

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

PEROXIDASES NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTES
INDUSTRIAIS

Elizabeth Jardim Ramos de Almeida

Orientadora: Flávia Donária Reis da Silva

Ouro Branco
Dezembro/2014

**PEROXIDASES NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTES
INDUSTRIAIS**

Elizabeth Jardim Ramos de Almeida

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João Del-Rei

Orientadora: Flávia Donária Reis da Silva

**Ouro Branco
Dezembro/2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

PEROXIDASES NA DEGRADAÇÃO DE CORANTES EM EFLUENTES
INDUSTRIAIS

Elizabeth Jardim Ramos de Almeida

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Flávia Donária Reis da Silva – Orientadora

Isabel Cristina Braga Rodrigues – Examinadora

Natália Rocha Barboza – Examinadora

Ouro Branco, ____/____/____

Resumo

A especificidade das enzimas na degradação de substratos é característica importante no uso industrial desses biocatalisadores. Suas inúmeras vantagens de aplicação em relação aos catalisadores químicos são determinantes na escolha das enzimas. A possibilidade de imobilização e produção em larga escala através da engenharia genética chama a atenção de estudiosos para sua aplicação em indústria, principalmente no tratamento de efluentes, na degradação de substâncias não eliminadas por outras formas de tratamento, como os corantes. Esses compostos representam grande problema no descarte de efluentes industriais e promover sua degradação de maneira eficiente é uma necessidade cada vez maior. Os tratamentos existentes nem sempre são eficientes e utilizam muita energia e produtos químicos. Nesse cenário, o tratamento enzimático com peroxidases mostra-se uma interessante opção. As peroxidases, por degradar compostos tóxicos fenólicos e de estrutura complexa, possuem grande potencial na resolução desse problema. Vários estudos vêm comprovando as vantagens de se utilizar essas enzimas na degradação de corantes, inclusive a utilização de fungos da podridão branca para sua produção tem merecido destaque nesse contexto.

Palavras-chave: enzimas; peroxidases; efluentes industriais; corantes.

Sumário

1. Introdução	5
2. Objetivo	7
3. Revisão bibliográfica	8
3.1 Enzimas	8
3.1.1 Engenharia enzimática	9
3.1.2 Aplicações de enzimas	10
3.2 Peroxidasas	11
3.3 Problemática dos corantes em efluentes líquidos	13
3.3.1 Tratamentos existentes	14
3.4 Tratamento enzimático	16
3.5 Estudos sobre a ação de peroxidasas em corantes	16
3.5.1 Degradação de corantes de efluentes têxteis por peroxidase de nabo	17
3.5.2 Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima <i>Horseradish</i> peroxidase	19
3.6 Degradação de corantes em efluentes industriais por fungo da podridão branca e suas enzimas	21
3.6.1 Descoloração microbiana de corantes azo e corante em efluente industrial por <i>Fomes lividus</i>	22
4. Conclusão e sugestões	23
5. Referências bibliográficas	24

1. Introdução

Uma das atribuições do Engenheiro de Bioprocessos é promover o desenvolvimento industrial de maneira sustentável, aplicando produtos naturais gerando, dessa forma, efluentes com reduzido impacto ambiental. Outra preocupação do profissional é a remediação de efluentes que não estão adequados ao descarte, utilizando recursos que não agredam o meio ambiente.

Com o avanço tecnológico e o consequente aumento das indústrias, o volume de efluentes lançados todos os dias nos corpos d'água é questão preocupante para todos [1]. Porém, o desenvolvimento não para. Dessa forma, torna-se necessário o equilíbrio entre a evolução industrial e a sustentabilidade [2].

As características dos efluentes líquidos dependem do tipo de atividade executada pela indústria e dos insumos utilizados por ela [2]. Muitas vezes, a preocupação da mesma está relacionada ao tratamento que deve aplicar ao efluente depois de gerado, sem tentar, ao menos, diminuir a emissão de poluentes.

Na maioria dos casos, a preocupação da indústria é atender à legislação ambiental de descarte, fazendo apenas o mínimo de recuperação do efluente. Além disso, muitas vezes falta fiscalização, contribuindo para as irregularidades.

As indústrias que utilizam corantes em sua produção enfrentam maiores dificuldades para que o efluente atinja condições adequadas para descarte [3], principalmente por esta ser uma poluição aparente [2]. Além disso, os corantes normalmente são substâncias de difícil degradação.

Em um efluente são encontradas várias espécies químicas, além dos corantes, como sais e surfactantes, e em diferentes concentrações [1, 4]. O setor têxtil possui um dos tipos mais complexos [5].

São vários os métodos existentes para tratamento de efluentes e várias são as combinações que podem ser feitas entre eles para que resultados melhores sejam alcançados [2]. Porém, as desvantagens econômicas e ambientais, além da ineficiência, em muitos casos, deixam pesquisadores em busca de alternativas.

Uma das ferramentas que o engenheiro tem nas mãos é o uso de catalisadores biológicos, as enzimas. Os estudos de aplicação das enzimas são cada vez mais difundidos e espera-se que seu uso seja a solução para diversos problemas industriais, ainda sem resposta.

As peroxidases, como outras enzimas, já são utilizadas na indústria em vários tipos de catálise [6, 7]; sua atuação na degradação de compostos corantes aromáticos também tem sido cada vez mais comprovada, surgindo como opção para o tratamento de efluentes coloridos.

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo apresentar soluções para um problema industrial, a remediação de efluentes de difícil tratamento, contaminados com corantes, de maneira eficiente e menos agressiva ao meio ambiente. Para isso, será avaliada a atuação das peroxidases, enzimas que têm recebido destaque na degradação de compostos aromáticos complexos, como os corantes, e são cada vez mais alvo de estudos.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Enzimas

As enzimas são catalisadores das reações biológicas, que atuam na velocidade das reações químicas em células e organismos não alterando o equilíbrio químico dessas reações [8, 9]. Podem ser proteínas ou RNAs, no caso das ribozimas.

Algumas reações que ocorrem nas células podem demorar até mesmo anos para se completarem, se não houver a presença do catalisador [10]. Reações químicas, como a oxidação da sacarose, por exemplo, precisam de catálise para ocorrer em tempo útil, mantendo, dessa forma, a vida [9].

A ação das enzimas é específica sobre determinados reagentes, chamados de substratos, convertendo-os em certo produto. Seu poder catalítico é, muitas vezes, maior que o de catalisadores sintéticos ou inorgânicos [9]. A atividade enzimática depende de uma variedade de fatores, são eles [8]:

- natureza do substrato;
- exigência de co-fatores: íons metálicos e compostos orgânicos agem como ativadores;
- presença de inibidores;
- natureza do solvente;
- pH do meio: cada enzima tem um pH ótimo característico;
- temperatura: assim como o pH, cada enzima possui uma temperatura ótima de atividade.

É raro obter uma enzima de fonte natural não misturada a outras proteínas. Para determinação da atividade específica da enzima, a mesma pode ser purificada por vários métodos conhecidos, como os cromatográficos, desde que o processo de purificação não provoque perda em sua atividade [8].

São conhecidas, atualmente, milhares de enzimas diferentes. Dessa forma, para que as mesmas pudessem ser identificadas, a Comissão para Enzimas (*Enzyme Commission* – E.C.) estabeleceu a classificação e nomenclatura de enzimas. São seis classes de enzimas, de acordo com a reação catalisada. Cada enzima possui um código com quatro números, precedido das letras E.C.: o primeiro dígito indica a classe a qual a enzima pertence; o segundo dígito refere-se à subclasse; o terceiro é relativo à

subsubclasse; e o último dígito representa o ordenamento das enzimas dentro de cada categoria [8].

As classes às quais as enzimas podem pertencer são:

1. Oxirredutases – catalisam reações de oxidação-redução;
2. Transferases – transferência de um átomo ou grupo entre moléculas;
3. Hidrolases – catalisam reações de hidrólise;
4. Liasas – remoção de um grupo de uma molécula;
5. Isomerases – catalisam reações de isomerização;
6. Ligases – catalisam reações de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP.

Além do código, cada enzima possui um nome trivial e um nome sistemático.

Normalmente, o nome usual é composto por duas palavras: a primeira indicando o substrato da enzima e a segunda especificando o tipo de reação catalisada, terminada em *ase*. Exemplo: glicogênio sintase [10].

3.1.1 Engenharia enzimática

Quando um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em produto, fala-se em biocatálise ou biotransformação. A investigação e aplicação da biocatálise em larga escala e para fins analíticos se deu pela Engenharia Enzimática, com a imobilização de enzimas [8]. A Engenharia Enzimática vem com a expansão da produção e aplicação de enzimas modificadas [6].

Um biocatalisador pode ser imobilizado, garantindo a retenção de sua atividade catalítica e sua reutilização, se confinado em uma região restrita [8, 11]. A obtenção de extratos enzimáticos puros normalmente é trabalhosa e dispendiosa, no entanto, sua imobilização traz vantagens quanto à reutilização, minimização da contaminação do produto, maior produtividade volumétrica e fácil separação entre produto e biocatalisador, diminuindo os custos do processo [8, 6]. Em contrapartida, pode haver perda da atividade catalítica durante a imobilização, devido à origem da matriz de imobilização ou durante a bioconversão [8]. É importante, também, que os custos da imobilização não sejam muito altos, que pode se dar por uma ligação por adsorção física até uma encapsulação [6].

O biocatalisador, para a realização de bioconversão, deve apresentar atividade catalítica significativa, seletividade e estabilidade nas condições em que o processo se

realizará. Geralmente, o biocatalisador é produzido por fermentação submersa, através de um hospedeiro celular robusto, com crescimento rápido, densidade celular e níveis de expressão elevados [8]. Alguns biocatalisadores são extraídos de tecidos animais e vegetais [6]. A tecnologia do DNA recombinante vem possibilitando a expressão de enzimas em diferentes hospedeiros, a alteração e o melhoramento das propriedades da enzima, que podem ser usadas na forma livre ou na forma imobilizada. O meio reacional e o reator utilizado para a bioconversão interferem em sua otimização. O isolamento e purificação do produto da bioconversão dependem de suas características, que definirão a recuperação, qualidade, pureza e escala de interesse [8].

Atualmente, uma pequena porção das enzimas existentes na natureza é utilizada, já que menos de 1% dos organismos vivos são passíveis de cultivo em laboratório. Existem mais de 2500 reações catalisadas enzimaticamente e pode-se estimar a presença de 10^6 enzimas diferentes na natureza [8]. No entanto, são aproximadamente 4300 enzimas sequenciadas, sendo dessas, 300 comercializadas. O desafio da descoberta de novas enzimas está associado à dificuldade de torná-las economicamente viáveis e de sua possível modificação [6].

Além disso, uma melhor utilização de recursos renováveis e um menor impacto dos processos industriais em nível ambiental, associados aos avanços da biotecnologia, cada vez mais estimulam o crescimento do mercado e da aplicação da biocatálise [8].

3.1.2 Aplicações de enzimas

Conciliar o desenvolvimento econômico com a preservação e recuperação do meio ambiente é um objetivo das novas abordagens industriais e econômicas, muitas vezes utilizando biocatálise. A chamada bioeconomia visa à diminuição dos custos e produção alavancada, substituindo produtos sintéticos por biodegradáveis e renováveis [6].

Os biocatalisadores apresentam vantagens em relação aos seus congêneres químicos, especialmente a régio e estereoseletividades [8]. Além disso, em soluções aquosas, operam em temperaturas, pressões e faixas de pH moderadas que, associado ao seu alto grau de especificidade, possuem propriedades como poucos catalisadores não biológicos, definindo sua eficiência do ponto de vista energético [8, 9].

Cerca de 75% das enzimas aplicadas industrialmente são hidrolases, atuando na despolimerização de substâncias naturais. Dessas, as proteases têm maior importância

por sua aplicação nos laticínios como coagulantes e na indústria de detergentes. As glucanases, utilizadas na panificação, fabricação de cerveja, produção de amido modificado e indústrias têxteis, constituem o segundo grupo mais importante [8].

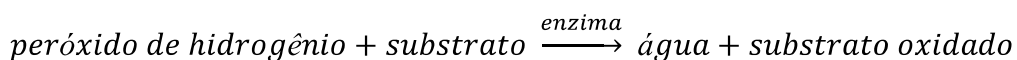
Dependendo da aplicação da enzima, as indústrias podem ser divididas em [8]:

- enzimas como produtos finais (aplicações analíticas, detergentes, farmacêutica, alimentação animal e rações);
- enzimas como adjuvantes do processo (têxtil, papel e pasta de papel, açúcar, café);
- enzimas para produção de alimentos e bebidas (laticínios, cerveja, vinícola, álcool, panificação, óleos e gorduras);
- enzimas em processos de biotransformação (processamento do amido, antibióticos, química fina).

A engenharia genética veio permitir a produção de enzimas com atividade e estabilidade desejadas, aumentando sua gama de aplicações [8]. Porém, um desafio em relação ao uso de enzimas em determinadas indústrias está relacionado à aceitação do público, já que a inovação tecnológica pode ir de encontro às convenções sociais, políticas e religiosas de alguns consumidores [6].

3.2 Peroxidases

As peroxidases são enzimas da classe das oxirredutases, classe mais abundante na natureza; promovem a oxidação de compostos, orgânicos e inorgânicos, empregando peróxido como aceptor de elétrons. Seu código é E.C. 1.11.1._ [12]. Podem ter origem bacteriana, animal, vegetal e fúngica, existindo tanto as intracelulares quanto as extracelulares. Resumidamente, sua forma de ação é:



Na desintoxicação das células, as peroxidases possuem importante papel, eliminando o peróxido de hidrogênio.

Dessa forma, as peroxidases tanto removem peróxidos quanto utilizam sua habilidade de oxidação em suas reações [13].

Muitas peroxidases são heme-proteínas, ou seja, possuem um grupo heme e catalisam a peroxidação de compostos usando o íon de ferro (Fe^{3+}) presente nele: a molécula de peróxido oxida o íon de ferro que, por sua vez, oxida o substrato da peroxidase [13]. São exemplos, a manganês peroxidase e a lignina peroxidase. A primeira, com pH ótimo de atuação igual a 5, oxida compostos fenólicos na presença de Mn^{2+} . Esse íon é oxidado a Mn^{3+} que, complexado por substâncias produzidas pelo próprio organismo que originou a enzima, oxida os substratos orgânicos [14]. A segunda oxida estruturas aromáticas fenólicas e não fenólicas, formando radicais cátion. A figura 1 mostra uma simplificação do mecanismo de ação das duas enzimas, sendo S = substrato aromático e FOH = substrato fenólico. As enzimas são oxidadas por H_2O_2 aos compostos C_1 e, posteriormente, reduzidas em duas etapas, a partir da oxidação dos substratos, voltando às formas nativas [15].

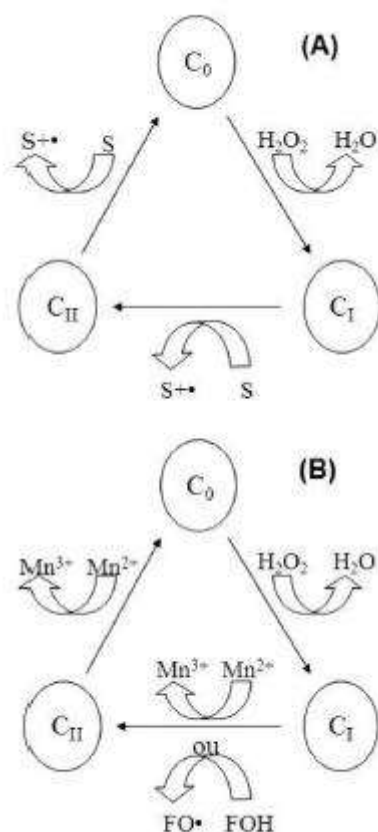


Figura 1. Simplificação do mecanismo de ação da lignina peroxidase (A) e da manganês peroxidase (B) [15].

As peroxidases que não possuem o grupo heme utilizam uma cisteína do sítio ativo que, ao ser oxidada por uma molécula de peróxido, age como oxidante para o substrato da enzima [13].

As peroxidases, dentre outras aplicações, são empregadas em indústrias de papel e celulose, no branqueamento da polpa e tratamento de efluentes [7]. Na indústria têxtil, após o branqueamento das fibras de algodão, as peroxidases decompõem o peróxido de hidrogênio residual, reduzindo o consumo de água, produtos químicos e energia [6].

3.3 Problemática dos corantes em efluentes líquidos

O crescimento populacional e o aumento da atividade industrial fizeram da ação antrópica grande causadora de sérios problemas ambientais, alterando a qualidade do ar do solo e das águas [1].

Os efluentes líquidos são gerados a partir da contaminação das águas utilizadas pelas indústrias, por resíduos do próprio processo industrial, podendo ocorrer na lavagem de máquinas, pisos e tubulações, nos sistemas de resfriamento e geração de vapor e nos esgotos. Ao serem despejados nos corpos d'água, os efluentes líquidos contaminados causam alterações nas características desses corpos e sua consequente poluição [2].

A poluição das águas é caracterizada por uma alteração química, física ou biológica em sua qualidade. O desafio é equilibrar a produção industrial com a conservação do meio ambiente. Antes de as substâncias dissolvidas e em suspensão na água serem removidas, devem ser transformadas em materiais estáveis ambientalmente [2].

A coloração em águas residuais é a primeira contaminação a ser reconhecida e deve ser removida antes do descarte desses efluentes no ambiente [3].

A cor é característica sensorial importante nos efluentes, confusamente controlada pela legislação. A cor aparente, resultante do lançamento de efluentes coloridos em um corpo hídrico, é composta de corantes dissolvidos e coloides, estes últimos causando turbidez. Há corantes orgânicos (sintéticos e/ou residuais), inorgânicos (metais pesados), compostos húmicos e subprodutos de biodegradação, quantificados em unidades Hazen (uH) [2].

As indústrias têxtil, gráfica e fotográfica utilizam extensivamente corantes sintéticos [1]. Para as indústrias, é importante que os corantes sejam recalcitrantes, para

que seus produtos não sejam facilmente danificados por agentes externos. Outros exemplos de indústrias que utilizam corantes são as de alimentos, cosméticas e farmacêuticas.

O setor têxtil merece destaque como gerador de volumes expressivos de resíduos com elevada carga orgânica e coloração, já que consome grande quantidade de água e há corante residual, estimado em 20% da carga utilizada nos tingimentos [5]. Esses corantes são formados por vários compostos de estrutura aromática complexa, tornando-os estáveis e dificultando sua biodegradação [7]. Para o tingimento, também são adicionados surfactantes, sais, óleos e graxas, chamados de auxiliares químicos, que dificultam o tratamento dos efluentes têxteis [4]. Dessa forma, os efluentes deste tipo de indústria são complexos e de composições variadas.

As moléculas de corante possuem duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura que se fixa à fibra, no tingimento de tecidos [1]. O grupo cromóforo mais representativo, cerca de dois terços dos corantes catalogados, pertence à família dos azo corantes, caracterizado por apresentar ligações $-N=N-$ a sistemas aromáticos [16]. Além dos azo, são exemplos de classificação de corantes baseados em sua estrutura química: índigo, ftalocianina, triarilmetano, antraquinona, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso [4, 5].

Outra forma de classificar os corantes é considerando-se o método pelo qual ele se fixa na fibra têxtil [5]. São eles: corantes reativos, corantes diretos, corantes azoicos, corantes ácidos, corantes a cuba, corantes de enxofre, corantes dispersos, corantes pré-metalizados e corantes branqueadores.

Todos os corantes absorvem luz na região do visível, sendo esta a característica comum a eles [3].

Os efluentes de indústrias de corantes ou têxteis, quando lançados em corpos d'água sem o devido tratamento, dificultam a absorção de luz pela vida aquática, podendo interferir em suas atividades fotossintéticas. Além disso, alguns corantes, como os azo, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos [5].

3.3.1 Tratamentos existentes

Os principais objetivos do tratamento de efluentes são atender à legislação ambiental e o reúso de águas. A natureza dos poluentes presentes nos efluentes e as

operações unitárias utilizadas em seu tratamento definem qual processo será utilizado, podendo ser classificados em físicos, químicos ou biológicos [2].

Os processos físicos removem os sólidos em suspensão. Como exemplo têm-se gradeamento, peneiramento, sedimentação, flotação, filtração e separação de óleos e gorduras. Sempre que possível, os resíduos devem ser removidos na forma sólida ou semi-sólida, evitando sua solubilização [2].

Os processos químicos utilizam produtos químicos nas etapas de tratamento que, através de reações químicas, removem os poluentes ou facilitam as etapas seguintes. São exemplos: clarificação química, eletrocoagulação, precipitação de metais tóxicos, redução de cromo hexavalente, oxidação de cianetos e troca iônica [2].

Já os processos biológicos removem a matéria orgânica dissolvida e em suspensão pela ação de microrganismos presentes nos efluentes, que a utilizam como substrato, transformando-a em novos microrganismos ou gases. Os principais processos são: lagoas anaeróbias, biodigestores, lodos ativados (processo aeróbio) e biofilmes [2]. Nos processos aeróbios os principais produtos finais são CO_2 e H_2O e nos anaeróbios CO_2 e CH_4 [17].

Alguns métodos físicos e químicos apresentam resultado em determinadas etapas do tratamento de efluentes, por exemplo, na remoção de material particulado. Porém, a remoção de cor ainda deixa a desejar [1].

Os estudos de biodegradação buscam microrganismos versáteis, que degradem vários poluentes a um baixo custo operacional. Porém, a diversidade e as diferentes concentrações de espécies químicas presentes nos efluentes dificultam os bons resultados [1]. Além disso, alguns poluentes, como os corantes, podem ser biodegradados e os metabólitos formados serem mais tóxicos que as moléculas de origem. E mesmo reduzindo-se os resíduos dos efluentes, há fases sólidas ou flocos biológicos resultantes, que se separam com facilidade da massa líquida, mas não possuem destino definido [1, 2].

Dessa forma, um resultado melhor no tratamento de efluentes só é possível com a combinação de vários desses métodos.

Os níveis de tratamento são classificados em preliminar (remoção dos sólidos grosseiros), primário (remoção de sólidos por sedimentação, flotação e floculação química), secundário (remoção de matéria orgânica) e terciário (melhoria da qualidade e desinfecção do efluente) e são aplicados conforme as características e necessidades do efluente e de seu corpo receptor [2].

É importante ressaltar que a preocupação das indústrias deve começar na fonte do efluente dentro da fábrica, não deixando o foco apenas para o tratamento no final do processo [1].

3.4 Tratamento enzimático

O tratamento de efluentes industriais tem sido cada vez mais difícil e complexo, devido à natureza variável e à diversidade dos componentes dos rejeitos, trazendo a necessidade de novas metodologias para sua adequação à legislação ambiental [1].

A combinação dos processos físicos, químicos e biológicos tem sido aplicada, porém com altos custos. Os processos químicos utilizam altas temperaturas e pressões [18] e, além disso, substâncias como detergentes e dispersantes dificultam a remoção de nitrogênio por bactérias em sistemas de lodo ativado. Processos alternativos e de maior eficiência são, portanto, de grande importância para remoção de cor e adequação dos efluentes industriais às leis de descarte [4, 16]. A degradação enzimática apresenta baixo consumo, melhores resultados, processos mais estáveis e operação simples em reator específico [18].

As enzimas são cada vez mais utilizadas em remediação por degradar poluentes específicos, precipitando-os ou transformando-os em produtos biodegradáveis. A redução dos custos dessa forma de tratamento de efluentes pode se dar pela utilização de vegetais com grande atividade enzimática, aplicados diretamente e tão eficientes quanto a enzima purificada [4].

Os avanços biotecnológicos possibilitam melhores procedimentos de isolamento e purificação de enzimas, resultando em produção mais barata, além de ambientalmente amigável. O tratamento enzimático permite aplicação em materiais recalcitrantes, atuação em amplo espectro de pH, temperatura e salinidade, ação em diversas concentrações de contaminantes, dentre outras vantagens em relação aos outros tratamentos [19].

3.5 Estudos sobre a ação de peroxidases em corantes

Pesquisas e experimentos cada vez mais vêm sendo feitos para comprovar a ação de peroxidases na remoção de compostos aromáticos em efluentes e sua eficiência na descoloração dos mesmos [7].

Oxirredutases, como as lacases e as peroxidases, podem transformar corantes aromáticos, além da precipitação, degradando seu anel aromático. As peroxidases têm ação comprovada em uma série de corantes, com remoção de grupamentos fenólicos tóxicos nos efluentes, usando peróxido de hidrogênio; porém, o mecanismo de degradação e a formação de metabólitos nessas reações às vezes são desconhecidos [4, 19].

3.5.1 Degradação de corantes de efluentes têxteis por peroxidase de nabo

Silva *et al* [4] realizaram uma avaliação do potencial de ação da peroxidase extraída das raízes do nabo (*Brassica campestris*), a partir de uma solução bruta, sem utilização de processos de purificação, em alguns corantes utilizados na indústria têxtil. Foram feitas quatro análises:

1. Ação da enzima nos seguintes corantes isolados:

- a) turqueza remazol G 133% (CTR) – classificação: ftalocianina;
- b) remazol brilliant blue R (RBBR) – classificação: antraquinona;
- c) levafix brilliant green E 5BA – classificação: triarilmetano;
- d) remazol vermelho ultra RGB (RVU);
- e) remazol brilliant orange 3R (RBO3R) – classificação: azo;
- f) acid orange 52 (AO52) – classificação: azo e
- g) acid blue 62 (AB62) – classificação antraquinona.

2. Ação da enzima nos corantes CTR e RBBR hidrolisados.

3. Ação da enzima em efluentes simulados, com presença de sais e auxiliares químicos de tingimento, contendo CTR e RBBR.

4. Ação da peroxidase em uma mistura dos corantes RBBR, RVU e RBO3R em igual proporção.

A figura 2 mostra a estrutura química de alguns dos corantes estudados.

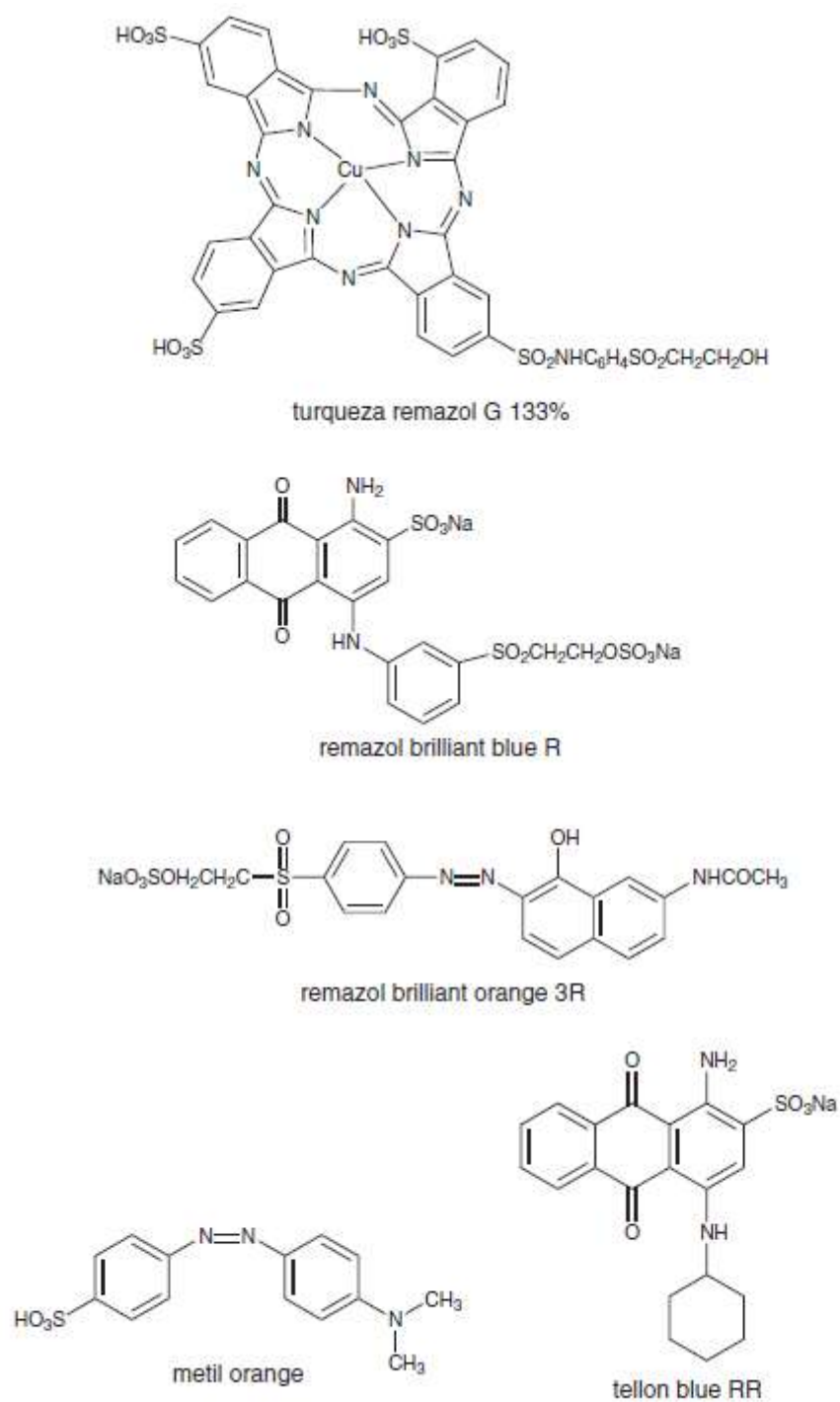


Figura 2. Estrutura química dos corantes [4].

Para interpretação dos resultados foram medidas as absorvâncias das soluções no decorrer das reações, nos comprimentos de onda nos quais os corantes absorvem luz. Dessa forma obteve-se:

1. Para os corantes isolados: os corantes CTR e levafix brilliant Green E 5BA foram mais sensíveis à ação enzimática, seguidos de RBBR, AO52 e AB62. Portanto, a peroxidase de nabo parece ter alta eficiência na remoção de corantes ftalocianínicos, antraquinona e triarilmetano e baixa eficiência na remoção de corantes azo.
2. No segundo caso, foi observado que a eficiência da enzima é reduzida pela hidrólise química dos corantes CTR e RBBR.
3. Verificou-se que a peroxidase de nabo tem seu potencial de degradação de corantes diminuído na presença dos auxiliares químicos de tingimento, sendo necessária a imobilização da enzima em suportes sólidos ou combinação com outros processos que removam os sais e auxiliares químicos, atenuando o impacto dos mesmos na atividade enzimática.
4. No último caso, foi visto que a mistura dos corantes não afetou a ação da enzima na remoção de cada um deles, representando um bom resultado, já que os efluentes reais normalmente contêm vários corantes.

Portanto, associada aos tratamentos microbianos, a aplicação da peroxidase de nabo pode representar um aumento na eficiência da remoção de corantes em efluentes têxteis.

3.5.2 Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima *Horseradish* peroxidase

Forgiarini [7] avaliou o potencial da enzima *Horseradish* peroxidase, também conhecida como peroxidase da raiz forte, na descoloração de corantes e efluentes têxteis e a toxicidade dessas amostras antes e depois do tratamento enzimático.

Para isso, foram utilizados os corantes reativos turqueza remazol G 133%, preto remazol B e o corante ácido azul lanaset 2R, sem tratamento prévio de purificação. A figura 3 traz suas estruturas químicas. Foram estudados os corantes individualmente e amostras de efluente de uma indústria têxtil. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (25 °C).

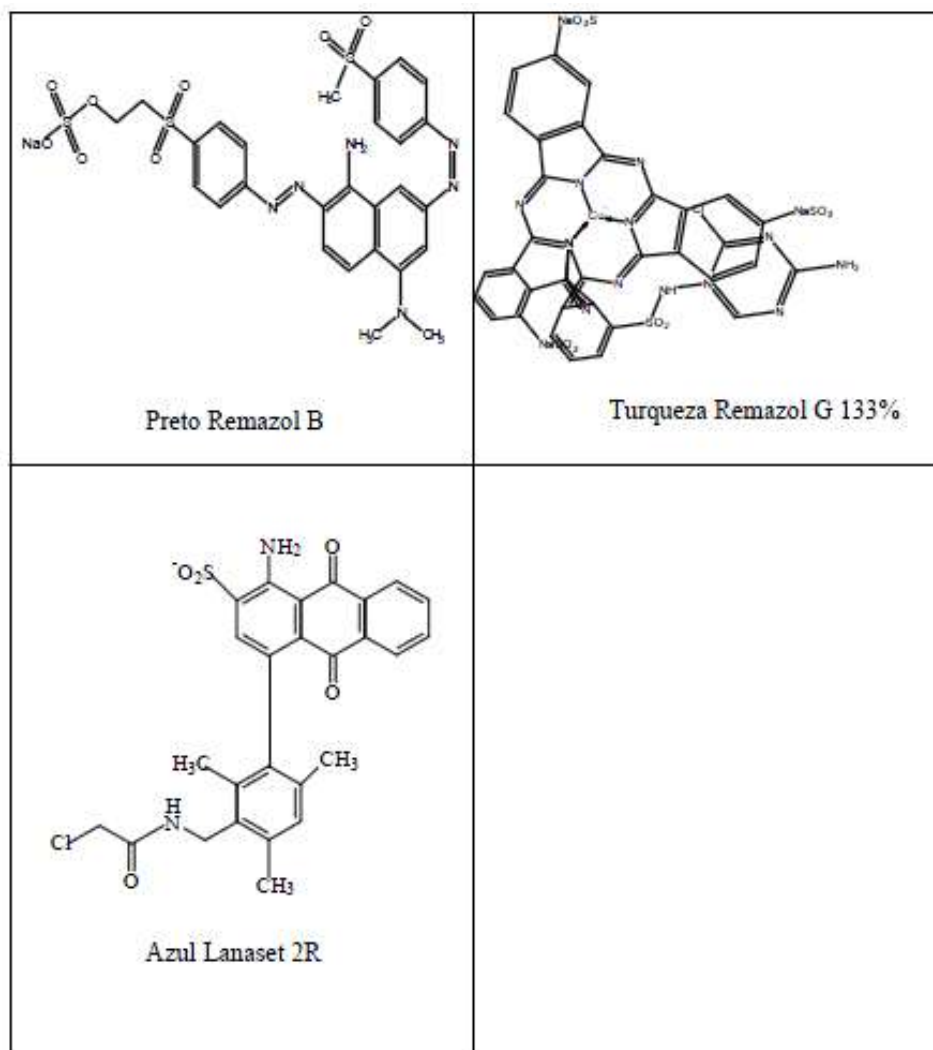


Figura 3. Estrutura química dos corantes utilizados [7].

Primeiramente, utilizando o corante turqueza remazol G 133% foram determinadas as condições ótimas de atuação da enzima. Dessa forma, nas condições ótimas, a enzima foi aplicada nos outros dois corantes e no efluente têxtil. Avaliou-se, então, a descoloração das amostras e sua toxicidade antes e após a ação da enzima.

O resultado da ação da peroxidase e a velocidade de descoloração foram diferentes em cada caso, devido às diferenças estruturais e recalcitrantes de cada corante. Os corantes azul lanaset 2R e turqueza remazol G 133% obtiveram descoloração de 94 e 59%, respectivamente. Já o preto remazol B não descoloriu. No efluente têxtil o melhor resultado da enzima foi de 52% de descoloração.

Para avaliar a toxicidade dos corantes utilizou-se *Artemia salina* e raiz de cebola como organismos teste. Foi observado que, após o tratamento enzimático, a toxicidade

do corante aumenta; possivelmente há formação de espécies intermediárias mais tóxicas que a substância inicial. Os testes de toxicidade para o efluente têxtil foram feitos utilizando-se os bioindicadores *Artemia salina*, *Daphnia magna* e inibição do crescimento da raiz de cebola *Allium cepa*. Considerando a sensibilidade de cada organismo aos compostos tóxicos, observou-se que, após o tratamento enzimático, ao contrário dos corantes em separado, a toxicidade do efluente diminuiu.

É importante salientar também que os resultados tendem a ser melhores quando a enzima encontra-se imobilizada, em comparação à forma livre. Estudos nesse sentido também podem ser feitos a fim de aumentar a eficiência do tratamento.

3.6 Degradação de corantes em efluentes industriais por fungo da podridão branca e suas enzimas

Outras propostas de estudos também se revelam promissoras, como a utilização de fungos da podridão branca para produção de enzimas com ação degradante sob os corantes presentes em efluentes industriais [7].

Fungos da podridão branca são organismos capazes de degradar um dos constituintes fundamentais da madeira, a lignina [20], tornando-a menos rígida e mais clara.

O fungo da podridão branca é um dos organismos mais estudados na descoloração de corantes, principalmente por possuir um sistema enzimático extracelular complexo, que em ambientes com limitações de nutrientes consegue degradar compostos ligninolíticos, aromáticos complexos e melanoidinas, muitas vezes não degradados por outros organismos [21, 22].

Esse sistema inclui as enzimas lignina peroxidase, manganês peroxidase e a fenoloxidase, lacase. Frequentemente são expressas mais de uma isoforma das enzimas. Elas são produzidas durante o metabolismo secundário do fungo, sua síntese e secreção são, muitas vezes, induzidas por níveis limitados de carbono e nitrogênio [21].

3.6.1 Descoloração microbiana de corantes azo e corante em efluente industrial por *Fomes lividus*

Selvam *et al* [23] isolaram o fungo da podridão branca *Fomes lividus* no sul da Índia e pesquisaram seu potencial de remoção de corantes azo em soluções aquosas e de descoloração de corantes têxteis em efluente industrial.

- Descoloração de corantes azo:

Foi testada a remoção dos corantes azo: orange G, congo red e amido black 10B pelo fungo, em solução aquosa. Os corantes foram inoculados com suspensão de esporos de *Fomes lividus* e incubados em shaker.

As seguintes taxas de descoloração foram observadas: orange G – 30,8%, congo red – 74% e amido black 10B – 98,9%.

- Descoloração de corante em efluente industrial:

Para que a eficiência do fungo em descolorir o efluente fosse avaliada, os testes foram feitos em modo contínuo e em batelada. Ao efluente foi adicionada suspensão de esporos do fungo e o meio foi incubado. Em batelada, 84,4% da coloração foram removidos do efluente e, no modo contínuo, somente 37,5%.

A intensidade da cor das amostras foi medida em espectrofotômetro.

Os resultados mostram que, embora a descoloração do orange G não tenha sido muito eficiente, o potencial de aplicação de *Fomes lividus* em biorremediação de efluentes é claro. Os corantes congo red e amido black foram bem removidos e os testes em batelada mostraram um excelente resultado na descoloração do efluente, principalmente tendo em vista que a grande maioria dos efluentes é constituída por vários tipos de corantes. Além da ação das enzimas ligninolíticas, a adsorção física do corante pelo fungo contribuiu para o sucesso da descoloração das amostras analisadas.

Considerando que as enzimas são produzidas pelo fungo durante seu metabolismo secundário [21] e que em batelada esta etapa pode ser mais facilmente alcançada, isto pode ser uma possível explicação para o sucesso destes testes.

4. Conclusão e sugestões

As enzimas peroxidase mostraram-se opção eficiente no tratamento de efluentes coloridos, tanto na descoloração, quanto na diminuição da toxicidade de amostras, podendo ser aplicada em grande escala, diminuindo custos, além de ser uma alternativa ambientalmente amigável. Pode ser interessante testar a atuação de outras enzimas para que, agindo em conjunto com as peroxidases, possam obter resultados ainda melhores sem a necessidade de aplicação de outros tratamentos, como os químicos ou físicos. Além disso, utilizar ao mesmo tempo diferentes fontes de peroxidases, como bactérias e fungos da podridão branca, pode ser alternativa promissora, pois os mecanismos de ação e os tipos de enzimas liberadas em cada caso são diferentes e podem se complementar.

5. Referências bibliográficas

- [1] KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
- [2] GIORDANO, G. **Tratamento e controle de efluentes industriais**. 2009. 81 p.
- [3] BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 217-227, 1996.
- [4] SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; TORRES, J. A.; AMORIM, M. T. S. P. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 889-894, 2012.
- [5] GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n.1, p.71-78, jan./fev. 2000.
- [6] BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.
- [7] FORGIARINI, E. **Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP)**. 2006. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- [8] CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R.; GAMA, M. (coord.). **Engenharia enzimática**. Lisboa: Lidel, 2003. 250 p.
- [9] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2007. 1202 p.
- [10] BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. 254 p.

- [11] SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering**: basic concepts. 2.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 2010. 553 p.
- [12] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology – Enzyme Nomenclature. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 15/10/2014.
- [13] DUNFORD, H. B.; STILLMAN J. S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 19, p. 187-251, 1976.
- [14] GLENN, J. K.; AKILESWARAN, L.; GOLD, M. H. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 251, n. 2, p. 688-696, 1986.
- [15] AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729-1738, 2011.
- [16] VANDEVIVERE, P.C.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1998.
- [17] PERALTA-ZAMORA, P.; ESPOSITO, E.; REYES, J.; DURÁN, N. Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose. Tratamento biológico e fotocatalítico. **Química Nova**, v. 20, p. 186-190, 1997.
- [18] WU, Y.; LI, T.; YANG, L. Mechanisms of removing pollutants from aqueous solutions by microorganisms and their aggregates: a review. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 10-18, 2012.
- [19] DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

[20] BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 78-87, 1994.

[21] WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.

[22] PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2321-2334, 2007.

[23] SELVAM, K.; SWAMINATHAN, K.; CHAE K-S. Microbial decolorization of azo dyes and dye industry effluent by *Fomes lividus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 591-593, 2003.