



MARIA CRISTINA SILVA

**DEGRADAÇÃO DE CORANTES E
REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES TÊXTEIS POR
EXTRATO BRUTO DE PEROXIDASE DE NABO**

LAVRAS - MG

2011

MARIA CRISTINA SILVA

**DEGRADAÇÃO DE CORANTES E REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES
TÊXTEIS POR EXTRATO BRUTO DE PEROXIDASE DE NABO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Angelita Duarte Corrêa

LAVRAS-MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Silva, Maria Cristina.

Degradação de corantes e remediação de efluentes têxteis por extrato bruto de peroxidase de nabo / Maria Cristina Silva. – Lavras : UFLA, 2011.

135 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Angelita Duarte Corrêa.

Bibliografia.

1. Biocatálise. 2. Descontaminação ambiental. 3. Descoloração enzimática. 4. *Brassica campestris* ssp. *Rapifera*. 5. Oxidação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.23

MARIA CRISTINA SILVA

**DEGRADAÇÃO DE CORANTES E REMEDIAÇÃO DE EFLUENTES
TÊXTEIS POR EXTRATO BRUTO DE PEROXIDASE DE NABO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2011.

Dr. Matheus Puggina de Freitas UFLA

Dra. Zuy Maria Magriotis UFLA

Dra. Silvana Marcussi UFLA

Dra. Angelita Duarte Corrêa
Orientadora

LAVRAS-MG

2011

A Deus, por ser meu amparo nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Aparecida e Geraldo, pelo amor, dedicação e pelos ensinamentos que me tornaram hoje a pessoa que sou.

As minhas irmãs, Janaína e Talita, pelo incentivo e amizade.

As minhas sobrinhas, Sarah e Laura, pela continuidade.

Aos meus familiares, amigos e a todos os demais que contribuíram para a execução deste trabalho e não me deixaram desanimar. Em especial a Juliana Arriel Torres, Luciana Lopes Silva Pereira e Sheila Carvalho Martins.

A minha orientadora, Angelita, pela confiança.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Angelita Duarte Corrêa, pelo apoio e confiança.

Às bolsistas de iniciação científica e amigas Juliana Arriel Torres e Pricila M. Batista Braga, pelo indispensável auxílio durante a execução de todo o trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos, pela coorientação.

A todos do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química, em especial Luciana, Stefânia e Rafaela, pelo apoio e amizade.

Ao Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos (LGRQ) da UFLA, pela recuperação do solvente utilizado nos ensaios.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Química, em especial a Xulita, Cidinha (que sempre cuida pra deixar o laboratório limpinho) e Shirley.

À professora Dra. Maria Teresa Pessoa Sousa de Amorim (Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho, Guimarães, Portugal), pela orientação e por ter me acolhido com tanto carinho em Portugal.

Ao professor Dr. Píer Parpot (Departamento de Química da Universidade do Minho, Guimarães, Portugal), pela orientação nas análises cromatográficas.

Aos amigos do Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho, em Portugal: Emília, Anabela, Sara, Heri, Ana Paula, Clara, Fernando, Hiná, incluindo, claro, a Kaká e o Thiago, pela amizade, incentivo e por tornar a saudade de casa mais amena.

À Engenheira Virgínia Pinto, responsável pelo Laboratório de Investigação de Química e Ambiente do Departamento de Engenharia Têxtil – Universidade do Minho, pela colaboração e acolhida.

As minhas amigas e companheiras de república Sheila e Clarissa, pelo apoio e por me entenderem nos momentos de estresse, desde as provas das disciplinas obrigatórias até a redação da tese.

Finalmente, à Capes, pela bolsa de estudos no exterior e à Capes e à Fapemig, pela bolsa de estudos no Brasil.

RESUMO GERAL

Os corantes têxteis são misturas de compostos com estrutura molecular complexa e de difícil biodegradação. Quando não tratados adequadamente, e lançados em águas residuárias, podem modificar o ecossistema, diminuindo a transparência da água e a penetração da radiação solar. A utilização de peroxidases na remoção de corantes em meio aquoso tem se mostrado uma alternativa promissora. Neste trabalho, a obtenção da enzima peroxidase de várias fontes vegetais, nabo, abobrinha, jiló e batata-doce, foi estudada. Como a peroxidase do nabo (PEN) se destacou com a melhor atividade enzimática, as melhores condições de extração desta enzima foram padronizadas e o seu potencial na descoloração de corantes têxteis foi avaliado. A peroxidase do nabo foi extraída em tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5 contendo NaCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, na proporção 1:4 (m/v). O extrato obtido foi precipitado com acetona 65% (v/v), sendo este solvente destilado e posteriormente reaproveitado no processo. O pó cetônico foi ressuspensão no tampão de extração e utilizado como fonte enzimática. Para os ensaios de descoloração, a enzima foi colocada em contato com os corantes estudados e a porcentagem de remoção da cor foi avaliada. A PEN se mostrou eficiente na remoção de cinco importantes corantes industriais, entre eles o corante reativo turqueza remazol G 133% (CTR). Entretanto, a eficiência deste catalisador se mostrou dependente do pH, das concentrações de enzima, substrato e de H_2O_2 utilizadas. Quando comparada à enzima comercial *Horsehadish peroxidase*, a PEN apresentou potencial de degradação superior para o corante CTR. A presença de auxiliares químicos geralmente utilizados nos banhos de tingimento influenciou de forma negativa a descoloração enzimática. Além disso, os resultados obtidos revelaram que a velocidade da reação e a taxa de descoloração dependem da estrutura do corante e da posição de seus grupos substituintes. Análises por HPLC/MS com fonte de ionização *electrospray* no modo ESI^+ foram realizadas para avaliar os produtos de oxidação do CTR pela PEN, confirmando a ruptura do grupo cromóforo pela PEN e um mecanismo de oxidação foi proposto. O CTR submetido ao tratamento enzimático apresentou toxicidade elevada quando testado sobre sementes de alface e comparado ao CTR não tratado, necessitando, portanto, da combinação de outros métodos biológicos, para uma possível degradação total dos produtos. O tratamento enzimático poderia ser empregado como tratamento primário, reduzindo a carga de corantes para o sistema de tratamento biológico, para que águas residuárias possam ser reutilizadas e recirculadas para o processo produtivo.

Palavras-chave: Biocatálise. Peroxidase. Descoloração. Corantes têxteis. Nabo (*Brassica campestris ssp. Rapifera*).

GENERAL ABSTRACT

Textile dyes are mixtures of compounds with complex molecular structure and of hard biodegradation. When not treated adequately and thrown into wastewaters, they can modify the ecosystem, decreasing both water transparency and the penetration of the solar radiation. Use of peroxidases in removing dyes in aqueous medium, has proved a promising alternative. In this work, the obtaining the enzyme peroxidase from various plant sources, turnip, radish, zucchini, eggplant, sweet potato, was studied. As the turnip peroxidase stood out with greater enzymatic activity, optimum conditions for extraction of this enzyme have been standardized, and the potential indecolorization of textile dyes was evaluated.

Turnip peroxidase was extracted in 0.05 mol L^{-1} sodium phosphate buffer pH 6.5 containing $\text{NaCl } 0.2 \text{ mol L}^{-1}$, in proportion 1:4 (v/v). The extract obtained was precipitated with 65% (v/v) acetone, if this solvent is distilled, and later re-utilized in the process. The ketonic powder was re-suspended in the extraction buffer and used as an enzyme source. For the discoloration assays, the enzyme was put into contact with the investigated dyes and the percentage of color removal was evaluated. PEN proved efficient in removing five important industrial dyes, among them the reactive dye remazol turquoise G 133% (CTR). Nevertheless, the efficiency of this catalyzer proved independent of pH, of the enzyme concentrations, substrate and of H_2O_2 utilized. The presence of chemical auxiliaries generally utilized in the dyeing baths influenced in a negative way in the enzymatic discoloration. In addition, the results obtained revealed that both velocity of reaction and discoloration rate depend upon the day structure and position of its substituent groups. Analyses by HPLC/MS with a source of *electrospray* ionization in the ESI^+ mode were carried out to evaluate the oxidation products of the CTR by PEN confirming the rupture of the chromophore group by HRP and an oxidation mechanism was proposed. The CTR submitted to the enzymatic treatment presented high toxicity when compared with the untreated CTR, therefore requiring the combination of other biological methods, for possible total degradation products. The enzymatic treatment could be employed as a primary treatment, reducing the load of the dyes to the biological treatment system, either applied directly in removing the color of the dyeing baths, for it to be able to reutilized and recirculated for the productive process.

Key words: Biocatalysis. Peroxidase. Decolorization. Textile dyes. Turnip (*Brassica campestris ssp. Rapifera*).

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|----|
| | CAPÍTULO 1: Introdução Geral..... | 12 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 | Indústria têxtil e meio ambiente..... | 16 |
| 2.2 | Corantes..... | 19 |
| 2.3 | Remoção da cor em efluentes industriais..... | 23 |
| 2.4 | Uso de enzimas na descoloração de corantes têxteis..... | 25 |
| 2.5 | Peroxidasas..... | 28 |
| 2.6 | Vegetais utilizados como fonte de peroxidase..... | 31 |
| | REFERÊNCIAS..... | 34 |
| | CAPÍTULO 2: Obtenção de peroxidase vegetal e seu potencial na descoloração do corante têxtil reativo turqueza remazol G 133%..... | 41 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 44 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| 2.1 | Vegetais, enzima comercial e corante..... | 47 |
| 2.2 | Análise estatística..... | 47 |
| 2.3 | Obtenção do extrato bruto enzimático..... | 48 |
| 2.4 | Determinação da atividade enzimática..... | 48 |
| 2.5 | Influência de aditivos na atividade enzimática..... | 49 |
| 2.6 | Influência do pH na atividade enzimática e estabilidade térmica..... | 49 |
| 2.7 | Precipitação das proteínas..... | 50 |
| 2.7.1 | Precipitação por acetona..... | 50 |
| 2.7.2 | Precipitação por sulfato de amônio..... | 50 |
| 2.8 | Ensaio de descoloração do CTR..... | 51 |
| 2.9 | Efeito da adsorção do corante pelo extrato enzimático..... | 52 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 53 |
| 3.1 | Seleção de uma fonte vegetal rica em peroxidase com alta atividade..... | 53 |
| 3.2 | Influência de aditivos na atividade da peroxidase | 54 |
| 3.3 | Influência do pH na atividade enzimática e estabilidade térmica..... | 55 |
| 3.4 | Precipitação das proteínas..... | 58 |
| 3.5 | Ensaio de descoloração do CTR..... | 58 |
| 3.5.1 | Tempo de contato com a enzima..... | 59 |
| 3.5.2 | Efeito da concentração de H₂O₂..... | 60 |
| 3.5.3 | Efeito da concentração da enzima..... | 63 |
| 3.5.4 | Efeito da concentração do corante..... | 65 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.6 | Descoloração enzimática do corante turqueza remazol G 133% catalisada por HPR e PEN | 66 |
| 3.7 | Efeito da adsorção do corante pelo extrato enzimático..... | 68 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 69 |
| | REFERÊNCIAS | 70 |
| | CAPÍTULO 3: Estudo dos produtos da degradação enzimática do corante turqueza remazol g 133% por peroxidase de nabo (Brassica campestre ssp. Rapifera)..... | 74 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 77 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 80 |
| 2.1 | Corante..... | 80 |
| 2.2 | Obtenção do extrato enzimático..... | 80 |
| 2.3 | Determinação da atividade enzimática..... | 81 |
| 2.4 | Ensaio de descoloração do CTR..... | 81 |
| 2.5 | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com modo de ionização electrospray..... | 82 |
| 2.6 | Toxicidade | 82 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 84 |
| 3.1 | Ensaio de descoloração com CTR..... | 84 |
| 3.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com modo de ionização electrospray..... | 84 |
| 3.3 | Toxicidade..... | 91 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 94 |
| | REFERÊNCIAS..... | 95 |
| | CAPÍTULO 4: Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo..... | 98 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 101 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 103 |
| 2.1 | Corantes..... | 103 |
| 2.2 | Obtenção do extrato enzimático..... | 105 |
| 2.3 | Determinação da atividade enzimática..... | 105 |
| 2.4 | Ensaio de descoloração..... | 106 |
| 2.4.1 | Corantes isolados..... | 106 |
| 2.4.2 | Corantes hidrolisados..... | 107 |
| 2.4.3 | Efluentes sintéticos | 107 |
| 2.4.4 | Mistura de corantes..... | 109 |
| 2.5 | Demanda química de oxigênio..... | 109 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 110 |
| 3.1 | Ensaio de descoloração com CTR..... | 110 |
| 3.1.1 | Corantes isolados..... | 110 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 3.1.2 | Corantes hidrolisados..... | 117 |
| 3.1.3 | Efluentes sintéticos..... | 119 |
| 3.1.4 | Mistura de corantes..... | 123 |
| 3.2 | Demanda química de oxigênio..... | 125 |
| 4 | CONCLUSÃO..... | 128 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 129 |
| | REFERÊNCIAS..... | 131 |
| | ANEXOS..... | 134 |

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos tem aumentado de forma alarmante, como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Neste contexto, o setor têxtil apresenta destaque, uma vez que o efluente gerado pela indústria têxtil é classificado como o mais poluidor entre todos os setores industriais.

Os processos têxteis são grandes consumidores de água e de corantes sintéticos, geradores de efluentes com intensa coloração e ricos em compostos orgânicos, aliado ao teor de sais inorgânicos. Estima-se que aproximadamente 20% da carga de corantes seja perdida nos resíduos de tingimento durante o processamento têxtil, enquanto, para os corantes reativos, até 50% da concentração inicial do corante é descarregada no banho de tingimento (AZMI; BANERJEE, 2001).

A quantidade exata de corantes produzidos e de corantes despejados no meio ambiente é desconhecida, mas estima-se uma produção mundial de 10.000 t/ano, enquanto as perdas são de 1% a 2% na produção e de 1% a 10% na aplicação (FORGACS; CSERHÁTI; OROS, 2004). Uma pequena quantidade de corante (10 a 50 mg L⁻¹) é bastante visível e afeta a estética, a transparência e a solubilidade de gases em corpos aquáticos (SPONZA; ISIK, 2004).

A cor no efluente, além do aspecto estético, impede a fotossíntese e modifica o regime de solubilidade dos gases, prejudicando tanto a flora como a fauna aquática. Dentre os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade das águas, a cor é o mais facilmente detectado.

Vários métodos físicos e químicos, incluindo adsorção, coagulação, precipitação, filtração e oxidação, são empregados para o tratamento de efluentes contaminados. Estes métodos, no entanto, podem gerar uma quantidade significativa de lodos que podem facilmente causar poluição devido

ao excessivo uso de produtos químicos. Além disso, esse tipo de processo tem custo elevado e nem sempre é eficiente no tratamento de efluentes que apresentam corantes em sua composição. A utilização de enzimas provenientes de microorganismos ou plantas no tratamento de efluentes e na remoção de poluentes orgânicos mostra-se uma alternativa promissora devido ao seu apelo ecológico. Empregados como tratamento primário, os processos enzimáticos atuam reduzindo a carga para o sistema de tratamento biológico, enquanto, como tratamento terciário, removeriam os compostos biorrefratários.

Vantagens potenciais dos processos enzimáticos sobre os tratamentos convencionais são: custo reduzido de implementação e operação; operação ao nível traços de compostos orgânicos, ou sobre compostos não removidos por processos físico-químicos existentes; redução no consumo de agentes oxidantes e ausência de materiais adsorventes para serem dispostos (NICELL et al., 1992).

A utilização de processos enzimáticos na descoloração de corantes têxteis consiste na identificação e caracterização de enzimas com potencial de degradação dos mesmos. As peroxidases são enzimas que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio, enquanto um doador de elétrons é oxidado. A baixa especificidade destas enzimas facultam a sua atuação em um amplo espectro de substratos, e possibilitam a sua aplicação em uma gama de transformações de interesse com vantagens tecnológicas, econômicas e ambientais. Dentre as aplicações da peroxidase, destaca-se a sua utilização na remoção de poluentes orgânicos, incluindo corantes têxteis, sendo, portanto, aplicadas em processos de descoloração e tratamento de efluentes.

A fonte comercial mais utilizada de peroxidase é a raiz forte (horseradish peroxidase), geralmente cultivada e colhida em países de clima frio e em pequena escala de produção. A disponibilidade limitada da planta eleva os custos de produção da enzima e inviabilizam economicamente a sua utilização no tratamento de efluentes líquidos para remover compostos recalcitrantes.

Portanto, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima e por processos de obtenção de baixo custo que possibilitem a sua utilização como biocatalisador ambiental.

Em contrapartida, o Brasil, um país tropical, possui uma enorme variedade de frutas e vegetais, sendo a maioria com produção de relativamente baixo custo e facilmente encontrada em todo o território nacional. Essas frutas e vegetais são fontes inesgotáveis de enzimas que podem ser utilizadas *in natura* ou como extrato bruto, obtido por procedimentos simples de extração.

Este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: (1) obter novas fontes de peroxidase vegetal por processo simples e de baixo custo; (2) caracterizar a enzima obtida quanto às condições ótimas de pH, temperatura e estabilidade, parâmetros importantes para avaliar a capacidade de aplicação da enzima em processos industriais; (3) avaliar a viabilidade de utilização da enzima na descoloração de corantes têxteis e efluentes sintéticos simulados; (4) identificar os produtos formados durante a oxidação enzimática e avaliar a toxicidade dos mesmos e (5) sugerir opções quando o tratamento de efluentes têxteis proposto aumentar a toxicidade da molécula do corantes após aplicação do mesmo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Indústria têxtil e meio ambiente

A indústria têxtil tem papel muito importante na maioria dos países, sendo um dos segmentos industriais de maior tradição, responsável pela maior parte da economia dos países desenvolvidos e carro-chefe nos países emergentes.

No Brasil, a indústria têxtil destaca-se entre os 24 setores mais importantes da atividade industrial, ocupando os primeiros lugares em empregos diretos e em faturamento (CONCHON, 1999). Das cerca de 5.000 indústrias existentes, 11% correspondem a empresas de grande porte, 21% a indústrias de pequeno e médio porte e 68% a microempresas. Embora as tecnologias entre as pequenas e grandes indústrias sejam muito diferentes, todas têm em comum a particularidade de utilizar muita água, o que faz com que o setor têxtil seja responsável por 15% do consumo industrial de água (KUNZ et al., 2002).

A água é usada na indústria têxtil como meio de transporte para os produtos químicos que entram no processo, bem como para a remoção do excesso daqueles produtos considerados indesejáveis para o substrato têxtil. A maior parte da carga contaminante dos efluentes aquosos contém impurezas inerentes à matéria prima, tais como os produtos adicionados para facilitar os processos de fiação e tecelagem, produtos químicos auxiliares e corantes eliminados durante as diferentes etapas do acabamento (TWARDOKUS, 2004).

O processo têxtil de produção de tecidos é dividido em fiação, tecelagem e beneficiamento. O processo de fiação compreende a produção de fios a partir de fibras naturais ou não naturais, sendo o algodão a matéria prima mais frequente no Brasil. Nesta etapa não há geração de efluentes líquidos, pois todas as etapas ocorrem a seco. Na etapa de tecelagem, os fios tingidos ou crus são

transformados em tecidos nos teares. O beneficiamento abrange todas as etapas de transformação do tecido quanto à aparência, à capacidade de absorção de água e ao aumento da resistência, entre outras (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996; BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Os estágios de formação do tecido pouco contribuem para a geração de efluentes líquidos, quando comparados às operações do estágio de processos molhados ou acabamento. Essas operações podem ser divididas, de acordo com Forgiarini (2006), em:

- a) tratamento prévio ou preparação: é um conjunto de operações necessárias para preparar o material têxtil a ser tingido, estampado ou receber um dado acabamento. Essas operações são por vezes designadas apenas por alveijamento;
- b) tingimento: operação de coloração uniforme do material têxtil;
- c) estamparia: aplicação de um desenho colorido no material têxtil;
- d) acabamento propriamente dito: efetuado sobre o tecido alvejado, tingido ou estampado, conforme o caso, de forma a torná-lo mais adequado para sua utilização.

Durante o processo de tingimento, três etapas são consideradas importantes: a montagem, a fixação e o tratamento final (ALCÂNTARA; DALTIM, 1996). Entretanto, todo processo de tintura envolve como operação final uma etapa de lavagem em banhos correntes para a retirada do excesso de corante original ou corante hidrolisado não fixado à fibra nas etapas precedentes.

Quando não tratados adequadamente, e lançados em águas naturais, os efluentes provenientes da indústria de corantes ou de processos envolvendo tingimento de fibras têxteis podem modificar o ecossistema, diminuindo a transparência da água e a penetração da radiação solar, o que pode modificar a atividade fotossintética e o regime de solubilidade dos gases (ZANONI; CARNEIRO, 2001). São considerados de alto poder tóxico para a biota aquática,

uma vez que podem causar eutrofização das águas, alterações na demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e no oxigênio dissolvido, redução da fotossíntese e apresentar diferentes graus de toxicidade, mutagênese e carcinogênese (RODRIGUES, 2003).

Os efluentes têxteis geralmente apresentam elevados níveis de coloração e, além do aspecto estético, os corantes sem o tratamento adequado podem persistir no ambiente por longos períodos. São deletérios não apenas para os processos fotossintéticos de plantas aquáticas, mas também para todos os organismos vivos, desde que a degradação destes pode levar a substâncias carcinogênicas (HAO; KIM; CHIANG , 2000; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

Além disso, a biotransformação de corantes contendo a função azo-aromático como cromóforo, os quais constituem o maior grupo de corantes orgânicos produzidos mundialmente, pode ser responsável pela formação de intermediários com reconhecido efeito carcinogênico e mutagênico (NAM; RENGANATHAN; TRATNYEK, 2001; PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

Outro grupo de corantes que merece destaque é o dos corantes reativos e/ou grupos cromóforos di-azo portadores de grupos sulfonados. Embora a alta solubilidade desse tipo de corante minimize a absorção no organismo, esses corantes são elaborados para reagirem eficientemente com substâncias portadoras de grupos aminas e hidroxilas, presentes nas fibras naturais, mas também presentes nos organismos vivos (proteínas, enzimas, etc.) (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Normalmente, a água é classificada segundo a sua cor verdadeira ou aparente (APHA, 1995). A cor verdadeira é determinada com a retirada dos sólidos suspensos ou turbidez da amostra. Para a cor aparente, a amostra não sofre nenhum tipo de tratamento. Os efluentes industriais apresentam

características bastante variáveis quanto aos tons e às concentrações de espécies que conferem cor ao efluente, o que torna bastante difícil quantificar a cor de um efluente industrial.

Para o monitoramento da eficiência de tratamentos, quando se trata de redução de cor, geralmente utiliza-se a análise do espectro de absorção de luz no visível da amostra pesquisada (MARMAGNE, 1996).

A resolução do CONAMA nº 357/05, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, não fixa valores máximos para o parâmetro de cor, mas estabelece que o lançamento não poderá modificar a característica original do corpo receptor, ou seja, visualmente não pode haver alteração (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2005). Entretanto, a níveis não detectáveis a olho nu (virtualmente ausentes), o problema pode ser mais sério, envolvendo acumulação, biodisponibilidade, etc., colocando em risco o equilíbrio aquático, bem como a saúde e o bem-estar humano, com a deterioração da qualidade das águas (GUARATINI; ZANONI, 2000).

2.2 Corantes

Os corantes são substâncias intensamente empregadas para a coloração de vários substratos, tais como alimentos, cosméticos, plásticos e substratos têxteis. São retidos por adsorção física, formação de soluções, sais ou complexos com metais, retenção mecânica ou por constituição de pontes químicas covalentes (ROSALEN et al., 2004).

Corantes compreendem três componentes principais: (a) o grupo cromóforo responsável pela cor, geralmente grupos retiradores de elétrons, cujos mais importantes são: C=C-, -C=N-, -C=O, -N=N-, -NO₂ e - NO; (b) grupos

auxocromos que intensificam a cor e proporcionam qualidades tintoriais, como os grupos amino, amino substituídos, carboxílicos, hidroxílicos e (c) grupos solubilizantes responsáveis pela solubilidade, substantividade e lavabilidade, como grupos sulfônicos e aminas quaternárias (TWARDOKUS, 2004; ZILLE, 2005).

Segundo Guaratini e Zanoni (2000), os corantes são classificados de acordo com sua estrutura química ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado na fibra têxtil.

A forma de fixação da molécula do corante às fibras têxteis é feita em solução aquosa e pode envolver, basicamente, quatro tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e covalentes (GUARANTINI; ZANONI, 2000).

Baseado na estrutura química ou cromóforo, cerca de 20 a 30 diferentes grupos de corantes podem ser identificados. Corantes azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antraquinona, ftalocianina e triarilmetano são quantitativamente os grupos cromóforos principais (ZILLE, 2005).

Na indústria têxtil, a classificação mais adotada é quanto ao modo de fixação. O Color Index (CI) é um catálogo editado desde 1924 pela Society of Dyers and Colourists e pela American Association of Textile Chemists and Colorists. A última edição do Color Index lista aproximadamente 13.000 diferentes corantes, sendo atribuído a cada um deles um nome genérico CI, determinado de acordo com sua aplicação e cor (ZILLE, 2005). Na Figura 1 estão apresentadas as estruturas químicas de alguns grupos cromóforos.

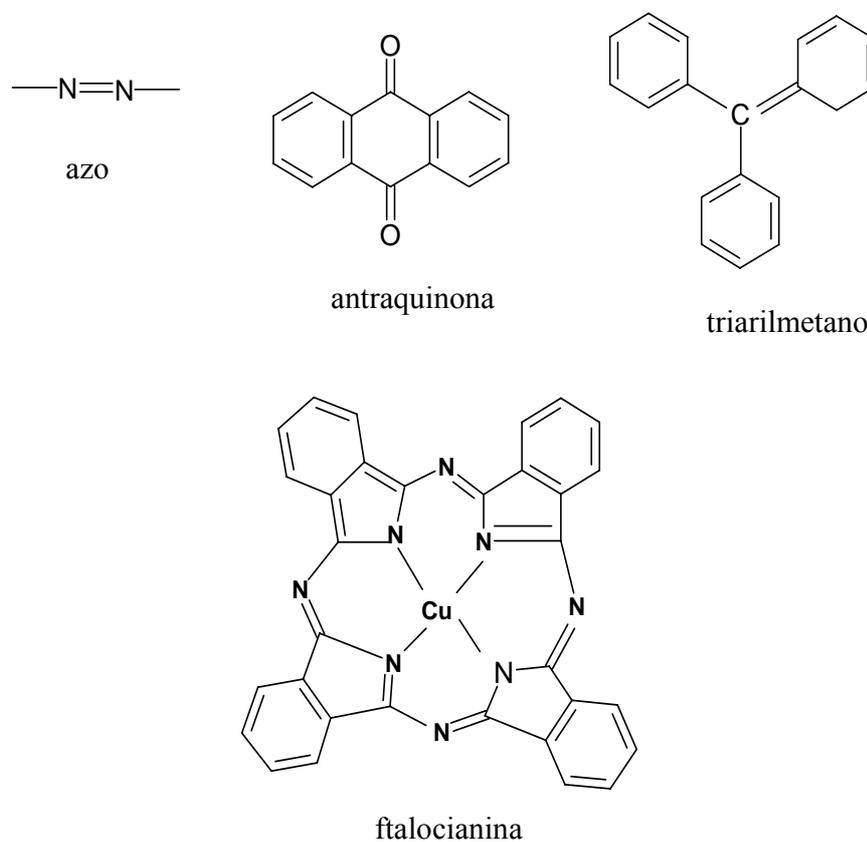


Figura1 Estruturas químicas dos grupos cromóforos mais importantes
Fonte: Adaptado de Zille (2005)

Alguns dos grupos de corantes mais utilizados na indústria têxtil, classificados quanto ao modo de fixação à fibra e à aplicação, são descritos na Tabela 1. Dentre estas classes, os corantes reativos constituem a classe mais importante, representando de 20% a 30% dos corantes mais utilizados na atualidade (O'NEILL et al., 1999).

Tabela 1 Principais classes de corantes têxteis classificados em relação ao modo de fixação à fibra e à aplicação

| Classes de corantes | Características |
|----------------------------|---|
| Ácidos | Alta solubilidade em água devido à presença de grupos ácidos sulfônicos, aplicação em fibras proteicas e em fibras de poliamidas sintéticas (lã, seda e náilon). Ligam-se à fibra por meio de troca iônica envolvendo um par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilatos das fibras proteicas, na forma não protonada. Interações de Van der Waals e de hidrogênio também podem ser formadas. As estruturas mais comuns são azo, antraquinona e triarilmetano. |
| Reativos | Alta solubilidade em água e o estabelecimento de ligações covalentes com grupos OH, -NH ou -SH em algodão, lã, seda e náilon. O problema de efluentes coloridos associados ao uso desses corantes deve-se à hidrólise dos grupos reativos que ocorre durante o processo de tingimento têxtil. As estruturas mais comuns são azo, antraquinona e ftalocianina |
| Diretos | Solúveis em água e capazes de tingir fibras de celulose por meio de interações de Van der Waals. Apenas 30% das 1.600 estruturas ainda estão em uso, devido à sua falta de solidez durante a lavagem. As estruturas mais comuns são quase sempre corantes azo sulfonados. |
| A cuba | Praticamente insolúveis em água, entretanto, durante o processo de tingimento, são reduzidos, tornando-se solúveis e posteriormente oxidados, regenerando a forma original do corante sobre a fibra. As estruturas mais comuns são antraquinonas e indigoides. |
| Corantes de enxofre | Compostos macromoleculares com pontes dissulfeto, altamente insolúveis. Representam 15% da produção global de corantes. Tingimento (principalmente em fibras celulósicas) envolve processos de redução e oxidação. |

Fonte: (CHRISTIE, 2001; GUARANTINI; ZANONI, 2000).

2.3 Remoção da cor em efluentes industriais

Compostos recalcitrantes ou refratários são aqueles que não são biodegradados pelos organismos normalmente presentes em sistemas biológicos de tratamento, nos tempos usuais de retenção hidráulica aplicados, sendo, então, lançados nos corpos aquáticos receptores (ALMEIDA et al., 2004). A recalcitrância de certas substâncias constitui um dos maiores problemas em águas residuárias.

O processo de tratamento pode ser dividido em quatro grupos: processos de separação (concentração de compostos orgânicos sem alteração química), processos de degradação (processos oxidativos que têm a intenção de mineralizar os compostos orgânicos para a forma de CO₂ e água), processos que modificam quimicamente os constituintes do efluente, mas não levam à mineralização (processos de redução, como por exemplo, a desalogenação) e a preparação do efluente pela adição de certos compostos químicos para tratamento subsequente por degradação ou separação, quebra de emulsões, floculação, precipitação ou ajuste de pH (RODRIGUES, 2003).

No que diz respeito ao tratamento de efluentes coloridos, a diversidade estrutural dos corantes proporciona uma grande variedade de cores, dificultando, entretanto, a utilização de um único método no tratamento desses efluentes (FERREIRA LEITÃO, 2000).

Atualmente, vários métodos podem ser utilizados na remoção de corantes em efluentes industriais. Estes métodos podem ser distribuídos em três categorias, que são químicos, físicos e biológicos.

Os métodos químicos compreendem, entre outros, reação de Fenton, ozonação, processos fotoquímicos e destruição eletroquímica. Os mais utilizados são processos oxidativos, em decorrência de sua simplicidade de aplicação. A

oxidação química remove a cor de efluentes como resultado da quebra das ligações aromáticas das moléculas de corantes.

Alguns processos oxidativos que utilizam compostos com um potencial de oxidação (E_0) maior que o oxigênio (1,23 V), como o peróxido de hidrogênio ($E_0 = 1,78$ V), ozônio ($E_0 = 2,07$ V) e o radical hidroxil ($E_0 = 2,28$ V), são frequentemente de custo elevado e a acumulação de lodo concentrado gera um problema de disposição (ROBINSON et al., 2001).

Os principais processos físicos empregados são coagulação/floculação, adsorção e filtração por membranas. Entretanto, essas tecnologias somente transferem o corante de fase, não resolvendo essencialmente o problema (ARAÚJO; YOKOYAMA, 2006).

Dentre os métodos biológicos, o mais utilizado é o sistema de lodos ativados, o qual consiste na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e ar, durante um tempo necessário para metabolizar e flocular grande parte da matéria orgânica (KUNZ et al., 2002). O tratamento biológico inclui, habitualmente, processos aeróbios que, em relação à remoção de cor, são ineficazes para uma enorme variedade de corantes.

Das diversas tecnologias atualmente utilizadas na descoloração de efluentes têxteis, cada uma apresenta sua própria restrição em termos de custo, viabilidade, funcionalidade, impacto ambiental, geração de lodo, necessidade de pré-tratamento, teor de produtos orgânicos removidos e geração de intermediários potencialmente tóxicos. A escolha do processo depende de aspectos econômicos, fatores operacionais, como dosagens de produtos químicos, eficiência desejada, quantidade de lodo produzida, grau de inibição ou de substâncias recalcitrantes presentes e da classe de corantes a ser tratada (BELTRAME, 2006).

Geralmente, tratamentos que apenas transferem os poluentes de fase ou que contribuem para a formação de compostos tóxicos (que não podem ser removidos por combinação com outros processos) não são interessantes.

2.4 Uso de enzimas na descoloração de corantes têxteis

A implementação de normas cada vez mais rigorosas em relação ao descarte de resíduos no meio ambiente exige o desenvolvimento de processos alternativos e de alta eficiência.

A biocatálise é a aplicação de enzimas livres ou de células íntegras como agentes catalisadores (BEILEN; LI, 2002). Cada vez mais é reconhecido o uso das enzimas em processos de remediação para tratamento de poluentes específicos. Estas podem atuar em compostos recalcitrantes, para removê-los por precipitação ou transformação em outros produtos inócuos (DURÁN; ESPOSITO, 2000). Podem também mudar as características de um determinado rejeito para torná-lo mais receptivo ao tratamento, ou auxiliar na bioconversão dos rejeitos em produtos de maior valor agregado (KARAM; NICELL, 1997).

A ação catalítica das enzimas é extremamente eficiente e seletiva, quando comparada aos catalisadores químicos convencionais. As potenciais vantagens do tratamento enzimático, quando comparado a tratamentos convencionais, incluem: aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em concentrações altas e baixas dos contaminantes, atuação num amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, a não necessidade de aclimatização de biomassa e o fácil processo de controle (DURÁN; ESPOSITO, 2000).

As principais oxirredutases, lacases e peroxidases apresentam potencial no tratamento de uma variedade de compostos coloridos (AKHTAR et al., 2005; BHUNIA; DURANI; WANGIKAR, 2001; YANG et al., 2003) e seu uso pode ser uma prática interessante para a descoloração de corantes sintéticos.

Peroxidases podem catalisar a transformação/degradação de corantes aromáticos, tanto por precipitação como pela ruptura do anel aromático (HUSSAIN, 2009).

Vários estudos foram realizados utilizando peroxidases de plantas na descoloração de corantes. A planta mais relatada na literatura é a raiz-forte (horshadish peroxidase - HPR).

Diversos relatos na literatura apontam o uso da horshadish peroxidase na remoção de diversos corantes: (1) Bhunia, Durani e Wangikar (2001) demonstraram que a HRP pode ser efetiva degradando e precipitando importantes azo corantes industriais; (2) Ferreira Leitão, Silva e Bon (2003) estudaram a degradação do corante azul de metileno pela HRP e, nesse trabalho, apenas 4,7% do corante permaneceu em solução, para uma proporção de corante/H₂O₂ de 1:10; (3) Mohan et al. (2005) obtiveram 79% de degradação do corante “acid black” com a peroxidase de raiz forte (HRP) imobilizada em gel de acrilamida e 67% com a enzima livre e (4) Ulson de Souza, Forgiarini e Ulson de Souza (2007) investigaram o potencial de descoloração de corantes têxteis e seus efluentes, tendo os resultados indicados que a descoloração dos corantes tratados, turqueza remazol G 133% e azul lanaset 2R, foi de 59% e 94%, respectivamente, enquanto a descoloração do efluente têxtil foi de 52%.

No entanto, outras peroxidases de plantas vêm sendo empregadas na remediação de corantes comerciais. Na Tabela 2 estão sumarizados os potenciais de descoloração de algumas peroxidases de plantas.

Tabela 2 Descoloração de corantes por peroxidases de plantas

| Fonte | Corante/efluente | Observações experimentais | Referência |
|--------------------------|--|--|--|
| Horsehadish (raiz forte) | Turqueza remazol blue G, azul lanaset 2R | A descoloração do turqueza remazol G133% foi de 59% e 94% para o azul lanaset 2R; para o efluente têxtil, a descoloração foi 52%. | Ulson de Souza, Forgiarini e Ulson de Souza (2007) |
| | Preto ácido 10 BX | A remoção da cor foi dependente do tempo de reação, do pH e da concentração de enzima, corante e H ₂ O ₂ . | Mohan et al. (2005) |
| | Amarelo Direto 12 | Direct yellow 12 foi removido por HPR ¹ , a oxidação aumentou com aumento das concentrações de corante, enzima e H ₂ O ₂ em pH 4,0. | Maddhinni, Vurimindi e Yerramilli (2006) |
| | Laranja II | Aproximadamente 90% de degradação por um período de 36 horas. | Shim et al. (2007) |
| Nabo | Cinco corantes ácidos | A descoloração dos corantes foi máxima (62% a 100%) na presença de 2,0 mM HOBT ² em pH 5,0 a 40°C. | Kulshrestha e Husain (2007) |
| | Corantes diretos | A descoloração de corantes diretos foi máxima na presença de 0,6 mM de mediador redox em pH 5,5 a 30°C | Matto e Husain (2007) |

Tabela 2, Continuação

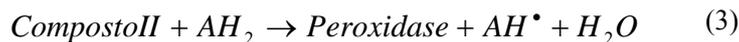
| Fonte | Corante/Efluente | Observações experimentais | Referência |
|--------------------------------|---|--|------------------------|
| White radish (rabanete branco) | Reactive red 120 Reactive blue 171 | Descoloração máxima de 56% a 81% em pH 5,0 e 40°C, em 1 hora, na presença de 1,0 mM de HOBT. | Satar e Husain (2009) |
| Horsehadish/soja | Direct yellow 11 | 48% de descoloração em 90 minutos | Knutson et al. (2005) |
| <i>Saccharum uvarum</i> | Procion navy blue HER Procion brilliant Blue H-7G Procion green HE-4BD e Supranol green | Os corantes (50 mg L ⁻¹) foram completamente degradados em 8 horas. | Shaffiqu et al. (2002) |

Fonte: Adaptado de Hussain (2009)

¹horsehadish peroxidase; ²1-hidroxibenzotriol

2.5 Peroxidases

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7, doador H₂O₂ oxidorreductase) são enzimas que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou outro peróxido orgânico, enquanto um doador de elétrons (AH₂) é oxidado. A reação ocorre em múltiplas etapas, como mostrado a seguir.



No primeiro estágio do processo catalítico ocorre a reação do sítio ativo com o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é reduzido produzindo água e a enzima é oxidada formando o composto I, uma forma intermediária reativa que apresenta um estado de oxidação mais alto em comparação com a enzima nativa. No segundo estágio da reação, o composto I oxida uma molécula de substrato (AH_2), gerando um substrato radicalar e o composto II. Finalmente, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de substrato, fazendo com que a enzima retorne a sua forma inicial (HINER et al., 2001).

Os radicais livres formados durante o ciclo (AH^\bullet) difundem-se do sítio ativo da enzima para o meio da solução. Estes radicais livres são reativos e tendem a iniciar uma reação espontânea, em cadeia, em que as moléculas aromáticas são ligadas formando um produto poliaromático com solubilidade reduzida ($2AH^\bullet \rightarrow A_2H_{2(s)} \downarrow$) (NICELL, 1994).

A maioria das moléculas poliaromáticas solúveis produzidas apresenta características de substrato da enzima, sendo novamente oxidadas pela reação. Consequentemente, a demanda de H_2O_2 para a reação global de um substrato aromático é sempre maior do que o previsto pela estequiometria da reação. O resultado subsequente desta oxidação é a formação de cadeias ainda maiores com solubilidade reduzida (NICELL et al., 1992).

Enzimas peroxidases possuem especificidade por uma ampla variedade de substratos aromáticos, como fenóis, polifenóis, aminas aromáticas primárias e poliaminas aromáticas primárias. Essas enzimas podem ser encontradas em microrganismos, plantas e também em mamíferos. A função biológica das peroxidases envolve síntese de várias biomoléculas e também a detoxificação por meio da destruição de H_2O_2 (VAN DE VELDE; VAN RANTWIJK; SHELDON, 2001).

As peroxidases podem ser classificadas em três superfamílias: planta peroxidase, animal peroxidase e catalase peroxidase. A superfamília planta

peroxidase está ainda dividida em três classes, de acordo com sua origem: classe I, peroxidases intracelulares que incluem a citocromo C peroxidase de levedura, a ascorbato peroxidase e a catalase-peroxidase bacteriana (PASSARDI et al., 2007); a classe II, que consiste em peroxidases fúngicas extracelulares: ligninases, ou lignina peroxidase (Lip) e manganês peroxidase (MnP), glicoproteínas monoméricas que estão envolvidas na degradação da lignina e são comumente estudadas na descoloração de corantes e a classe III, que compreende as classes vegetais, sendo a isoenzima C da horsehadish peroxidase o exemplo mais estudado (DUNFORD, 1999; HUSSAIN, 2009).

A peroxidase de raiz forte ou horsehadish peroxidase é a mais conhecida e mais estudada até o presente momento. Trata-se de uma glicoproteína globular com massa molecular de $42.000 \text{ g mol}^{-1}$, que tem uma parte proteica (apoenzima) de, aproximadamente, $34.000 \text{ g mol}^{-1}$ e o restante é composto pelo grupo prostético (tipo heme) que contém o cofator ligado fortemente ao sítio ativo da enzima. Nos vegetais superiores, o cofator ferro no seu estado de oxidação +3 encontra-se ligado a uma molécula de porfirina, compondo o grupo heme, que promove a doação de elétrons na reação de oxidação dos seus substratos aromáticos (DUNFORD, 1999; FORGIARINI, 2006).

As peroxidases são empregadas na indústria devido às suas propriedades catalíticas, à versatilidade de reconhecer diversos substratos e à termoestabilidade. Apresentam aplicações na área de síntese orgânica, remoção de compostos fenólicos em resíduos industriais, construção e aplicação de biossensores, imunoenaios enzimáticos e diminuição de resíduos poluentes de indústria de tecidos, que utilizam estas enzimas em processos de descoloração (LOUGHLIN, 2000; MACIEL; GOUVÊA; PASTORE, 2006, 2007; MILAND; SMYTH; FAGAIN, 1996).

2.6 Vegetais utilizados como fonte de peroxidase

As peroxidases são encontradas em diversas espécies do reino vegetal e a mais importante, do ponto de vista comercial, é a isolada da raiz forte (*Armoracia rusticana*) na forma purificada (horsehadish peroxidase - HPR). A raiz forte é geralmente cultivada e colhida em países de clima frio.

A disponibilidade limitada da planta e os custos inerentes aos processos de purificação inviabilizam o uso desta enzima em larga escala. Portanto, é evidente a necessidade da busca de fontes mais acessíveis e a redução do custo de produção destas enzimas, que pode ser obtida otimizando as condições de extração e pela utilização de vegetais contendo alta atividade enzimática, que podem ser aplicados diretamente sem a necessidade de processos dispendiosos de purificação.

Fatibello Filho e Vieira (2002) avaliaram o uso de extratos brutos vegetais ricos em peroxidase para a determinação de vários analitos de interesse alimentício, ambiental, farmacêutico, industrial e tecnológico. Os vegetais testados foram pêssego, inhame, mandioca, alcachofra, batata-doce, nabo, rabanete e abobrinha, tendo sido os quatro últimos os que apresentaram maior atividade enzimática. O extrato bruto de jiló também foi utilizado como fonte de peroxidase para a construção de biossensores (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006).

Diante do relato do uso do extrato bruto destes vegetais como fonte de peroxidase contendo alta atividade, os seguintes vegetais (1) nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*), (2) rabanete (*Raphanus sativus*), (3) abobrinha (*Curcubita pepo*), (4) jiló (*Solanum gilo Raddi*) e (5) batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) foram investigados neste trabalho, quanto à obtenção de peroxidase, para aplicação na oxidação de corantes têxteis.

A seguir, fazem-se algumas considerações gerais sobre os vegetais em estudo.

O nabo é uma hortaliça anual, de porte herbáceo, pertencente à família Brassicaceae. A parte comestível é a raiz. As folhas também são comestíveis e, em alguns lugares, são utilizadas como saladas. O ciclo cultural tem cerca de 40 a 60 dias, na primavera e no verão e de 90 a 100 dias no inverno (PAULA JÚNIOR et al., 1987).

O rabanete, pertencente à família Brassicaceae, de origem europeia e asiática, é planta de pequeno porte. Sua raiz pode ter coloração avermelhada (mais consumida) ou branca e tipo globular ou cilíndrico (comprido ou meio alongado). Minas Gerais produz cerca de 96% do rabanete comercializado nos Ceasas-MG. As regiões do Triângulo Mineiro e Metropolitana de Belo Horizonte são as principais produtoras. Desenvolve-se melhor em regiões de clima ameno, com temperaturas entre 13° e 20°C. Entretanto, têm sido desenvolvidos cultivares e híbridos mais resistentes ao calor, o que tem possibilitado o cultivo durante todo o ano, principalmente em regiões mais quentes (PEDRO JÚNIOR; VENZON, 2007).

A abobrinha (*Cucurbita pepo*) pertence à família Cucurbitaceae, que é constituída por 118 gêneros e cerca de 825 espécies. As cucurbitáceas estão entre as mais importantes famílias de espécies cultivadas, visto que se destacam quando ao valor econômico e alimentar. O principal produto olerícola das cucurbitáceas é o fruto, que é consumido na forma imatura, sendo extremamente variável quanto às suas características (PEDRO JÚNIOR; VENZON, 2007).

A batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é planta de clima tropical e subtropical, possivelmente de origem americana. Exige temperaturas elevadas durante seu ciclo natural e não tolera geada. Atinge máximo desenvolvimento com temperaturas médias acima de 24°C e alta luminosidade, paralisando seu crescimento em temperaturas iguais ou inferiores a 10°C (PEDRO JÚNIOR; VENZON, 2007).

O jiló (*Solanum gilo* Raddi) é uma hortaliça anual de porte herbáceo, rico em fibras solúveis, de sabor amargo. O jiló é tipicamente tropical, exigente em calor (26°-28 °C) e pouco tolerante ao frio (PEDRO JÚNIOR; VENZON, 2007).

REFERÊNCIAS

AKHTAR, S. H. Potential applications of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase in the removal of phenols from polluted water. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, p. 1228-1235, June 2006.

ALCÂNTARA, M. R.; DALTIM, D. A química do processamento têxtil. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 320-330, 1996.

ALMEIDA, E. et al. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 818-824, 2004.

APHA. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. Washington, 1995.

ARAÚJO, F. V. F.; YOKOYAMA, L. Remoção de cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H₂O/UV. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 11-14, 2006.

AZMI, W.; BANERJEE, U. Biological decolorization of crystal violet by a newly isolated *Bacillus* sp. And microbial assessment of toxicity of untreated and treated dye. **Scientia Iranica**, Tehran, v. 8, n. 3, p. 171-178, July 2001.

BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002.

BELTRAME, L. T.C. **Sistemas microemulsionados aplicados à remoção da cor de efluentes têxteis**. 2006. 148 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 72, p. 562-567, Mar. 2001.

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

CHRISTIE, R. M. **Colour chemistry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001.

CONCHON, J. A. Tratamento de efluentes na indústria têxtil. **Base Têxtil**, São Paulo, v. 123, n. 3, p. 1-5, 1999.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA (Brasil). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, dá outras providências e revoga a Resolução nº 20/86. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

DUNFORD, H. B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley-VHC, 1999. 532 p.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase: like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, New York, v. 714, p. 1-17, Nov. 2000.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

FERREIRA LEITÃO, V. S. **Estudo da degradação do azul de metileno e do azure B e obtenção preferencial de derivados n-desmetilados usando lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium***. (2000). 90 p. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

FERREIRA LEITÃO, V. S.; SILVA, J. G.; BON, E. P. S. Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases. **Applied Catalysis B: Environmental**, New York, v. 42, p. 213-221, May 2003.

FORGACS, E.; CSERHÁTI, T; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewater : a review. **Environment International**, Belgrado, v. 30, n. 7, p. 953-971, 2004.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima horseradish peroxidase (HRP)**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

GUARATINI, C. C. I. ; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

HAO, O. J.; KIM, H.; CHIANG, P. C. Decolorization of wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 30, n. 4, p. 449-505, 2000.

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

HUSSAIN, Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 117-140, 2009.

KARAM, J.; NICELL, J. Potential application of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, London, v. 69, n. 2, p. 141-153, 1997.

KULSHRESTHA, Y.; HUSAIN, Q. Decolorization and degradation of acid dyes mediated by partially purified turnip (*Brassica rapa*) peroxidase. **Toxicological and Environmental Chemistry**, London, v. 89, p. 255–267, May 2007.

KNUTSON, K.; KIRZAN, S.; RAGAUSKAS, A. Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase. **Biotechnology Letters**, New York, v. 27, n. 11, p. 753-758, 2005.

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p.78-82, jan./fev. 2002.

LOUGHLIN, W. A. Biotransformation in organic synthesis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 49-62, 2000.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. Leaves. **Ciências e Tecnologias de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 221-225, 2007.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* Desf com alta atividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 735-739, 2006.

MADDHINNI, V. L.; VURIMINDI, H. B.; YERRAMILI, A. Degradation of azo dye with horseradish peroxidase (HRP). **Journal of the Indian Institute of Science**, Bangalore, v. 86, p. 507–514, Sept./Oct. 2006.

MARMAGNE, O.; COSTE, C. Color removal from textile plant effluents, **American Dyestuff Reporter**, New York, v. 85, p. 15-21, Apr. 1996.

MATTO, M.; HUSAIN, Q. Decolorization of direct dyes by salt fractionated turnip proteins enhanced in the presence of hydrogen peroxide and redox mediators. **Chemosphere**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 338-345, 2007.

MILAND, E.; SMYTH, M. R.; FAGAIN, C. O. Modification of horseradish peroxidase with bifunctional N-hydroxysuccinimide esters: effects on molecular stability. **Enzyme Microbial Technology**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 242-249, 1996.

MOHAN, S. V. et al. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, New York, v. 58, p. 1097-1105, Sept. 2005.

NAM, S.; RENGANATHAN, V.; TRATNYEK, P. G. Substituent effects on azo dye oxidation by the FeIII-EDTA-H₂O₂ system. **Chemosphere**, New York, v. 45, n. 1, p. 59-65, 2001.

NICELL, J. A. et al. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 157-164, 1992.

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

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

O'NEILL, C. et al. Colour on textile effluents-source, measurement, discharge contents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v. 74, n. 11, p. 1009-1018, 1999.

PASSARDI, F. et al. Prokaryotic origins of the nonanimal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. **Genomics**, Amsterdam, v. 89, n. 5, p. 567-579, 2007.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M. **101 culturas: manual de tecnologias agrícolas**. Belo Horizonte: EPAMIG, 2007. 800 p.

PEDRO JÚNIOR, M. J. et al. **Instruções agrícolas para o Estado de São Paulo**. 4. ed. Campinas: [s.n.], 1987. 231 p.

PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and Pigments**, London, v. 61, n. 2, p. 121-139, 2004.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.

RODRIGUES, T. A. **Estudo da interação biosortiva entre o corante reativo procion blue MXG, e as linhagens CCB 004, CCB 010 e CCB 650 de *Pleurotus ostreatus* paramorfogênico**. 2003. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

ROSALEN, L. A. et al. Biodegradação de efluente têxtil e nove corantes técnicos utilizando fungos basidiomicetos. **Química Têxtil**, São Paulo, n. 76, p. 44-52, 2004.

SATAR, R.; HUSAIN Q. Applications of celite-adsorbed white radish (*Raphanus sativus*) peroxidase in batch process and continuous reactor for the degradation of reactive dyes. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 96-104, 2009.

SHAFFIQU, T. S. et al. Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. **Applied Biochemical Biotechnology**, Totowa, v. 102-103, n. 1, p. 315-326, 2002.

SHIM, J. et al. Degradation of azo dye by an electroenzymatic method using horseradish peroxidase immobilized on porous support. **Korean Journal of Chemical Engineering**, Khon Kaen, v. 24, n. 1, p. 72-78, 2007.

SPONZA, D. T.; ISIK, M. Decolorization and inhibition kinetic of direct black 38 azo dye with granulated anaerobic sludge. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 2, p. 147-158, 2004.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil**. 2004. 136 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

ULSON DE SOUZA, S. M. A. G.; FORGIARINI, E.; ULSON DE SOUZA, A. A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 147, p. 1073-1078, June 2007.

VAN DE VELDE, F.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 19, n. 6, p. 73-80, 2001.

YANG, Q. X. et al. Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. **Biotechnology Letters**, New, York, v. 25, n. 9, p. 709-711, 2003.

ZANONI, M. V.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência hoje**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 174, p. 61-64, 2001.

ZILLE, A. **Laccase reactions for textile applications**. 2005. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia Têxtil) - Universidade do Minho, Minho, 2005.

CAPÍTULO 2

**OBTENÇÃO DE PEROXIDASE VEGETAL E SEU POTENCIAL NA
DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REATIVO TURQUEZA
REMAZOL G 133%**

RESUMO

Os corantes têxteis reativos têm a estrutura composta por um grupo cromóforo, um grupo solubilizante e um reativo. O grupo cromóforo é responsável pela cor, sendo a ftalocianina a classe mais estável entre todas as atualmente utilizadas. Um exemplo típico desta classe é o corante turqueza remazol G 133% (CTR). Os corantes têxteis são misturas de compostos com estrutura molecular complexa, altamente estável e de difícil biodegradação. Devido aos padrões de preservação ambiental serem cada vez mais exigentes, novas tecnologias para a remoção de corantes em meio aquoso vêm sendo desenvolvidas. A utilização de enzimas como as peroxidases tem se mostrado uma alternativa promissora na remoção da cor de efluentes coloridos. Entretanto, o custo de produção e a obtenção de novas fontes de peroxidase inviabilizam este processo. Neste trabalho, os vegetais nabo, rabanete, jiló, abobrinha e batata-doce foram testados como fontes de peroxidase. A peroxidase foi extraída em tampão fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5, na proporção 1:4 (v/v) e, em seguida, precipitada com acetona 65% (v/v). A enzima obtida do nabo foi caracterizada quanto às condições ótimas de pH, temperatura e estabilidade, e aplicada na oxidação do CTR. Fez-se, ainda, a padronização dos parâmetros ótimos (concentrações de corante, H_2O_2 e enzima) para a máxima remoção do corante. A peroxidase extraída do nabo (PEN) foi selecionada por apresentar alta atividade. Essa enzima apresentou atividade ótima em pH 7,0 e mostrou-se estável termicamente. A PEN foi capaz de remover até 60% do corante em solução aquosa. No entanto, a eficiência deste catalisador mostrou-se dependente das concentrações da enzima, do corante e de H_2O_2 utilizadas no ensaio. A eficiência da PEN na oxidação do corante foi comparável à horshedish peroxidase, uma enzima comercial geralmente utilizada em processos de descoloração. A enzima obtida apresentou-se como uma alternativa eficaz e economicamente viável na remoção de corantes industriais.

Palavras-chave: Peroxidase vegetal. Descoloração enzimática. Corante têxtil. Nabo (*Brassica campestris* ssp. Rapifera).

**OBTAINING OF PLANT PEROXIDASE AND ITS POTENTIAL IN THE
DISCOLORATION OF THE REACTIVE TEXTILE DYE REMAZOL
TURQUOISE G 133%**

ABSTRACT

Textile reactive dyes possess a structure composed by a chromophore group, a solubilizing group and one reactive. The chromophore group is responsible for color, phthalocyanine being the most stable class among all the ones utilized at present. A typical instance of this class is the dye remazol turquoise G 133% (CTR). Textile dyes are a mixture of compounds with complex molecular structure, highly stable and of hard biodegradation. Due to the fact of the environmental preservation standards being more and more demanding, new technologies for removal of dyes in aqueous medium has been being developed. Use of enzymes such as peroxidases has proved a promising alternative in the removal of the color of colored effluent. However, the cost of production and the obtaining of new sources of peroxidase make this process unfeasible. In this work, the vegetables: turnip, scarlet eggplant, zucchini and sweet potato were tested as sources of peroxidase. Peroxidase was extracted in 0.05 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 6,5 in proportion 1:4 (v/v) and next it was precipitated with 65% acetone (v/v). The enzyme obtained was characterized as to the optimum conditions of pH, temperature, stability and applied in the oxidation of CTR. The standardization of the optimum parameters (concentrations of dye, H₂O₂ and enzyme) for the maximum removal of the dye was still done. The turnip-extracted peroxidase (TNP) was selected for presenting a high activity. The enzyme presented optimum activity at pH 7.0 and proved thermally stable. HRP was capable of removing up to 60% of the dye in aqueous solution. Nevertheless, the efficiency of this catalyzer proved to be dependent of the concentrations of the enzyme, of the dye and of the of H₂O₂ utilized in the assay. The efficiency of TNP in the oxidation of the dye was comparable to horseradish peroxidase, a commercial enzyme generally utilized in discoloration processes. The enzyme obtained presented an effective and economically viable alternative in removing industrial dyes.

Key words: Plant peroxidase. Enzymatic discoloration. Textile dye. Turnip.

1 INTRODUÇÃO

As peroxidases (E.C. 1.11.1.7, doador H₂O₂ oxidorreductase) catalisam a redução do peróxido de hidrogênio ou outro peróxido orgânico, enquanto um doador de elétrons é oxidado. A baixa especificidade destas enzimas facultam a sua atuação em um amplo espectro de substratos e possibilita a sua aplicação em uma gama de transformações de interesse com vantagens tecnológicas, econômicas e ambientais.

Essa classe de enzimas tem sido muito utilizada em biotecnologia e várias outras áreas da ciência, para o estabelecimento de diagnósticos clínicos e avaliação de processos patológicos, em análise de qualidade dos alimentos, na construção de biossensores, na indústria de papel e celulose, sendo empregadas na etapa de branqueamento da polpa e no tratamento de seus efluentes (MACIEL; GOUVÊA; PASTORE, 2006, 2007).

As peroxidases podem ser utilizadas ainda na remoção de compostos fenólicos e aminas aromáticas em soluções aquosas (WILBERG; ASSENHAIMER; RUBIO, 2002). Além disso, alguns autores mostram que a destruição oxidativa de compostos coloridos é estimulada significativamente por meio da utilização de enzimas oxidativas (BHUNIA; DURANI; WANGIKAR, 2001; REGALADO; GARCÍA-ALMENDÁREZ; DUARTE-VÁZQUEZ, 2004).

A fonte comercial mais utilizada de peroxidase é a raiz forte (horshadish peroxidase), geralmente cultivada e colhida em países de clima frio (MACIEL; ; GOUVÊA; PASTORE, 2006). A horshadish peroxidase (HPR) é conhecida por sua eficiência na remoção de um amplo espectro de compostos aromáticos (fenol, bifenóis e anilinas) na presença de peróxido de hidrogênio e na degradação ou na precipitação de importantes corantes industriais (KIM et al., 2005; MOHAN et al., 2005).

Devido à ampla utilização das peroxidases, principalmente como biocatalisador ambiental, há um interesse crescente por novas fontes desta enzima e por processos de obtenção de baixo custo.

Limitações para o uso de peroxidases de plantas em biocatálise são o baixo rendimento e o alto custo de produção, em comparação com as enzimas bacterianas ou fúngicas. Entretanto, a redução do custo de produção dessas enzimas pode ser obtido otimizando-se as condições de extração e pela utilização de vegetais contendo alta atividade enzimática que podem ser aplicados diretamente com a mesma eficiência que a enzima purificada (DEC; BOLLAG, 1994).

Na literatura, os vegetais nabo, rabanete, jiló, abobrinha e batata-doce são mencionados como fontes ricas de peroxidase (FATIBELLO FILHO; VIEIRA, 2002; OLIVEIRA; VIEIRA, 2006) e por isso foram utilizados neste trabalho.

Os corantes reativos possuem uma estrutura composta por um grupo cromóforo, um grupo solubilizante e um reativo. O grupo cromóforo é responsável pela cor, sendo a ftalocianina a classe mais estável entre todas as atualmente utilizadas, assumindo tonalidades verdes ou azuis, dependendo de seus substituintes. A maior parte destes corantes é de complexos metálicos de cobre (ftalocianinas de cobre), por apresentarem boas propriedades de cor e resistência (BELTRAME, 2006). Um exemplo típico desta classe é o corante turquesa remazol G 133% (CI reactive blue 21), cuja estrutura está mostrada na Figura 1.

Tendo em vista que se trata de um corante altamente estável e de difícil biodegradação e que a presença de corantes, além do aspecto estético, podem causar modificações nas atividades fotossintetizantes da biota aquática, novas alternativas são necessárias para a remoção eficiente deste e de outros corantes

têxteis em banhos de tingimento, visando o reuso da água no processamento têxtil e ou o tratamento de efluentes coloridos.

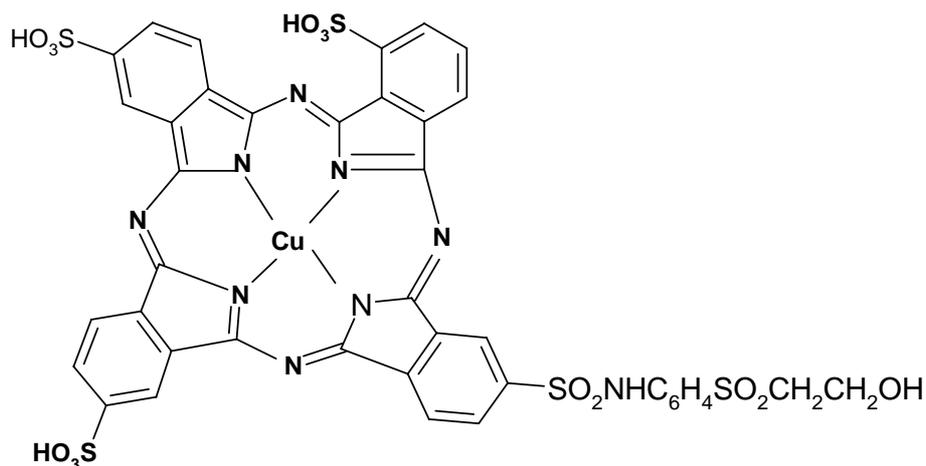


Figura 1 Estrutura química do corante turqueza remazol G 133%
(Fonte: Conneely et al. (2001))

Portanto, este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: (1) obtenção de uma fonte vegetal rica em peroxidase, estudando cinco espécies vegetais; (2) elaboração de procedimentos simples e de baixo custo para a obtenção da enzima; (3) caracterização da enzima obtida quanto às condições ótimas de pH, temperatura e estabilidade, parâmetros importantes para avaliar a capacidade de aplicação da enzima em processos industriais; (4) avaliação do seu potencial na descoloração do corante reativo turqueza remazol G 133% (CTR), em que parâmetros como concentrações da enzima, de substrato e de H₂O₂ e o tempo de contato foram investigados para otimizar as condições do sistema e (5) comparar sua eficiência de oxidação com a enzima comercial horshadish peroxidase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos realizados neste experimento foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais.

2.1 Vegetais, enzima comercial e corante

Os seguintes vegetais foram utilizados para a obtenção da peroxidase: (1) nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*), (2) rabanete (*Raphanus sativus*), (3) abobrinha (*Curcubita pepo*), (4) jiló (*Solanum gilo* Raddi) e (5) batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Empregaram-se os frutos da abobrinha e jiló, as raízes do nabo e rabanete, o tubérculo da batata-doce e as folhas e as cascas de todos os vegetais citados.

A enzima horshadish peroxidase (HPR) foi adquirida da Sigma Aldrich e utilizada em solução aquosa (diluição de 30 mg da enzima comercial em 20 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 6,5). Após a preparação, a enzima foi armazenada à temperatura média de 4°C.

O corante turqueza remazol G 133% (C. I. reactive blue 21) - CTR utilizado nos ensaios de oxidação foi gentilmente cedido pela Dy Star (Brasil).

2.2 Análise estatística

Para análise de variância dos resultados, quando realizada, utilizou-se o software SISVAR (FERREIRA, 2010) e, quando esta se mostrou significativa, foi aplicado o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, para comparação das médias.

2.3 Obtenção do extrato bruto enzimático

Os frutos, as raízes e os tubérculos dos vegetais foram devidamente lavados em água corrente e água destilada. Em seguida, 25 g do tecido vegetal descascado foram picados em pedaços de tamanho uniforme e homogeneizado em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 6,5, por 30 segundos. O homogenato foi filtrado em tecido organza e centrifugado a 10.000 x g, durante 15 minutos, a 4°C. A solução sobrenadante foi recolhida, armazenada a 4°C e utilizada como fonte enzimática da peroxidase (FATIBELLO FILHO; VIEIRA, 2002).

As cascas e folhas dos vegetais foram lavadas em água corrente e destilada, picadas em pedaços pequenos e uniformes, sendo adotado o mesmo procedimento de extração descrito anteriormente.

2.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada segundo Khan e Robinson (1994), utilizando-se como meio de reação: 1,5 mL de guaiacol (Vetec; 97% v/v) 1% (v/v); 0,4 mL de H₂O₂ (Vetec, PA) 0,3% (v/v); 0,1 mL de enzima (mantida em banho de gelo) e 1,2 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 6,5. A reação foi acompanhada, durante 5 minutos, a 30°C, em espectrofotômetro Spectrovision, em 470 nm, acoplado a um banho termostatizado.

Uma unidade da atividade da peroxidase representou a oxidação de 1 μmol de guaiacol em 1 minuto nas condições de ensaio e foi calculada utilizando-se dados relativos à porção linear da curva.

2.5 Influência de aditivos na atividade enzimática

Os aditivos NaCl 0,2 mol L⁻¹; KCl 0,2 mol L⁻¹; PEG 4000 (polietilenoglicol) 2% (p/v); PVP insolúvel (polivinil pirrolidona) 2% (p/v) e EDTA 10 mmol L⁻¹ foram incorporados separadamente à solução extratora para avaliar sua influência na atividade enzimática (HOLSCHUH, 2000). O controle foi feito medindo-se a atividade na ausência de qualquer aditivo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos (5 aditivos e um controle) e 4 repetições.

2.6 Influência do pH na atividade enzimática e estabilidade térmica

O pH ótimo foi determinado variando-se o pH das soluções tampão de 2,0 a 9,0 com intervalo de uma unidade de pH. Os tampões utilizados foram: tampão citrato 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,0 a 6,0) e tampão tris – HCl 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0 a 9,0).

A estabilidade térmica da peroxidase foi avaliada incubando-se a enzima por 1, 2 e 4 horas, variando-se a temperatura de 30° a 90°C, com intervalos de 10°C. Após o tratamento térmico, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e a atividade residual foi determinada. Como controle determinou-se a atividade do extrato bruto enzimático sem tratamento térmico. Foram feitas três repetições para cada tratamento.

2.7 Precipitação das proteínas

Para a precipitação das proteínas foram testados dois agentes precipitantes, acetona e sulfato de amônio.

2.7.1 Precipitação por acetona

Ao extrato bruto enzimático foi adicionada acetona gelada até atingir 65% (v/v). Após repouso de 12 a 14 horas, a -18°C , o homogenato foi centrifugado a $11.000 \times g$, por 15 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e a acetona foi posteriormente recuperada pelo Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos (LGRQ) da UFLA, por destilação simples, em um rotaevaporador, à temperatura controlada de 56°C .

O precipitado contendo a peroxidase foi submetido à remoção da acetona em banho de gelo, por 3 horas. O precipitado foi ressuspensionado em 10 mL de tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5 e a suspensão obtida foi utilizada para a determinação da atividade enzimática. O procedimento foi feito em três repetições.

2.7.2 Precipitação por sulfato de amônio

A precipitação por sulfato de amônio foi feita segundo Zeraik et al. (2008), com algumas modificações. Em uma primeira etapa, ao extrato foi adicionado sulfato de amônio sólido, de modo a se obter 40% de saturação. Neste ponto, observou-se uma clarificação da solução de extrato, proveniente da precipitação dos materiais citoplasmáticos e nucleares e/ou proteínas presentes. Essa solução foi mantida a 4°C , por 20 horas e centrifugada a $8.000 \times g$, durante 10 minutos, a 4°C . O precipitado foi descartado e ao sobrenadante adicionou-se

mais sulfato de amônio sólido para atingir 85% de saturação e a solução foi mantida a 4°C, por mais 20 horas. O sobrenadante foi separado do precipitado por centrifugação a 8.000 x g, durante 10 minutos, a 4 °C. Nesta etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ pH 6,5.

A suspensão obtida foi dialisada contra tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 6,5, durante 24 horas (tubo para diálise benzoilado 32 mm com limite de exclusão de 2 kDa, 5 trocas diárias, em geladeira e agitação magnética) para a retirada do sulfato de amônio. A suspensão obtida foi submetida à determinação da atividade enzimática. O procedimento foi feito em três repetições.

2.8 Ensaios de descoloração do CTR

As reações de oxidação enzimática do CTR foram conduzidas a 30°C em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 (1,2 mL), contendo: (1) H₂O₂ 100 μmol L⁻¹ (0,4 mL), (2) corante turqueza remazol G 133% (1,5 mL), na concentração de 50 mg L⁻¹ e 0,1 mL de solução enzimática. Inicialmente, todos os parâmetros foram mantidos constantes e a reação foi conduzida por um período de 2 horas, a fim de avaliar o melhor tempo de contato da enzima com o corante.

Em seguida, realizaram-se vários experimentos, variando-se a concentração do corante (10 a 50 mg L⁻¹), a concentração de peróxido de hidrogênio (50 a 500 μmol L⁻¹) e a concentração de enzima (de 1,62 a 26,16 U mL⁻¹).

O modo de adição do H₂O₂ ao meio reacional (simples ou em pulsos) também foi avaliado. O modo de adição em pulsos consistiu em sucessivas adições de H₂O₂ ao meio reacional, após intervalos de tempo determinados, de acordo com o número de pulsos adicionados. Quando realizado em dois pulsos,

a solução de H₂O₂ foi adicionada após 25 minutos do tempo de reação e, quando em 4 pulsos, adicionada a cada 12min30s.

O extrato enzimático vegetal considerado mais adequado na utilização da oxidação dos corantes (apresentou maior atividade enzimática) foi submetido à precipitação com acetona, conforme descrito anteriormente e utilizado nos ensaios de descoloração como fonte enzimática. A enzima HPR também foi utilizada nos ensaios de descoloração do CTR para fins de comparação.

A mistura reacional foi incubada em espectrofotômetro acoplado a um banho termostaticado (ou em banho com agitação leve) e a absorvância dos corantes foi medida em diferentes tempos durante os experimentos. O acompanhamento da oxidação foi feito ao comprimento de onda máximo do corante a 624 nm. O cálculo para determinar a porcentagem de remoção de cor para os corantes foi feito de acordo com a equação:

$$\%deremoção = \frac{absorbância_{inicial} - absorbância_{final}}{absorbância_{inicial}} \times 100$$

O procedimento foi feito em três repetições.

2.9 Efeito da adsorção do corante pelo extrato enzimático

Para avaliar se houve ou não adsorção do corante pelo extrato enzimático, o meio reacional contendo tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 (1,6 mL); 1,5 mL do corante turqueza remazol G 133% (50 mg L⁻¹) e 0,1 mL do extrato enzimático (12,18 U mL⁻¹) foi incubado em espectrofotômetro, a 30°C, por duas horas, e a remoção da cor foi acompanhada a 624 nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção de uma fonte vegetal rica em peroxidase com alta atividade

Na Tabela 1 estão apresentadas as atividades médias das peroxidases de diferentes tecidos vegetais, cuja análise de variância consta na Tabela 1 do anexo. Dentre as fontes vegetais analisadas, a casca do nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*) proporcionou maior atividade enzimática, enquanto suas folhas e as de rabanete (*Raphanus sativus*) apresentaram menor atividade (Tabela 1).

Tabela 1 Atividade da peroxidase de extratos brutos de diferentes tecidos vegetais

| Amostra | Tecido vegetal | Atividade (U mL ⁻¹)* |
|---|----------------|----------------------------------|
| Abobrinha (<i>Curcubita pepo</i>) | fruto | 0,223 ±0,02f |
| | casca | 1,253±0,05b |
| | folhas | 0,845 ±0,03d |
| Batata doce (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.) | tubérculo | 0,105±0,01g |
| | casca | 0,812±0,07d |
| | folhas | 0,316±0,00e |
| Jiló (<i>Solanum gilo Raddi</i>) | fruto | 0,275±0,00e |
| | casca | 0,159±0,03f |
| | folhas | 0,189±0,00f |
| Nabo (<i>Brassica campestris</i> ssp. <i>Rapifera</i>) | raiz | 1,080±0,00c |
| | casca | 1,487±0,12a |
| | folhas | 0,024±0,07h |
| Rabanete (<i>Raphanus sativus</i>) | raiz | 0,225±0,00f |
| | casca | 1,039±0,12c |
| | folhas | 0,015±0,00h |
| CV (%) | | 9,89 |

* Dados são a média de três repetições ± desvio padrão.

**Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Observou-se também que a raiz do nabo constitui uma fonte rica em peroxidase, portanto, adotou-se o nabo (casca + raiz) como fonte principal da enzima. Todos os ensaios subsequentes foram realizados utilizando esta fonte enzimática.

3.2 Influência de aditivos na atividade da peroxidase

A influência de aditivos na atividade da peroxidase foi investigada, cujos resultados constam na Tabela 2 e a análise de variância na Tabela 2 do anexo. A solução extratora contendo NaCl 0,2 mol L⁻¹ acarretou maior aumento da atividade enzimática, seguida por KCl 0,2 mol L⁻¹ e EDTA 10 mmol L⁻¹, enquanto PEG (polietilenoglicol) a 2% (p/v) e PVP insolúvel (polivinil pirrolidona) a 2% (p/v) acarretaram diminuição da mesma.

Tabela 2 Influência dos aditivos sobre a atividade da peroxidase, obtida a partir do extrato bruto do nabo¹

| Aditivos | Atividade (U mL ⁻¹) ² |
|---------------------------------|--|
| PEG (2%) | 0,248±0,04 e |
| PVP (2%) | 0,262±0,01 e |
| Controle (sem aditivos) | 0,330±0,01 d |
| EDTA (10 mmol L ⁻¹) | 0,398±0,03 c |
| KCl (0,2 mol L ⁻¹) | 0,473±0,02 b |
| NaCl (0,2 mol L ⁻¹) | 0,776±0,06 a |
| CV (%) | 7,91 |

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

²Dados são a média de 4 repetições ± desvio padrão.

PEG - polietilenoglicol

PVP – polivinil pirrolidona

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

Diversos trabalhos descrevem um melhoramento significativo na atividade e na estabilidade de enzimas, quando o procedimento de extração é realizado em presença de aditivos. Os aditivos têm sido utilizados para proteção da inativação da enzima, retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e como dispersantes das moléculas da enzima e facilitadores de transporte de massa. O contato do aditivo com a enzima pode apresentar comportamento antagônico, isto é, a interação pode apresentar um efeito negativo na reação de interesse, como foi observado para os aditivos PEG a 2% (p/v) e PVP insolúvel a 2% (p/v). Soares et al. (2003) afirmam que nem todos os aditivos são eficientes como estabilizantes e a influência do aditivo na atividade enzimática ainda não está totalmente esclarecida.

3.3 Influência do pH na atividade enzimática e estabilidade térmica

A atividade da PEN mostrou variação significativa em função do pH. A PEN apresentou atividade ótima em pH 7,0 (Figura 2).

Em pH ácido, a peroxidase apresentou diminuição de atividade, sendo o mesmo observado em pH 9,0. Essa diminuição da atividade pode ter ocorrido principalmente por alterações iônicas da enzima, que alteram a conformação da mesma e, conseqüentemente, a conformação do sítio ativo, podendo levar, ainda, à desnaturação proteica.

O pH para a atividade máxima de peroxidase varia com a fonte da enzima, a composição de isoenzimas, o substrato doador e o tampão utilizado para a análise (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981).

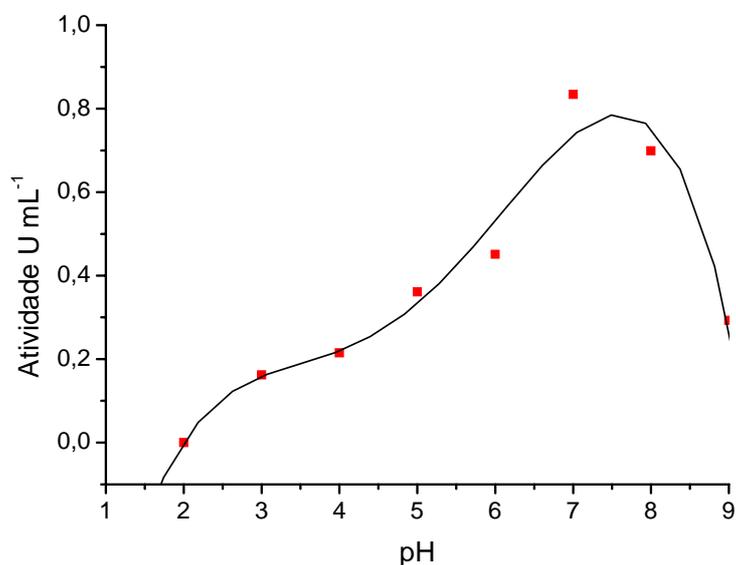


Figura 2 Efeito do pH sobre a atividade da peroxidase obtida a partir do extrato bruto de nabo

Valores de pH na faixa de 5,7 a 5,9 foram encontrados para a peroxidase de carambola, utilizando-se guaiacol como substrato (HOLSCHUH, 2000). A peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* apresentou atividade ótima na faixa de pH de 5,5 a 6,0 (MACIEL; GOUVÊA ; PASTORE, 2006).

O estudo do efeito da temperatura na estabilidade da PEN mostrou que a enzima é termoestável até 40°C, após 1, 2 e 4 horas de incubação (Figura 3). A 50°C observou-se um pequeno decréscimo da atividade após 2 e 4 horas de incubação. A atividade enzimática foi totalmente perdida acima de 70°C, confirmando que, para altas temperaturas, ocorre diminuição de sua atividade e eficiência.

A estabilidade de peroxidases é muito importante para utilização em diversas áreas da ciência; quanto maior a estabilidade e a atividade enzimática,

melhor a capacidade de aplicação da enzima em processos diversos como, por exemplo, a aplicação como biocatalisadores (MACIEL; GOUVÊA; PASTORE, 2007). De acordo com os resultados obtidos, em uma faixa de temperatura de 30° a 50°C, a enzima extraída não apresentou alterações significativas na atividade enzimática, o que favorece a sua utilização em processos industriais.

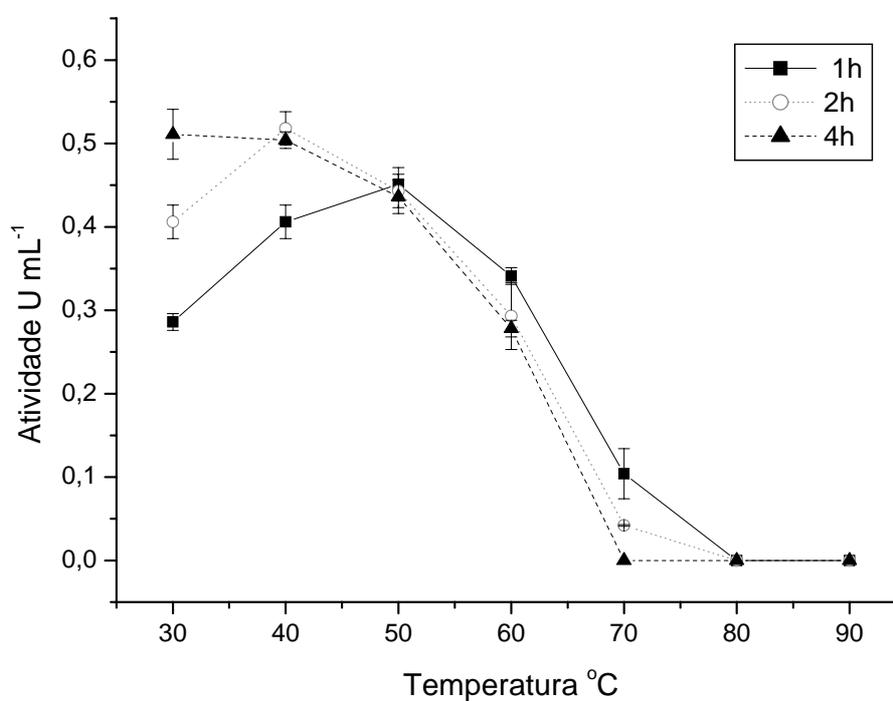


Figura 3 Influência da temperatura e do tempo de incubação sobre a estabilidade da peroxidase obtida do extrato bruto de nabo

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

A peroxidase de *Copaifera langsdorffii* Desf. também se mostrou estável em temperaturas inferiores a 50°C e pH entre 4,5 e 9,0, por até 24 horas. A peroxidase foi inativada após 4 horas a 80°C e após 3 minutos a 96°C (MACIEL; GOUVÊA; PASTORE, 2007).

3.4 Precipitação das proteínas

O agente precipitante mais eficiente foi a acetona, que acarretou 94,48±0,62% de recuperação, em termos de atividade da enzima, enquanto o sulfato de amônio apenas 64,85±6,49%. Além de proporcionar elevada recuperação, a precipitação com acetona não necessita de diálise, reduzindo o tempo e os custos do processo, o que contribui para a obtenção da enzima, por meio de um processo simples e viável economicamente. Além disso, a acetona utilizada na precipitação das proteínas foi recuperada por destilação simples, propiciando redução nos custos do processo enzimático e evitando a descarga do mesmo no meio ambiente. Portanto, para a obtenção da enzima optou-se pela precipitação com acetona.

Observou-se que com a precipitação não se recupera toda a atividade enzimática, porém, a precipitação da enzima é uma etapa importante para a remoção de impurezas que podem afetar o processo de oxidação dos corantes têxteis. Além disso, constitui uma etapa de pré-concentração da enzima.

3.5 Ensaios de descoloração do CTR

Os resultados obtidos para os ensaios de descoloração do CTR estão apresentados a seguir.

3.5.1 Tempo de contato com a enzima

Inicialmente, as reações de oxidação do CTR foram realizadas utilizando-se concentrações fixas de enzima (PEN - 20,3 U mL⁻¹) de corante (50 mg L⁻¹) e de H₂O₂ (100 μmol L⁻¹), a fim de avaliar o tempo de contato com a enzima necessário para que ocorra a máxima remoção do corante. Como pode ser observado na Figura 4, a partir de 45 minutos de contato com a enzima, o aumento na remoção da cor foi negligenciável.

Nas condições de ensaio, a descoloração foi de 60,00±1,82%, após 60 minutos de contato com a enzima e de 57,00±0,45%, após 50 minutos. Portanto, o tempo de reação nos ensaios seguintes foi de 50 minutos.

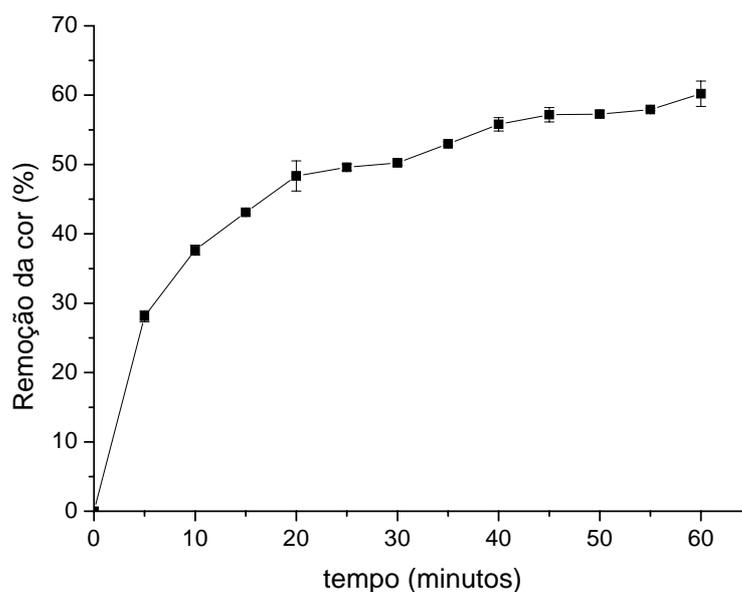


Figura 4 Descoloração do corante turquesa remazol G133% em solução aquosa catalisada pela peroxidase de nabo (20,3 U mL⁻¹), em função do tempo de contato

* Valores são a média de três repetições ± desvio padrão.

3.5.2 Efeito da concentração de H_2O_2

A concentração de H_2O_2 é um dos parâmetros que devem ser otimizados para garantir a eficiência da técnica, uma vez que, em excesso, inibe a atividade da peroxidase e, quando em pequena quantidade, limita a taxa de reação (WU et al., 1994).

O peróxido de hidrogênio atua como cosubstrato e participa do ciclo catalítico da peroxidase para oxidar a enzima nativa em um intermediário enzimático (composto I) que é reduzido pela transferência de um elétron do substrato AH (ex: corante) formando o composto II e oxidando a molécula do substrato para a forma de um radical livre (MOHAN et al., 2005). O composto III se refere à forma inativa da enzima que é formada em função de um excesso de peróxido de hidrogênio (Figura 5).

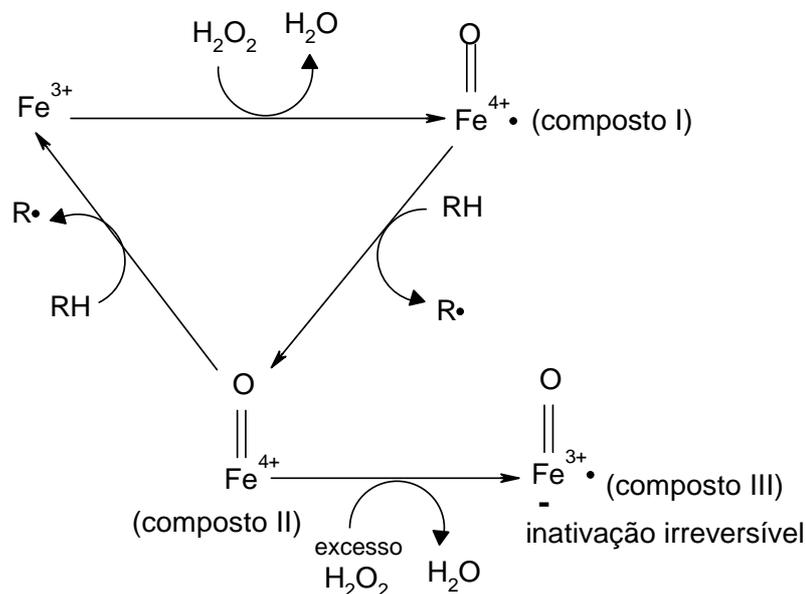


Figura 5 Ciclo catalítico da peroxidase e o efeito do peróxido de hidrogênio na inativação da enzima

Fonte: Deurzen, Rantwijk e Sheldon (1997) e Timofeevski, Reading e Aust (1998)

Uma vez que a eficiência na remoção da cor pela PEN depende da concentração de H_2O_2 no meio reacional, foi feito um estudo variando a quantidade de peróxido adicionada (50 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$), mantendo-se as concentrações de enzima (10,15 U mL^{-1}) e de corante (50 mg L^{-1}) fixas.

A concentração de H_2O_2 que proporcionou a maior taxa de remoção da cor do corante (55,1 \pm 0,75%) foi de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 6).

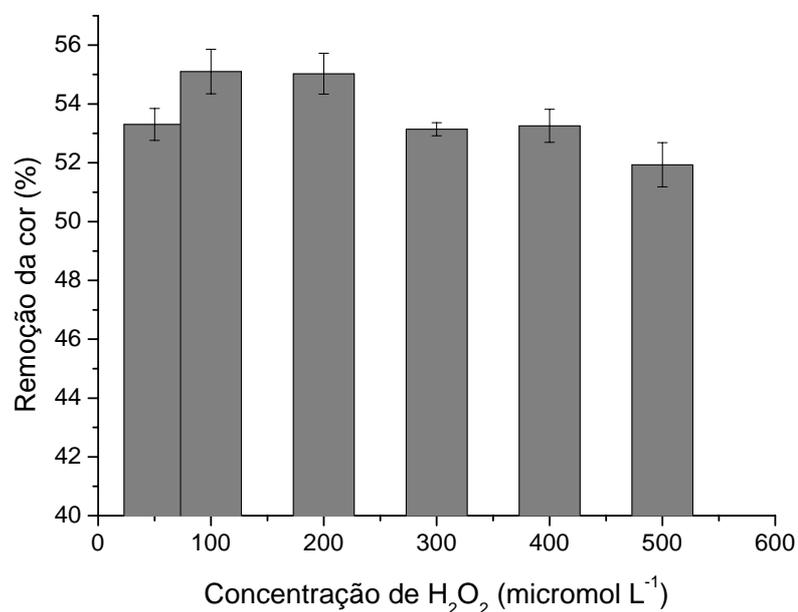


Figura 6 Efeito da concentração de H_2O_2 na descoloração do corante CTR (50 mg L^{-1}) pela PEN (10,15 U mL^{-1})

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

A remoção do corante CTR em solução aquosa foi pouco afetada pela variação do peróxido de hidrogênio no meio reacional. Todavia, mesmo em pequenas proporções, observa-se uma diminuição na eficiência da descoloração

do corante à medida que se aumenta a concentração do peróxido de hidrogênio. Ou seja, o aumento na quantidade de peróxido passou a ter um efeito inibitório, diminuindo a eficiência na remoção da cor. A partir dos dados obtidos observou-se que uma dose de peróxido de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi suficiente para a degradação máxima do corante, nas condições experimentais especificadas, e que doses acima deste valor não são recomendadas.

Souza, Forgiarini e Souza (2007) estudaram a descoloração do corante turqueza remazol G 133% (CTR) por HPR e observaram a inibição da atividade da enzima em concentrações de peróxido de hidrogênio acima de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. As condições experimentais utilizadas foram: concentração de corante 100 mg L^{-1} ; temperatura 30°C e $5 \times 10^{-3} \text{ mL}$ de enzima/mL de solução corante ($29,85 \text{ U/mL}$).

Diversos autores relatam a diminuição da atividade da peroxidase (HPR, Lignina peroxidase - LiP, Manganês peroxidase - MnP) e, conseqüentemente, a perda na eficiência de remoção de vários corantes em solução aquosa, com o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional (FERREIRA LEITÃO; SILVA; BON, 2003; FERREIRA LEITÃO; CARVALHO; BON 2007; HOSHINO et al., 2002; MOHAN et al., 2005).

O uso da adição de H_2O_2 por pulsos ou de forma gradativa proporciona uma concentração efetiva de peróxido mais baixa no meio de reação, evitando a perda da atividade enzimática (FERREIRA LEITÃO; SILVA; BON, 2003). Dessa forma, após 30 minutos do início da reação de oxidação, foi adicionada uma nova concentração de H_2O_2 , de modo que, ao final, a concentração do reagente era de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Neste caso, a remoção obtida foi de $57 \pm 0,83\%$, próxima dos $55,1 \pm 0,75\%$ obtidos no modo de adição única.

Visto que a adição de peróxido de hidrogênio em pulsos não afetou de forma significativa a eficiência da enzima na descoloração do CTR, adotou-se como procedimento padrão a utilização de adições simples do reagente na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

3.5.3 Efeito da concentração da enzima

Uma relação ótima entre a quantidade de enzima e de substrato pode alcançar uma máxima atividade (MOHAN et al., 2005). Neste trabalho, o efeito da concentração da enzima na descoloração do CTR foi avaliado, variando-se a concentração da enzima (1,62 a 26,16 U mL⁻¹), mantendo constantes os demais parâmetros (100 μ mol L⁻¹ de H₂O₂; 50 mg L⁻¹ de corante).

A remoção da cor aumentou com o aumento da quantidade de enzima até 10,83 U mL⁻¹. A partir deste ponto, a remoção não apresentou aumento significativo (Figura 7). A remoção da cor obtida neste caso foi de 54,5±0,5%. Um aumento na quantidade de enzima para 20,3 U mL⁻¹ (aproximadamente o dobro da concentração anterior) correspondeu a uma remoção de 57,7±0,3%. E ainda, em concentração superior a 20,3 U mL⁻¹, nenhum aumento na remoção da cor foi observado. Portanto, a descoloração não foi influenciada em altas concentrações de enzima.

Portanto, considera-se a faixa de concentração de 10,83 a 20,3 U mL⁻¹ como uma faixa de concentração ótima de PEN para a oxidação do CTR.

O efeito da concentração da enzima na remoção do CTR em solução aquosa catalisada por horshedish peroxidase - HPR foi avaliada por Souza, Forgiarini e Souza (2007). A concentração de corante removido foi dependente da concentração de enzima utilizada. Para a quantidade de enzima igual a 14,985 U, houve uma remoção de 58%; dobrando-se essa quantidade, a remoção foi de 62% (29,85U). Esses resultados corroboram os dados obtidos neste trabalho, de que o excesso de enzima não resulta no aumento da remoção do CTR.

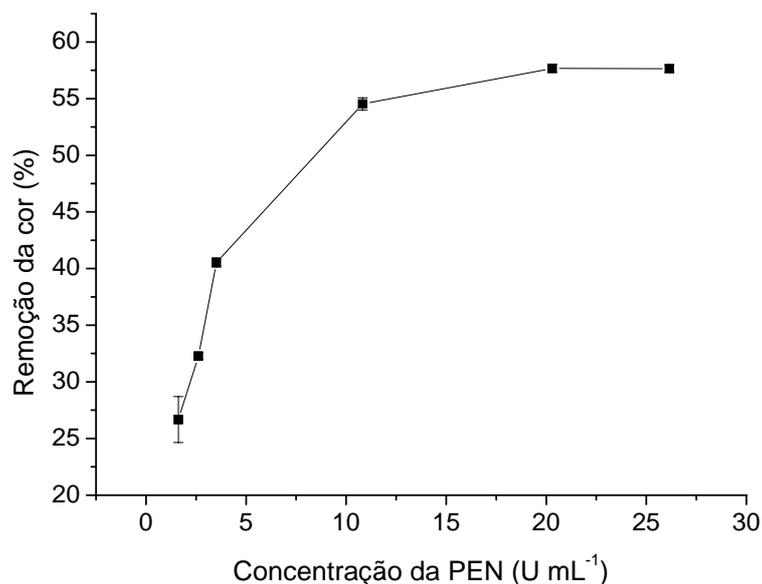


Figura 7 Efeito da concentração da PEN na descoloração do corante CTR (50 mg L⁻¹).

* Valores são a média de três repetições ± desvio padrão.

Mohan et al. (2005), em seu estudo da degradação do corante preto ácido 10 BX pela enzima HRP, constataram que a concentração de enzima ótima para a máxima remoção do corante foi de 2,205 U mL⁻¹, nas condições experimentais especificadas (corante 20 mg L⁻¹; pH 2; temperatura 25°C; tempo de contato 45 minutos e 0,6 μL L⁻¹ de H₂O₂). Em virtude da diferença estrutural entre os corantes preto ácido 10 BX e CTR, e o uso de diferentes enzimas (PEN e HPR) na remoção destes em solução aquosa, os parâmetros padronizados e considerados ótimos (concentração de enzima, concentração de corante, pH, entre outros) são diferentes.

3.5.4 Efeito da concentração do corante

O efeito da concentração do substrato em uma reação enzimática é bem conhecido. À medida que se aumenta a concentração do substrato mantendo constante a concentração da enzima, a taxa de reação irá aumentar até que, em altas concentrações de substrato, quando os sítios ativos das enzimas estão saturados, a taxa ou velocidade de reação permanece constante e nenhuma adição futura de substrato é capaz de promover aumento na velocidade enzimática.

Para avaliar o efeito da concentração do corante CTR, em sua descoloração pela ação da enzima PEN, vários ensaios foram realizados variando-se a concentração do corante (10 a 60 mg L⁻¹) e mantendo os demais parâmetros constantes (100 µmol L⁻¹ de H₂O₂; extrato enzimático 10,83 U mL⁻¹).

O aumento da concentração do corante até 40 mg L⁻¹ proporcionou um aumento efetivo na remoção da cor (Figura 8). Para concentrações maiores de corante até 60 mg L⁻¹, o aumento na porcentagem de sua remoção foi negligenciável.

Souza, Forgiarini e Souza (2007) avaliaram o efeito da concentração do corante na remoção do CTR por horshedish peroxidase - HPR (29,85 U mL⁻¹). Nas condições experimentais de 5 x 10⁻³ mL enzima por mL de solução de corante, 2x10⁻³ mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio, pH 4,0 e temperatura de 30°C, a maior descoloração foi obtida em uma concentração de corante de 100 mg L⁻¹.

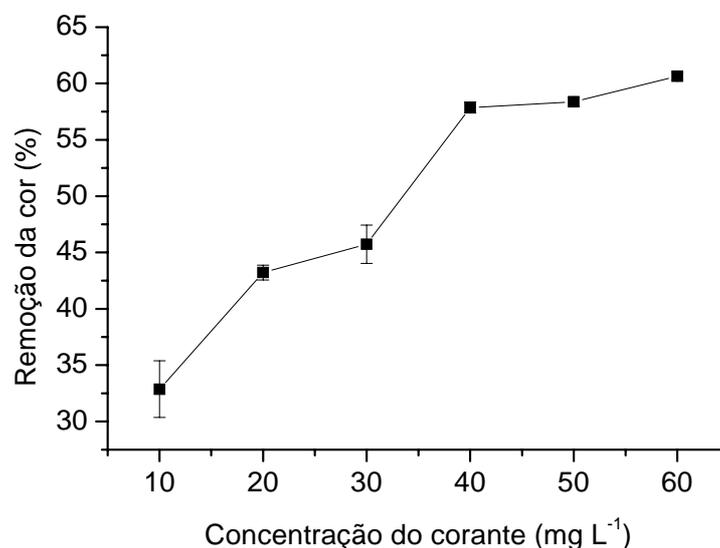


Figura 8 Efeito da concentração do corante turqueza remazol G 133% em sua descoloração por peroxidase de nabo (10,83 U mL⁻¹)

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

3.6 Descoloração enzimática do corante turqueza remazol G 133% catalisada por HPR e PEN

O CTR é muito utilizado pelas indústrias têxteis. Pertence à classe de corantes reativos, apresenta um grupo monofuncional e, como grupo reativo, a vinilsulfona (FORGIARINI, 2006).

A remoção do corante em solução aquosa (50 mg L⁻¹) catalisada pela HPR (22 U mL⁻¹) foi de 41,0 \pm 1,2%, em 50 minutos de contato com a enzima, enquanto que catalisada pela PEN (20,3 U mL⁻¹) a remoção foi de 56,0 \pm 0,83% nas mesmas condições de ensaio (Figura 9).

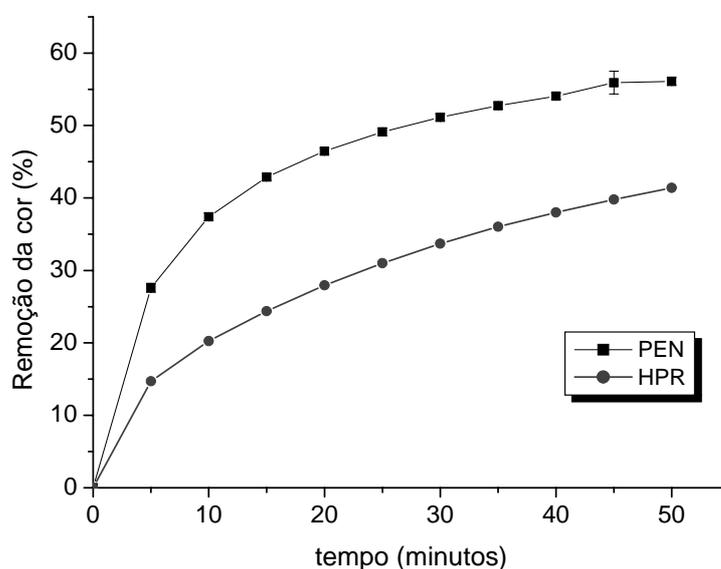


Figura 9 Descoloração do corante turqueza remazol G 133% catalisada pela enzima comercial horsehadish peroxidase (HPR) e por peroxidase do nabo (PEN)

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza, Forgiari e Souza (2007) que obtiveram 59% de remoção do CTR em solução aquosa com a HPR, nas seguintes condições: concentração do corante 100 mg mL^{-1} ; HPR $29,85 \text{ U mL}^{-1}$, H_2O_2 $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e pH entre 4,0 e 5,0, a 30°C .

A PEN apresentou um potencial de degradação deste corante superior à HPR sem etapas de purificação, que aumentariam o custo do processo de obtenção da enzima, podendo ser utilizada como uma alternativa economicamente viável na remoção da cor em efluentes coloridos.

3.7 Efeito da adsorção do corante pelo extrato enzimático

Não houve adsorção do corante pelo extrato enzimático, uma vez que, na ausência de peróxido de hidrogênio, não houve redução da cor. Isso indica que a descoloração ocorre exclusivamente em função da atividade catalítica da enzima.

4 CONCLUSÃO

O nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*) é a fonte com mais alta atividade enzimática dentre os vegetais estudados.

A solução extratora contendo NaCl 0,2 mol L⁻¹ acarreta maior aumento da atividade enzimática da peroxidase de nabo (extrato bruto enzimático). Essa enzima apresenta atividade máxima em pH 7,0 e é ativa na faixa de temperatura de 30° a 50°C, o que favorece a sua utilização em processos industriais. Na purificação parcial da peroxidase, o agente precipitante mais eficiente foi a acetona.

A peroxidase obtida do nabo mostrou-se eficiente na degradação do corante têxtil turqueza remazol G 133% e apresenta potencial como uma alternativa eficiente e de baixo custo na remoção da cor de efluentes têxteis ou efluentes contendo corantes, visto que os tratamentos convencionais são pouco eficientes na remoção da cor de corantes solúveis, como os corantes reativos. No entanto, a eficiência deste catalisador mostrou-se dependente das concentrações de enzima, do corante e de H₂O₂ utilizadas no ensaio.

A PEN apresentou potencial de degradação do CTR superior ao da enzima comercial horshadish peroxidase, nas mesmas condições de ensaio.

REFERÊNCIAS

BELTRAME, L. T.C. **Sistemas microemulsionados aplicados á remoção da cor de efluentes têxteis**. 2006. 148 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 72, n. 5, p. 562-567, Mar. 2001.

CONNELLY, A. et al. Study of the mass spectrometry behaviour of phthalocyanine and azo dyes using electrospray ionisation and matrix-assisted laser desorption/ionisation. **Rapid Communications in mass spectrometry**, Chichester, v. 15, n. 22, p. 2076-2084, 2001.

DEC, J.; BOLLAG, J. M. Use of plant material for the descontamination of water polluted with phenols. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 44, n. 9, p. 1132-1139, Nov. 1994.

DEURZEN, P. J. V. M.; RANTWIJK, F. V.; SHELDON, R. A. Selective oxidations catalyzed by peroxidases. **Tetrahedron**, Oxford, v. 53, n. 5, p. 13183-13220, May 1997.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6 (build 6.1) software. Lavras: DEX/UFLA, 2003. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/danielff/dff02.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

FERREIRA LEITÃO, V. S.; CARVALHO, M. E. A.; BON, E. P. S. Lignin peroxidase efficiency for methylene blue decolouration: Comparison to reported methods. **Dyes and Pigments**, London, v. 74, p. 230-236, June 2007.

FERREIRA LEITÃO, V. S.; SILVA, J. G.; BON, E. P. S. Methylene Blue and Azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases. **Applied Catalysis B: Environmental**, New York, v. 42, p. 213-221, Sept. 2003.

FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima horseradish peroxidase (HRP)**. 2006. 110 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

KIM, G. Y. et al. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 126, p. 183-188, Nov. 2005.

HOLSCHUH, H. J. **Isolamento, purificação e caracterização bioquímica de peroxidase da carambola (*Averrhoa carambola*, L.)**. 2000. 159 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

HOSHINO, F. et al. Thermally stable and hydrogen peroxide tolerant manganese peroxidase (MnP) from *Lenzites betulinus*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 530, n. 1, p. 249-252, 2002.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. Leaves. **Ciências e Tecnologias de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 221-225, 2007.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* Desf com alta atividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 735-739, out./dez. 2006.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 932-939, 2006.

REGALADO, C.; GÁRCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, New York, v. 3, n. 1/2, p. 243-256, 2004.

SOARES, C. M. F. S. et al. Efeito do polietilenoglicol e da albumina na imobilização de lipase microbiana e na catálise em meio orgânico. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 832-838, 2003.

SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E.; SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 147, p. 1073-1078, June 2007.

TIMOFEEVSKI, S. L.; READING, N. S.; AUST, S. D. Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v. 356, n. 2, p. 287-295, 1998.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. **Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 15, n. 1, p. 49-127, 1981.

WILBERG, K.; ASSENHAIMER, C.; RUBIO, J. Removal of aqueous phenol catalysed by a low purity soybean peroxidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v. 77, p. 851-857, 2002.

WU, J. et al. Effect of H₂O₂ addition mode on enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, Ottawa, v. 72, n. 5, p. 881-886, 1994.

ZERAIK, A. E. et al. Development of a spot test for peroxidase activity monitoring during a purification procedure. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

CAPÍTULO 3

**ESTUDO DOS PRODUTOS DA DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DO
CORANTE TURQUEZA REMAZOL G 133% POR PEROXIDASE DE
NABO (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*).**

RESUMO

Os corantes ftalocianínicos têm como grupo cromóforo a ftalocianina. A maior parte desses corantes é um complexo metálico de cobre (ftalocianinas de cobre). São altamente solúveis em água, resistentes à degradação microbiana e, na maioria das vezes, não são removidos pelos tratamentos convencionais. A remoção de corantes ftalocianínicos por peroxidases fúngicas ou vegetais tem sido muito relatada na literatura. No entanto, o mecanismo de degradação e os possíveis metabólitos formados a partir da oxidação enzimática desses corantes nem sempre são conhecidos. Neste trabalho, os produtos de degradação do corante turqueza remazol G 133% (CTR) pela peroxidase de nabo (PEN) foram analisados por HPLC/MS/ESI e por HPLC - DAD. A toxicidade do corante antes e após o tratamento enzimático foi avaliada utilizando-se sementes de alface (*Lactuca sativa*) como bioindicador. A PEN foi capaz de remover $58,0 \pm 3,74\%$ do CTR em solução aquosa em 50 minutos. Os possíveis produtos de degradação do CTR pela PEN identificados por HPLC/MS neste trabalho foram o metabólito I de m/z 437 $[M+H]^+$ e o metabólito II de m/z 524. Um mecanismo de oxidação envolvendo, a clivagem das ligações de nitrogênio no interior do anel da ftalocianina e a liberação dos íons Cu^{2+} do complexo metálico, foi proposto. O corante bruto não apresentou efeito significativo na inibição do crescimento das radículas de alface. No entanto, após o tratamento enzimático, houve aumento na toxicidade, sugerindo a formação de produtos de degradação mais tóxicos do que a molécula parental. Dessa forma, o processo enzimático deve ser combinado com métodos biológicos, para promover a degradação microbiana dos metabólitos formados. Esse aumento da toxicidade pode também ser atribuído à liberação dos íons Cu^{2+} da estrutura do corante.

Palavras-chave: Nabo. Degradação enzimática. HPLC/MS/ESI. Metabólitos.

**STUDY OF THE PRODUCTS OF THE ENZYMATIC DEGRADATION
OF THE DYE REMAZOL TURQUOISE G 133% BY TURNIP
PEROXIDASE (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*).**

ABSTRACT

Phthalocyanine dyes possess as a chromophore group phthalocyanine. Most of these dyes is a metallic complex of copper (copper phthalocyanines). They are highly soluble in water, resistant to degradation and most times they are not removed by conventional treatments. The removal of phthalocyanine dyes by either fungal or plant peroxidases has been much reported in the literature. However, the degradation mechanism and the possible metabolites formed from the enzymatic oxidation of these dyes are not always known. In this work, the degradation products of the dye remazol turquoise G 133% (DRT) by the turnip peroxidase (TNP) were analyzed by HPLC/MS/ESI and by HPLC - DAD. The toxicity of the dye both before and after the enzymatic dye was evaluated by utilizing lettuce seeds (*Lactuca sativa*) as a bio-indicator. PEN was capable to remove $58.0 \pm 3.74\%$ of the DRT in aqueous solution in 50 minutes. The possible degradation products of the DRT by TNP identified by HPLC/MS in this work were metabolite I of m/z 437 $[M+H^+]$ and metabolite II of m/z 524. A oxidation mechanism involving the cleavage of the nitrogen bonds in the interior of the phthalocyanine ring and the release of the Cu^{2+} ions of the metallic complex was proposed. The raw dye presented no significant effect in the inhibition of the growth of the lettuce radicles. Nevertheless, after the enzymatic treatment, there was an increase in toxicity, suggesting the formation of degradation products more toxic than the parental molecule. In this way, the enzymatic process must be combined with biological methods to promote microbial degradation of the formed metabolites. The increased toxicity may also be ascribed to the release of the Cu^{2+} ions of the dye structure.

Key words: Turnip. Enzymatic degradation. HPLC/MS/ESI. Metabolites.

1 INTRODUÇÃO

O corante reativo turquesa remazol G 133% (C. I. reactive blue 21) é muito utilizado pelas indústrias têxteis e tem como grupo cromóforo ftalocianina de cobre (Figura 1) e o grupo reativo vinilsulfônico.

A ftalocianina é uma molécula composta por 56 átomos, apresentando em sua formulação 32 carbonos, 16 hidrogênios e 8 nitrogênios. Esta molécula é um macrociclo de carbono, podendo hospedar em seu centro um átomo metálico, como Zn, Cu, Mn, Ni, Pt e Al, ou, simplesmente, dois hidrogênios (CASAGRANDE; ROCHA, 2006).

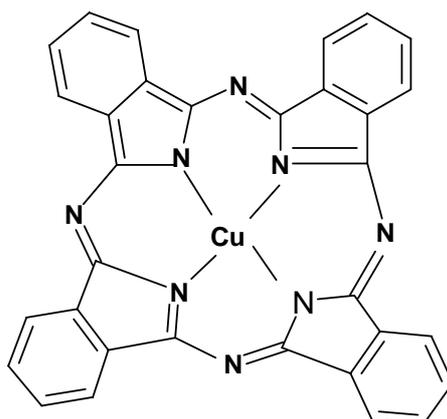


Figura 1 Estrutura da ftalocianina de cobre

O grupo ftalocianina é, provavelmente, a classe de corantes mais estável entre todas as atualmente utilizadas, assumindo tonalidades verdes ou azuis, dependendo de seus substituintes. A maior parte destes corantes é um complexo metálico de cobre (ftalocianinas de cobre) por apresentar boas propriedades de cor e resistência (BELTRAME, 2006).

As propriedades inerentes a essa classe de corantes, como solidez de cor, estabilidade e resistência a degradação oxidativa, dificulta a remoção da cor de efluentes têxteis. Os corantes reativos que possuem a ftalocianina como grupo cromóforo são altamente solúveis em água, resistentes à degradação biológica sob condições aeróbicas, e não são eficientemente removidos por adsorção na biomassa em plantas de tratamento de efluentes, resultando em efluentes coloridos (MATTHEWS; BOOTTOMLEY; PAVLOSTATHIS, 2009).

Além disso, são potencialmente mutagênicos e de especial toxicidade por apresentarem em sua estrutura metais pesados, como o Cu e Ni. A toxicidade do cobre está relacionada à interação com proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, metabólitos e membranas celulares. O Cu também é conhecido por inibição da atividade fotossintética e da divisão celular em algas (FLEMMING; TREVORS, 1989).

A remoção de corantes ftalocianínicos em solução aquosa por peroxidases tem sido muito relatada nos últimos anos, especialmente por fungos produtores de enzimas lignolíticas, ou fungos de degradação branca. A descoloração de dois corantes reativos ftalocianínicos, reactive blue 15 e reactive blue 38, por *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* foi demonstrada por Heinfling et al. (1998). Souza, Forgiarini e Souza (2007) obtiveram 59% de remoção do corante turqueza remazol G 133% (Reactive Blue 21) por horsetradish peroxidase.

No entanto, o mecanismo de degradação e os possíveis metabólitos formados a partir da oxidação enzimática desses corantes nem sempre são conhecidos. A identificação dos metabólitos formados é importante para compreender a quebra desta estrutura complexa e quimicamente estável (MATTHEWS; BOOTTOMLEY; PAVLOSTATHIS, 2009).

Além disso, para avaliar a eficiência do tratamento enzimático é necessário avaliar outro parâmetro importante, a formação de substâncias tóxicas

durante o tratamento, o que pode ser feito por meio da utilização de bioindicadores.

A toxicologia envolve o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos adversos de substâncias químicas ou outros materiais antropogênicos sobre os organismos expostos. Os testes de toxicidade consistem em se expor organismos representativos durante um período determinado a várias concentrações de uma ou mais substâncias e avaliar os efeitos causados. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos chamados subletais, tais como mudanças no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução e no comportamento, entre outros (ABRAHÃO; SILVA, 2002).

Via de regra, são recomendados testes com três tipos de organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos do ambiente, sendo eles produtores primários, representados por algas ou plantas superiores, consumidores primários, tais como microcrustáceos e consumidores secundários representados por peixes (DELLAMATRICE, 2005).

No que diz respeito à degradação e ou à remoção de corantes em solução aquosa, para que a degradação seja considerada eficiente deve resultar em redução nos níveis de toxicidade sem a formação de metabólitos tóxicos. Caso o tratamento utilizado resulte em compostos de toxicidade mais elevada que a molécula parental, outros tratamentos devem ser combinados, como a degradação microbiana utilizada nos tratamentos convencionais de efluentes.

Neste estudo, os produtos formados durante a descoloração enzimática do corante ftalocianínico turqueza remazol G 133% (CTR) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC-MS). A toxicidade do corante antes e após o tratamento enzimático também foi avaliada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos descritos neste capítulo foram realizados no Departamento de Química da Universidade do Minho, cidade de Braga, Portugal e no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

2.1 Corante

O corante turqueza remazol G 133% (reactive blue 21) – CTR utilizado nos ensaios de oxidação foi gentilmente cedido pela Dy Star (Brasil).

2.2 Obtenção do extrato enzimático

A fonte enzimática utilizada foi proveniente das raízes do nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*). As raízes (com a casca) foram lavadas em água corrente e picadas em pequenos pedaços uniformes. Uma massa de 25 g do tecido vegetal foi homogeneizada em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 6,5, por 30 segundos. O homogenato foi filtrado em tecido organza e centrifugado, a 10.000 x g, durante 15 minutos, a 4°C (FATIBELLO FILHO; VIEIRA, 2002).

Ao extrato bruto enzimático (proveniente de 12 extrações) foi adicionada acetona gelada, até atingir 65% (v/v). Após repouso de 12 a 14 horas, a -18°C, o homogenato foi centrifugado, a 11.000 x g, por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e a acetona foi posteriormente recuperada, pelo Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos da UFLA, por destilação simples em um rotaevaporador, à temperatura controlada de 56°C. O precipitado foi colocado em geladeira, para a remoção dos resíduos de acetona, por 72 horas e,

em seguida, ressuspêndido em 15 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 6,5. A solução obtida foi utilizada nos ensaios de descoloração.

2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática do extrato enzimático foi determinada segundo Khan e Robinson (1994), conforme descrito no item 4.4, capítulo 2.

2.4 Ensaios de descoloração do CTR

As reações de oxidação enzimática do CTR foram conduzidas, a 30°C, em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 (1,2 mL), contendo: (1) H₂O₂ 100 µmol L⁻¹ (0,4 mL), (2) o corante turqueza remazol G 133%, na concentração de 50 mg L⁻¹ (1,5 mL) e 0,1 mL de solução enzimática (26,16 U mL⁻¹).

A mistura reacional foi incubada em espectrofotômetro acoplado a um banho termostatizado, por 50 minutos. O acompanhamento da oxidação foi feito ao comprimento de onda máximo do corante, a 624 nm. O cálculo para determinar a porcentagem de remoção de cor foi feito de acordo com a equação:

$$\%remoção = \frac{absorbância_{inicial} - absorbância_{final}}{absorbância_{inicial}} \times 100$$

Após o tratamento enzimático, a solução do corante foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC-MS) e à avaliação de toxicidade utilizando *Lactuca sativa* como bioindicador.

2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com modo de ionização *electrospray*

As análises por HPLC/MS foram realizadas no Departamento de Química da Universidade do Minho, cidade de Braga, Portugal.

Os produtos formados da biodescoloração do CTR por peroxidase de nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*) foram analisados por cromatografia.

As amostras foram filtradas em membranas de ultrafiltração (millipore) com peso molecular de corte (*cut off*) igual a 50 kDa, antes da injeção no cromatógrafo.

As análises de HPLC/MS/ESI foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Thermo Surveyor (bomba de gradiente, amostrador automático e detector de arranjo de diodos) acoplado a um espectrômetro de massas Thermo LXQ Linear Ion Trap. O espectrômetro de massas no modo de ionização *electrospray* e o detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) foram utilizados em paralelo. Para a detecção na região do ultravioleta (UV) utilizando o detector de arranjo de diodos, fez-se uma varredura na faixa de 200 a 800 nm.

Um volume de 20 μL da amostra foi injetado e a separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Hypersil GOLD (100 x 4,6 mm). Uma mistura metanol/água (água acidificada 1%, v/v) foi utilizada como fase móvel, a um fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, em 10 minutos.

2.6 Toxicidade

Foram colocadas 20 sementes de alface (*Lactuca sativa*) sobre papel de filtro Whatman nº 1, em placa de poliestireno ($\text{Ø} = 9 \text{ cm}$) embebido em 2 mL de cada diluição da amostra (100%, 75%, 50% e 25%). As amostras foram incubadas no escuro envoltas por papel de alumínio e, após 72 horas, foram

avaliados a germinação das sementes e o comprimento das radículas para o cálculo da CI_{50} (DUTKA, 1989). O parâmetro CI_{50} corresponde à concentração do agente tóxico que causa letalidade ou outro efeito sobre 50% dos organismos em teste (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2006).

As amostras utilizadas foram o corante CTR puro e, após o tratamento enzimático e como controle, utilizou-se água destilada. A porcentagem de inibição foi calculada segundo a equação:

$$\%inibição = \frac{\text{comprimentomédiodocontrole} - \text{comprimentomédiodaamostra}}{\text{comprimentomédiodocontrole}} \times 100$$

Elaborou-se um gráfico dose-resposta em que, na ordenada, colocou-se a porcentagem de inibição e na abscissa a concentração. Com base no gráfico, a concentração que produz 50% de inibição foi calculada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaios de descoloração com CTR

A peroxidase obtida do nabo (PEN) na concentração de $26,16 \text{ U mL}^{-1}$ foi capaz de remover $58,00 \pm 3,74\%$ do CTR em solução aquosa, após 50 minutos de incubação.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza, Forgiari e Souza (2007) que obtiveram 59% de remoção do CTR em solução aquosa com a horseradish peroxidase (HPR), nas seguintes condições: concentração do corante 100 mg mL^{-1} , HPR $29,85 \text{ U mL}^{-1}$, H_2O_2 $2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, pH entre 4,0 e 5,0 a 30°C e tempo de contato com a enzima de 45 minutos.

3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com modo de ionização *electrospray*

Para detectar os intermediários de degradação ou metabólitos estáveis formados durante a oxidação do corante CTR pela PEN, o corante tratado foi analisado por HPLC/MS.

A Figura 2 (A) representa o cromatograma obtido no sistema HPLC – DAD do CTR (50 mg L^{-1}) antes do tratamento enzimático, mostrando dois picos máximos de retenção, em 2,80 e em 3,67 minutos. O perfil cromatográfico do CTR após tratamento com a PEN (Figura 2B) mostrou um deslocamento do pico de retenção a 3,72 minutos e a formação de um pico adicional a 3,15 minutos. O pico que apareceu a 2,80 minutos na amostra controle, não foi detectado após o tratamento enzimático. Esses dados confirmaram a quebra da molécula parental e a formação de novos produtos.

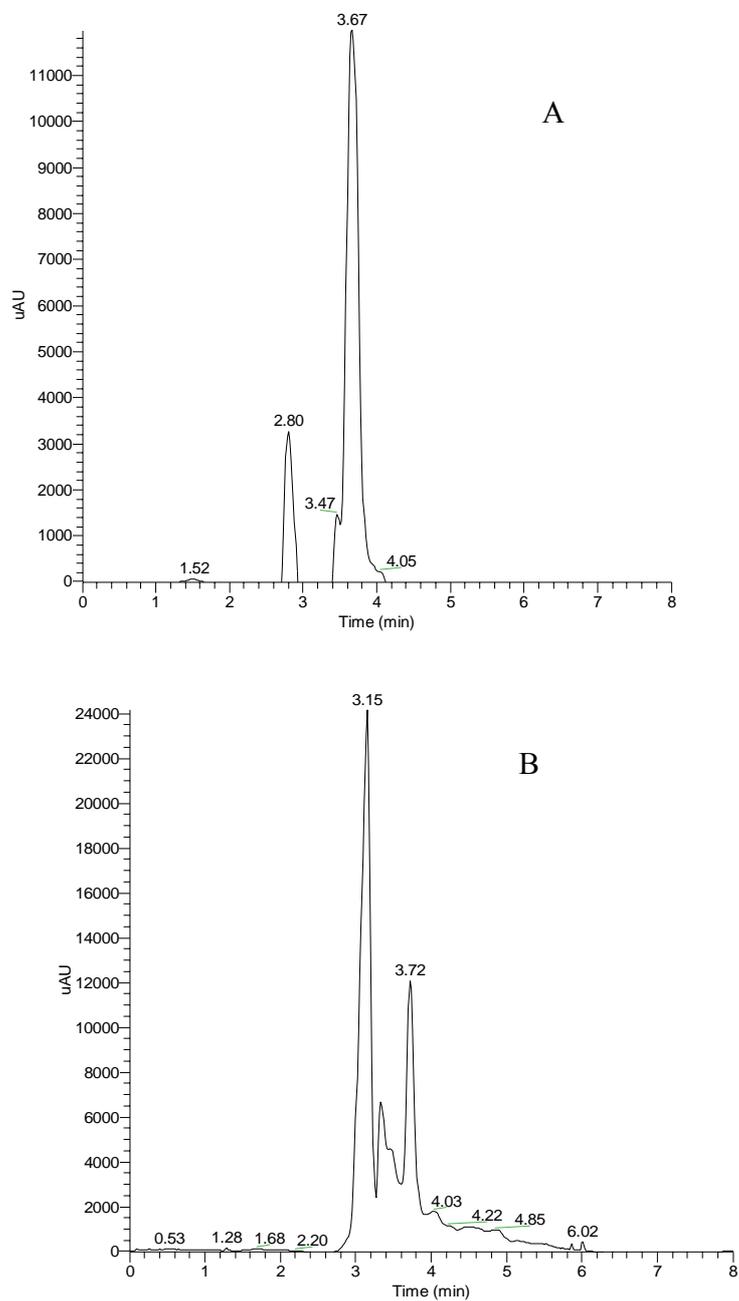


Figura 2 Cromatogramas obtidos por HPLC – DAD (A – controle, B – corante após tratamento enzimático com peroxidase de nabo)

O cromatograma obtido por HPLC-MS no modo ESI+ para o corante CTR após o tratamento enzimático mostrou a formação de dois picos intensos em 3,72 minutos e 3,96 minutos (Figura 3). Os espectros de massas para ambos os picos estão representados na Figura 4.

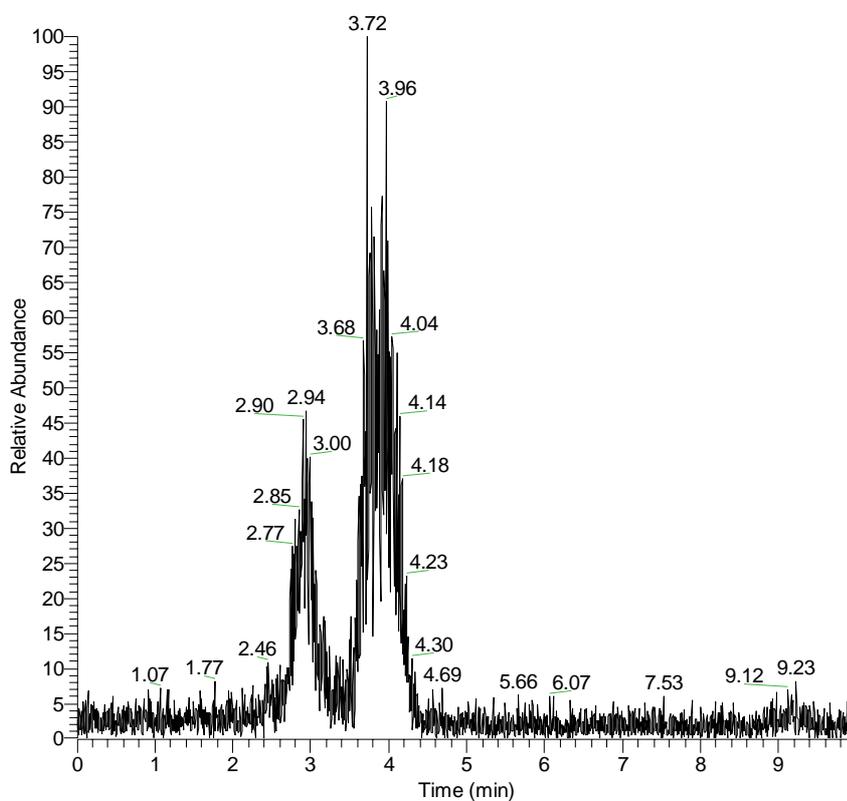


Figura 3 Cromatograma obtido por HPLC – MS/ESI+ para o corante CTR após tratamento enzimático com peroxidase de nabo

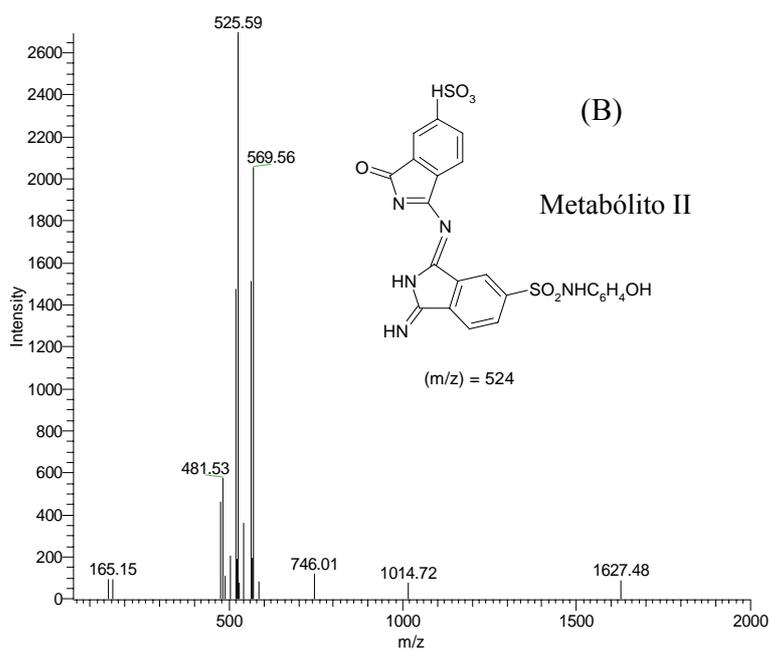
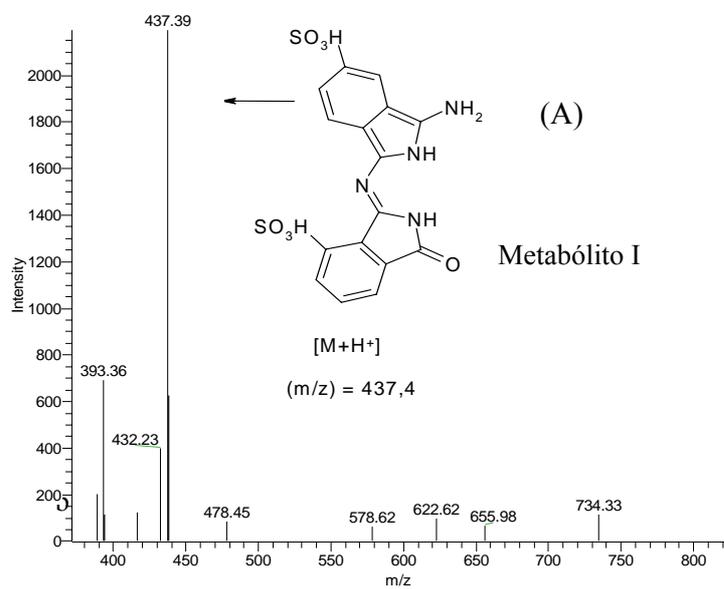


Figura 4 Espectros de massas dos produtos de reação do CTR após tratamento com peroxidase de nabo (A - tr 3,71 minutos e B - tr 3,96 minutos)

Alguns estudos relatam a formação de ftalamidas como produtos de degradação de corantes ftalocianínicos por peroxidases, bem como a liberação de íons Cu^{2+} do complexo metálico. Heinfling-Weidtmann et al. (2001) estudaram os produtos de degradação dos corantes têxteis “reactive blue 15” (RB15) e “reactive blue 38” (corantes ftalocianínicos) pelo fungo de degradação branca *Bjerkandera adusta*. As sulfoftalamidas (SPI; 3 e 4) foram identificadas por HPLC/MS como metabólitos majoritários formados durante a oxidação do corante RB15 e um esquema de oxidação foi proposto (Figura 5).

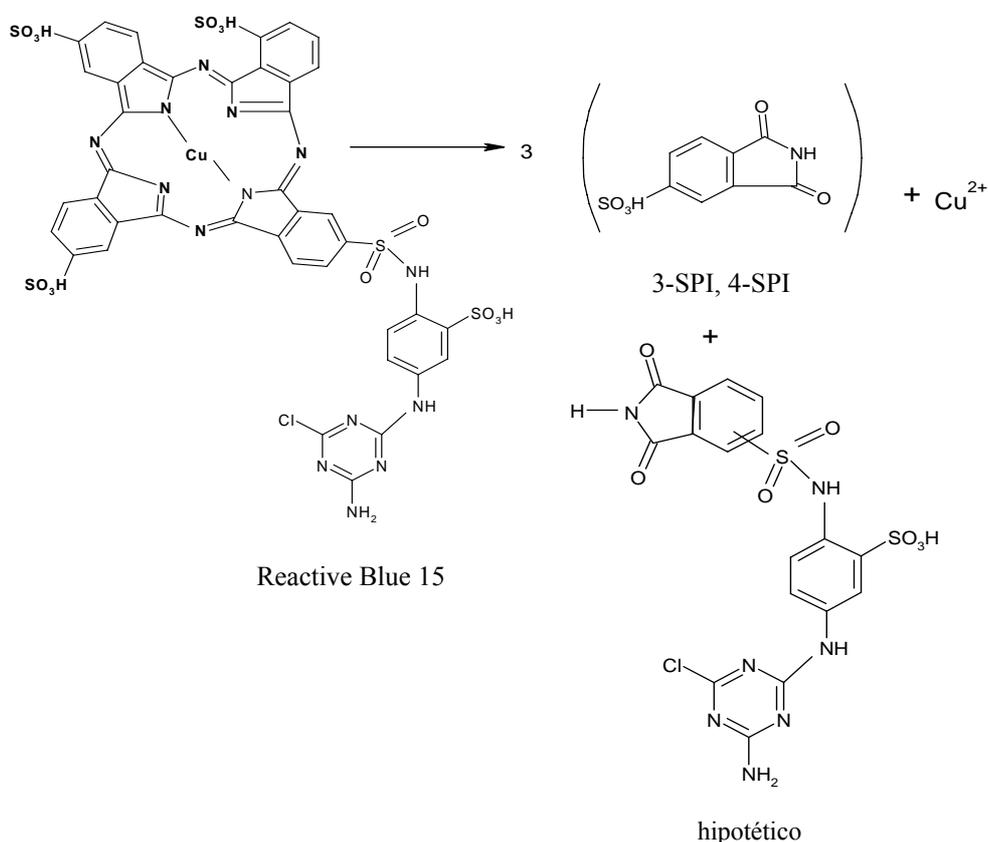


Figura 5 Mecanismo sugerido para a oxidação enzimática do corante RB15 por peroxidase de *Bjerkandera adusta*.

Fonte: Weidtmann et al.(2001)

Conneely et al. (2002) utilizaram também o fungo de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium* para a descoloração do CTR e obtiveram a ftalamida como metabólito majoritário. Outros produtos intermediários foram obtidos, mas não foram identificados.

Os possíveis produtos de degradação do CTR pela PEN identificados por HPLC/MS neste trabalho foram o metabólito I de m/z 437 [M+H⁺] e o metabólito II de m/z 524 (Figura 4).

Com base nos relatos de estudos anteriores e nos espectros de massa LC/MS obtidos para os produtos de oxidação do CTR pela PEN, foram sugeridas estruturas para os metabólitos I e II e proposto um mecanismo de oxidação (Figura 6).

Os produtos majoritários formados envolvem a clivagem das ligações de nitrogênio no interior do anel da ftalocianina e a liberação dos íons Cu²⁺ do complexo metálico. Pode-se observar, ainda, a clivagem da cadeia lateral do CTR, durante a formação do metabólito II.

A razão massa carga do metabólito II proposto de 524 não coincidiu com a razão massa carga obtida para um dos picos observados no espectro de massas referente ao tempo de retenção de 3,96 minutos (525,59). Provavelmente, essa discrepância de uma unidade de massa é decorrente de transformações na cadeia lateral como o ganho de prótons por exemplo.

O metabólito II, provavelmente, é um fragmento referente ao metabólito de m/z 569,56, cuja estrutura não foi identificada. Essa fragmentação pode ocorrer em função de transformações oxidativas também na cadeia lateral

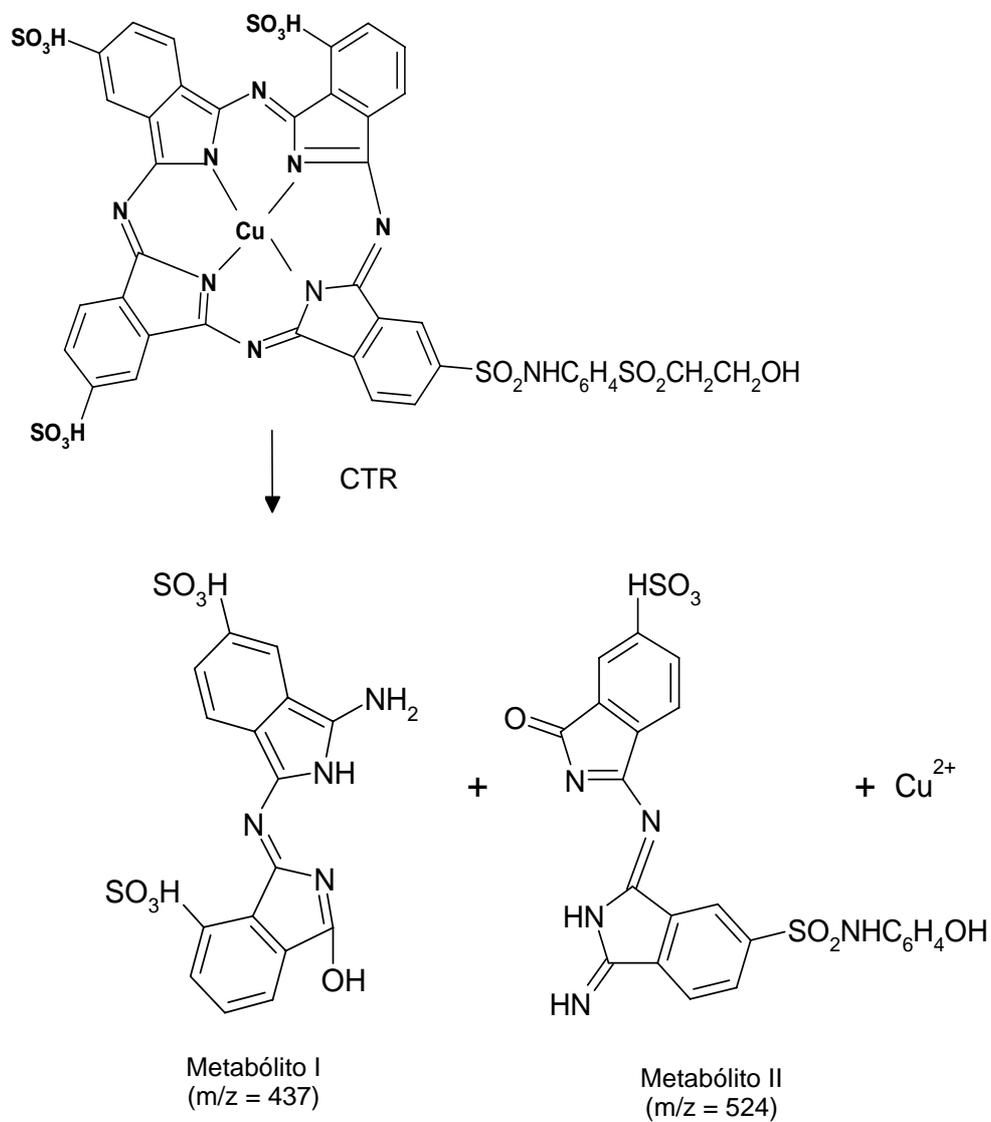


Figura 6 Mecanismo sugerido para a oxidação enzimática do CTR por peroxidase de nabo

As análises de HPLC/MS, portanto, permitiram a identificação de três metabólitos majoritários, tendo a estrutura de dois destes sido proposta. A liberação dos íons Cu^{2+} do complexo metálico também foi bastante evidenciada, o que pode contribuir para o aumento da toxicidade do corante após oxidação enzimática.

3.3 Toxicidade

A toxicidade do CTR foi avaliada antes e após o tratamento enzimático utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*) como bioindicador.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados do teste de inibição sobre o crescimento das radículas de alface, nas concentrações de 100%, 50%, 75% e 25% do corante CTR e após o tratamento enzimático. Como controle negativo utilizou-se a água.

Tabela 1 Porcentagens de inibição sobre o crescimento das radículas de alface para o corante CTR após tratamento enzimático

| Tratamentos | Concentração (%) ¹ | | | | CI ₅₀ (%) |
|-----------------|-------------------------------|-----------|------------|----------|-------------------------|
| | 100 | 75 | 50 | 25 | |
| Corante puro | 7,42±1,6 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | 0,0±0,0 | - |
| Corante tratado | 61,50±2,3 | 50,26±1,0 | 30,31± 4,9 | 12,3±2,5 | 74,60 |

¹Dados são a média de três repetições ±desvio padrão.

O teste de inibição sobre o crescimento das radículas de alface com o corante mostrou baixa toxicidade. Na concentração de 100% foi encontrada apenas 7,42% de inibição sobre os organismos, enquanto nas demais

concentrações não houve inibição, não sendo possível calcular a CI_{50} . No entanto, após o tratamento enzimático, houve um aumento na toxicidade ($CI_{50} = 74,60\%$).

Souza, Forgiarini e Souza (2007) avaliaram a toxicidade aguda do CTR utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* antes e após o tratamento com a enzima HPR. O corante apresentou baixa toxicidade ($CI_{50} = 87,5\%$); no entanto, após o tratamento enzimático, a toxicidade foi mais elevada ($CI_{50} = 60,70\%$), causando expressiva mortalidade dos microcrustáceos.

A descoloração enzimática do CTR por peroxidase envolve a liberação da molécula de cobre da estrutura do corante, como pode ser observado neste trabalho, por meio das análises de HPLC/MS e suportado por estudos anteriores (HEINFLING-WEIDTMANN et al., 2001). Neste caso, a toxicidade do CTR após o tratamento enzimático pode ser atribuída, em parte, à presença de íons Cu^{2+} em solução. O metal inicialmente complexado ao corante não estaria biodisponível, ao passo que, após o tratamento, sua biodisponibilidade seria aumentada, contribuindo para o aumento da toxicidade.

Resultados semelhantes foram observados por Kunz, Mansilla e Duran (2002), que obtiveram aumento da toxicidade do corante CTR após o tratamento com ozônio em função da liberação da molécula de cobre da estrutura do corante. A retirada do Cu^{2+} da solução pode ser realizada por procedimentos de precipitação simples ou por adsorção em argilas ativadas (VENGRIS; BINKIENE; SVEIKAUSKAITE, 2001), zeólitas (PANAYOTOVA, 2001) e carvão ativado (BARROS, 2001).

No entanto, deve-se considerar que a toxicidade após o tratamento enzimático pode ainda ser decorrente da formação de metabólitos mais tóxicos do que a molécula parental. Neste caso, o tratamento enzimático deve ser combinado aos tratamentos biológicos, visto que os metabólitos formados com

massas moleculares menores são mais susceptíveis ao tratamento microbiano, aumentando a biodegradabilidade do corante após o tratamento enzimático.

4 CONCLUSÃO

As análises por HPLC/MS demonstram que a descoloração do corante turqueza remazol G 133%, após incubação com a peroxidase do nabo, corre em função da quebra oxidativa do grupo cromóforo (ftalocianina).

A toxicidade do CTR sobre a inibição do crescimento das radículas de alface (*Lactuca sativa*) aumenta após o tratamento enzimático, o que pode estar relacionado à liberação de Cu^{2+} da estrutura do corante pela ação da enzima e à formação de compostos mais tóxicos que a molécula parental. No entanto, a toxicidade do corante tratado pode ser removida pela combinação com métodos biológicos, visto que os produtos de oxidação formados apresentam massas moleculares menores e são mais polares, sendo mais susceptíveis à degradação microbiana, e, ainda, pela remoção dos íons Cu^{2+} em solução.

Dessa forma, o tratamento enzimático pode representar um passo importante para uma completa degradação microbiana de corantes têxteis, especialmente aqueles classificados como ftalocianínicos.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, A. J.; SILVA, G. A. Influência de alguns contaminantes na toxicidade aguda de efluentes da indústria têxtil. **Química Têxtil**, Barueri, v. 67, p. 8-34, 2002.

BARROS, A. R. B. **Remoção de íons metálicos em água utilizando diversos adsorventes**. 2001. 89 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

BELTRAME, L. T. C. **Sistemas microemulsionados aplicados á remoção da cor de efluentes têxteis**. 2006. 148 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

CASAGRANDE, D.; ROCHA, C. A. Estudos teóricos da estrutura eletrônica da molécula de ftalocianina e sua adsorção sobre a superfície de silício na direção [111]. In: CONGRESSO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 17., 2006. Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: [s. n.], 2006. Disponível em: <<http://www.metallum.com.br/17cbecimat/resumos/17cbecimat-406-009.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2011.

CONNELLY, A.; SMYTH, W. F.; MCMULLAN, G. Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 451, p. 259–270, Aug. 2002.

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da estação de tratamento de águas residuárias de Americana, SP**. 2005. 137 p. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, T. R. Toxicidade de resíduos têxteis tratados por microorganismos. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 63-66, 2006.

DUTKA, B. **Short-term root elongation toxicity bioassay**. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments, Ottawa: National Water Research Institute, 1989.

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n.3, p. 455-464, 2002.

FLEMMING, C. A.; TREVORS, J. T. Cooper toxicity and chemistry in the environment: a review. **Water Air and Soil Pollution**, Amsterdam, v. 44, n. 1/2, p. 143-158, 1989.

HEINFLING, A. et al. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiol.Lett**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 43-50, 1998.

HEINFLING-WEIDTMANN, A. et al. Sulfophthalimide as major metabolite formed from sulfonated phthalocyanine dyes by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 203, n. 2, p. 179-183, 2001.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

KUNZ, A. A.; MANSILLA, H.; DURAN, N. A degradation and toxicity study of three textile dyes by ozone. **Environmental Technology**, London, v. 23, n. 8, p. 911-918, 2002.

MATHEWS, R. D.; BOTTOMLEY, L. A.; PAVLOSTATHIS, S. G. P. Palladium-catalyzed hydrogen reduction and decolorization of reactive phthalocyanine dyes. **Desalination**, Amsterdam, v. 248, n. 1/3, p. 816-825, 2009.

PANAYOTOVA, M. I. Kinetics and thermodynamics of copper ions removal from wastewater by use of zeolite. **Waste Management**, Washington, v. 21, n. 7, p. 671-676, 2001.

SOUZA, S. M. A. G. U.; FORGIARINI, E.; SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 147, p. 1073-1078, June 2007.

VENGRIS, T.; BINKIENE, R.; SVEIKAUSKAITE, A. Nickel, copper and zinc removal from waste water by a modified clay sorbent, applied clay. **Science**, London, v. 18, n. 3/4, p. 183-190, 2001.

CAPÍTULO 4

DESCOLORAÇÃO DE CORANTES INDUSTRIAIS E EFLUENTES TÊXTEIS SIMULADOS POR PEROXIDASE DE NABO.

RESUMO

O potencial de remoção de importantes corantes industriais por peroxidase de nabo (PEN) foi avaliado. Dentre os corantes estudados, os corantes reativos “reactive green 21” e “remazol brilliant blue R” (RBBR) apresentaram as maiores taxas de descoloração, ambos com 66% de remoção da cor, seguidos pelos corantes “acid blue 62” e “metil orange”, com 47% e 50%, respectivamente. O corante azo “reactive orange 16” (RO16) e remazol vermelho ultra (RVU) apresentaram baixa degradabilidade frente ao tratamento enzimático. Os efluentes têxteis, além de corantes residuais, contêm também auxiliares químicos, como sais, detergentes, agentes dispersantes e molhantes utilizados para auxiliar no processo de tingimento. O efeito destes foi avaliado na remoção dos corantes turqueza remazol G 133% (CTR) e do RBBR pela PEN em efluentes sintéticos que simulam as etapas do processo de tingimento. A descoloração obtida para o efluente sintético contendo o CTR foi de 37%, em 95 minutos de contato com a enzima, enquanto que, para o efluente contendo o RBBR, foi de 58%, em 90 minutos. Houve um decréscimo no potencial de degradação dos corantes no efluente simulado em relação aos corantes isolados, o que indica que a presença de sais e auxiliares químicos tem um efeito negativo na atuação da enzima. Esse efeito pode ser atenuado pela imobilização da enzima em suporte sólido e processos combinados. A descoloração da mistura dos corantes reativos RBBR, RVU e RO16 pela PEN também foi avaliada. A ação da enzima sobre a remoção da cor da mistura de corantes foi equivalente à dos corantes isolados. A demanda química de oxigênio (DQO) no efluente após o tratamento enzimático teve um aumento significativo em relação ao efluente não tratado, o que pode ser atribuído à adição de matéria orgânica adicional na forma de extrato vegetal (enzima), em função da presença de corante residual não degradado e de produtos formados durante a reação enzimática. A remoção da DQO pode ser realizada pela combinação dos tratamentos microbianos convencionais.

Palavras-chave: Nabo. Peroxidase. Efluente sintético. Descoloração.

**DESCOLORATION OF INDUSTRIAL DYES AND SIMULATED
TEXTILE EFFLUENTS DYES BY TURNIP PEROXIDASE.**

ABSTRACT

The removal potential of important industrial dyes by turnip peroxidase (TNP) was evaluated. Out of the investigated dyes, the reactive dyes reactive green 21 and remazol brilliant blue R (RBBR) presented the highest discoloration rates, both with 66% of removal, followed by the dyes acid blue 62 and methyl orange with 47 and 50%, respectively. The dye azo reactive orange 16 (RO16) and remazol ultra red (RUV) presented poor degradability as compared with the enzymatic treatment. The textile effluents besides the residual dyes contain also chemical auxiliaries such as salts, detergents, dispersing and wetting agents and utilized to help in the dyeing process. The effect of these was evaluated in the removal of the dyes remazol turquoise G 133% (DRT) and of RBBR by TNP in synthetic effluents which simulate the steps of dyeing process. The discoloration obtained for the synthetic effluent containing the CTR was of 37% in 95 minutes of contact with the enzyme, whilst for the effluent containing the RBBR, it was of 58% in 90 minutes' time. There was a decrease in the degradation potential of the dyes in the effluent simulated in relation to the single dyes, which points out that the presence of salts and chemical auxiliaries have a negative effect upon the acting of the enzyme. This effect can be mitigated by the immobilization of the enzyme on a solid support and combined processes. The discoloration of the mixture of the reactive dyes RBBR, RUV and RO16 by TNP was also evaluated. The action of the enzyme on colour removal of dye mixture was equivalent to the dyes alone. The chemical demand of oxygen (CDO) in the effluent after enzymatic treatment had a significant increase in relation to the untreated effluent, which can be ascribed to the addition of additional organic in the form of plant extract (enzyme) based on the presence of the non-degraded residual dye and products formed during the enzymatic reaction. The removal of the CDO can be carried out by the combination of the additional conventional microbial treatments.

Key words: Turnip. Peroxidase. Synthetic effluent. Decolorization

1 INTRODUÇÃO

Os efluentes têxteis não contêm apenas corantes residuais, mas também auxiliares químicos, como surfactantes, sais, óleos e graxas. Os principais auxiliares químicos utilizados no processo de tingimento, como sais, detergentes, agentes sequestrantes e dispersantes, contribuem para a complexidade do tratamento de efluentes têxteis (WANG et al., 2002). Substâncias como detergentes e dispersantes podem interromper a remoção do nitrogênio por bactérias nitrificantes em processos de lodo ativado (BOHM, 1994; VANDEVIVERE; BIANCHINI; VERSTRAETE, 1998).

O tingimento com corantes reativos baseia-se na formação de ligações covalentes com os grupos hidroxila ionizados da celulose, a pH alcalino e temperaturas elevadas. Nestas condições, a hidrólise do corante ocorre como uma reação secundária, impossibilitando que este se ligue covalentemente à fibra. Parte do corante hidrolisado pode ainda ser absorvida pela celulose como se fosse um corante direto, mas o restante acaba por ser perdido para o efluente (SANTOS, 2009). Portanto, banhos de tingimento contendo corantes reativos além dos auxiliares químicos e sais contêm também corantes hidrolisados.

Quando não tratados adequadamente, e lançados em águas naturais, os efluentes provenientes da indústria de corantes ou de processos envolvendo tingimento de fibras têxteis podem modificar o ecossistema, diminuindo a transparência da água e a penetração da radiação solar, o que pode modificar a atividade fotossintética e o regime de solubilidade dos gases (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

Uma combinação de processos físicos, químicos e biológicos tem sido proposta para a remoção da cor, entretanto, geralmente, são processos de custo elevado (HAI; YAMAMOTO; FUKUSHI, 2007; ROBINSON et al., 2001).

Devido ao fato de os padrões de preservação ambiental serem cada vez mais exigentes, há a necessidade de tecnologias eficientes e mais baratas para o tratamento de efluentes coloridos.

Nos capítulos anteriores, foi avaliada a descoloração do corante reativo turqueza remazol G 133% (CTR) por peroxidase de nabo (PEN). A enzima foi capaz de remover até 60% do corante em solução aquosa. No entanto, para avaliar a aplicabilidade do processo de descoloração para uma situação real, é preciso avaliar o impacto de auxiliares químicos normalmente presentes em banhos de tingimento contendo corantes reativos.

Nesse contexto, neste trabalho, foi avaliada a descoloração dos corantes reativos turqueza remazol G 133% (CTR) e remazol brilliant blue R (RBBR) após a hidrólise alcalina, visto que eles se encontram na forma hidrolisada após o processo de tingimento.

A remoção destes corantes pela PEN foi avaliada também no efluente têxtil sintético que simula as etapas de pré-tratamento e tingimento e apresenta em sua constituição sais e auxiliares químicos. Um banho de tingimento artificial possui uma composição constante e, portanto, o efeito do tratamento enzimático pode ser mais bem entendido neste caso (CRISTÓVÃO et al., 2009a).

Os efluentes reais normalmente incluem mais de um componente de cor. Sendo assim, a descoloração de uma mistura de três corantes reativos pela PEN também foi avaliada, bem como a sua capacidade de remoção da cor de outros corantes, além do corante CTR já estudado.

Além disso, investigou-se o impacto ambiental do processo, pela avaliação da demanda química de oxigênio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos realizados neste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Investigação de Química e Ambiente do Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho, na cidade de Guimarães, Portugal.

2.1 Corantes

Foram utilizados os corantes reativos: turqueza remazol G 133% (CI reactive blue 21), remazol brillante blue R (CI reactive blue 19), remazol brilliant orange 3R (C. I. reactive orange 16) e o remazol vermelho ultra RGB, gentilmente cedidos pela Dy Star e levafix brilliant green E 5BA (CI reactive green 21), adquirido da Levafix. Os corantes ácidos tellon blue RR (CI acid blue 62) e metil orange (C. I. acid orange 52) da Analyticals também foram utilizados nos ensaios de descoloração.

Em geral, as estruturas químicas dos corantes não são fornecidas pelos fabricantes, embora algumas apresentem registro no Colour Index. As estruturas disponíveis dos corantes utilizados estão listadas nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

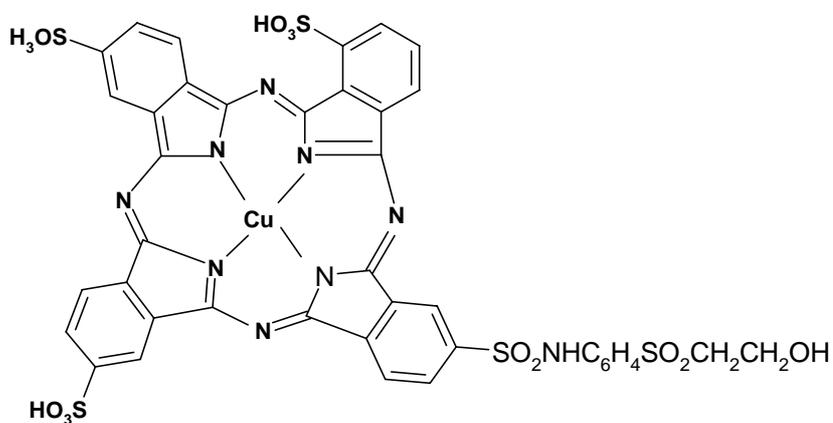


Figura 1 Estrutura química do corante turqueza remazol G 133% (C. I. reactive blue 21)

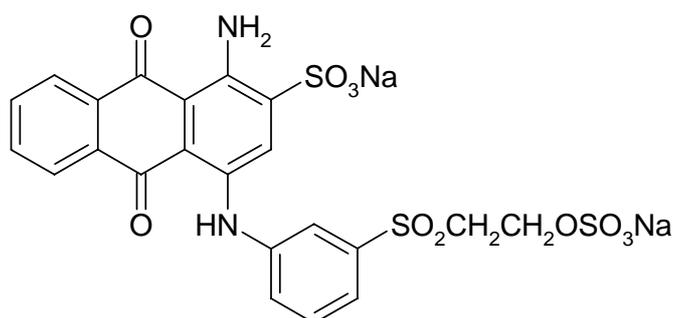


Figura 2 Estrutura química do corante remazol brilliant blue R (CI reactive blue 19)

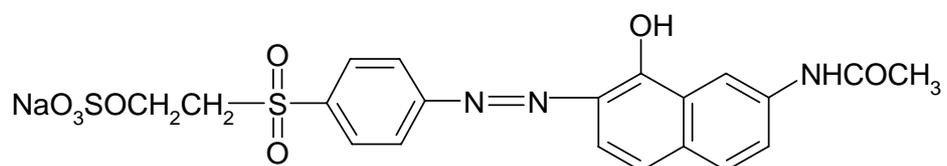


Figura 3 Estrutura química do corante remazol brilliant orange 3R (CI reactive orange 16)

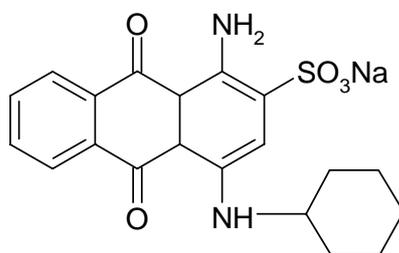


Figura 4 Estrutura química do corante Telson Blue RR (CI acid blue 62)

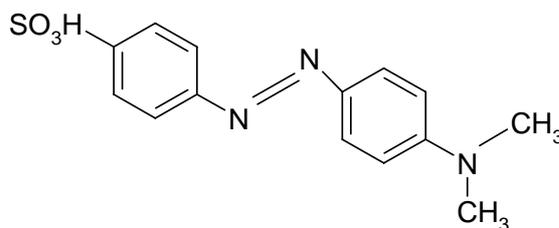


Figura 5 Estrutura química do corante metil orange (CI acid orange 52)

2.2 Obtenção do extrato enzimático

A obtenção do extrato enzimático foi feita de acordo com a metodologia descrita no item 4.2, capítulo 3.

2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática do extrato enzimático foi determinada segundo Khan e Robinson (1994), conforme descrito no item 4.4, capítulo 2.

2.4 Ensaios de descoloração

Os ensaios de descoloração para cada amostra foram feitos conforme descritos a seguir.

2.4.1 Corantes isolados

As reações de oxidação enzimática dos corantes têxteis foram conduzidas a 30°C, em tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 7,0 (1,2 mL), contendo: (1) H₂O₂ 100 µmol L⁻¹ (0,4 mL), (2) os corantes isoladamente (1,5 mL) e (3) 0,1 mL de extrato enzimático.

A mistura reacional foi incubada em espectrofotômetro acoplado a um banho termostaticado e a absorbância dos corantes foi medida em diferentes tempos, durante os experimentos. O acompanhamento da oxidação foi feito ao comprimento de onda máximo de cada corante: turqueza remazol G 133% - CTR (624 nm); remazol brilliant blue R - RBBR (596 nm), levafix brilliant green E 5BA – RG21 (596 nm), remazol vermelho ultra RGB - RVU (517 nm), remazol brilliant orange 3R (490 nm) – RBO3R; acid orange 52– AO52 (452 nm) e 600 nm para o acid blue 62 (AB62).

O cálculo para determinar a porcentagem de remoção de cor para os corantes foi feito de acordo com a equação:

$$\% \text{deremoção} = \frac{\text{absorbância}_{\text{inicial}} - \text{absorbância}_{\text{final}}}{\text{absorbância}_{\text{inicial}}} \times 100$$

Os ensaios foram realizados em três repetições.

2.4.2 Corantes hidrolisados

Os corantes reativos turqueza remazol G 133% (CTR) e remazol brilliant blue R (RBBR) foram hidrolisados dissolvendo-se o corante (50 mg L^{-1}) em água destilada sob agitação e aquecimento. Em seguida, $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de NaOH foram adicionados à solução do corante, que foi mantida em aquecimento e fervura durante 20 minutos. Após o arrefecimento, foi feita a correção do pH para 7,0 e do volume total (FIGUEIREDO, 2002).

Os corantes hidrolisados foram submetidos aos ensaios de descoloração em três repetições (descrito no subitem 4.4.1), pela PEN, a fim de avaliar a atuação da enzima após a hidrólise dos mesmos.

2.4.3 Efluentes sintéticos

A preparação do efluente simulado com os corantes reativos CTR (50 mg L^{-1}) e RBBR (50 mg L^{-1}) foi feita de acordo com Santos (2009), com algumas modificações: (1) aquecimento, em agitação, de 125 mL de água da torneira contendo 6,25 g de NaCl; (2) adição de 125 μL de agente molhante e 107 μL de agente sequestrante; (3) adição do corante reativo (50 mg L^{-1}), mantendo-se a solução a $55\text{-}60^\circ\text{C}$, por 10 minutos, para a completa dissolução; (4) adição de 0,25 g de NaOH e 1,25 g de Na_2CO_3 e conservação da temperatura constante por mais 1 hora; (5) arrefecimento, neutralização e diluição para 1 litro de solução. Durante o período de 1 hora de hidrólise, foram feitas algumas adições de água, de modo a evitar uma redução significativa de volume que pudesse provocar a precipitação do corante em função do aquecimento.

As concentrações finais no efluente simulado encontram-se na Tabela 1, enquanto na Tabela 2 apresenta-se a descrição sucinta dos produtos auxiliares de tingimento utilizados.

Tabela 1 Composição química do efluente simulado

| Composição do efluente | Concentração (g L⁻¹) |
|---------------------------------|--|
| Corante | 0,050 |
| NaCl | 6,250 |
| Agente molhante | 0,125 |
| Agente sequestrante | 0,125 |
| NaOH | 0,250 |
| Na ₂ CO ₃ | 1,250 |

Tabela 2 Produtos auxiliares de tingimento utilizados na simulação do efluente

| Nome comercial e funções | Aparência | Natureza iônica |
|---|------------------------|------------------------|
| Periwet WLV (agente molhante) Melhora a penetração do corante na fibra; Não causa a formação de espuma. | líquido incolor, turvo | aniônico |
| Periquet T BSD (agente sequestrante) Sequestrante de cálcio, magnésio e metais pesados | líquido amarelo claro | aniônico |

Os efluentes simulados contendo CTR e RBBR foram submetidos ao tratamento enzimático com a PEN, a fim de avaliar o efeito da presença de sais e auxiliares químicos de tingimento na atuação da enzima.

Os ensaios de descoloração foram realizados em três repetições.

2.4.4 Mistura de corantes

Os efluentes reais normalmente incluem mais de um componente de cor. Sendo assim, a descoloração da mistura de três corantes reativos pela PEN também foi avaliada.

Os corantes foram misturados em igual proporção, resultando numa solução com concentração final de 50 mg L^{-1} . Os corantes utilizados na tricomia foram: remazol brilliant blue R (RBBR); remazol vermelho ultra (RVU); remazol brilliant orange 3R (RBO3R).

A descoloração da mistura de corantes pela PEN foi determinada monitorando-se o decréscimo da absorbância no comprimento de onda máximo de cada corante. A quantificação da cor total foi avaliada a partir do valor da área abaixo da curva, obtida mediante uma varredura espectral na faixa de 450 nm a 650 nm. A avaliação da descoloração total foi feita por meio da diferença entre a área inicial e a área final.

2.5 Demanda química de oxigênio

A determinação da demanda química de oxigênio (DQO) foi realizada em três repetições, de acordo com o método descrito no Standard Methods (APHA, 1995). O método para amostras com baixo valor de DQO foi utilizado, após diluição adequada, quando o excesso de cloretos excedia o máximo permitido pelo procedimento convencional.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de descoloração com CTR

Os resultados obtidos para os ensaios de descoloração com CTR estão apresentados a seguir.

3.1.1 Corantes isolados

A porcentagem de descoloração e a taxa de degradação procederam-se com velocidades diferentes, variando com o corante em estudo, o que indica que a especificidade da enzima obtida depende da estrutura de cada corante. Na Tabela 3 está apresentada a classificação dos corantes estudados quanto ao modo de fixação à fibra e quanto à estrutura química.

Tabela 3 Classificação dos corantes estudados quanto ao modo de fixação à fibra e quanto à estrutura química

| Corante | Classificação | |
|-------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| | Quanto ao modo de fixação à fibra | Quanto à estrutura química |
| Turqueza remazol G 133% | reativo | ftalocianina |
| Remazol brilliant blue R | reativo | antraquinona |
| Remazol brilliant orange 3R | reativo | azo |
| Remazol vermelho ultra | reativo | - |
| Levafix brilliant green E 5BA | reativo | triarilmetano |
| Acid blue 62 | ácido | antraquinona |
| Acid orange 52 | ácido | azo |

Para o corante reativo remazol brilliant blue R (RBBR), a descoloração máxima obtida foi de $66\pm 3,8\%$, após 40 minutos de contato com a enzima. Observou-se que, acima de 40 minutos, houve um ligeiro decréscimo na descoloração (Figura 6).

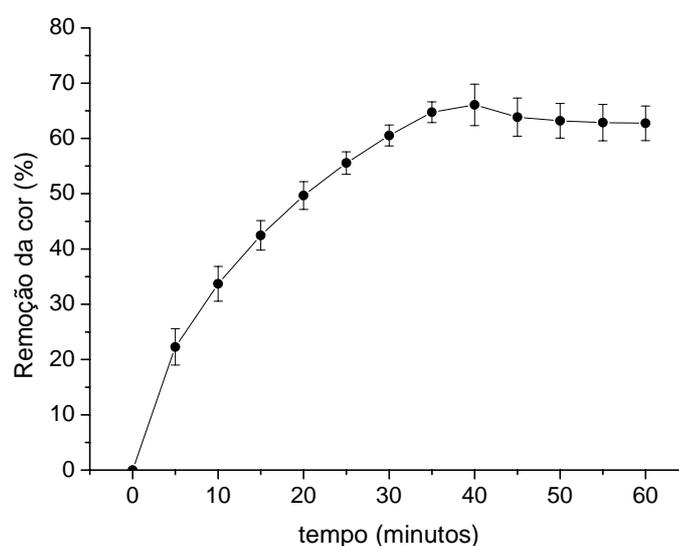


Figura 6 Descoloração do corante remazol brilliant blue R em solução aquosa catalisada pela peroxidase de nabo ($16,7 \text{ U mL}^{-1}$), em função do tempo de contato

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

Liu, Huang e Zhang (2009) demonstraram o potencial de oxidação do corante RBBR por birulin oxidase (EC 1.3.3.5, de *Myrothecium verrucaria*). A descoloração do corante foi de 40%, com 4 horas de contato, entretanto, na presença de um mediador redox ABTS (ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), a descoloração obtida foi de 91,5%, aos 25 minutos.

Como pode ser observado, a PEN apresentou maior potencial de oxidação do corante RBBR, quando comparada à birulin peroxidase, exceto na presença do mediador redox ABTS.

Existem vários relatos na literatura quanto à descoloração enzimática do RBBR, especialmente por fungos produtores de degradação branca, como *Stereum rugosum*, *Pleurotus ostreatus* e *Bjerkandera adusta* (NOVOTNY et al., 2001).

A descoloração do corante reativo levafix brilliant green E 5BA (CI reactive green 21) foi de $66 \pm 1,0\%$, após 45 minutos de contato com a enzima na concentração de $64,3 \text{ U mL}^{-1}$ (Figura 7).

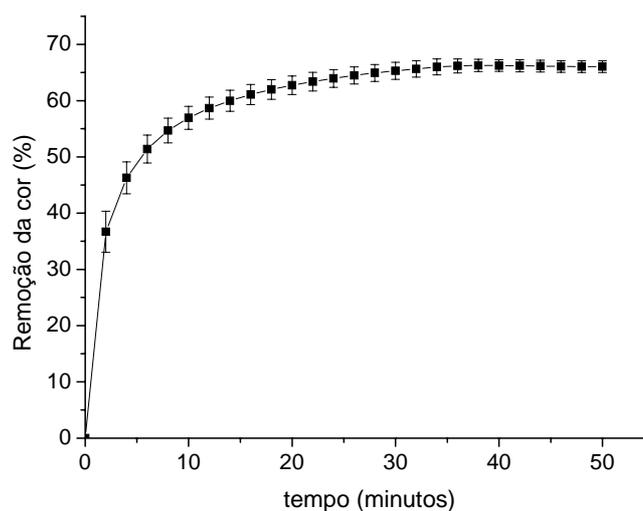


Figura 7 Remoção do corante reactive green 21 em solução aquosa catalisada pela peroxidase de nabo ($64,28 \text{ U mL}^{-1}$), em função do tempo de contato

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

A descoloração obtida para os corantes azo remazol brilliant orange 3R (RBO3R) e remazol vermelho ultra (RVU) não foi satisfatória. A baixa degradabilidade destes corantes pode estar relacionada à especificidade da enzima em relação aos mesmos e a outros fatores que influenciam na velocidade da reação como concentração de enzima, proporção substrato: H_2O_2 , concentração do corante ou a presença de mediadores.

A descoloração obtida para o corante RBO3R na concentração de 20 mg L^{-1} foi de apenas $9,00 \pm 1,66\%$, enquanto, para o corante RVU na mesma concentração, foi de apenas $5,50 \pm 0,64\%$. A concentração da enzima utilizada no ensaio foi 20,5 U mL^{-1} e o tempo de reação foi de 60 minutos e 110 minutos para os corantes RVU e RBO3R, respectivamente.

A relação entre a biodegradabilidade e a estrutura molecular dos corantes depende do tipo, da quantidade, da posição dos grupos substituintes no anel aromático e do peso molecular dos corantes. A presença de grupos substituintes em diferentes posições no anel aromático pode acelerar ou reduzir a taxa de descoloração ou provocar sua completa inibição. No caso dos corantes azo sulfonados, a posição e o número de grupos SO_3H , entre outros, afetam a velocidade de degradação da molécula do corante (DAWKAR et al., 2009; SHAFFIQU et al., 2002).

O corante acid blue 62 (AB 62) apresentou uma rápida cinética de degradação. A descoloração obtida foi de 47% em apenas 3 minutos de contato com a enzima (Figura 8). A concentração de enzima necessária para alcançar a remoção obtida neste caso foi de 13,1 U mL^{-1} . A mesma concentração de enzima proporcionou a remoção de 50% do corante metil orange (14 mg L^{-1}), após 45 minutos de incubação (Figura 9).

A descoloração do corante AB62 por lacase de *Cerrena unicolor* apresentou também uma rápida cinética de degradação. A remoção da cor foi observada após 12 minutos da adição da enzima (MICHNIEWICZ et al., 2008).

Os resultados obtidos quanto ao potencial de descoloração dos corantes estão sumarizados na Tabela 4. Como pode ser observado, os corantes turqueza remazol G133% (descoloração foi avaliada no capítulo 2) e levafix brillante green E 5 BA (reactive green 21) foram mais susceptíveis ao tratamento enzimático, seguidos dos corantes remazol brilliant blue R, metil orange e acid blue. Portanto, a PEN parece ter maior afinidade com corantes ftalocianínicos, antraquinona e triarilmetano, e baixa eficiência na remoção de corantes azo, como o remazol brilliant orange 3R.

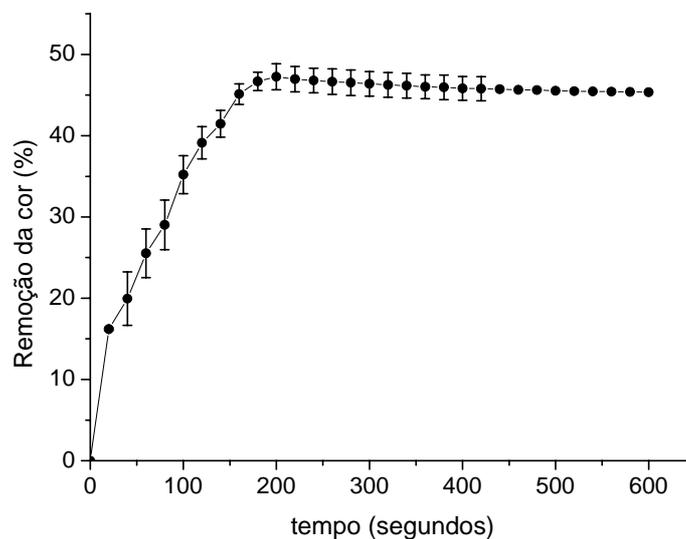


Figura 8 Descoloração do corante acid blue 62 em solução aquosa catalisada pela peroxidase de nabo ($13,1 \text{ U mL}^{-1}$), em função do tempo de contato

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

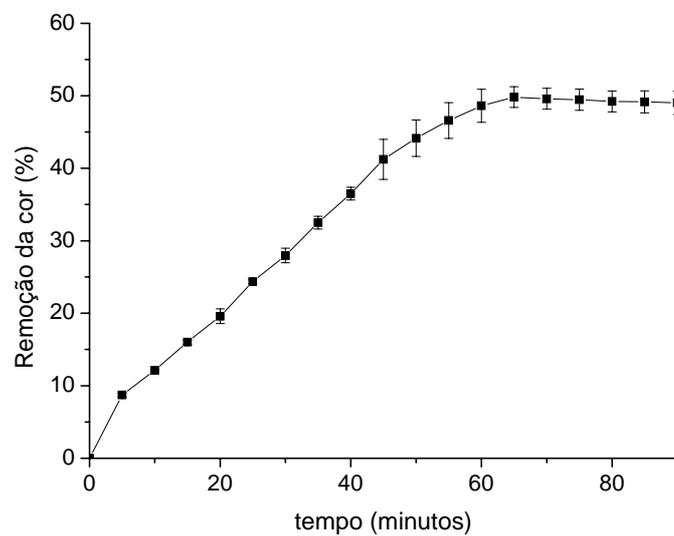


Figura 9 Descoloração do corante metil orange em solução aquosa catalisada pela peroxidase de nabo ($13,1 \text{ U mL}^{-1}$), em função do tempo de contato

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

Tabela 4 Descoloração de corantes têxteis por peroxidase de nabo (*Brassica campestris* ssp. *Rapifera*)

| Corantes | Concentração corante (mg L ⁻¹) | Concentração enzima (U mL ⁻¹) | Tempo de reação (min) | Remoção da cor * (%) |
|-----------------------------|--|---|-----------------------|----------------------|
| Turqueza remazol G133% | 50 | 20,3 | 60 | 60,0±2,6 |
| Remazol brilliant Blue R | 50 | 16,7 | 40 | 66,0±3,8 |
| Reactive green 21 | 50 | 64,3 | 45 | 66,0±1,0 |
| Remazol brilliant orange 3R | 20 | 20,5 | 110 | 9,0±1,7 |
| Remazol vermelho ultra RGB | 20 | 20,5 | 60 | 5,5±0,6 |
| Acid blue 62 | 50 | 13,1 | 3 | 47,0±1,6 |
| Metil orange | 14 | 13,1 | 65 | 50,0±1,4 |

* Valores são a média de três repetições ± desvio padrão.

É interessante notar ainda que os corantes AB62 e RBBR são ambos antraquinonas, mostrando, entretanto, cinéticas de degradação muito distintas, o que pode ser atribuído à presença de grupos substituintes diferentes no anel aromático.

Apesar de a concentração da enzima utilizada ter sido diferente para alguns corantes, conforme observado no capítulo 2 item 5.5.3, o aumento da taxa de descoloração não foi significativa a partir de 10,83 U mL⁻¹, e um aumento na concentração da enzima acima de 20,3 U mL⁻¹ não provocou aumento na taxa de descoloração. Sendo assim, as concentrações de enzima utilizadas provavelmente não influenciaram os resultados.

3.1.2 Corantes hidrolisados

A descoloração do CTR hidrolisado pela PEN ($17,5 \text{ U mL}^{-1}$) foi de $47,0 \pm 0,79\%$ após 1 hora de contato com a enzima e $53,0 \pm 0,5\%$, após 2 horas, enquanto a descoloração do RBBR hidrolisado foi de $69,5 \pm 0,99\%$, após 85 minutos (Figura 10).

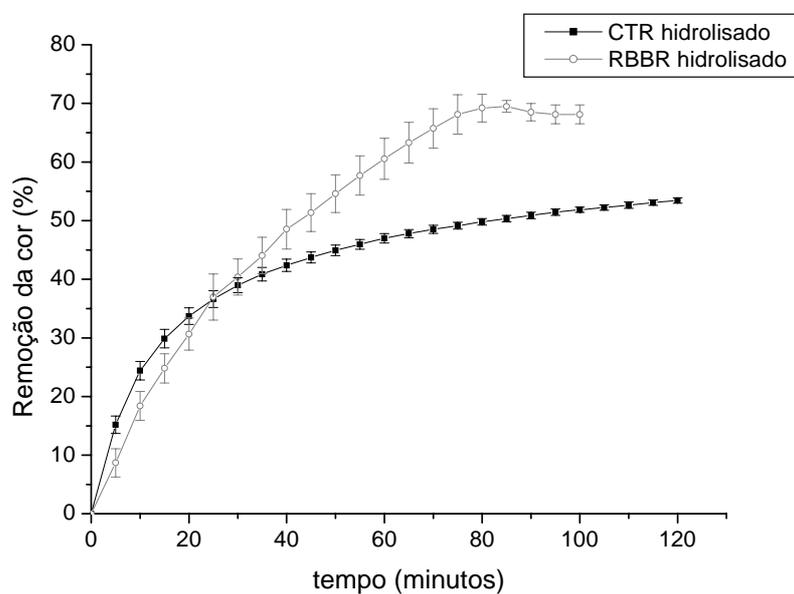


Figura 10 Descoloração dos corantes turqueza remazol G 133% e remazol brilliant blue R pela peroxidase de nabo ($17,5 \text{ U mL}^{-1}$), em função do tempo de contato

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

A oxidação do RBBR catalisada pela PEN apresentou uma cinética rápida quando comparada ao corante hidrolisado, visto que o tempo necessário para a remoção máxima da cor foi de 85 minutos. No que diz respeito à taxa de

descoloração, não houve diferença significativa. Quanto ao CTR, houve um decréscimo na remoção da cor de 60% para 47%, em relação ao corante hidrolisado, após 1 hora de contato com a enzima e de 53%, após 2 horas.

Os espectros de absorção dos corantes hidrolisados antes e após o tratamento enzimático estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

Em cada caso, o pico do grupo cromóforo decresceu após a reação enzimática (a 624 nm para o CTR e 596 nm para o RBBR), o que indica a transformação do corante pela enzima. Entretanto, a degradação completa do corante não foi observada, visto que algum corante não degradado ainda está presente na solução. No caso do RBBR, houve um aumento do pico entre 300 e 350 nm após o tratamento enzimático, indicando a formação de produtos de oxidação que absorvem nesta região do espectro.

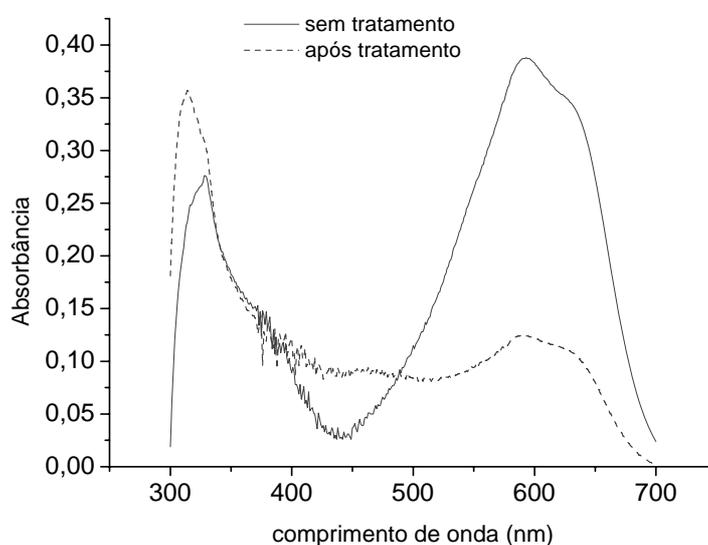


Figura 11 Espectros de absorção do corante remazol brilliant blue R hidrolisado antes e após o tratamento enzimático com peroxidase de nabo

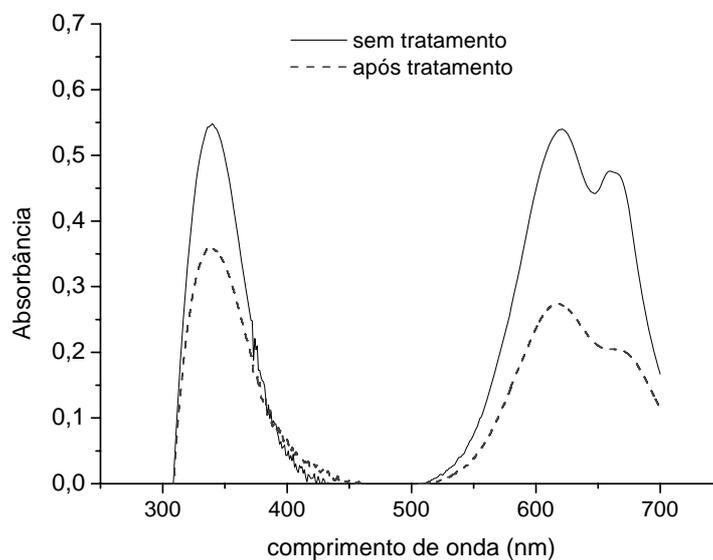


Figura 12 Espectros de absorção do corante turquesa remazol G 133% hidrolisado antes e após o tratamento enzimático com peroxidase de nabo

3.1.3 Efluentes sintéticos

O efeito da presença de sais e auxiliares químicos de tingimento no potencial de descoloração dos corantes reativos CTR e RBBR pela PEN foi avaliado, submetendo-se o efluente sintético ao tratamento enzimático.

A utilização do efluente têxtil simulado é de extrema importância para avaliar a aplicabilidade do processo de descoloração para uma situação real (CRISTÓVÃO et al., 2009a).

A descoloração obtida para o efluente sintético contendo o CTR foi de 37%, em 95 minutos de contato com a enzima, enquanto para o efluente

contendo o RBBR foi de 58%, em 90 minutos (Figura 13). A enzima utilizada em ambos os ensaios apresentava uma atividade enzimática de $17,5 \text{ U mL}^{-1}$.

Em relação ao corante hidrolisado, houve um decréscimo na remoção da cor em relação aos efluentes simulados. A PEN foi capaz de remover $23,5 \text{ mg L}^{-1}$ do CTR hidrolisado em solução aquosa, após 60 minutos de reação (item 5.1.2), enquanto a remoção da cor do efluente simulado foi de $18,5 \text{ mg L}^{-1}$, em 95 minutos de reação. Para o RBBR, a redução foi de $34,75 \text{ mg L}^{-1}$ (item 5.1.2) para 29 mg L^{-1} de corante removido.

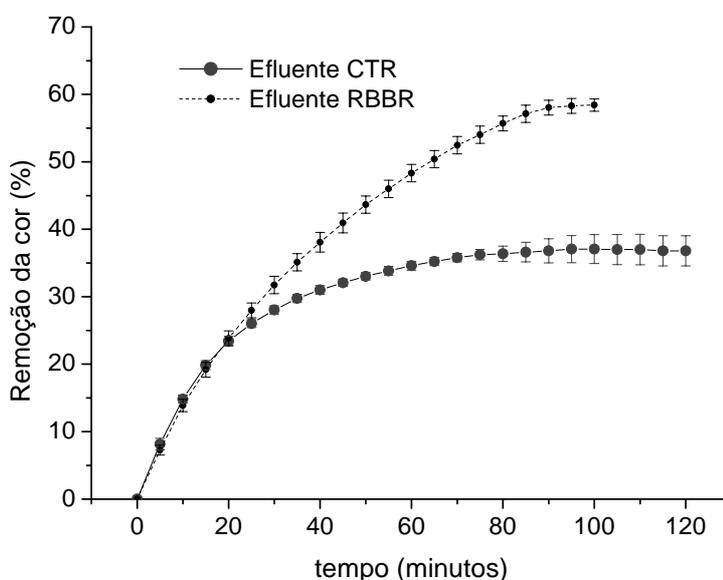


Figura 13 Descoloração dos efluentes contendo os corantes turqueza remazol G 133% e remazol brilliant blue R (50 mg L^{-1}) pela PEN ($17,5 \text{ U mL}^{-1}$), em função do tempo de contato

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão.

Esse decréscimo é atribuído à presença de auxiliares químicos de tingimento (agente dispersante e sequestrante) e de sais que são adicionados no processo de tingimento à base de corantes reativos.

A eficiência do tratamento enzimático é menor neste caso porque pode ocorrer a formação de ligações químicas fortes com as espécies envolvidas no meio reacional, a formação de produtos ou a desativação da enzima (CRISTÓVÃO et al., 2009a).

Cristóvão et al. (2009a) observaram um decréscimo de 68,23% para 42,04% na descoloração do corante reactive red 239 por lacase comercial de *Aspergillus* na presença de auxiliares químicos de tingimento.

Merpól, um surfactante aniônico usado como agente molhante e detergente no processo de tingimento, inibiu a descoloração do corante RBBR por depleção do substrato; por análise espectrofotométrica foi demonstrado que o merpol interage com o corante. A presença de cloretos também promoveu a inibição da descoloração (CHAMPAGNE, 2009).

A PEN mostrou ser eficiente na remoção do CTR e RBBR em solução aquosa, porém, esse potencial diminui na presença de auxiliares químicos de tingimento. Estes resultados mostram que a PEN pode ser eficiente no tratamento de efluentes têxteis, particularmente como um processo de polimento de reciclagem da água, desde que o impacto de sais e auxiliares químicos na atividade da enzima seja atenuado, por exemplo, pela imobilização da enzima em suportes sólidos e por combinação com outros processos que possibilitem a remoção destes do banho de tingimento.

A PEN pode apresentar melhor desempenho para a remoção de corantes ácidos como o acid blue 62 e o metil orange de banhos de tingimento, visto que, em tingimentos com corantes ácidos, a necessidade de auxiliares químicos, como agentes molhantes e dispersantes, é menor, em função das propriedades

das fibras que são tingidas com esse tipo de corante, como, por exemplo, as poliamidas.

Os espectros de absorção dos efluentes sintéticos contendo os corantes CTR e RBBR antes e após o tratamento enzimático estão apresentados nas Figuras 14 e 15. O perfil dos espectros continua o mesmo daqueles dos corantes hidrolisados, indicando a diminuição do pico cromóforo e o aparecimento de picos em comprimentos de onda menores, indicando a formação dos produtos de reação.

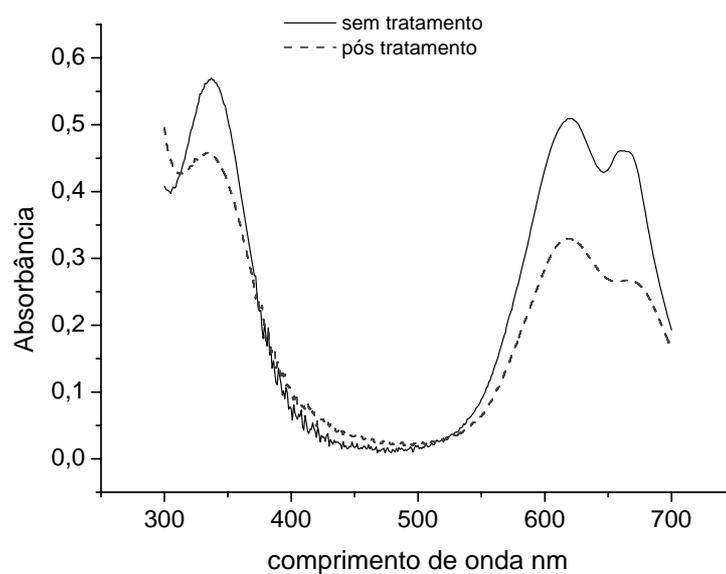


Figura 14 Espectros de absorção do efluente contendo turqueza remazol G 133%, antes e após o tratamento enzimático

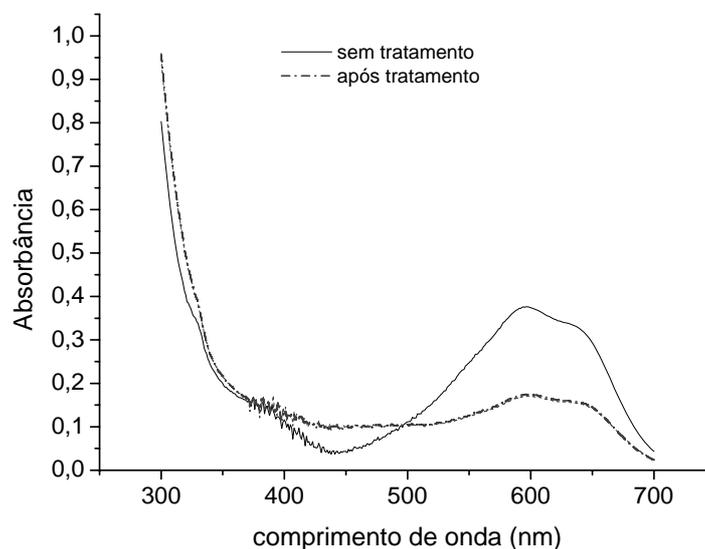


Figura 15 Espectros de absorção do efluente contendo remazol brilliant blue R, antes e após o tratamento enzimático

3.1.4 Mistura de corantes

O potencial de descoloração de uma mistura de três corantes pela peroxidase de *Brassica campestris* ssp. *Rapifera* foi avaliado (Tabela 5).

A mistura reacional foi incubada com a PEN por 120 minutos e a remoção dos corantes RBBR, RVU e RBO3 ocorreu após 30, 40 e 90 minutos da adição da enzima, respectivamente. A porcentagem de remoção da cor para os corantes RVU e RBO3R foi baixa, conforme esperado, visto que o potencial de degradação da enzima para estes corantes em solução aquosa foi baixo (item 5.1.1). Entretanto, a taxa de descoloração foi maior para ambos na mistura. O tempo de reação necessário para a máxima remoção da cor dos corantes foi

menor na mistura. Resultados semelhantes foram encontrados por Cristóvão et al. (2009b), em que a cinética de degradação dos corantes isolados “Reactive Black 5”, “Reactive Yellow 15” e “Reactive Red 239” por lacase comercial foi diferente quando comparada à degradação dos corantes misturados.

Tabela 5 Descoloração de uma mistura de corantes pela PEN ($64,28 \text{ U mL}^{-1}$) baseada no pico de absorção máxima de cada corante presente e da mistura por integração da área obtida mediante varredura espectral (450 a 650 nm)

| Corante | Remoção da cor (%)* | Tempo de reação (min) |
|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Remazol brilliant blue R | 69,0±3,3 | 30 |
| Remazol vermelho ultra | 18,7±0,8 | 40 |
| Remazol brilliant orange 3R | 26,0±1,0 | 90 |
| Cor total | 49,0±0,7 | 120 |

* Valores são a média de três repetições \pm desvio padrão e da mistura por integração da área

A mistura dos corantes reativos estudados não teve efeito sobre a ação da enzima, no que diz respeito à remoção de cada corante separadamente, o que é favorável para a aplicação da enzima, visto que um efluente real geralmente contém vários corantes. A remoção da cor total, quantificada pela diferença entre a área inicial e a área final obtida mediante uma varredura espectral na faixa de 450 nm a 650 nm, foi de 49%.

Os espectros de absorção da mistura de corante antes e após tratamento enzimático mostram a diminuição dos picos cromóforos de cada corante após o tratamento enzimático, no entanto, na região entre 350 e 450 nm, aproximadamente, observa-se um aumento da intensidade da absorbância. Isso

significa que os produtos que estão sendo formados durante a reação enzimática absorvem nesta região do espectro (Figura 16).

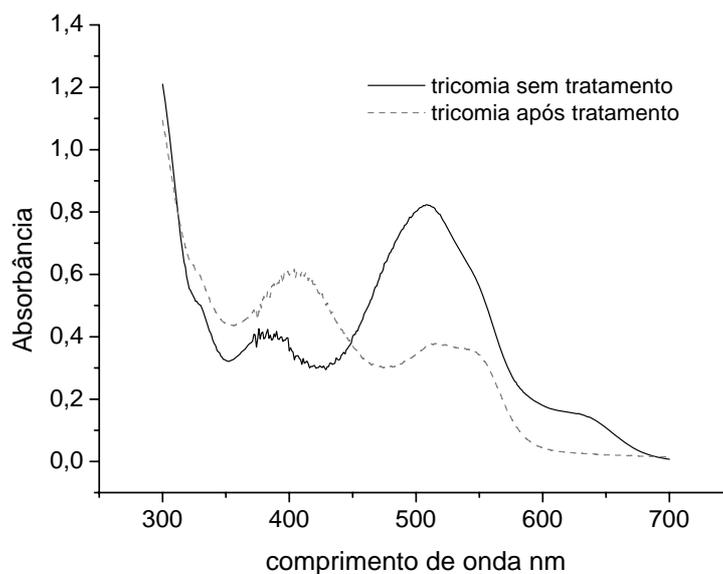


Figura 16 Espectros de absorção da mistura de corantes (50 mg L^{-1}), antes e após o tratamento enzimático

3.2 Demanda química de oxigênio

O conteúdo orgânico residual da solução tratada deve ser avaliado, uma vez que a técnica envolve a adição de um extrato vegetal com alto conteúdo de carbono. Além disso, o corante residual e os subprodutos solúveis da reação também contribuem para o aumento da demanda química de oxigênio (DQO), o que implica em impactos adversos ao meio aquático.

Na Tabela 6 encontram-se os valores obtidos para a determinação da demanda química de oxigênio das amostras antes e após o tratamento enzimático.

Tabela 6 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

| Amostra | DQO (mg L⁻¹ O₂)* |
|---|---|
| *CTR (50 mg L ⁻¹) | 19,7±2,1 |
| Efluente sintético contendo CTR (50 mg L ⁻¹) sem tratamento enzimático | 56,4±0,8 |
| Efluente sintético contendo CTR (50 mg L ⁻¹) após tratamento enzimático | 238,8±2,5 |

*CTR – corante turqueza remazol G 133%

A adição de produtos auxiliares de tingimento contidos no efluente sintético contribui para o aumento da DQO. Neste caso, houve um acréscimo de DQO de 36,73 mg L⁻¹ O₂ em relação à solução do corante. Um acréscimo de 4,23 vezes na DQO também foi observado no efluente tratado enzimaticamente.

Este aumento da DQO pode ser atribuído à presença de matéria orgânica adicionada na forma de extrato enzimático de *Brassica campestris* ssp. *Rapifera*. A DQO final também é atribuída ao corante residual na solução e à formação de produtos de baixo peso molecular durante o processo enzimático.

Cristóvão et al. (2009a) também observaram um aumento significativo da DQO de um efluente simulado (contendo corantes reativos) de 394 para 3.383 mg L⁻¹ O₂, após o tratamento enzimático com lacase.

A aplicação da técnica enzimática para o tratamento de efluentes têxteis industriais deve ser visualizada em conjunto com processos convencionais, com o objetivo de torná-lo mais ameno para o tratamento biológico. Dessa forma, a

DQO da fonte enzimática acrescida ao efluente, composta basicamente por proteínas e fibras solúveis biodegradáveis, pode ser facilmente abatida no tratamento biológico.

Outra estratégia que deve ser considerada, não apenas com o objetivo de preservar a DQO do sistema, mas com uma série de outras vantagens operacionais, é o emprego da fonte de enzima imobilizada em uma matriz suporte (WILBERG, 2003).

4 CONCLUSÃO

A peroxidase do nabo (PEN) mostra-se eficiente na remoção da cor de importantes corantes industriais em fase aquosa. Entretanto, a porcentagem de descoloração e a taxa de degradação ocorreram com velocidades diferentes, de acordo com a estrutura do corante.

A eficiência de descoloração é reduzida pela hidrólise química dos corantes estudados (CTR e RBBR) e pela adição de auxiliares químicos contidos no efluente sintético.

A DQO residual aumenta no efluente sintético contendo CTR após o tratamento enzimático, o que pode ser atribuído à presença de matéria orgânica adicionada na forma de extrato vegetal (enzima), devido à presença de corante residual na solução e produtos de baixo peso molecular formados durante o processo oxidativo.

Portanto, a utilização da PEN na descoloração de corantes e efluentes têxteis, aliada aos tratamentos microbianos convencionais, pode ser uma alternativa eficiente e de baixo custo. O processo enzimático pode ser também utilizado diretamente na remoção da cor dos banhos de tingimento, para que possa ser reutilizado e recirculado para o processo produtivo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção de enzimas mais baratas foi possível a partir da padronização das condições de extração por processo de obtenção de baixo custo. A enzima obtida apresentou alta atividade e foi utilizada em processos de biodegradação com a mesma eficiência que a enzima purificada. Além disso, o solvente utilizado no processo de obtenção dessas enzimas (acetona) foi reciclado, podendo ser reutilizado no processo, reduzindo ainda mais o custo de obtenção desses catalisadores.

A enzima utilizada neste trabalho, peroxidase de nabo, se mostrou eficiente na remoção de corantes têxteis em meio aquoso. No entanto, a eficiência deste catalisador foi dependente de alguns parâmetros importantes como concentrações da enzima, de substrato e de peróxido de hidrogênio e pH. Além disso, a estrutura do corante e a afinidade enzima-substrato são determinantes na velocidade e na taxa de reação.

Além destes parâmetros, a eficiência da descoloração foi afetada negativamente pela presença de auxiliares químicos normalmente presentes nos banhos de tingimento de corantes reativos e pela inibição da enzima pelos produtos de degradação formados. Diante do exposto, uma alternativa para amenizar esses efeitos seria a utilização da enzima imobilizada em suportes sólidos.

Análises de HPLC/MS/ESI confirmaram a quebra enzimática do grupo cromóforo, no caso da oxidação do corante turqueza remazol G 133% (CTR) pela PEN, bem como a formação de produtos de massas moleculares menores.

O CTR submetido ao tratamento enzimático apresentou toxicidade elevada quando comparado ao CTR não tratado. Daí a importância da combinação de outros métodos biológicos, a fim de remover possíveis

metabólitos tóxicos formados e promover a degradação da matéria orgânica adicionada na forma de extrato vegetal (enzima).

Dessa forma, o tratamento enzimático poderia ser empregado como tratamento primário, reduzindo a carga de corantes para o sistema de tratamento biológico, geralmente ineficiente na remoção da cor dos efluentes industriais.

O processo enzimático pode ser também utilizado diretamente na remoção da cor dos banhos de tingimento, para que possa ser reutilizado e recirculado para o processo produtivo, implicando em redução de custos para a indústria e diminuição da carga orgânica descartada nos efluentes.

A tecnologia desenvolvida apresenta diversas vantagens quando comparada a outras tecnologias que visam à remoção da cor em soluções aquosas. Entre elas destacam-se: a degradação do corante em uma ampla faixa de concentração; a não geração de resíduos sólidos e a possibilidade de transformação de produtos inócuos, no caso os corantes, em produtos mais susceptíveis aos tratamentos convencionais.

REFERÊNCIAS

APHA. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed. Washington, 1995.

BOHM, B. A test method to determine inhibition of nitrification by industrial wastewaters. **Water Science Technology**, Amsterdam, v. 30, n. 6, p. 169-172, 1994.

CHAMPAGNE, P. **Dye decolourization by immobilized laccase and impact of auxiliary chemicals on dye decolourization** 2009. 202 p. Thesis (Doctoral of Philosophy) - Queen's University, Kingston, 2009.

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

CRISTÓVÃO, R. O. et al. Treatment and kinetic modelling of a simulated dye house effluent by enzymatic catalysis. **Bioresource Technology**, Texas, v. 100, p. 6236-6242, Aug. 2009a.

DAWKAR, V. V. et al. Peroxidase from *Bacillus sp. vus* and its role in the decolorization de textile dyes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, New York, v. 14, n. 5, p. 361-368, 2009.

FIGUEIREDO, S. A. R. C. **Remoção de corantes têxteis em solução aquosa usando materiais naturais contendo quitina**. 2002. 136 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, 2002.

HAI, F. I.; YAMAMOTO, K.; FUKUSHI, K. Hybrid treatment systems for dye wastewater. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 37, n. 4, p. 315-377, 2007.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

LIU, Y.; HUANG, J.; ZHANG, X. Decolorization and biodegradation of remazol brilliant blue R by bilirubin oxidase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 108, n. 6, p. 496-500, 2009.

MICHNIEWICZ, A. et al. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. **Dyes and pigments**, London, v. 77, n. 2, p. 295-302, 2008.

NOVOTNY, C. et al. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 113-22, 2001.

ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**, Texas, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.

SANTOS, S. C. R. **Adsorção de corantes têxteis em materiais naturais e residuais de matriz inorgânica**. 2009. 194 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Porto, Porto, 2009.

SHAFFIQU, T. S. et al. Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Totowa, v. 102/103, n. 1/5, p. 315-326, 2002.

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

WANG, C. et al. Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. **Chemosphere**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 339-344, 2002.

WILBERG, K. Q. **Oxidação de compostos fenólicos fenólicos em solução aquosa com enzima peroxidase de extratos vegetais**. 2003. 157 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, 2003.

ZANONI, M. V.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciência hoje**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 61-64, ago. 2001.

ANEXO A

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1A | Resumo da análise de variância das atividades médias da peroxidase de extratos brutos de diferentes idos vegetais..... | 135 |
| Tabela 2A | Resumo da análise de variância para o efeito de aditivos sobre a atividade da peroxidase, obtida a partir do extrato bruto do nabo..... | 135 |

Tabela 1A Resumo da análise de variância das atividades médias da peroxidase de extratos brutos de diferentes vegetais

| FV | GL | SQ | QM |
|-----------------------------------|----|--------|---------|
| Tecido vegetal | 14 | 11,819 | 0,7387* |
| Erro | 32 | 0,0701 | 0,0021 |
| Coeficiente de variação (%) | | 9,89 | |
| Média geral (U mL ⁻¹) | | 0,536 | |

Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.

Tabela 2A Resumo da análise de variância para o efeito de aditivos sobre a atividade da peroxidase, obtida a partir do extrato bruto do nabo

| FV | GL | SQ | QM |
|-----------------------------------|----|--------|---------|
| Aditivos | 5 | 0,7692 | 0,1538* |
| Erro | 18 | 0,0193 | 0,0010 |
| Coeficiente de variação (%) | | 7,91 | |
| Média geral (U mL ⁻¹) | | 0,415 | |

Significativo, a 1% de probabilidade, pelo teste F.