

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

Simone Farias

**REÚSO DO EFLUENTE DO PROCESSO DE TINGIMENTO E  
UTILIZAÇÃO DA ENZIMA *Horseradish peroxidase* LIVRE E  
IMOBILIZADA PARA A REMOÇÃO DE CORANTES  
REATIVOS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA TÊXTIL**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
graduação em Engenharia Química da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do grau de  
doutor em Engenharia Química  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Selene M. A.  
Guelli Ulson de Souza  
Coorientador: Prof. Dr. Antônio  
Augusto Ulson de Souza

Florianópolis  
2017

Farias, Simone

Reúso do efluente do processo de tingimento e utilização da enzima Horseradish peroxidase livre e imobilizada para remoção de corantes reativos utilizados na indústria têxtil / Simone Farias ; orientadora, Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza ; coorientador, Antônio Augusto Ulson de Souza. - Florianópolis, SC, 2017.

179 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Corante reativo. 3. Reúso do efluente do processo de tingimento. 4. Imobilização de enzima. 5. Horseradish peroxidase. I. Arruda Guelli Ulson de Souza, Selene Maria de. II. Ulson de Souza, Antônio Augusto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Simone Farias

**REÚSO DO EFLUENTE DO PROCESSO DE TINGIMENTO E UTILIZAÇÃO DA ENZIMA *Horseradish peroxidase* LIVRE E IMOBILIZADA PARA REMOÇÃO DE CORANTES REATIVOS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA TÊXTIL**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 3 de março de 2017.

---

Prof.<sup>a</sup> Cíntia Soares, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Selene M. A. Guelli Ulson de Souza, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Antônio Augusto Ulson de Souza, Dr.  
Coorientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Débora de Oliveira, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Maria da Graça Nascimento, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Marcelo Lanza, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Damiani Sebrão, Dr.  
Universidade do Estado de Santa Catarina

---

Prof. Rogério Marcos Dallago, Dr.  
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões



Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Maria de Lourdes e Waldir, ao meu  
irmão Charles e ao meu amado  
namorado Diego Alex Mayer.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar saúde e força para realizar este trabalho.

À UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina e ao PosENQ – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, pelo suporte físico e acadêmico para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao LABSIN/LABMASSA, pela infraestrutura e suporte para a realização desse trabalho.

Aos meus orientadores, os professores Selene Maria de Arruda Guelli Ulson de Souza e Antônio Augusto Ulson de Souza, pela confiança depositada em mim.

À professora Débora de Oliveira pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do LABSIN/LABMASSA, pelos bons momentos em especial a Daniele Maass, Diego A Mayer, Diego Todescato, Fabíola V Hackbarth, Crisleine Zottis dos Reis e Laís Graziela de Melo da Silva.

Ao Diego Alex Mayer por todo suporte na realização deste trabalho, em especial, na simulação da transferência de massa e na formatação do trabalho.

Ao Diego Todescato, pela ajuda na interpretação da parte de planejamentos experimentais.

Ao Projeto “Linha Ecológica de Tecidos de Malha de Algodão - Da Pluma ao Tecido Acabado” financiado pela empresa Malwee, pela infraestrutura para a realização dos testes piloto e caracterização das amostras.

À Karsten, pela doação do corante amarelo reativo145.

Ao Sr. Marcus Müller e à empresa Toyobo, pela doação da enzima *Horseradish peroxidase*.

À Mannes, pela doação dos reagentes Tolueno diisocianato (TDI) e Polioli poliéter.

Ao técnico Leandro e à Central de Análises do EQA-UFSC, pelos testes de FTIR e texturômetro.

Ao técnico Américo e ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), pelas análises de Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Aos Professores Débora, Marcelo, Maria da Graça, Damianni e Rogério pelas contribuições dadas ao meu trabalho.

A todos que, embora não citados, contribuíram para a realização desse trabalho.





"Aquele que não tem coragem de assumir riscos  
não alcançará nada na vida."

(Muhammad Ali)



## RESUMO

Corantes reativos são estruturas complexas que quando descartadas no meio ambiente podem causar sérios danos ambientais. Neste trabalho foi utilizada a metodologia da superfície de resposta através de um planejamento  $2^4$  do tipo estrela, avaliando-se os principais fatores que influenciam na reação enzimática (concentração de enzima, peróxido de hidrogênio, corante e pH) e obtendo-se como resposta a descoloração do corante. As máximas remoções foram de 89 e 71% para os corantes azul reativo 221 (RB 221) e azul reativo 198 (RB 198), respectivamente. Utilizando-se os corantes vermelho reativo 195 (RR 195) e amarelo reativo 145 (RY 145) de forma isolada, não foram obtidas remoções. Quando o corante RB 221 foi avaliado na dicromia com o RR 195 e na tricromia com RR 195 e RY 145, foi observado um aumento na eficiência de remoção dos corantes azul e vermelho. Esse efeito sinérgico foi observado somente para o RB 198, quando estava presente na dicromia com o RR 195 e na tricromia com RR 195 e RY 145. Os resultados obtidos para a tricromia RB 198, RR 195 e RY 145 foram utilizados nos estudos de reúso do processo de tingimento. Observou-se que com reúso de 50% do efluente de tingimento foi obtido um valor maior de  $\Delta E^*$  do que o obtido com a lavagem enzimática que foi realizada com 100% de água limpa. No teste de escala piloto foi obtida uma economia de água e energia e ainda um tecido com uma baixa perda de cor ( $\Delta E^*$  de 0,6) e uma boa nota de solidez à lavagem (4). Os corantes RB 221 e RB 198 também foram avaliados em estudos de imobilização de enzimas utilizando como suporte alginato de cálcio. Nesses estudos a máxima remoção obtida foi de 93% para o RB 221 e de 75% para o RB 198, em pH 5,5, concentração de  $H_2O_2$  de 43,75  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 221 e 37,5  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 198, 30 °C, tempo de 180 min para o RB 221 e de 240 min para o RB 198, massa de cápsulas 0,120 g para o RB 221 e 0,110 g para o RB 198. Foi possível reusar o biocatalisador em até 3 vezes. O modelo numérico proposto para o alginato forneceu um bom ajuste em relação aos dados experimentais. Nos ensaios de imobilização utilizando espuma de poliuretano, a máxima degradação de 58% para o RB 221 e de 72% para o RB 198 foi obtida em pH 6 e 7, respectivamente, 30 °C, 30 min de reação, concentração de  $H_2O_2$  37,5  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 198 e 50,0  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 221.

**Palavras-chave:** Corante reativo. Reúso do efluente de tingimento. Imobilização. Enzima. *Horseradish peroxidase*.



## ABSTRACT

Reactive dyes are complex structures that when discharged into the environment cause serious environmental damage. In this work we used the methodology of response surface through a  $2^4$  experimental design of type star, evaluating the main factors that influence the enzymatic reaction (enzyme concentration,  $H_2O_2$ , dye and pH) and obtaining an answer to removal of the dye. The maximum removals were 89 and 71%, respectively, for the Reactive blue dye 221 (RB 221), and Reactive blue 198 (RB 198). Using the dyes reactive red 195 (RR 195) and reactive yellow 145 (RY 145) alone, removals were not obtained. When the dye RB 221 was evaluated in dichrome with the RR 195 and trichrome with RR 195 and RY 145, there was an increase in removal efficiency of blue and red dyes. This synergistic effect was observed only for RB 198 when it was present in the dichrome with the RR 195 and trichrome with RR 195 and RY 145. The results obtained for trichrome RB 198, RR 195 and RY 145 were used in the reuse studies of the dyeing process. It was observed that with a reuse of 50% of the dye effluent a higher value of  $\Delta E^*$  was obtained than that obtained with the enzymatic washing that was performed with 100% of clean water. In the pilot scale test, a water and energy saving was obtained, as well as a fabric with a low color loss ( $\Delta E^* 0.6$ ) and a good washing fastness (4). RB 221 and RB 198 dyes were also evaluated in enzyme immobilization studies using calcium alginate as support. In these studies, the maximum removal obtained was 93% for RB 221 and 75% for RB 198, at pH 5.5, concentration of  $H_2O_2$  of 43.75  $\mu\text{mol/L}$  for RB 221 and 37.5  $\mu\text{mol/L}$  for RB 198, 30 ° C, time of 180 min for RB 221 and 240 min for RB 198, capsule mass 0.120 g for RB 221 and 0.110 g for RB 198. It was possible to reuse the biocatalyst in up to 3 times. The numerical model proposed for alginate provided a good fit over the experimental data. In the immobilization tests using polyurethane foam, the maximum degradation of 58% for RB 221 and 72% for RB 198 was obtained at pH 6 and 7, respectively, 30 ° C, 30 min of reaction, concentration of  $H_2O_2$  37, 5  $\mu\text{mol/L}$  for RB 198 and 50.0  $\mu\text{mol/L}$  for RB 221.

**Keywords:** Reactive dye. Reuse of the dyeing effluent. Immobilization. Enzyme. *Horseradish peroxidase*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da cadeia celulósica. ....	41
Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de interação do corante reativo do tipo vinil sulfonato com a fibra celulósica. ....	41
Figura 3 - Representação dos grupos funcionais presentes nos corantes reativos. ....	43
Figura 4 - Estrutura do corante diazo Preto reativo 5. ....	44
Figura 5 - Estrutura do corante antraquinona Azul reativo 19. ....	44
Figura 6 - Principais grupos reativos utilizados no tingimento de fibras celulósicas. ....	45
Figura 7- Representação esquemática da estrutura cristalina da <i>Horseradish peroxidase</i> obtida através de difração de raio X. ....	46
Figura 8 - Ciclo catalítico da peroxidase. ....	48
Figura 9 - Esquema de degradação do corante Azul 21 pela peroxidase do nabo. ....	50
Figura 10 - Mecanismo de degradação do corante azo sulfonato por peroxidase. ....	52
Figura 11- Métodos de imobilização de enzimas. ....	54
Figura 12- Estrutura do alginato. ....	56
Figura 13- Reação de formação do poliuretano. ....	57
Figura 14 - Representação esquemática dos estudos da presença de um ou mais corantes em solução. ....	60
Figura 15- Estrutura química dos corantes utilizados neste trabalho. ....	62
Figura 16- Sequência de etapas do processo de tingimento. ....	67
Figura 17- Processo de lavagem enzimática. ....	68
Figura 18- Processo de lavagem química. ....	69
Figura 19 - Processo de reúso 1. ....	70
Figura 20- Processo de reúso 2. ....	71
Figura 21- Fluxograma simplificado do esquema de minimização das constantes cinéticas e resolução numérica das equações para o sistema com enzima livre. ....	81
Figura 22- Fluxograma simplificado do esquema de minimização dos coeficientes de transferência de massa e resolução numérica das equações para o sistema com enzima imobilizada. ....	83
Figura 23- Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RB 221. ....	90
Figura 24 - Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RB 198. ....	95
Figura 25- Curva de nível para os fatores $H_2O_2$ e enzima em relação à resposta descoloração do corante RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195. ....	101
Figura 26 - Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195. ....	104

Figura 27 - Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195.....	109
Figura 28 - Curva de nível para os fatores pH e enzima em relação à resposta descoloração do corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145...	115
Figura 29 - Curva de nível para os fatores pH e enzima em relação à resposta descoloração do corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145.....	121
Figura 30- Comparação entre a lavagem enzimática e reuso 1.....	125
Figura 31 - Comparação do reuso 2 com padrão e com o tingimento em água limpa com posterior lavagem com tensoativo EM8007.....	128
Figura 32 - Comparação entre padrão e reuso 1 feito em escala piloto.....	129
Figura 33- (a) e (b) Morfologia das cápsulas de alginato de cálcio com HRP imobilizada.....	131
Figura 34- Cinética de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP, (■) RB221 e (●) RB198. Condições: temperatura 30°C; pH 5,5; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50,00 µmol/L para o RB 198 e 43,75 µmol/L para o RB 221; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.....	133
Figura 35- Efeito do pH na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30°C; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50,00 µmol/L para o RB 198 e 43,75 µmol/L para o RB 221; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.....	135
Figura 36 - Efeito da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.....	136
Figura 37 - Efeito da temperatura na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 43,75 µmol/L; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.....	138
Figura 38 - Efeito da massa de cápsulas na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 43,75 µmol/L.....	139
Figura 39 - Reuso da enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio para remoção dos corantes RB 221 e RB 198. Condições: temperatura 30°C; pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 43,75 µmol/L; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.....	141
Figura 40 - Cápsulas de alginato de cálcio com enzima HRP imobilizada.....	142
Figura 41- Estudo de estabilidade na reação da remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: Temperatura 30 °C; pH 5,5 RB 221 e pH	



7,0 RB 198; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 43,75 μmol/L; massa de cápsulas 0,120 g para o RB 221 e 0,110 g para o RB 198. (a) (■) RB221L e (●) RB 221 I, HRP livre (L) e imobilizada (I) para remover RB 221 e (b) (■) RB198 L e (●) RB 198 I, HRP livre (L) e imobilizada (I) para remover RB 198.....	143
Figura 42 - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da <i>Horseradish peroxidase</i> imobilizada em EPU.....	145
Figura 43 - (a), (b), (c) e (d) Morfologia da HRP imobilizada em EPU. ....	146
Figura 44 - Cinética de remoção dos corantes (a) RB 221 e (b) RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 37,5 μmol/L para o RB 198 e 50,0 μmol/L para o RB 221; massa de espuma + 0,02 g.....	151
Figura 45 - Efeito do pH na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 37,5 μmol/L para o RB 198 e 50,0 μmol/L para o RB 221; massa de espuma + 0,02 g. ....	152
Figura 46 - Efeito da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30°C; pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; massa de espuma + 0,02 g.....	154
Figura 47 - Efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 37,5 μmol/L para o RB 198 e 50,0 μmol/L para o RB 221; massa de espuma + 0,02 g.....	155
Figura 48 - Estudo de estabilidade na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30°C; pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 37,5 μmol/L para o RB 198 e 50,0 μmol/L para o RB 221; massa de espuma + 0,02 g. (a) (■) RB 221L e (●) RB 221 I, HRP livre (L) e imobilizada (I) para remover RB 221 e (b) (■) RB198 L e (●) RB 198 I, HRP livre (L) e imobilizada (I) para remover RB 198.....	157
Figura 49 - Comparação da remoção de corante experimental e simulada usando HRP livre: (a) (○) RB 221 dados experimentais, (linha contínua) RB 221 simulado e (linha pontilhada) simulando produto; (b) (□) RB 198 dados experimentais, (linha contínua) RB 198 simulado e (linha pontilhada) simulando produto.....	161
Figura 50 - Comparação da remoção de corante experimental e simulada da remoção de corantes usando HRP imobilizada: (a) (○) RB 221 dados experimentais, (linha contínua) RB 221 simulado e (linha pontilhada) produto simulado; (b) (□) RB 198 dados experimentais, (linha contínua) RB 198 simulado e (linha pontilhada) produto simulado.....	163



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Limites de tolerância para utilização de água em processos têxteis...	40
Tabela 2 - Resumo de trabalhos da literatura de remoção de corante com peroxidase.....	49
Tabela 3 - Propriedades da enzima <i>Horseradish peroxidase</i> .....	63
Tabela 4 - Variáveis e níveis de estudo utilizados no planejamento experimental. ....	65
Tabela 5 - Picos máximos de absorvância dos corantes utilizados.....	66
Tabela 6 - Planejamento experimental da descoloração enzimática do corante RB 221.....	86
Tabela 7 - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 221.....	88
Tabela 8 - Análise de variância para o corante RB 221. ....	91
Tabela 9 - Planejamento experimental da descoloração enzimática do corante RB 198.....	92
Tabela 10 - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 198.....	94
Tabela 11- Análise de variância para o corante RB 198.....	96
Tabela 12 - Planejamento experimental da descoloração enzimática dos corantes RB 221+ RR 195. ....	98
Tabela 13 - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195. ....	100
Tabela 14 - Análise de variância para o corante RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195.....	102
Tabela 15 - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195. ....	103
Tabela 16 - Análise de variância para o corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195.....	105
Tabela 17 - Planejamento experimental da descoloração enzimática dos corantes RB 198+ RR 195. ....	106
Tabela 18 - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 198 na dicromia RB 198+ RR 195. ....	108
Tabela 19 - Análise de variância para o corante RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195.....	110
Tabela 20 - Planejamento experimental da descoloração enzimática dos corantes RB 221+ RR 195 + RY 145.....	112
Tabela 21 - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145. ....	114
Tabela 22 - Análise de variância para o corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195+ RY 145. ....	116
Tabela 23 - Descoloração do corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR195+ RY 145.....	118
Tabela 24 - Cálculo dos efeitos e dos seus respectivos índices estatísticos para o corante RB 198 na mistura RB 198+ RR 195 + RY145. ....	120

Tabela 25 - Análise de variância para o corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195+ RY 145. ....	122
Tabela 26- Síntese dos resultados obtidos na etapa de estudo da presença de mais de um corante em solução. ....	123
Tabela 27 - Comparação dos tecidos tingidos sem lavagem (padrão) em relação aos tecidos do processo de reúso e lavagem enzimática. ....	124
Tabela 28 - Solidez à lavagem dos tecidos após o reúso do efluente e lavagem enzimática. ....	126
Tabela 29 - Reúso 2 com posterior lavagem com tensoativo EM8807 e comparado com a lavagem com tensoativo EM8007. ....	127
Tabela 30- Solidez à lavagem dos tecidos após o reúso 2 e lavagem química. ....	128
Tabela 31- Características texturais das cápsulas de alginato de sódio. ....	132
Tabela 32- Características texturais da espuma de poliuretano. ....	147
Tabela 33 - Estudos de imobilização em diferentes concentrações de enzima HRP e remoção do corante RB 221. Condições da reação de remoção do corante RB 221: temperatura 30°C; pH 6,0; concentração de corante 40,0 mg/L; tempo 30 min; concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50,0 µmol/L. ....	148
Tabela 34 - Estudos de efeito do pH na imobilização da HRP em EPU. ....	149
Tabela 35- Síntese de trabalhos da literatura utilizando enzimas imobilizadas em diversos suportes para remoção de corantes comparados aos resultados obtidos neste trabalho. ....	159
Tabela 36- Dados cinéticos da remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela HRP livre. ....	160
Tabela 37 - Parâmetros de transferência de massa e de processo na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela HRP imobilizada. ....	162

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs <sub>inicial</sub>	absorbância inicial
Abs <sub>final</sub>	absorbância final
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
Aba 1	preto ácido 1
Aba 194	preto ácido 194
ABIT	Associação Brasileira da Indústria Têxtil e de Confecção
ANOVA	análise de variância
Are	vermelho ácido 42
CIElab	sistema de coordenadas retangulares de medida de cor
CAS	número de registro dos corantes
C.I	Colour Index (Catálogo da Society of Dyers and Colourist)
CNI	confederação Nacional das Indústrias
Des	modelo de descoloração
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DB80	azul direto 80
DR23	vermelho direto 23
DY4	amarelo direto 4
DQO	demanda química de oxigênio
EPU	espuma de poliuretano
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
FIESP/CIESP	Federação das Indústrias do Estado de São Paulo/ Centro das Indústrias do Estado de São Paulo
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PU-PEG	poliuretano peguilado
PVA	álcool polivinílico
R 49	azul reativo 49
R 243	vermelho reativo 243
RB	Relação de banho
RBBR	azul brilhante remazol
RBU69	azul reativo 69
RB 198	azul reativo 198
RB 221	azul reativo 221
RR 195	Vermelho reativo 195
RR 239	vermelho reativo 239
RY 145	amarelo reativo 145
SS	sólidos suspensos
TDI	tolueno diisocianato



## LISTA DE SÍMBOLOS

$A$	atividade enzimática (U/mL)
$a^*$	alteração de cor no eixo vermelho/verde
$b^*$	alteração de cor eixo Amarelo/Azul
$C_m^{exp}$	concentração experimental da literatura no ponto m
$C_m^{num}$	concentração numérica no ponto m
$D$	corante degradado (%)
$D_{eP}$	difusividade efetiva do produto ( $m^2/s$ )
$D_{eS}$	difusividade efetiva do substrato ( $m^2/s$ )
$\Delta A$	variação da absorbância
$\Delta E^*$	diferença de cor em relação a um padrão
$E$	enzima (mg/L)
$\varepsilon$	coeficiente de extinção molar
$\varepsilon_P$	porosidade da partícula
$\varepsilon_r$	porosidade do reator
$ES$	complexo enzima-substrato (mg/L)
$K$	quilo ( $10^3$ )
$K_{mS}$	constante para o substrato (mg/L)
$k_2$	constante de velocidade (L/(mg min))
$K_{eq}$	constante de equilíbrio
$k_{LS}$	coeficiente de massa do substrato (m/s)
$k_{LP}$	coeficiente de transferência do produto (m/s)
$K_{mP}$	constante para o produto de Michaelis-Menten (mg/L)
$L^*$	luminosidade
$m$	ponto da amostra no reator
$n$	número de pontos experimentais
$\mu$	micro ( $10^6$ )
$\mu_{max}$	velocidade máxima de reação (1/min)
$P$	produto (mg/L)
$P_p$	concentração de produto na fase sólida (mg/L)
$P_b$	concentração de produto na fase líquida (mg/L)
$pH$	potencial hidrogeniônico
$r$	coordenada radial
$R$	raio da partícula (m)
$R^2$	coeficiente de correlação
$S$	substrato (mg/L)
$S_{b,0}$	concentração inicial de substrato na fase líquida (mg/L)
$S_b$	concentração inicial de produto na solução líquida (mg/L)
$S_p$	concentração de substrato na fase sólido (mg/L)
$\rho_P$	densidade aparente da partícula (Kg/m)
$t$	tempo (min)
$T$	temperatura ( $^{\circ}C$ )

$U$	unidade de atividade enzimática
$V_{total}$	volume total de solução na cubeta (mL)
$V_{extrato}$	volume de extrato enzimático (mL)
$v$	velocidade de reação (1/min)
$\lambda$	Comprimento de onda (nm)



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>35</b>
1.2. OBJETIVOS.....	37
<b>1.2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>1.2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>39</b>
2.1. Indústria têxtil e o grande volume de água consumido.....	39
2.2. Fibra têxtil: Algodão.....	40
2.3. Corantes reativos.....	42
<b>2.3.1. Classificação dos corantes reativos.....</b>	<b>43</b>
2.3.1.1. Grupos cromóforos.....	43
<b>2.3.1.1.1. Azo.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3.1.1.2. Antraquinona.....</b>	<b>44</b>
2.3.1.2. Grupos Reativos.....	45
2.4. Enzimas.....	45
<b>2.4.1 Peroxidases.....</b>	<b>47</b>
2.4.1.1. Degradação de corantes com enzimas: um estudo dos subprodutos.....	49
<b>2.4.2. Imobilização de enzimas.....</b>	<b>53</b>
2.4.2.1. Alginato.....	55
2.4.2.2. Espuma de poliuretano (EPU).....	57
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
3.1. Materiais.....	61
<b>3.1.1. Corantes.....</b>	<b>61</b>
<b>3.1.2. Substrato Têxtil.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1.3. Enzima.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1.4. Equipamentos.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1.5. Reagentes.....</b>	<b>63</b>
3.2. Métodos.....	64
<b>3.2.1. Determinação da atividade enzimática da <i>Horseradish peroxidase</i> (HRP).....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.2. Estudos de degradação enzimática e efeito da presença de mais de um corante em solução.....</b>	<b>65</b>

<b>3.2.3. Medidas de cor das soluções.....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.4. Tingimentos.....</b>	<b>66</b>
<b>3.2.5. Lavagens pós-tingimento.....</b>	<b>67</b>
3.2.5.1. Lavagem enzimática.....	67
3.2.5.2. Lavagem química.....	68
<b>3.2.6. Reúso da solução de tingimento Reúso 1.....</b>	<b>69</b>
3.2.6.1. Tingimento na solução de reúso Reúso 2.....	70
<b>3.2.7. Análise dos tecidos.....</b>	<b>71</b>
3.2.7.1. Avaliação da perda de cor.....	71
3.2.7.2. Avaliação da solidez à lavagem.....	72
<b>3.2.8. Estudos em escala piloto.....</b>	<b>72</b>
3.3. Materiais.....	73
<b>3.3.1. Corantes.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3.2. Enzima.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3.3. Equipamentos.....</b>	<b>73</b>
<b>3.3.4. Reagente.....</b>	<b>73</b>
3.4. Métodos.....	74
<b>3.4.1. Determinação da atividade enzimática da <i>Horseradish peroxidase</i> (HRP).....</b>	<b>74</b>
<b>3.4.2. Imobilização da enzima HRP.....</b>	<b>74</b>
<b>3.4.3. Imobilização da enzima HRP em alginato de cálcio.....</b>	<b>74</b>
3.4.3.1. Caracterização da enzima imobilizada em alginato.....	75
3.4.3.1.1. Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	75
3.4.3.1.2. Caracterização de textura.....	75
<b>3.4.4. Reações de remoção dos corantes reativos pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio.....</b>	<b>75</b>
3.4.4.1. Preparação da espuma de poliuretano (EPU).....	76
3.4.4.2. Imobilização de HRP em EPU.....	76
3.4.4.2.1. Caracterização da enzima imobilizada em EPU.....	76
3.4.4.2.2. Quantidade ótima de enzima imobilizada em EPU.....	76
3.4.4.2.3. Reações de remoção dos corantes reativos pela enzima HRP imobilizada em EPU.....	77
<b>3.4.5. Modelo cinético de reações enzimáticas para enzima livre e imobilizada em alginato de cálcio: otimização e simulação.....</b>	<b>77</b>
3.4.5.1. Balanço do reator em batelada: Enzima livre.....	78

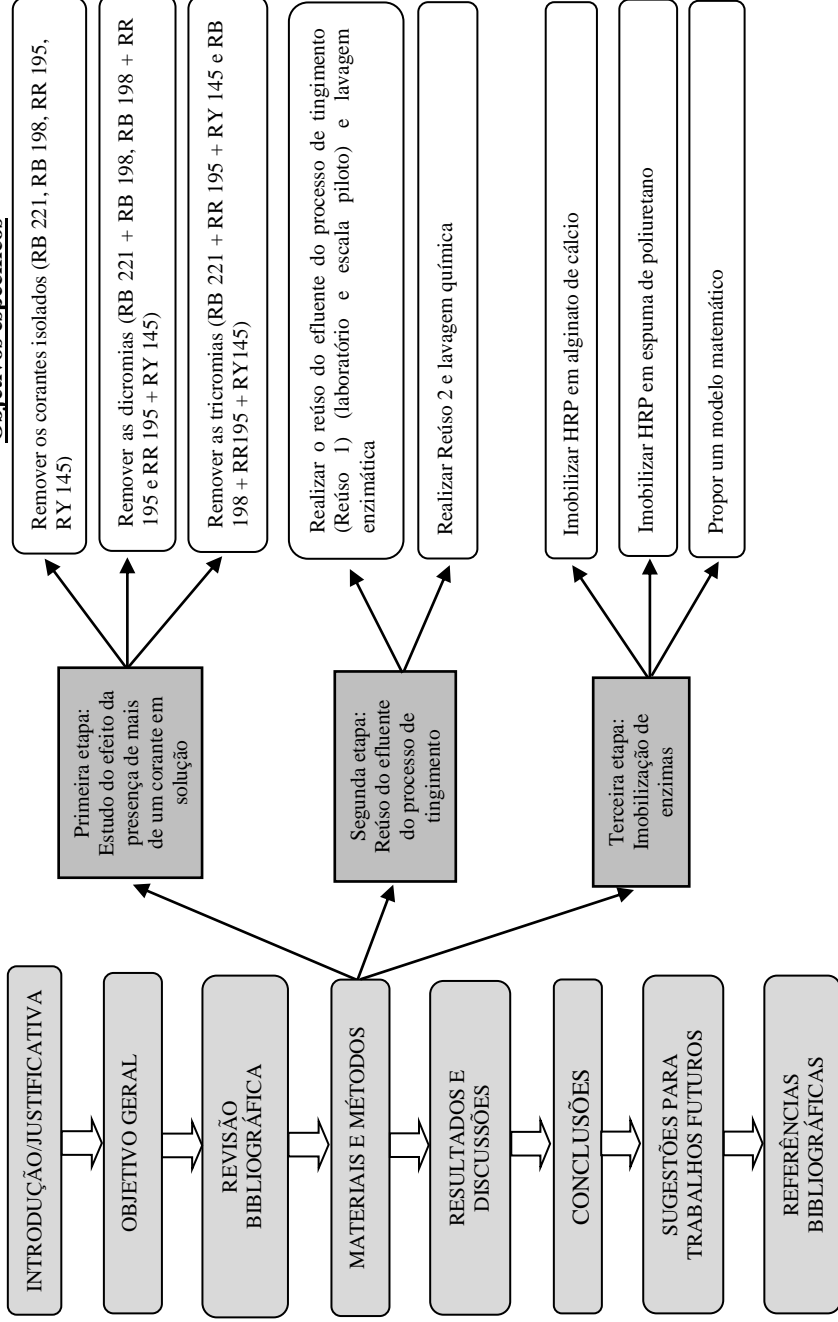
3.4.5.2. Balanço do reator em batelada: Enzima imobilizada.....	78
3.4.5.3. Estimativa das constantes cinéticas, coeficientes de transferência de massa e solução numérica.....	80
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
4.1. Estudo do efeito da presença de mais de um corante em solução.....	85
<b>4.1.1. Remoção enzimática do corante Azul 221 (RB 221).....</b>	<b>85</b>
<b>4.1.2. Degradação enzimática do corante Azul 198 (RB 198).....</b>	<b>91</b>
<b>4.1.3. Degradação enzimática do corante Amarelo 45 (RY 145).....</b>	<b>96</b>
<b>4.1.4. Degradação enzimática do corante Vermelho 195 (RR 195).....</b>	<b>97</b>
<b>4.1.5. Degradação enzimática da dicromia RB 221 + RR 195.....</b>	<b>97</b>
4.1.5.1. Degradação enzimática do RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195.....	97
4.1.5.2. Degradação enzimática do RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195.....	102
<b>4.1.6. Degradação enzimática da dicromia RB 198 + RR 195.....</b>	<b>105</b>
4.1.6.1. Degradação enzimática do RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195.....	105
4.1.6.2. Degradação enzimática do RR 195 na dicromia RB 198 + RR 195.....	110
<b>4.1.7. Degradação enzimática da dicromia RR 195 + RY 145.....</b>	<b>110</b>
<b>4.1.8. Degradação enzimática da tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145.....</b>	<b>111</b>
4.1.8.1. Degradação enzimática do RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145.....	113
4.1.8.2. Degradação enzimática do RR 195 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145.....	116
4.1.8.3. Degradação enzimática do RY 145 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145.....	117
<b>4.1.9. Degradação enzimática da tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145.....</b>	<b>117</b>
4.1.9.1. Degradação enzimática do RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145.....	119
4.2. Reúso do efluente do processo de tingimento.....	124
<b>4.2.1. Avaliação da perda de cor do tecido (<math>\Delta E^*</math>).....</b>	<b>124</b>
<b>4.2.2. Avaliação da solidez à lavagem.....</b>	<b>126</b>
<b>4.2.3. Reúso 2 e posterior lavagem com tensoativo EM8007.....</b>	<b>126</b>
<b>4.2.4. Teste em escala piloto.....</b>	<b>129</b>
4.3. Caracterização da enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio.....	131
<b>4.3.1. Morfologia da superfície das cápsulas de alginato de cálcio com a enzima HRP imobilizada.....</b>	<b>131</b>

<b>4.3.2. Estudos de textura da cápsula de alginato com enzima imobilizada.....</b>	<b>132</b>
4.4. Estudos de degradação dos corantes RB 221 e RB 198 utilizando enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio.....	133
<b>4.4.1. Cinética de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio.....</b>	<b>133</b>
<b>4.4.2. Efeito do pH na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio.....</b>	<b>134</b>
<b>4.4.3. Efeito da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio.....</b>	<b>136</b>
<b>4.4.4. Efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio.....</b>	<b>137</b>
<b>4.4.5. Efeito da massa de cápsulas de alginato de cálcio com enzima HRP imobilizada para remoção dos corantes RB 221 e RB 198.....</b>	<b>139</b>
<b>4.4.6. Reúso da enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio para remover os corantes RB 221 e RB 198.....</b>	<b>140</b>
<b>4.4.7. Estabilidade na reação da HRP imobilizada em alginato de cálcio para remoção dos corantes RB 221 e RB 198.....</b>	<b>142</b>
4.5. Caracterização da enzima HRP imobilizada em espuma de poliuretano (EPU).....	144
<b>4.5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da HRP imobilizada em EPU.....</b>	<b>144</b>
<b>4.5.2. Morfologia da HRP imobilizada em EPU.....</b>	<b>146</b>
<b>4.5.3. Estudos de textura da EPU com enzima imobilizada.....</b>	<b>147</b>
<b>4.5.4. Efeito da concentração de enzima HRP na imobilização em EPU... </b>	<b>148</b>
<b>4.5.5. Efeito do pH na imobilização da enzima HRP em EPU.....</b>	<b>149</b>
4.6. Estudos de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 utilizando enzima imobilizada em EPU.....	150
<b>4.6.1. Cinética de reação na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada EPU.....</b>	<b>150</b>

4.6.2. Efeito do pH na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em EPU.....	152
4.6.3. Efeito da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em EPU.....	153
4.6.4. Efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em EPU.....	155
4.6.5. Reúso da enzima HRP imobilizada em EPU para remover os corantes RB 221 e RB 198.....	156
4.6.6. Estabilidade da HRP imobilizada em EPU para remoção dos corantes RB 221 e RB 198.....	157
4.7. Modelagem matemática e estimativa das constantes cinéticas em HRP livre.....	160
4.8. Modelagem matemática e estimativa dos parâmetros de transferência de massa para HRP imobilizada.....	161
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>165</b>
5.1. Conclusões.....	165
5.2. Sugestões para trabalhos futuros.....	166
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>167</b>
<b>APÊNDICE A- Ficha técnica da enzima <i>Horseradish peroxidase</i>.....</b>	<b>181</b>



Organograma do documento da tese.







# 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

Corantes reativos são amplamente utilizados nas indústrias têxteis para o tingimento de fibra de algodão, porém nem todo corante adicionado na etapa de tingimento se fixa à fibra, parte desse acaba hidrolisando durante o processo e remanesecendo no efluente final.

Esses corantes são muito eficientes apresentando como características uma grande variedade de cor e uma boa solidez à lavagem, contudo quando descartados inadequadamente nos corpos d'água podem causar sérios danos ambientais, por possuírem altos valores de DQO, DBO, pH e forte coloração e também propriedades carcinogênicas e mutagênicas que podem alterar os ciclos biológicos.

Na literatura são descritos vários métodos que são utilizados para remover corantes de efluentes têxteis como, por exemplo, reagente fenton, ozonólise, métodos fotoquímicos, degradação eletroquímica, adsorção, filtração por membrana entre outros, contudo esses métodos possuem limitações, como o alto custo ou o longo tempo de processo.

Atualmente destaca-se a utilização de enzimas da classe das oxidoredutases como peroxidases, livres ou imobilizadas, para degradação de corantes do efluente têxtil. Essas enzimas podem ser utilizadas em condições mais brandas de temperatura, um menor tempo de reação, apresentando boa eficiência de remoção de corantes e um menor custo em relação a outros processos. Entre as peroxidases mais utilizadas destaca-se a *Horseradish peroxidase*, que tem a capacidade de remover uma grande variedade de compostos aromáticos como corantes, fenóis, anilinas entre outros.

Neste trabalho é proposto o tratamento enzimático e o reúso do efluente do processo de tingimento, utilizando 50% do efluente de tingimento, como forma de economizar água e energia. Também é proposto realizar uma lavagem enzimática no tecido, com enzima *Horseradish peroxidase*, para remover o corante não fixado à fibra, procurando obter padrões de coloração e solidez à lavagem desejados pelas indústrias. A grande vantagem desse reúso é realizar esse processo sem a adição de aditivos como sequestrantes e tensoativos, utilizar um curto tempo de reação, condições brandas de temperatura e pH neutro, utilizando ainda uma pequena quantidade de enzima e peróxido de hidrogênio.

As enzimas livres podem ser utilizadas para degradar corantes com boa eficiência de remoção, no entanto podem apresentar algumas limitações para degradar grandes volumes de efluentes como: a perda da atividade, menor estabilidade térmica e variação do pH. Neste trabalho,

adicionalmente, é investigada a imobilização de enzima em diferentes suportes, visando estudar os melhores suportes para realizar a imobilização da enzima *Horseradish peroxidase* e verificar sua capacidade para remover corantes.

A imobilização de enzimas pode apresentar várias vantagens como aumento da estabilidade, facilidade de purificação e recuperação e principalmente a possibilidade de reutilização. A imobilização pode ser realizada tanto em polímeros naturais como quitina, quitosana, ágar ágar, gelatina e alginato de cálcio, como também em polímeros sintéticos como PVA, nylon, silicone e poliuretano.

Existem na literatura vários estudos utilizando enzimas imobilizadas em alginato de cálcio para degradar corantes com bons índices de remoção. Porém ainda não foi reportado um modelo numérico de transferência de massa que consiga prever os perfis de remoção de corante ao longo do tempo utilizando tanto a enzima livre quanto a enzima imobilizada. Neste trabalho é apresentado um modelo para avaliar a transferência de massa na cápsula de alginato e os perfis de remoção da enzima livre, determinando-se também as constantes cinéticas.

A espuma de poliuretano também tem sido muito estudada como suporte de imobilização, principalmente por seu baixo custo e facilidade de preparação. Existem vários trabalhos descritos na literatura utilizando enzimas lipases imobilizadas em espuma de poliuretano para diversas aplicações. Porém praticamente não existem trabalhos que estudam a viabilidade desse polímero como suporte de enzimas como peroxidases para remoção de corantes reativos. Neste trabalho é proposto o estudo da viabilidade em utilizar espuma de poliuretano com peroxidase imobilizada para remover corantes reativos.

A redução e o tratamento do grande volume de efluente é a melhor forma de reduzir o grande impacto ambiental causado por esses reagentes quando descartados nos cursos de água. Não se deve poupar esforços para encontrar alternativas que gerem não só uma economia de aditivos, água e energia, como também crie alguma vantagem competitiva nos produtos fabricados pela indústria têxtil

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é utilizar a enzima *Horseradish peroxidase* (HRP) para o reúso do efluente do processo de tingimento e o estudo da presença de mais de um corante em solução e realizar a imobilização da HRP em alginato de cálcio e espuma de poliuretano para degradação de corantes reativos.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito sinérgico que ocorre quando mais de um corante está presente em solução aquosa através de um planejamento  $2^4$ , para remoção destes corantes isolados e em dicromias e tricromias, variando pH, concentração de  $H_2O_2$ , concentração de corante e temperatura;
- Estudar o reúso do efluente do processo de tingimento em laboratório e em escala piloto através das melhores condições obtidas nos estudos de remoção dos corantes em tricromia;
- Analisar o tecido tingido e os lavados (lavagem química, enzimática, reúso) por testes de perda de cor e solidez à lavagem;
- Imobilizar a enzima HRP em alginato de cálcio e espuma poliuretano e verificar o desempenho da mesma;
- Caracterizar a enzima imobilizada em alginato de cálcio e espuma de poliuretano;
- Utilizar as enzimas imobilizadas para remover corantes reativos de solução aquosa;
- Propor um modelo numérico para representar a transferência de massa da enzima imobilizada na cápsula de alginato de cálcio;
- Comparar os resultados obtidos com os trabalhos reportados na literatura.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma revisão dos principais tópicos abordados neste trabalho. Primeiro serão apresentados aspectos referentes à indústria têxtil como consumo de água, estrutura do algodão e dos corantes reativos e trabalhos reportados na literatura utilizando enzima peroxidase. Em seguida será reportada, com base em trabalhos da literatura, a imobilização de enzimas em alginato de cálcio e espuma de poliuretano e a remoção de corantes utilizando enzima livre e imobilizada.

### 2.1. Indústria têxtil e o grande volume de água consumido

O Brasil é o quinto maior parque têxtil do mundo sendo o quarto lugar na produção de confecção e o terceiro em malhas. A indústria têxtil brasileira possui várias vantagens em relação às indústrias têxteis de outros países principalmente por ser autossuficiente em fornecimento de algodão e na produção de fibras químicas (CNI, 2012).

De acordo com Bezerra (2014), a indústria têxtil brasileira é concentrada principalmente nas regiões Sudeste (52,2%), Sul (28,3%) e Nordeste (15,6%). O estado de São Paulo participa do mercado têxtil nacional com uma contribuição de 41,0%, seguido por Santa Catarina, que tem uma participação de 19,4%.

O processo produtivo da cadeia têxtil é composto de várias etapas desde a fiação, tecelagem, passando pela malharia e o beneficiamento (tinturaria, estamparia e lavanderia) (BEZERRA, 2014). Essas etapas são geradoras de grandes volumes de efluentes ricos em aditivos químicos como sais, sequestrantes, tensoativos, fixadores e corantes utilizados na etapa de tingimento. Os corantes são particularmente problemáticos porque quando descartados em corpos d'água podem causar sérios danos ambientais, Industrial Safety and Pollution Control Handbook (1995 apud BALAMURUGAN; THRUMARIMURUGAN; KANNADASSAN, 2011, p.6365).

Devido às leis ambientais cada vez mais rigorosas, as indústrias têxteis investem em tecnologias sustentáveis como forma de diminuir os gastos e agregar valor ao produto final. A reutilização de materiais como retalhos vem sendo utilizada em muitas indústrias têxteis evitando que toneladas destes resíduos sejam descartados em aterros sanitários (CNI, 2012).

Segundo Hasanbeigi e Price (2015), vários esforços têm sido realizados com objetivo de aumentar a economia de água e energia. A

indústria têxtil é um dos setores industriais que mais consomem água em suas várias etapas. Estima-se que para produzir 1 kg de tecido sejam necessários 150 L de água (GUIA TÉCNICO AMBIENTAL DA INDÚSTRIA TÊXTIL, 2014).

Além do grande volume de água consumido, muitas etapas do processo têxtil exigem água com controle mais rigoroso de qualidade, em outras uma água menos pura, variando conforme o processo. Na Tabela 1, são apresentados os limites de tolerância para utilização de água nos processos têxteis.

**Tabela 1-** Limites de tolerância para utilização de água em processos têxteis.

Processo	Cor (uH)	CaCO <sub>3</sub> (mg/L)	Fe (mg/L)	pH	SS (mg/L)
Engomagem	5,0	25,0	0,3	6,5-10	5,0
Lavagem	5,0	25,0	0,1	3,0-10,5	5,0
Branqueamento	5,0	25,0	0,1	2,0-10,5	5,0
Tingimento	5,0	25,0	0,1	3,5-10	5,0

Fonte: FIESP/CIESP (2012).

Algumas indústrias já estão utilizando alternativas para minimizar esse grande consumo de água. Segundo Lima (2014 apud ABIT, 2014) em 10 anos o setor industrial têxtil conseguiu diminuir em até 90% a quantidade de água utilizada para produzir 1,0 kg de tecido.

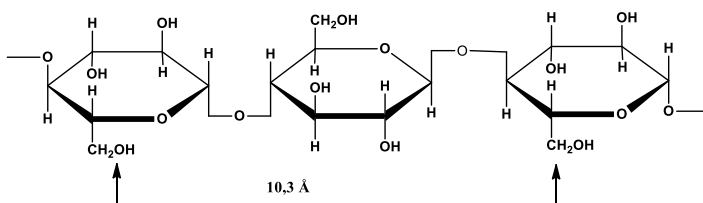
Além dessa redução estão sendo utilizadas outras alternativas, como o sistema *Dye Clean* que reaproveita a água residuária dos processos de tingimento de fibras celulósicas com corantes reativos, reciclando a água e diminuindo a quantidade de sal e auxiliares durante o processo.

## 2.2. Fibra têxtil: Algodão

Entre as fibras mais utilizadas pelas indústrias têxteis está o algodão, que é uma fibra natural, que se destaca principalmente por suas propriedades químicas e tintoriais (PICCOLI, 2008).

De acordo com München et al. (2015), o algodão tem uma estrutura do tipo fibrilar e é conhecido por sua resistência mecânica, que é dada pelas ligações de hidrogênio na sua parte cristalina, pelo tamanho e pelo entrelaçamento das cadeias celulósicas. Na Figura 1, é apresentada a estrutura da cadeia celulósica.

**Figura 1-** Estrutura da cadeia celulósica.



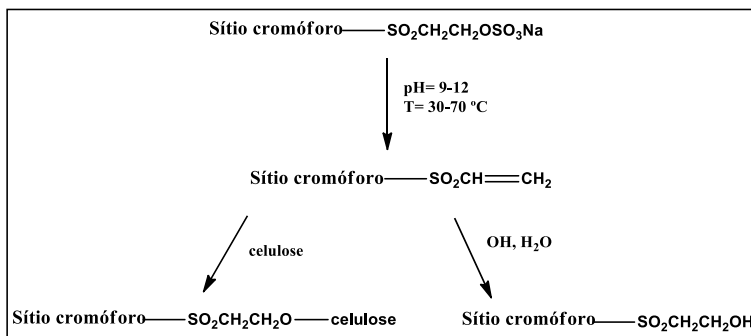
Estrutura de um elo da cadeia de celulose

Fonte: Salem (2000, apud Twardokus, 2004, p. 30).

O algodão é composto por aproximadamente 90% de celulose, porém outras substâncias podem estar presentes em menor número, como proteínas, pectina, cinza, cera, podendo influenciar no tingimento (PICCOLI, 2008). O algodão possui em torno de 70 % de cadeias cristalinas e 30 % de regiões amorfas, no entanto somente as regiões amorfas absorvem os corantes.

Os grupos hidroxilas são os principais componentes da cadeia celulósica sendo responsáveis por muitas das propriedades associadas ao algodão. No processo de tingimento estes grupos se unem aos corantes reativos por meio de ligações covalentes em presença de pH elevados e eletrólitos (AHMAD et al., 2012). Na Figura 2, é apresentada uma representação esquemática do mecanismo de interação do corante reativo do tipo vinil sulfonato com a fibra celulósica.

**Figura 2-** Representação esquemática do mecanismo de interação do corante reativo do tipo vinil sulfonato com a fibra celulósica.



Fonte: Weber (1993 apud Kunz et al., 2002, p. 79).

Na Figura 2 é possível observar uma representação da reação do grupo eletrofílico (reativo), vinilssulfona, com a adição do grupo hidroxila (OH) da fibra celulósica que acontece por meio de ligações covalentes em pH elevado. Este tipo de ligação confere uma maior estabilidade na cor do tecido tingido (GUARANTININI; ZANONI, 2000).

### 2.3. Corantes reativos

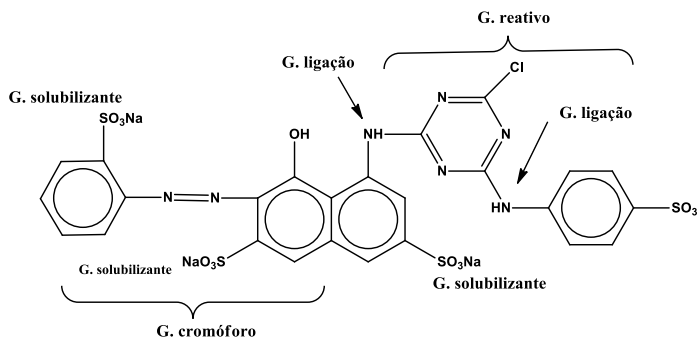
A classificação dos corantes têxteis pode se dar tanto por sua estrutura química, quanto pela forma que se ligam à fibra. Os principais corantes utilizados na indústria são os corantes disperso, direto, à cuba, ácido, pré-metalizado, sulfurosos, branqueadores e o mais utilizado nas indústrias têxteis de todo mundo para o tingimento de fibra de algodão, os corantes reativos (GUARANTINI; ZANONI, 2000).

Os corantes reativos constituem aproximadamente 12% da produção mundial dos corantes sintéticos comercializados e são muito utilizados na indústria têxtil para o tingimento de fibras de algodão.

Essa classe de corantes possui um grupo reativo (por exemplo, vinil sulfona, clorotriazina), que se liga covalentemente à fibra durante o processo de tingimento, um grupo cromóforo responsável pela cor (por exemplo, antraquinona, azo, ftalocianina), grupos de ligação -NH, grupos auxiliares solubilizantes -SO<sub>3</sub>Na que dissociam-se em íon sulfonato colorido e liberam o sódio na forma de cátion (BANSAL; SUD, 2013; PICCOLI, 2008; KIMURA, 2001). Na Figura 3, é apresentada a estrutura esquematizada de um corante reativo com um grupo cromóforo azo, um grupo reativo monoclotriazina, grupos solubilizante e grupos de ligação.



**Figura 3-** Representação dos grupos funcionais presentes nos corantes reativos.



Fonte: Kimura (2001).

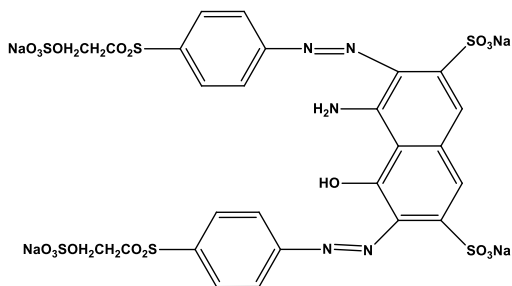
### 2.3.1. Classificação dos corantes reativos

Os corantes reativos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo etc.) ou com seu grupo reativo. Os grupos cromóforos e reativos mais utilizados serão apresentados a seguir.

#### 2.3.1.1. Grupos cromóforos

##### 2.3.1.1.1. Azo

É a classe mais importante de corante, representa 50% dos corantes comerciais. Corantes azo são caracterizados pela ligação N=N, estrutura responsável pela riqueza de cor (LAU et al., 2014). Estes corantes são produzidos pela reação de acoplamento entre um sal de diazônio com anéis ativados de fenóis e arilaminas. As reações de acoplamento dos sais de diazônio são tipicamente substituições aromáticas, em que o íon diazônio positivamente carregado reage com o anel rico em elétrons do fenol ou de uma arilamina. Estes produtos são largamente utilizados como corantes principalmente por causa da conjugação estendida do sistema aromático  $\pi$  que faz com que estes compostos absorvam luz no visível (MURRY, 2005). Na Figura 4, é apresentada a estrutura do corante diazo Preto reativo 5.

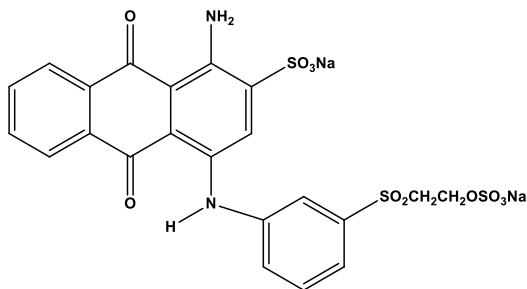
**Figura 4-** Estrutura do corante diazo Preto reativo 5.

Fonte: [www.worlddyevariety.com/reactive-dyes](http://www.worlddyevariety.com/reactive-dyes)

### 2.3.1.1.2. Antraquinona

É a segunda classe de corante mais utilizada, possui o grupo cromóforo antraquinona. Estes corantes são baseados na 9,10-antraquinona, a qual é incolor. Para produzir corantes comerciais são utilizados doadores de elétrons como aminas e hidroxilas. Estes grupos podem ser introduzidos em uma ou mais posições (CAMPOS, 2010).

Corantes de antraquinona têm recebido atenção, principalmente por causa do sistema elétron  $\pi$  conjugado, boas propriedades óticas e estabilidade térmica, que permitem que estes corantes sejam utilizados em diversas aplicações como dispositivos fotônicos (PRAMODINI; POORNESH, 2014). Na Figura 5, é apresentada a estrutura do corante de antraquinona Azul reativo 19.

**Figura 5-** Estrutura do corante antraquinona Azul reativo 19.

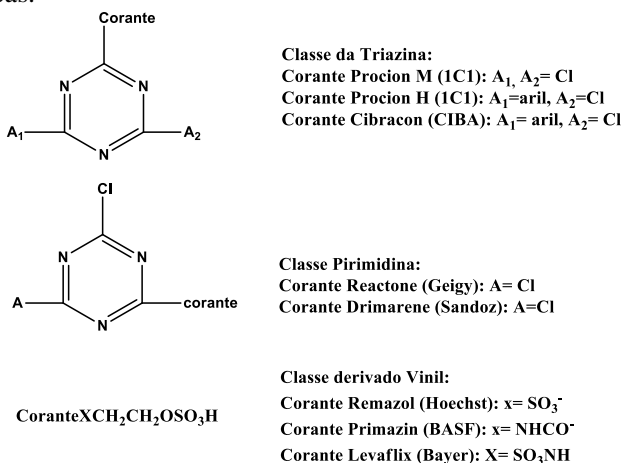
Fonte: [www.worlddyevariety.com/reactive-dyes](http://www.worlddyevariety.com/reactive-dyes)

### 2.3.1.2. Grupos Reativos

Os grupos reativos podem ser do tipo triazina, vinil e pirimidina. Existem corantes que apresentam mais de um grupo na mesma molécula podendo ser bi, tri e polifuncionais.

De acordo com os grupos ligados na molécula do corante este recebe uma denominação como remazol (grupos ligantes  $\text{SO}_3$  ligados numa molécula de vinil obtendo um composto vinilssulfona) (KIMURA, 2009). Na Figura 6, são apresentados os principais grupos reativos utilizados no tingimento de fibras celulósicas.

**Figura 6-** Principais grupos reativos utilizados no tingimento de fibras celulósicas.



Fonte: Kimura (2001).

## 2.4. Enzimas

Enzimas são macromoléculas de origem proteica que catalisam uma série de reações biológicas. A especificidade das enzimas é maior do que qualquer catalisador químico já criado pelo homem.

A atividade enzimática é o quanto efetiva uma enzima é como catalisador. A atividade está relacionada com o formato tridimensional da proteína, especificamente com seu sítio ativo que é a parte da enzima responsável pela catálise. Toda enzima possui um sítio ativo, esse contém aminoácidos cujas cadeias laterais formam uma superfície tridimensional complementar ao substrato (NELSON; COX, 2000). Em

alguns estudos é possível observar através da difração de raio X a parte onde o substrato se liga. Na Figura 7, é apresentada uma representação esquemática da estrutura cristalina da *Horseradish peroxidase* obtida através de difração de raio X, o grupo heme é mostrado no centro e em vermelho é apresentado o átomo de ferro, as esferas pretas são íons cálcio.

**Figura 7-** Representação esquemática da estrutura cristalina da *Horseradish peroxidase* obtida através de difração de raio X.



Fonte: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological\\_Chemistry/Catalysts/Case\\_Studies/Horseradish\\_Peroxidase](http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological_Chemistry/Catalysts/Case_Studies/Horseradish_Peroxidase)

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classificam as enzimas em seis grandes classes, e cada uma dessas em subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada.

As enzimas são classificadas em transferases, que catalisam reações de transferências de grupos como acila, açúcares, fosforiza; hidrolases, que catalisam hidrólises de ligações; liases, que catalisam reações de adição, geralmente com HX a dupla ligação; isomerases, que catalisam transferência de grupos dentro da molécula produzindo isômeros; ligases, que catalisam a formação de ligações C-O, C-S, C-C e de ésteres de fosfato e oxirredutases, que são enzimas que catalisam reações através da transferência de elétrons, ou seja, reações de oxirredução (NELSON;COX, 2000).

Neste trabalho foi utilizada uma enzima da classe das oxidorredutases, mais especificamente a peroxidase, que é uma das

enzimas mais utilizadas atualmente para realizar degradação de efluentes contendo compostos aromáticos entre outras aplicações.

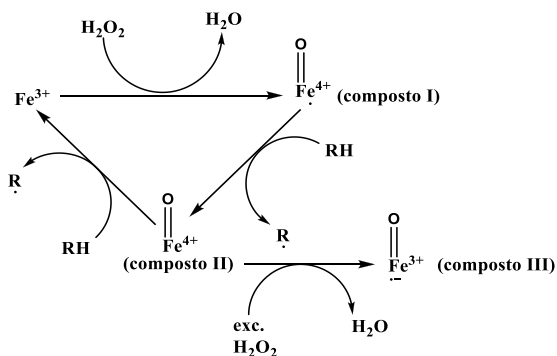
### 2.4.1 Peroxidases

Peroxidases são enzimas da classe das oxidorreduções produzidas por um grande número de micro-organismos e plantas. Essas enzimas catalisam uma série de reações biológicas, porém todas requerem a presença de  $H_2O_2$  (SI; CUI, 2013). Devido à grande estabilidade, as peroxidases possuem a capacidade de degradar uma ampla variedade de compostos entre estes se destacam os corantes (ŠEKULJICA et al., 2015) e os fenóis (ALEMZADEH; NEJATI, 2009).

As peroxidases classificam-se em duas superfamílias: as derivadas de plantas e de animais. A superfamília planta peroxidase também pode ser dividida em três subclasses, a classe I formada por peroxidases intracelulares, a classe II por peroxidases fúngicas e a classe III pelas plantas peroxidases, sendo a *Horseradish peroxidase* o exemplo mais conhecido (HUSAIN, 2012; VEITCH, 2004).

A *Horseradish peroxidase* ou também denominada peroxidase da raiz forte (HRP, EC 1.11.1.7) tem sido utilizada na remoção de contaminantes aromáticos aquosos, principalmente porque ela mantém sua atividade sobre uma ampla gama de pH e temperatura. Uma vez ativada por peróxido de hidrogênio, HRP pode catalisar a oxidação uma variedade de compostos tóxicos incluindo compostos aromáticos, fenóis, bifenois, anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos (GUELLI; FORGIARINI; ULSON DE SOUZA, 2007; WAN et al., 2012).

Segundo Córdoba, Magario e Ferreira (2012) o ciclo catalítico da enzima HRP ocorre em três etapas, conforme apresentado na Figura 8. Na primeira etapa do ciclo a enzima na forma férrica é oxidada pelo  $H_2O_2$ , formando um intermediário (Composto I), a enzima oxidada é então reduzida à sua forma nativa (Composto II) formando um radical livre. Na última etapa a transferência de elétrons entre substrato e enzima faz com que essa retorne a sua forma inicial (Composto III).

**Figura 8-** Ciclo catalítico da peroxidase.

Fonte: [http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological\\_Chemistry/Catalysts/Case\\_Studies/Horseradish\\_Peroxidase](http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological_Chemistry/Catalysts/Case_Studies/Horseradish_Peroxidase)

Segundo Wang, Si e Zhao (2012), oxidases não específicas como peroxidases têm grande potencial em muitos processos industriais, tais como branqueamento de polpa de papel, funcionalização, biorremediação, aplicações na indústria têxtil e biotecnológicas.

Existem vários trabalhos reportados na literatura sobre o uso de peroxidases solúveis de diversos tipos de fontes vegetais, fúngicas e animais para remover corantes de diversas classes com eficiência e na maioria dos casos em tempos relativamente baixos de reação. Na Tabela 2, é apresentado um resumo de alguns dos principais trabalhos encontrados na literatura.

**Tabela 2** - Resumo de trabalhos da literatura de remoção de corante com peroxidase.

Referência	Enzima peroxidase	Corante	pH	tempo (min)	D (%)
Silva et al. (2013 a)	Peroxidase da soja	Azul remazol brilhante R	6,0	13,0	86,0
Chiong et al. (2016)	Peroxidase da soja	Alaranjado de metila	5,0	60,0	81,4
Jamal; Pandey; Qidwai (2010)	Planta <i>Trichoshes diocia</i>	Vermelho disperso 19	4,0	60,0	79,0
		Preto disperso 9			60,0
Yousefive; Hamid-Reza (2010)	Fungo <i>Coprinus cinereus</i>	Ácido laranja 7	9,0	1,0	100,0
Šekuljica et al. (2015)	HRP	Ácido Azul 225	5,0	32,0	89,4
		Ácido violeta 109	4,0	15,0	94,7
Ma et al. (2014)	Fungo <i>Ganoderma sp. En3</i>	Laranja reativo 16	5,0	5760,0	95,0
Córdoba; Magario; Ferreira (2012)	HRP	Laranja II	9,0	60,0	92,0

#### 2.4.1.1. Degradação de corantes com enzimas: um estudo dos subprodutos

Existem na literatura muitos trabalhos sobre degradação de corantes com enzimas de diversas fontes vegetais, animais e fúngicas, além de trabalhos utilizando bactéria e outros micro-organismos. Os mecanismos de degradação enzimática de corante reativo ainda não são bem descritos, porém vêm crescendo o interesse em elucidar os



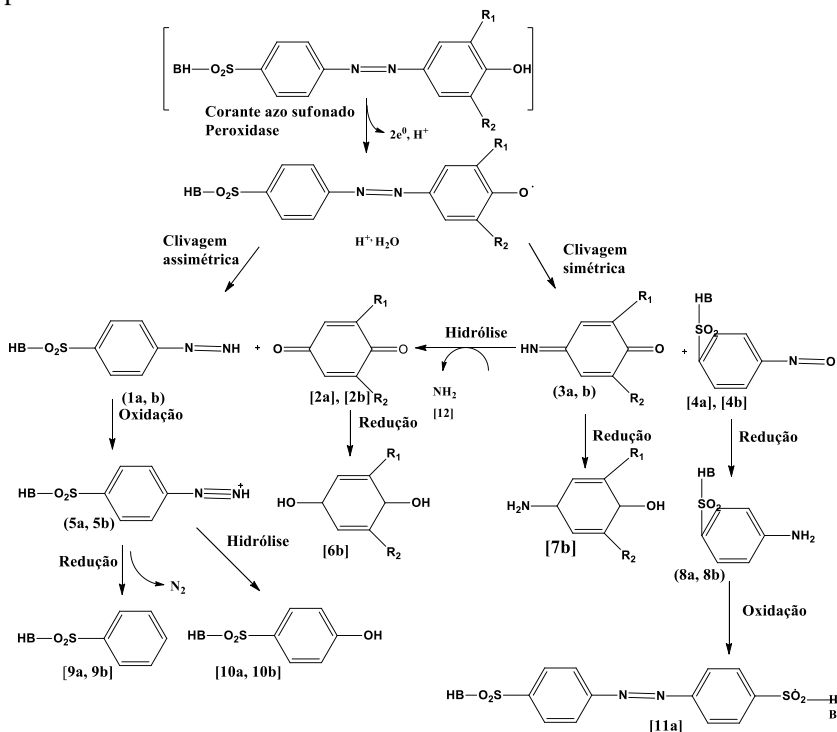


Corantes que contém cobre em sua estrutura são amplamente utilizados nas indústrias têxteis. No estudo de Silva et al. (2012 b) foi observado que com a ruptura do anel ocorre a liberação do metal tóxico  $\text{Cu}^{2+}$  em solução. Porém, os autores ressaltam que o cobre presente no efluente final não seria um problema, uma vez que o cobre pode ser facilmente removido por precipitação.

Corantes são estruturas complexas que em presença de enzima podem gerar vários intermediários como demonstrado no estudo realizado por Goszczynski et al. (1993), que realizou a degradação de diferentes compostos orgânicos tóxicos e perigosos ao meio ambiente, inclusive corantes azo, utilizando fungo da decomposição branca. Após estas remoções foram encontrados 12 metabólitos, sendo que a clivagem assimétrica deu origem a quinona e diazeno, já a clivagem simétrica resultou na formação de monoimina, quinona e derivados nitrosos. Os intermediários instáveis foram submetidos a processo redox fornecendo 11 novos produtos e amônia.

MC Mulan (2001 apud SINGH; SINGH; SINGH, 2015, p. 27) realizaram a degradação de corante azo sulfonado. Foi proposto o mecanismo de decomposição do corante. Os compostos apresentados em parênteses não foram identificados, porém não deixaram de ser essenciais para explicar o mecanismo de degradação destes corantes. Na primeira etapa  $R_1=R_2=B=$  grupo carboxila, na segunda etapa  $R_1= H, R_2= OCH$  e  $B= NH$ . [2 a] 2,6- dimetil-1,4-benzoquinona, [4a] ácido 4-nitrobenzeno sulfônico, [6 b] metoxi-hidroquinona, [7b] 2-metoxi-4-aminofenol, [8a] ácido sulfanílico, [8b] sulfonilamida, [9a] ácido 4-hidroxibenzeno-sulfônico, [9b] 4-hidroxi-benzeno-sulfonilamida, [10 a] ácido benzeno-sulfônico, [10b] benzeno-sulfonamida, [11a] ácido 4-(4-hidroxi-fenil-azo) benzeno sulfônico, [12] amônia. Na Figura 10, é apresentado o mecanismo de degradação de corante azo sulfonato por peroxidase.

**Figura 10-** Mecanismo de degradação do corante azo sulfonato por peroxidase.



Fonte: MC MULAN (2001 apud SINGH; SINGH; SINGH, 2015, p. 27)

Entre os principais grupos presentes nos subprodutos de degradação pode-se destacar as quinonas, que já tinham sido descritas como subproduto no trabalho de Goszczynski et al. (1993). As quinonas são substâncias orgânicas derivadas do benzeno, naftaleno e antraceno. A benzoquinona apresenta duas carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono em posições orto ou para. Alguns integrantes deste grupo apresentam alto poder redox, participando em reações enzimáticas e não enzimáticas e formando como subproduto de redução derivados da hidroquinona. Esses subprodutos podem ser tóxicos ou reagir com oxigênio molecular formando um radical superóxido e dando origem a um novo ciclo (SOUSA, 2012).

Também presentes entre os subprodutos de degradação os derivados do ácido sulfônico e sulfanoamida são compostos

antimicrobianos muito utilizados na medicina como antibióticos. Como possuem alta solubilidade em água, são pouco absorvidos por materiais sólidos, além de serem resistentes à foto e termo degradação (CARVALHO, 2013).

Apesar das peroxidases serem utilizadas em muitos estudos de remoção de corantes, estas enzimas ainda exibem algumas limitações para tratar grandes volumes de efluentes, como por exemplo, a inibição da atividade, estabilidade térmica, ataque por proteases e até mesmo o custo do biocatalisador (GHOLAMI-BORUJENI et al., 2011; AKHTAR et al., 2005; SILVA et al., 2013).

#### **2.4.2. Imobilização de enzimas**

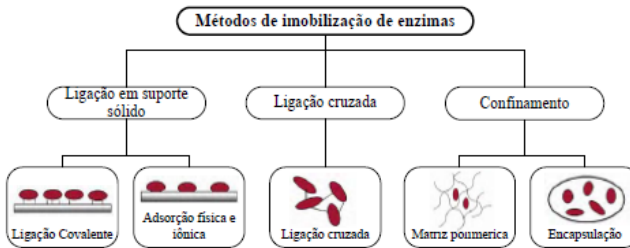
A imobilização de enzimas consiste no confinamento da enzima num suporte (MENDES et al., 2011). Este processo possui uma série de vantagens tais como aumento da estabilidade (temperatura e pH), facilidade de purificação, recuperação e reutilização do biocatalisador, proteção contra desnaturação, possibilidade de operação contínua do processo, facilidade de interrupção da reação e redução de custos (MOHAMED et al., 2013; NOREEN et al., 2016; BILAL et al., 2016; MENDES et al., 2011). Apesar das vantagens existentes na imobilização de enzimas, esse processo pode apresentar algumas desvantagens como a mudança da conformação da enzima, o custo de alguns suportes e a perda de atividade e estabilidade. Enquanto que em alguns processos é observado um aumento na estabilidade enzimática em outros há uma diminuição, porém não existe uma regra para todas as enzimas (ARROYO, 1998; MENDES, 2009; FRAMPTON; ZELISKO, 2014).

A escolha do método adequado de imobilização depende do tipo de enzima e de outros fatores como custo do procedimento, substrato utilizado, características de regeneração e inativação, toxicidade dos reagentes, tipo de reações e as configurações do reator (DALLAVECHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MALCATA et al., 1990; MENDES, 2009).

A imobilização de enzimas pode ser realizada tanto em polímeros naturais quanto em sintéticos. Entre os polímeros naturais destacam-se a imobilização de enzimas em alginato de cálcio (PREETHI et al., 2013; GHOLAMI-BORUJENI et al., 2011; RICHETTI et al., 2012), quitosana (KARIN et al., 2012) e ágar ágar (BILAL et al., 2016 c). Entre os polímeros sintéticos vêm crescendo o interesse pelo uso do poliuretano (MALANI et al., 2013; CIPOLLATI et al., 2015; NICOLETTI et al., 2015) principalmente por ser um suporte de baixo custo e fácil obtenção.

Existem vários métodos possíveis de imobilizar enzimas. Entre os mais conhecidos estão os de ligação a um suporte sólido por adsorção física e iônica e ligação covalente. A enzima também pode se ligar a um suporte por ligação cruzada ou confinamento, processo em que se destaca a encapsulação, conforme apresentado na Figura 11 (NICOLETTI, 2015).

**Figura 11-** Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Gulrajani e Gupta (2011), Santos (2003) e Reis (2012).

O método de imobilização por adsorção é o mais simples e mais utilizado principalmente pela baixa alteração na estrutura da enzima. Nesse método a enzima é estabilizada por ligações de baixa energia e ligada ao suporte por meio de interações fracas de Van der Waals, ligações de hidrogênio ou ligações iônicas. Uma das desvantagens desta técnica é a possibilidade de acontecer a dessorção da enzima do suporte (DALLA-VECHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; MENDES et al., 2011). Na imobilização por ligação iônica a enzima se une ao suporte por ligações eletrostáticas. Este método é semelhante ao de adsorção física.

Na imobilização por ligação covalente, que pode se dar no suporte ou por ligação cruzada entre enzima e suporte, as ligações formadas são mais longas e duradouras (WU et al., 2015). Segundo Mendes et al. (2011), este método baseia-se na reação entre os grupos reativos do suporte com os grupos nucleofílicos da enzima.

Monier et al. (2010), realizaram a imobilização da enzima *Horseradish peroxidase* em cápsulas de quitosana modificada utilizando o método de ligação covalente, sendo obtido até 98,4% de imobilização e uma atividade relativa maior, quando comparada a enzima livre.

Outro método de imobilização de enzimas é o de encapsulamento ou microencapsulamento, que consiste em confinar um biocatalisador em uma cápsula. Segundo Dalla-Vechia; Nascimento; Soldi (2004), a enzima é delimitada por uma membrana porosa ficando protegida de fatores degradantes. De acordo com os autores, como enzimas são moléculas grandes, elas não conseguem se difundir através da membrana como moléculas pequenas de substrato e produtos. Esta membrana semipermeável permite que substâncias de baixa massa molar se difundam através dela e por isso este processo é muito utilizado para liberação controlada de fármacos, aromas, fragrâncias entre outros.

Reis (2012) realizou o encapsulamento da papaína em microcápsulas de gelatina e goma arábica para auxiliar na liberação controlada de óleo de hortelã e de jojoba. Foi constatado que o hortelã afetou em até 85% a atividade da enzima. O mesmo comportamento não foi observado para o óleo de jojoba.

#### 2.4.2.1. Alginato

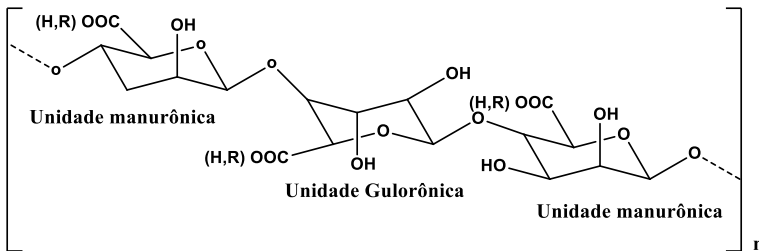
Alginatos são polissacarídeos encontrados em certas bactérias como *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa* e na parede celular de algas castanhas, sendo estas muito utilizadas comercialmente (SANTOS, 2012). Estruturalmente estes polímeros naturais são lineares compostos por ácido D-manurônico e por seu epímero ácido L-glutarônico ligados por ligações glicosídicas 1-4 (SANTOS, 2012; FUENZALIDA et al., 2016). Esses polissacarídeos têm sido muito estudados para imobilizar enzimas e micro-organismos, principalmente, por serem biodegradáveis não-tóxicos e ainda devido a suas propriedades estabilizantes, capacidade de modificar a viscosidade dos sistemas aquosos e de formar gel na presença de certos cátions divalentes como cálcio, bário e estrôncio {BRACCINI E PÉREZ (2001 apud Wang et al., 2014, p.1683); FUENZALIDA et al., 2016}.

O alginato de cálcio é um dos suportes mais utilizados para imobilizar enzimas. Geralmente a formação de gel se dá na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$  e é muito comum gotejar a solução de alginato de sódio com a enzima em uma solução de  $\text{CaCl}_2$  para obter as cápsulas de alginato de cálcio. Na presença destes íons em grandes quantidades ocorre a formação do gel necessário para formação das cápsulas.

De acordo com Santos (2012), os alginatos devem ser armazenados a temperaturas menores que 25 °C, visto que a viscosidade diminui com o aumento da temperatura e temperaturas elevadas podem causar a despolimerização desses polissacarídeos. Em relação ao pH o

autor esclarece que a viscosidade do alginato não é alterada numa escala de pH 5-10 e que existe uma relação entre pH e massa molecular. Quanto menor a massa molecular, mais estável a solução de alginato será a baixos valores de pH. Na Figura 12 é apresentada a estrutura do alginato .

**Figura 12-** Estrutura do alginato.



Fonte: Kawaguti e Sato (2008).

Enzimas imobilizadas em alginato de cálcio tem sido muito utilizada para remover corantes de difícil degradação como corantes reativos, com um aumento da sua estabilidade e altos índices de remoção se comparado à enzima livre (BILAL; ASGHER, 2015 c). Gholami-Borujeni et al. (2011) realizaram a remoção de corantes ácido laranja 7 e azul 25, utilizando HRP imobilizada em alginato de cálcio. Foi obtida uma remoção de 75% e 84% para o laranja 7 e para o azul 25 respectivamente em 90 min de reação.

Resultado semelhante foi obtido por Preethi et al., 2013, que também avaliaram a remoção de corante ácido, o azul 113 utilizando a enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio, foi obtida uma degradação de 76% obtida em 240 min de reação.

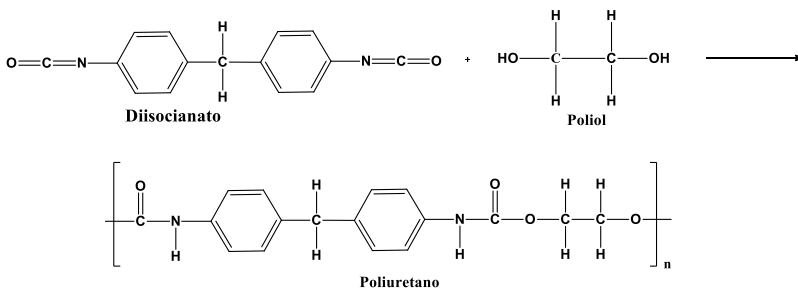
Bilal e Asgher (2015 c) realizaram a remoção de corantes reativos utilizando a manganês peroxidase imobilizada em alginato de c, em que foram obtidas remoções de 87,5, 82,1, 89,4, 95,7 e 83,0 %, respectivamente, para os corantes vermelho reativo 195, azul reativo 21, Sandal-fix Foron Blue E2BLN, mistura de corantes, amarelo reativo 145 após 12 h de reação.

Boucherit; Abouseoud e Adour (2013) avaliaram a remoção do corante amarelo direto 106 utilizando peroxidase imobilizada em alginato de cálcio. A máxima descoloração obtida foi de 75% em 15 min de reação.

### 2.4.2.2. Espuma de poliuretano (EPU)

Poliuretanos são polímeros sintetizados através da reação de um derivado do isocianato com um polioli. Na Figura 13, é apresentada a reação de formação do poliuretano. Segundo Vilar (2014) entre os polióis mais utilizados para síntese dos EPUs estão os polióis poliéteres que são derivados de poli (óxido de propileno/etileno). Já entre os isocianatos mais utilizados encontra-se o tolueno diisocianato (TDI) que é geralmente comercializado na mistura de isômeros 2,4 e 2,6 nas proporções 80/20 (TDI 80/20), 65/35 (TDI 65/35), ou puro (TDI 100). (VILAR, 2014)

**Figura 13-** Reação de formação do poliuretano.



Fonte: Elaborado pela a autora.

Espumas de poliuretano são caracterizadas principalmente por possuírem biocompatibilidade, estabilidade química, propriedades mecânicas (alta resistência e elasticidade), flexibilidade, durabilidade, além do baixo custo associado a esse material (LI et al., 2011; CUI et al., 2013, NICOLETTI, 2015). Esses compostos possuem uma alta porosidade e ampla absorção em sua superfície o que poderia reduzir a resistência à difusão e a transferência de massa (CUI et al., 2013).

A versatilidade dos poliuretanos é analisada em uma série de estudos descritos na literatura que utilizam este polímero com enzimas de diversas classes imobilizadas, como o estudo realizado por Haven e Rase (1993) para degradar pesticida utilizando enzima da classe das hidrolases imobilizadas em poliuretano. Pode ser observado que o poliuretano foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de ingrediente ativo na formulação comercial estudada.

O poliuretano também pode ser utilizado em aplicações farmacêuticas como o estudo realizado por Fritzen-Garcia et al. (2013),

que imobilizaram a *Horseradish peroxidase* em nanopartículas de poliuretano peguilhado (PEG-PU) para detecção de dopamina. Foi observada uma recuperação de dopamina de 93 a 107% e uma retenção da atividade de 50% após 50 dias de armazenamento.

Esses polímeros também podem ser utilizados em sínteses orgânicas como a realizada por Quezada Carballeira e Sinisterra (2012) que realizaram a imobilização da *Diplogelatinospora grovesii* IMI 171018 em EPU para a redução estereosseletiva de cetonas. O biocatalisador foi reutilizado até 18 vezes e manteve 90% de sua estabilidade. Nicoletti et al. (2015), realizaram a imobilização da lipase de *Candida antarctica* em poliuretano, para produção do éster derivado do geraniol. Foram testados vários tipos de imobilizações e a maior conversão de 83% foi obtida em 24 h utilizando a técnica de lipase imobilizada ao suporte por adsorção.

Na literatura, destacam-se alguns estudos utilizando micro-organismos imobilizados em poliuretano para degradar corantes industriais. Lade Govindwar e Paul (2015) avaliaram a degradação do corante vermelho congo e de efluente real utilizando um consórcio microbiano imobilizado em poliuretano. Foi obtida uma remoção completa do corante vermelho congo em pH 7,5 em 12 h de reação a temperatura de 30 °C e uma remoção de 50% para o efluente real nas mesmas condições, porém em 20 h de reação.

Casieri et al. (2008) realizaram a degradação dos corantes vermelho reativo 243 (R 243), azul brilhante remazol R (RBBR) e azul reativo 49 (B 49) utilizando os fungos *Trametes pubescens* e *Pleurotus ostreatus*, imobilizados em cubos de poliuretano em um biorreator. Ao longo de 5 ciclos foi observada uma remoção de 97-98% para os corantes (RBBR e B49) e 65% para o corante R 243.

A partir destas considerações, neste trabalho será realizado um reúso do efluente do processo de tingimento. Existem na literatura diversos estudos da reutilização do efluente por via enzimática, porém em nenhum desses trabalhos há uma preocupação em realizar melhoramento no substrato têxtil, agregando valor ao produto final e ainda realizando uma economia de água e energia.

Outro estudo realizado será um estudo estatístico do efeito da presença de mais de um corante em solução, existem alguns trabalhos descritos na literatura que destacam um aumento na eficiência de degradação de corantes, quando existe uma mistura de corantes, mas nenhum estudo tenta propor uma explicação.

Adicionalmente foi realizado um estudo exploratório de viabilidade de imobilização da enzima *Horseradish peroxidase* em



alginato de cálcio e espuma de poliuretano para remover corantes reativos.

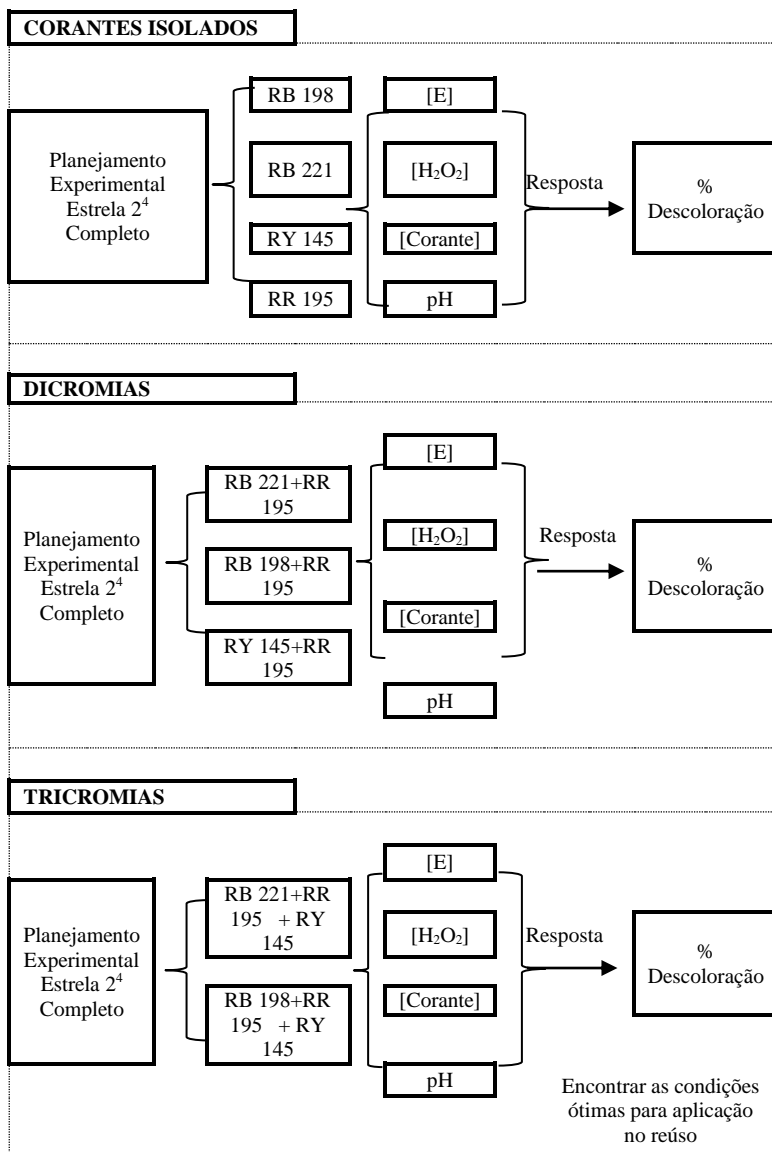
Para as cápsulas de alginato de cálcio foi desenvolvido um modelo matemático para representar os perfis de remoção de corante ao longo do tempo, tanto para sistema com enzima livre quanto para o sistema com enzima imobilizada. Ainda não existe na literatura um modelo matemático considerando a transferência de massa que ocorre nas cápsulas de alginato, sendo estes aspectos apresentados contribuições inéditas deste trabalho.

### 3. MATERIAIS E METÓDOS

A apresentação dos materiais e métodos utilizados neste trabalho é dividida em duas partes. Na parte 1 são apresentadas as metodologias referentes ao estudo do efeito da presença de mais de um corante em solução aquosa e a reuso do efluente do processo de tingimento. Na parte 2 são apresentadas as metodologias referentes à remoção de corantes com a *Horseradish peroxidase* imobilizada em alginato de cálcio e espuma de poliuretano e um modelo matemático, para enzima livre e imobilizada em alginato de cálcio, para determinar os parâmetros cinéticos e coeficiente de transferência de massa.

Os estudos da presença de mais de um corante em solução foram realizados para avaliar a influência que um corante exerce sobre os outros, avaliando os corantes de forma isolada e em mistura de dois (dicromia) e três corantes (tricromia) e para obter as condições ótimas para os estudos de reuso do efluente de tingimento e para os testes em escala piloto. Foram realizados planejamentos experimentais do tipo estrela  $2^4$  com pontos axiais para avaliar todos os fatores que influenciam em uma reação enzimática. Avaliou-se concentração de enzima, de peróxido de hidrogênio, de corante e pH, obtendo-se como resposta a descoloração do corante. A representação esquemática dos estudos da presença de mais de um corante em solução estão apresentados na Figura 14.

**Figura 14-** Representação esquemática dos estudos da presença de um ou mais corantes em solução.



Fonte: Elaborado pela autora.

## **PARTE EXPERIMENTAL I- ESTUDO DO EFEITO DA PRESENÇA DE MAIS DE UM CORANTE EM SOLUÇÃO AQUOSA E REÚSO DO EFLUENTE DO PROCESSO DE TINGIMENTO**

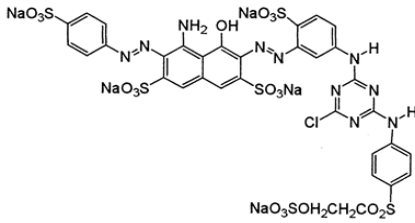
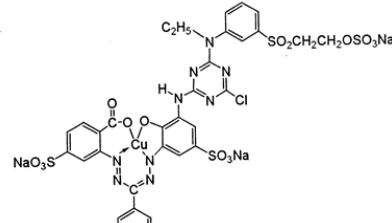
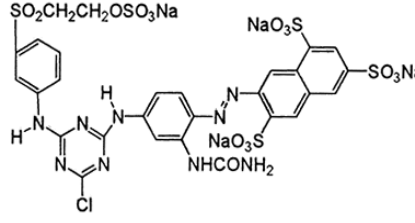
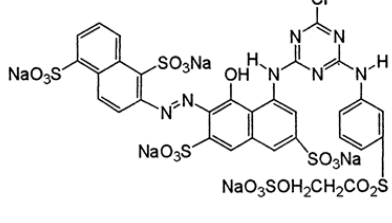
Nesta parte são apresentados os reagentes, equipamentos e metodologias utilizados neste trabalho para estudar o efeito de mais de um corante presente em solução e em seguida o reúso do efluente do processo de tingimento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata de experimentos.

### **3.1. Materiais**

#### **3.1.1. Corantes**

Para o desenvolvimento desta parte do trabalho foram utilizados os corantes Azul Reativo 221 (RB 221), Azul Reativo 198 (RB 198), Vermelho Reativo 195 (RR 195), gentilmente cedido pela empresa Malwee e Amarelo Reativo 145 (RY 145), gentilmente cedido pela empresa Karsten. Os estudos foram conduzidos utilizando os corantes isolados, em dicromias e tricromias, visando avaliar a existência de efeito sinérgico entre os corantes. Na Figura 15 são apresentadas as estruturas químicas, o CAS (número de registro dos corantes) e as massas molares dos corantes estudados neste trabalho.

**Figura 15-** Estrutura química dos corantes utilizados neste trabalho.

<p>Azul reativo 198 (RB 198) CAS: 124448-55-1 Massa molar: 1304,80 g/mol</p>	<p>Azul reativo 221 (RB 221) CAS: 93051-41-3/89933-65-3 Massa molar: 1082,83 g/mol</p>
	
<p>Amarelo reativo 145 (RY 145) CAS: 93050-80-7 Massa molar: 1026,25 g/mol</p>	<p>Vermelho reativo 195 (RR 195) CAS: 93050-79-4 Massa molar: 1136,32 g/mol</p>
	

Fonte: [www.worlddyevariety.com/reactive-dyes](http://www.worlddyevariety.com/reactive-dyes)

### 3.1.2. Substrato Têxtil

O substrato têxtil utilizado foi o tecido de malha de algodão com gramatura de 149 g/m<sup>2</sup>, pré-alvejado, cedido pela empresa Malwee. Em todos os estudos laboratoriais foram utilizados 10 g de tecido.

### 3.1.3. Enzima

A enzima utilizada foi a *Horseradish peroxidase* (HRP) com atividade declarada, pela empresa Toyobo, de 8,2 kU/g, gentilmente doada pela Toyobo do Brasil (2013). As principais características dessa enzima são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3-** Propriedades da enzima *Horseradish peroxidase*.

Estabilidade	Estável em – 20 °C (por pelo menos 1 ano)
Massa molar	Aproximadamente 40.000 g mol <sup>-1</sup>
pH ótimo	6-7
Temperatura ótima	45 °C
Estabilidade em pH	5-10 (25 °C, 20 h)
Estabilidade térmica	Abaixo 50 °C (pH 6, 10 min)

Fonte: Toyobo do Brasil (2013) (Apêndice A).

### 3.1.4. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nesta parte do trabalho foram:

- ✓ Agitadores magnéticos: Dist;
- ✓ Banho Dubnoff: Dist;
- ✓ Balança analítica: Micronal AB204-S;
- ✓ Espectrofotômetro: Shimadzu UV mini-1240;
- ✓ Fourlard: Mathis FVH;
- ✓ pHmetro: Quimis;
- ✓ Rama: Mathis, LTE-S-B;
- ✓ Tingimento em canecos: Mathis, ALT - I - B até 135 °C.

### 3.1.5. Reagentes

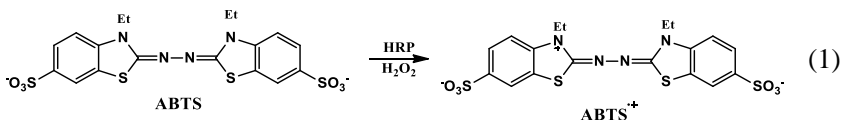
Os reagentes utilizados nesta parte do trabalho foram:

- ✓ Ácido cítrico (Nuclear);
- ✓ 2,2'- Ácido *Azino-bis* [3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico 9] (ABTS) (Sigma Aldrich);
- ✓ Barrilha (Carbonato de sódio) (Vetec);
- ✓ Fosfato de potássio monobásico (Vetec);
- ✓ Fosfato de sódio dibásico (Vetec);
- ✓ Peróxido de hidrogênio 130 V, 35% (Lafan);
- ✓ Sulfato de sódio (Quimis);
- ✓ Tensoativo não-iônico EM8007 (Malwee).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Determinação da atividade enzimática da *Horseradish peroxidase* (HRP)

A atividade enzimática foi determinada conforme metodologia modificada de Wu et al. (1997). Na Equação 1 é apresentada a equação de formação do cátion ABTS<sup>•+</sup>, que é oxidado pela enzima na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formando o cátion ABTS<sup>•+</sup>.



A atividade da enzima *Horseradish peroxidase* foi determinada utilizando 0,255 mL de solução de ABTS 20 mmol/L; 0,255 mL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 mmol/L; 0,300 mL de extrato enzimático 1,000 mmol/L; 2,190 mL de tampão citrato-fosfato ou fosfato (0,05 mol/L). Todas as soluções foram preparadas em tampão no pH utilizado em cada reação. Todos os reagentes foram colocados separadamente em um banho Dubnoff a 30 °C por 10 min para uniformizar a temperatura e em seguida foram mensurados e adicionados em uma cubeta, para então serem acompanhados durante 5 min em um espectrofotômetro a 420 nm ( $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 3,6 \times 10^4 \text{ l}/(\text{mol/L}\cdot\text{cm})$ ) (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000). A atividade enzimática (A) foi calculada conforme a Equação 2.

$$A(U / \text{mL}) = \frac{\Delta_{Abs} V_{total} 10^6}{\epsilon_{ABTS} V_{extrato} t} \quad (2)$$

Em que  $A$ ,  $V_{total}$ ,  $\Delta_{Abs}$ ,  $\epsilon_{ABTS}$ ,  $V_{extrato}$  e  $t$  são, respectivamente, atividade enzimática, volume total de solução na cubeta (mL), variação de absorbância (final – inicial), coeficiente de extinção molar para o ABTS a 420 nm, volume de extrato enzimático utilizado na reação (mL) e tempo de reação (min).

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.

### 3.2.2. Estudos de degradação enzimática e efeito da presença de mais de um corante em solução

Os estudos de degradação enzimática e estudo da presença de mais de um corante em solução foram conduzidos segundo a metodologia da superfície de resposta através de um planejamento experimental estrela  $2^4$  utilizando como ferramenta o programa computacional STATISTICA 10. O planejamento experimental foi realizado para avaliar todas as variáveis que afetam o processo de degradação enzimática. As variáveis selecionadas foram concentração de enzima, de corante, de peróxido de hidrogênio e pH (Tabela 4) e a resposta obtida foi a remoção do corante em porcentagem. Os valores de cada variável utilizada no planejamento foram definidos a partir de testes preliminares. O tempo reacional foi previamente definido através de cinética e a temperatura de degradação de corantes reativos pela HRP é descrita em vários trabalhos da literatura (FARIAS, 2013).

Estes estudos foram realizados em tubos de ensaio em banho Dubnoff a 130 rpm contendo 0,40 mL de solução de  $H_2O_2$ , 0,10 mL de extrato enzimático, os corantes (1,50 mL) e tampão citrato ou fosfato 0,05 mol/L (1,20 mL). Todos os ensaios foram realizados durante 30 min a 30 °C. Nos controles reacionais foram empregados todos os reagentes com exceção do  $H_2O_2$  que foi substituído por tampão.

Nos estudos da presença de mais de um corante em solução, nas dicromias foi utilizada a metade de cada corante, por exemplo para a concentração 40,00 mg/L foi utilizado (20,00 mg/L de um corante + 20,00 mg/L de outro corante) e nos estudos de tricromia a concentração foi dividida em três. Todas as outras concentrações foram mantidas as mesmas da Tabela 4.

**Tabela 4** - Variáveis e níveis de estudo utilizados no planejamento experimental.

Variáveis	Níveis de estudo				
	-2	-1	0	+1	+2
Concentração de Enzima U/mL	162,35	324,71	487,06	649,42	811,77
Concentração de $H_2O_2$ $\mu$ mol/L	18,75	25,00	31,25	37,50	43,75
Concentração de corante mg/L	20,00	40,00	60,00	80,00	100,00
pH	2,50	4,00	5,50	7,00	8,50

### 3.2.3. Medidas de cor das soluções

Para a quantificação do corante removido foram feitas varreduras espectrais na região do visível (400 a 800 nm), com objetivo de obter os picos máximos de absorção dos corantes (Tabela 5). A quantidade de corante degradado ( $D$ ) foi calculada pela Equação 2. As medidas foram realizadas em triplicata de experimentos.

**Tabela 5** - Picos máximos de absorbância dos corantes utilizados.

Corantes	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Amarelo 145	416
Azul 221	611
Azul 198	625
Vermelho 195	536

Em todas as medidas realizadas por espectroscopia, a remoção de corante foi calculada pela equação 3:

$$D(\%) = \frac{Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}}{Abs_{\text{inicial}}} 100 \quad (3)$$

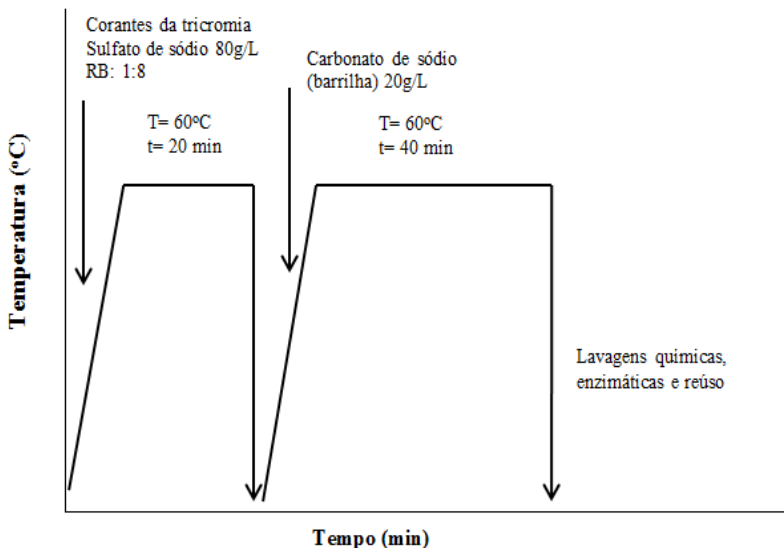
onde  $Abs_{\text{inicial}}$  e  $Abs_{\text{final}}$  são respectivamente, absorbância inicial e final.

### 3.2.4. Tingimentos

Os tingimentos na cor bordô foram realizados na máquina de tingimento Mathis HT. Foi utilizada a mistura dos corantes 0,260 de RB 198, 4,400 de RR 195 e 0,305% de RY 145 e sulfato de sódio 80,00 g/L durante 20 min a 60 °C. As porcentagens de cada corante utilizado foram obtidas de uma formulação de tingimento cedida pela empresa Malwee. Após este tempo foi adicionado à reação 20,00 g/L de barrilha (carbonato de sódio) e esses foram colocados na máquina por mais 40 min a 60 °C. O procedimento de tingimento foi realizado com relação de banho 1:8 (m:v), ou seja 10g de tecido para 80 mL de solução. Na Figura 16, é apresentado um esquema com a sequência de etapas do processo de tingimento.



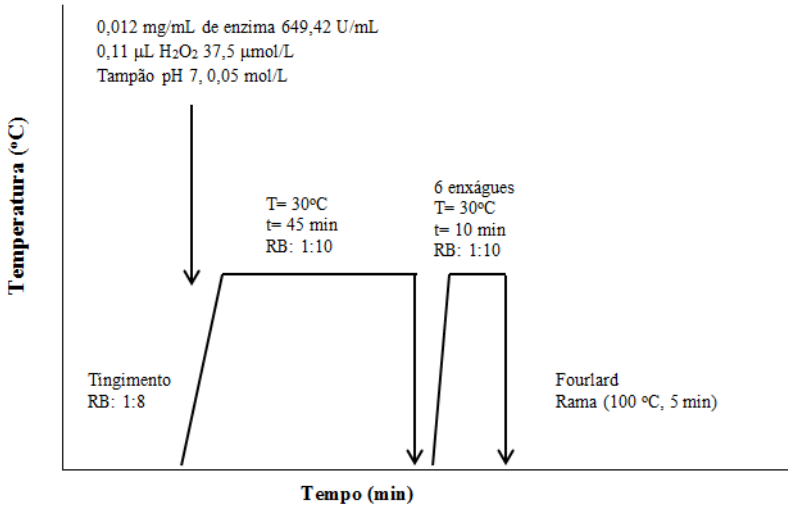
**Figura 16-** Sequência de etapas do processo de tingimento.



### 3.2.5. Lavagens pós-tingimento

#### 3.2.5.1. Lavagem enzimática

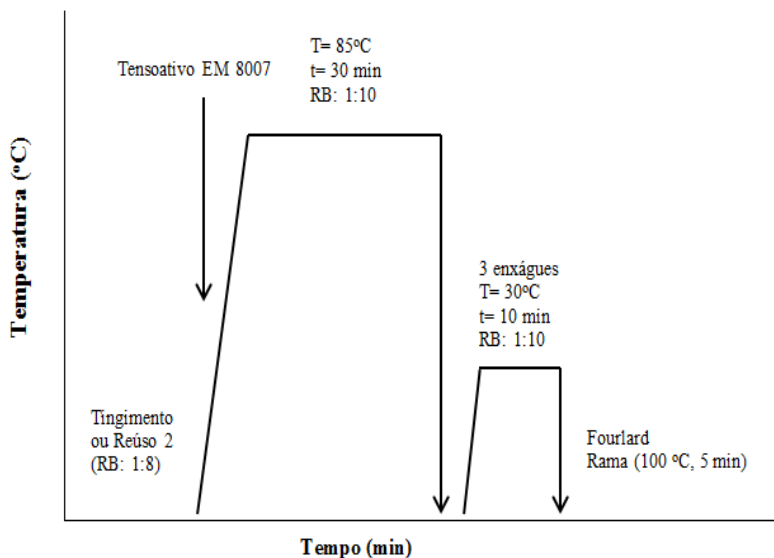
Após o tingimento o tecido foi retirado da solução e passado através do Fourlard para remover o excesso de solução com um Pick up de 100%. A lavagem enzimática foi realizada, em 100 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 7,0, em uma máquina Mathis HT, com uma relação de banho 1:10. A essa solução foram adicionados 0,012 mg/mL de enzima HRP 649,42 U/ml, calculado através do cálculo da atividade enzimática e 0,11 de  $\mu\text{L H}_2\text{O}_2$  37,50  $\mu\text{mol/L}$ . A solução permaneceu na máquina durante 45 min a 30 °C. Após a lavagem foram realizados 6 enxágues a 30 °C durante 10 min, com uma relação de banho 1:10 e subsequentemente o tecido foi passado no Fourlard e seco na Rama durante 5 min a 100 °C. Na Figura 17, é apresentado um esquema do processo de lavagem enzimática.

**Figura 17-** Processo de lavagem enzimática.

### 3.2.5.2. Lavagem química

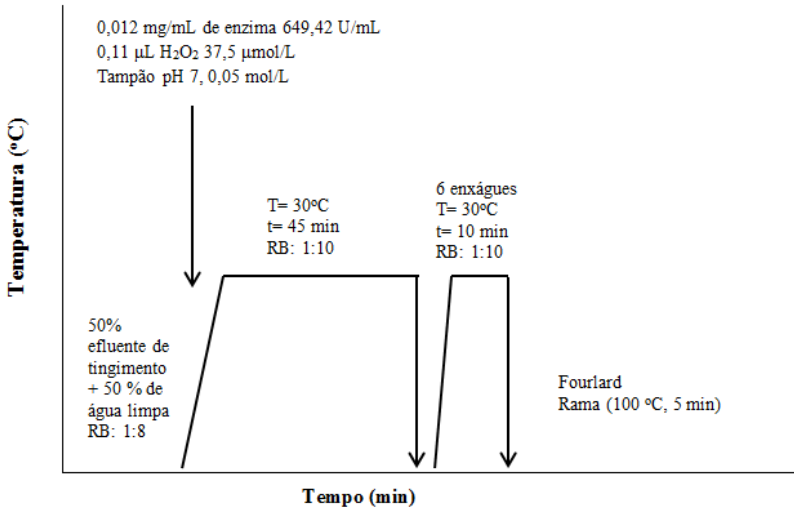
A lavagem química com tensoativo não-iônico EM 8007 foi realizada posteriormente ao processo de reúso 2 e a um tingimento em água limpa (realizada de forma comparativa ao processo de reúso 2), com uma RB 1:10. Esse processo foi realizado a 85 °C durante 30 min no equipamento Mathis HT. Após a lavagem os tecidos passaram por 3 enxágues a 30 °C durante 10 min, utilizando uma relação de banho de 1:10 e posteriormente o tecido foi passado no Foulard e seco na Rama durante 5 min a 100 °C. Na Figura 18, é apresentado o esquema do processo de lavagem química.

**Figura 18-** Processo de lavagem química.



### 3.2.6. Reúso da solução de tingimento – Reúso 1

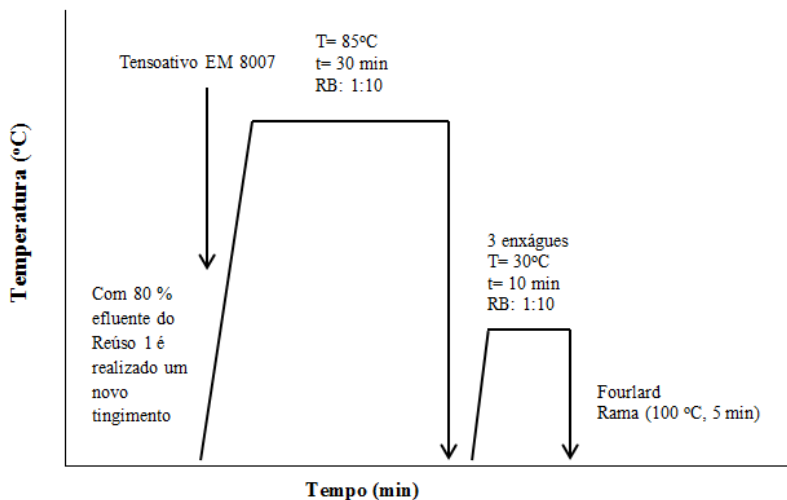
Considerando a influência na atividade enzimática dos eletrólitos presentes na solução do primeiro tingimento, optou-se por diluir 50% de efluente de tingimento em 50% de água destilada. A solução resultante foi tamponada com tampão fosfato 0,05 mol/L, pH 7 e foram adicionados 0,012 mg/mL de enzima HRP 649,42 U/mL e 0,11 de  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  37,5  $\mu\text{mol/L}$  (conforme determinado nos estudos de mais de um corante presente em solução, realizados para esta tricromia). O reúso 1 foi realizado utilizando uma relação de banho 1:10, durante 45 min a 30 °C. Após esse processo foram realizados 6 enxágues a 30 °C durante 10 min e subseqüentemente o tecido foi passado no Fourlard e seco na Rama durante 5 min a 100 °C. Um volume de 80 mL da solução de reúso 1 foi utilizado para realizar o reúso 2 conforme item 3.2.6.1. Na Figura 19 é apresentado um esquema do processo de reúso 1.

**Figura 19-** Processo de reúso 1.

### 3.2.6.1. Tingimento na solução de reúso – Reúso 2

Na etapa de reúso 2 foi realizado um tingimento reutilizando 80 % do efluente de descarte do reúso 1 e após o processo de tingimento uma lavagem com tensoativo EM 8007, conforme item 3.2.5.2. O tingimento, dessa etapa, foi realizado nas mesmas condições descritas no item 3.2.4. Não foram ajustados teor de sais e nem o pH. Para efeito de comparação foi realizado um tingimento nas mesmas condições em água limpa e uma posterior lavagem com tensoativo EM 8007 (lavagem química). Na Figura 20, é apresentado um esquema do processo de reúso 2.

**Figura 20-** Processo de reúso 2.



### 3.2.7. Análise dos tecidos

#### 3.2.7.1. Avaliação da perda de cor

Os tecidos foram avaliados através de testes de determinação colorimétrica para coordenadas retangulares empregando o sistema CIE  $L^*a^*b^*$  (CIELAB) sumarizado pelo valor de  $\Delta E^*$ . Nesse sistema o  $L^*$  representa a luminosidade. O máximo para  $L^*$  é 100 que representa um perfeito difusor refletindo (Branco). O mínimo de  $L^*$  é zero, o qual representa (Preto), quanto mais o  $L^*$  se aproxima de 100, maior a perda de cor. Os eixos  $a^*$  e  $b^*$  representam as coordenadas cromáticas, em que  $a^*$  positivo representa uma tendência para o vermelho e  $a^*$  negativo uma tendência para o verde,  $b^*$  positivo há uma tendência para o amarelo e  $b^*$  negativo, para o azul. O valor de  $\Delta E^*$  varia de 0 a 1, quanto mais esse valor se aproxima de zero, menor a perda de cor (HUNTERLAB, 2008).

### 3.2.7.2. Avaliação da solidez à lavagem

Os testes de solidez à lavagem foram realizados conforme a Norma NBR ISO 105-C06: 2010, utilizando a escala de cinzas que atribui notas de 1 a 5, em que 1 significa grande perda de cor, baixa solidez e 5 que significa cor inalterada, ótima solidez.

Os testes de solidez à lavagem foram realizados pelo laboratório de Tinturaria da empresa Malwee localizada em Jaraguá do Sul, SC, em aparelho modelo TUBOTEST ATW-3 da marca KIMAK.

### **3.2.8. Estudos em escala piloto**

Após os estudos em laboratório, foi conduzido em parceria com a empresa Malwee do Brasil um teste em escala piloto do processo de reúso do efluente do tingimento com o mesmo procedimento descrito no item 3.2.6, porém utilizando o volume de 10 L de solução e 1 kg de malha.

## PARTE EXPERIMENTAL II - IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA

Neste capítulo são apresentadas as metodologias que foram utilizadas para realizar a imobilização da enzima HRP em alginato de cálcio e em espuma de poliuretano, assim como, as metodologias referentes às reações de remoção de corantes, realizadas com as enzimas imobilizadas, e a modelagem matemática para determinar parâmetros cinéticos e o coeficiente de transferência de massa para a enzima livre e imobilizada em alginato de cálcio.

### 3.3. Materiais

#### 3.3.1. Corantes

Para o desenvolvimento desta parte do trabalho foram utilizados os corantes Azul Reativo 221 (RB 221) e Azul Reativo 198 (RB 198). As estruturas dos corantes foram apresentadas no item 3.1.1.

#### 3.3.2. Enzima

A enzima utilizada foi a *Horseradish peroxidase* com as características descritas no item 3.1.3.

#### 3.3.3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nesta parte do trabalho foram:

- ✓ Agitadores magnéticos: Dist;
- ✓ Banho Dubnoff: Dist;
- ✓ Balança analítica: Micronal AB204-S;
- ✓ Espectrofotômetro: Shimadzu UV mini-1240;
- ✓ pHmetro: Quimis.

#### 3.3.4. Reagentes

Os reagentes utilizados nesta parte do trabalho foram:

- ✓ Ácido cítrico (Nuclear);
- ✓ Alginato de sódio baixa viscosidade (Vetec);
- ✓ 2,2'- Ácido *Azino-bis* [3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico 9] (ABTS) (Sigma Aldrich);

- ✓ Cloreto de cálcio (Vetec);
- ✓ Fosfato de potássio monobásico (Vetec);
- ✓ Fosfato de sódio dibásico (Vetec);
- ✓ Peróxido de hidrogênio 130 V, 35% (Lafan);
- ✓ Poliol poliéter (Mannes);
- ✓ Tolueno diisocianato (Mannes).

### 3.4. Métodos

#### **3.4.1. Determinação da atividade enzimática da *Horseradish peroxidase* (HRP)**

A atividade enzimática foi determinada conforme descrita anteriormente no item 3.2.1.

#### **3.4.2. Imobilização da enzima HRP**

Os estudos de imobilização da HRP foram realizados utilizando como suporte alginato de cálcio e espuma de poliuretano. O potencial catalítico das enzimas imobilizadas foi avaliado em reações de remoção enzimática de corantes, estudando parâmetros, tais como, efeito do pH, temperatura, concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, massa de cápsulas de alginato de cálcio, reutilização e estabilidade enzimática a frio na degradação dos corantes RB 221 e RB 198.

#### **3.4.3. Imobilização da enzima HRP em alginato de cálcio**

A imobilização da enzima HRP foi realizada conforme metodologia modificada de Preethi et al. (2013).

Para imobilizar a enzima foi preparada uma solução 2307,70 U/mL de HRP no pH ótimo de cada corante, estabelecidos nos estudos de degradação enzimática, item 3.2.2. Nesta mistura foram adicionados 0,02 g/mL de alginato de sódio e agitado até a formação de uma mistura homogênea. Esta mistura foi gotejada, com uma pipeta, em 50 mL de solução de cloreto de cálcio 0,1 mol/L, sob agitação em agitador magnético, para formar as cápsulas.

Após a formação das cápsulas, estas foram colocadas, em repouso, em um banho termostático a 30 °C durante 40 min. Posteriormente as cápsulas foram filtradas e armazenadas em água destilada em uma temperatura de 4 °C, sendo peneiradas para remover a água, antes de cada utilização.



### 3.4.3.1. Caracterização da enzima imobilizada em alginato

Para caracterizar a enzima imobilizada em alginato foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em um texturômetro para obter parâmetros como área superficial, volume total de poro, diâmetro médio do poro e diâmetro de partícula.

#### **3.4.3.1.1. Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia do suporte com a enzima imobilizada foi avaliada em um equipamento JEOL JSM-6390LV. As cápsulas de alginato de cálcio foram secas previamente em estufa a 60 °C durante 60 min. Para realizar as análises de morfologia as cápsulas foram fixadas em um stub e recobertas com ouro. Foram avaliadas ampliações de 1500 e 2500 vezes. As análises de MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME).

#### **3.4.3.1.2. Caracterização de textura**

A caracterização de textura das cápsulas de alginato de cálcio foi realizada para obter a área superficial, volume total de poro, diâmetro médio da partícula e diâmetro da partícula. Essas análises foram realizadas pelo método N<sub>2</sub>-BET usando analisador de área superficial e porosidade (TA.HD.plus Texture Analyser, Stable Micro Systems). As análises de textura foram realizadas na Central de análises do EQA.

### **3.4.4. Reações de remoção dos corantes reativos pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio**

Nos estudos de remoção dos corantes RB 198 e RB 221 pela enzima HRP foram avaliados, efeito do pH, da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da temperatura, da massa de cápsulas, a otimização do tempo de reação, reutilização e estabilidade enzimática. A quantidade de corante foi mantida constante em 40 mg/L. Foram variados pH (4; 5,5; 6 e 7), concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (31,2; 37,5; 43,7 e 50,0 μmol/L), tempo de reação (0; 30; 60; 120; 180; 240 e 300 min), temperatura (20; 30; 40; 50 e 60 °C), massa de cápsulas (0,110; 0,120; 0,140 e 0,160 g) e estabilidade enzimática na reação da enzima imobilizada e livre a 4 °C (0; 2; 3; 4; 5; 30; 45; 60 dias).

#### 3.4.4.1. Preparação da espuma de poliuretano (EPU)

A preparação da espuma de EPU foi realizada conforme metodologia modificada de Nicoletti et al. (2015). Em um copo plástico, em banho de gelo, foram adicionados 3,0 mL de tolueno diisocianato, formado numa mistura de isômeros 2,4 e 2,6 nas proporções 80/20 (TDI 80/20) em 5,0 mL de polioli poliéter em uma razão molar de NCO:OH de 2:1, sob agitação manual lenta, até formar um creme amarelo uniforme.

Após o término da reação a espuma permaneceu por aproximadamente 5 min em repouso para ocorrer a expansão do polímero, que em seguida foi colocado para secar em dessecador. Para as reações as espumas foram pesadas e estimou-se um peso médio de  $\pm 0,02$  g em cada reação.

#### 3.4.4.2. Imobilização de HRP em EPU

Nos estudos de imobilização foram utilizados 1,0 mg/mL de HRP para 1,5 g de espuma de poliuretano, em cada pH estudado. Esta permaneceu em um agitador orbital a 15 °C durante 2 h a 140 rpm. Ao término da reação a solução foi filtrada e o imobilizado resultante foi seco em estufa a 30 °C durante 24 h e após este tempo armazenado na geladeira a 4 °C, sem ser colocado em nenhuma solução. Na solução resultante foi determinada a atividade para se obter a quantidade de enzima imobilizada.

##### **3.4.4.2.1. Caracterização da enzima imobilizada em EPU**

Para caracterizar a enzima imobilizada em EPU utilizou-se espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) com ampliações de 30, 100 e 150 vezes e análises de texturômetro.

##### **3.4.2.2.2. Quantidade ótima de enzima imobilizada em EPU**

Foi realizado um estudo para determinar se o aumento da quantidade de enzima no processo de imobilização influenciaria na eficiência da degradação dos corantes. Foram utilizadas quantidades de enzima 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mg/mL para 1,5 g de espuma de poliuretano nas mesmas condições descritas no item 3.4.2.1.2. Em seguida as espumas foram utilizadas em reações de degradação enzimática.

### 3.4.2.2.3. Reações de remoção dos corantes reativos pela enzima HRP imobilizada em EPU

Foram utilizados dois corantes nos estudos de degradação pela enzima HRP, o RB 221 e o RB 198. Os parâmetros avaliados foram o efeito do pH, da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da temperatura, otimização do tempo de reação, reutilização e estabilidade enzimática. A quantidade de corante foi mantida constante em 40 mg/L. Foram variados pH (4; 5,5; 6 e 7), concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (31,2; 37,5; 43,7 e 50,0 μmol/L), tempo de reação (0; 5;10;20;30;40 min) para o corante RB 198 e de (0; 10; 30; 50; 60; 70; 80 min) para o corante RB 221, temperatura (20; 30; 40; 50 e 60 °C), reutilização e estabilidade enzimática na reação da enzima imobilizada e livre a 4°C (0; 3; 5; 15; 30; 45; 60 dias).

### 3.4.5. Modelo cinético de reações enzimáticas para enzima livre e imobilizada em alginato de cálcio: otimização e simulação

Um modelo matemático baseado em mecanismos cinéticos, proposto por Cristovão et al. (2007), foi utilizado para representar os perfis de remoção de corante ao longo do tempo em um reator em batelada. O mecanismo cinético dado pela equação de Michaelis-Menten, Equação 4, assume que a enzima (*E*) e o substrato (*S*) combinam para formar o complexo (*ES*), o qual se dissocia em produto (*P*) e enzima livre.



Onde  $K_{mS}$  e  $k_2$  são respectivamente, a constante de Michaelis-Menten para o substrato (mg/L) e a constante de velocidade (L/(mg.min)). De acordo com Cristóvão et al. (2008) existe uma dependência da concentração de substrato com a velocidade de reação ( $v$ ) na concentração do substrato é representada pela equação de Michaelis-Menten, dada pela Equação 5:

$$v = k_2 ES = \frac{\mu_{max} S}{K_{mS} + S} \quad (5)$$

onde  $v$  e  $\mu_{max}$  são respectivamente, velocidade de reação (1/min) e velocidade máxima de reação (1/min),  $S$  é a concentração de substrato

(mg/L). Quando a remoção não é completa, uma outra forma do modelo de Michaelis-Menten pode ser utilizada; essa forma considera um mecanismo reversível da equação de Michaelis-Menten, dada pela Equação 6.

$$v = \frac{\mu_{\max} \left( S - \frac{P}{K_{eq}} \right)}{K_{mS} \left( 1 + \frac{P}{K_{mP}} \right) + S} \quad (6)$$

Onde  $K_{eq}$  e  $K_{mP}$  são respectivamente, constante de equilíbrio (mg/L) e constante de Michaelis-Menten para o produto (mg/L).

#### 3.4.5.1. Balanço do reator em batelada: Enzima livre

A equação diferencial ordinária obtida do balanço de massa para  $S$  e  $P$  e considerando a HRP livre é dada pelas Equações 7 e 8:

$$-\frac{dS}{dt} = vE \quad (7)$$

$$\frac{dP}{dt} = vP \quad (8)$$

onde  $t$  é tempo (min).

#### 3.4.5.2. Balanço do reator em batelada: Enzima imobilizada

O modelo matemático utilizado para descrever a remoção em um reator de batelada alimentada com HRP imobilizada foi adaptado do estudo de Al-Muftan e Abu-Reesh (2005). Este modelo matemático considera as seguintes hipóteses: (i) reator com HRP imobilizada isotérmico; (ii) a atividade da HRP é uniforme através da partícula; (iii) a enzima é imobilizada uniformemente dentro de partículas esféricas porosas; (iv) não há desativação da HRP; (v) a HRP pode catalisar uma reação específica de acordo com mecanismo cinético reversível de Michaelis-Menten; (vi) a reação enzimática é monocomponente e gera somente um produto; (vii) a Lei de Fick pode modelar a difusão  $S$  e  $P$

dentro da partícula catalítica e a difusividade efetiva não se altera no interior da partícula e é independente da concentração.

Aplicando-se as hipóteses acima, o balanço diferencial de massa na fase líquida para o substrato e o produto pode ser escrito respectivamente pelas Equações 9 e 10:

$$\frac{dS_b}{dt} = -\frac{(1-\varepsilon_r)}{\varepsilon_r} \frac{3}{R} k_{LS} (S_b - S_{b,r=R}) \quad (9)$$

$$\frac{dP_b}{dt} = -\frac{(1-\varepsilon_r)}{\varepsilon_r} \frac{3}{R} k_{LP} (P_b - P_{b,r=R}) \quad (10)$$

onde  $S_b$ ,  $P_b$ ,  $\varepsilon_r$ ,  $R$ ,  $k_{LS}$  e  $k_{LP}$  são, respectivamente, concentração do substrato na fase líquida (mg/L), concentração do produto na fase líquida (mg/L), porosidade do reator, raio da partícula (m), coeficiente de transferência de massa do substrato e produto (m/s).

O balanço diferencial na fase sólida para o substrato e o produto pode ser escrito respectivamente pelas Equações 11 e 12:

$$\varepsilon_P \frac{\partial S_P}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 D_{eS} \frac{\partial S_P}{\partial r} \right) - \rho_P v \quad (11)$$

$$\varepsilon_P \frac{\partial S_P}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 D_{eP} \frac{\partial S_P}{\partial r} \right) - \rho_P v \quad (12)$$

onde  $\varepsilon_P$ ,  $S_P$ ,  $P_P$ ,  $r$ ,  $D_{eS}$ ,  $D_{eP}$  e  $\rho_P$  são, respectivamente, porosidade da partícula, concentração de substrato na fase sólida (mg/L), concentração de produto na fase sólida (mg/L), coordenada radial, difusividade efetiva do substrato e produto (m<sup>2</sup>/s) e massa específica aparente da partícula (kg/m<sup>3</sup>).

As condições iniciais e condições de contorno para as Equações (9-12) são:

$$t = 0 \quad S_b = S_{b,0} \quad P_b = S_P = P_P = 0 \quad (13)$$

$$r = 0 \quad \frac{\partial S_P}{\partial r} = \frac{\partial P_P}{\partial r} = 0 \quad (14)$$

$$r = R \quad \begin{aligned} D_{eS} \frac{\partial S_P}{\partial r} &= k_{LS} (S_b - S_{P,r=R}) \\ D_{eP} \frac{\partial P_P}{\partial r} &= k_{LP} (P_b - P_{P,r=R}) \end{aligned} \quad (15)$$

onde  $S_{b,o}$  é a concentração inicial do substrato na fase líquida (mg/L).

### 3.4.5.3. Estimativa das constantes cinéticas, coeficientes de transferência de massa e solução numérica

Um dos grandes problemas no desenvolvimento de modelos matemáticos e que muitas vezes impossibilita sua aplicação na área de bioprocessos é o desconhecimento ou a impossibilidade em determinar experimentalmente as constantes cinética de reação.

A determinação das constantes cinéticas de reação foi realizada através do emprego de métodos numéricos de otimização acoplados com a solução numérica das equações diferenciais ordinárias resultantes dos balanços de massa para o sistema com a enzima livre.

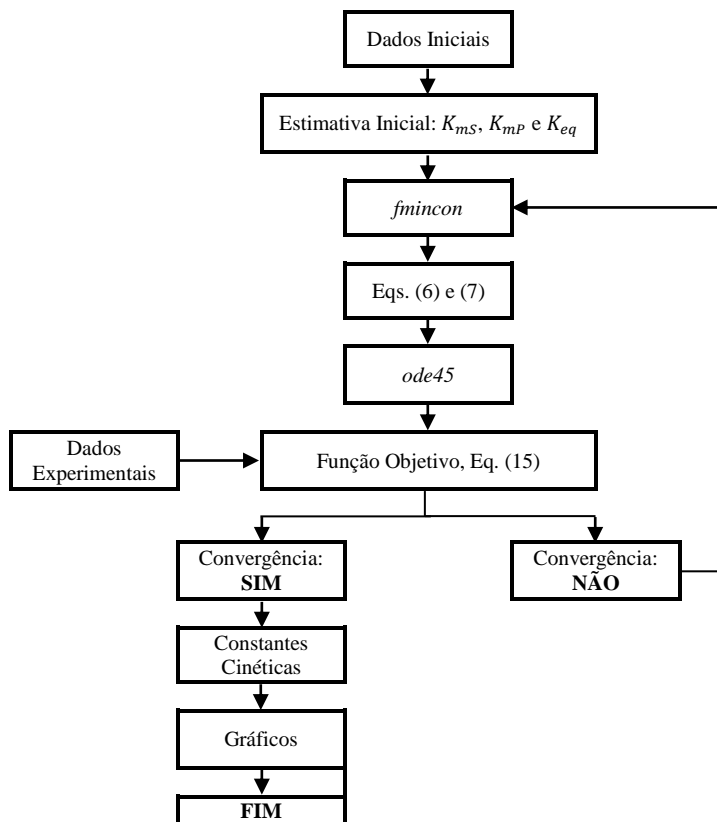
Preferiu-se determinar as constantes cinéticas considerando o mecanismo reversível ( $K_{mS}$ ,  $K_{mP}$  e  $K_{eq}$ ), Equação 5, em um sistema com enzima livre com a finalidade de evitar uma possível interferência causada pelos coeficientes de transferência de massa do sistema com enzima imobilizada.

As constantes cinéticas de reação foram estimadas através do ajuste entre os dados experimentais e numéricos (solução das Equações 6 e 7). Esse ajuste foi obtido através de um algoritmo escrito em linguagem Matlab 2013a utilizando duas funções internas, a *ode45* e a *fmincon*. A *ode45* resolve numericamente as equações diferenciais ordinárias e a *fmincon* minimiza uma função objetivo ( $F_{obj}$ ) dado pela Equação 16. Na Figura 21, é apresentado um fluxograma simplificado do esquema de minimização das constantes cinéticas e resolução numérica das equações para o sistema com enzima livre.

$$F_{obj} = \sum_{m=1}^n \left( C_m^{\text{exp}} - C_m^{\text{num}} \right)^2 \quad (16)$$

Onde  $m$  é o ponto experimental,  $n$  é o número de pontos experimentais,  $C_m^{exp}$  é a concentração experimental no ponto  $m$  e  $C_m^{num}$  é a concentração numérica no ponto  $m$ .

**Figura 21-** Fluxograma simplificado do esquema de minimização das constantes cinéticas e resolução numérica das equações para o sistema com enzima livre.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após a estimação dos parâmetros cinéticos e resolução das equações diferenciais ordinárias para o sistema enzima livre, estimou-se os coeficientes de transferência de massa para o substrato e produto

( $k_{LS}$ ,  $k_{LP}$ ,  $D_{eS}$  e  $D_{eP}$ ) e no sistema com enzima imobilizada em cápsulas de alginato.

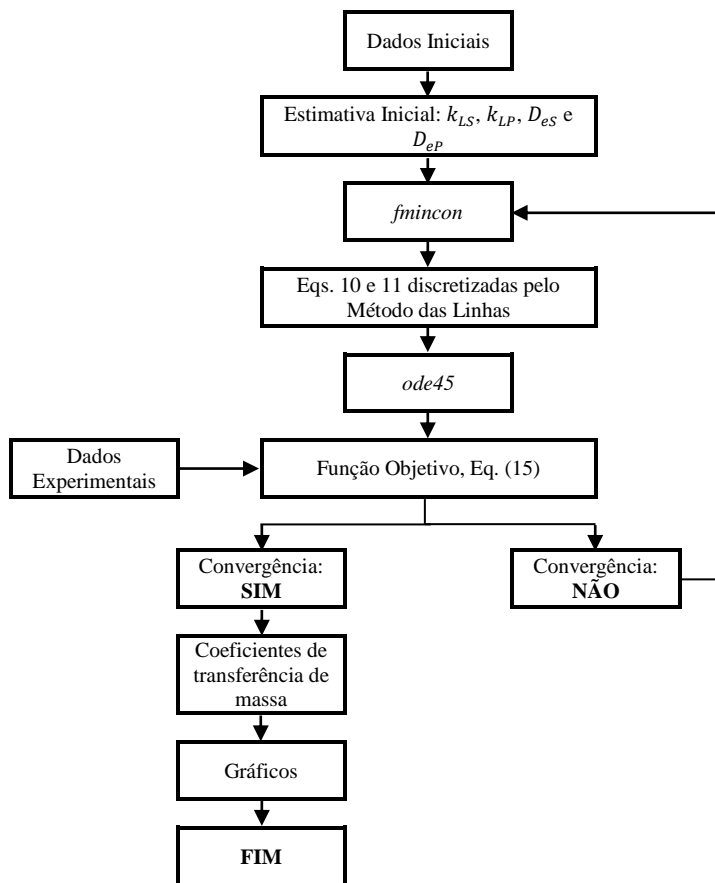
As equações diferenciais parciais juntamente com suas condições de contorno provenientes do balanço de massa para o sistema com enzima imobilizada foram resolvidas numericamente através do método das linhas.

O método das linhas consiste em transformar uma equação diferencial parcial em uma equação diferencial ordinária através de uma técnica de discretização que pode ser resolvida numericamente pela *ode45* do Matlab (MAYER et al., 2016). A técnica de discretização empregada foi diferenças finitas.

Na Figura 22 é apresentado um fluxograma simplificado do esquema de estimação dos coeficientes de transferência de massa e resolução das equações diferenciais parciais resultantes do balanço de massa para o sistema com enzima imobilizada. A ideia desse algoritmo é muito similar ao sistema com enzima livre, em que também foi realizada a minimização da função objetivo, Equação 15, através do ajuste entre os dados experimentais e numéricos. Nesse sistema foram utilizadas as constantes cinéticas obtidas no sistema com enzima livre.



**Figura 22-** Fluxograma simplificado do esquema de minimização dos coeficientes de transferência de massa e resolução numérica das equações para o sistema com enzima imobilizada.



Fonte: Elaborado pela autora.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A apresentação dos resultados e discussão é dividida em duas partes. Na parte 1 são apresentados os resultados dos estudos do efeito da presença de mais de um corante presente em solução aquosa e reúso do efluente do processo de tingimento. Na parte 2 são apresentados os estudos de remoção de corantes utilizando a enzima *Horseradish peroxidase* imobilizada em alginato de cálcio ou espuma de poliuretano e o modelo matemático para enzima livre e imobilizada em alginato de cálcio para determinar constantes cinéticas e coeficiente de transferência de massa.

### **RESULTADOS PARTE I- ESTUDO DO EFEITO DA PRESENÇA DE MAIS DE UM CORANTE EM SOLUÇÃO AQUOSA E REÚSO DO EFLUENTE DO PROCESSO DE TINGIMENTO**

#### **4.1. Estudo do efeito da presença de mais de um corante em solução**

Os estudos do efeito da presença de mais de um corante em solução foram realizados conforme item 3.2.2. Primeiramente serão apresentados os resultados referentes aos corantes isolados e em seguida os resultados referentes à mistura de dois ou três corantes.

O tempo das reações realizadas neste estudo foi de 30 min, sendo este tempo definido em cinéticas preliminares realizadas para todos os corantes. A temperatura e a agitação foram obtidas de trabalhos anteriores (FARIAS, 2013).

##### **4.1.1. Remoção enzimática do corante Azul 221 (RB 221)**

O corante RB 221 é um corante de formazan muito utilizado nas indústrias têxteis para tingir tecido de algodão. O estudo foi realizado conforme seção 3.2.2, através de um planejamento experimental estrela  $2^4$  com triplicata do ponto central. Foram analisados os 4 principais fatores que influenciam em uma reação enzimática (concentração de enzima,  $H_2O_2$ , corante e pH), bem como suas possíveis interações. As descolorações obtidas em cada estudo são apresentadas na Tabela 6.

**Tabela 6** - Planejamento experimental da descoloração enzimática do corante RB 221.

<b>Ensaio</b>	<b>Enzima U/ml</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μmol/L</b>	<b>Corante mg/l</b>	<b>pH</b>	<b>D RB 221 (%)</b>
<b>1</b>	324,71	25,00	40,00	4,0	4
<b>2</b>	324,71	25,00	40,00	7,0	27
<b>3</b>	324,71	25,00	80,00	4,0	1
<b>4</b>	324,71	25,00	80,00	7,0	17
<b>5</b>	324,71	37,50	40,00	4,0	4
<b>6</b>	324,71	37,50	40,00	7,0	30
<b>7</b>	324,71	37,50	80,00	4,0	0
<b>8</b>	324,71	37,50	80,00	7,0	25
<b>9</b>	649,42	25,00	40,00	4,0	4
<b>10</b>	649,42	25,00	40,00	7,0	30
<b>11</b>	649,42	25,00	80,00	4,0	2
<b>12</b>	649,42	25,00	80,00	7,0	15
<b>13</b>	649,42	37,50	40,00	4,0	5
<b>14</b>	649,42	37,50	40,00	7,0	44
<b>15</b>	649,42	37,50	80,00	4,0	1
<b>16</b>	649,42	37,50	80,00	7,0	22
<b>17</b>	162,35	31,25	60,00	5,5	34
<b>18</b>	811,77	31,25	60,00	5,5	31
<b>19</b>	487,06	18,75	60,00	5,5	27
<b>20</b>	487,06	43,75	60,00	5,5	58
<b>21</b>	487,06	31,25	20,00	5,5	89
<b>22</b>	487,06	31,25	100,00	5,5	19
<b>23</b>	487,06	31,25	60,00	2,5	4
<b>24</b>	487,06	31,25	60,00	8,5	4
<b>25</b>	487,06	31,25	60,00	5,5	31
<b>26</b>	487,06	31,25	60,00	5,5	32
<b>27</b>	487,06	31,25	60,00	5,5	31

Na Tabela 6, pode-se observar que a máxima descoloração do corante RB 221 foi de 89 %, obtida no estudo 21, em que foram utilizados 487,06 U/mL de enzima, 31,25 μmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20,00 mg/L de corante e pH 5,5. Nesse estudo a maior remoção foi obtida em uma concentração de corante de 20,00 mg/L. O aumento da concentração de

corante provocou uma diminuição na eficiência de remoção. Esse comportamento pode ser observado em outros estudos que foram utilizados a mesma quantidade de enzima,  $H_2O_2$  e pH, porém houve um aumento da concentração de corante, no estudo 22, em que foram utilizados 100,00 mg/L, a máxima remoção foi de apenas 19%. Mohan et al., (2005), realizaram a remoção do corante preto ácido 10 BX pela enzima HRP, a máxima descoloração foi obtida a uma concentração de 30 mg/L e houve uma diminuição em concentrações superiores a este valor. Os mesmos autores observaram que quando a concentração de enzima manteve-se constante a quantidade de substrato foi gradualmente aumentada, a taxa de reação aumentou até um máximo, após o que o valor permaneceu constante.

Já em relação ao pH, pode-se observar que a maior descoloração foi obtida em pH 5,5, e que em pHs extremos praticamente não houve remoção.

Resultados semelhantes foram obtidos por Abdel-Aty et al. (2013), que realizaram a degradação de corantes como laranja de metila, azul de metileno, verde de metileno e azul de bromofenol, utilizando HRP, a máxima descoloração foi obtida quando foi utilizado 20 mg/L de corante em pH 5,5, 60, 71, 80 e 75% respectivamente.

Si e Cui (2013) utilizaram uma nova peroxidase de origem fúngica derivada da *Perenniporia subacida* para degradar uma série de corantes de vários tipos como reativos, dispersos e neutros. Os autores observaram uma máxima atividade da enzima em pH 5,5 a 30 °C.

Por meio dos resultados obtidos na Tabela 6, realizou-se uma análise dos efeitos dos 4 fatores estudados em relação à resposta do experimento (descoloração de corante), os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7** - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 221.

Fator	Efeito	Erro padrão	t Student	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
<b>Média/ interações</b>	<b>31,3</b>	<b>0,3</b>	<b>94,0</b>	<b>0,0</b>	<b>29,9</b>	<b>32,8</b>
(1) Enzima (L)	0,8	0,2	3,2	0,1	-0,2	1,8
<b>Enzima (Q)</b>	<b>-5,7</b>	<b>0,2</b>	<b>-22,8</b>	<b>0,0</b>	<b>-6,8</b>	<b>-4,6</b>
<b>(2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (L)</b>	<b>7,8</b>	<b>0,2</b>	<b>32,9</b>	<b>0,0</b>	<b>-6,8</b>	<b>8,8</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Q)	-0,7	0,2	-2,8	0,1	-1,8	0,4
<b>(3) Corante (L)</b>	<b>17,1</b>	<b>0,2</b>	<b>-72,5</b>	<b>0,0</b>	<b>-18,1</b>	<b>-16,1</b>
<b>Corante (Q)</b>	<b>5,0</b>	<b>0,2</b>	<b>20,2</b>	<b>0,0</b>	<b>4,0</b>	<b>6,1</b>
<b>(4) pH (L)</b>	<b>15,8</b>	<b>0,2</b>	<b>66,8</b>	<b>0,0</b>	<b>14,8</b>	<b>16,8</b>
<b>pH (Q)</b>	<b>19,9</b>	<b>0,2</b>	<b>-79,8</b>	<b>0,0</b>	<b>-21,0</b>	<b>-18,9</b>
<b>1L e 2L</b>	<b>1,4</b>	<b>0,3</b>	<b>4,8</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>2,6</b>
<b>1L e 3L</b>	<b>-2,6</b>	<b>0,3</b>	<b>-9,1</b>	<b>0,0</b>	<b>-3,9</b>	<b>-1,4</b>
1L e 4L	1,1	0,3	3,9	0,0	-0,1	2,4
2L e 3L	-0,6	0,3	-2,2	0,1	-1,9	0,6
<b>2 L e 4 L</b>	<b>4,1</b>	<b>0,3</b>	<b>14,3</b>	<b>0,0</b>	<b>2,9</b>	<b>5,4</b>
<b>3L e 4L</b>	<b>-4,9</b>	<b>0,3</b>	<b>-16,9</b>	<b>0,0</b>	<b>-6,1</b>	<b>-3,5</b>

Analisando a Tabela 7 pode-se observar, que os resultados do intervalo de confiança mostram que os efeitos lineares do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do corante e do pH, os efeitos quadráticos da enzima, do corante e do pH e as interações entre enzima e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enzima e corante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH, corante e pH são estatisticamente significativos. Nesse intervalo esses fatores apresentam efeitos diferentes de zero no intervalo de confiança, calculado em um nível de significância de 5%. Observa-se ainda que na reação de remoção do corante RB 221, quase todos os fatores e interações influenciaram na reação de remoção, com destaque para pH e corante em que tanto os fatores lineares quanto os quadráticos foram significativos. De acordo com Cavaco e Gubits (2003) o pH é um dos fatores que mais influencia em uma reação enzimática.

Toda enzima tem uma faixa ótima de pH em que sua atividade é máxima, fora dessa faixa, as interações eletrostáticas dentro da enzima se alteram com a possibilidade de alterar a conformação tridimensional e a atividade enzimática. Na Tabela 6, pode ser observado que nos estudos

23 em que se usou pH 2,5 e no estudo 24 em que se usou pH 8,5 a remoção de corante foi extremamente baixa, principalmente porque nesse estudo de degradação do corante RB 221 foi encontrado um pH ótimo de 5,5. Em valores muito distantes desse ponto praticamente não há remoção.

A degradação dos corantes vermelho direto 23 (DR 23), vermelho direto 239 (DR 239), azul direto 80 (DB 80) e amarelo direto 4 (DY 4) por peroxidase do nabo foram estudadas por Matto e Husain (2007), na faixa de valores de pH numa escala de 3,0-10,0, onde a máxima degradação foi obtida na faixa de pH 5,0-5,5 em 1 h de reação, com degradações que variaram de 6-93%, dependendo do mediador utilizado. Para valores de pH entre 7 e 10 os corantes não apresentaram degradação.

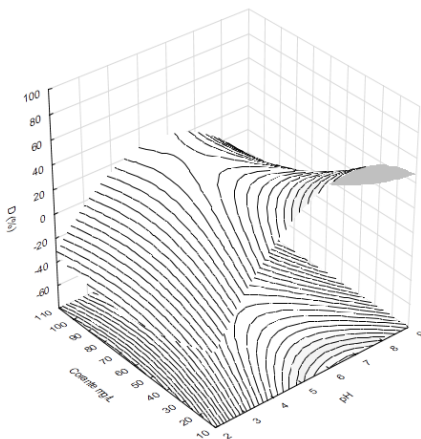
Outro fator que influencia fortemente nas reações enzimáticas é o corante, que é o substrato da reação. Quando o substrato se liga à enzima, esse também é influenciado pelas interações eletrostáticas, que dependendo do grau de interação com a enzima, remove uma quantidade maior ou menor de corante.

A enzima peroxidase depende de peróxido para catalisar a oxidação de uma série de compostos aromáticos. Segundo Fodil et al. (2012), baixas concentrações de  $H_2O_2$  podem limitar a formação de uma enzima intermediária no ciclo catalítico da peroxidase. Já segundo Liu et al., (2014), a alta concentração de  $H_2O_2$  não é favorável para a estabilidade das proteínas heme, tais como *Horseradish peroxidase*, devido à inativação causada pela destruição oxidativa da porção interna da porfirina.

Li et al. (2009) realizaram a degradação do corante vermelho congo com manganês peroxidase. Os autores observaram que as interações entre  $H_2O_2$  e enzima, corante e enzima foram estatisticamente significativas na faixa estudada.

Na Figura 23, pode-se observar a curva de nível para os fatores corante e pH, correspondentes à superfície de resposta gerada pelo modelo com termos lineares e quadráticos e interações dos termos lineares.

**Figura 23-** Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RB 221.



Na Figura 23, pode-se observar que a máxima remoção de corante foi obtida num ponto bem específico em que foi utilizado 20 mg/L de corante e pH 5,5. Nesse estudo observou-se que o aumento da concentração de corante provocou uma diminuição na eficiência de remoção (MOHAN et al., 2005). Esse comportamento pôde ser observado no estudo 22, em que se utilizou 100 mg/L de corante e foi obtida uma diminuição na eficiência de remoção.

Forgiarini (2006) realizou a descoloração do corante Turquesa remazol G 133% utilizando a *Horseradish peroxidase* a máxima descoloração foi de 59% obtida em pH 4, porém em pH 5,0 foi obtido 57% de descoloração, indicando uma faixa ótima de descoloração.

O corante Turquesa remazol G 133% utilizado no estudo de Forgiarini (2006), também contém cobre em sua estrutura e uma estrutura semelhante ao RB 221. Para o RB 221 a máxima remoção foi obtida em pH 5,5.

Com os efeitos obtidos na Tabela 7 foi calculado o modelo de descoloração do corante RB 221 pela enzima HRP, que é apresentado na Equação 17.



$$Des = \left( \begin{array}{l} 31,8 - 2,8[enzima]^2 + 2,5[corante]^2 - 9,9[pH]^2 + \\ 3,9[H_2O_2] - 8,5[corante] + 7,9[pH] + \\ 0,7[enzima][H_2O_2] - 1,3[enzima][corante] + \\ 2,0[H_2O_2][pH] - 2,4[corante][pH] \end{array} \right) \quad (17)$$

Na Tabela 8, é possível observar a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

**Tabela 8** - Análise de variância para o corante RB 221.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	6239,8	14	445,7		
Resíduos	4461,2	12	371,7	1,2	2,5
Falta de Ajuste	3846,4	10	384,6		
Erro puro	0,7	2	0,3	1282	4,1
Total	10700,7	26			

Varição explicada: 0,6405%

Varição máxima explicável: 0,2210%

Na Tabela 8, pode-se observar, que a soma quadrática dos erros é muito pequena, o que nos indica que o modelo poderia ser considerado bom, porém o F calculado do erro puro em relação à falta de ajuste é muito grande em relação ao F tabelado indicando que há falta de ajuste ao modelo. Foi obtido um  $R^2$  de 64%.

#### 4.1.2. Degradação enzimática do corante Azul 198 (RB 198)

O corante RB 198 é um corante de trifenodioxina muito utilizado nas indústrias têxteis. Esse tipo de corante precisa de altas temperaturas de tingimento para se fixar a fibra de algodão. O estudo foi realizado conforme item 3.2.2, através de um planejamento experimental estrela  $2^4$  com triplicata do ponto central. Foram analisados 4 fatores que influenciam em reações enzimáticas

(concentração de enzima,  $H_2O_2$ , corante e pH) bem como suas possíveis interações. As descolorações obtidas em cada estudo estão apresentadas na Tabela 9.

**Tabela 9** - Planejamento experimental da descoloração enzimática do corante RB 198.

<b>Ensaio</b>	<b>Enzima U/ml</b>	<b><math>H_2O_2</math> <math>\mu\text{mol/L}</math></b>	<b>Corante mg/l</b>	<b>pH</b>	<b>D RB 198 (%)</b>
<b>1</b>	324,71	25,00	40,00	4,0	24
<b>2</b>	324,71	25,00	40,00	7,0	56
<b>3</b>	324,71	25,00	80,00	4,0	7
<b>4</b>	324,71	25,00	80,00	7,0	27
<b>5</b>	324,71	37,50	40,00	4,0	28
<b>6</b>	324,71	37,50	40,00	7,0	65
<b>7</b>	324,71	37,50	80,00	4,0	11
<b>8</b>	324,71	37,50	80,00	7,0	40
<b>9</b>	649,42	25,00	40,00	4,0	40
<b>10</b>	649,42	25,00	40,00	7,0	61
<b>11</b>	649,42	25,00	80,00	4,0	25
<b>12</b>	649,42	25,00	80,00	7,0	28
<b>13</b>	649,42	37,50	40,00	4,0	38
<b>14</b>	649,42	37,50	40,00	7,0	71
<b>15</b>	649,42	37,50	80,00	4,0	25
<b>16</b>	649,42	37,50	80,00	7,0	43
<b>17</b>	162,35	31,25	60,00	5,5	58
<b>18</b>	811,77	31,25	60,00	5,5	60
<b>19</b>	487,06	18,75	60,00	5,5	53
<b>20</b>	487,06	43,75	60,00	5,5	63
<b>21</b>	487,06	31,25	20,00	5,5	64
<b>22</b>	487,06	31,25	100,00	5,5	36
<b>23</b>	487,06	31,25	60,00	2,5	0
<b>24</b>	487,06	31,25	60,00	8,5	48
<b>25</b>	487,06	31,25	60,00	5,5	61
<b>26</b>	487,06	31,25	60,00	5,5	61
<b>27</b>	487,06	31,25	60,00	5,5	60

Na Tabela 9, observa-se que a máxima descoloração do corante RB 198 pela enzima HRP 71% foi obtida quando foi utilizado 649,42 U/mL de enzima, 37,50  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 40,00 mg/L de corante, e pH 7,0.

Nos estudos 2, 6, 10, 17, 18, 20, 21 e na triplicata do ponto central, foram obtidas remoções de 56, 65, 61, 58, 60, 63, 64 e 61%, respectivamente. Para o RB 198 pode-se observar que não houve uma regra específica para remoção de corante. A máxima remoção foi obtida em pH 7,0, porém na maioria dos estudos que foram obtidas remoção em torno de 60%, essa foi obtida em pH 5,5 utilizando concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 25,00-37,50  $\mu\text{mol/L}$ , concentração de corante entre 20-60 mg/L e concentrações de enzima em toda faixa estudada.

Resultados semelhantes foram obtidos por Chen et al. (2003) que avaliaram a capacidade de 6 cepas bacterianas em degradar corantes têxteis ácido, direto e reativo entre estes o RB 198 e encontraram melhores descolorações em uma faixa entre pH 5,5 a 10,0 e temperaturas de 25 a 30 °C.

Sathishkuma, Murugesan e Palvannan (2010) realizaram a descoloração do corante RB 198 utilizando lacase do *P. florida* NCIM. Foi obtida uma degradação de até 96% em 10 min de reação e de 99% em 120 min de reação utilizando 50 ppm de corante em pH 4,5.

Por meio dos resultados obtidos na Tabela 9, realizou-se uma análise dos efeitos dos 4 fatores estudados em relação a resposta do experimento (descoloração de corante), os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 198.

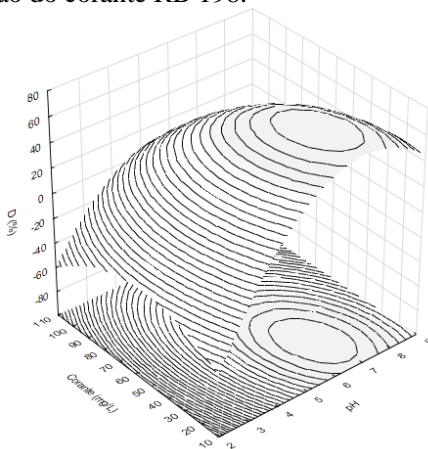
Fator	Efeito	Erro padrão	t Student	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
Média/ interações	60,7	0,3	182,0	0,0	59,2	62,1
(1)Enzima (L)	6,4	0,2	27,2	0,0	5,4	7,4
Enzima (Q)	-4,5	0,2	-18,0	0,0	-5,5	-3,4
(2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (L)	6,1	0,2	25,8	0,0	5,1	7,1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Q)	-5,0	0,2	-20,0	0,0	-6,0	-3,9
(3) Corante (L)	-19,4	0,2	82,4	0,0	-20,4	-18,4
Corante (Q)	-9,0	0,2	-36,0	0,0	-10,0	-7,9
(4) pH (L)	24,1	0,2	102,7	0,0	23,0	25,1
pH (Q)	-22,0	0,2	-88,0	0,0	-23,0	-21,0
1L e 2L	-0,9	0,3	-3,0	0,1	-2,1	0,4
1L e 3L	-0,1	0,3	-0,4	0,1	-1,4	1,1
1L e 4L	-5,4	0,3	-18,6	0,0	-6,6	-4,1
2L e 3L	1,4	0,3	4,8	0,0	0,1	2,6
2 L e 4 L	5,1	0,3	17,8	0,0	3,9	6,4
3L e 4L	-6,6	0,3	-23,0	0,0	-7,9	-5,4

Analisando a Tabela 10 observar-se que os resultados do intervalo de confiança mostram que todos os efeitos lineares e quadráticos e as interações entre enzima e pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e corante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH e corante e pH, foram estatisticamente significativos. Neste intervalo de confiança esses fatores apresentam efeitos diferentes de zero calculado em um nível de significância de 5%.

Pode-se observar que a maior parte dos efeitos e interações que foram significativos para o RB 198, também foram significativos para o RB 221, mostrando que esses fatores influenciam a degradação de corantes reativos, principalmente os azuis, pelas enzimas peroxidases.

Na Figura 24 observa-se a curva de nível para os fatores corante e pH correspondentes à superfície de resposta gerada pelo modelo com termos lineares e quadráticos e interações dos termos lineares.

**Figura 24-** Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RB 198.



Na Figura 24, pode-se observar que um aumento no pH promove um aumento na descoloração do corante em torno do ponto central. Em pHs entre 5,5 e 7,0 foram obtidas as máximas descolorações, após essa faixa, houve um decréscimo na eficiência de descoloração. O corante também variou com a máxima degradação em torno de 60 mg/L. Porém a maior degradação foi obtida para uma concentração de corante de 40 mg/L. O modelo de descoloração do corante RB 198 pela enzima HRP é apresentado na equação 18

$$Des = \left( \begin{array}{l} 60,7 - 2,2[enzima]^2 - 2,5[H_2O_2]^2 - 4,5[corante]^2 - \\ 11,0[pH]^2 + 3,2[enzima] + 3,0[H_2O_2] - 9,7[corante] + \\ 12,0[pH] - 2,7[enzima][pH] + 0,7[H_2O_2][corante] + \\ 2,6[H_2O_2][pH] - 3,3[corante][pH] \end{array} \right) \quad (18)$$

Na Tabela 11, é possível observar a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

**Tabela 11-** Análise de variância para o corante RB 198.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	9863,7	14	704,5		
Resíduos	287,9	12	24,0	29,3	2,5
Falta de Ajuste	842,4	10	84,2		
Erro puro	0,7	2	0,3	280,6	4,1
Total	10151,6	26			

Varição explicada: 0,9170: %

Varição máxima explicável: 0,8202%

Na Tabela 11, observa-se que a soma quadrática dos erros é pequena, o que nos indica que o modelo é bom. Os valores de resíduos se comparado à regressão não são significativos. O F calculado do erro puro em relação à falta de ajuste é alto em relação ao F tabelado indicando certa falta de ajuste. Foi apresentado um  $R^2$  de 91,7%.

#### 4.1.3. Degradação enzimática do corante Amarelo 145 (RY 145)

O mesmo planejamento experimental utilizado para avaliar a descoloração dos corantes RB 221 e RB 198 foi utilizado para o corante RY 145, porém para este corante foram obtidas degradações menores que 2%.

Corantes amarelos como o RY 145 geralmente possuem uma menor eficiência de degradação quando se utiliza enzimas. Pereira et al. (2009) realizaram a degradação de uma série de corantes reativos entre estes o RY 145 utilizando uma lacase bacteriana. A máxima descoloração obtida para este corante foi de 15% numa faixa de pH de 8,0-9,0, após 24 h de reação.

Para obtenção de degradações significativas muitas vezes são necessários longos tempos de reação como comprovado por Minusi et al. (2001) que avaliaram a descoloração de corantes sintéticos como o RY 145, utilizando o fungo da decomposição branca. Após 9 dias de contato foi obtida uma degradação de 100% com o fungo *P. chrysosporium*.

A baixa eficiência de remoção de corantes amarelos por enzima, provavelmente é devido à baixa velocidade com que esse corante acessa o sítio ativo da enzima. No estudo de Minusi et al. (2009) para atingir 100% de remoção, por fungo da decomposição branca, foram

necessários 9 dias de reação. Esse tipo de fungo produz enzimas que tem a capacidade de remover corantes.

#### **4.1.4. Degradação enzimática do corante Vermelho 195 (RR 195)**

O Corante RR 195 foi avaliado segundo item 3.2.2, através da metodologia da superfície de resposta, foi obtida uma máxima descoloração de 8%, quando foi utilizado 649,42 U/mL de enzima, 37,50  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 40,00 e 80,00 mg/L de corante em pH 7,0.

Corantes azo vermelhos como RR 195, geralmente possuem baixa eficiência de degradação. Silva et al. (2012 c) realizaram a degradação do corante vermelho ultra RGB com uma máxima degradação de 5,5%. Da mesma forma que o RY 145, o RR 195 é mais resistente à degradação por enzimas, por isso é necessário utilizar longos tempos de reação, outros tipos de micro-organismos ou combinação de mais de uma metodologia. Nawahwi, Ibrahim e Yahya (2013) realizaram a descoloração do corante RR 195 pela bactéria *Paenibacillus* spp. R<sub>2</sub> obtendo 95% de descoloração em 24 h de reação.

Sahasrabudhe e Pathade (2012) avaliaram que a descoloração do corante RR 195 utilizando a bactéria *Georgenia* sp foi obtida remoção de até 95% em 5 h, em condições anóxicas.

#### **4.1.5. Degradação enzimática da dicromia RB 221 + RR 195**

O planejamento experimental para a dicromia RB 221 + RR 195 foi realizado conforme item 3.2.2, porém as medidas dos corantes foram realizadas no comprimento de onda de cada corante.

##### **4.1.5.1. Degradação enzimática do RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195**

O planejamento experimental da descoloração enzimática da dicromia RB 221 + RR 195 com as respostas obtidas para cada corante é apresentado na Tabela 12. Nestes estudos todas as análises estatísticas são apresentadas separadamente.

**Tabela 12** - Planejamento experimental da descoloração enzimática dos corantes RB 221+ RR 195.

Ensaio	Enzima U/ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol/L	Corante mg/l	pH	D RB 221 (%)	D RR 195 (%)
1	324,71	25,00	40,00	4,0	5	0
2	324,71	25,00	40,00	7,0	29	10
3	324,71	25,00	80,00	4,0	1	0
4	324,71	25,00	80,00	7,0	20	4
5	324,71	37,50	40,00	4,0	7	2
6	324,71	37,50	40,00	7,0	30	8
7	324,71	37,50	80,00	4,0	3	1
8	324,71	37,50	80,00	7,0	26	8
9	649,42	25,00	40,00	4,0	7	1
10	649,42	25,00	40,00	7,0	41	13
11	649,42	25,00	80,00	4,0	1	0
12	649,42	25,00	80,00	7,0	16	7
13	649,42	37,50	40,00	4,0	9	1
14	649,42	37,50	40,00	7,0	49	14
15	649,42	37,50	80,00	4,0	4	1
16	649,42	37,50	80,00	7,0	24	10
17	162,35	31,25	60,00	5,5	61	14
18	811,77	31,25	60,00	5,5	92	22
19	487,06	18,75	60,00	5,5	40	12
20	487,06	43,75	60,00	5,5	86	23
21	487,06	31,25	20,00	5,5	92	25
22	487,06	31,25	100,00	5,5	37	9
23	487,06	31,25	60,00	2,5	2	0
24	487,06	31,25	60,00	8,5	2	1
25	487,06	31,25	60,00	5,5	88	22
26	487,06	31,25	60,00	5,5	89	21
27	487,06	31,25	60,00	5,5	89	24

Na Tabela 12, pode-se observar que para o RB 221 a máxima descoloração de 92% foi obtida com 60,00 mg/L de corante, 31,25 μmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH 5,5 (experimentos 18 e 21), em duas concentrações diferentes de enzima (487, 06 e 811,77 U/mL). Nos estudos 20 e na triplicata do ponto central foram obtidas remoções de 86 e 89%, respectivamente.



Vale ressaltar que quando o corante RB 221 foi analisado isoladamente nos estudos 18 e na triplicata do ponto central a máxima descoloração foi de aproximadamente 31%, quando o corante RB 221 foi analisado em presença do RR 195, a máxima descoloração foi de 92% no estudo 18 e de aproximadamente 89% na triplicata do ponto central. Para o corante RR 195 foi observado esse mesmo comportamento, enquanto que, quando este corante foi analisado isoladamente, a máxima descoloração foi de 8%. Avaliando esse corante na presença do corante RB 221 foram observadas degradações de aproximadamente 22 a 25 % nos estudos 18, 20, 21 e na triplicata do ponto central.

Wong e Yu (1999) observaram um aumento na remoção dos corantes azo e índigo, quando o corante de antraquinona estava presente na mistura. A antraquinona trabalhou como um mediador da catálise e também foi degradado durante a decomposição dos outros corantes.

Provavelmente o corante RR 195 atuou como um mediador da catálise do RB 221. Como os corantes têm velocidades diferentes de remoção, a presença do outro corante em solução pode ter aumentado a velocidade de remoção do RB 221. Após esse corante ter atingido sua máxima remoção, ele pode ter auxiliado o RR 195 a atingir uma velocidade maior de remoção.

Este mesmo efeito sinérgico foi observado por Silva et al. (2012 c), que realizaram a degradação dos corantes azul brilhante remazol, vermelho ultra remazol e laranja brilhante 3R pela peroxidase do nabo, estes corantes foram analisados isoladamente e em uma tricromia. Quando os corantes estavam isolados foi obtida uma descoloração de 66,0, 5,50 e 9,0% respectivamente. Quando os corantes estavam presentes em uma tricromia foram obtidas remoção de 69,0, 18,7 e 26,0 %, respectivamente.

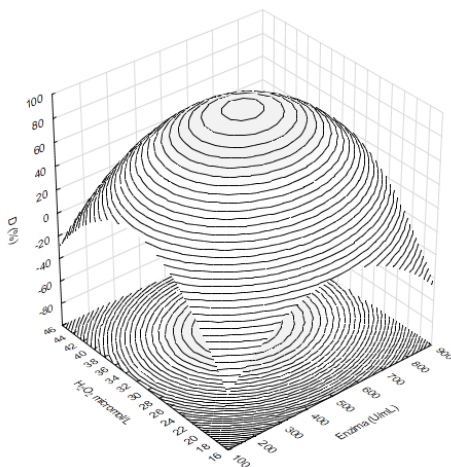
A partir dos resultados apresentados na Tabela 12 para o corante RB 221 foram obtidos os efeitos, que estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195.

Fator	Efeito	Erro padrão	t Student	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
Média/ interações	88,6	0,3	266,0	0,0	87,2	90,1
(1)Enzima (L)	7,6	0,2	32,5	0,0	6,6	8,7
Enzima (Q)	-17,6	0,2	-70,3	0,0	-18,6	-16,5
(2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (L)	10,3	0,2	43,8	0,0	9,3	11,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Q)	-24,3	0,2	-97,3	0,0	-25,4	-23,5
(3) Corante (L)	-16,0	0,2	67,9	0,0	-17,0	-15,0
Corante (Q)	-23,6	0,2	-94,3	0,0	-24,6	-22,5
(4) pH (L)	16,5	0,2	70,0	0,0	15,5	17,5
pH (Q)	-54,8	0,2	-219,3	0,0	-55,9	-52,8
1L e 2L	1,2	0,3	4,3	0,1	0,0	2,5
1L e 3L	-5,0	0,3	-17,3	0,1	-6,2	-3,8
1L e 4L	2,5	0,3	8,6	0,0	1,2	3,8
2L e 3L	0,8	0,3	2,6	0,0	-0,5	2,0
2 L e 4 L	2,0	0,3	6,0	0,0	0,5	3,0
3L e 4L	-5,5	0,3	-19,0	0,0	-6,7	-4,2

Analisando a Tabela 13 pode-se observar que os resultados do intervalo de confiança mostram que todos os fatores lineares e quadráticos foram estatisticamente significativos, apenas a interação entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e corante não influenciou na reação enzimática. Se comparado com o RB 221 quando estava isolado na reação, pode-se observar que a interação entre a enzima e pH não foi significativa naquele estudo e passou a ser na dicromia. Quando mais de um corante está presente em solução, existem mais competidores pelo sítio ativo da enzima, provavelmente o corante que degradar em um pH mais próximo à faixa de pH ótimo de atuação da enzima será degradado primeiro, enquanto o outro corante será degradado posteriormente e numa velocidade menor. Na Figura 25, pode-se observar a curva de nível para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e enzima em relação à resposta descoloração de corante.

**Figura 25-** Curva de nível para os fatores  $H_2O_2$  e enzima em relação à resposta descoloração do corante RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195.



Na Figura 25, observa-se que as máximas descolorações foram obtidas em concentrações de enzima de 487,06 ou 811,77 U/mL, 31,25  $\mu\text{mol/L}$  de  $H_2O_2$ , 60 mg/L de corante e pH 5,5 (ensaios 18 e 21) e em pontos próximos ao ponto central. Se comparado com o gráfico apresentado na Figura 23, pode-se observar que houve uma mudança no tipo de gráfico. No estudo utilizando corante isolado a máxima descoloração foi obtida pontualmente no ensaio 21, já com corante na mistura foi observado um aumento na faixa de descoloração que abrange principalmente pontos próximos ao ponto central. O modelo de descoloração do corante RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195 pela enzima HRP é apresentado na Equação 19.

$$Des = \left( \begin{array}{l} 88,6 - 8,8[enzima]^2 - 12,1[H_2O_2]^2 - 11,8[corante]^2 - \\ 27,4[pH]^2 + 3,8[enzima] + 5,1[H_2O_2] - 8,0[corante] + \\ 8,2[pH] + 0,6[enzima][H_2O_2] - 2,5[enzima][corante] + \\ 1,2[enzima][pH] + 0,9[H_2O_2][pH] - 2,8[corante][pH] \end{array} \right) \quad (19)$$

Na Tabela 14, é possível observar a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

**Tabela 14** - Análise de variância para o corante RB 221 na dicromia RB 221 + RR 195.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	28238,5	14	2017,0		
Resíduos	905,6	12	75,4	26,8	2,5
Falta de Ajuste	8307,4	10	830,7		
Erro puro	0,67	2	0,34	2443,2	4,1
Total	29144,1	26			

Varição explicada: 0,7150%

Varição máxima explicável: 0,3823 %

Na Tabela 14, observa-se que a soma quadrática dos erros é pequena, indicando que o modelo poderia ser considerado bom, porém o F calculado para o erro puro em relação à falta de ajuste é muito alto indicando falta de ajuste. Pode-se observar que em relação ao corante RB 221 analisado de forma isolada e na mistura, o efeito sinérgico da presença de mais de um corante em solução provocou um aumento no  $R^2$  e no ajuste. O  $R^2$  aumentou de 64,0% para 71,5%, enquanto o ajuste ao modelo aumentou de 22,1% para 38,2%

#### 4.1.5.2. Degradação enzimática do RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195

A partir dos resultados obtidos na Tabela 12 para o corante RR 195 realizou-se uma análise dos efeitos em relação à resposta, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 15.

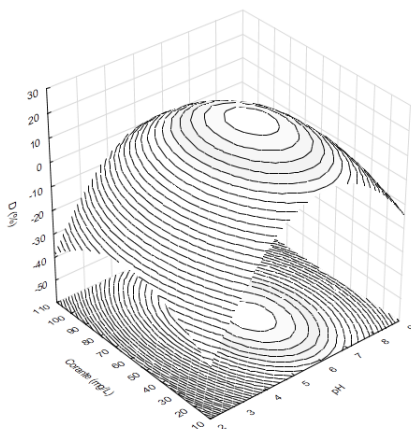
**Tabela 15** - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195.

Fator	Efeito	Erro padrão	t Student t	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
<b>Média/interações</b>	<b>22,3</b>	<b>0,9</b>	<b>25,3</b>	<b>0,0</b>	<b>18,5</b>	<b>26,1</b>
(1)Enzima (L)	2,5	0,6	4,0	0,0	-0,2	5,2
<b>Enzima (Q)</b>	<b>-4,9</b>	<b>0,6</b>	<b>-7,4</b>	<b>0,0</b>	<b>-7,8</b>	<b>-2,1</b>
(2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (L)	2,6	0,6	4,3	0,0	-0,0	5,3
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Q)</b>	<b>-5,2</b>	<b>0,6</b>	<b>-7,8</b>	<b>0,0</b>	<b>-8,0</b>	<b>-2,3</b>
<b>(3) Corante (L)</b>	<b>-4,1</b>	<b>0,6</b>	<b>-6,7</b>	<b>0,0</b>	<b>-6,8</b>	<b>-1,5</b>
<b>Corante (Q)</b>	<b>-5,4</b>	<b>0,6</b>	<b>-8,2</b>	<b>0,0</b>	<b>-8,3</b>	<b>-2,6</b>
<b>(4) pH (L)</b>	<b>5,8</b>	<b>0,6</b>	<b>9,3</b>	<b>0,0</b>	<b>3,1</b>	<b>8,5</b>
<b>pH (Q)</b>	<b>-13,6</b>	<b>0,6</b>	<b>-20,6</b>	<b>0,0</b>	<b>-16,5</b>	<b>-10,8</b>
1L e 2L	0,0	0,7	0,0	1,0	-3,3	3,3
1L e 3L	-0,5	0,7	-0,6	0,6	-3,8	2,8
1L e 4L	1,8	0,7	2,3	0,1	-1,5	5,0
2L e 3L	1,0	0,7	1,3	0,3	-2,3	4,3
2 L e 4 L	0,0	0,7	0,3	0,8	-3,0	3,1,5
3L e 4L	-1,8	0,7	-2,3	0,1	-5,0	1,5

Analisando a Tabela 15 pode-se observar que os resultados do intervalo de confiança mostram que os efeitos lineares do corante e do pH e os efeitos quadráticos da enzima, do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do corante e do pH são estatisticamente significativos. Observa-se que nenhuma interação influenciou de forma significativa na descoloração do corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195. Estes fatores significativos influenciam fortemente as reações enzimáticas. A enzima peroxidase é dependente de peróxido para poder catalisar qualquer reação, só conseguindo degradar o substrato (corante) se este tiver acesso ao seu sítio ativo para sofrer a catálise e para que esta reação ocorra a enzima tem que estar atuando numa faixa ótima de pH.

Na Figura 26, pode-se observar a curva de nível para os fatores corante e pH em relação a resposta descoloração de corante.

**Figura 26-** Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195.



Na Figura 26, observa-se que a máxima descoloração 25% foi obtida em pH 5,5 (ensaio 21). Em pontos próximos ao ponto central também foram obtidas descolorações entre 21-24%. O modelo de descoloração do corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195 pela enzima HRP é apresentado na Equação 20.

$$Des = \left( \begin{array}{l} 22,3 - 2,4[enzima]^2 - 2,5[H_2O_2]^2 - 2,7[corante]^2 - \\ 2,0[corante] + 2,9[pH] \end{array} \right) \quad (20)$$

Na Tabela 16, é possível observar a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

**Tabela 16** - Análise de variância para o corante RR 195 na dicromia RB 221 + RR 195

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	1842,2	14	131,6		
Resíduos	114,1	12	9,5	13,6	2,5
Falta de Ajuste	531,8	10	53,2		
Erro puro	4,6	2	2,3	23,1	4,1
Total	1956,3	26			

Varição explicada: 0,7258 %

Varição máxima explicável: 0,4059

Na Tabela 16 observa-se que a soma quadrática dos erros é pequena, o que nos indica que esse modelo poderia ser considerado bom. O valor de F calculado para o erro puro em relação à falta de ajuste é maior que o tabelado, indicando falta de ajuste ao modelo. Foi obtido um  $R^2$  de 72,6%.

#### 4.1.6. Degradação enzimática da dicromia RB 198 + RR 195

##### 4.1.6.1. Degradação enzimática do RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195

O planejamento experimental da descoloração enzimática da dicromia RB 198 + RR 195 com as respostas obtidas para cada corante é apresentado na Tabela 17. Nestes estudos todas as análises estatísticas são apresentadas separadamente.

**Tabela 17** - Planejamento experimental da descoloração enzimática dos corantes RB 198+ RR 195.

Ensaio	Enzima U/ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol/L	Corante mg/L	pH	D RB 198 (%)	D RR 195 (%)
1	324,71	25,00	40,00	4,0	18	0
2	324,71	25,00	40,00	7,0	59	0
3	324,71	25,00	80,00	4,0	8	2
4	324,71	25,00	80,00	7,0	56	0
5	324,71	37,50	40,00	4,0	16	0
6	324,71	37,50	40,00	7,0	61	0
7	324,71	37,50	80,00	4,0	7	1
8	324,71	37,50	80,00	7,0	64	0
9	649,42	25,00	40,00	4,0	31	0
10	649,42	25,00	40,00	7,0	66	0
11	649,42	25,00	80,00	4,0	12	0
12	649,42	25,00	80,00	7,0	53	0
13	649,42	37,50	40,00	4,0	28	0
14	649,42	37,50	40,00	7,0	66	0
15	649,42	37,50	80,00	4,0	48	0
16	649,42	37,50	80,00	7,0	69	0
17	162,35	31,25	60,00	5,5	59	0
18	811,77	31,25	60,00	5,5	61	0
19	487,06	18,75	60,00	5,5	51	0
20	487,06	43,75	60,00	5,5	63	0
21	487,06	31,25	20,00	5,5	61	0
22	487,06	31,25	100,00	5,5	9	0
23	487,06	31,25	60,00	2,5	0	0
24	487,06	31,25	60,00	8,5	49	0
25	487,06	31,25	60,00	5,5	60	0
26	487,06	31,25	60,00	5,5	61	0
27	487,06	31,25	60,00	5,5	61	0

Na Tabela 17 pode-se observar que, na degradação dos corantes RB 198 + RR 195, o corante RB 198 teve seus maiores aumentos de remoção em pH 7 (ensaios 4, 8, 12 e 16), 56, 64, 53, 69%, respectivamente. A máxima remoção foi obtida no estudo 16, quando foi utilizado 649, 42 U/mL de enzima, 37,50 μmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 80,00 mg/L e pH 7,0. O corante RR 195 não apresentou remoções maiores que



2%, mas pôde ser observado o efeito sinérgico causado por esse corante quando estava presente na dicromia com RB 198. Provavelmente com dois corantes em solução o RR 195 aumenta a velocidade de remoção do RB 198, já que esses corantes competem pelo sítio ativo da enzima. Nesse estudo, não foi observado o mesmo comportamento apresentado para a dicromia RB 221 + RR 195, somente o RB 198 apresentou degradação.

Farias (2013) realizou a degradação da mistura de corantes RB 21 + RR 195, foi observado um aumento na degradação de ambos os corantes quando o outro estava presente. O RB 21 é um corante de ftalocianina que contém cobre em sua estrutura, conforme mecanismo apresentado Silva et al. (2012 b), o  $\text{Cu}^{2+}$  é liberado durante a reação. O corante RB 221 também contém cobre em sua estrutura e possivelmente deve apresentar um mecanismo de degradação semelhante.

Dawkar et al. (2009), realizaram a degradação de corantes têxteis com peroxidase. Os autores avaliaram o efeito de metais pesados na atividade da enzima, quando foi utilizada a peroxidase do *Bacillus sp.* VUS os metais como  $\text{Cu}^{2+}$  inibiram a atividade da enzima em grandes concentrações, em pequenas concentrações não houve inibição.

Se existe essa possibilidade de a enzima não ser inibida por cobre, esse metal pode facilitar a interação do corante com a enzima, como por exemplo, tornando o sítio da enzima mais acessível e facilitando a degradação, não só desse corante como do outro presente da mistura. O corante RB 198 não possui cobre na estrutura provavelmente por isso que não consegue facilitar a degradação do corante RR 195.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 18 para o corante RB 198 na dicromia RB198+RR195 foram obtidos os efeitos, que estão apresentados na Tabela 18.

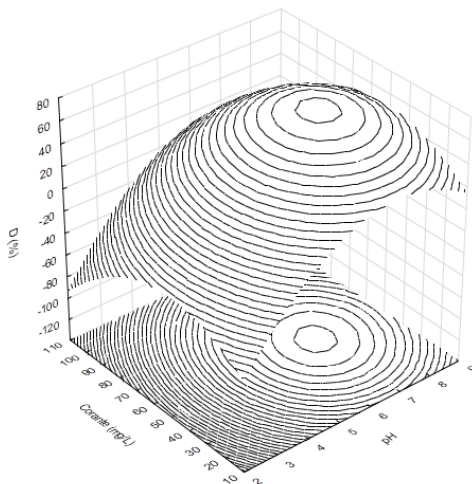
**Tabela 18** - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 198 na dicromia RB 198+ RR 195.

Fator	Efeito	Erro padrão	t Student t	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
Média/interações	60,6	0,3	182,0	0,0	59,2	62,1
(1)Enzima (L)	7,3	0,2	31,1	0,0	6,3	8,3
Enzima (Q)	-1,2	0,2	-5,0	0,0	-2,3	-0,2
(2) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (L)	6,6	0,2	28,3	0,0	5,6	7,7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Q)	-2,8	0,2	-11,0	0,0	-3,8	-1,7
(3) Corante (L)	-11,0	0,2	-46,7	0,0	-12,0	-10,0
Corante (Q)	-13,8	0,2	-55,0	0,0	-14,8	-12,7
(4) pH (L)	35,3	0,2	149,9	0,0	34,3	36,3
pH (Q)	-19,0	0,2	-76,0	0,0	-20,1	-17,9
1L e 2L	5,2	0,3	18,2	0,0	4,0	6,5
1L e 3L	1,2	0,3	4,3	0,0	0,0	2,5
1L e 4L	-7,0	0,3	-24,2	0,0	-8,2	-5,8
2L e 3L	7,8	0,3	26,8	0,0	6,5	9,0
2 L e 4 L	-0,5	0,3	-1,7	0,2	-1,8	1,0
3L e 4L	1,0	0,3	3,4	0,1	-0,2	2,2

Analisando a Tabela 18 pode-se observar que os resultados do intervalo de confiança mostram que todos os efeitos lineares e quadráticos e as interações entre enzima e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enzima e corante, enzima e pH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e corante são estatisticamente significativos. Observa-se que as interações entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH e corante e pH não influenciaram de forma significativa na descoloração do corante RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195. Todos os efeitos que foram significativos para o corante RB 198 isolado, também foram significativos na dicromia, porém quando o RB 198 foi analisado de forma isolada as interações entre enzima e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e enzima e corante não foram significativas, já no RB 198 na dicromia RB 198+ RR 195 as interações entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH e corante e pH não foram significativas.

Conforme já foi mencionado anteriormente em uma mistura, mais de um composto compete pelo sítio ativo da enzima, então as interações entre enzima e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e enzima e corante são essenciais. Na Figura 27, pode-se observar a curva de nível para os fatores corante e pH em relação a resposta descoloração do corante.

**Figura 27-** Curva de nível para os fatores corante e pH em relação à resposta descoloração do corante RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195.



Na Figura 27, observa-se que a máxima descoloração 69% foi obtida com 649,42 U/mL de enzima, 37,50  $\mu\text{mol/L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 80,00 mg/L de corante em pH 7,0 (ensaio 16). Em pontos próximos ao ponto central e outros pontos com pH 7,0 foram obtidas eficiência de degradação em torno de 60%. Pode-se observar que na dicromia houve um aumento na eficiência de remoção de corante de 40 para 80mg/L. O modelo de descoloração do corante RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195 pela enzima HRP é apresentado na Equação 21.

$$Des = \left( \begin{array}{l} 60,6 - 0,6[enzima]^2 - 1,4[H_2O_2]^2 - 6,9[corante]^2 - \\ 9,5[pH]^2 - 3,6[enzima] + 3,3[H_2O_2] - 5,5[corante] + \\ 17,6[pH] + 2,6[enzima][H_2O_2] + 0,6[enzima][corante] - \\ 3,5[enzima][pH] + 3,9[H_2O_2][pH] \end{array} \right) \quad (21)$$

Na Tabela 19, é possível observar a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

**Tabela 19** - Análise de variância para o corante RB 198 na dicromia RB 198 + RR 195.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	12346,1	14	86,1		
Resíduos	1205,9	12	100,5	0,85	2,5
Falta de Ajuste	1514,8	10	151,5		
Erro puro	0,7	2	0,3	503,5	4,1
Total	13552,0	26			

Varição explicada: 0,8881%

Varição máxima explicável: 0,7577%

Na Tabela 19, observa-se que a soma quadrática dos erros é pequena, o que nos indica que esse modelo poderia ser considerado bom, contudo valor de F calculado para o erro puro em relação à falta de ajuste é muito maior que o tabelado, indicando falta de ajuste ao modelo. Para este corante observou-se um efeito distinto do observado para o RB 221. A presença do corante RR 195 em solução ocasionou uma diminuição no  $R^2$  e no ajuste ao modelo. O  $R^2$  que era de 91,7% quando o corante RB 198 foi avaliado de forma isolada, diminuiu para 88,8% quando este mesmo corante foi avaliado na dicromia, já o ajuste que era de 82,0% diminuiu para 75,8%.

#### 4.1.6.2. Degradação enzimática do RR 195 na dicromia RB 198 + RR 195

Conforme apresentado na Tabela 17 para o corante RR 195 não foi obtida degradação, como foi explicado anteriormente na discussão da Tabela 17.

#### 4.1.7. Degradação enzimática da dicromia RR 195 + RY 145

O planejamento experimental para a dicromia RY 145 + RR 195 foi realizado conforme seção 3.2.2. Em toda faixa estudada não foi obtida degradação para ambos os corantes. Como mencionado anteriormente, utilizando enzima peroxidase é muito difícil obter-se altos índices de degradações para esses corantes. Combinando outras técnicas ou utilizando outros micro-organismos muitas vezes poderá ser

possível obter uma degradação maior como citado anteriormente nos itens 4.1.3 e 4.1.4.

#### **4.1.8. Degradação enzimática da tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145**

O planejamento experimental para a tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145 foi realizado conforme seção 3.2.2, porém os corantes foram avaliados isoladamente. O planejamento experimental com as respostas obtidas é apresentado na Tabela 20.

**Tabela 20** - Planejamento experimental da descoloração enzimática dos corantes RB 221+ RR 195 + RY 145.

Ensaio	Enzima U/mL	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol/ L	Corante mg/L	pH	D	D	D
					RR221 (%)	RR 195 (%)	RY 145 (%)
1	324,71	25,00	40,00	4,0	13	3	0
2	324,71	25,00	40,00	7,0	27	7	0
3	324,71	25,00	80,00	4,0	3	3	0
4	324,71	25,00	80,00	7,0	25	7	0
5	324,71	37,50	40,00	4,0	15	0	0
6	324,71	37,50	40,00	7,0	30	8	0
7	324,71	37,50	80,00	4,0	4	0	0
8	324,71	37,50	80,00	7,0	28	8	0
9	649,42	25,00	40,00	4,0	37	6	0
10	649,42	25,00	40,00	7,0	43	11	0
11	649,42	25,00	80,00	4,0	10	2	0
12	649,42	25,00	80,00	7,0	29	10	0
13	649,42	37,50	40,00	4,0	38	7	0
14	649,42	37,50	40,00	7,0	47	13	0
15	649,42	37,50	80,00	4,0	8	1	0
16	649,42	37,50	80,00	7,0	41	12	0
17	162,35	31,25	60,00	5,5	36	15	0
18	811,77	31,25	60,00	5,5	90	21	0
19	487,06	18,75	60,00	5,5	89	9	0
20	487,06	43,75	60,00	5,5	89	21	0
21	487,06	31,25	20,00	5,5	91	23	0
22	487,06	31,25	100,00	5,5	84	19	0
23	487,06	31,25	60,00	2,5	0	0	0
24	487,06	31,25	60,00	8,5	2	2	0
25	487,06	31,25	60,00	5,5	84	19	0
26	487,06	31,25	60,00	5,5	86	19	0
27	487,06	31,25	60,00	5,5	86	19	0

Na Tabela 20, pode-se observar que as maiores degradações do corante RB 221, na mistura RB 221+ RR 195+ RY145, foram 90, 89, 89, 91, 84 e 85% obtidas nos ensaios 18, 19, 20, 21, 22 e na triplicata do ponto central, respectivamente. Quando esse corante foi avaliado de forma isolada foram obtidas degradações de 31, 27, 58, 89, 19 e 31%. Pode-se observar que sem a presença dos outros corantes, só o ensaio 21

apresentava um alto índice de degradação. Em relação à tricromia, a presença de outro corante (RY 145) aumentou a eficiência de remoção nos estudos 19 e 22. O que provavelmente é uma evidência que o aumento do número de corantes em solução pode causar um aumento da eficiência de remoção de corantes.

O corante RR 195 não apresenta altos índices de degradação comparando-se ao RB 221, as maiores degradações para esse corante foram de 21, 21, 23, 19, e 19%, nos ensaios 18, 20, 21, 22 e na triplicata do ponto central, respectivamente. Vale ressaltar que quando analisado de forma isolada, a máxima degradação obtida para este corante foi 8%. Destaca-se que o efeito sinérgico do aumento da remoção foi obtido nos mesmos ensaios que o RB 221, com exceção do ensaio 19, que apresentou baixo índice de remoção para o corante RR 195.

A presença dos outros corantes não auxiliou na degradação do corante RY 145, para este corante não foi obtida degradação. Resultados similares foram descritos por Cristóvão et al. (2009), que realizaram a degradação de uma mistura dos corantes reativos (Preto reativo 5 (RB 5), amarelo reativo 15 (RY 15) e vermelho reativo 239 (RR 239)) utilizando uma lacase comercial. Os autores observaram quando misturados RB 5 e RR 239 apresentam uma taxa de degradação ( $V_{max}$ ) mais elevada, enquanto que o corante RY 15 apresenta uma velocidade inferior de degradação em relação aos corantes analisados de forma isolada.

#### 4.1.8.1. Degradação enzimática do RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145

A partir dos resultados obtidos na Tabela 20 para o corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145 realizou-se uma análise dos efeitos em relação à resposta de degradação do corante. Os cálculos dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145 são apresentados na Tabela 21.

**Tabela 21** - Cálculo dos efeitos e respectivos índices estatísticos para o corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145.

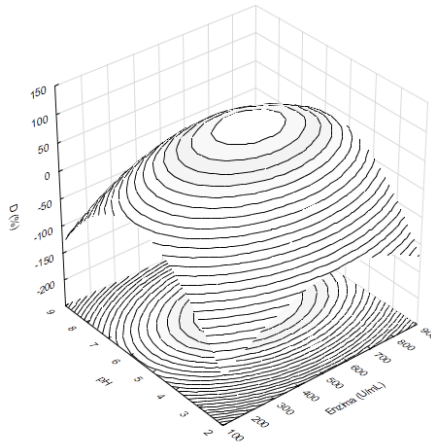
Fator	Efeito	Erro padrão	t Student	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
<b>Média/interações</b>	<b>85,3</b>	<b>0,6</b>	<b>128,0</b>	<b>0,0</b>	<b>84,5</b>	<b>88,2</b>
<b>(1)Enzima (L)</b>	<b>18,0</b>	<b>0,5</b>	<b>38,2</b>	<b>0,0</b>	<b>16,0</b>	<b>20,0</b>
<b>Enzima (Q)</b>	<b>-23,0</b>	<b>0,5</b>	<b>-45,8</b>	<b>0,0</b>	<b>-25,0</b>	<b>-20,8</b>
<b>(2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (L)</b>	<b>2,0</b>	<b>0,5</b>	<b>4,2</b>	<b>0,0</b>	<b>-0,0</b>	<b>4,0</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Q)</b>	<b>-9,9</b>	<b>0,5</b>	<b>-19,8</b>	<b>0,0</b>	<b>-12,0</b>	<b>-7,8</b>
<b>(3) Corante (L)</b>	<b>-9,6</b>	<b>0,5</b>	<b>-20,5</b>	<b>0,0</b>	<b>-11,7</b>	<b>-7,6</b>
<b>Corante (Q)</b>	<b>-10,7</b>	<b>0,5</b>	<b>-21,3</b>	<b>0,0</b>	<b>-12,8</b>	<b>-8,5</b>
<b>(4) pH (L)</b>	<b>12,6</b>	<b>0,5</b>	<b>25,8</b>	<b>0,0</b>	<b>10,1</b>	<b>14,2</b>
<b>pH (Q)</b>	<b>-53,9</b>	<b>0,5</b>	<b>-107,8</b>	<b>0,0</b>	<b>-56,1</b>	<b>-51,8</b>
<b>1L e 2L</b>	<b>0,8</b>	<b>0,6</b>	<b>1,3</b>	<b>0,3</b>	<b>-1,7</b>	<b>3,2</b>
<b>1L e 3L</b>	<b>-6,5</b>	<b>0,6</b>	<b>-11,2</b>	<b>0,6</b>	<b>-9,0</b>	<b>-4,0</b>
<b>1L e 4L</b>	<b>-1,0</b>	<b>0,6</b>	<b>-1,7</b>	<b>0,2</b>	<b>-3,5</b>	<b>1,5</b>
<b>2L e 3L</b>	<b>0,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,9</b>	<b>0,5</b>	<b>-2,0</b>	<b>3,0</b>
<b>2L e 4L</b>	<b>2,5</b>	<b>0,6</b>	<b>4,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>5,0</b>
<b>3L e 4L</b>	<b>6,8</b>	<b>0,6</b>	<b>11,7</b>	<b>0,0</b>	<b>4,2</b>	<b>9,2</b>

Analisando Tabela 21 pode-se observar que os resultados do intervalo de confiança mostram que os efeitos lineares da enzima, do corante e do pH, os efeitos quadráticos da enzima, do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do corante e do pH e as interações entre enzima e corante, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH e corante e pH foram estatisticamente significativas. Como observado nos estudos anteriores, o pH é um fator que influencia fortemente as reações enzimáticas. Cada enzima atua em uma faixa ótima de pH e fora dessa faixa pode haver alteração na estrutura tridimensional da enzima e a perda da atividade enzimática. Na Tabela 20 é possível verificar esse efeito, em pHs extremo 2,5 e 8,5 (ensaios 23 e 24), praticamente não foram obtidas degradações.

Na Figura 28, pode-se observar a curva de nível para o fator pH e enzima em relação à resposta descoloração de corante.



**Figura 28-** Curva de nível para os fatores pH e enzima em relação à resposta descoloração do corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145.



Na Figura 28, observa-se que a máxima descoloração 91% foi obtida no estudo 21 em pH 5,5 e em pontos próximos a do ponto central. Pela curva de nível é possível observar que à medida em que o pH diminui, há uma diminuição na eficiência de descoloração, em pH 2,5 não foi obtida remoção. O mesmo comportamento foi observado com o aumento do pH, em pH 8,5 praticamente não houve degradação, apenas 2%. Na Equação 22 é apresentado o modelo de descoloração do corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145 pela enzima HRP.

$$Des = \left( \begin{array}{l} 85,3 - 11,4[enzima]^2 - 4,9[H_2O_2]^2 - 5,3[corante]^2 - \\ 27,0[pH]^2 + 9,0[enzima] - 4,8[corante] + 6,1[pH] - \\ 3,2[enzima][corante] + 1,2[H_2O_2][pH] + 3,4[corante][pH] \end{array} \right) \quad (22)$$

Na Tabela 22, é possível observar a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

**Tabela 22** - Análise de variância para o corante RB 221 na tricromia RB 221 + RR 195+ RY 145.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	23236,6	14	1659,8		
Resíduos	4492,4	12	374,4	4,4	2,5
Falta de Ajuste	7424,9	10	3712,4		
Erro puro	2,6	2	1,3	2855,7	4,1
Total	27729,0	26			

Variância explicada: 0,7321%

Variância máxima explicável: 0,4196%

Na Tabela 22, observa-se que a soma quadrática dos erros é pequena, por isso o modelo poderia ser considerado bom, contudo o valor de F calculado para o erro puro em relação à falta de ajuste é muito grande, indicando falta de ajuste ao modelo. Conforme foi observado no estudo da degradação da dicromia dos corantes RB221 + RR 195, o efeito sinérgico de mais de um corante em solução ocasionou um aumento no  $R^2$  e no ajuste ao modelo. Quando o corante RB 221 estava isolado foi obtido um  $R^2$  de 64,0%, que na dicromia aumentou para 71,4% e para 73,2% na tricromia. O ajuste ao modelo que era de 22,1% quando considerou-se o corante isolado, aumentou para 38,2% na dicromia e 42,0% na tricromia, melhorando em 20,0%. Este aumento provavelmente é devido à melhoria na eficiência de degradação ocorrida quando mais de um corante está presente em solução, que faz com que o aumento da degradação aumente o  $R^2$  e o ajuste ao modelo.

#### 4.1.8.2. Degradação enzimática do RR 195 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145

A partir dos resultados obtidos na Tabela 22 para o corante RR 195 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145 realizou-se uma análise dos efeitos em relação à resposta, os resultados obtidos, porém a análise para este corante na tricromia não foi significativa e por isso não será apresentado o planejamento experimental.

#### 4.1.8.3. Degradação enzimática do RY 145 na tricromia RB 221 + RR 195 + RY 145

Para o corante RY 145 não foi obtida degradação. O efeito sinérgico observado para os corantes RB 221 e RR 195, não foi observado para o corante RY 145, que não degrada de forma isolada e nem em misturas de corantes, porém auxiliou na remoção dos corantes RB 221 e RR 195.

#### 4.1.9. Degradação enzimática da tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145

O planejamento experimental para a tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145 foi realizado conforme seção 3.2.2, porém os corantes foram avaliados isoladamente. O planejamento experimental com as respostas obtidas é apresentado na Tabela 23.

**Tabela 23** - Descoloração do corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR195+ RY 145.

Ensaio	Enzima U/ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> μmol/L	Corante mg/l	pH	D RB 198 (%)	D RR 195 (%)	D RY 145 (%)
1	324,71	25,00	40,00	4,0	22	0	0
2	324,71	25,00	40,00	7,0	60	0	0
3	324,71	25,00	80,00	4,0	10	0	0
4	324,71	25,00	80,00	7,0	60	0	0
5	324,71	37,50	40,00	4,0	24	0	0
6	324,71	37,50	40,00	7,0	60	0	0
7	324,71	37,50	80,00	4,0	12	0	0
8	324,71	37,50	80,00	7,0	60	0	0
9	649,42	25,00	40,00	4,0	26	0	0
10	649,42	25,00	40,00	7,0	69	0	0
11	649,42	25,00	80,00	4,0	17	0	0
12	649,42	25,00	80,00	7,0	69	0	0
13	649,42	37,50	40,00	4,0	26	0	0
14	649,42	37,50	40,00	7,0	66	0	0
15	649,42	37,50	80,00	4,0	19	0	0
16	649,42	37,50	80,00	7,0	69	0	0
17	162,35	31,25	60,00	5,5	63	0	0
18	811,77	31,25	60,00	5,5	66	0	0
19	487,06	18,75	60,00	5,5	64	0	0
20	487,06	43,75	60,00	5,5	64	0	0
21	487,06	31,25	20,00	5,5	63	0	0
22	487,06	31,25	100,00	5,5	67	0	0
23	487,06	31,25	60,00	2,5	0	0	0
24	487,06	31,25	60,00	8,5	43	0	0
25	487,06	31,25	60,00	5,5	61	0	0
26	487,06	31,25	60,00	5,5	62	0	0
27	487,06	31,25	60,00	5,5	63	0	0

Na Tabela 23, observa-se que quando o RB 198 foi analisado na mistura de corantes, houve um efeito sinérgico de aumento da degradação. Foram obtidas remoções de 60, 69, 69, 69, 67%, nos ensaios 4, 8, 12, 16 e 22, respectivamente. Esse aumento foi praticamente o mesmo obtido quando foi avaliada a dicromia do RB 198 + RR 195 e só o ensaio 22 que naquela dicromia não havia apresentado esse aumento.

Pode-se observar que para os corantes RR 195 e RY 145 não houve degradação em presença de outros corantes. Khan et al., 2014 realizaram a degradação de 15 diferentes corantes entre esses o RR 195 por um consórcio bacteriano. Foi obtido mais de 50% de descoloração na mistura de corantes. Os autores observaram que a quebra dos anéis aromáticos do RR 195 geraram vários hidrocarbonetos alifáticos de baixa massa molar, além de prótons de  $-CH_2$  e  $-OCH_2$ .

Shilpa, Niranjana e Vishwas (2012) realizaram a degradação do corante RY 145 por *Bacillus boroniphilus*. Os autores apresentaram a proposta do mecanismo que ocorre através de uma clivagem oxidativa gerando como intermediário 1 composto dissulfonato e dois derivados sulfônicos e em uma segunda etapa de dessulfonação gerando 2 derivados de amina aromática e um de amina e fenol.

Tilli et al. (2011) reportaram a degradação dos corantes vermelho ácido 42 (Are 42), preto ácido 1 (Aba 1), preto ácido 194 (Aba 194) e azul reativo 69 (Rbu 69) individualmente e misturados. Os corantes Rbu 69 e Are 42 não apresentaram diferenças significativas na degradação isolados ou em misturas. Aba 1 e Aba 194 apresentaram o mesmo grau de degradação, porém em períodos maiores de reação. Segundo os autores, este comportamento sugere que Rbu 69 e Are 42 causam um efeito de atraso da degradação dos outros corantes. Somente após a degradação desses corantes os demais são oxidados.

Uma avaliação da remoção de cor a partir de soluções do corante Laranja II por HRP foi realizada por Cordova et al.(2012), utilizando a metodologia de superfície de resposta. Estes autores relataram que as conversões foram fortemente influenciadas pelo pH seguido pelas concentrações do biocatalisador e do  $H_2O_2$ .

#### 4.1.9.1. Degradação enzimática do RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145

A partir dos resultados obtidos na Tabela 23 para o corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145 realizou-se uma análise dos efeitos em relação à resposta, os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 24.

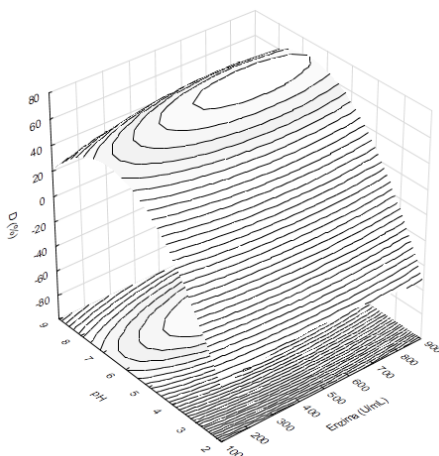
**Tabela 24** - Cálculo dos efeitos e dos seus respectivos índices estatísticos para o corante RB 198 na mistura RB 198+ RR 195 + RY145.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	t Student t	p	Limite de confiança	
					-95%	+95%
<b>Média/ interações</b>	<b>62,0</b>	<b>0,6</b>	<b>107,4</b>	<b>0,0</b>	<b>59,5</b>	<b>64,5</b>
<b>(1) Enzima (L)</b>	<b>4,9</b>	<b>0,4</b>	<b>12,0</b>	<b>0,0</b>	<b>3,2</b>	<b>6,6</b>
<b>Enzima (Q)</b>	<b>-2,7</b>	<b>0,4</b>	<b>-6,3</b>	<b>0,0</b>	<b>-4,6</b>	<b>-0,9</b>
<b>(2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (L)</b>	0,2	0,4	0,6	0,6	-1,5	2,0
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Q)</b>	<b>-3,0</b>	<b>0,4</b>	<b>-6,9</b>	<b>0,0</b>	<b>-4,8</b>	<b>-1,1</b>
<b>(3) Corante (L)</b>	<b>-2,4</b>	<b>0,4</b>	<b>-5,9</b>	<b>0,0</b>	<b>-4,2</b>	<b>-0,6</b>
<b>Corante (Q)</b>	<b>-2,5</b>	<b>0,4</b>	<b>-5,7</b>	<b>0,0</b>	<b>-4,3</b>	<b>-0,6</b>
<b>(4)- pH (L)</b>	<b>36,9</b>	<b>0,4</b>	<b>90,4</b>	<b>0,0</b>	<b>35,2</b>	<b>38,6</b>
<b>pH (Q)</b>	<b>-24,3</b>	<b>0,4</b>	<b>-55,9</b>	<b>0,0</b>	<b>26,1</b>	<b>-22,4</b>
1L e 2L	-0,6	0,5	-1,2	0,3	-2,8	1,5
1L e 3L	1,4	0,5	2,8	<b>0,1</b>	-0,8	3,5
1L e 4L	1,6	0,5	3,2	0,1	-0,5	3,8
2L e 3L	0,6	0,5	1,2	0,3	-1,5	2,8
2L e 4L	-1,1	0,5	-2,2	0,1	-3,3	1,0
<b>3L e 4L</b>	<b>5,4</b>	<b>0,5</b>	<b>10,8</b>	<b>0,1</b>	<b>3,2</b>	<b>7,5</b>

Analisando Tabela 24 pode-se observar que os resultados do intervalo de confiança mostram que o efeito linear da enzima, do corante, do pH e os efeitos quadráticos da enzima, do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do corante e do pH são estatisticamente significativos, no entanto, os efeitos linear do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e as interações entre enzima e pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e corante e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH que eram significativas quando o RB 198 foi analisado de forma isolada, deixaram de ser significativos.

Na Figura 29, pode-se observar a curva de nível para o fator pH e enzima em relação à resposta descoloração de corante.

**Figura 29-** Curva de nível para os fatores pH e enzima em relação à resposta descoloração do corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145.



Na Figura 29, observa-se que a máxima descoloração 69% foi obtida na concentração de enzima 649,42 U/mL, nas concentrações de  $H_2O_2$  25,0 e 37,5  $\mu\text{mol/L}$ , nas concentrações de corante 40 e 80 mg/L e em pH 7,0. O modelo de descoloração do corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195 + RY 145 pela enzima HRP é apresentado na Equação 23.

$$Des = \left( \begin{array}{l} 62,0 - 1,4[enzima]^2 - 1,5[H_2O_2]^2 - 1,2[corante]^2 - \\ 12,1[pH]^2 + 2,4[enzima] - 1,2[corante] - 12,1[pH] + \\ 2,7[corante][pH] \end{array} \right) \quad (23)$$

Na Tabela 25, é possível observar a análise de variância (ANOVA) do modelo obtido.

**Tabela 25** - Análise de variância para o corante RB 198 na tricromia RB 198 + RR 195+ RY 145.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	11750,1	14	839,3		
Resíduos	1796,4	12	149,7	5,6	2,5
Falta de Ajuste	1570,1	10	157,0		
Erro puro	2,00	2	1	157,0	4,1
Total	13546,5	26			

Varição explicada: 0,8839%

Varição máxima explicável: 0,7485%

Na Tabela 25, observa-se que a soma quadrática dos erros é pequena, o que nos indica que o modelo é bom, o valor de F calculado para o erro puro em relação à falta de ajuste é grande indicando falta de ajuste. Para o RB 198 nesta tricromia foi observado um comportamento diferente do apresentado para o corante RB 211, com o aumento da quantidade de corantes em solução, diminui o  $R^2$  e o ajuste ao modelo. O  $R^2$  que foi de 91,7% na análise do corante RB 198 isolado, diminui para 88,8% quando este corante foi avaliado na dicromia e para 88,4% quando este corante foi avaliado na tricromia, já o ajuste diminui de 82,0 % na análise do corante isolado, para 75,8% na dicromia e 74,8% na tricromia.

Nos estudos do efeito da presença de mais de um corante presente em solução pôde ser observado que, quanto maior a quantidade de corantes presentes em solução, melhor a eficiência de remoção. Quando os corantes RB 221 e RB 198 foram avaliados de forma isolada, a máxima remoção foi obtida em somente alguns estudos.

Para o RB 221 +RR 195 nos estudos de dicromia observou-se um efeito sinérgico do aumento de remoção, para ambos corantes. Na tricromia foi observado esse mesmo efeito e adicionalmente uma maior eficiência de remoção em mais alguns estudos quando foi adicionado o corante RY 145, apesar desse corante não apresentar remoção, ele aumenta a velocidade dos outros dois corantes presentes na tricromia.

Para o RB 198 + RR 195 nos estudos da dicromia foi observado um efeito sinérgico do aumento de remoção na presença do RR 195, mas somente o RB 198 apresentou remoção. Na tricromia foi observado um aumento de remoção em mais alguns estudos na presença do RY 145, porém nem o RR 195, nem o RY 145 apresentaram remoção.



Na Tabela 26 é apresentada uma síntese dos resultados obtidos nessa etapa do trabalho. Nessa tabela enzima é representada por (1), peróxido de hidrogênio (2), corante (3) e pH (4).

**Tabela 26-** Síntese dos resultados obtidos na etapa de estudo da presença de mais de um corante em solução.

<b>Corante, dicromia ou tricromia</b>	<b>Máxima remoção</b>	<b>Condições da máxima remoção</b>	<b>Fatores Significativos</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>RB 221</b>	89%	Estudo 21	Linear: 2,3 e 4 Quadrático: 1, 3 e 4	64%
<b>RB 198</b>	71%	Estudo 14	Todos Lineares e quadráticos	91,7%
<b>RR 195</b>	8%	-	-	-
<b>RY 145</b>	< 2%	-	-	-
<b>RB 221 + RR 195</b>	<b>RB 221:</b> 92% <b>RR 195:</b> 25%	<b>RB 221:</b> Estudos 18 e 21 <b>RR 195:</b> Estudo 21	<b>RB 221:</b> Todos lineares e quadráticos <b>RR 195:</b> Linear: 3 e 4 Quadrático: 1,2,3 e 4	<b>RB 221:</b> 71% <b>RR 195:</b> 72,6%
<b>RB 198 + RR 195</b>	<b>RB 198:</b> 69% <b>RR 195:</b> < 2%	<b>RB 198:</b> Estudo 16	<b>RB 198:</b> Todos Lineares e quadráticos	<b>RB 198:</b> 88,8%
<b>RB 221 + RR 195 + RY 145</b>	<b>RB 221:</b> 91% <b>RR 195:</b> 23 % <b>RY 145:</b> 0 %	RB 221: Estudos 18, 19, 20, 21 RR 195: Estudos 18, 20, 21	<b>RB 221:</b> Linear: 1,3 e 4 Quadrático: 1, 2, 3 e 4	<b>RB 221:</b> 73,2% <b>RR 195:</b> Análise não significativa <b>RY 145:</b> -
<b>RB 198 + RR 195 + RY 145</b>	<b>RB 198:</b> 71% <b>RR 195:</b> 0 % <b>RY 145:</b> 0 %	<b>RB 198:</b> Estudos 4, 8, 12, 16, 22	<b>RB 198:</b> Linear: 1, 3 e 4 Quadrático: 1, 2, 3 e 4.	<b>RB 198:</b> 88,4% <b>RR 195:</b> - <b>RY 145:</b> -

## 4.2. Reúso do efluente do processo de tingimento

### 4.2.1. Avaliação da perda de cor do tecido ( $\Delta E^*$ )

O estudo do reúso do efluente do processo de tingimento foi realizado em duas etapas. Primeiramente o tecido foi tingido com a tricromia de corantes RB 198 + RR 195 + RY 145, utilizando uma RB: 1:8. Após a etapa de tingimento, foram separados 50% do efluente de tingimento para posterior reúso 1. O reúso foi realizado conforme item 3.2.6, utilizando 50% do efluente de tingimento + 50% de água limpa. Para comparar realizou-se uma lavagem enzimática (item 3.2.5.1) com 100% de água limpa. Na tabela 27 é apresentada a comparação dos tecidos que passaram pelo reúso 1 e pela lavagem enzimática, em relação a um padrão sem lavagem, que passou apenas por um rápido enxágue a 30 °C durante 10 min, para remover o excesso de corante não fixado à fibra de algodão.

**Tabela 27** - Comparação dos tecidos tingidos sem lavagem (padrão) em relação aos tecidos do processo de reúso e lavagem enzimática.

Tecido	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
Padrão	27,69	31,79	-7,12	-
Reúso 1	28,23±0,23	34,78±0,23	-5,76±0,17	3,31±0,28
Lavagem enzimática	28,91±0,41	35,63±0,32	-4,85±0,30	4,64±0,45

Na Tabela 27 é possível observar que com o processo de reúso foi obtida uma menor perda de cor em relação ao tecido que passou pela lavagem enzimática. Todos os parâmetros se aproximaram dos valores do padrão.

O parâmetro luminosidade ( $L^*$ ), que varia de 0 a 100, foi mais próximo do mínimo, indicando que houve uma pequena perda de cor. O parâmetro  $a^*$ , que é a variação de cor no eixo vermelho/verde, foi positivo indicando que houve uma maior tendência de cor ao vermelho. O parâmetro  $b^*$ , que é a variação de cor no eixo azul/amarelo, foi negativo indicando uma tendência de cor maior para o azul.

Todos esses parâmetros são sintetizados no valor  $\Delta E^*$ , que foi menor para o reúso 1 em relação a lavagem enzimática. Quanto mais esse valor de  $\Delta E^*$  aproxima-se de zero, mais próxima a cor está do

padrão. Na Figura 30, é apresentada a comparação entre lavagem enzimática e reúso em relação ao padrão.

**Figura 30-** Comparação entre a lavagem enzimática e reúso 1.



Pela Figura 30 pode-se observar que visualmente ambos os estudos (reúso 1 e lavagem enzimática), apresentaram cores próximas as do padrão, porém essa diferença pôde ser observada no valor  $\Delta E^*$ , conforme observado na Tabela 27. Vale ressaltar que o reúso 1 foi realizado reutilizando 50% do efluente de tingimento, um efluente rico em eletrólitos e corantes hidrolisados, enquanto a lavagem enzimática foi realizada em água limpa.

O processo de biodegradação é dependente de muitos fatores, de acordo com Solis et al. (2012), entre estes estão incluídos a estrutura do corante azo, salinidade, pH, temperatura e concentração de corante.

A atividade da peroxidase obtida da *Perenniporia subacida* (Pspd) foi observada por Si e Cui (2013). Estes autores observaram um aumento na atividade da enzima de aproximadamente 130% na presença de 100,0 mmol/L de NaCl, na presença de 400,0 mmol/L deste mesmo sal a atividade retornou a seu nível original.

A remoção da mistura dos corantes amarelo ácido 42, vermelho ácido 374 e azul ácido 80 por *Pleurotus* sp com ou sem aditivos, foi estudada por Ciullini et al. (2012). Foi reportado que a mistura descoloriu em até 80% sem aditivos e 82-83% na presença de aditivos.

De acordo com Zille et al. (2003), a força iônica das soluções enzimáticas influencia na performance biocatalítica. Altas quantidades de sal no efluente de tingimento melhoram o acoplamento eletrostático de corantes aniônicos e proteínas com carga positiva, formando agregados estáveis enzima-substrato.

Azul reativo 19, azul reativo 221 foram removidos por Abadulla et al. (2000), utilizando *Trametes hirsuta* para reutilização do efluente do tingimento. Os autores reportaram que a remoção dos produtos ou a inativação da enzima interferiram no tingimento uma vez que os valores de K/S foram menores do que os obtidos utilizando água.

#### 4.2.2. Avaliação da solidez à lavagem

Os testes de solidez à lavagem foram realizados de acordo com item 3.2.7.2. As medidas obtidas para as amostras de algodão tingidas com a tricromia de corantes são apresentadas na Tabela 28.

**Tabela 28-** Solidez à lavagem dos tecidos após o reúso do efluente e lavagem enzimática.

<b>Tecido</b>	<b>Solidez à lavagem 100% algodão</b>
Padrão	3
Reúso 1	2
Lavagem enzimática	3

Os resultados apresentados na Tabela 28 indicam que tanto o tecido que passou pelo processo de reúso 1, quanto o lavado na lavagem enzimática apresentaram baixas notas de solidez à lavagem (2-3), enquanto que o ideal seriam notas entre 4-5. Este comportamento, provavelmente é devido ao fato de que na mistura existem três corantes diferentes sendo degradados a diferentes velocidades.

Bhunja et al. (2002), relataram a descoloração de diferentes corantes utilizados na indústria têxtil. O corante azul remazol foi degradado a uma taxa de reação de  $0,017 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , crystal violeta a  $0,02 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$  e vermelho cibacron a  $2,8 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

#### 4.2.3. Reúso 2 e posterior lavagem com tensoativo EM8007

O padrão definido para análise das amostras foi o tecido sem lavagem, apenas com 1 enxágue para retirar o excesso de corante não adsorvido pela fibra. Após o reúso 1 foi reutilizado 80% do banho desse processo para realizar o reúso 2. Ao final do processo de reúso 2 foi realizada uma lavagem com tensoativo EM 8007 e comparado com o tecido lavado com esse mesmo tensoativo, tingido em água limpa. Os resultados referentes ao reúso 2 com posterior lavagem

com tensoativo EM8007, comparado com o tecido tingido em água limpa e lavado com tensoativo EM8007, são apresentados na Tabela 29.

**Tabela 29** - Reúso 2 com posterior lavagem com tensoativo EM8807 e comparado com a lavagem com tensoativo EM8007.

<b>Tipo de lavagem</b>	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E^*$
Padrão	30,31	-8,48	-6,18	-
Reúso 2	40,56±0,63	-3,31±2,23	0,27±0,55	13,00±0,43
Tensoativo EM8007	35,92±0,33	-5,73±0,32	-2,00±0,30	7,70±0,46

Na Tabela 29, pode-se observar que o valor de  $\Delta E^*$  obtido no reúso 2, foi maior que o obtido para o tecido tingido em água limpa e lavado com tensoativo EM 8007. Esse comportamento já era esperado uma vez que no banho de reúso 1, em que foi realizado o tingimento, existiam muitos eletrólitos que restaram do primeiro tingimento, além de enzima  $H_2O_2$  e tampão.

Vale ressaltar que não foram utilizados fixadores e nenhum outro reagente que auxilia na fixação da cor ao tecido e que o pH também não foi corrigido, estes fatores poderiam levar a menores valores de  $\Delta E^*$ , que poderia ser bem próximo aos obtidos com os tecidos que foram tingidos em água limpa e lavados com tensoativo EM 8007.

Destaca-se ainda que se comparado com a Tabela 27 os valores obtidos com a lavagem enzimática e reúso 1 são bem menores se comparada a lavagem com tensoativo EM 8007, em que foi obtido um  $\Delta E^*$  de 7,70.

Na Tabela 30, são apresentados os resultados de solidez à lavagem para os tecidos que passaram pelo reúso 2 e pela lavagem química com tensoativo EM 8007.

**Tabela 30-** Solidez à lavagem dos tecidos após o reúso 2 e lavagem e química.

Tecido	Solidez à lavagem 100% algodão
Padrão	3
Reúso 2	2
Tensoativo EM 8007	2

Na Tabela 30 são apresentados os testes de solidez à lavagem para o reúso 2 e a lavagem química utilizando tensoativo EM 8007. Como pode ser observado foram obtidas baixas notas de solidez à lavagem para ambos os estudos.

Na Figura 31 é apresentada a comparação do reúso 2 com o padrão e com o tingimento em água limpa com posterior lavagem com tensoativo EM8007.

**Figura 31-** Comparação do reúso 2 com padrão e com o tingimento em água limpa com posterior lavagem com tensoativo EM8007.



Na Figura 31 pode-se observar que tanto o tecido que passou pelo reúso 2, quanto o que passou pelo tingimento em água limpa e posterior lavagem com tensoativo EM 8007, apresentaram visualmente uma grande perda de cor em relação ao padrão. Esta perda de cor também foi comprovada pelos parâmetros apresentados na Tabela 29. No caso do reúso 2 essa perda de cor pode estar relacionada à grande quantidade de aditivos em solução.

#### 4.2.4. Teste em escala piloto

O reúso do efluente de tingimento foi realizado em escala piloto numa parceria com a empresa Malwee. Foram utilizados todos os parâmetros e reagentes utilizados em escala laboratorial, porém considerando um volume de banho de 10 L e 1 kg de malha. O tingimento e o reúso 1 foram realizados com água da torneira, que a indústria utiliza em seus processos. Foi obtido um valor de  $\Delta E^*$  de 0,6, que é aceito como padrão de qualidade por todas as indústrias têxteis. Os valores aceitáveis pela indústria são valores até próximo de 1, porém quanto mais perto de zero menor será a perda de cor e esse seria um cenário altamente desejado pelas indústrias (ABADULLA et al., 2000).

Para as mesmas amostras foram realizados testes de solidez à lavagem e obteve-se uma solidez de 4, que segundo a escala padrão significa boa solidez à lavagem e é um valor dentro do padrão de qualidade aceito pelas indústrias têxteis. Na Figura 32 é apresentado o resultado do teste piloto comparado com o padrão que passou por um enxágue para remover o excesso de corante.

**Figura 32** - Comparação entre padrão e reúso 1 feito em escala piloto.



Na Figura 32 pode-se observar que visualmente o tecido que passou pelo reúso 1 apresentou praticamente a mesma cor do padrão, o que foi comprovado pelo baixo valor de  $\Delta E^*$  e boa solidez à lavagem.

Observa-se que no estudo de reúso 1 realizado em escala piloto, foi obtido um menor valor  $\Delta E^*$  e um valor mais alto de solidez à lavagem em relação aos valores obtido nos estudos realizados em laboratório. Esse comportamento ocorre principalmente devido às condições em que são realizados os estudos em escala piloto.

Esse processo é realizado numa máquina maior, em que ocorre uma maior fricção e agitação do tecido, que fazem com que o corante apresente uma maior fixação à fibra.

O processo de reúso mostrou-se muito vantajoso para ser aplicado na indústria têxtil. Esse processo realiza ao mesmo tempo uma lavagem enzimática no tecido, utilizando uma quantidade mínima de enzima e  $H_2O_2$ , e ao mesmo tempo agrega valor ao produto final obtendo parâmetros de perda de cor e solidez à lavagem altamente desejados pela indústria têxtil. Adicionalmente há economia de água e energia, que para uma máquina de grande porte, em que são utilizados 300 kg de malha, representa um volume considerável de água.



## RESULTADOS PARTE II- IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

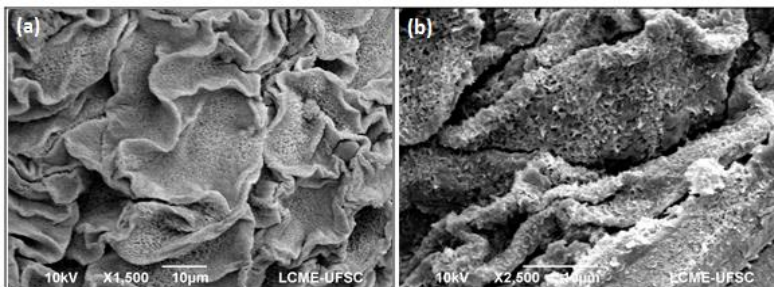
Neste capítulo são apresentados os estudos de imobilização da enzima HRP em cápsulas de alginato de cálcio e espuma de poliuretano (EPU) para remover os corantes RB 221 e RB 198. Primeiramente serão apresentados os resultados obtidos utilizando como suporte o alginato de cálcio, para na sequência apresentar os resultados obtidos com o suporte espuma de poliuretano. Após esse estudo será apresentado um modelo matemático para a enzima livre e imobilizada em alginato de cálcio, determinando os parâmetros cinéticos e o coeficiente de transferência de massa.

### 4.3. Caracterização da enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio

#### 4.3.1. Morfologia da superfície das cápsulas de alginato de cálcio com a enzima HRP imobilizada

A morfologia da superfície das cápsulas de alginato de cálcio com a enzima HRP imobilizada foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para realização da análise as cápsulas foram secas na estufa a 60 °C durante 60 min. Foram utilizadas ampliações de 1500 e 2500 vezes. Na Figura 33 (a) e (b) é apresentada a morfologia das cápsulas de alginato de cálcio com HRP imobilizada.

**Figura 33** - (a) e (b) Morfologia das cápsulas de alginato de cálcio com HRP imobilizada.



Nas Figuras 33 (a) e (b) observa-se a morfologia das cápsulas alginato de cálcio com HRP imobilizada. Pode-se observar que nas imagens de MEV as cápsulas apresentam um aspecto enrugado devido à

desidratação a que foram submetidas antes da análise. No processo de imobilização da HRP em alginato de sódio foi preparada uma solução da enzima em tampão a qual foi adicionada ao alginato de sódio e colocada para agitar até completa homogeneização. Esta solução foi gotejada em outra solução de cloreto de cálcio para formar as cápsulas, obtendo-se uma boa eficiência de imobilização.

#### 4.3.2. Estudos de textura da cápsula de alginato com enzima imobilizada

A textura das cápsulas de enzima imobilizada em alginato de cálcio foram determinadas através da avaliação da área superficial, volume total do poro, diâmetro médio do poro e diâmetro da partícula. Na Tabela 31 são apresentadas as características texturais das cápsulas de alginato de cálcio.

**Tabela 31-** Características texturais das cápsulas de alginato de sódio.

Características	Valor
Área superficial ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	1,59
Volume total do poro ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	0,15
Diâmetro médio do poro ( $\text{Å}$ )	3,76
Diâmetro da partícula ( $d_p$ ) (mm)	5,00

Na Tabela 31 pode-se observar que para cápsula de alginato de cálcio com enzima HRP imobilizada foram obtidos área superficial de  $1,59 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ , um volume de poro de  $0,150 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ , diâmetro médio de poro de  $3,76 \text{ Å}$  e um diâmetro de partícula de  $5,00 \text{ mm}$ .

Segundo Maia (2013), as partículas podem ser classificadas em 3 tipos, de acordo com tamanho que apresentam. As partículas podem ser macro ( $> 5000 \text{ }\mu\text{m}$ ), micro ( $0,2\text{-}5000 \text{ }\mu\text{m}$ ) e nano ( $< 0,2 \text{ }\mu\text{m}$ ). Nesse trabalho foi obtido um diâmetro médio da partícula de  $5,00 \text{ mm}$ , sendo essa partícula considerada micro.

Resultado semelhante foi obtido por Bressel (2007), que desenvolveu um sistema gerador de microcápsulas de alginato. Foi obtido um diâmetro da partícula de  $400 \text{ }\mu\text{m}$  ou  $4,00 \text{ mm}$ .

Dalponte et al. (2016) avaliaram a produção de esferas de alginato contendo  $\text{TiO}_2$  imobilizado para degradação do corante azo amarelo tartrazina. Foi obtida uma área específica de  $8,25 \text{ m}^2/\text{g}$  e um volume total de poro de  $0,013 \text{ cm}^3.\text{g}^{-1}$ , um pouco menor em relação ao

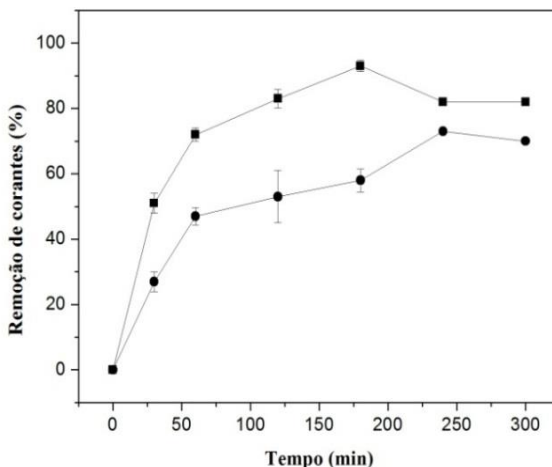
obtido neste trabalho, porém nesse trabalho foi imobilizado enzima e no trabalho realizado por Dalponte et al. (2016),  $\text{TiO}_2$ . Foi obtido um diâmetro médio de poro de 62,00 Å.

4.4. Estudos de degradação dos corantes RB 221 e RB 198 utilizando enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio

#### 4.4.1. Cinética de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio

Antes dos estudos de remoção de corante, foi realizado um branco utilizando todos os reagentes, porém sem o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nesse teste preliminar, não foi obtida remoção de corante. O tempo de reação é um fator que afeta a quantidade de corante removido em reações utilizando enzimas. Uma cinética foi realizada para definir o tempo necessário para a máxima remoção de cada corante. Na Figura 34 é apresentada a cinética de remoção dos corantes RB 221 e RB 198.

**Figura 34**– Cinética de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP, (■) RB221 e (●) RB198. Condições: temperatura 30°C; pH 5,5; concentração de corante 40 mg/L; concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  50,00  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 198 e 43,75  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 221; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.



Na Figura 34 pode ser observado que o tempo reacional foi variado de 0 a 300 min. As máximas remoções foram de 93% em 180 min para o RB 221 e de 73% em 240 min para o RB 198.

Farias (2013) utilizou a enzima HRP livre para remover os corantes azul reativo 21 (RB 21) e vermelho reativo 195 (RR 195). As máximas remoções de 79 e 7%, respectivamente para o RB 21 e RR 195, foram obtidas em 30 min de reação. Neste trabalho nos estudos do efeito da presença de mais de um corante em solução, as máximas degradações também foram obtidas em 30 min de reação.

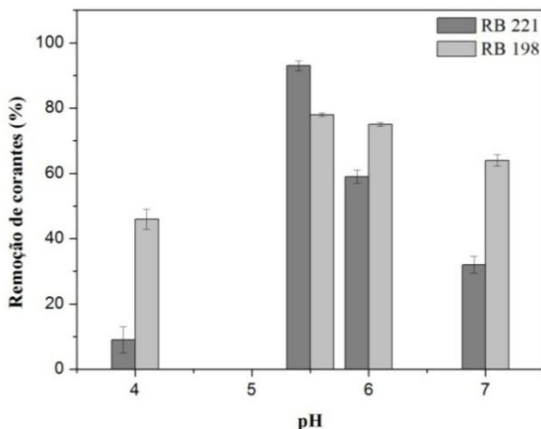
O mesmo comportamento foi observado por Preeti et al., (2013) na remoção do corante ácido azul 113 pela enzima HRP. O autor comparou a enzima livre com a imobilizada em alginato de cálcio e observou um aumento significativo no tempo de reação de 45 min para 240 min quando a enzima HRP estava imobilizada.

Este aumento no tempo de reação deve-se principalmente ao tamanho das moléculas dos corantes e às limitações de transferência de massa que ocorrem na enzima imobilizada. Corantes com grandes estruturas, como os corantes reativos utilizados neste trabalho, geralmente têm limitações no acesso ao sítio ativo da enzima para formar o complexo enzima-substrato. No processo de imobilização é criada uma barreira que confere alguma dificuldade na difusão do corante na partícula.

#### **4.4.2. Efeito do pH na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio**

O pH é um dos efeitos que mais influencia nas reações enzimáticas. Toda enzima tem uma faixa ótima de pH em que sua atividade é máxima, fora dessa faixa a enzima pode ter sua atividade diminuída ou até mesmo perder a atividade. Nos estudos do efeito da presença de mais de um corante em solução, realizados com a enzima livre, pôde ser observado a grande importância do pH em reações enzimáticas de remoção de corante. O pH foi o único fator significativo em todos os estudos realizados e influenciou fortemente em todas as reações de remoção de corante. Na Figura 35 é apresentado o estudo do efeito do pH na remoção dos corantes RB 221 e RB 198.

**Figura 35-** Efeito do pH na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30°C; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50,00 µmol/L para o RB 198 e 43,75 µmol/L para o RB 221; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.



Na Figura 35 é possível observar que o pH foi variado entre 4,0-7,0. A máxima remoção de 93% para o corante RB 221 foi obtida em pH 5,5 e de 75 e 72% para o corante RB 198 foram obtidas numa faixa de pH de 5,5 e 6,0, respectivamente. Em relação aos estudos do efeito da presença de mais de um corante em solução, utilizando a enzima livre, pôde-se observar que o pH ótimo de remoção do corante RB 198 passou de 7,0 para 5,5, no entanto, a remoção do RB 221 não apresentou esse mesmo comportamento, foi obtido o mesmo pH independentemente da enzima estar livre ou imobilizada.

Bilal et al. (2016 c) observaram um aumento da estabilidade térmica e ao pH da enzima manganês peroxidase imobilizada em ágar ágar. Esta enzima foi utilizada para remover os corantes vermelho reativo 195, azul reativo 21 e amarelo reativo 145. A atividade ótima foi obtida em uma faixa de pH entre 5,0 e 6,0. Foi observado que depois de 120 h, a manganês peroxidase reteve 71,9% e 60,3% da atividade a 30 °C e 40 °C, respectivamente.

Gholami-Borujeni et al. (2011) avaliaram o pH ótimo de remoção dos corantes ácido laranja 7 e ácido azul 25 pela HRP. A enzima imobilizada em alginato de cálcio foi estável a uma atividade residual

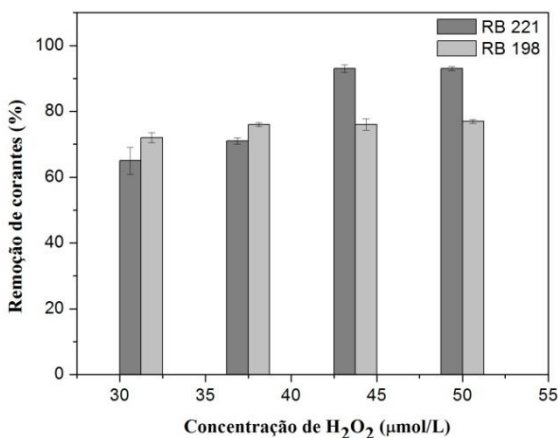
maior que 90% a pH 7,4. A enzima livre foi estável no mesmo pH e reteve aproximadamente 85% da atividade, o que foi considerado uma vantagem da imobilização.

A enzima imobilizada, geralmente, pode remover corante em uma ampla faixa de pH se comparada a enzima livre, como foi observado por Karim, Adnan e Husain (2012), na estabilidade da enzima HRP imobilizada em um complexo de quitosana-ciclodextrina para remover corantes azo.

#### 4.4.3. Efeito da concentração de $H_2O_2$ na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio

A enzima peroxidase é dependente do  $H_2O_2$  como ativador, para catalisar os mais variados tipos de reações. Porém em baixas concentrações de  $H_2O_2$  essa enzima pode sofrer restrição da catálise e em altas concentrações pode inibir a atividade enzimática e por isso é necessário determinar uma faixa ótima de  $H_2O_2$  que maximize a atuação da enzima. Na Figura 36 é apresentado o estudo do efeito do da concentração de  $H_2O_2$  na remoção dos corantes RB 221 e RB 198.

**Figura 36** - Efeito da concentração de  $H_2O_2$  na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.



Na Figura 36 é possível observar o estudo do efeito da concentração de  $H_2O_2$  que foi variado de 31,25 a 50  $\mu\text{mol/L}$ . A máxima remoção foi obtida numa concentração de 43,75  $\mu\text{mol/L}$  para o corante RB 221 e na concentração de 37,5  $\mu\text{mol/L}$  para o corante RB 198. Depois desse ponto, um aumento na concentração de  $H_2O_2$  não causou um aumento na eficiência de remoção. Nos estudos subsequentes para ambos os corantes foram utilizadas concentrações de 43,75  $\mu\text{mol/L}$  como forma de padronizar a mesma concentração de  $H_2O_2$ .

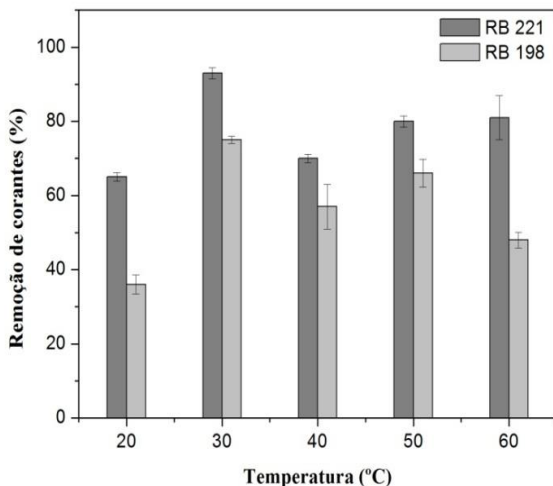
De acordo com Gholami-Borujeni et al. (2011), a eficiência de remoção aumenta com aumento da concentração de  $H_2O_2$  até um ponto, após este ponto, a adição de  $H_2O_2$  reduz a remoção.

Karim, Adnan e Hussain (2012), observaram um aumento na eficiência de remoção até a concentração de  $H_2O_2$  de 0,6 mmol/L, após esse ponto, foi obtida uma diminuição na eficiência de remoção.

#### **4.4.4. Efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio**

As reações enzimáticas são muito dependentes da temperatura. Toda enzima possui uma temperatura ótima de atuação, acima dessa temperatura pode sofrer desnaturação e perder sua atividade. A imobilização de enzimas, geralmente, promove um aumento na estabilidade térmica, por isso é necessário à investigação do efeito da temperatura. Na Figura 37 é apresentado o estudo do efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198.

**Figura 37-** Efeito da temperatura na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 43,75 µmol/L; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.



O efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 foi investigado variando a temperatura de 20 a 60 °C, conforme apresentado na Figura 37. Para ambos os corantes a temperatura ótima foi de 30 °C, a mesma temperatura observada nos estudos com a enzima livre tanto neste trabalho quanto em estudos anteriores (FARIAS, 2013). Porém, pode-se observar um aumento na estabilidade nas temperaturas de 50 e 60 °C em relação a reações utilizando a enzima livre. Na tabela 3, pode-se observar que a enzima livre é estável a uma temperatura máxima de 50 °C, porém com a imobilização essa estabilidade foi aumentada o que pode ser comprovada pela remoção de 81 % a 60 °C.

A 40 °C pôde-se observar uma diminuição da eficiência de remoção que, após esse ponto, voltou a aumentar nas temperaturas de 50 e 60 °C. O estudo do efeito da temperatura foi repetido 5 vezes, porém em todas às vezes foi obtido o mesmo resultado, uma eficiência de remoção menor a 40 °C que volta a aumentar com aumento da temperatura.

Resultados similares foram obtidos por Matto e Husain (2009) que conduziram a remoção de corantes azo pela peroxidase da soja. Foi

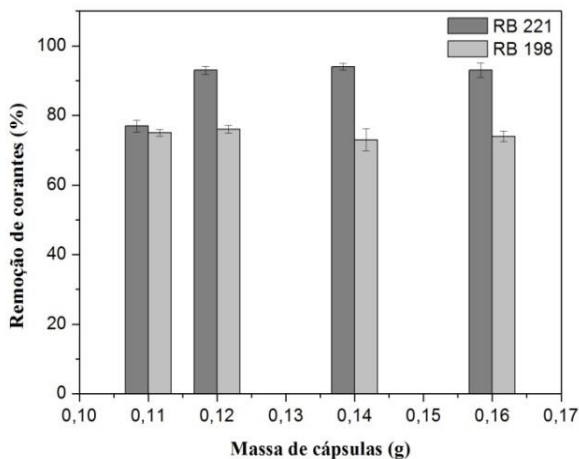


obtida uma máxima remoção de 30 °C tanto para enzima livre, quanto para imobilizada.

#### 4.4.5. Efeito da massa de cápsulas de alginato de cálcio com enzima HRP imobilizada para remoção dos corantes RB 221 e RB 198

O efeito da massa de cápsulas nas reações de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 foi investigado, os resultados obtidos são apresentados na Figura 38.

**Figura 38-** Efeito da massa de cápsulas na reação de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 43,75 µmol/L.



Os estudos do efeito da massa de cápsulas foram realizados variando a massa de cápsulas de 0,110 a 0,160 g. Pode-se observar para o corante RB 198, que um aumento na massa de cápsulas não promoveu um aumento na eficiência de remoção, que permaneceu praticamente constante. Por isso nos estudos posteriores foi utilizada a massa de cápsulas de 0,110g. Nessa massa foi removida uma quantidade de 75% do corante RB 198. Para o corante RB 221 pode-se observar um aumento na remoção de 77 para 93% quando se alterou a massa de

cápsulas de 0,110 g para 0,120 g, respectivamente, após esse ponto o aumento na massa de cápsulas não ocasionou um aumento na remoção.

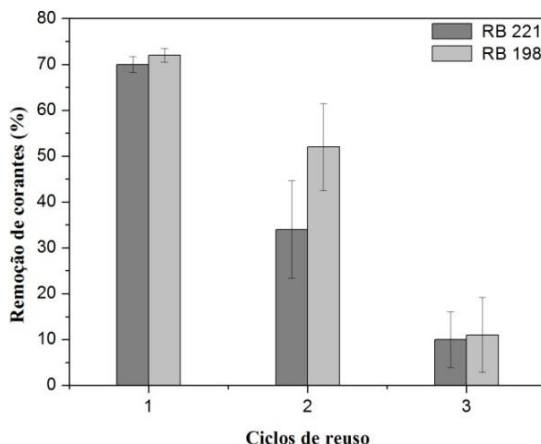
A imobilização foi realizada utilizando uma solução com uma elevada concentração de enzima para assegurar que todas as cápsulas tivessem uma concentração adequada para remover a maior parte do corante. Provavelmente, não foi observado aumento na remoção com aumento da massa, porque a máxima capacidade de remoção de corante é atingida com uma massa menor de cápsulas.

#### **4.4.6. Reúso da enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio para remover os corantes RB 221 e RB 198**

Uma das vantagens da imobilização de enzimas é a possibilidade de reúso do biocatalisador, que faz com que o processo fique mais barato e cause menos danos ao meio ambiente.

As cápsulas de alginato de cálcio com enzima HRP imobilizada, que foram utilizadas neste estudo, foram encubadas e permaneceram por 1 dia a 4 °C. Após cada reúso, as cápsulas foram lavadas com água destilada e colocadas no próximo ciclo. Na Figura 39 é apresentado o reúso da enzima HRP imobilizada em de alginato de cálcio para remoção dos corantes RB 221 e RB 198.

**Figura 39-** Reúso da enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio para remoção dos corantes RB 221 e RB 198. Condições: temperatura 30°C; pH 5,5; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 43,75 µmol/L; massa de cápsulas 0,110 g para o RB 198 e 0,120 g para o RB 221.



Para o corante RB 198 pôde ser observado uma perda de aproximadamente 28% da atividade do primeiro para o segundo reúso e 85% do primeiro para o terceiro. Já para o corante RB 221 foi observado uma perda de 50% do primeiro para o segundo reúso e 86% do primeiro para o terceiro (Figura 35). A enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio pôde ser reutilizada por até 3 ciclos.

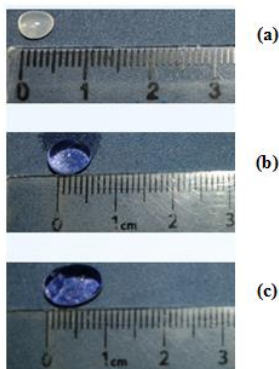
Resultados similares foram encontrados por Preethi et al. (2013), que utilizou a enzima HRP imobilizada em alginato de cálcio para remover o corante ácido azul 113, foram possíveis 3 ciclos de reúso.

Malani et al. (2013) reutilizaram a enzima HRP por 3 ciclos na descoloração de corantes azo.

Provavelmente a alta perda de atividade deve-se à degradação da cápsula de um estudo para outro. A cápsula de alginato absorve um pouco da solução durante a reação. Como nas reações seguintes esta cápsula já está mais inchada, isso faz com que haja perda da atividade, podendo em algumas situações, como por exemplo, em pH muito básicos, ocorrer o rompimento da cápsula. Na Figura 40 é apresentada a fotografia das cápsulas de alginato de sódio com a enzima HRP imobilizada logo após serem retiradas da reação, antes de serem lavadas

com água destilada. (a) cápsula de alginato, (b) cápsula de alginato depois da reação, (c) cápsula de alginato depois do primeiro reuso.

**Figura 40-** Cápsulas de alginato de cálcio com enzima HRP imobilizada.

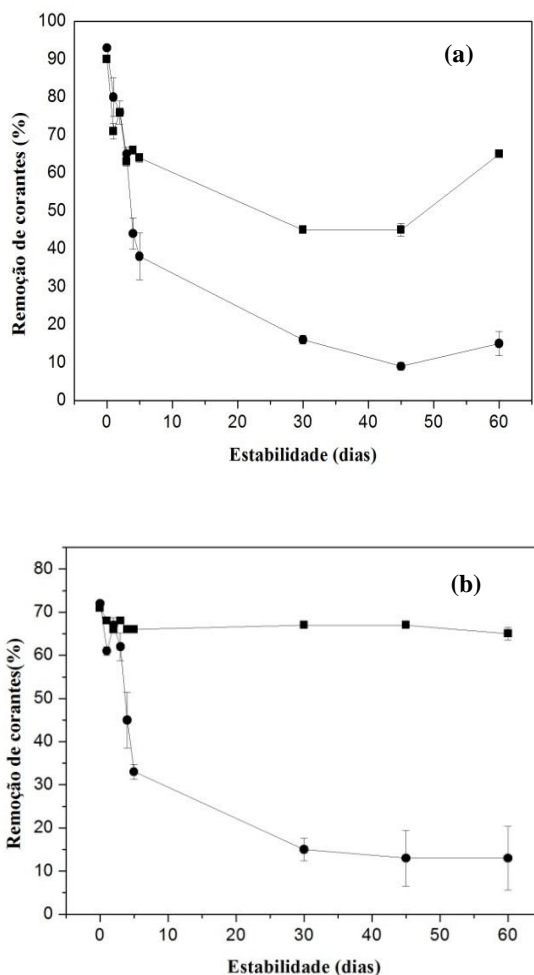


#### 4.4.7. Estabilidade na reação da HRP imobilizada em alginato de cálcio para remoção dos corantes RB 221 e RB 198

Foram realizados estudos de estabilidade (4 °C) para avaliar a estabilidade da enzima HRP livre e imobilizada, já que as enzimas são conservadas a 4 °C. Para remover o RB 221 a enzima foi imobilizada em pH 5,5 e as reações foram realizadas paralelamente as reações utilizando a enzima livre, com a solução preparada em pH 5,5. Para remover o RB 198 a enzima foi imobilizada em pH 7,0, apesar do pH ótimo da enzima imobilizada ser 5,5, está foi avaliada em pH 7,0 porque é o pH ótimo de degradação da enzima livre.

As soluções foram estocadas a 4 °C. As cápsulas da enzima imobilizada foram estocadas em água destilada e retiradas 5 min antes de cada reação.

**Figura 41-** Estudo de estabilidade na reação da remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: Temperatura 30 °C; pH 5,5 RB 221 e pH 7,0 RB 198; tempo de reação 180 min para o RB 221 e 240 min para o RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 43,75 μmol/L; massa de cápsulas 0,120 g para o RB 221 e 0,110 g para o RB 198. (a) (■) RB221L e (●) RB 221 I, HRP livre (L) e imobilizada (I) para remover RB 221 e (b) (■) RB198 L e (●) RB 198 I, HRP livre (L) e imobilizada (I) para remover RB 198.



Os estudos de estabilidade enzimática foram realizados variando a estabilidade de 0 a 60 dias. Na Figura 41 (a) são apresentados os estudos realizados em reação com o corante RB 221. Pode ser observado que a enzima imobilizada apresentou uma grande perda de estabilidade em relação à enzima livre. A enzima livre ao final dos 60 dias apresentou uma perda da estabilidade de 28%, enquanto que a imobilizada apresentou uma perda de 80%.

Os estudos de estabilidade para o corante RB 198 foram realizados a pH 7,0 para enzima livre e imobilizada. Na Figura 41 (b) são apresentados os estudos realizados em reação com o corante RB 198. Pode ser observado que a enzima livre manteve a estabilidade constante 67% durante o período de incubação, enquanto a enzima imobilizada apresentou uma perda de 80%.

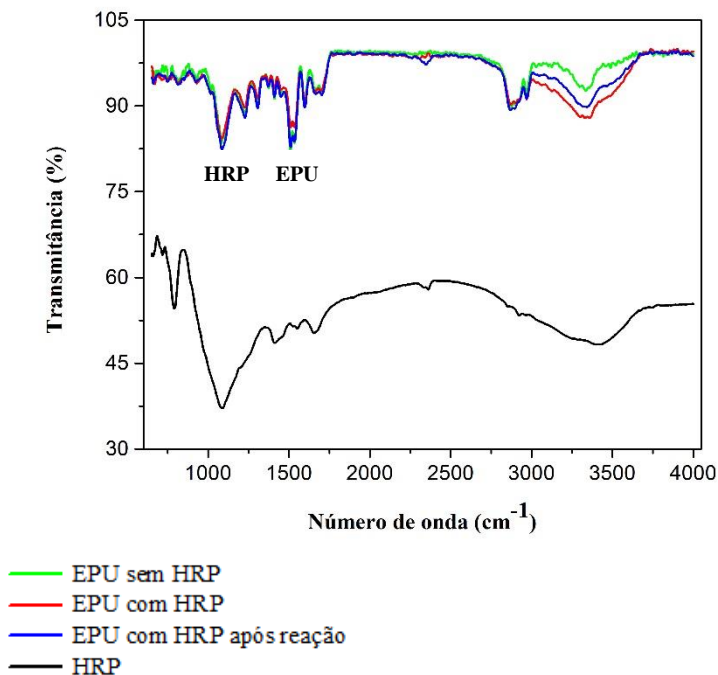
Vários autores como Bilal e Asgher (2015 a) e Gholami-Borujeni et al. (2011) reportaram um aumento da estabilidade da enzima imobilizada em relação a enzima livre, porém todos esses autores conduziram os experimentos de estabilidade a quente, não foram encontrados estudos que reportassem a perda da estabilidade enzimática a baixas temperaturas. Provavelmente esses estudos não são realizados porque há uma grande perda na estabilidade da enzima, geralmente nos estudos de estabilidade a quente há um aumento na estabilidade.

4.5. Caracterização da enzima HRP imobilizada em espuma de poliuretano (EPU)

#### **4.5.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da HRP imobilizada em EPU**

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para caracterizar a enzima HRP imobilizada em EPU. Foram comparados o FTIR do EPU sem HRP e da enzima HRP, com o FTIR da HRP imobilizada em EPU e o da HRP imobilizada em EPU após a reação. Os resultados encontrados para espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da *Horseradish peroxidase* imobilizada em espuma de poliuretano são apresentados na Figura 42.

**Figura 42-** Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) da *Horseradish peroxidase* imobilizada em EPU.



Na Figura 42 pode-se observar que o FTIR da HRP apresentou banda típica de amina alifática primária, secundária ou terciária, entre  $1020\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ , nessa faixa é possível observar a banda de absorção da ligação C-N não conjugada (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). Em aproximadamente  $1680\text{ cm}^{-1}$  pode ser observada a banda correspondente a carbonila, que também está presente na estrutura da enzima e na região de aproximadamente  $3400\text{ cm}^{-1}$  é possível observar uma banda larga correspondente ao grupo  $\text{OH}^-$ , presente na estrutura da enzima.

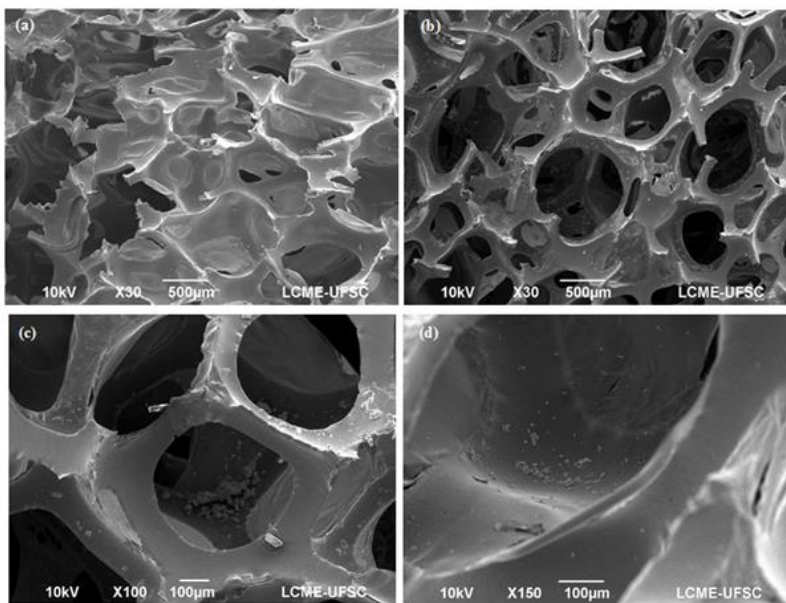
A EPU é gerada pela reação do diisocianato com poliálcool poliéter. Nos espectros da enzima HRP imobilizada tanto antes como depois da reação observa-se a banda característica da ligação C-N entre  $1020\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  é observada a banda que corresponde ao uretano e que é a mesma banda apresentada pelo espectro do EPU sem a HRP (NICOLETTI, 2014). Em aproximadamente  $2800\text{ cm}^{-1}$  observa-se

a banda correspondente às ligações C-H e na região entre 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  uma banda um pouco mais estreita do que a de OH<sup>-</sup>, associada à ligação N-H de amina primária.

#### 4.5.2. Morfologia da HRP immobilizada em EPU

A morfologia da HRP immobilizada em EPU foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram utilizadas ampliações de 30, 100 e 150 vezes. Na Figura 43 (a), (b), (c) e (d) são apresentadas as análises de MEV para enzima immobilizada EPU.

**Figura 43-** (a), (b), (c) e (d) Morfologia da HRP immobilizada em EPU.



Na Figura 43 (a) é possível observar morfologia da EPU sem a enzima immobilizada. As cavidades observadas na figura devem-se a liberação de CO<sub>2</sub> que ocorre durante a expansão da espuma (NICOLETTI, 2014).

Nas Figuras 43 (b), (c) e (d) pode-se observar diferentes ampliações da estrutura da EPU com enzima immobilizada.



### 4.5.3. Estudos de textura da EPU com enzima imobilizada

A textura das cápsulas de enzima imobilizada em EPU foram determinadas através da avaliação da área superficial, volume total do poro, diâmetro médio do poro e diâmetro da partícula. Na Tabela 32 são apresentadas as características texturais da espuma de poliuretano.

**Tabela 32-** Características texturais da espuma de poliuretano.

Características	Valor
Área superficial ( $\text{cm}^2/\text{g}$ )	0,95
Volume total do poro ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )	0,03
Diâmetro médio do poro ( $\text{Å}$ )	1,24
Diâmetro da partícula ( $d_p$ ) (cm)	1,00

Na Tabela 32 pode-se observar que para EPU com enzima HRP imobilizada foram obtidos área superficial de  $0,95 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , um volume de poro de  $0,03 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ , diâmetro médio de poro de  $1,24 \text{ Å}$  e um diâmetro de partícula de  $1,00 \text{ mm}$ , podendo ser considerada uma partícula micro, pois o diâmetro está entre  $0,2\text{-}500 \text{ }\mu\text{m}$ .

Kubota (2011) realizou o desenvolvimento de materiais uretânicos combinados com carboidratos para remoção de contaminantes. Com o sistema Amido/TDI foi obtida uma área superficial de  $6,90 \text{ m}^2/\text{g}$ , um diâmetro de poros de  $0,40 \text{ Å}$  e um volume total de poros de  $0,007 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Utilizando o sistema maltodextrina/TDI foi obtida uma área superficial de  $7,70 \text{ m}^2/\text{g}$ , um diâmetro de poros de  $0,48 \text{ Å}$  e um volume total de poros de  $0,008 \text{ cm}^3/\text{g}$ .

Observa-se que o volume total de poros obtido nesse trabalho  $0,03 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ , foi somente um pouco maior em relação ao obtido por Kubota (2011). Provavelmente o volume de poro deste trabalho é maior porque nele contém somente EPU e HRP, enquanto o do trabalho de Kubota (2011) é uma combinação de PU-carboidrato. Nesse mesmo trabalho foi obtida uma área superficial de  $6,90 \text{ m}^2/\text{g}$ , que convertida em  $\text{cm}^2/\text{g}$ , dá uma área superficial muito superior à obtida no presente trabalho.

De acordo com Kubota (2011), o diâmetro de poros de materiais sólidos pode ser classificado como microporoso quando apresenta diâmetro de poro até  $20 \text{ Å}$ , mesoporoso com diâmetro de  $20$  até  $500 \text{ Å}$  e macroporoso com diâmetro maior que  $500 \text{ Å}$ . O poliuretano

utilizado neste trabalho apresenta um diâmetro de poros de 1,24 Å, podendo ser classificado como microporoso.

#### 4.5.4. Efeito da concentração de enzima HRP na imobilização em EPU

Este estudo foi realizado para definir a concentração ótima de enzima a ser imobilizada em EPU. As concentrações foram variadas de 1,0 a 4,0 mg/mL conforme descrito no item 3.4.2.2.3 e os estudos de remoção foram realizados conforme item 3.4.2.2.4. A porcentagem de imobilização foi calculada pela determinação da atividade enzimática do sobrenadante antes e depois da imobilização. Na Tabela 33 são apresentados os resultados dos estudos de remoção e a porcentagem de enzima imobilizada em cada concentração.

**Tabela 33-** Estudos de imobilização em diferentes concentrações de enzima HRP e remoção do corante RB 221. Condições da reação de remoção do corante RB 221: temperatura 30°C; pH 6,0; concentração de corante 40,0 mg/L; tempo 30 min; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50,0 µmol/L.

Concentração de enzima mg/mL	Imobilização (%) de HRP em 1,5g de EPU	Remoção do corante RB 221 (%)
1,0	3,0	57
2,0	5,0	59
3,0	13	56
4,0	7,0	52

Na Tabela 33 pode-se observar que independente da alteração na concentração de enzima foi obtida uma baixa eficiência de imobilização, a máxima imobilização de 13% foi obtida com 3,0 mg/mL de enzima. As espumas de poliuretano com enzima imobilizada em diferentes concentrações foram utilizadas nos estudos de remoção do corante RB 221. Pode-se observar que a máxima remoção do corante de 59% foi obtida com 2,0 mg/mL de enzima imobilizada, porém não houve uma alteração significativa na eficiência de remoção independentemente da quantidade de enzima imobilizada no suporte, demonstrando que há uma saturação do suporte já em pequenas concentrações de enzima, por isso nos estudos subsequentes foi utilizada a concentração de enzima de 1,0 mg/mL para imobilizar a enzima na EPU.

#### 4.5.5. Efeito do pH na imobilização da enzima HRP em EPU

A enzima HRP foi imobilizada na EPU variando o pH de 4,0 a 7,0. Os resultados do efeito do pH na imobilização da HRP em EPU estão apresentados na Tabela 34.

**Tabela 34** - Estudos de efeito do pH na imobilização da HRP em EPU.

pH	Atividade solução inicial (U/mL)	Atividade após imobilização (U/mL)	Imobilização em 1,5 g de EPU (%)
4,0	702,1	600,4	14
5,5	414,6	398,9	4,0
6,0	255,5	247,1	3,0
7,0	97,2	90,5	7,0

Na Tabela 34 é possível observar que a máxima imobilização de 14% foi obtida em pH 4,0. Em pH 5,5; 6,0 e 7,0 foram obtidas imobilizações de 4,0, 3 e 7%, respectivamente.

Fritzen-Garcia et al. (2013) realizaram a imobilização da HRP em nanopartículas de poliuretano para detecção de dopamina. Os autores observaram que cerca de 4.400 moléculas de HRP foram adsorvidos a nanopartícula de PU-PEG, o que correspondeu a 45% a área superficial.

Quek, Ting e Tan (2006) realizaram a imobilização do *Rhodococcus* sp. F92 em espuma de poliuretano. O *Rhodococcus* obteve uma eficiência de imobilização de 90% na espuma de poliuretano numa densidade de 14 kg.m<sup>-3</sup>.

Provavelmente a baixa imobilização da HRP no poliuretano deve-se a baixa capacidade dessa enzima em fixar-se nesse tipo de suporte. Existem vários trabalhos descritos na literatura como Nicoletti et al. (2015), que imobilizaram lipase em poliuretano com boa eficiência de imobilização. Talvez a utilização de um reagente que modificasse a superfície desse polímero seria uma alternativa para aumentar a eficiência de imobilização. Apesar da baixa eficiência, foram obtidas remoções de corantes significativas e comparadas a outros trabalhos da literatura como Forgiarini (2006), obtidos para degradação de corante com HRP livre.

#### 4.6. Estudos de remoção dos corantes RB 221 e RB 198 utilizando enzima imobilizada em EPU

Nesta parte do trabalho foram realizados estudos de imobilização da enzima HRP em EPU para remoção dos corantes RB 221 e RB198. Com objetivo de avaliar se o  $H_2O_2$  presente no meio de reação não era o causador da remoção dos corantes, foi realizado um teste para cada corante nas mesmas condições reacionais que seriam utilizadas ao longo deste capítulo.

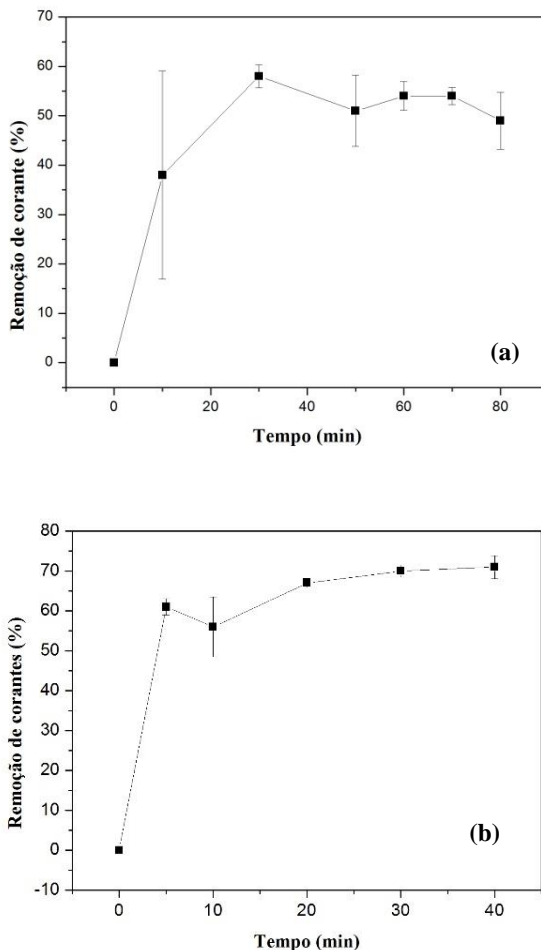
Os testes continham todos os reagentes que seriam utilizados nas reações de remoção, porém foi utilizada somente a espuma de poliuretano, sem a enzima.

Neste ensaio não foi obtida nenhuma remoção, provando que o responsável pela remoção não é o  $H_2O_2$  e nem a adsorção do corante na espuma e sim a enzima presente no suporte. Outro teste realizado foi o da espuma na eficiência de remoção do corante. Não foram observadas diferenças na eficiência de remoção com o aumento da quantidade de espuma. O aumento da área do polímero não aumentou a eficiência de remoção.

##### **4.6.1. Cinética de reação na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada EPU**

Uma cinética foi realizada variando o tempo de reação de 0 a 80 min para o RB 221 e de 0 a 40 min para o corante RB 198, para definir a máxima remoção de cada corante. Na Figura 44 é apresentada a cinética remoção dos corantes (a) RB 221 e (b) RB 198.

**Figura 44-** Cinética de remoção dos corantes (a) RB 221 e (b) RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37,5 µmol/L para o RB 198 e 50,0 µmol/L para o RB 221; massa de espuma ± 0,02 g.



Na Figura 44 (a) pode-se observar que para o corante RB 221 o tempo de reação foi variado de 0 a 80 min. A máxima remoção foi de 58% obtida em 30 min de reação. Em 50 min foi obtida uma remoção de 52% que após esse ponto só se alterou em 80 min em que foi obtida uma

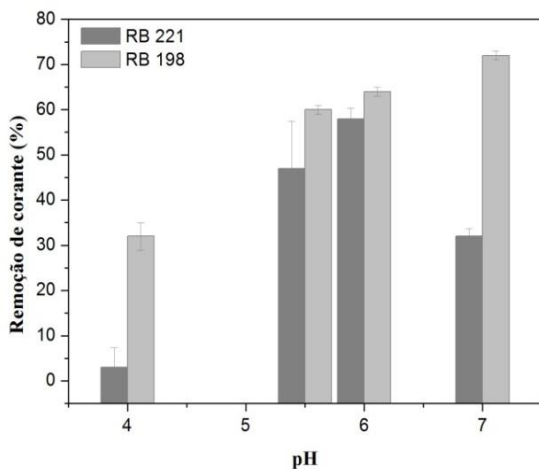
remoção de 49%. Se for comparada a remoção do mesmo corante com alginato, observa-se que naquele caso foram necessários 180 min para remover o corante RB 221.

Na Figura 44 (b) observa-se que para o corante RB 198 o tempo foi variado de 0 a 40 min. Em 20 min foi obtido 67% de remoção, porém a máxima remoção de 70% foi obtida em 30 min de reação e após esse tempo permaneceu constante. Vale ressaltar que para este corante em apenas 5 min de reação foi obtido 61% de remoção. Nos estudos realizados com alginato o corante RB 198 apresentou uma máxima remoção de 75% obtida em 240 min de reação.

#### 4.6.2. Efeito do pH na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em EPU

O efeito do pH foi estudado variando o pH de 4,0 a 7,0. O estudo do efeito do pH para remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP é apresentado na Figura 45.

**Figura 45-** Efeito do pH na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30 °C; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37,5 µmol/L para o RB 198 e 50,0 µmol/L para o RB 221; massa de espuma ± 0,02 g.



Na Figura 41 pode ser observado que a máxima remoção de corante pela enzima HRP foi de 58% para o RB 221, obtida em pH 6,0 e de 72% para o RB 198 obtida em pH 7,0.

Fritzen-Garcia et al. (2009) imobilizaram a enzima peroxidase do pinho em nanopartículas de poliuretano peguado. Foi variado o pH numa escala de 6,0 a 8,0. A máxima atividade da enzima imobilizada foi obtida em pH 6,5.

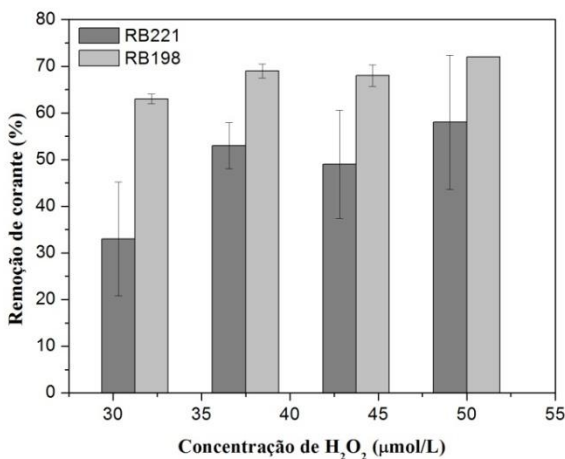
Lade et al. (2015) realizaram a imobilização de um consórcio microbiano em poliuretano para remoção do corante vermelho congo do efluente real. Foi obtida uma remoção de 100% em 12 h de reação a pH 7,5.

Comparando-se o pH obtido para enzima HRP imobilizada em alginato, que foi de 5,5 para ambos os corantes e em poliuretano que foi de 6,0 para o RB 221 e de 7,0 para o RB 198, pode ser observado que o pH da reação não se alterou de forma significativa, se comparado com pH declarado na ficha técnica da enzima que é entre 6-7 (Apêndice A). Dessa forma pode-se observar que a presença do suporte praticamente não influenciou na atividade enzimática.

#### **4.6.3. Efeito da concentração de $H_2O_2$ na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em EPU**

O efeito da concentração de  $H_2O_2$  foi investigado variando a concentração de  $H_2O_2$  entre 31,2 a 50,0  $\mu\text{mol/L}$ . O efeito da concentração de  $H_2O_2$  na remoção dos corantes RB 221 e RB198 pela HRP é apresentado na Figura 46.

**Figura 46-** Efeito da concentração de  $H_2O_2$  na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30°C; pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; massa de espuma  $\pm 0,02$  g.



Na Figura 46 é possível analisar que a máxima remoção de corante, na faixa de concentração de  $H_2O_2$  estudada, foi de 58% para o corante RB 221, obtida com 50  $\mu\text{mol/L}$  de  $H_2O_2$  e de 72% para o RB 198 obtido também com 50  $\mu\text{mol/L}$ . Analisando o RB 198 observa-se que após 37,5  $\mu\text{mol/L}$ , se considerado o desvio padrão, praticamente não houve variação da remoção do corante com o aumento da quantidade de  $H_2O_2$ , esse mesmo comportamento não foi observado para o RB 221, como o desvio padrão foi muito grande é muito difícil prever o comportamento desse corante.

Nos estudos de efeito da concentração de  $H_2O_2$  pode-se observar um comportamento semelhante ao observado para o corante RB 198 utilizando a enzima imobilizada tanto em alginato, quanto em poliuretano. Com a enzima imobilizada em alginato foi obtida uma máxima remoção em 37,5  $\mu\text{mol/L}$ , para o RB 198 e de 43,75  $\mu\text{mol/L}$  para o corante RB 221, após esse ponto a remoção permaneceu constante.

Li et al. (2009) realizaram a remoção do corante vermelho congo utilizando manganês peroxidase. A descoloração aumentou com o aumento da concentração de  $H_2O_2$  de 0 a 0,2 mmol/L, a máxima



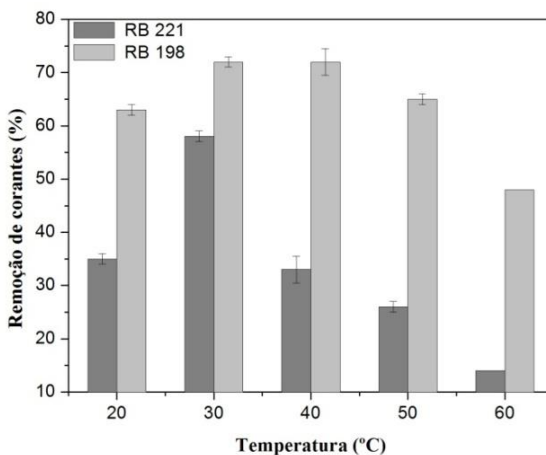
remoção foi obtida com 0,2 mmol/L. Em altas concentrações de  $H_2O_2$  houve uma diminuição na eficiência de remoção.

Liu et al. (2014) realizaram a degradação dos corantes de antraquinona e trifenilmetano utilizando cloroperoxidase. Os autores observaram que altas concentrações de  $H_2O_2$  não foram favoráveis para estabilidade da heme proteína como HRP devido à inativação causada pela destruição oxidativa da porfirina. Já baixas concentrações de  $H_2O_2$  não foram suficientes para suprir a quantidade suficiente de oxidante.

#### 4.6.4. Efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP imobilizada em EPU

A temperatura de reação foi variada de 20 a 60 °C. O efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB198 pela HRP imobilizada em EPU são apresentados na Figura 47.

**Figura 47-** Efeito da temperatura na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de  $H_2O_2$  37,5  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 198 e 50,0  $\mu\text{mol/L}$  para o RB 221; massa de espuma  $\pm 0,02$  g.



Na Figura 47 é possível observar os estudos do efeito da temperatura. A máxima remoção de 58% para o RB 221 e de 72% para o RB 198 foi obtida na temperatura de 30 °C para o corante RB 221 e na

faixa 30-40 °C para o corante RB 198. Após esses pontos observou-se uma diminuição na eficiência de remoção para ambos os corantes, mais significativa para o corante RB 221. Pode-se observar que a reação de remoção do corante RB 198 apresentou uma maior resistência à temperatura se comparado com a remoção do RB 221.

Liu et al. (2014) realizaram a remoção de corantes de antraquinona e trifenilmetano, a máxima remoção de 80% para o corante vermelho alizarin foi obtida numa faixa de temperatura de 20-60 °C e de 85% para o cristal violeta na faixa de 10 a 90 °C.

Jamal, Pandey e Qidwai (2010) realizaram a degradação de corantes dispersos utilizando a peroxidase *Trichosanthos diocia* à máxima remoção foi obtida a 42 °C em 1 h de reação.

Em relação aos estudos realizados com alginato, pode-se observar que este polímero natural foi mais estável a altas temperaturas de 50 e 60 °C do que o EPU, que apresentou uma queda na eficiência de remoção. Essa diferença pode está relacionada aos diferentes métodos de imobilização. O alginato foi imobilizado por encapsulamento e o poliuretano por adsorção.

Baborová et al. (2006) realizaram a remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromático utilizando manganês peroxidase. Os autores observaram uma faixa de temperatura ótima entre 50-60 °C e uma perda de atividade em temperaturas maiores do que 65 °C.

#### **4.6.5. Reúso da enzima HRP imobilizada em EPU para remover os corantes RB 221 e RB 198**

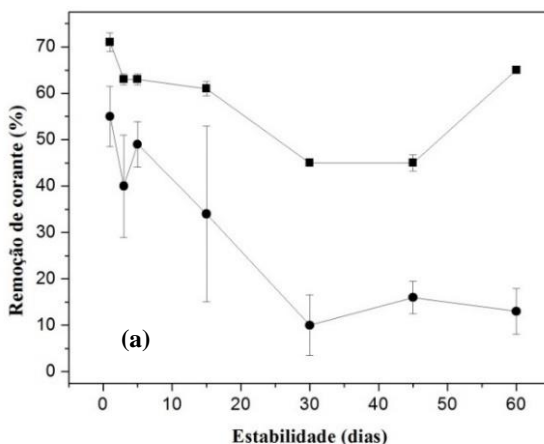
O estudo do reúso do biocatalisador foi avaliado nas condições ótimas de pH, concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e temperatura obtida nos estudos apresentados nos itens 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3. Foi realizado um ensaio de remoção do corante e posteriormente a espuma de EPU foi lavada com água destilada e colocada na estufa por 30 min. Na segunda reação, não foi observada remoção de nenhum dos corantes.

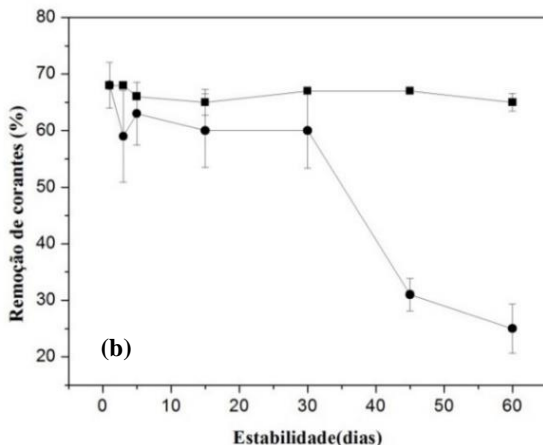
A enzima HRP foi imobilizada em EPU por adsorção. Muito provavelmente ao final do processo, há a dessorção de parte da enzima do suporte, fazendo com que o biocatalisador não possa ser reutilizado. Nesse sentido a imobilização em alginato de cálcio mostrou-se mais eficiente, como a enzima está encapsulada e não imobilizada por adsorção, este processo não tem como limitação a dessorção do biocatalisador. No processo utilizando alginato foram possíveis até 3 ciclos de reúso.

#### 4.6.6. Estabilidade da HRP immobilizada em EPU para remoção dos corantes RB 221 e RB 198

A enzima immobilizada em espuma de poliuretano foi estocada a 4°C, sem estar em nenhuma solução. Foram realizados estudos de estabilidade a (4 °C) para avaliar a estabilidade da enzima HRP livre e immobilizada em EPU. Os resultados para a estabilidade da HRP immobilizada em EPU na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 são apresentados na Figura 48.

**Figura 48-** Estudo de estabilidade na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela enzima HRP. Condições: temperatura 30°C; pH 6,0 para RB 221 e pH 7,0 para RB 198; concentração de corante 40 mg/L; concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37,5 µmol/L para o RB 198 e 50,0 µmol/L para o RB 221; massa de espuma ± 0,02 g. (a) (■) RB 221L e (●) RB 221 I, HRP livre (L) e immobilizada (I) para remover RB 221 e (b) (■) RB198 L e (●) RB 198 I, HRP livre (L) e immobilizada (I) para remover RB 198.





Pode-se observar na Figura 48 (a), que na reação de remoção do corante RB 221, ao longo dos 60 dias em que a HRP esteve estocada a 4 °C, houve uma queda na remoção deste corante. Já a enzima livre não apresentou o mesmo comportamento, foi observada uma diminuição significativa na remoção do corante RB 221 apenas após o décimo quinto dia de estocagem da solução de enzima. Pode-se observar que essa redução não foi tão grande quanto à observada para a enzima imobilizada, que teve perda de atividade após o quinto dia de armazenamento.

Apesar de a faixa ótima de atividade da enzima HRP livre ser 6-7 (Apêndice A), a enzima HRP imobilizada em pH 7, quando utilizada para remover o RB 198, apresentou uma maior estabilidade se comparada a enzima imobilizada em pH 6, ou pH 5,5, como utilizado nos estudos com alginato. O EPU com a HRP imobilizada só apresentou uma diminuição da eficiência de remoção após 30 dias de estocagem. Já a solução de enzima livre manteve a estabilidade nos 60 dias de reação.

Não existem trabalhos reportados na literatura realizando a estabilidade da enzima a frio somente a quente, provavelmente porque na maioria das reações ocorre uma perda significativa na estabilidade da enzima em remover o corante. Porém para armazenar as enzimas imobilizadas é necessário estocar a enzima na geladeira, então se faz necessário estudar este tipo de comportamento, que ainda não se encontra descrito na literatura.

Na Tabela 35 são apresentados alguns trabalhos reportados na literatura sobre a remoção de corantes com enzima imobilizada em diversos suportes comparados aos resultados obtidos para HRP imobilizada em alginato de cálcio e espuma de poliuretano neste trabalho.

**Tabela 35-** Síntese de trabalhos da literatura, utilizando enzimas imobilizadas em diversos suportes para remoção de corantes, comparados aos resultados obtidos neste trabalho.

Referência	Enzima	Corante	Suporte	Tempo (min)	D (%)
Gholami-Borujeni et al. (2011)	HRP	Ácido Laranja 7 Ácido Azul 25	Alginato de cálcio	90	75,0 84,0
Jaiswal et al. (2016)	papaya lacase	Índigo-carmim	Cápsulas de quitosana	480	56,0
Bilal et al. (2016 b)	HRP	Vermelho reativo 120 Azul reativo 4 Laranja reativo 16	Alginato de cálcio	60	72,3- 87,2
Shoabargh et al. (2014)	glucose oxidase	Ácido Laranja 7	TiO <sub>2</sub> /Poliuretano	22	99,0
Bilal et al. (2016 c)	Manganês peroxidase	Vermelho reativo 195 Azul Reativo 21 Amarelo reativo 145	Gel ágar-ágar	720	78,6- 84,7
Este trabalho	HRP	RB 221 RB 198	Alginato de cálcio	180 240	93,0 75,0
Este trabalho	HRP	RB 221 RB 198	Espuma de poliuretano	30 30	58,0 72,0

#### 4.7. Modelagem matemática e estimativa das constantes cinéticas em HRP livre

Um mecanismo de Michaelis-Menten reversível descrito na Equação 5 foi utilizado para prever o comportamento de remoção de corante ao longo do tempo, uma vez que não existe a remoção completa dos corantes estudados. Os parâmetros cinéticos do modelo foram minimizados em um sistema com enzima livre, a fim de não subestimar o mesmo com a interferência de parâmetros de transferência de massa do sistema HRP-corante imobilizado.

Os parâmetros cinéticos minimizados individualmente para os corantes RB 221 e RB 198 com a HRP livre são apresentados na Tabela 36.

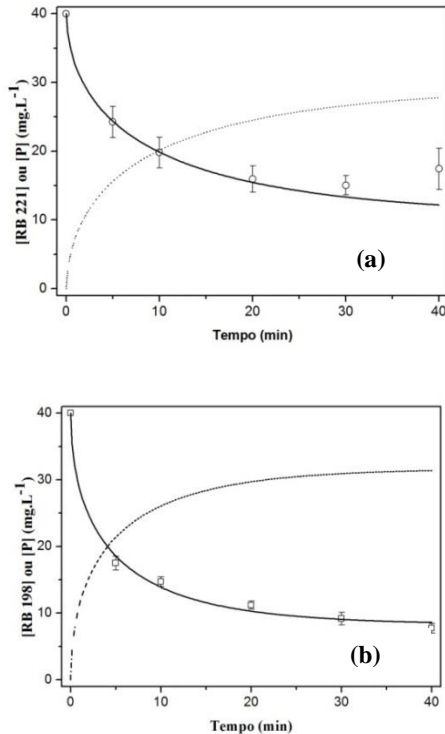
Esses parâmetros foram obtidos através do ajuste do modelo aos dados experimentais obtidos nas condições ótimas de degradação para cada corante num reator com 3,2 mL e com massa inicial de enzima de 28,87 mg.

**Tabela 36-** Dados cinéticos da remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela HRP livre.

Parâmetros	RB 221	RB 198
$\mu_{max}$ (1/min)	$1,02 \times 10^{-2}$	$4,09 \times 10^{-2}$
$K_{mS}$ (mg/L)	61,91	63,58
$K_{mP}$ (mg/L)	0,74	0,41
$K_{eq}$	2,80	3,81

Na Tabela 36 pode-se observar que o  $\mu_{max}$  é aproximadamente 4 vezes maior para o RB 198 do que para o RB 221 e  $K_{mS}$  é quase o mesmo para ambos os corante, o  $K_{mP}$  é aproximadamente 2 vezes maior para o RB 221 do que para o RB 198 e o  $K_{eq}$  é maior para o RB 198 do que para o RB 221. As Figuras 49 (a) e (b) mostram os perfis experimentais e numéricos de remoção do corante ao longo do tempo.

**Figura 49-** Comparação da remoção de corante experimental e simulada usando HRP livre: (a) (○) RB 221 dados experimentais, (linha contínua) RB 221 simulado e (linha pontilhada) simulando produto; (b) (□) RB 198 dados experimentais, (linha contínua) RB 198 simulado e (linha pontilhada) simulando produto.



As Figuras 49 (a) e (b) mostram os perfis experimentais e simulados para remoção de corante ao longo do tempo. Pode-se observar que para o RB 221 o modelo se ajustou bem aos dados experimentais, para o RB 198 o modelo conseguiu representar os dados experimentais.

#### 4.8. Modelagem matemática e estimativa dos parâmetros de transferência de massa para HRP imobilizada

Os parâmetros de transferência de massa das Equações 8-11 juntamente com suas condições de contorno foram ajustados aos dados

experimentais obtidos nas condições ótimas de imobilização de HRP que foram apresentados na Figura 30.

A Tabela 37 apresenta os parâmetros de transferência de massa, com  $D_{eS}$ ,  $D_{eP}$ ,  $K_{LS}$  e  $K_{LP}$  obtidos pela solução numérica juntamente com os parâmetros de processo. Observa-se que as difusividades efetivas para ambos os corantes são muito semelhantes, mas o RB 198 apresentou a um coeficiente de transferência de massa maior que o do RB 221.

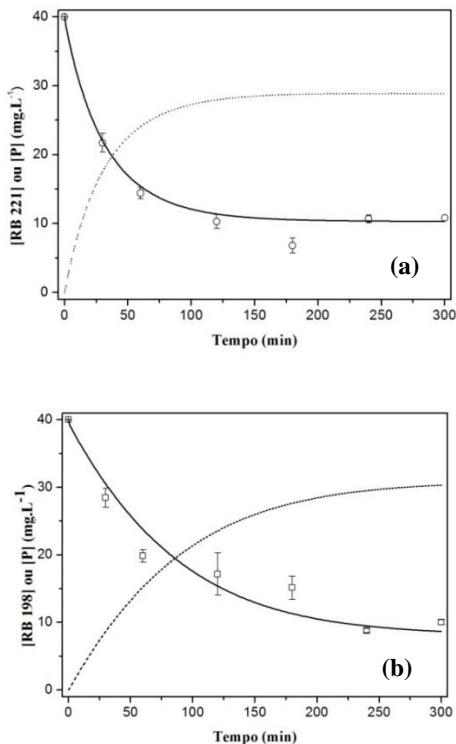
**Tabela 37** - Parâmetros de transferência de massa e de processo na remoção dos corantes RB 221 e RB 198 pela HRP imobilizada.

Parâmetros	RB 221	RB 198	Referências
$\varepsilon_r$	0,9507	0,9546	Este estudo
$\varepsilon_p$		0,61	Jung et al. (2016)
$D_{eS}$ (m <sup>2</sup> /s)	1,47 x 10 <sup>-9</sup>	1,51 x 10 <sup>-9</sup>	Este estudo
$D_{eP}$ (m <sup>2</sup> /s)	1,39 x 10 <sup>-9</sup>	1,66 x 10 <sup>-9</sup>	Este estudo
$\rho_p$ (g/cm <sup>3</sup> )		0,723	Jung et al., 2016
$k_{LS}$ (m/s)	1,32 x 10 <sup>-3</sup>	1,67 x 10 <sup>-3</sup>	Este estudo
$k_{LP}$ (m/s)	1,29 x 10 <sup>-4</sup>	1,30 x 10 <sup>-5</sup>	Este estudo

As Figuras 50 (a) e (b) mostram os perfis experimentais e numéricos de remoção do corante ao longo do tempo usando HRP imobilizada.



**Figura 50-** Comparação da remoção de corante experimental e simulada da remoção de corantes usando HRP imobilizada: (a) (○) RB 221 dados experimentais, (linha contínua) RB 221 simulado e (linha pontilhada) produto simulado; (b) (□) RB 198 dados experimentais, (linha contínua) RB 198 simulado e (linha pontilhada) produto simulado.



Para ambos os corantes é observado que o modelo de transferência de massa prevê muito bem os dados experimentais de remoção de cor.

De uma forma geral os modelos matemáticos aplicados aos processos de remoção de cor de corantes com enzima livre e imobilizada foram eficientes na predição das constantes cinéticas e nos parâmetros de transferência de massa. Sendo assim é possível através da modelagem matemática prever condições não testadas experimentalmente e reduzir significativamente o número de experimentos.



## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1. Conclusões

O estudo do reúso enzimático do efluente de tingimento apresentou viabilidade para ser aplicado em indústrias têxteis, pois agregou valor ao substrato têxtil e adicionalmente foi observada uma economia de água, energia e aditivos. Nesse processo foi obtido uma menor perda de cor, uma boa solidez à lavagem, em um menor tempo de processo, utilizando pH neutro e pouca quantidade de enzima e peróxido de hidrogênio.

Nos processos têxteis atuais, geralmente os tingimentos são realizados utilizando mistura de 3 corantes. No estudo da presença de mais de um corante em solução, utilizando a enzima *Horseradish peroxidase* livre, foi observado que quando vários corantes estão presentes em solução pode ocorrer um efeito sinérgico do aumento da remoção de corante, provocada pela degradação dos corantes em diferentes velocidades.

Fatores como concentração de enzima, peróxido de hidrogênio, corante e pH influenciam fortemente em reações enzimáticas, porém o único fator que foi significativo em todos os estudos realizados foi o pH, que pode ser considerado o efeito mais importante em reações utilizando enzima.

As enzimas peroxidases livres são utilizadas para remover corantes reativos em varios trabalhos reportados na literatura, porém essas possuem algumas limitações para remover grandes quantidades de corantes. Neste estudo foi realizada uma investigação exploratória para avaliar a imobilização da HRP em alginato de cálcio e espuma de poliuretano.

Foi observado que a imobilização da HRP em alginato de cálcio foi viável para remover corantes de efluentes têxteis, podendo a cápsula ser reutilizada por até 3 vezes. Porém o processo de remoção de corantes é mais lento em relação ao utilizando a enzima livre, por isso foi proposto um modelo matemático para determinar os perfis de remoção de corante ao longo do tempo em um reator de batelada. Com esse modelo foi possível prever as constantes cinéticas e os parâmetros de transferência de massa tendo sido obtido um bom ajuste ao modelo.

Nos estudos de imobilização utilizando poliuretano foram obtidos bons índices de remoção em um pequeno tempo de reação, embora não tenha sido possível reutilizar esse polímero.

A utilização da enzima *Horseradish peroxidase* apresentou viabilidade para aplicações industriais e laboratoriais, podendo ser aplicada livre e imobilizada para remover corante de efluente têxtil e agregar valor ao substrato têxtil.

## 5.2. Sugestões para trabalhos futuros

A partir dos resultados obtidos, têm-se como sugestões para trabalhos futuros:

- Investigar o efeito de diferentes concentrações do metal cobre na remoção de corantes reativos pela HRP;
- Avaliar a influência de corantes contendo cobre sobre dicromias e tricromias de corantes de difícil degradação;
- Avaliar o mecanismo de degradação de corantes reativos e os subprodutos formados;
- Realizar varreduras espectrais antes e depois da reação, em diferentes pH, para verificar se o pH atua como indicador;
- Estudar a modificação da superfície da espuma de poliuretano para aumentar a remoção de corante;
- Analisar a imobilização de enzima em espuma de poliuretano modificado;
- Avaliar a imobilização da HRP em diferentes suportes;
- Realizar estudos avaliando DBO e DQO;
- Avaliar a toxicidade dos corantes antes e depois aos procedimentos oxidativos.

## REFERÊNCIAS

ABADULLA, E., TZANOV, T., COSTA, S., ROBRA, K., CAVACO-PAULO, A., GUBITZ, G. M. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsute*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3357-3362, 2000.

ABDEL-ATY, A; HAMED, M.B; FAHMY, A.S; MOHAMED, S. A. Comparison of the potential of *Ficus sycomorus* latex and *Horseradish peroxidases* in the decolorization of synthetic and natural dyes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v.11, p.95-102, 2013.

ABNT, “Têxteis—Ensaio de solidez da cor Parte C06: Solidez da cor à lavagem doméstica e comercial”, **ABNT Catálogo**, 2015, acessado em 03 de fevereiro de 2017, <http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=63626>.

AHMAD, B; BHATTI, I. A; BHATTI, H.N; ABBAS, M. A Study of Physico-Chemical Properties, Exhaust Dyeing of Cotton with Synthesized azo-reactive Dyes and Their Printing Applications. **International Journal of Basic & Applied Sciences**, v.12, p 137-142, 2012.

AKHTAR, S; KHAN, A. A, HUSAIN, Q Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. **Chemosphere**, v.60, p.291-301, 2005.

AL-MUFTAH, A. E; ABU-REESH, I.M. Effects of simultaneous internal and external mass transfer and product inhibition on immobilized enzyme-catalysed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 167-178, 2005.

ALEMZADEH, I; NEJATI, S. Phenols removal by immobilized *Horseradish peroxidase*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 166, p.1082–1086, 2009.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas, Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars farmacêutica**, v.39, p.23-29, 1998.

BALAMURUGAN, B.; THRUMARIMURUGAN, M.; KANNADASSAN, T. Anaerobic degradation of textile dye bath effluent using *Halomonas sp.* **Bioresource Technology** v.102 p. 6365-6369, 2011.

BANSAL, P; SUD, D. Photocatalytic Degradation of Commercial Dye, CI Reactive Red 35 in Aqueous Suspension: **Degradation Pathway and Identification of Intermediates by LC/MS**. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2013.03.018>, 2013.

- BABOROVÁ, P; MÖDER, M; BALDRIAN, P; CAJTHAMLOVÁ, K; CAJTHAML, T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. **Research in Microbiology**, v.157, p.248–253, 2006.
- BEZERRA, D. F. Análise retrospectiva e prospectiva do setor têxtil no Brasil e no nordeste. **Informe Macroeconomia, Indústria e Serviços**, n. 2, 2014.
- BILAL, M; ASGHER, M. (a) Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. **Biotechnology**, v. 15 DOI 10.1186/s12896-015-0227-8, 2015.
- BILAL, M; IQBAL, H. M. N; HUSSAIN; SHAH, S. Z; HU, H; WANG, W; ZHANG, X. (b) Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v.183, Parte 3, p.836-842, 2016.
- BILAL, M; ASGHER, M; SHAHID, M; BHATTI, H. N. (c) Characteristic features and dye degrading capability of agar–agar gel immobilized manganese peroxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.86, p.728-740, 2016.
- BRACCINI, I, PÉREZ, S. Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, p.1089–96, 2001.
- BRESSEL, T. A. B. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- BHUNIA, A., DURANI, S., WANGIKAR, P. *Horseradish Peroxidase* Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.72, p.562-567, 2002.
- CAMPOS, E. S. **Seleção e avaliação de *Pseudomonas* para descoloração de corantes têxteis por cultivo submerso**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- CARVALHO, L.S. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a avaliação de remoção de sulfanoamidas no tratamento de águas residuárias em reatores biológicos de leito fixo**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

CASIERI, L.; VARESE, G. C.; ANASTASI, A.; PRIGIONE, V.; SVOBODOVA, K.; MARCHISIO, V. P.; NOVOTNÝ, C. Decolorization and Detoxication of Reactive Industrial Dyes by Immobilized Fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus*. **Folia microbiologica**, v. 53, p.44-52, 2008.

CAVACO, P. A.; GUBITS, G.M. **Textile processing with enzymes**, p. 163, Ed CRC, 2003.

[http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological\\_Chemistry/Catalysts/Case\\_Studies/Horseradish\\_Peroxidase](http://chemwiki.ucdavis.edu/Biological_Chemistry/Catalysts/Case_Studies/Horseradish_Peroxidase). Acesso em 27de junho de 2016.

CHEN, KUO-CHENG; WU, JANE-YII; LIU; DAR-JEN; HWANG SZ-CHWUN J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v.101, p.57-68, 2003.

CIPOLATTI, E. P; MORENO-PÉREZ, S; SOUZA, L. T. A; VALÉRIO, A; GUSÁND, J. M; ARAÚJO, P. H. H; SAYER, C; NINOW, J. M; OLIVEIRA, D; PESSELA, B. C. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolsis of fish oil insolvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.122, 163–169, 2015.

CNI- **Confederação Nacional das Indústrias**. p.13, 2012. Disponível em: <[http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo\\_18/2013/09/23/4970/20131002174510609604i.pdf](http://arquivos.portaldaindustria.com.br/app/conteudo_18/2013/09/23/4970/20131002174510609604i.pdf)> Acesso em: 28 de maio de 2015.

CÓRDOBA, A; MAGARIO, I; FERREIRA, M.L. Evaluation of hematin-catalyzed Orange II degradation as a potential alternative to *Horseradish peroxidase*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 73, p. 60-72, 2012.

CRISTOVÃO, R.O; TAVARES, A.P.M; RIBEIRO, A.S; LOUREIRO, J.M; BOAVENTURA, R.A.R; MACEDO, E.A. Kinetic modelling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p.4768-4774, 2008

CRISTÓVÃO, R.O; TAVARES, A. P. P. M; FERREIRA, L.A; LOUREIRO, J.M; BOAVENTURA, R. A. R; MACEDO, E.A. Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase. **Bioresource Technology**, v.100, p.1094–1099, 2009.

CUI, C.; TAO, Y.; LI, LINGLI; CHEN, B.; TAN, T. Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.91, p. 59–66, 2013.

CIULLINI, I., GULLOTTO, A., TILLI, S., SANNIA, G., BASOSI, R., SCOZZAFAVA, A., BRIGANTI, F. Enzymatic decolorization of spent textile dyeing baths composed by mixtures of synthetic dyes and additives. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v.96, p.395-405, 2012.

DALLA-VECHIA, R; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p.623-630, 2004.

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

FRAMPTON, M. B.; ZELISKO, P. M. Chain length selectivity during the polycondensation of siloxane-containing esters and alcohols by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Enzyme & Microbial Technology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec>, 2014.

FIESP/CIESP-(**FIESP-Federação das Indústrias do Estado de São Paulo/CIESP-Centro das Indústrias do Estado de São Paulo**) (<http://www.fiesp.com.br/> [www.ciesp.com.br/](http://www.ciesp.com.br/)). Acesso em 30 de maio de 2016.

FRITZEN-GARCIA, M.B; OLIVEIRA, I. R. W. Z; ZANETTI-RAMOS, B. G; FATIBELLO-FILHO, O.; SOLDI, V.; PASA, A.A; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Carbon paste electrode modified with pine kernel peroxidase immobilized on pegylated polyurethane nanoparticles. **Sensors & Actuators B**, v.139, 570–575, 2009.

FRITZEN-GARCIA, M.B; MONTEIRO, F.F; CRISTOFOLINI, T; ACUÑA, J.J. S; ZANETTI-RAMOS, B. G; OLIVEIRA, I. R. W. Z; SOLDI, V; PASA, A. A; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Characterization of *Horseradish peroxidase* immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. **Sensors & Actuators B**, v.182 p.264– 272, 2013.

FODIL, D; JAOUADI, B; BADIS, A; NADIA, Z. J; FERRADJI, F. Z; BEJAR, S; BOUTOUMI, H. A thermostable humic acid peroxidase from *Streptomyces* sp. strain AH4: Purification and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v.111, p.383–390, 2012.

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima *Horseradish peroxidase* (HRP)**, Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.



FUENZALIDA, J. F; NAREDDY, P.K, MORENO-VILLOSLADA, I.; MOERSCHBACHER, B.M; SWAMY, M. J; PAN, S.; OSTERMEIER, M.; Goycoolea, F.M On the role of alginate structure in complexing with lysozyme and application for enzyme delivery. **Food Hydrocolloids**, v.53, p.239-248, 2016.

GHOLAMI-BORUJENI, F; MAHVI, A H; NASERI, S, FARAMARZI, M. A; NABIZADEH, R; ALIMOHAMMADI, M. Application of immobilized *Horseradish peroxidase* for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v.15, 217-222, 2011.

GOSZCZYNSKI, S; PASZCZYNSKI, A; PASTI-GRIGSBY, M. B. CRAWFORD, R. L; CRAWFORD, D. L. New Pathway for Degradation of Sulfonated Azo Dyes by Microbial Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Journal of bacteriology**, p. 1339-1347, 1994.

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

GUELLI, U. SOUZA. S.M.A; FORGIARINI, E; ULSON de SOUZA A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme *Horseradish peroxidase* (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, v.147, p.1073–1078, 2007.

**GUIA TÉCNICO AMBIENTAL DA INDÚSTRIA TÊXTIL** p.37 2014.

Disponível em: <

[http://www.feam.br/images/stories/producao\\_sustentavel/GUIAS\\_TECNICOS\\_AMBIENTAIS/guia\\_textil.pdf](http://www.feam.br/images/stories/producao_sustentavel/GUIAS_TECNICOS_AMBIENTAIS/guia_textil.pdf)>. Acesso em: 28 de maio de 2015.

GULRAJANI, M. L.; GUPTA, D. Emerging Techniques for Functional Finishing of Textiles. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 36, p. 388 – 397, 2011.

HASANBEIGI, A; PRICE, L. A technical review of emerging technologies for energy and water efficiency and pollution reduction in the textile industry. **Journal of Cleaner Production**, v.95, p.30-44, 2015.

HUNTERLAB. CIEL\*A\*B\* Color Scale. **Applications Note**. n.7, v.8, p1-4, 2008.

ITHIARA DALPONTE, MATHIAS, A. L; JORGE, R. M.M; WEINSCHTZ, R. I. Degradação fotocatalítica de tartrazina com tio2 imobilizado em esferas de

alginato. **Química Nova**, <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160141>, 2016.

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

JAISWAL, N; PANDEY, V. P; DWIVEDI, U. N. Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p.288-295, 2016.

JOHANNES, C; MAJCHERCZY, A. Laccase activity and laccase inhibitors **Journal of Biotechnology**, v.78, p.193-199, 2000.

JUNG, K.W; CHOI, B.H; HWANG, M.J; AHN, K.H. Fabrication of granular activated carbons derived from spent coffee grounds by entrapment in calcium alginate beads for adsorption of acid orange 7 and methylene blue. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2016.07.098, 2016.

KARIM, Z; ADNAN, R; HUSAIN, Q. A  $\beta$ -cyclodextrin-chitosan complex as the immobilization matrix for *Horseradish peroxidase* and its application for the removal of azo dyes from textile effluent. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.72, p.10-17, 2012.

KAWAGUTI, H. Y.; CARVALHO, P. H.; SATO, Hélia Harumi; Transformação de sacarose em isomaltulose por células livres e imobilizadas de *Serratia plymuthica*, 01/2008, **VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, v.1, p.1-3, Lorena, SP, Brasil, 2008

KHAN, Z; JAIN, K; SONI, A; MADAMWAR, D. Microaerophilic degradation of sulphonated azo dye e Reactive Red 195 by bacterial consortium AR1 through co-metabolism. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p.167-175, 2014.

KIMURA, I. Y.; SANTOS, J. D. S. Adsorção de corantes reativos vinisulfona pela quitosana reticulada: cinética e equilíbrio. In: 29<sup>a</sup> **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia, 2006.

KUBOTA, T. Desenvolvimento de materiais **poliméricos uretânicos para remoção de contaminantes**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G., DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. v.25, p. 78-82, 2002.
- LAU, YEN-YIE; WONG, YEE-SHIAN, TENG, TJOON-TOW; MORAD, N; RAFATULLAH, M; ONG, SOON-AN. Coagulation-flocculation of azo dye Acid Orange 7 with green refined laterite soil. **Chemical Engineering Journal**, v.246, p.383–390, 2014.
- LI, W.B., ZHOU, C., CAO, C.B., LI, M.S. New development of polyurethanes in medical applications. **Chinese Journal of Mechanical Engineering**, v. 30, p.130–134, 2011.
- LI, X; JIA, R; LI, P; ANG, S. Response surface analysis for enzymatic decolorization of Congo red by manganese peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.56 p.1–6, 2009.
- LIMA, Marcelo. **Fabricantes reduzem consumo de água para minimizar escassez**. IG, 11 abril 2014. Disponível em: <<http://economia.ig.com.br/empresas/industria/2014-04-11/fabricantes-reduzem-consumo-de-agua-para-minimizar-escassez.html>> Acesso em: 28 de maio de 2015.
- LIU, L; ZHANG, J; TAN, Y; JIANG, Y; HUA, M; LI, S; ZHAI, Q. Rapid decolorization of anthraquinone and triphenylmethane dye using chloroperoxidase: Catalytic mechanism, analysis of products and degradation route. **Chemical Engineering Journal**, v.244, p.9–18, 2014.
- MA, L; ZHUO, R; LIU, H; YU, D; JIANG, M; ZHANG, X; YANG, Y. Efficient decolorization and detoxification of the sulfonated azo dye Reactive Orange 16 and simulated textile wastewater containing Reactive Orange 16 by the white-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 isolated from the forest of Tzu-chin Mountain in China. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p.1– 9, 2014.
- MAIA, J, L. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo as antocianinas presentes no corante do extrato do jambo por polimerização superficial**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.
- MALANI, R. S; KHANNA, S; MOHOLKAR, V. S. Sonoenzymatic decolorization of an azo dye employing immobilized *Horseradish peroxidase* (HRP): A mechanistic study. **Journal of Hazardous Materials**, v.256-257, p.90- 97, 2013.

- MALCATA, F. X; REYES, H.R; GARCIA, H.S; HILL JR, C.G;  
AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors modification of fats and oils.  
A review. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 67, p. 890-910,  
1990.
- MATTO, M; HUSAIN. Q. Decolorization of direct dyes by salt fractionated  
turnip proteins enhanced in the presence of hydrogen peroxide and redox  
mediators. **Chemosphere**, v.69, p.338-345, 2007.
- MAYER, D. A; ULSON de SOUZA A.A; FONTANA, E; GUELLI, U.  
SOUZA. S.M.A; Kinetic study of biodegradation of BTX compounds in mono-  
and multicomponent systems in reactor with immobilized biomass. **Bioprocess  
and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 1441-1454, 2016.
- MENDES, A.A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases  
para a síntese enzimática de biodiesel**. Tese (Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química)- Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- MINUSSI, R.C; MORAES, S.G; PASTORE, G.M; DÚRAN, N.  
Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid  
medium: possible role of siderophores. **Letters in Applied Microbiology**, v.33,  
p. 21-25, 2001.
- MOHAMED, A.S; DARWISH, A. A; EL-SHISHTAWY, R. M. Immobilization  
of *Horseradish peroxidase* on activated wool. **Process Biochemistry**, v.48,  
p.649-655, 2013.
- 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.
- MONIER, M; AYAD, D.M; SARHAN, A.A. Immobilization of *Horseradish  
peroxidase* on modified chitosan beads International Journal of Biological  
**Macromolecules**, v.46, p.324-330, 2010.
- NAWAHWI, M.Z; IBRAHIM, Z; YAHYA, A. Degradation of the Azo Dye  
Reactive Red 195 by *Paenibacillus* spp. R<sub>2</sub>. **Journal of Bioremediation &  
Biodegradation**, <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6199.1000174>, 2013.
- NELSON, D. L; COX, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 3<sup>a</sup> ed.,  
Worth Publishers: New York, 2000.
- NICOLETTI, G. **Imobilização de lipase b de *candida antarctica* em espuma  
de poliuretano e aplicação na síntese do ester geranyl propionato.**

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

NICOLETTI, G; CIPOLATTI, E. P; VALÉRIO, A; CARBONERA, N. T. G; SOARES, N. S; THEILACKER, E; Ninow, J.L; OLIVEIRA, D. Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate. **Journal Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.38, p.1739–1748, 2015.

NOREEM, S; ASGHER, M; HUSSAIN, F; Iqbal. Performance improvement of Ca-alginate bead cross- linked laccase from *Trametes versicolor* IBL-04. **Bioresources**, v.11, p.558-572, 2016.

MURRY, J. M. **Química Orgânica**. 6. ed. São Paulo: Thomson, p. 906, 2005.

MUNCHEN, S; ADAIME, M. B; PERAZOLLI, L. A; AMANTÉIA, B. E; ZAGHETE, M. A. **Jeans: a relação entre aspectos científicos, tecnológicos e sociais para o Ensino de Química**. *Quím. nova esc.* v. 37, p. 172-179, 2015.

PEREIRA, L; COELHO, A.V; VIEGAS; A.C; SANTOS, M.M.C; ROBALO, M.P; MARTINS, L.O. Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase. **Journal of Biotechnology**, v.139 p.68–77, 2009.

PICCOLI, H.H. **Determinação do Comportamento Tintorial de Corantes Naturais em Substrato de Algodão**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PRAMODINI, S; POORNESH, P. Effect of conjugation length on non linear optical parameters of anthraquinone dyes investigated using He–Ne laser operating in CW mode. **Optics & Laser Technology**, v.62, p.12–19, 2014.

PREETHI, S; ANUMARY, A.; ASHOKKUMAR, M; THANIKAIVELAN, P Probing *Horseradish peroxidase* catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. **Springer Plus**, doi:10.1186/2193-1801-2-341, 2013.

QUEZADA, M.A; CARBALLEIRA, J.D; SINISTERRA, J.V. *Diplogelasinospora grovesii* IMI 171018 immobilized in polyurethane foam. An efficient biocatalyst for stereoselective reduction of ketones. **Bioresource Technology**, v.112, p.18–2, 2012.

REIS, C. Z. **Liberação controlada de substâncias ativas em tecidos de algodão por ação enzimática**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em

Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

RICHETTI, A; MUNARETTO, C.B; LERIN, L.A; BATISTELLA, L; OLIVEIRA, J. V; DALLAGO, R. M; ASTOLFI, V; LUCCIO, M. D; MAZUTTI, M.A; OLIVEIRA, D; TREICHEL, H. Immobilization of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using modified sodium alginate beads. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 383–388, 2012.

SAHASRABUSHE, M; PATHADE, G. Decolourization and degradation of C.I. Reactive Red 195 by *Georgenia* sp. **Indian Journal os Experimental Biology**, v.50, p.290-299, 2012.

SANTOS, R. **Imobilização de lipases em gel de pectina**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade Regional de Blumenau. Mestrado Interinstitucional em Química – UFSC/FURB. Florianópolis e Blumenau, 2003.

SANTOS, R.S.B. **Estudo dos fatores que influenciam os atributos de esferas de alginato**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química)- Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.

SATHISHKUMAR, P; MURUGESAN, K; PALVANNAN, T. Production of laccase from *Pleurotus florida* using agro-wastes and efficient decolorization of Reactive blue 198. *Journal of Basic Microbiology*, v.50, p.360-367, 2010.

SEGALA, Mariana. Água: a escassez na abundância. **Planeta Sustentável**. 12/2012. Disponível em:  
<http://planetasustentavel.abril.com.br/noticia/ambiente/populacao-falta-agua-recursos-hidricos-graves-problemas-economicos-politicos-723513.shtml>. Acesso 28 de maio de 2015.

SEKULJICA, N; PRLAINOVI, N. Z; STEFANOVI A. B; ZUZA, M.G; CKICKARIC, D. Z; MIJIN, D.Z; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.D. Decolorization of Anthraquinonic Dyes from Textile Effluent Using *Horseradish peroxidase*: Optimization and Kinetic Study. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/371625>, Disponível <http://www.ache.org.rs/HI/> 2015.

SHILPA, G.D; NIRANJAN, P.P; VISHWAS, B. G. ECO-FRIENDLY BIODEGRADATION OF REACTIVE YELLOW 145 BY NEWLY ISOLATED *Bacillus boroniphilus* FROM INDUSTRIAL EFFLUENT. **Journal of Environmental Research &Development**. v. 7, p. 303-311, 2012.

SHOABARGH, S., KARIMI, A., DEHGHAN, G; KHATAEE, A. A hybrid photocatalytic and enzymatic process using glucose oxidase immobilized on

TiO<sub>2</sub>/polyurethane for removal of a dye. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, p.3150-3156, 2014.

SI, J; CUI, B-K. A new fungal peroxidase with alkaline-tolerant, chloride-enhancing activity and dye decolorization capacity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.89, p.6-14, 2013.

SILVA, M. C; TORRES, J. A; SÁ, L. R. V; CHAGAS, P. M. B; FERREIRA-LEITÃO, V.S; CORREA, A. D.(a) 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.

SILVA, M.C; CORREA, A.D; AMORIM, T.S.P; PARPOT, P; TORRES, J.A; CHAGAS, P.M.B.(b) Decolorization of the phthalocyanine reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.77, p. 9-14, 2012.

SILVA, M. C; CORREA, A. D; TORRES, J. A; AMORIM, M. T. S. P. (c) Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). **Química Nova**, v.35, p. 889-894, 2012.

SILVERSTAIN, R. M.; BASSLER, G. Clayton; MORRIL, Terence C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387 p.

SINGH, R.L; SINGH, P.K; SINGH R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes-A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.104, 21-31, 2015.

SOLIS, M., SOLIS, A., PEREZ, H. I., MANJARREZ, N., FLORES, M. Microbial decolouration of azo dyes: A review. **Process Biochemistry**, v.47, p.1723-1748, 2012.

SOUSA, E.T **Quinonas no ar atmosférico: Determinação, concentrações e correlações entre as fases vapor e particulada**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

TAVARES, A. P.M; CRISTÓVÃO, R. O; LOUREIRO, J. M; BOAVENTURA, R A R; MACEDO, E A. Application of statistical experimental methodology to optimize reactive dye decolourization by commercial laccase. **Journal of Hazard Mater**, v.162, p.1255-1260, 2009.

TILLI, S; CIULLINI, I; SCOZZAFAVA, A.; BRIGANTI, F. Differential decolorization of textile dyes in mixtures and the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase activities present in extracellular extracts from *Funalia trogii*. **Enzyme & Microbial Technology**, v.49, p.465-471, 2011.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

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

VILAR, W. D. **Química e tecnologia dos poliuretanos**. 3ª Edição. Disponível em <http://www.poliuretanos.com.br>. 3a Ed., Vilar Consultoria, Rio de Janeiro. Acessado em 07 de junho de 2016.

[www.worlddyevariety.com/reactive-dyes](http://www.worlddyevariety.com/reactive-dyes), Acessado: 2 de junho de 2016.

WAN, M.M; GAO, L; CHEN, Z; WANG, Y, K; WANG, Y; ZHU, J. H. Facile synthesis of new periodic mesoporous organosilica and its performance of immobilizing *Horseradish peroxidase*. **Microporous and Mesoporous Materials**. v.155, p.24-33, 2012.

WANG, Y; CHEN, H; WANG, J; XING, L. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate–chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 49, p.1682–1690, 2014.

WANG, M; SI, T; ZHAO, H. Biocatalyst development by directed evolution. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 117-125, 2012.

WONG, Y., YU, J. Laccase-catalysed decolorization of synthetic dyes. **Water Research**, v.33, p.3512-3520, 1999.

WU, Y.; TAYLOR, K. E.; BISWAS, N., BEWTRA, J. K. Comparison of Additives in the Removal of Phenolic Compounds by Peroxidase Catalyzed Polymerization. **Water Research**, v. 31, p. 2699-2704, 1997.

WU, J. C. Y; HUTCHINGS, C. H; LINDSAY, M. J; WERNER, C. J; BUNDY, B.C. Enhanced Enzyme Stability Through Site-Directed Covalent Immobilization. **Journal of Biotechnology**, v. 193, 83–90, 2015.

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



ZILLE, A., TZANOVL, T., GÜBITZ, G.M., CAVACO-PAULO, A.  
Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent.  
**Biotechnology Letters**, v.25, p.1473-1477, 2003



## APÊNDICE A- Ficha técnica da enzima *Horseradish peroxidase*

Neste apêndice A é apresentada a ficha técnica da enzima *Horseradish peroxidase* fornecida pela Toyobo, conforme descrito no seção 3.1.3.

Figura A- Ficha técnica da enzima *Horseradish peroxidase* fornecida pela Toyobo.

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.

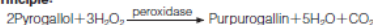
Appearance	: Reddish-brown amorphous powder, lyophilized
Activity	: Grade I 250 Purpurogallin U/mg-solid or more (-131) (RZ ≥ 3.0, salt free) Grade III 110 Purpurogallin U/mg-solid or more (-301) (RZ ≥ 2.0, containing approx. 30% of stabilizers) Grade III 180 Purpurogallin U/mg-solid or more (-302) (RZ ≥ 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 conditions 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  $\mu$  × 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 mM
Pyrogallol	40 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7.4mM

- 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 portions 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 extracting 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 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 Vail 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-Dalqoq et al.; *J.Histochem.Cytochem.*, **25**, 1201 (1977).
- M.Sato et al.; *Brain Res.*, **140**, 149 (1978).