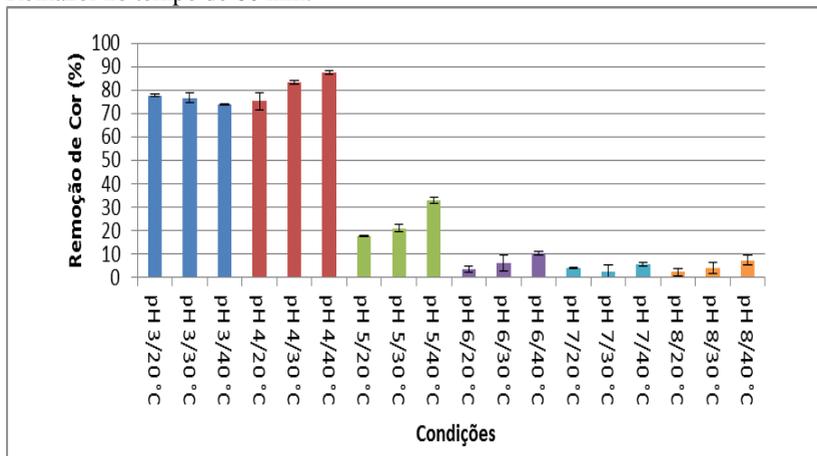


Figura 52. Influência da temperatura e pH na remoção de cor do corante Preto Remazol no tempo de 60 min.



A cinética de remoção de cor do corante Preto Remazol, assim como dos corantes Azul Brilhante e Azul Turquesa, é fortemente influenciada pelo pH do meio. Para o fator temperatura, não é possível estabelecer um padrão de influência, já que ela apresentou influência no rendimento das reações em apenas alguns pHs.

A alteração na temperatura, 20, 30 e 40 °C, não alterou a cinética de remoção de cor do corante Preto Remazol para os pHs 3, 7 e 8. Entretanto, para os pHs 4, 5 e 6 a temperatura de 40 °C favoreceu as reações de remoção de cor.

A melhor condição de reação encontrada para o corante preto foi pH 4 e temperatura de 40 °C que proporcionou uma remoção de cor de cerca de 86% a partir de 30 min de reação. Portanto, estas condições foram utilizadas nos ensaios posteriores.

No trabalho de Forgiarin (2006), que avaliou o potencial da enzima HRP na descoloração do corante Preto Remazol (100 mg/L), este corante não apresentou descoloração superior a 10%. Cristóvão (2010) obteve remoção de cor de 75% para este corante ao utilizar a enzima lacase.

### 5.3.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Preto Remazol

Para a concentração de corante 25 mg/L as reações com concentração de peróxido de hidrogênio de  $2,5 \times 10^{-5}$  e  $5 \times 10^{-5}$  mM apresentaram cinéticas de remoções de cor semelhantes, conforme o apresentado nas Figura 53, entretanto, para as soluções de 100 mg/L as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio apresentaram diferentes cinéticas, como mostrado na Figura 54.

Figura 53. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Preto Remazol variando a concentração de peróxido de hidrogênio.

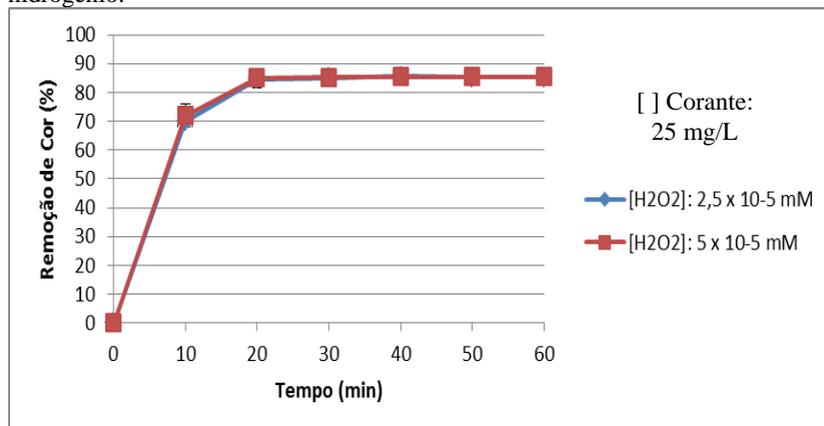
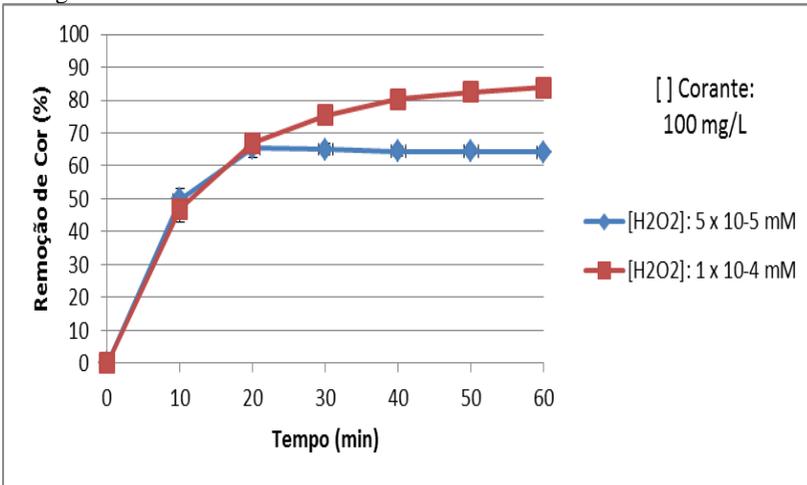


Figura 54. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Preto Remazol variando a concentração de peróxido de hidrogênio.

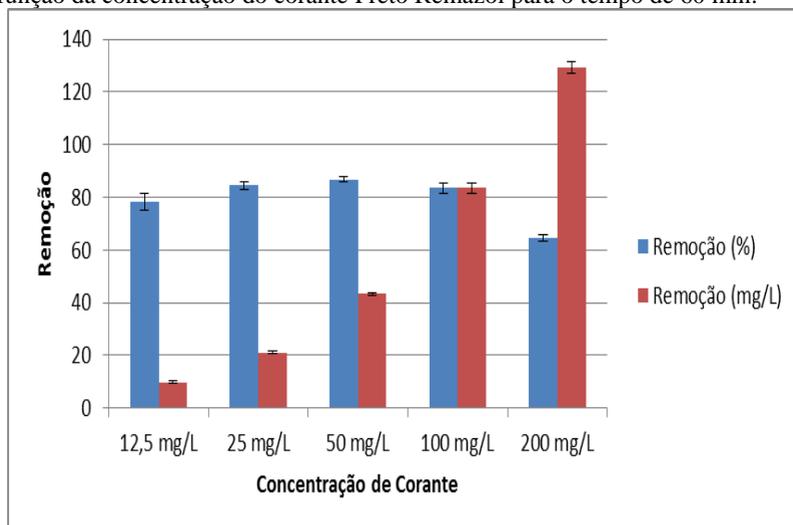


Com as soluções de concentração de corante de 100 mg/L para se obter um bom rendimento da reação foi necessário utilizar  $1 \times 10^{-4}$  mM de peróxido de hidrogênio, ao se utilizar a mesma quantidade de peróxido de hidrogênio dos estudos com soluções de corante de 50 mg/L houve inibição do progresso da reação a partir de 20 min, conforme apresentado na Figura 54. Foi observado comportamento semelhante ao do corante Azul Brillante. Ou seja, a concentração de peróxido de hidrogênio requerida para ter um alto rendimento de reação de descoloração do corante Azul Brillante é dependente da concentração de corante utilizada. Os resultados indicam que para obter altos rendimentos de cor é necessário uma relação peróxido de hidrogênio (mM)/Concentração de corante (g) igual a 0,001 mM/g de corante Preto Remazol.

### 5.3.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Preto

Os resultados do estudo da influência da concentração do corante Preto Remazol na eficiência da remoção de cor são apresentados na Figura 55.

Figura 55. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Preto Remazol para o tempo de 60 min.



Para as concentrações de corante de 12,5 a 100 mg/L, obtiveram-se rendimentos de remoção de cor na faixa de 78 a 86%. Ao se aumentar a concentração do corante para 200 mg/L houve diminuição no rendimento da reação, sendo que a remoção de cor alcançada ficou em torno de 64%. Entretanto, a 200 mg/L de corante, a quantidade de corante removida foi significativamente mais alta do que nos demais tratamentos.

A relação entre a concentração de corante e a quantidade de corante removido (mg/L), nas condições usadas no estudo, pode ser representada por uma função linear, com equação:  $y = 0,645x + 3,6664$  (Equação 16) e  $R^2 = 0,9992$  (gráfico apresentado no Apêndice A). Os demais corantes estudados, Azul Turquesa e Azul Brilhante, também apresentaram este comportamento.

## 5.4 Estudos de Remoção de Cor do Corante Vermelho CQ4BL

### 5.4.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção do Corante – Corante Vermelho CQ4BL

Na Tabela 15, são mostrados todos os ensaios conforme a matriz do planejamento fatorial e os respectivos valores de velocidade

inicial (em 10 min) e porcentagem de remoção de cor para o corante Vermelho CQ4BL.

Tabela 15. Resultados de velocidade inicial e remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL em função das condições de reação.

<b>Experimento</b>	<b>[E]</b>	<b>[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]</b>	<b>pH</b>	<b>T</b>	<b>Velocidade inicial (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Remoção de cor (%)</b>
1	-1	-1	-1	-1	0,0000	0,12
2	1	-1	-1	-1	0,0108	16,18
3	-1	1	-1	-1	0,0015	3,57
4	1	1	-1	-1	0,0097	13,99
5	-1	-1	1	-1	0,0010	2,91
6	1	-1	1	-1	0,0053	10,01
7	-1	1	1	-1	0,0008	2,14
8	1	1	1	-1	0,0014	4,36
9	-1	-1	-1	1	0,0002	0,85
10	1	-1	-1	1	0,0138	19,11
11	-1	1	-1	1	0,0013	1,93
12	1	1	-1	1	0,0101	18,62
13	-1	-1	1	1	0,0004	2,54
14	1	-1	1	1	0,0046	7,38
15	-1	1	1	1	0,0008	0,48
16	1	1	1	1	0,0042	9,07
17	0	0	0	0	0,0020	6,36
18	0	0	0	0	0,0012	2,54
19	0	0	0	0	0,0008	3,82

O corante Vermelho CQ4BL foi o que apresentou as menores remoções de cor no planejamento inicial, sendo possível obter no máximo 19,11% de remoção. Os Gráficos de Pareto, nas Figuras 56 e 57, mostram os efeitos das variáveis experimentais para as respostas: velocidade inicial e remoção de cor (%), respectivamente.

Figura 56. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante Vermelho CQ4BL utilizando como resposta a velocidade inicial.

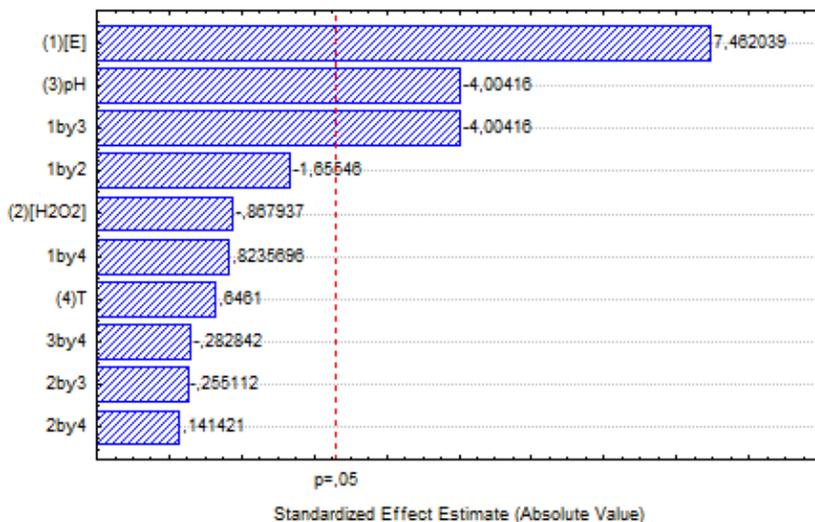
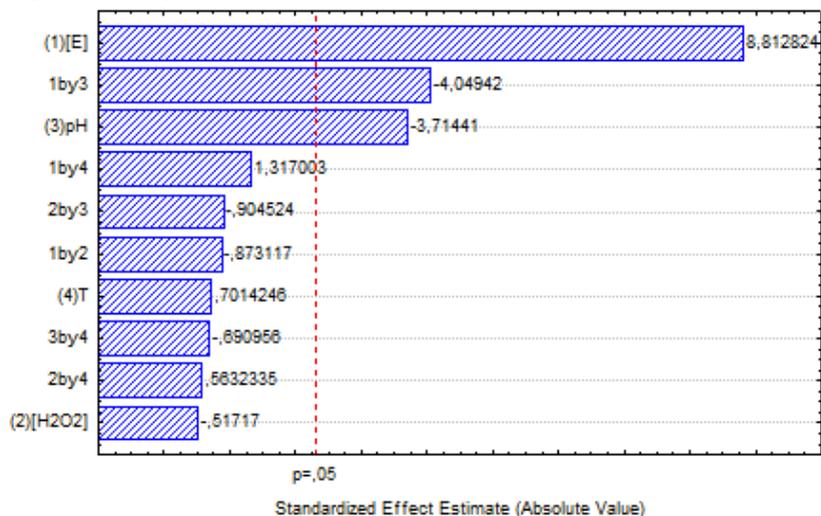


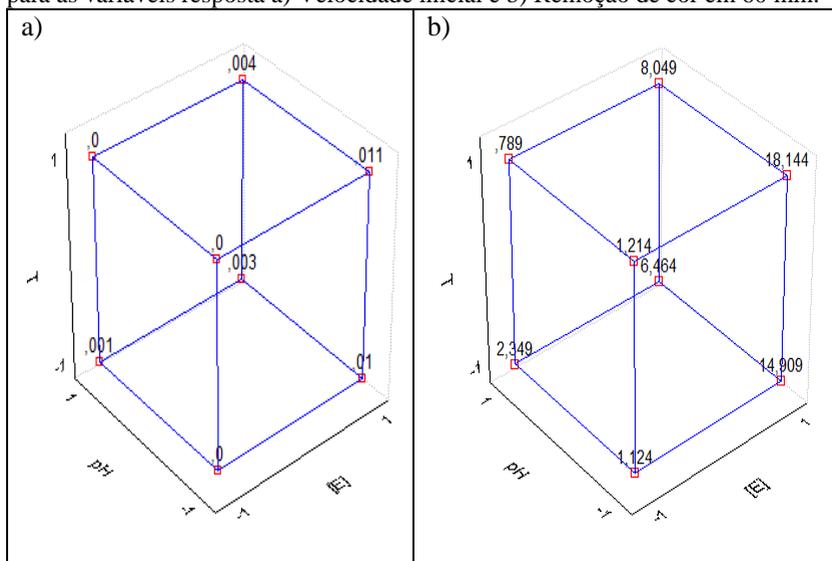
Figura 57. Gráfico de Pareto resultante do planejamento fatorial  $2^4$  com três repetições no ponto central para o corante vermelho CQ4BL utilizando como resposta a remoção de cor (%).



Para ambas as variáveis respostas analisadas, velocidade inicial e remoção de cor em 60 min, as variáveis significativas foram concentração de enzima, com efeito positivo, o pH, com efeito negativo e a interação concentração de enzima e pH. Resultados semelhantes aos obtidos com o corante Preto Remazol. A concentração de enzima (com efeito positivo) foi a única variável que apareceu como significativa no planejamento experimental inicial de todos os corantes estudados (exceto do corante Vermelho Remazol).

Semelhante ao ocorrido com os corantes Azul Turqueza e Preto Remazol, os maiores valores de velocidade inicial e de remoção de cor foram obtidos quando se utilizaram altas concentração de enzima em baixo pH, como pode ser observado no diagrama do planejamento fatorial da Figura 58.

Figura 58. Diagrama do planejamento fatorial  $2^4$  do corante Vermelho CQ4BL para as variáveis resposta a) Velocidade inicial e b) Remoção de cor em 60 min.



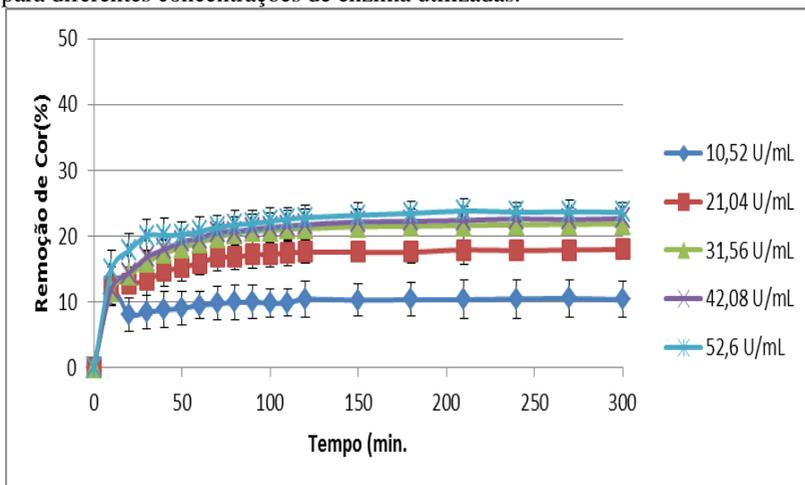
#### 5.4.2 Estudo da Influência da Concentração de Enzima – Corante Vermelho CQ4BL

A influência da concentração de enzima foi avaliada em cinco níveis, mantendo os demais fatores que afetam o processo constantes

(pH 4, temperatura de 25 °C e concentração de peróxido de hidrogênio de  $2 \times 10^{-4}$  mM), os resultados estão apresentados na Figura 59.

De forma semelhante ao ocorrido com o corante Azul Turquesa e Preto Remazol, foi fixado o pH em 4 para este experimento devido a este valor de pH ter apresentado melhores resultados de remoção de cor no planejamento inicial. A temperatura não se mostrou um fator de grande influência no planejamento inicial, desta forma, optou-se por utilizar a temperatura de 25 °C.

Figura 59. Gráfico de remoção de cor do corante Vermelho CQBL por tempo para diferentes concentrações de enzima utilizadas.



As soluções com concentrações de enzima de 10,52 U/mL apresentaram as menores remoções de cor, enquanto que, as soluções com 21,04 U/mL, a 52,6 U/mL de enzima produziram remoções de cor iguais, significativamente, em todos os tempos analisados.

Para o estudo posterior foram utilizadas as concentrações de enzima de 21,04, 31,56 e 42,08 U/mL. As soluções com concentrações de enzima de 10, 52 U/mL não foram utilizadas por apresentarem baixas remoções de cor e as soluções com concentrações de enzima de 52,6 U/mL por apresentarem cinética de reação semelhantes as soluções com concentrações de 42,08 U/mL.

### 5.4.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio – Corante Vermelho CQ4BL

Nas Figuras 60, 61 e 62 estão apresentados os resultados do estudo da influência da concentração de peróxido de hidrogênio nas reações de descoloração do corante Vermelho CQ4BL.

Figura 60. Gráfico de remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL por tempo para concentração de enzima de 21,04 U/mL.

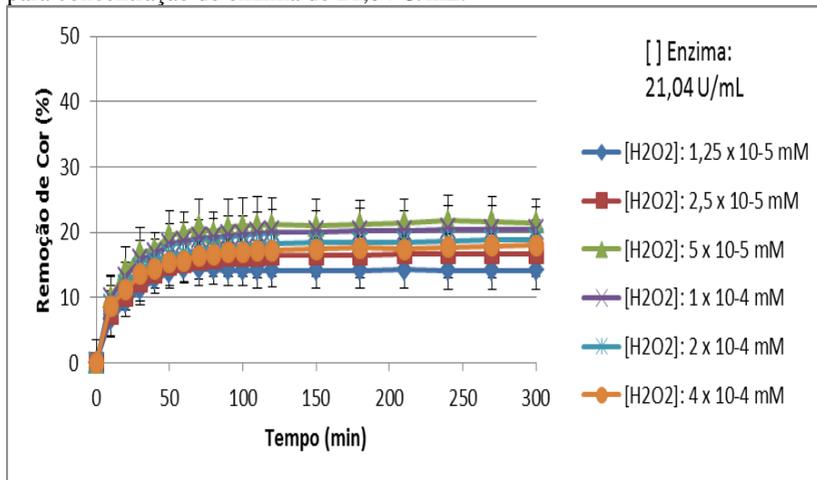


Figura 61. Gráfico de remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL por tempo para concentração de enzima de 31,56 U/mL.

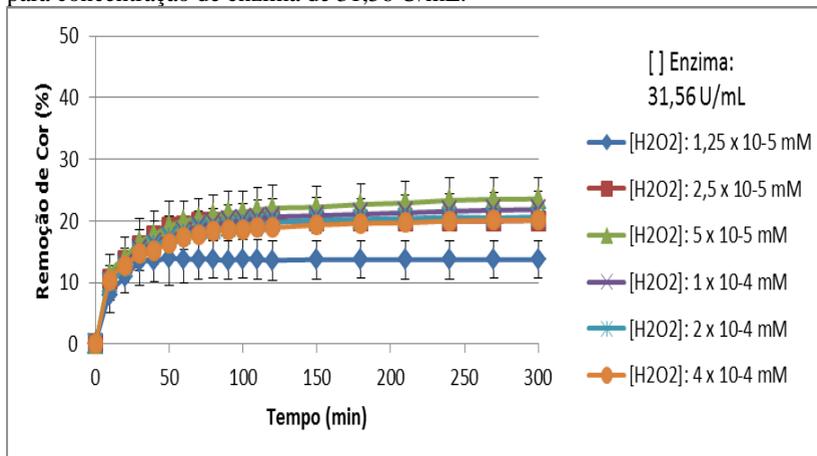
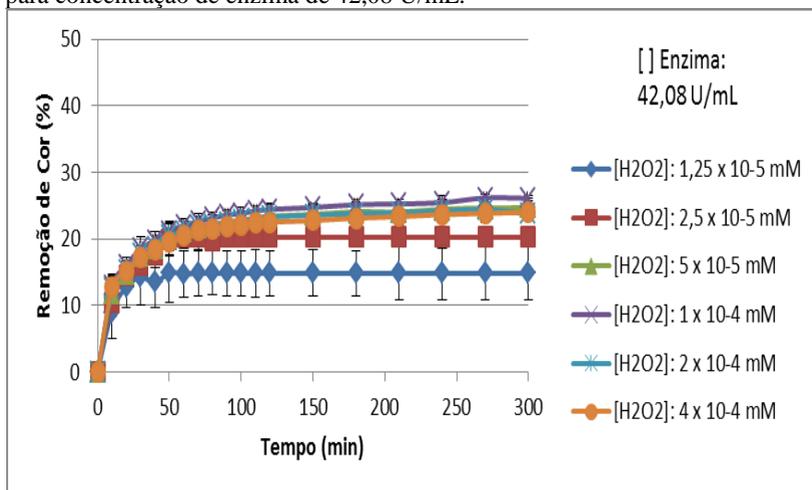


Figura 62. Gráfico de remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL por tempo para concentração de enzima de 42,08 U/mL.



Para o corante Vermelho CQ4BL, com os experimentos realizados, não foi possível identificar a menor concentração de peróxido de hidrogênio eficaz para as reações de remoção de cor pela enzima HRP. Para fins de padronização, foram escolhidas como melhores condições: concentração de enzima de 21,04 U/mL, e concentração de peróxido de hidrogênio de  $5 \times 10^{-5}$  mM, nestas condições foram alcançadas remoções de cor de cerca de 19% ( $\pm 2,85$ ). As diferentes concentrações de enzima testada produziram respostas de remoção de cor semelhantes.

#### 5.4.4 Estudo da Influência do pH e da Temperatura – Corante Vermelho CQ4BL

Assim como ocorrido com os demais corantes estudados, o pH foi um fator determinante nas reações de remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL.

Nas Figuras, 63, 64, 65 e 66 estão apresentados os resultados dos estudos da influência do pH e da temperatura nas reações de remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL.

Figura 63. Influência do pH na remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL à temperatura de 20 °C.

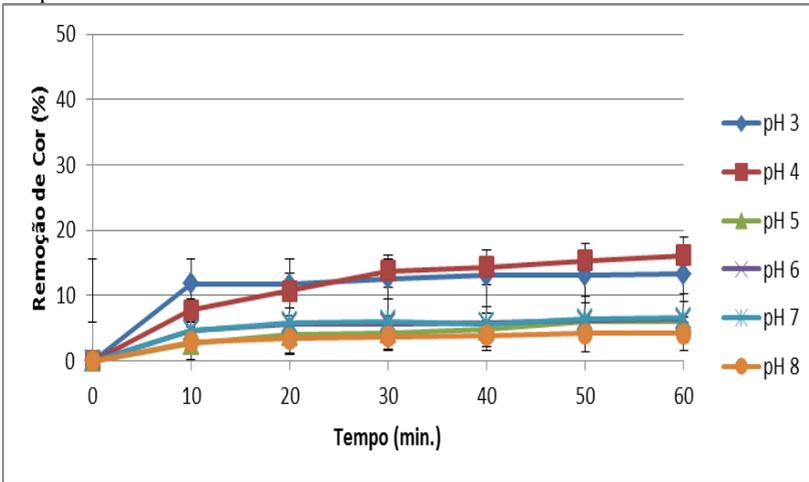


Figura 64. Influência do pH na remoção de cor do corante Vermelho CQ4BL à temperatura de 30 °C.

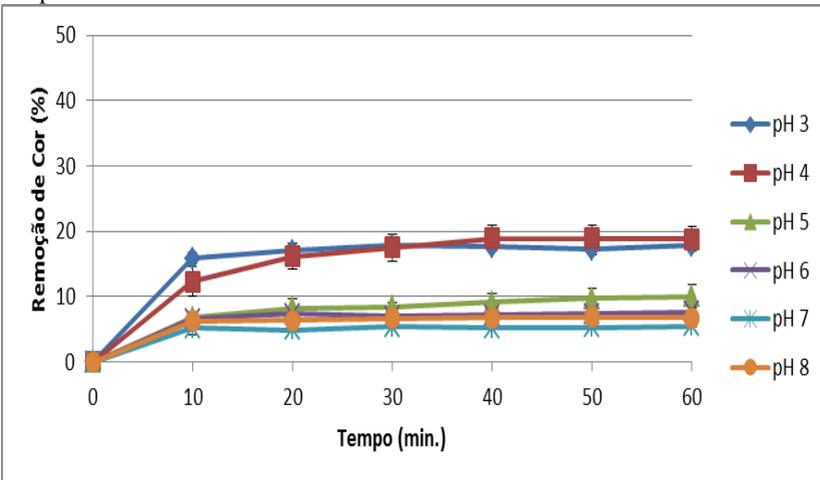
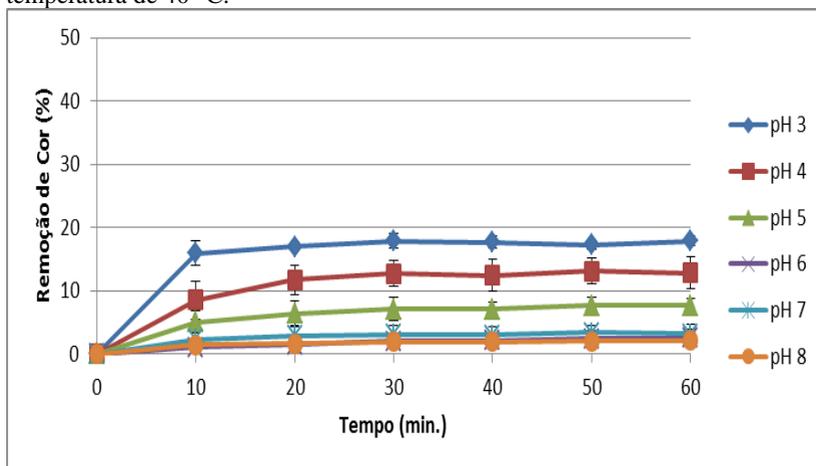
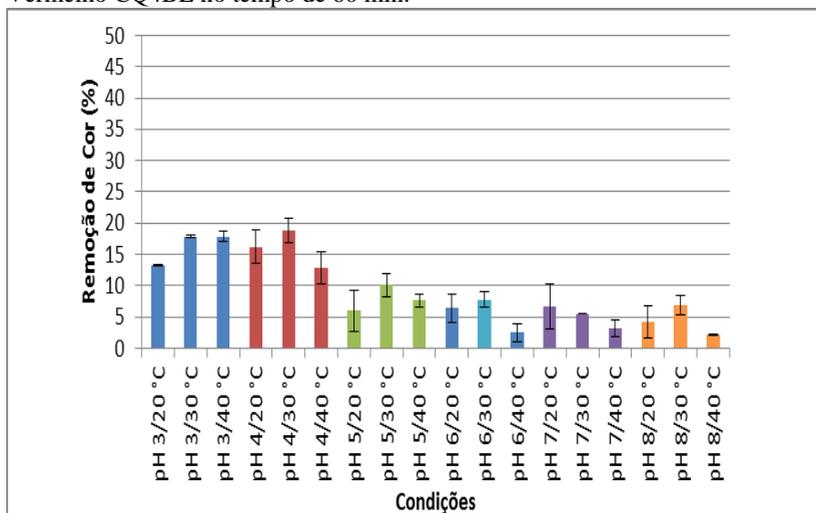


Figura 65. Influência do pH na remoção de cor do Corante Vermelho CQ4BL à temperatura de 40 °C.



Nos pHs estudados, exceto em pH 3, o aumento de temperatura de 20 para 30 °C não promoveu alterações significativas na remoção de cor em 60 min. Apenas nos pHs 4, 6 e 8 o aumento de temperatura de 30 para 40 °C promoveu alteração no rendimento das reações, sendo que nestes casos, esse aumento de temperatura diminuiu a remoção de cor.

Figura 66. Influência da temperatura e pH na remoção de cor do Corante Vermelho CQ4BL no tempo de 60 min.



As melhores remoções de cor em 60 min foram obtidas com o pH 3, a 30 e a 40 °C e em pH 4 a 20 e 30 °C. Estas condições apresentaram cinéticas de remoção de cor semelhantes. Para os estudos posteriores foram fixadas as condições: pH 4, por ser mais próximo a neutralidade, e temperatura de 30 °C, para fins de padronização. Nestas condições foram alcançadas remoções de cor de 18,85% ( $\pm 0,91$ ).

No trabalho de Farias (2013), que avaliou o potencial da enzima HRP em remover corantes reativos não fixados às fibras de algodão e corantes remanescentes do efluente do processo de lavagem, as soluções de corante Vermelho CQ4BL apresentaram 7,0% de remoção de cor.

#### 5.4.5 Estudo sobre a Influência da Relação Concentração de Peróxido de Hidrogênio:Concentração de Corante – Corante Vermelho CQ4BL

Nas Figuras 67 e 68 estão apresentados os resultados de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L e 100 mg/L do Corante Vermelho CQ4BL.

Figura 67. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 25 mg/L do corante Vermelho CQ4BL variando a concentração de peróxido de hidrogênio.

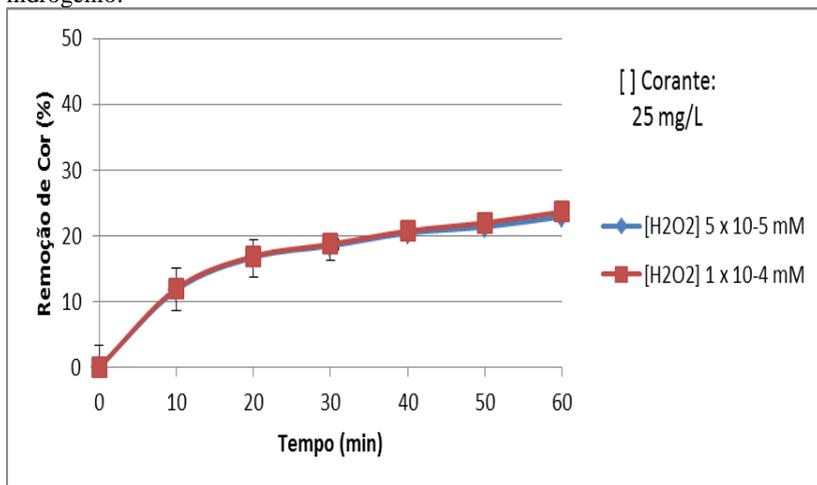
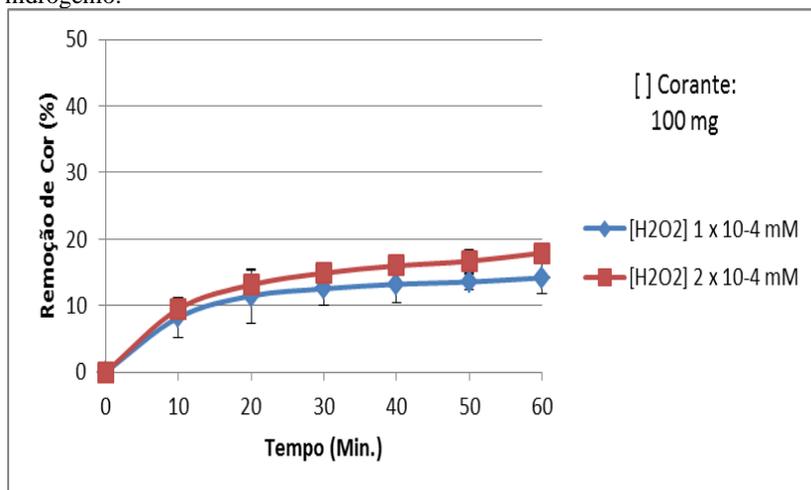


Figura 68. Gráfico de remoção de cor em função do tempo para soluções de 100 mg/L do corante Vermelho CQ4BL variando a concentração de peróxido de hidrogênio.



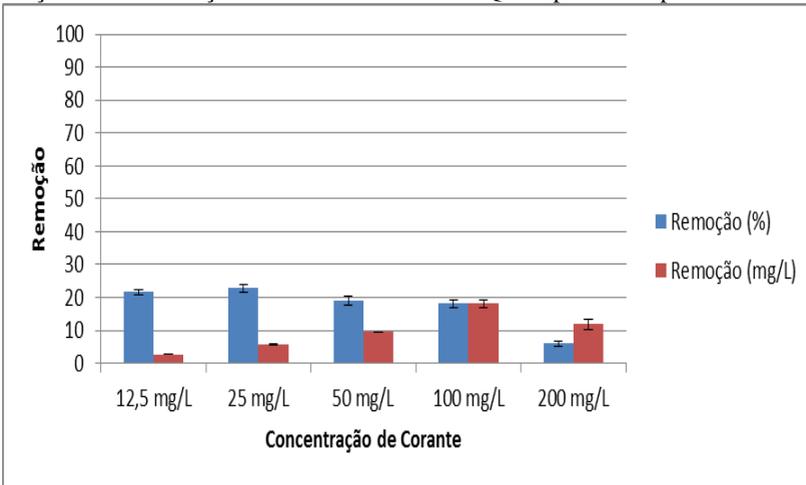
Neste estudo, não foram encontradas diferenças significativas nas remoções de cor obtidas para soluções de diferentes concentrações do corante Vermelho CQ4BL utilizando diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Entretanto, este fato pode ter ocorrido por não se ter encontrado a concentração limite de peróxido de hidrogênio no estudo da influência da quantidade de peróxido de hidrogênio sob as reações de descoloração do corante Vermelho CQ4BL.

Para o corante Azul Brillante e para o corante Preto Remazol, a concentração de peróxido de hidrogênio a ser utilizada para alcançar melhores remoções de cor mostrou-se ser diretamente proporcional a concentração dos corantes. Para os corantes Vermelho CQ4BL e Azul Turquesa concentrações proporcionais de peróxido de hidrogênio:concentração de corante não provocaram mudanças significativas nas remoções de cor. No estudo posterior, da mesma forma como foram conduzidos os estudos com o corante Azul Turquesa, optou-se por utilizar concentrações proporcionais de peróxido de hidrogênio em relação a concentrações de corante, mesmo não havendo evidências da necessidade, apenas para assegurar que a concentração de peróxido de hidrogênio não seja o limitante da reação.

### 5.4.6 Estudo sobre a Influência da Concentração de Corante – Corante Vermelho CQ4BL

Os resultados do estudo da influência da concentração do corante Vermelho CQ4BL na eficiência da remoção de cor são apresentados na Figura 69.

Figura 69. Gráfico de remoção de corante (em porcentagem e em mg/L) em função da concentração do corante Vermelho CQ4BL para o tempo de 60 min.



Os melhores rendimentos, em termos de remoção de cor percentual foram obtidos com as concentrações de corante de 12,5 mg/L e 25 mg/L, com remoções de cor entre 21 e 22%. Ao se utilizar uma alta concentração de corante, 200 mg/L, a reação de descoloração do corante Vermelho CQ4BL foi inibida, possivelmente pelo excesso de substrato, que causou a inativação da enzima, fato não observado com os demais corantes estudados.

A relação entre a concentração de corante e a quantidade de corante removido (mg/L), para concentrações de corante entre 12,5 e 100 mg/L, pode ser representada por uma relação linear, com equação:  $y = 0,173x + 1,373$  (Equação 18) e  $R^2 = 0,9769$  (gráfico apresentado no Anexo C). Para o corante Vermelho CQ4BL, a relação linear só pode ser observada até a concentração de 100 mg/L, enquanto que, para os demais corantes estudados, esta relação foi observada até a concentração de 200 mg/L.

## **5.5 Estudos de Remoção de Cor do Corante Vermelho Brilhante**

### **5.5.1 Estudo dos Fatores de Maior Influência na Remoção do Corante – Vermelho Brilhante**

Os processos enzimáticos são muito promissores para a descoloração de corantes. Entretanto, devido à elevada variedade estrutural, apenas alguns são degradados por enzimas (SUDHA *et al.*, 2014).

O corante Vermelho Brilhante não apresentou nenhuma descoloração pela enzima HRP no planejamento experimental inicial deste estudo e, portanto, não foi utilizado para os demais testes.

Claus *et al.*, (2002) em seus estudos sobre descoloração de corantes sintéticos por enzimas, atribuíram a resistência à descoloração de alguns corantes às suas estruturas moleculares e não a algumas condições da reação, como por exemplo, a concentração da enzima, já que essa determina a velocidade da reação, mas não o nível de descoloramento do corante.

A relação entre a biodegradabilidade e a estrutura molecular dos corantes depende do tipo, da quantidade, da posição dos grupos substituintes no anel aromático e do peso molecular dos corantes (SILVA *et al.*, 2012). De acordo com SHAFFIQU (2002) a descoloração dos corantes azo depende do seu potencial de oxidação e, no caso de corantes azo sulfonados, a posição e número do grupo  $\text{SO}_3\text{H}$  também podem afetar a velocidade de degradação da molécula do corante.

A compreensão de como a estrutura química influencia a suscetibilidade à degradação de compostos artificiais pode ajudar a desenvolver uma nova geração de corantes facilmente degradáveis (CHACKO; SUBRAMANIAM, 2011).

Uma alternativa para descoloração de soluções contendo este corante seria a utilização de outra classe de enzimas. No estudo de Cristóvão (2010) a enzima lacase reduziu em 58% a cor de soluções deste corante.

## **5.6 Estudo Cinético da Degradação Enzimática dos Corantes**

Os dados das cinéticas de descoloração dos corantes estudados nas melhores condições, que estão apresentadas na Tabela 15, foram testadas em modelos de primeira, segunda, pseudo-primeira e pseudo-

segunda ordem. Na Tabela 16 estão as constantes cinéticas e os coeficientes de determinação.

Tabela 16. Melhores condições das reações de descoloração de soluções dos corantes têxteis a 50 mg/L e rendimentos máximos obtidos.

	<b>Azul Brilhante</b>	<b>Azul Turqueza</b>	<b>Preto Remazol</b>	<b>Vermelho CQ4BL</b>
Concentração de Enzima (U/mL)	10,5	5,25	31,56	21,04
Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	1 x 10 <sup>-4</sup>	2,5 x 10 <sup>-5</sup>	5 x 10 <sup>-5</sup>	5 x 10 <sup>-5</sup>
pH	6	4	4	4
Temperatura (°C)	30	30	40	30
Rendimento máximo	96%	90%	87%	20%

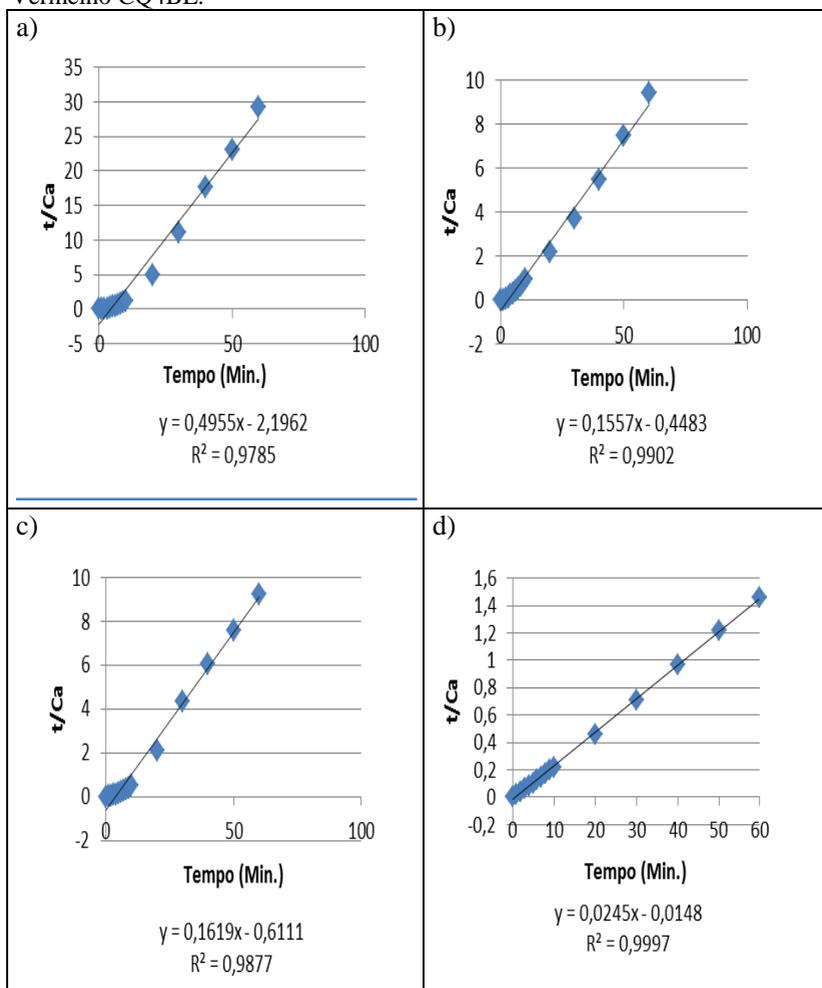
Tabela 17. Constantes cinéticas das reações de remoção de cor.

<b>Corante</b>		<b>Modelo</b>			
		<b>Primeira Ordem</b>	<b>Segunda Ordem</b>	<b>Pseudo Primeira Ordem</b>	<b>Pseudo Segunda Ordem</b>
Azul Turqueza	k1	0,0235	0,0017	0,0377	0,1275
	R2	0,7262	0,9035	0,971	0,9913
Azul Brilhante	k1	0,0483	0,0088	0,0461	0,4955
	R2	0,7982	0,9615	0,9747	0,9785
Preto Remazol	k1	0,0158	0,0027	0,0371	0,06111
	R2	0,8444	0,9054	0,9283	0,9877
Vermelho CQ4BL	k1	0,0013	5E-0,5	0,0301	0,0245
	R2	0,8607	0,8728	0,9581	0,9997
<b>Corante</b>		<b>Modelo</b>			

Na Figura 70 são apresentadas as representações gráficas obtidas pelo melhor ajuste no estudo da cinética de descoloração dos corantes têxteis. Os demais gráficos estão apresentados no Apêndice B.

Para todos os corantes estudados, o modelo que melhor representou os dados foi o modelo de cinética de pseudo-segunda ordem. Os coeficientes de determinação ficaram entre 0,978 e 0,999.

Figura 70. Representação gráfica do estudo da cinética de descoloração dos corantes têxteis segundo o modelo de pseudo-segunda ordem a) Corante Azul Brilhante, b) Corante Azul Turqueza, c) Corante Preto Remazol d) Corante Vermelho CQ4BL.



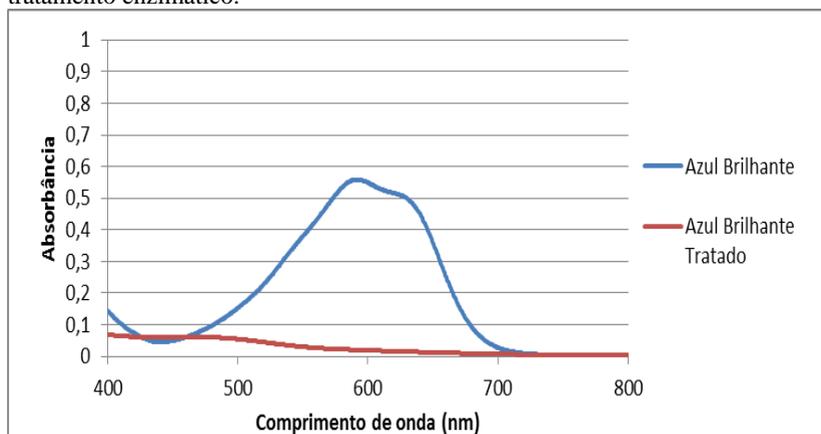
Manske (2010) estudou a cinética de degradação do corante azul brilhante G utilizando a enzima peroxidase. O comportamento cinético para o processo biocatalítico seguiu a equação de primeira

ordem, com coeficiente de determinação -  $R^2 \geq 0,98$ . O trabalho de Corrêa *et al.* (2009) investigou a influência do uso do extrato de levedura e fontes de mediadores redox (riboflavina e nicotinamida) na remoção de cor de soluções do corante azo Drimaren Azul HF-RL. A maior parte dos dados experimentais tiveram melhor ajuste ao modelo de cinética de segunda ordem. Segundo os autores estes resultados indicam que a velocidade de remoção de cor depende não só da concentração residual do corante, mas também de algum outro fator.

### 5.7 Espectros das Soluções Antes e Após o Tratamento Ótimo

Nas Figuras 71, 73, 75 e 76 são apresentados os espectros de absorção das soluções dos corantes: Azul Brilhante, Azul Turquesa, Preto Remazol e Vermelho CQ4BL antes e após o tratamento enzimático (na concentração de 50 mg/L).

Figura 71. Espectro da solução de corante Azul Brilhante antes e após o tratamento enzimático.



O corante Azul Brilhante apresenta como pico de absorção o comprimento de onda de 593 nm. Após o tratamento enzimático, que removeu cerca de 96% da cor deste corante, houve a redução dos picos de absorção e a formação de um novo pico, entre 400 e 480 nm, indicando a formação compostos de oxidação que absorvem nesta região do espectro.

Perlatti *et al.* (2012) identificaram os produtos de degradação do corante Azul Brilhante pelo *Aspergillus flavus*. Foram identificados quatro produtos de degradação com massa molecular de 318, 336, 165 e

188 Da, respectivamente. De acordo com estes autores, a oxidação da segunda porção carbonila no anel antraquinona gera dois produtos: o ácido o-ftálico e 2-amino-Ácido sulfônico-1-fenol-4, a que foram atribuídas as massas moleculares de 165 Da e 188 Da, respectivamente (Figura 72).

Figura 72. Proposta de mecanismo de transformação biocatalítica do corante Azul Brilhante por *A. flavus* (Perlatti *et al.*, 2012).

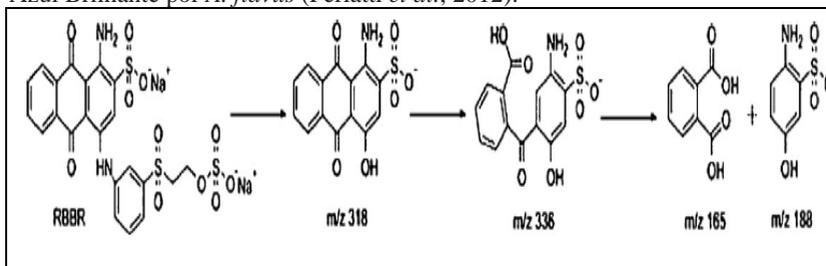
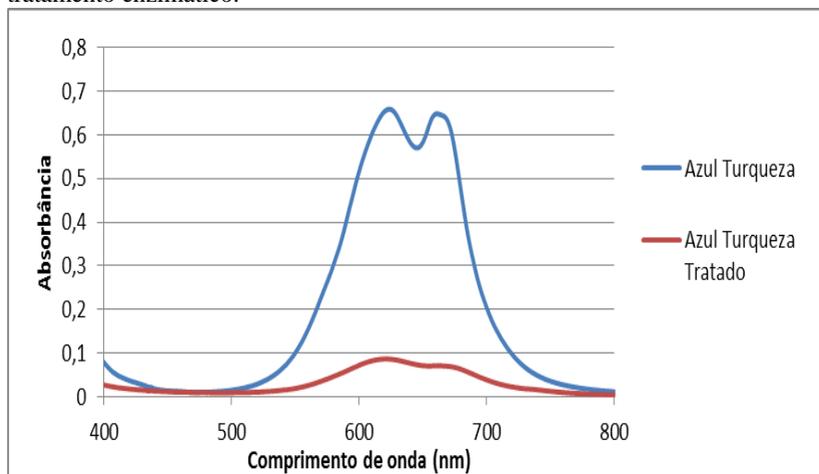


Figura 73. Espectro da solução de corante Azul Turquesa antes e após o tratamento enzimático.



O espectro da solução do corante Azul Turquesa antes do tratamento é caracterizado na região do visível pela presença de dois picos, um a 661 nm e outro a 625 nm, que conferem à solução a coloração azul. Após o tratamento enzimático, em que foi removido cerca de 88% da cor deste corante, houve a redução dos picos de absorção, sendo a remoção mais evidente no pico a 661 nm.

Silva *et al.* (2012) em seus estudos sugeriram como principais produtos formados da degradação do corante Azul Turquesa pela enzima HRP as estruturas dos metabólitos I e II (Figura 74). O mecanismo sugerido envolve a clivagem das ligações azoto no interior do anel da molécula de ftalocianina e liberação de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Figura 74. Metabólitos sugeridos por Silva *et al.* (2012) para degradação do corante Azul Turquesa pela HRP.

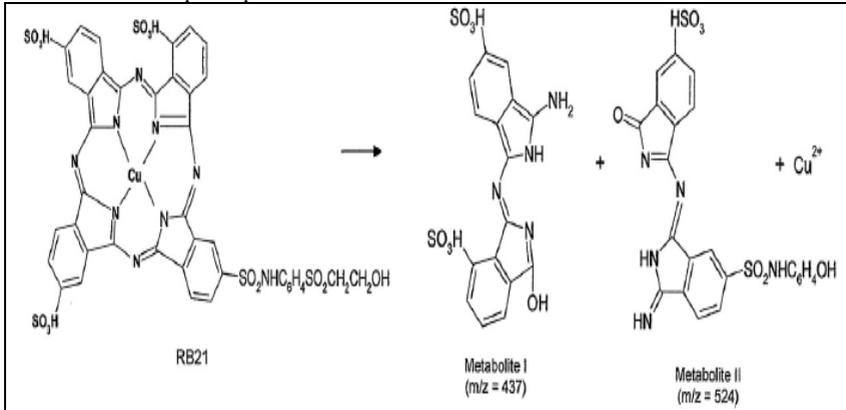
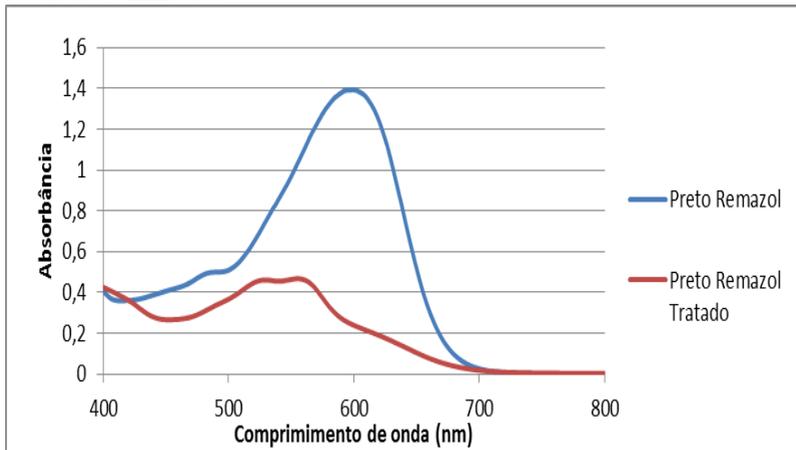


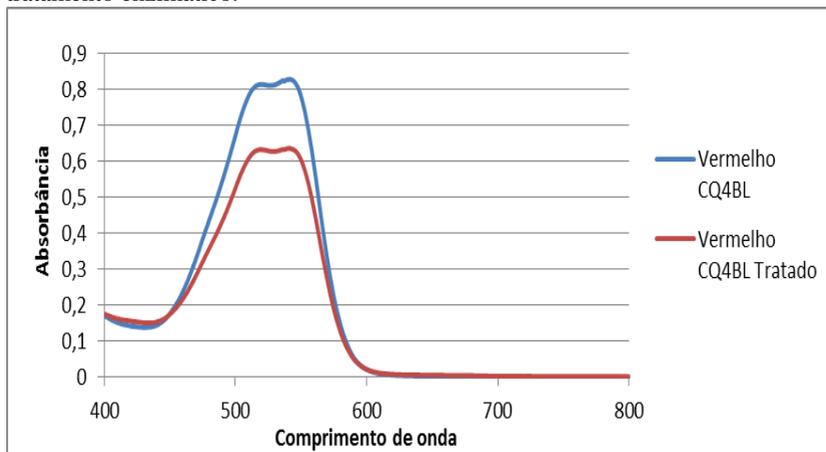
Figura 75. Espectro da solução de corante Preto Remazol antes e após o tratamento enzimático.



O espectro da solução de corante Preto Remazol antes do tratamento é caracterizado na região do visível pela presença de um pico em 597 nm. Após o tratamento enzimático houve redução do pico de

absorção e a formação de dois picos menores entre 520 e 570 nm, além de um pico próximo a 400 nm. Estes resultados indicam a formação de compostos oxidação que absorvem nesta região do espectro.

Figura 76. Espectro da solução de Corante Vermelho CQ4BL antes e após o tratamento enzimático.



O espectro da solução de corante Vermelho CQ4BL antes do tratamento é caracterizado na região do visível pela presença de dois picos em 541 e 536 nm. Após o tratamento enzimático houve redução dos picos de absorção sem a formação de novos picos.

Uma vez que a degradação enzimática de corantes envolve a ligação de corantes e enzimas, não é surpreendente que as estruturas químicas dos corantes afetam fortemente suas eficiências de decoloramento. No entanto, é difícil sugerir um mecanismo molecular real, porque a estrutura do corante e a eficiência dos mediadores redox contribuem em grande parte na catálise mediada por peroxidases. A eficiência de remoção de cor de corantes é fortemente dependente do efeito estérico de substituintes químicos em corantes (RAUF e ASHRAF, 2012).

## 5.8 Testes de toxicidade

O efluente proveniente das diversas atividades exercidas pelo homem tem um grande potencial de contaminação, e nem sempre as técnicas de tratamento empregadas asseguram que o efluente seja desprovido de toxicidade (SILVA, 2002).

Os testes físico-químicos isoladamente são incapazes de prever em sua totalidade o risco apresentado por uma substância ou efluente. De modo que os testes toxicológicos possuem uma posição de extrema importância na caracterização destes. A seguir serão apresentados e discutidos os resultados dos testes toxicológicos com os organismos: *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* e os testes comportamentais utilizando a alga *Euglena gracilis*. Os testes toxicológicos foram realizados com os quatro corantes têxteis, Azul Brillante, Azul Turqueza, Preto Remazol e Vermelho CQ4BL antes e após o tratamento enzimático. O corante Vermelho Remazol não foi utilizado por não ter conseguido alcançar nenhuma remoção de cor nos estudos.

### 5.8.1 Teste Agudo Utilizando o Organismo *Daphnia magna*

Neste estudo, a toxicidade aguda dos corantes, antes do tratamento e após o melhor tratamento eleito, foi avaliada utilizando-se o teste com *Daphnia magna*. Na Tabela 18 estão apresentados os valores dos fatores de toxicidade para os corantes antes e após o tratamento.

Tabela 18. Fator de toxicidade dos corantes têxteis (nas concentrações de 100 mg/L) antes e após tratamento frente ao bioindicador *Daphnia magna*.

	Inicial (FTd)	Tratado (FTd)
Azul Turqueza	Não tóxico	4
Azul Brillante	2	16
Preto Remazol	Não tóxico	4
Vermelho CQ4BL	Não tóxico	2

FTd = Fator de Toxicidade para *Daphnia magna*.

O fator de toxicidade (FT) é representado pela menor diluição da amostra em que não se observa efeito significativo de inibição da capacidade natatória do organismo indicador superior a 10% dos organismos expostos, após 48 horas de exposição. Outra forma de expressar resultados deste teste toxicológico é através da CE<sub>50</sub> (valor de dose mínimo necessário para causar a imobilidade de 50% dos

organismos). A  $CL_{50}$  e a  $CE_{50}$  são parâmetros que indicam a toxicidade da substância ou amostra testada; quanto menor a  $CL_{50}$  ou  $CE_{50}$ , maior a toxicidade da substância ou amostra (MAGALHÃES e PEREIRÃO FILHO, 2008).

Os resultados expresos em  $CE_{50}$  estão disponíveis na Tabela 19 e na Figura 77.

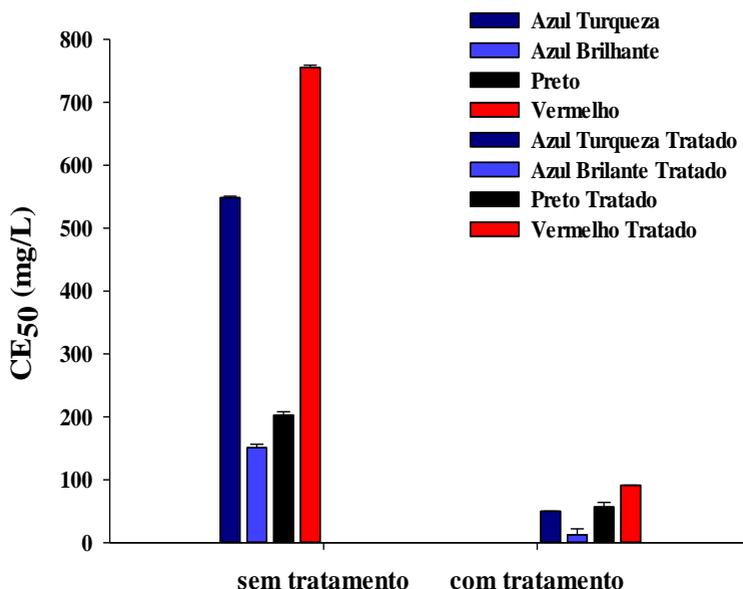
Tabela 19. CE<sub>50</sub> dos corantes têxteis antes e após tratamento frente ao bioindicador *Daphnia magna*.

<b>Azul Turqueza</b>			<b>Azul Turqueza Tratado</b>		
CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>	CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>
548,54	2,35	0,9970	50,00	0,02	0,9999
		<0,0001			<0,0001
<b>Azul Brilhante</b>			<b>Azul Brilhante Tratado</b>		
CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>	CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>
150,98	5,36	0,9868	12,60	9,43	0,9686
		<0,0001			<0,0001
<b>Preto Remazol</b>			<b>Preto Remazol Tratado</b>		
CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>	CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>
202,68	5,36	0,9999	56,90	7,07	0,9727
		<0,0001			<0,0001
<b>Vermelho CQ4BL</b>			<b>Vermelho CQ4BL Tratado</b>		
CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>	CE <sub>50</sub> (mg/L)	DP	R <sup>2</sup>
755,34	3,77	0,9936	91,37	0,01	0,9999
		<0,0001			<0,0001

Teste de normalidade (*p*) (Shapiro-Wilk)

CE<sub>50</sub>: Dose mínima para causar a *imobilidade* de 50% das *D. magna*.

Figura 77.  $CE_{50}$  dos corantes têxteis antes e após tratamento frente ao bioindicador *Daphnia magna*.



Os corantes: Azul Turqueza, Preto Remazol e Vermelho CQ4BL não apresentaram toxicidade na concentração de 100 mg/L para o organismo *D. magna* no teste agudo, conforme resultados apresentados na Tabela 16.

A toxicidade de todos os corantes estudados aumentou significativamente após o tratamento enzimático. Sendo que para a *D. magna* a amostra que apresentou maior toxicidade foi a solução do corante Azul Brilhante após o tratamento enzimático.

O rendimento da reação parece estar relacionado ao aumento da toxicidade dos corantes após o tratamento enzimático. O corante Vermelho CQRL, o qual apresentou a menor taxa de descoloração (cerca de 19%) foi o que apresentou a menor toxicidade após o tratamento ( $FT = 2$  e  $CL_{50} = 91,37\text{mg/L}$ ), já o corante Azul Brilhante, que teve uma descoloração acima de 95%, passou de um  $FT = 2$  antes do tratamento para 16 após o tratamento. Os corantes Azul Turqueza e Preto Remazol, nos quais a remoção de cor foi de cerca de 90 e de 75%, respectivamente, e que possuíam  $CL_{50}$  de 548 e 202 mg/L antes do tratamento obtiveram  $CL_{50}$  após o tratamento de 50 e 56 mg/L.

A toxicidade, em especial aguda, apresentada pelo corante Azul Brillhante pode ser justificada, conforme descrito por Jonsson e Baun (2003), pela presença do produto de degradação (Figura 72) ácido *o*-ftálico, que apresenta toxicidade aguda para as *D. magna*, com  $CL_{50}$  de 103 mg.L<sup>-1</sup>. Para o outro produto de degradação gerado, 2-amino1-fenol-4-sulfônico, ainda não se tem descrito na literatura nenhum dado referente a sua toxicidade. Da mesma forma, os estudos referentes à toxicidade crônica deste corante e de seus produtos de degradação também não foram encontrados.

Silva *et al.* (2013) avaliaram a descoloração do corante têxtil Azul Brillhante por peroxidase de soja e a toxicidade dos produtos formados após tratamento enzimático utilizando *Artemia salina* e sementes de alface (*Lactuca sativa*). Neste estudo obteve-se a remoção máxima 86% após 13 min de reação e, os produtos obtidos após a descoloração enzimática apresentaram toxicidade mais elevada do que o corante inicial. Champagne e Ramsay (2010) observaram o aumento da toxicidade sobre *Vibrio fischeri* após descoloração enzimática do corante Azul Brillhante por lacase de *Trametes versicolor*.

Silva *et al.* (2012) avaliaram o processo de descoloração do corante têxtil Reactive Blue 21 (Azul Turqueza) pela enzima peroxidase de nabo, e estudaram a toxicidade do corante antes e após o tratamento enzimático. Os testes de toxicidade com sementes de alface mostraram um aumento da toxicidade após o tratamento enzimática do corante. Estes autores concluíram que o aumento da toxicidade após o tratamento enzimático pode ser atribuído à presença de Cu<sup>2+</sup> em solução (conforme o esquema proposto por estes autores para degradação do corante, apresentado na Figura 74), embora esses íons não sejam os únicos responsáveis pelo aumento da toxicidade das soluções.

De acordo com a PORTARIA Nº 017/02 – FATMA DE 18/04/2002 que estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens e fornece outras providências, o fator de diluição para o organismo *Daphnia magna* aceitável para efluentes provenientes de indústrias têxteis é de 2. Segundo esta norma, todas as soluções de corante antes do tratamento e, apenas a solução tratada do corante Vermelho CQ4BL, estão em conformidade.

### **5.8.2 Teste Agudo Utilizando o Organismo *Vibrio fischeri***

O *Vibrio fischeri* é uma bactéria luminescente que vem sendo muito utilizada em testes toxicológicos, principalmente devido à

facilidade e à rapidez da análise. Neste teste a diminuição da luminescência emitida pela bactéria é considerada um efeito tóxico.

Na Tabela 20 são apresentados os resultados referentes ao ensaio de toxicidade aguda utilizando bactérias bioluminescentes.

Tabela 20. Fator de toxicidade dos corantes têxteis (na concentração: 100 mg/L) antes e após tratamento frente ao bioindicador *Vibrio fischeri*.

	Inicial (FT)	Tratado (FT)
Azul Turqueza	2	16
Azul Brilhante	2	16
Preto Remazol	2	32
Vermelho CQ4BL	2	16

FTB = Fator de Toxicidade para *Vibrio fischeri*: menor diluição da amostra em que não se observa efeito significativo de inibição de luminescência do organismo indicador.

Todos os corantes estudados apresentaram um FT igual a 2 antes do tratamento enzimático no teste de toxicidade aguda com o *Vibrio fischeri*. Após o tratamento enzimático o FT subiu para 16 ou 32, dependendo do corante. De acordo com a Portaria N° 017/02 – FATMA DE 18/04/2002 que estabelece que o FT máximo para o teste de toxicidade aguda de efluentes têxteis com o organismo *V. fischeri* é 2, somente as soluções de corante antes do tratamento estão dentro dos limites estabelecidos de toxicidade para este organismo.

Para o organismo *V. fischeri* a amostra que apresentou maior toxicidade, de forma diferente ao encontrado para a *D. magna*, foi a solução do corante Preto Remazol após o tratamento enzimático.

Os resultados dos FTs agudos para *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* foram iguais somente para as amostras de corante Azul Brilhante, para os demais corantes estudados os FTs para o *V. fischeri* foram maiores.

Os resultados encontrados após a aplicação dos testes de toxicidade aguda com a *D. magna* e o *V. fischeri* no presente estudo, assim como os resultados obtidos por Flohr *et al.* (2012), mostraram que o *Vibrio fischeri* é mais sensível do que a *Daphnia magna* em testes de toxicidade aguda.

Os diferentes organismos testes utilizados nos testes de toxicidade podem apresentar diferentes sensibilidades às substâncias. A variabilidade das respostas obtidas com os diferentes organismos-teste ressalta a importância da utilização de organismo de diferentes níveis tróficos na avaliação da toxicidade ambiental de substâncias e efluentes.

### 5.8.3 Teste de Eficiência Fotossintética no PAM Utilizando o Organismo *Euglena gracilis*

As medições da fluorescência da clorofila usando PAM tornaram-se um método comum para o estudo dos efeitos de fatores ambientais sobre a fotossíntese das plantas, bem como de macro e microalgas (NIELSEN e NIELSEN, 2008).

Os resultados de rendimento fotossintético obtidos através do teste de desempenho fotossintético com o PAM para os tempos de 2 e 7 dias estão dispostos nas Figuras 78 e 79.

Figura 78. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre o rendimento fotossintético da alga *E. gracilis* em 2 dias.

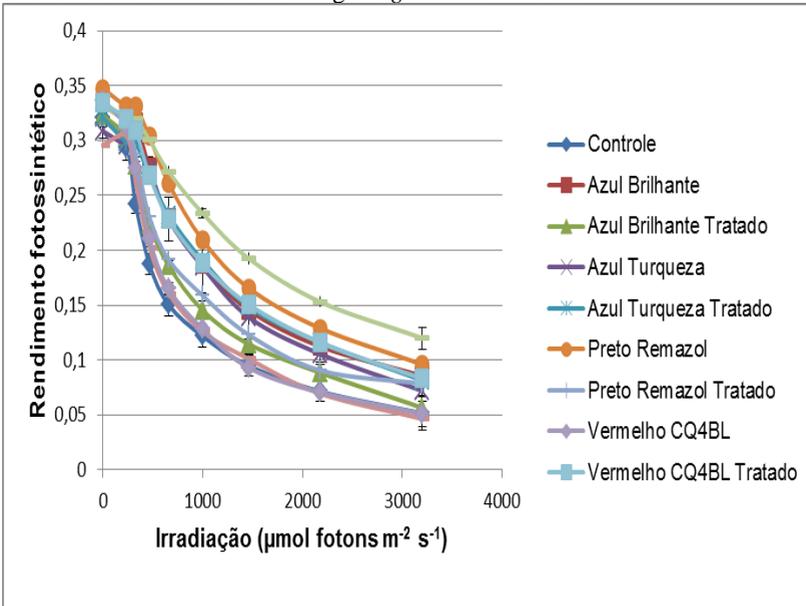
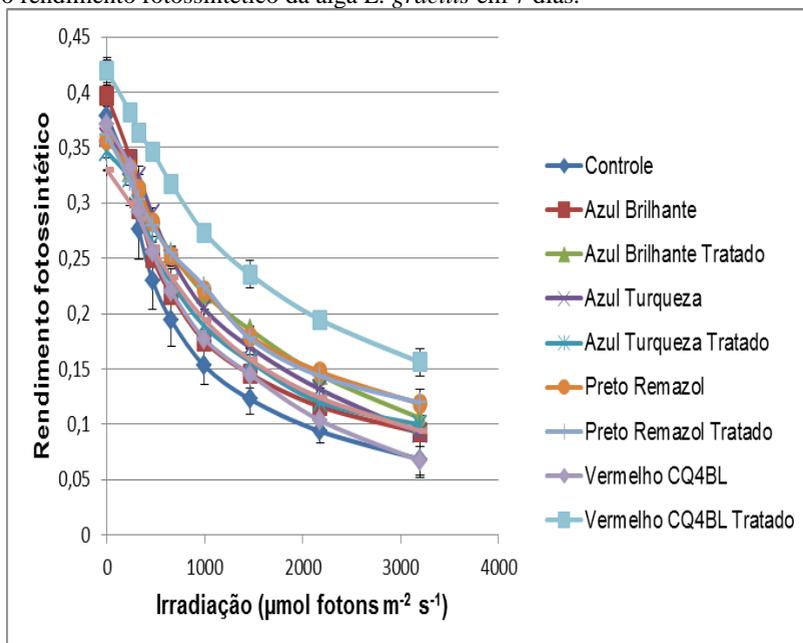


Figura 79. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre o rendimento fotossintético da alga *E. gracilis* em 7 dias.



Além da interferência estética, quando não tratados adequadamente, e lançados em águas naturais, os efluentes provenientes da indústria de corantes ou de processos envolvendo tingimento de fibras têxteis podem interferir na absorção da luz pelos vegetais e animais do ambiente aquático, provocando modificações nas atividades fotossintetizantes da biota aquática (ZANONI, 2001).

As amostras de corante têxteis estudadas, antes e após o tratamento enzimático, não produziram inibição do rendimento fotossintético nos tempos estudados, de 2 e 7 dias. Desta forma, pode-se afirmar que, apesar de coloridas, as soluções não prejudicaram o processo de fotossíntese das algas.

As Figuras 80 e 81 apresentam os resultados da taxa de transferência de elétrons (ETR) obtidos através do teste de desempenho fotossintético com o PAM para os tempos de 2 e 7 dias.

Figura 80. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre a taxa de transporte de elétrons (ETR) da alga *E. gracilis* em 2 dias.

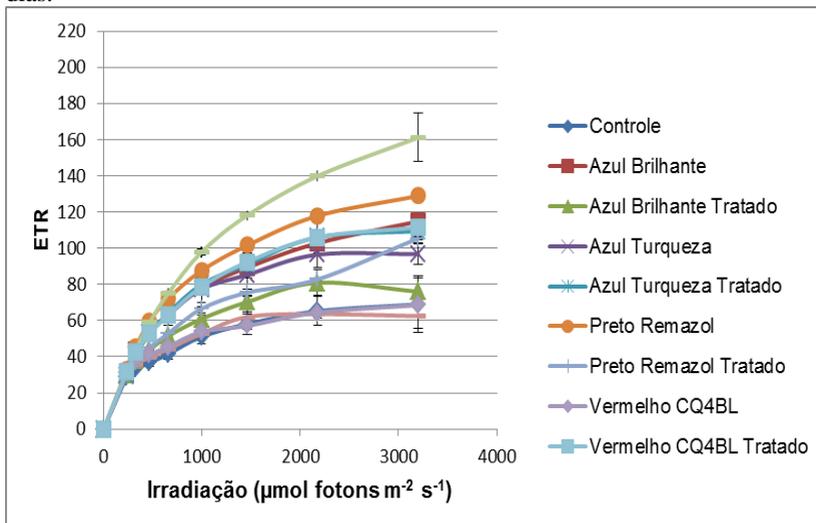
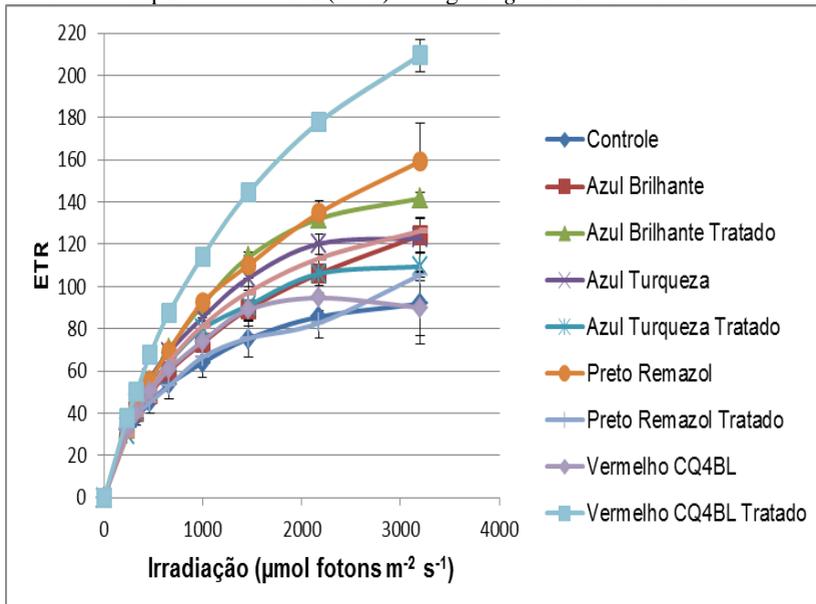


Figura 81. Efeitos dos corantes têxteis antes e após tratamento enzimático sobre a taxa de transporte de elétrons (ETR) da alga *E. gracilis* em 7 dias.



De forma semelhante ao ocorrido com o rendimento fotossintético, as amostras de corantes estudadas, antes e após o tratamento enzimático, não produziram inibição da ETR.

A estimativa de transporte de elétrons no PSII é um indicador útil de qualquer dano ao aparato fotossintético, uma vez que, qualquer inibição em PSII, vai resultar no bloqueio do transporte de elétrons no PSII (AHMED e HÄDER, 2010).

A análise do rendimento fotossintético e da ETR mostraram que, para todos os corantes testados, antes e após o tratamento, não houve efeito negativo sobre o sistema fotossintetizante, na maioria dos casos houve estímulo deste sistema. Azizullah *et al.* (2011) também observaram este fenômeno em um estudo sobre o desempenho fotossintético utilizando o equipamento PAM com sete diferentes águas residuais, uma delas provenientes de uma indústria têxtil.

Este efeito positivo sobre a fotossíntese pode ser explicado por um ou pela combinação dos seguintes fatores: (1) Os nutrientes presentes nas amostras estavam disponíveis para satisfazer o requisito nutricional da *E. gracilis*, em comparação com o controle (diluído com água destilada); (2) O efeito positivo foi devido a um possível efeito estimulador de doses baixas de toxinas (DANILOV e EKELUND, 2001a; JENNINGS, 1979; STEBBING, 1982; VOCKE *et al.*, 1980 appud AZIZULLAH, RICHTER e HADER, 2011). AZIZULLAH *et al.* (2011) ressaltam ainda que a função de proteção de águas residuais contra a radiação forte também pode ser uma possível razão para a maior eficiência fotossintética em altas intensidades de luz.

#### **5.8.4 Teste de Toxicidade Crônica Utilizando o Organismo *Daphnia magna***

Os testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, tais como reprodução (COSTA *et al.*, 2008).

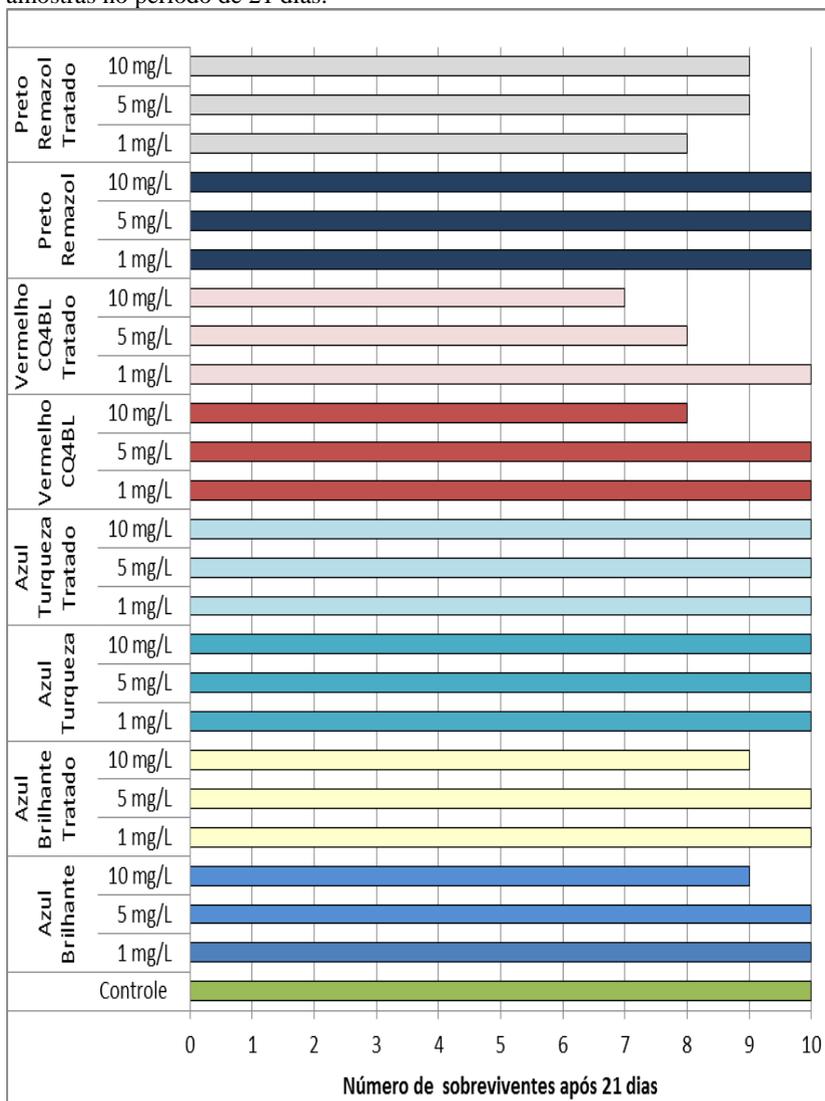
Para a execução dos testes crônicos decidiu-se trabalhar com as diluições de 1, 5 e 10% das soluções de corante a 100 mg/L obtendo as concentrações de 1, 5 e 10 mg/L. Estas concentrações são subletais ao organismo teste e permitem fácil acompanhamento dos testes, soluções mais concentradas tornam-se mais escuras e dificultam a visualização dos filhotes produzidos.

De acordo com os estudos de Terra e Feiden (2003), Terra *et al.* (2003) e Terra *et al.* (2004), para assegurar a validade do teste é necessário que o controle apresente pelo menos 80% de sobrevivência das daphnias adultas.

Para análise da longevidade foram consideradas com efeito significativamente letal as amostras que resultaram na morte de mais de 20% dos organismos. Para até 20% de mortalidade foi considerado que as mortes pudessem ter ocorrido em decorrência da manipulação dos organismos, e não necessariamente pela toxicidade das amostras.

A longevidade do grupo controle foi de 100% para os 21 dias de teste, e a longevidade de todos os grupos estudados, exceto do vermelho tratado a 10 mg/L, foram iguais ou superiores a 80%, conforme os dados apresentados na Figura 82. Desta forma, é possível afirmar que a solução de corante Vermelho CQ4BL a 10 mg/L após o tratamento apresentou toxicidade, neste momento do experimento, verificada pela mortalidade superior a 20% dos organismos.

Figura 82: Número de *Daphnia magna* adultas sobreviventes expostas as amostras no período de 21 dias.

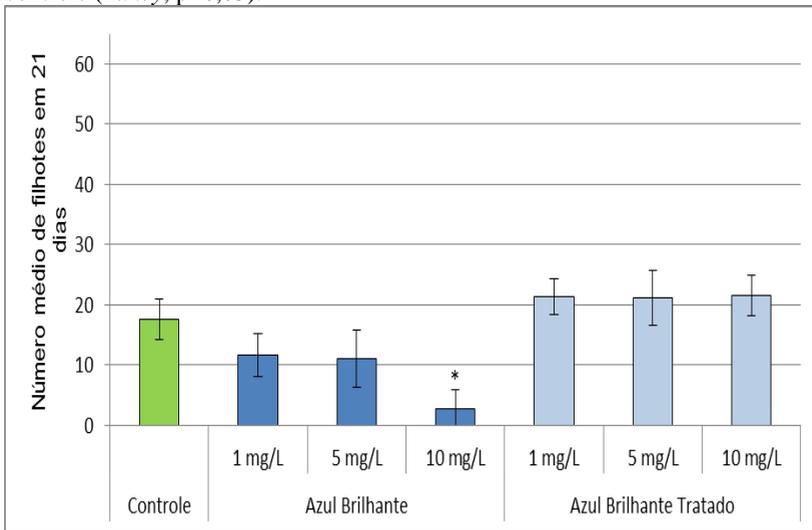


Nas Figuras 83, 84, 85, 86 e 87 são apresentados os resultados de fecundidade obtidos no teste de toxicidade crônica utilizando o organismo *Daphnia magna* para os quatro corantes estudados antes e após o tratamento enzimático.

Nos testes de toxicidade crônica pode-se determinar a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO). A CENO, portanto, é a concentração considerada segura do agente tóxico ou efluente tóxico a ser lançado num corpo d'água (MAGALHÃES e PEREIRÃO FILHO, 2008).

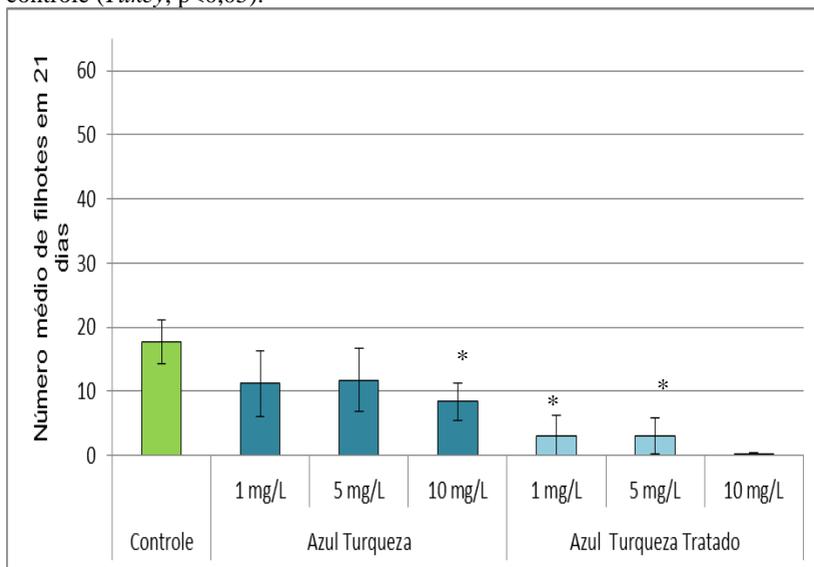
Os testes com o corante Azul Brillhante, Figura 83, indicaram que apenas a amostra de corante a 10 mg/L inibiu a fecundidade dos organismos testados. Sendo que, com o tratamento enzimático esta inibição não foi observada.

Figura 83. Número médio de filhotes produzidos por *Daphnia magna* quando expostas as amostras do corante Azul Brillhante antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias. \*Significativamente diferente do grupo controle (Tukey,  $p < 0,05$ ).



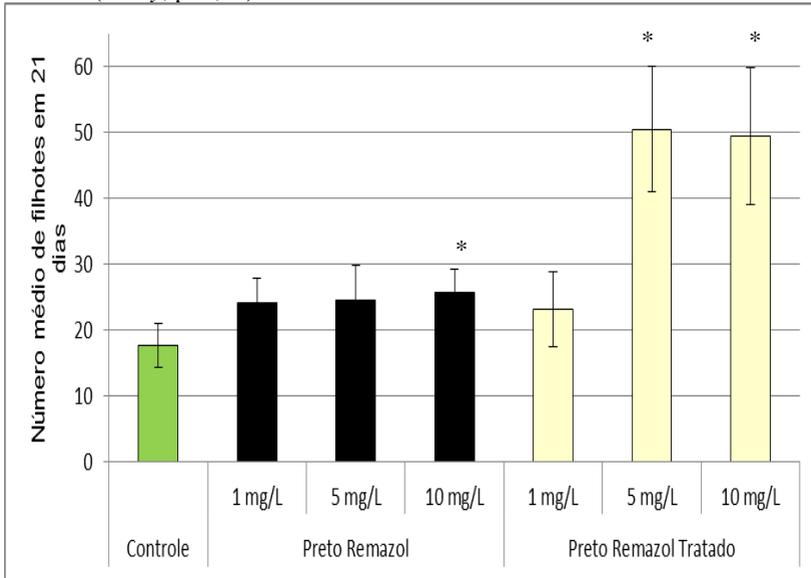
Para as amostras do corante Azul Turquesa, conforme apresentado na Figura 84, apenas as Daphnias que estavam nas amostras de corante Azul Turquesa a 1 e 5 mg/L tiveram média de filhotes significativamente iguais ao do grupo controle. Desta forma, todas as amostras testadas do corante Azul Turquesa após o tratamento, e também a amostra deste corante sem tratamento a 10 mg/L, alteraram a fecundidade dos organismos testados. A alteração observada ao final de 21 dias de teste foi a diminuição na fecundidade.

Figura 84. Número médio de filhotes produzidos por *Daphnia magna* quando expostas as amostras do corante Azul Turqueza antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias. \*Significativamente diferente do grupo controle (Tukey,  $p < 0,05$ ).



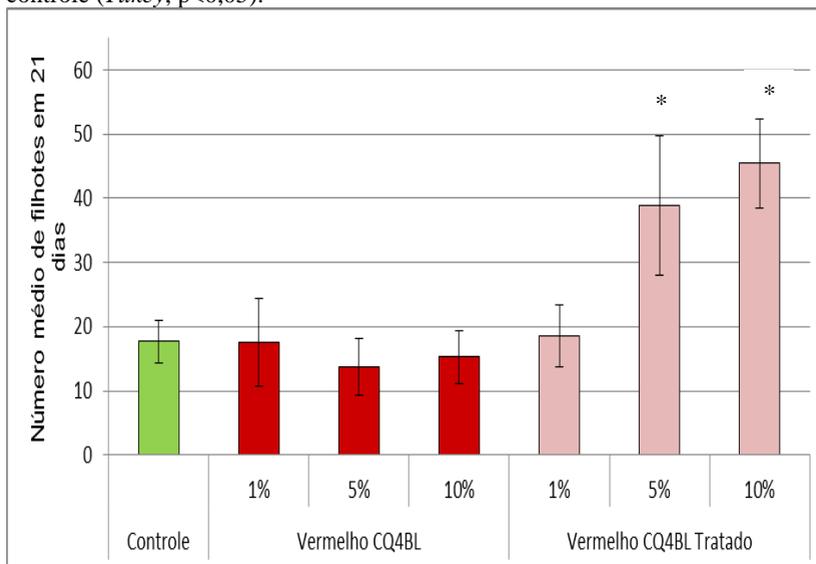
De acordo com a Figura 85, para o corante Preto Remazol, as amostras de corante Preto Remazol a 10 mg/L e as amostras de corante Preto Remazol após o tratamento, nas concentrações de 5 e 10 mg/L aumentaram a fecundidade da *D. magna*. No grupo controle a média de filhotes em 21 dias foi de 17,4 (3,3) filhotes por *Daphnia* mãe, no grupo corante Preto a 10 mg/L a média de filhotes gerados foi de 25,7 (3,4) e nas amostras com o corante Preto após o tratamento a 5 e 10 mg/L foram de 50,5 (9,4) e 49,4 (10,3), respectivamente.

Figura 85. Número médio de filhotes produzidos por *Daphnia magna* quando expostas as amostras do corante Preto Remazol antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias. \*Significativamente diferente do grupo controle (Tukey,  $p < 0,05$ ).



O corante Vermelho CQ4BL, até a concentração de 10 mg/L, conforme apresentado na Figura 3, não alterou a fecundidade do organismo teste no período de tempo testado. Já, o corante Vermelho CQ4BL após o tratamento enzimático, nas concentrações de 5 e 10 mg/L aumentaram significativamente a fecundidade da *Daphnia magna*. Enquanto a média de filhotes em 21 dias do grupo controle foi de 17,4 (3,3) filhotes por *Daphnia* mãe, a média de filhotes gerados nas amostras com o corante Vermelho após o tratamento a 5 e 10 mg/L foram de 38,8 (10,8) e 45,4 (6,9), respectivamente. De acordo com Flohr *et al.* (2012) aumentos de reprodução podem ser explicados com uma tentativa forçada de conservação das espécies.

Figura 86. Número médio de filhotes produzidos por *Daphnia magna* quando expostas as amostras do corante Vermelho CQ4BL antes e após tratamento enzimático no período de 21 dias. \*Significativamente diferente do grupo controle (Tukey,  $p < 0,05$ ).



Dos quatro corantes estudado, nenhuma solução dos corantes antes do tratamento a 1 e 5 mg/L apresentaram toxicidade crônica e, a 10 mg/L, o único corante que não apresentou toxicidade crônica foi o corante Vermelho CQ4BL. A toxicidade crônica frente ao organismo *D. magna* aumentou após o tratamento enzimático dos corantes, exceto para as soluções do corante Azul Brilhante.

Após o tratamento enzimático a única solução que não apresentou toxicidade crônica foi a do corante Azul Brilhante. Resultado contrário ao obtido no teste agudo utilizando o mesmo organismo. No teste agudo o FT das soluções do corante Azul Brilhante após o tratamento enzimático aumentou 8 vezes, e foi esta a solução que apresentou maior toxicidade aguda nos testes com a *D. magna*.

A solução que apresentou maior toxicidade crônica foi a solução do corante têxtil Azul Turquesa após o tratamento, que mesmo na concentração de 1 mg/L apresentou toxicidade crônica.

No teste de toxicidade crônica utilizando *Daphnias*, a toxicidade pode ser observada pela diminuição da fecundidade, como o ocorrido com os corantes Azul Brilhante e Azul Turquesa, ou pelo aumento da

fecundidade, como o ocorrido com o corante Preto Remazol e o corante Vermelho CQ4BL.

Ao comparar os testes de toxicidade aguda e crônica, é possível confirmar a grande importância dos testes crônicos com a *Daphnia magna*. No presente estudo, algumas soluções que não apresentaram efeitos agudos significativos na concentração de 100 mg/L, como as soluções dos corantes Azul Turqueza e Preto Remazol, apresentaram efeitos crônicos em concentrações de 1 mg/L. Resultados semelhantes foram encontrados por Flohr *et al.* (2012), em que seis das dez amostras analisadas não mostraram efeitos agudos significativos, mas apresentaram efeitos crônicos em pelo menos uma das variáveis observadas (reprodução, crescimento, e longevidade).

## 6. CONCLUSÃO

A enzima Hoseradish peroxidase mostrou-se eficiente na remoção de cor de importantes corantes têxteis, sendo que a remoção de cor e a velocidade de descoloração foram diferentes para cada um dos corantes estudados, pois, a degradação dos corantes dependente de suas estruturas moleculares.

A enzima peroxidase removeu de forma eficiente a cor dos corantes têxteis Azul Brilhante e Azul Turqueza, com remoções de cor de, respectivamente, cerca de 95% e 90%. O corante Preto Remazol teve aproximadamente 87% de remoção de cor, enquanto que o corante Vermelho CQ4BL apresentou apenas, cerca de, 20% de remoção.

O corante Vermelho Brilhante não foi suscetível à descoloração enzimática pela enzima peroxidase. Nenhuma das reações utilizando este corante apresentou qualquer remoção de cor.

As melhores condições: concentração de enzima, concentração de peróxido de hidrogênio, pH e temperatura encontradas nas reações de descoloração dos corantes têxteis variaram de acordo com o corante, exceto para o corante Azul Brilhante, que apresentou melhor rendimento das reações em pH 6, os demais corantes apresentaram como pH ótimo 4.

As reações de remoção de cor que utilizam como catalisador a enzima peroxidase só acontecem na presença de peróxido de hidrogênio. Para o corante Azul Brilhante e Preto Remazol, a concentração de peróxido de hidrogênio requerida para altos rendimentos das reações é proporcional à concentração de corante.

O rendimento das reações de descoloração e a quantidade de corante removido mostrou-se ser dependente da concentração de corante presente na solução. A relação entre a concentração de corante e a quantidade de corante removido (mg/L) para os corantes Azul Brilhante, Azul Turqueza e Preto Remazol, entre 12,5 e 200 mg/L, pode ser representada por uma função linear, onde a concentração de corante removido é diretamente proporcional a concentração de corante na amostra. Para o corante Vermelho CQ4BL esta relação foi observada somente até a concentração de 100 mg/L.

A toxicidade dos corantes têxteis Azul Brilhante, Azul Turqueza, Preto Remazol e Vermelho CQ4BL, frente ao organismo indicador *Daphnia magna*, aumentou após o tratamento enzimático. Sendo que os corantes que tiveram uma maior descoloração apresentaram maior toxicidade.

Todas as soluções de corantes têxteis tiveram sua toxicidade, frente ao organismo teste *Vibrio fischeri*, aumentada após o tratamento enzimático. Entretanto, o perfil de toxicidade das soluções de corante antes e após o tratamento enzimático frente a este organismo foi diferente do apresentado pela *Daphnia magna*. A solução de corante Azul Brilhante após o tratamento enzimático foi a que apresentou maior toxicidade frente ao organismo *D. magna* (FT 16). Frente ao organismo *V. fischeri*, a solução que apresentou maior toxicidade foi a do corante Preto Remazol, também após o tratamento enzimático (FT 32).

O organismo *V. fischeri* mostrou-se, de maneira geral, ser mais sensível aos efeitos tóxicos causados pelos corantes têxteis antes e após o tratamento enzimático do que o organismo teste *D. magna*. Sendo que, mesmo os corantes na concentração de 100 mg/L apresentaram toxicidade. Apenas as soluções do corante Azul Brilhante, antes e após o tratamento, apresentaram o mesmo FT para ambos os organismos teste.

No teste comportamental com a alga *Euglena gracilis*, foi possível observar que as soluções de corantes antes e após o tratamento não inibiram o processo fotossintético, avaliada pelo rendimento da fotossíntese, e não causaram danos ao aparato fotossintético, avaliado pela ETR.

Nos testes crônicos utilizando o organismo *Daphnia magna*, a longevidade de todos os grupos estudados, exceto do Vermelho CQ4BL tratado a 10 mg/L, foram iguais ou superiores a 80%. Dentre as concentrações estudadas neste teste, a única que apresentou efeito letal, portanto, foi a solução de corante Vermelho CQ4BL a 10 mg/L após o tratamento enzimático. Os testes realizados com os corantes Azul Turqueza, Azul Brilhante, Preto Remazol e Vermelho CQ4BL antes do tratamento a 1 e 5 mg/L não influenciaram na fecundidade da *D. magna*. Sendo que, o corante Vermelho CQ4BL foi o único corante que não alterou a fecundidade do organismo teste no período de tempo testado, mesmo na concentração de 10 mg/L. Após o tratamento, todas as amostras do corante Azul Turqueza, diminuíram a fecundidade do organismo teste. Para os corantes Preto Remazol e Vermelho CQ4BL, as amostras de corante após o tratamento, nas concentrações de 5 e 10 mg/L aumentaram significativamente a fecundidade da *D. magna*. Nos testes realizados com o corante Azul Brilhante após o tratamento enzimático a fecundidade não foi alterada.

Considerando o potencial de aplicação de enzimas na remoção da cor e os estudos de toxicidade que indicaram, em sua maioria, que os metabólitos formados após as reações enzimáticas, com a enzima peroxidase, são mais tóxicos do que a molécula inicial do corante, a

combinação com outro tipo de tratamento, físico-químico ou biológico, pode ser útil para reduzir a toxicidade. Desta forma, sugere-se estudar o tratamento enzimático associado a outros tipos de tratamento e, estudar os efeitos crônicos das soluções de corantes têxteis antes e após o tratamento enzimático com outras gerações do organismo teste *Daphnia magna*.



## REFERÊNCIAS

ABIT, 2012. **Perfil do Setor. Dados Gerais do Setor atualizados em 2012, Referentes ao Ano de 2011.** Disponível em: [http://www.abit.org.br/site/navegacao.asp?id\\_menu=1&id\\_sub=4&id\\_ma=PT](http://www.abit.org.br/site/navegacao.asp?id_menu=1&id_sub=4&id_ma=PT) acesso em 15 jan., 2013.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12713:** Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com *Daphnia* spp. São Paulo, 2004a.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15088:** Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com Peixes. São Paulo, 2004b.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 15411-3:** *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do Efeito Inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de Vibrio Fischeri (ensaio de bactéria luminescente).* Rio de Janeiro, 2012.

AGARRY S. E., AJANI A. O. Evaluation of Microbial Systems for Biotreatment of Textile Waste Effluents in Nigeria: Biodecolorisation and Biodegradation of textile Dye. **J. Appl. ci. Environ. Manage.**, v.15, n. 1, p. 79-86, mar., 2011.

AHMED, Hoda; HADER, Donat-Peter Häder. A Fast Algal Bioassay for Assessment of Copper Toxicity in Water using *Euglena gracilis*. **J Appl Phycol**, v. 22, p. 785–792, 2010.

ALMEIDA, Vitor de Cinque. **Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação e Extração de Corantes Têxteis em Efluentes Industriais.** 2006. 124 f. Tese (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós- Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

ALMEIDA, D. G.; SILVA, M. G. C.; MIRANDA, R. C. M.; MACIEL, C. C. S.; GUSMÃO, N. B. Descoloração do Corante Índigo Carmim e Produção de Lacase por Fungos Filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 5, p.1-10, 2012.

ANDRADE, Rui Miguel Sanches Linhares de. **Efeitos da Exposição de Peixe Zebra, *Danio rerio*, a um Efluente Têxtil**. 2004. 100 f.

Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2004.

ANSELMO, Ana Maria. ALMEIDA-VARA, Elsa; SENA-MARTINS, Gabriela; FERREIRA-LEITÃO, Viridiana Santana. Enzimas em Catálise. In BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

ARAGÃO, M. A., ARAÚJO, R. P. A.. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATO, P. A., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, 2006. 478p.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: Rima, 2003. 322 p.

AZIZULLAH, RICHTER, Peter; HÄDER, Donat-Peter. Toxicity Assessment of a Common Laundry Detergent using the Freshwater Flagellate *Euglena gracilis*. **Chemosphere**, n. 84, p. 1392-1400, 2011.

BABAN, A., YEDILER, A., LIENERT, D., KEMERDERE, N., KETTRUP, A. Ozonation of High Strength Segregated Effluents from a Woollen Textile Dyeing and Finishing Plant. **Dyes and Pigments**, v. 58, p. 93-98, 2003.

BAKER, N. R. ROSENQVIST, E. Applications of Chlorophyll Fluorescence can Improve Crop Production Strategies: an Examination of Future Possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1607-1621, 2004.

BEATON, M.J. & HEBERT P.D.N. Variation in chromosome numbers of *Daphnia* (Crustacea, Cladocera). **Hereditas**, v. 120. p. 275-279, 1994.

BEATRICI, A. C.; ARENZON, A; COIMBRA, N. J.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Fertilidade e Sensibilidade de *Daphnia similis* e

*Daphnia magna* Submetidas a Diferentes Cultivos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, p. 123-126, 2006.

BERTOLETTI, E. Sensibilidade de Algumas Espécies de Peixes de Água Doce Utilizadas no Brasil. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 4, n. 1-3, p. 9-13, 2009.

BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. Horseradish peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, p. 562 – 567, 2001.

BORZANI, Walter *et al.* **Biociencia Industrial: Fundamentos**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 1, 2001.

BRENTANO, Débora Monteiro. **Desenvolvimento e Aplicação do Teste de Toxicidade Crônica com *Daphnia magna***: Avaliação de Efluentes Tratados de um Aterro Sanitário. 2006. 145 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Curso de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M.. **Engenharia Enzimática**, 1ª ed., Lisboa: Lidel, 2003.

CAZARIN, Karen Cristine Ceroni; CORRÊA, Cristiana Leslie; ZAMBRONE, Flávio Ailton Duque. Redução, Refinamento e Substituição do uso de Animais em Estudos Toxicológicos: uma Abordagem Atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 40, n. 3, jul./set., 2004.

CHACKO, Joshni. T.; SUBRAMANIAM, Kalidass. Enzymatic Degradation of Azo Dyes – A Review. **International Journal of Environmental Sciences**, v.7, n.1, p 250 -1260, 2011.

CHAMPAGNE, P.P.; RAMSAY, J.A. **Dye Decolorization and Detoxification by Laccase Immobilized on Porous Glass Beads**. **Bioresour. Technol.** 101, p. 2230–2235, 2010.

CLAUS, H.; FABER, G.; KÖNIG, H. Redox-mediated Decolorization of Synthetic Dyes by Fungal Laccases. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 59, p. 672-678, 2002.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Norma Técnica L5.227**: Teste de Toxicidade com a Bactéria Luminescente *Vibrio fischeri*: Método de Ensaio. São Paulo: CETESB, 2001. 14 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução n° 357**, de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução n° 430**, de 13 de maio de 2011. Legislação Federal: Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005. Brasília, 2005.

CORRÊA, Cássia Aparecida Rabelo; AQUINO, Sérgio Francisco de, CALDAS, Paula Cristina de Paula; SILVA, Silvana de Queiroz. Uso de Extrato de Levedura como Fonte de Carbono e de Mediadores Redox, para a Degradação Anaeróbia de Corante Azo. **Eng Sanit. Ambient.**, v.14, n.4, p. 559-568, out/dez, 2009.

COSTA, Carla Regina; OLIVI, Paulo Olivi; BOTTA, Clarice M. R.; ESPÍNDOLA, Evaldo L. G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, Adilson Ben da; DALBERTO, Daiana. Avaliação da Compatibilidade entre Processos Produtivos e os Ecossistemas Locais pela Determinação da Capacidade Suporte dos Recursos Hídricos: um Estudo de Caso em Santa Cruz do Sul, RS. **Revista Produção Online**, v.10, n.4, dez., 2010.

COUTO, Susana Rodríguez; TOCA-HERRERA, José Luis. Lacasses in the Textile Industry. *Biotechnol. Mol. Biol. Ver.*, v.1, n. 4, p. 115-120, Dec., 2006.

CUBAS, Karina Guedes ; MORAIS, Josmaria Lopes de. Correlação de Análises Físico-químicas e Ensaio de Toxicidade. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 2011, Londrina. **Anais - Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, 2011**. v. II., 2011.

DAMATO, M. ; CAMPOS, F. ; LAGE FILHO, F. A. ; PIVELI, R. P. Avaliação da Toxicidade Aguda de Efluentes de Lagoa Facultativa Clorada para *Daphnia similis*. In: XXX CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO INTERAMERICANA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL - AIDIS, 2006, Punta del este / Uruguai. **Anais do XXX Congresso da Associação Interamericana de Engenharia Sanitária e Ambiental - AIDIS**, v. 01, 2006.

**DEVLIN, Thomas M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. 7 ed.** São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2011. 1296 p.

DIAS, Alexandre Magno de Paula; BRRENTANO, Débora Monteiro; PINTO, Cátia Regina Silva de Carvalho; MATIAS, William Gerson. Avaliação da Toxicidade Aguda de Fluidos de Corte Utilizados em Processos de Usinagem Usando como Organismos-teste *Poecilia reticulata* e *Daphnia magna*. **Revista Biotemas**, v. 19, n.3, set., 2006.

DUNFORD, H. B. **Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties**, Peroxidases in Chemistry and Biology, v. 02, p. 1-25, 225-227, 1991.

DURÁN, N.; ESPÓSITO, E. Potential Applications of Oxidative Enzymes and Phenoloxidase-like Compounds in Wastewater and Soil Treatment: a Review. **Appl. Catal. B: Environ**, v. 28, p. 83-89, 2000.

EINICKER-LAMAS, Marcelo; MEZIAN, Gustavo Antunes; FERNADES, Thiago Benevides; SILVA, Fabio Leandro S.; GUERRA, Flávio; MIRANDA, Kildare; ATTIAS; OLIVEIRA, Mecia M. *Euglena gracilis* as a Model for the Study of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> Toxicity and Accumulation in Eukaryotic Cells. **Environmental Pollution**, n. 120, p. 779-786, 2002.

EL HADDAD, Mohammadine; REGTI, Abdelmajid; LAAMARI, My Rachid; MAMOUNI, Rachid; SAFFaj. Use of Fenton Reagent as Advanced Oxidative Process for Removing Textile Dyes from Aqueous Solutions. **J. Mater. Environ. Sci.**, v. 5, n. 3, p. 667-674, 2014.

FANCHIANG, J.M., TSENG, D.H. Degradation of Anthraquinone Dye C.I. Reactive Blue 19 in Aqueous Solution by Ozonation. **Chemosphere**, v. 77, p. 214-221, 2009.

FARIAS, Simone. **Utilização da Enzima Horseradish peroxidase na Lavagem Pós-Tingimento para Remoção de Corante Reativo Não Fixado às Fibras de Algodão**. 2013. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

FENT, Karl. Ecotoxicological Problems Associated with Contaminated Sites. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 353-365, 2003.

FIESC, 2011. **Indústria têxtil e do Vestuário de SC**. Disponível em: <[http://www2.fiescnet.com.br/web/pt/site\\_topo/pei/info/textil-e-vestuario](http://www2.fiescnet.com.br/web/pt/site_topo/pei/info/textil-e-vestuario)>. Acesso em 15 de jan., 2013.

FLOHR, Letícia; CASTILHOS JÚNIOR, Armando Borges de Castilhos; MATIAS, William Gerson. Acute and Chronic Toxicity of Soluble Fractions of Industrial Solid Wastes on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **The Scientific World Journal**, v. 2012.

FORGIARINI, Eliane. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima Horseradish Peroxidase (HRP)**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FREIRE, Flavio Bentes; FREITAS, Sandra Lembo de. Avaliação da Remoção de Cor de um Efluente Têxtil Sintético. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 7, n. 3, p. 241-249, jul./set., 2010.

FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE DE SANTA CATARINA - FATMA. **Portaria n° 017/02** de 18 de abril de 2002. Limites Máximos de Toxicidade Aguda para Efluentes de Diferentes Origens, 2002.

GELBER, R. D. et al. Statistical Analysis. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Eds.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology**. 662p. p. 110-123, 1985.

GOMES, A. I. de E. **Avaliação da Ecotoxicidade de Águas Superficiais Aplicação à Bacia Hidrográfica do Rio Leça**. 2007. 184 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, 2007.

GONÇALVES, Marcel Jefferson. **Biodescoloração de efluentes têxteis**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós – Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

GUARATINI C. C. I.; ZANONI M.V. B. Corantes Têxteis. **Química nova**, v. 23, n.1, p. 71-78, 2000.

GUIMARÃES, Eduardo Santos; LAVA, Pedro Magalhães; MAGALHÃES, Neili Peixoto. Avaliação da Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* na Água Captada no Rio Paraíba do Sul e Processada na Estação de Tratamento de Água do Município. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 9, n. 2, p. 124-130, abr/jun., 2004.

HAMADA, Natália. **Ensaio de Toxicidade Empregados na Avaliação de Efeitos no Sistema de Tratamento de Esgotos e Efluentes, Ete Suzano, e seu Entorno, Utilizando Organismos Aquáticos**. 2008. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

HASSEMER, Maria Eliza Nagel; SENS, Maurício Luiz. Tratamento do Efluente de uma Indústria Têxtil por Processo Físico-químico com Ozônio e Coagulação/floculação. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 7, n. 1, p.1-7, 2002.

HONG-MEI, L.; NICELL, J. A. Biocatalytic Oxidation of Bisphenol A in a Reverse Micelle System Using Horseradish peroxidase. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4428-4437, 2008.

HUSAIN Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water. **Critical Rev in Biotechnol.**, v. 26, p. 201–221, 2006.

ISO – International Organization for Standardization, 1996, **Water Quality-Determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – Crustacea)**. (E) 12 p. ISO 6341.

JAMAL, F., QIDWAI, T., PANDEY, PRABHASH K., SINGH R., SINGH, S. Azo and Anthraquinone Dye Decolorization in Relation to its Molecular Structure Using Soluble 79 Trichosanthes Dioica

Peroxidase Supplemented with Redox Mediator. **Catalysis Communications**, v. 12, n. 13, p. 1218-1223, 2011.

JONSSON, S., & BAUN, A. Toxicity of Mono-and Diesters of O-phthalic Esters to a Crustacean, a Green Alga, and a Bacterium. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 22, n.12, p. 3037-3043, 2003.

KALSOOM, Umme; ASHRAF, Syed Salman , MEETANI, Mohammed A, RAUF, Muhammad A.; BHATTI, Haq Nawaz. Mechanistic Study of a Diazo Dye Degradation by Soybean Peroxidase. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 93. p. 1-10, 2013.

KNIE, J. L. W. & LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações**. Florianópolis: FATMA / GTZ, 2004. p. 289.

KUHN, Rosmary Milla ´n de; STREB, Christine Streb; BREITER, Roman; RICHTER, Peter, NEEBE, Thomas; HADER, Donat-Peter. Screening for Unicellular Algae as Possible Bioassay Organisms for Monitoring Marine Water Samples. **Water Research**, v. 40, p. 2695-2703, 2006.

KUNZ, Airton; PERALTA-ZAMORA, Patricio; MORAES, Sandra Gomes de; DÚRAN, Nelson. Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Obtenção de Nova Fonte de Peroxidase de Folha de Copaifera langsdorffii Desf com Alta Atividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 735-739, 2006.

MADDHINNI, Vasantha Laxmi; VURIMINDI, Hima Bindu; YERRAMILI, Anjaneyulu. Degradation of Azo Dye with Horseradish peroxidase (HRP). **J. Indian Inst. Sci.**, v. 86, p. 507-514, Sept./Oct., 2006.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO FILHO, Aloysio da Silva. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Bras.**, v. 12, n.3, p.355-381, 2008.

MAGRIS, R. A.; PASSAMANI, F.; BINDA, F. P. BINDA; FERNANES, L. L. Utilização de Testes de Toxicidade com Embriões da Ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) para Avaliação da Eficiência de uma Estação de Tratamento de Esgotos de Vitória (ES). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 1, p. 49-52, 2006.

MANSKE, Cintia. **Estudo da Cinética de Degradação do Corante Azul Brillhante G Catalisada pela Peroxidase da Raiz Forte**. 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química)- Programa de Pós- Graduação em Química, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

MARCELINO, Rafaela Brito Portela; FRADE, Paulo Ricardo; AMORIM, Camila Costa de; LEÃO, Mônica Maria Diniz. Tendências e Desafios na Aplicação de Tecnologias Avançadas para o Tratamento de Efluentes Industriais Não Biodegradáveis: Atuação do Grupo de Pesquisas POA Control da UFMG. *Rev. ufmg, belo horizonte*, v. 20, n.2, p. 358-383 jul./dez, 2013.

MARTINS, J. ; OLIVA TELES, L; VASCONCELOS, V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as Alert Systems in Aquatic Toxicology. **Environment International**, v. 33, p. 414-425, 2007.  
MARTINS, Leonardo madeira; SILVA, Carlos Ernando da; NETO, José Machado Moita; LIMA, Álvaro Silva; MOREIRA, Regina de Fátima Peralta Muniz. Aplicação de Fenton, Foto-Fenton e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no Tratamento de Efluente Têxtil Sintético Contendo o Corante Preto Biozol UC. *Eng. Sanit. Ambient.*, v.16, n.3, p. 261-270, jul/set 2011.

MILLÁN DE KUHN, R; STREB, C; BREITER, R; RICHTER, P; NEEBE, T; HÄDER, D-P. Screening for Unicellular Algae as Possible Bioassay Organisms for Monitoring Marine Water Samples. **Water Research**, n. 40, p. 2695-2700, 2006.

MINARDI, Bruno Degaspari **Estudos Morfofisiológicos de Duas Samambaias Epífitas da Mata Atlântica: *elaphoglossum luridum* (fée) christ (dryopteridaceae) e *Vittaria lineata* (L.) Smith (pteridaceae)**. 2012. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) -Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MOHAN, S.V.; PRASAD, K.K.; RAO, N.C.; SARMA P.N. Acid Azo Dye Degradation by Free and Immobilized Horseradish peroxidase (HRP) Catalyzed Process. **Chemosphere**, v. 58, p. 1097 – 1105, 2005.

MONTIBELLER, Mateus Mário **Remoção de Fenol de Águas Residuárias Método de Polimerização e Precipitação com Enzima Horseradish peroxidase (HRP)**, Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

NICELL, J.A.; WRIGHT, H., "A model of Peroxidase Activity with Inhibition by Hydrogen Peroxide", **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 4, p. 302-310, 1997.

NIELSEN, H. D.; NIELSEN, S. L. Evaluation of Imaging and Conventional PAM as a Measure of Photosynthesis in Thin- and Thickleaved Marine Macroalgae. **Aquat. Biol.**, v. 3, p.121–131, 2008.

NTEFIDOU, Maria, ISEKI, Mineo; WATANABE, Masakatsu, LEBERT, Michael, HADER, Donat-Peter. Photoactivated Adenylyl Cyclase Controls Phototaxis in the Flagellate *Euglena gracilis*. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1517-1521, dec. 2003.

O'BRIEN, A. M., O'FAGAIN C. Dye Bleaching and Phenol Precipitation by Phthalic Anhydride-modified Horseradish peroxidase. **J Chem Technol Biotechnol**; 75: 363-368. 2000.

ODIER, E.; ARTAUD, I. **Degradation of lignin**. IN Microbial Degradation of Natural Products. Ed. G. Winkelman, VCH Verlag, p. 161-191, Germany, 1992.

OLIVEIRA-FILHO, Eduardo Cyrino; DA\_MATTA, Anndressa Camillo; CABRAL, Lucianna Lopes; VEIGA, Leticia Falcão Veiga; PAUMGARTTEN, Francisco José Roma. Comparison Between Four and Seven-day *Ceriodaphnia dubia* Survival and Reproduction Test Protocols Using Oil Refinery Effluent Samples. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 51, n.1: p.137-142, Jan./Feb., 2008

PACHECO, Sabrina M. V.; SOARES, Carlos Henrique L. Imobilização e Caracterização de Lacase e seu Uso na Biodegradação de Efluentes de Indústrias Papeleiras. **Quim. Nova**, v.37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PARVEZ, S., VENKATARAMAN; C; MUKHERJI, S. A Review on Advantages of Implementing Luminescence Inhibition Test (*Vibrio fischeri*) for Acute Toxicity Prediction of Chemicals. **Environment international**, v. 32, p. 265–268, 2006.

PEIXOTO, F.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Corantes Têxteis: Uma Revisão. **Holos**, Ano 29, v.5, p. 98-106, 2103

PEREIRA, A. R.; YOKOYAMA, L.; ALHADEFF, E. M. Remoção de Cor Utilizando Enzima Horseradish Peroxidase e Peróxido de Hidrogênio. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 [Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2]**. São Paulo: Blucher, p. 8156-8163, 2015.

*PERIN, G. Ecotoxicologia Integrada Quantitativa. Joinville: Editora Univille. 2005. 350 p.*

PERLATTI, Bruno; SILVA, Maria F. Das Graças Fernandes da; FORIM, Moacir Rossi. Validation and Application of HPLC–ESI-MS/MS Method for the Quantification of RBBR Decolorization, a Model for Highly Toxic Molecules, Using Several Fungi Strains. **Bioresour. Technol.** v.124, p. 37–44, 2012.

PINTO, Luciano Henrique. **Estudo das Alterações na Atividade Fotossintética e no Comportamento Geral das Algas do Gênero *Euglenas gracilis* na Presença dos Hormônios de 17 $\alpha$  Etinilestradiol e 17  $\beta$  Estradiol**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente) – Departamento de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2012.

POUGH, F. Harvey; HEISER, John B.; JANIS, Cristine M. **A Vida dos Vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 684 p.

PRITCHARD; J. B. Aquatic Toxicology: Past, Present, and Prospects. **Environmental Health Perspectives**, v. 100, p. 249-257, 1993.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. **Introduction to Aquatic Toxicology**. In: RAND, G. M. (Ed) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**. Washington: Taylor & Francis, p.3-67, 1995.

RAUF, Muhammad A., ASHRAF, S. Salman. Survey of Recent Trends in Biochemically Assisted Degradation of Dyes. **Chemical Engineering Journal**, 209 p.520–530, 2012

REIS, Luiz Gustavo Teixeira dos. Degradação do Corante Vermelho Congo em Solução Aquosa através de Plasma Obtido por Eletrólise de Alta Tensão. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Pós-graduação de Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

REVIERS, B. de. **Biologia e Filogenia das Algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 280p.

RODRIGUES; Déborah Oliveira; SILVA, Sergio Luiz Rodrigues da; SILVA, Maria do Socorro Rocha da. Avaliação Ecotoxicológica Preliminar das Águas das Bacias Hidrográficas dos rios Tarumã, São Raimundo e Educandos. **Acta Amazônica**, v. 39, n.4, p. 935-942, 2009.

ROUTTU, J.; JANSEN, B.; COLSON, I.; DE MEESTER, L. & EBERT, D. The First-generation *Daphnia magna* linkage map. **BMC Genomics** 2010, 11:508, 2010.

RUBINGER, C. F. **Seleção de Métodos Biológicos para a Avaliação Toxicológica de Efluentes Industriais**. 2009. 89 p. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Programa de Pós - Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6ed. São Paulo: Roca, 1996. 1029 p.

SHAFFIQU, T. S.; ROY J. J., NAIR, R. A., ABRAHAM, T. E.. Degradation of Textile Dyes Mediated by Plant Peroxidases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 102–103. 2002.

SCHMITT, S. **Remoção de Corante Disperso Não-fixado de Fibras de Poliéster Através de Uso de Enzimas Oxidoredutases para Redução de Águas de Lavagem**. 2010. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

SLEIMAN, M. *et al.* Photocatalytic Degradation of Azo Dye Metanil Yellow: Optimization and Kinetic Modeling Using a Chemometric Approach. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 77, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

SILVA, A. C. **Tratamento do Percolado de Aterro Sanitário e Avaliação da Toxicidade do Efluente Bruto e Tratado**. 2002. 126 f. Tese (Mestrado em Engenharia Civil) Programa de Pós-graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2002.

SILVA, J. M. da; SANTOS, J R dos. Toxicologia de Agrotóxicos em Ambiente Aquático. **Oecol. Bras.**, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007.

SILVA FILHO, Heraldo Antunes; SANTOS, Elivânia Vasconcelos M. dos; SAMPAIO, Glória Maria M. Silva; RODRIGUES, Kelly de Araújo; ARTHAUD, Isabelle. Ensaio de Toxicidade e Remoção de Corantes Têxteis por Processo Biológico. **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa**. João Pessoa, 2007.

SILVA, Michelle Reis da. **Estudo da Enzima Horseradish peroxidase (HRP) no Descoramento dos Corantes Têxteis Azul Drimaren X-3LR, Azul Drimaren X-BLN, Rubinol Drimaren X-3LR e Azul Drimaren CL-R**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

SILVA, Fabiana Melo da; SANTANA, Sirlane Aparecida Abreu; BEZERRA, Cícero Wellington Brito; SILVA, Hildo Antonio dos Santos Silva. Adsorção do Corante Têxtil Azul de Remazol R por Pseudocaule da Bananeira (*Musa sp*). **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 17, n. 3, set/dez., 2010.

SILVA, Maria Cristina; CORREA, Angelita Duarte; TORRES, Juliana Arriel. Descoloração de Corantes Industriais e Efluentes Têxteis Simulados por Peroxidase de Nabo (*Brassica campestris*). **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012.

SILVA, Maria Cristina; TORRES, Juliana Arriel; SÁ, Lívian Ribeiro Vasconcelos de; CHAGAS, Pricila Maria Batista; LEITÃO, Viridiana

Santana Ferreira; CORRÊA, Agelita Duarte. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 122–129, 2013.

SOUZA, Claudio Roberto de Lima. **Degradação de Corantes Reativos e Remediação de Efluentes Têxteis por Processos Avançados Envolvendo Ferro Metálico**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E.; SOUZA, A. A. U. Toxicity of Dyes and Their Degradation by the Enzyme Horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p. 1073-1078, 2007.

SUDHA, M., SARANYA, A., SELVAKUMAR, G; SIVAKUMAR, N.. Microbial Degradation of Azo Dyes: A Review. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v.3, n. 2, p. 670-690, 2014.

TAHEDL, H.; HÄDER, D. P. Fast Examination of Water Quality Using the Automatic Biotest Ecotox Based on the Movement Behavior of a Freshwater Flagellate. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 426-432, fev., 1999.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R. Reproduction and Survival of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Cladocera) under Different Hardness Conditions. **Acta Limnologica Brasiliis**, v.15, n.2, p. 51-55, 2003.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R; CORREA, L. M. Ação Tóxica do Sedimento do Rio dos Sinos na Sobrevivência e na Reprodução de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea). In: VI Congresso de Ecologia do Brasil, 2003, Fortaleza. **Anais do VI Congresso de Ecologia do Brasil**. Fortaleza, 2003, p. 397-399.

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R; NUNES, E. **Efeito do Sedimento do Rio Gravataí na Reprodução e na Sobrevivência de *Daphnia magna*, 1820, Straus (Crustacea: Cladocera)**. In: IV Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, 2004, Porto Alegre. **Anais do IV Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental**. Porto Alegre, 2004, T436 – meio digital.

VASQUES, Andressa Regina. **Caracterização e Aplicação de Adsorvente para Remoção de Corantes de Efluentes Têxteis em Batelada e Colunas de Leito Fixo**. 2008. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a Modern View of a Classic Enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.

VIDOTTI, Eliane Cristina, ROLLEMBERG, Maria do Carmo E. Algas: da Economia nos Ambientes Aquáticos à Bioremediação e à Química Analítica. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5 ed. Washington, D.C.: U.S.EPA, 2002a. 266p.

UMBUZEIRO, Gisela de Aragão; KUMMROW, Fábio Kummrow; REI, Fernando Fernandes Cardozo. Toxicologia, Padrões de Qualidade de Água e a Legislação. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente** - v.5, n.1, Resenha, jan./abr., 2010.

UMBUZEIRO, Gisela de Aragão; RODRIGUES, Paulo Fernando. O Teste de Toxicidade com Bactérias Luminescentes e o Controle da Poluição das Águas. **Rev. O Mundo da saúde**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 444-449, out./dez., 2004.

WILLEMANN, R. L. Development of an Application of the ECOTOX System in the Estuarine Zone of the Baía da Babitonga, SC, Brazil, **Master Thesis**, Friedrich-Alexander University, Erlangen-Nürnberg, Germany. p. 1-72, 2002.

WHITE, A. J.; CRITCHLEY, C. Rapid Light Curves: a New Fluorescence Method to Assess the State of the Photosynthetic Apparatus. **Photosynth. Res.**, v. 59, n. 1, p. 63-72, 1999.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. São Carlos: Rima Editora, 2006. 478p.

ZANONI, Maria Valnice Boldrin; CARNEIRO, Patricia Alves. O Descarte dos Corantes Têxteis. **Ciência hoje**, v. 29, n. 174, p. 61-71, 2001.

ZHANG, Anping; FANG, Li; WANG, Juliana; LIU, Weiping.  
Enzymatic Decolorization of Orange II: Optimization by Response  
Surface Methodology and Pathway. **Environmental Progress &  
Sustainable Energy**, p. 2-8, 2012.

## ANEXO A - Ficha técnica da enzima Horseradish peroxidase

PEO-131-301-302

● TOYOBO ENZYMES ●

(Diagnostic Reagent Grade)

**PEROXIDASE***from Horseradish*

Donor: hydrogen-peroxidase oxidoreductase (EC 1. 11. 1. 7)

**PREPARATION and SPECIFICATION**

PEO-301/302 are isolated from horseradish root in our own method. PEO-131 is chromatographically separated from the other isoenzymes using SP Sephadex C-50 by the modified method of Paul et al.<sup>1)</sup> The peroxidase fractions having equal RZ values (ca.3.3) are combined to generate the preparation. This preparation has an RZ value of ca.3.3 and is electrophoretically homogeneous. On the other hand, Grade III is partially purified preparation.

Appearance	: Reddish-brown amorphous powder, lyophilized
Activity	Grade I 250 Purpurogallin U/mg-solid or more (-131) (RZ ≥ 3.0, salt free) Grade III 110 Purpurogallin U/mg-solid or more (-301) (RZ ≥ 2.0, containing approx. 30% of stabilizers) Grade III 180 Purpurogallin U/mg-solid or more (-302) (RZ ≥ 2.0, salt free)
Contaminant	: Phosphatase ≤1.0 × 10 <sup>-9</sup> % (Grade III)

**PROPERTIES**

Stability	: Stable at -20°C for at least one year	(Fig.1,2)
Molecular weight	: approx. 40,000	
Structure	: Glycoprotein with one mole of protohaemin IX <sup>2)</sup>	
Inhibitors	: Cyanide, sulfide, fluoride, azide <sup>3)</sup>	
Optimum pH	: 6.0-7.0	(Fig.3)
Optimum temperature	: 45°C	(Fig.4)
pH Stability	: pH 5.0-10.0 (25°C, 20hr)	(Fig.5)
Thermal stability	: below 50°C (pH 6.0, 10min)	(Fig.6)
Effect of various chemicals	: (Table 1)	

**APPLICATIONS**<sup>4-11)</sup>

This enzyme is useful for enzymatic determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in clinical analysis. Especially, the highly purified preparation (Grade I) is useful as a protein tracer in histo- and cyto-chemistry and as a valuable experimental tool in hodological neurography. Also, the enzyme preparation has been used as an enzyme label in enzyme immunoassay. Grade III (-302) is suitable for dry chemistry. On the other hand, the enzymes contribute for the reduction of phehol in waste water.

## ASSAY

### Principle:



The appearance of Purpurogallin is measured at 420nm by spectrophotometry.

### Unit definition:

One purpurogallin unit causes the formation of one milligram of purpurogallin in 20 seconds under the condition described below.

### Method:

#### Reagents

- A. Pyrogallol solution : 5% (W/V)(Should be prepared fresh).  
 B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution : 0.147M [Dilute 1.67ml of 30% (W/V) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to 100ml with H<sub>2</sub>O] (Should be prepared fresh)  
 C. Phosphate buffer, pH6.0 : 0.1M  
 D. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution : 2.0N

#### Procedure

- Prepare the following reaction mixture in a test tube (32 φ × 200mm) and equilibrate at 20°C for about 5 minutes.
 

14.0ml	H <sub>2</sub> O	
2.0ml	Pyrogallol solution	(A)
1.0ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> solution	(B)
2.0ml	Phosphate buffer, pH6.0	(C)

Concentration in assay mixture	
Phosphate buffer	15 ml
Pyrogallol	40 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.4ml

- Add 1.0ml of the enzyme solution\* and mix.
- After exactly 20 seconds at 20°C, add 1.0ml of 2.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (D) to stop the reaction.
- Extract the produced purpurogallin from the above stopped reaction mixture in five times with 15ml portion of ether and fill up the combined ether extracts to 100ml with fresh ether.
- Measure the optical density at 420nm against water (OD test).

At the same time, prepare the blank by first mixing the reaction mixture with 1.0ml of 2.0 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (D) after 20 a sec-incubation at 20°C, followed by the addition of the enzyme solution and extract it with ether by the same procedure as the test (OD blank).

- \* Dissolve the enzyme preparation in ice-cold 0.1M phosphate buffer, pH 6.0 (C), dilute to 3.0–6.0 μg purpurogallin U/ml with the same buffer and store on ice.

#### Calculation

Activity\*\* can be calculated by using the following formula.

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{\Delta \text{OD}(\text{OD test} - \text{OD blank}) \times \text{df}}{0.117 \times \text{Vs}} = \Delta \text{OD} \times 8.547 \times \text{df}$$

$$\text{Weight activity (U/mg)} = (\text{U/ml}) \times 1/\text{C}$$

Vs : Sample volume (1.0ml)

0.117 : Optical density at 420 nm corresponding to 1mg% of Purpurogallin in ether.

df : Dilution factor

C : Enzyme concentration in dissolution (c mg/ml)

\*\*One purpurogallin unit is equivalent to 13.5 international units determined with o-dianisidine at 25°C.

## REFERENCES

- K.G.Paul and T.Stigbrand; *Acta Chem.Scand.*, **24**, 3607 (1970).
- L.M.Shannon et al.; *J.Biol.Chem.*, **241**, 2166 (1966).
- E.Kay et al.; *J.Biol.Chem.*, **242**, 2470 (1967).
- R.Lasek et al.; *Brain Res.*, **8**, 319 (1968).
- W.M.Cowan et al.; *Brain Res.*, **37**, 21 (1972).
- J.H.La Vall et al.; *Brain Res.*, **58**, 470 (1973).
- A.M.Graybiel and M.Devor; *Brain Res.*, **68**, 167 (1974).
- A.H.Bunt et al.; *Brain Res.*, **102**, 152 (1976).
- D.R.Colman et al.; *Brain Res.*, **102**, 156 (1976).
- M.Dubois-Dalcq et al.; *J.Histochem.Cytochem.*, **25**, 1201 (1977).
- M.Sato et al.; *Brain Res.*, **140**, 149 (1978).

**Table 1. Effect of Various Chemicals on Peroxidase**

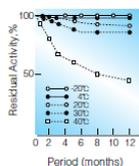
[The enzyme dissolved in 0.1M phosphate buffer, pH 6.0 (50U/ml) was incubated with each chemical at 25°C for 1hr.]

Chemical	Concn.(mM)	*Residual activity	Chemical	Concn.(mM)	*Residual activity
None	—	100%	MIA	2.0	99
Metal salt	2.0		NEM	2.0	97
MgCl <sub>2</sub>		102	IAA	2.0	99
CaCl <sub>2</sub>		102	Hydroxylamine	2.0	98
Ba(OAc) <sub>2</sub>		105	EDTA	5.0	95
FeCl <sub>3</sub>		98	o-Phenanthroline	2.0	98
CoCl <sub>2</sub>		97	α,α'-Dipyridyl	1.0	96
MnCl <sub>2</sub>		97	Borate	50	98
ZnCl <sub>2</sub>		99	NaF	2.0	98
CdCl <sub>2</sub>		99	NaN <sub>3</sub>	2.0	75
NiCl <sub>2</sub>		96	Triton X-100	0.10%	98
CuSO <sub>4</sub>		98	Brij 35	0.10%	80
Pb(OAc) <sub>2</sub>		96	Tween 20	0.10%	89
AgNO <sub>3</sub>		91	Span 20	0.10%	98
HgCl <sub>2</sub>		92	Na-cholate	0.10%	97
2-Mercaptoethanol	2.0	94	SDS	0.05%	98
PCMB	1.0	98	DAC	0.05%	102

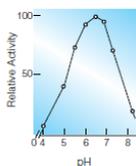
\*Residual activity was measured by 4AA-DEA method

4AA, 4-Aminoantipyrine; DEA, Diethylaniline

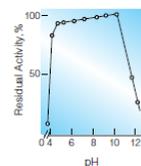
Ac, CH<sub>3</sub>CO; PCMB, p-Chloromercuribenzoate; MIA, Monoiodoacetate; NEM, N-Ethylmaleimide; IAA, Iodoacetamide; EDTA, Ethylenediaminetetraacetate; SDS, Sodium dodecyl sulfate; DAC, Dimethyl-benzyl-alkyl-ammonium chloride.



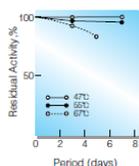
**Fig. 1. Stability (Powder form)**  
(kept under dry conditions)



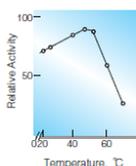
**Fig. 3. pH-Activity**  
(20°C, 20sec-reaction in 0.1M buffer solution; pH4.0-6.0, acetate; pH6.0-8.0, phosphate)



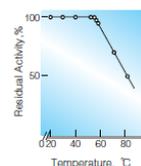
**Fig. 5. pH-Stability**  
(25°C, 20hr-treatment with 50mM buffer solution; pH3.5-6.0, acetate; pH6.0-8.0, phosphate; pH9.0-11.0 borate)



**Fig. 2. Stability (Powder form)**  
(kept under dry conditions)



**Fig. 4. Temperature activity**  
(20sec-reaction in 0.1M phosphate buffer, pH6.0)



**Fig. 6. Thermal stability**  
(10min-treatment with 50mM phosphate buffer, pH6.0)



## APÊNDICE A

Abaixo são apresentados os gráficos de remoção de corante em função da concentração dos corantes: Azul Brilhante, Azul Turqueza, Preto Remazol e Vermelho CQ4BL que demonstram a existência de uma relação linear entre a concentração de corante e sua remoção.

Figura 1a. Gráfico de remoção de corante em função da concentração do corante Azul Brilhante.

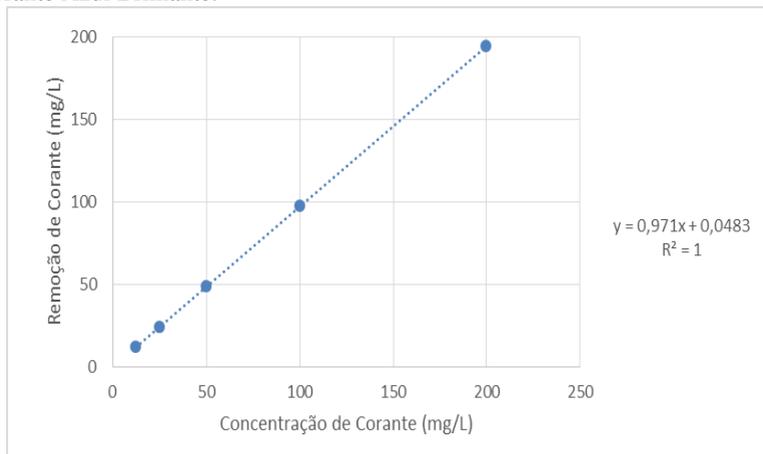


Figura 2a. Gráfico de remoção de corante em função da concentração do corante Azul Turqueza Remazol.

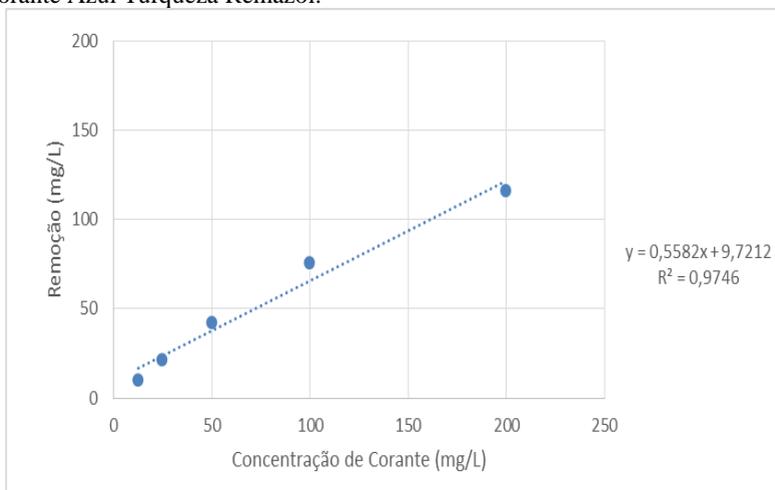


Figura 3a. Gráfico de remoção de corante em função da concentração do corante Preto Remazol.

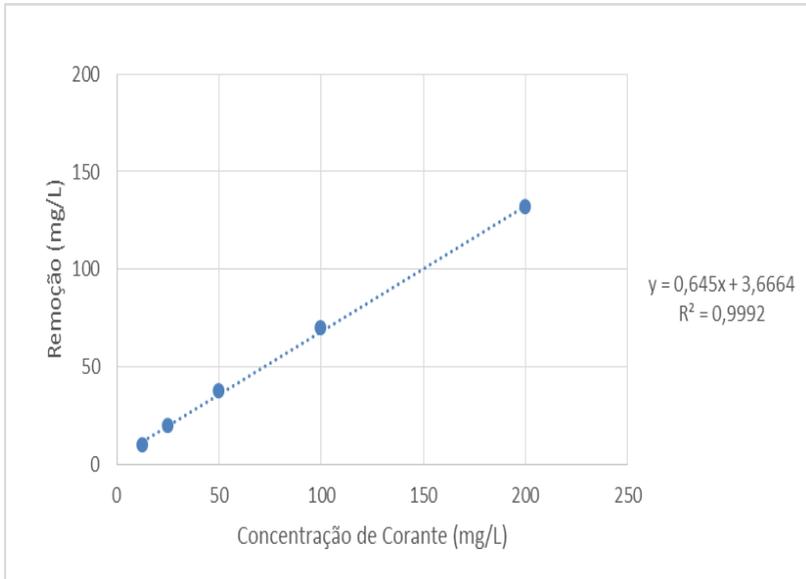
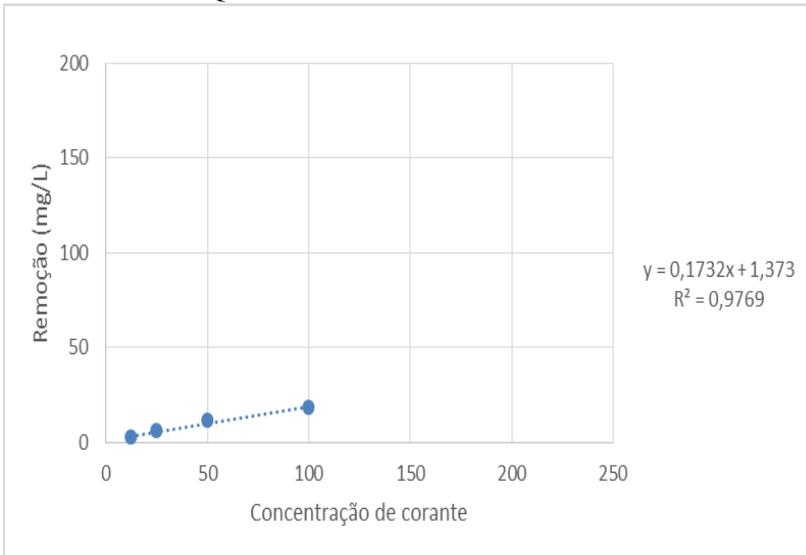


Figura 4a. Gráfico de remoção de corante em função da concentração do corante Vermelho CQ4BL.



## APÊNDICE B

Abaixo são apresentados todos os modelos cinéticos testados para os corantes: Azul Brillante, Azul Turquesa, Preto Remazol e Vermelho CQ4BL.

Figura 1b. Representação gráfica do estudo da cinética de descoloração do corante Azul brilhante segundo cinética de a) Primeira ordem, b) Segunda ordem, c) Pseudo primeira ordem e d) Pseudo segunda ordem.

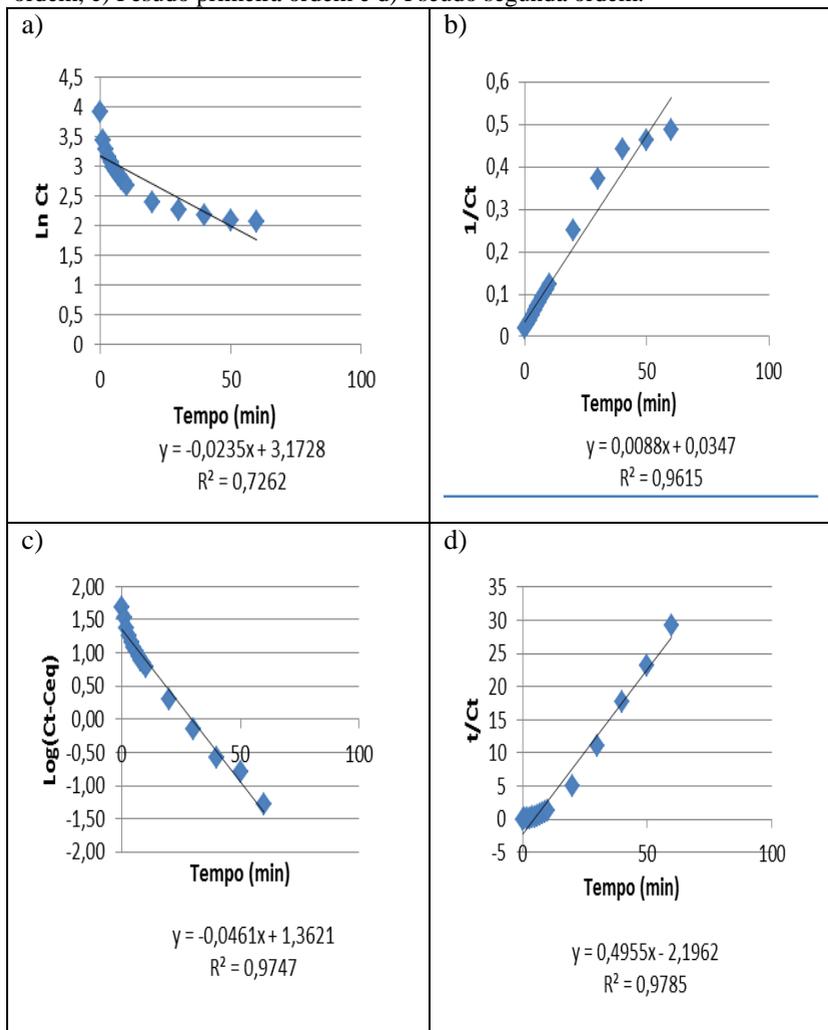


Figura 2b. Representação gráfica do estudo da cinética de descoloração do corante AzulTurqueza segundo cinética de a) Primeira ordem, b) Segunda ordem, c) Pseudo primeira ordem e d) Pseudo segunda ordem.

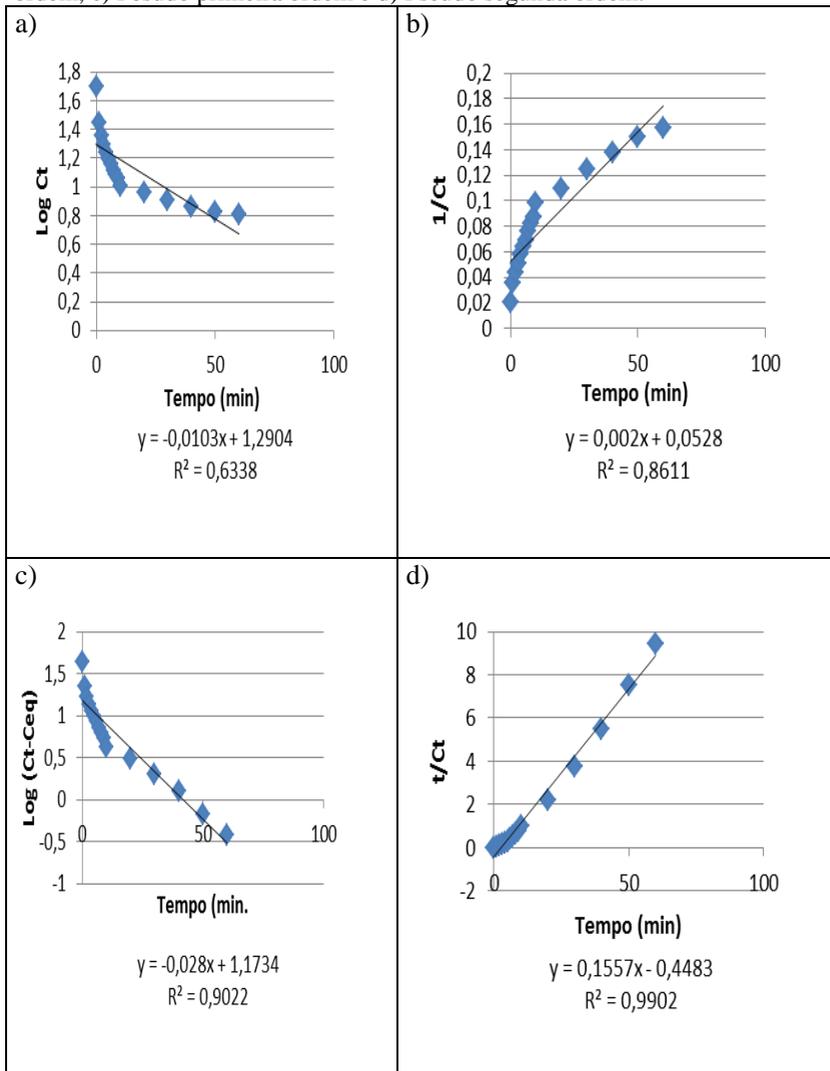


Figura 3b. Representação gráfica do estudo da cinética de descoloração do corante Preto Remazol segundo cinética de a) Primeira ordem, b) Segunda ordem, c) Pseudo primeira ordem e d) Pseudo segunda ordem.

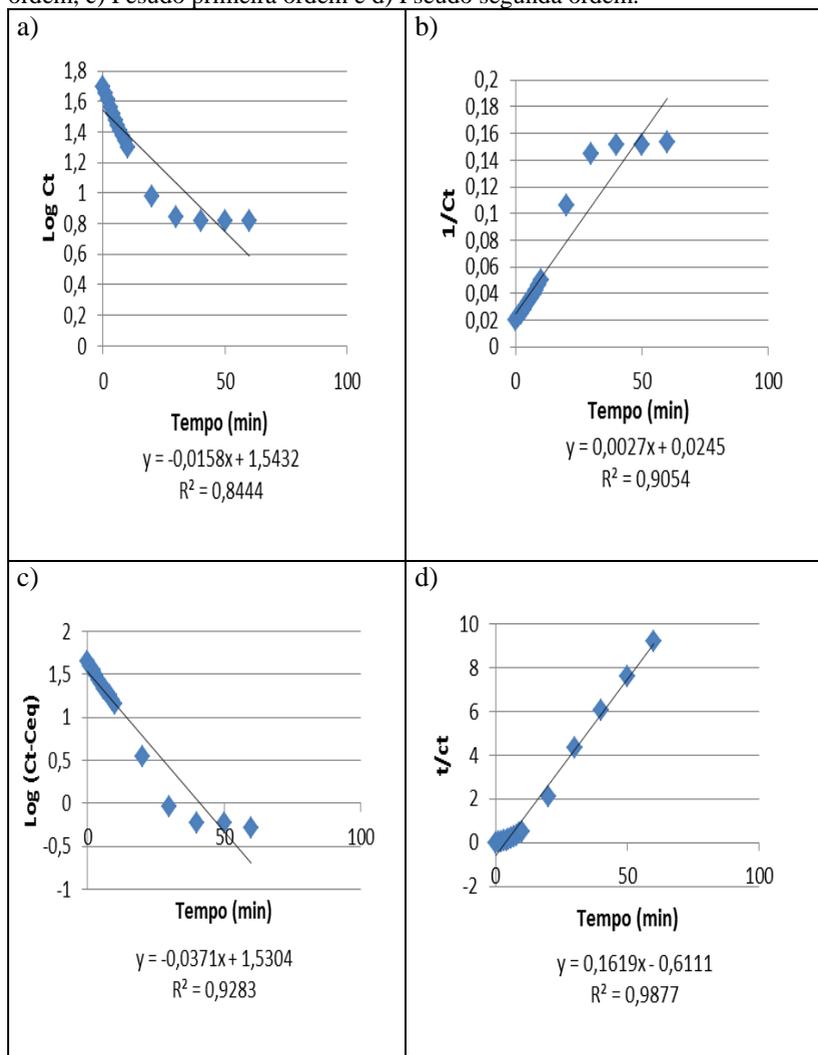


Figura 4b. Representação gráfica do estudo da cinética de descoloração do corante Vermelho CQ4BL segundo cinética de a) Primeira ordem, b) Segunda ordem, c) Pseudo primeira ordem a)

