

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP

**POTENCIAL APLICAÇÃO DE PEROXIDASE DE
RABANETE (*Raphanus sativus L.*) IMOBILIZADA EM
FIBRA DE COCO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES**

Autor: Kennedy Costa da Conceição

Orientadores: Prof. Dr^a Cleide Mara Faria Soares

Prof. Dr^a Rebeca Yndira Cabrera Padilla

ARACAJU, SE – BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

POTENCIAL APLICAÇÃO DE PEROXIDASE DE RABANETE (*Raphanus sativus*
L.) IMOBILIZADA EM FIBRA DE COCO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Kennedy Costa da Conceição

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM ENGENHARIA DE PROCESSOS.

Aprovado em: 23/02/2018

Dr.^a Cleide Mara Faria Soares
Orientadora – PEP/UNIT

Dr.^a Rebeca Yndira Cabrera Padilla
Orientadora

Dr. Ranyere Lucena de Souza
Membro interno – PEP/UNIT

Dr.^a Alini Tinoco Fricks
Membro externo – PBI/UNIT

Dr.^a Luciana Cristina Lins de Aquino Santana
Membro externo – RENORBIO/UFS

ARACAJU, SE – BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

C744p Conceição, Kennedy Costa da
Potencial aplicado de Peroxidase de Rabanete (*Raphanus sativus* L.) imobilizada em fibra de coco no tratamento de efluentes / Kennedy Costa da Conceição; orientação [de] Prof.^a Dr.^a Cleide Mara Faria Soares, Prof.^a Dr.^a Rebeca Yndira Cabrera Padilha – Aracaju: UNIT, 2018.

85 f. il.: 30cm

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, 2018

Inclui bibliografia.

1. Rabanete. 2. Fibra de coco. 3.Imobilização. 4. Biodegradação. 5. Correntes têxteis
I. Conceição, Kennedy Costa da. II. Soares, Cleide Mara Faria. (orient.). III. Padilha, Rebeca Yndira Cabrera (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 677:628.5-026.85

Primeiramente dedico este momento de grande felicidade a DEUS por me dar forças e iluminar sempre meus caminhos;

A minha madrinha, Meire, pelo seu amor incondicional, "Se fui capaz de ver mais longe foi apenas porque eu estava apoiado sobre ombro de gigantes." (Isaac Newton);

Agradeço imensamente a minha família por não medirem esforços para que eu alcance meus objetivos pessoais, profissionais e também por toda a compreensão nos momentos de minha ausência. Eu amo vocês imensamente;

Às minhas orientadoras Prof. Dr^a. Cleide Mara e Prof. Dr^a Rebeca Yndira, pela oportunidade e confiança em meu trabalho, por cumprirem o papel de orientadora com tanta dedicação e paciência. Agradeço pelos incentivos, pela confiança, pela disposição e oportunidade;

Há tantos pra agradecer, Prof. Dr^a Alini Tinoco Fricks a palavra mestre, nunca fará justiça à professores dedicados, em especial tu, onde terá meu eterno agradecimento;

A banca examinadora por aceitarem o convite em participar da defesa, Prof. Dr Ranyere Lucena de Souza e Prof.^a Dr^a. Luciana Cristina Lins de Aquino Santana por todo acompanhamento e por sempre se mostrarem disponíveis em ajudar;

Agradeço imensamente a todos os meus amigos de turma/laboratório. Não nos tornamos amigos apenas porque estudamos juntos e vivemos quase as mesmas experiências, mas sim porque fizemos parte da mesma escolha, seguimos a mesma trilha, dividimos os mesmos sonhos, as mesmas decepções, e tivemos uns aos outros para apoiar, confiar e, acima de tudo, admirar;

Aos funcionários da Universidade Tiradentes e do Instituto de Tecnologia e Pesquisa, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

Por fim, agradeço a todos os colegas de trabalho que diretamente ou indiretamente colaboram para a conclusão do trabalho;

À CAPES e FAPITEC/SE, pela concessão da bolsa de Mestrado.

MUITO OBRIGADO!

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

POTENCIAL APLICAÇÃO DE PEROXIDASE DE RABANETE (*Raphanus sativus* L.) IMOBILIZADA EM FIBRA DE COCO NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Kennedy Costa da Conceição

O presente estudo tem como objetivo avaliar a biodegradação de corantes têxteis utilizando peroxidase obtida a partir do rabanete imobilizado pelo método de adsorção física em fibra de coco como suporte orgânico, bem como a caracterização do pH, temperatura e FTIR. A Eficiência de Descoloração (ED) da peroxidase de rabanete livre (PRL) e da peroxidase de rabanete imobilizada (PRI) em fibra de coco foi quantificada em diferentes λ por espectrofotometria UV-Vis, 660 nm para Azul de Metileno (AM), 625 nm para Azul Marinho (AZM) e 527 nm para Vermelho do Congo (VC). Todos os ensaios de biodegradação da PRL e PRI foram conduzidos durante 1 h a 200 rpm à 25 °C num volume total de 10 mL em reator de tanque agitado. Os parâmetros avaliados para forma livre e imobilizada foram: efeito do pH, razão molar corante: H₂O₂, quantidade de biocatalisador e tempo de contato, e estabilidade operacional para PRI. Após a determinação das condições ótimas verificou-se a ED máxima, para PRL e PRI 26 e 87% para AM (pH 8 para ambos, 1:1 mmol/L e 1:0,5 mmol/L, 40,4 U e 3,25x10⁻³ U, respectivamente), 62 e 61% para AZM (pH 5, 1:10 mmol/L para ambos, 13,45 U e 26,25x10⁻³ U, respectivamente) e 70 e 50% para VC (pH 4 e 2, 1:1 mmol/L para ambos, 9,32 U e 23,66x10⁻³ U, respectivamente). A PRI foi reutilizada dez vezes para AM e duas vezes para AZM e VC, respectivamente, mantendo mais de 50% de eficiência inicial. Desta forma, os resultados confirmam o uso potencial de peroxidase de rabanete imobilizado em fibra de coco na biodegradação de corantes.

Palavras-chave: Rabanete, fibra de coco, imobilização, biodegradação, corantes têxteis.

Abstract of the dissertation presented to the Process Engineering graduate program of University Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.).

POTENTIAL APPLICATION OF RUBBER PEROXIDASE (*Raphanus sativus L.*)
IMMOBILIZED IN COCONUT FIBER IN EFFLUENT TREATMENT

Kennedy Costa da Conceição

The present study aims to evaluate the biodegradation of textile dyes using peroxidase obtained from radish immobilized by physical adsorption method on an organic support coconut fiber, as well as the characterization pH, temperature and FTIR. The discoloration efficiency (DE) of free radish peroxidase (FRP) and immobilized radish peroxidase (IRP) in coconut fiber was quantified in different λ by UV-Vis spectrophotometry, 660 nm Methylene Blue (MB), 625 nm Navy Blue (NB) and 527 nm Red Congo (RC). All biodegradation assays of FRP and IRP were conducted for 1 h at 200 rpm at 25 °C in a total volume of 10 mL in stirred tank reactor. The parameters evaluated for free and immobilized form were: effect of pH, molar ratio dye: H₂O₂, amount of biocatalyst and contact time, and operational stability to IRP. After determination of optimized conditions the maximum DE, for FRP and IRP 26 and 87% for MB (pH 8 for both, 1:1 mmol L⁻¹ and 1:0.5 mmol L⁻¹, 40.4 U and 3.25x10⁻³ U, respectively), and 62 and 61% for NB (pH 5, 1:10 mmol L⁻¹ for both, 13.45 U and 26.25x10⁻³ U, respectively) and 70 and 50% for RC (pH 4 and 2, 1:1 mmol L⁻¹ for both, 9.32 U and 23.66x10⁻³ U, respectively). The IRP was reused ten times for MB and twice for NB and RC, respectively, maintaining more than 50% initial efficiency. In this way, the results confirm the potential use of peroxidase of radish immobilized on coconut fiber in the biodegradation of dyes.

Keywords: Radish, coconut fiber, immobilization, biodegradation, textile dyes.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II.....	4
2. OBJETIVOS	4
2.1 OBJETIVO GERAL	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO III	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	5
3.2 TIPOS DE SUPORTES.....	7
3.3 COCOS NUCIFERA L. E SUA FIBRA	9
3.4 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	11
3.5 PRÉ – TRATAMENTO DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICO	12
3.6 PEROXIDASE DE <i>Raphanus sativus L.</i> E APLICAÇÕES.....	15
3.7 CORANTES TÊXTEIS.....	18
3.8 TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS	21
CAPÍTULO IV.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAL	25
4.2 MÉTODOS.....	26
4.2.1 Obtenção do Extrato Bruto do Rabanete	26
4.2.2 Determinação de Proteínas.....	26
4.2.3 Fibra de coco (Pré-Tratamento Alcalino).....	27
4.2.4 Imobilização da Peroxidase de Rabanete (<i>Raphanus sativus L.</i>).....	27
4.2.5 Determinação da Atividade Peroxidásica	27
4.2.6 Efeito de pH e temperatura sobre a atividade peroxidase na forma livre e imobilizada ..	28
4.2.7 Preparação das soluções dos Corantes Têxteis e espectros de adsorção.....	28
4.2.8 Teste de Biodegradação de Corantes Têxteis	29
4.2.8.1 Efeito de pH	29
4.2.8.2 Razão Molar do Corante: Peroxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	30
4.2.8.3 Quantidade de Biocatalisador	30

4.2.8.4 Tempo de Contato.....	30
4.2.9 Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	30
4.2.10 Estabilidade Operacional	31
CAPÍTULO V	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE RABANETE E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PEROXIDÁSICA	32
5.2 IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE DE RABANETE (PR) EM FIBRA DE COCO POR ADSORÇÃO FÍSICA.....	33
5.3 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	34
5.4 DEGRADAÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO, AZUL MARINHO E VERMELHO DO CONGO UTILIZANDO A PEROXIDASE DE RABANETE NA FORMA LIVRE (PRL) E IMOBILIZADA (PRI).....	36
5.4.1 Corante Catiônico e Reativo: Azul de Metileno e Azul Marinho	36
5.4.1.1 Efeito de pH	36
5.4.1.2 Efeito da razão molar do corante: peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	38
5.4.1.3 Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração.	39
5.4.1.4 Efeito do tempo de contato	41
5.4.2 Corante Direto: Vermelho do Congo.....	43
5.4.2.1 Efeito de pH	43
5.4.2.2 Efeito da razão molar do corante (VC): peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	44
5.4.2.3 Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração	45
5.4.2.4 Efeito do tempo de contato	47
5.5 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	48
5.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL DO BI NA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO, AZUL MARINHO E VERMELHO DO CONGO.....	50
CAPÍTULO VI.....	53
6. CONCLUSÃO.....	53
CAPÍTULO VII.....	55
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	55
CAPÍTULO VIII.....	56
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	56
ANEXO.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Técnica de Imobilização de Enzimas por Adsorção Física.....	6
Figura 2: Ilustração do Coqueiro e corte longitudinal do coco verde com a descrição de suas partes, modificado.....	10
Figura 3: Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento, com modificações.....	12
Figura 4: Amostras de Rabanete (<i>Raphanus sativus L.</i>) obtidas no mercado local.....	15
Figura 5: Estrutura química do ferro heme, modificado.....	16
Figura 6: Ciclo catalítico da peroxidase (HRP). As constantes de taxa k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente.....	17
Figura 7: Eficiência de Imobilização da PR em suporte de fibra de coco por adsorção física em função do carregamento enzimático.....	33
Figura 8: Efeito de pH do extrato bruto da peroxidase (■) extraída a partir do rabanete e imobilizada (○) por adsorção física na atividade relativa.....	34
Figura 9: Efeito da temperatura do extrato bruto da peroxidase (■) extraída a partir do rabanete e a imobilizada (○) por adsorção física na atividade relativa.....	35
Figura 10: Efeito de pH na eficiência de descoloração do Azul de Metileno (A) (PRL —▲—) e (PRI —□—), e Azul Marinho (PRL —●—) e (PRI —△—).....	36
Figura 11: Efeito da razão molar do corante: H_2O_2 na eficiência de descoloração do Azul de Metileno (A) (PRL ▨) e (PRI ■) e do Azul Marinho (B) (PRL ■) e (PRI ▩).....	38
Figura 12: Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração do Azul de Metileno (A: PRL —▲—) e (B: PRI —□—) e para Azul Marinho (C: PRL —●—) e (D: PRI —△—).....	40
Figura 13: Efeito do tempo de contato na eficiência de descoloração do Azul de Metileno pelo biocatalisador livre (PRL ▨) e imobilizada (PRI ■) para Azul Marinho (PRL ■) e (PRI ▩).....	42
Figura 14: Efeito de pH na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo (PRL —■—) e (PRI —○—).....	43
Figura 15: Efeito da razão molar do corante: H_2O_2 na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo (PRL ■) e (PRI ▨).....	45

Figura 16: Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo (A: PRL —■—) e (B: PRI —○—).....	46
Figura 17: Efeito do tempo de contato na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo mediante biocatalisadores na forma livre (PRL ■) e imobilizada (PRI ▣).....	47
Figura 18: Espectro no infravermelho (FTIR) para as bandas características entre 4000 – 650 cm ⁻¹ são representados por (a) para o corante Azul de Metileno, (b) para o corante Azul Marinho e (c) para o corante Vermelho do Congo. As amostras analisadas foram identificadas por enzima livre (1), fibra de coco tratada por (2), biocatalisador imobilizado por (3), corante azul de metileno AM por (4) e BI após o tratamento de AM por (5), corante azul marinho por (6) e BI após o tratamento de AZM por (7) e o corante vermelho do congo por (8) e BI após o tratamento de VC por (9). A ampliação da escala das mesmas amostras é descrita nos espectros a1, b1 e c1, nas bandas características entre 2000 – 650 cm ⁻¹	49
Figura 19: Ciclos de Reuso da PRI na degradação do corante catiônico Azul de Metileno.....	51
Figura 20: Ciclos de Reuso da PRI na degradação do corante reativo Azul Marinho...	51
Figura 21: Ciclos de Reuso da PRI na degradação do corante direto Vermelho do Congo.....	52

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Composição Química dos Suportes Orgânicos, Inorgânicos e Híbridos.....	7
Tabela 2: Produção de coco na Região Nordeste do Brasil em 2017 (LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2017).....	9
Tabela 3: Estruturas químicas dos corantes Azul de Metileno (AM), Vermelho do Congo (VC) e Azul Marinho (AZM).....	26
Tabela 4: Atividade Enzimática de Extrato Bruto de Rabanete preparado com tampão fosfato de sódio dibásico anidro.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

PR	Peroxidase de Rabanete
PRL	Peroxidase de Rabanete na forma Livre
PRI	Peroxidase de Rabanete na forma Imobilizada
BI	Biocatalisador Imobilizado
EI	Eficiência de Imobilização
ADS	Adsorção Física
AM	Azul de Metileno
AZM	Azul Marinho
VC	Vermelho do Congo
ED	Eficiência de Descoloração
PHVB	Poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)
FRP	Free Radish Peroxidase
IRP	Immobilized Radish Peroxidase
MB	Methylene Blue
NB	Navy Blue
RC	Red Congo
DE	Discoloration efficiency
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

A remoção da cor dos efluentes é um dos grandes problemas enfrentados pelo setor têxtil. A elevada estabilidade química dos corantes dificulta sua degradação pelos sistemas de tratamento convencionais empregados pelas indústrias têxteis. A contaminação de rios e lagos com estes compostos provocam, além da poluição visual, sérios danos à fauna e flora destes locais (DALLAGO *et al.*, 2005).

Devido a estas implicações ambientais, novos processos de remoção e/ou degradação destes compostos em efluentes têxteis têm sido testados. As principais técnicas disponíveis para a descoloração de águas residuais envolvem adsorção, precipitação, degradação química, processos eletroquímicos, fotoquímicos e biodegradação (DE SOUZA *et al.*, 2007). Dentro deste contexto, processos alternativos vêm sendo utilizados por meio de ação de enzimas, particularmente as oxidoredutases (SATAR e HUSAIN, 2009; SILVA *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2014).

Os tratamentos enzimáticos ainda não são comumente usados nas indústrias têxteis. Os altos custos associadas à produção e aplicação de biocatalisadores ainda dificultam seu uso em grande escala com finalidades ambientais. Os biocatalisadores imobilizados são sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em certa região definida no espaço com retenção de atividades catalíticas e que podem ser usadas repetida e continuamente, promovendo uma maior estabilidade operacional, aumentar a vida útil da enzima e facilitar a separação do produto do catalisador (PACHECO e SOARES, 2014). A extração a partir de fonte vegetal pode ser uma alternativa para o uso de enzimas de baixo custo e conseqüentemente consolidação biocatalítica ambiental (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Segunda a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) as enzimas podem ser classificadas em 6 como transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e dentre elas a oxidoredutases, onde o peróxido de hidrogênio atua em seu meio, degradando a partir dos compostos fenólicos os efluentes têxteis.

As peroxidases (EC 1.11.1.7) são heme proteínas que catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SINGH *et al.*, 2015). A fim de melhorar a eficiência e o custo do processo enzimático, a enzima pode ser imobilizada a fim de obter a reutilização. A escolha de um suporte adequado para realizar a imobilização é

influenciada pelas suas propriedades químicas (composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, estabilidade), mecânicas e geométricas (tamanho, forma, espessura, porosidade), características da enzima a ser imobilizada (composição química, propriedades físicas, estrutura) e suas propriedades ecológicas e biológicas (DA SILVA *et al.*, 2012).

Para conseguir uma aplicação de baixo custo a nível industrial, existem relatos de alguns suportes de baixo custo oriundos de resíduo agroindustrial, eficazes para imobilização de enzimas, como casca de arroz, palha de arroz e fibra de coco em oxidorreduções. O suporte de fibra de coco já foi utilizado por ser uma alternativa barata e facilmente disponível para a imobilização da lacase comercial na aplicação da descoloração do corante têxtil. A técnica de imobilização representa, no entanto várias vantagens, como porosidade de suporte elevado e estabilidade, num método suave, rápido, simples e baixo custo, como adsorção física tem como base a sua bioafinidade, ligação de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Este método economiza tempo e mão de obra uma vez que é uma operação simples podendo ser reutilizado em vários ciclos após dessorção da enzima inativa (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011; BOUCHERIT *et al.*, 2013).

Os corantes são compostos aromáticos complexos, que são normalmente utilizados para a coloração de vários substratos, às vezes são fundidos com metais pesados na estrutura interfacial e são considerados como uma consequência relativamente ruim para o meio ambiente, devido à sua natureza tóxica e inibitória (MOHAN *et al.*, 2005). Corantes como Azul Marinho e Vermelho do Congo apresenta uma estrutura do tipo antraquinona e azo, onde a antraquinona dispõe de moléculas mais resistentes a biodegradações a partir de processos convencionais, devido às suas estruturas aromáticas fundidas em comparação com o azo (CELEBI *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013). No Azul de Metileno sua estrutura molecular exhibe um comportamento característico na forma catiônica, podendo se unir à dímeros moleculares, ou mesmo trímeros e agregados maiores, facilitando sua degradação por sistemas convencionais e de baixo custo (SARTORI *et al.*, 2011).

Na sua aplicação, as enzimas podem atuar sobre os poluentes, na degradação utilizando biocatalisadores imobilizados, que podem alterar as características de um determinado local poluente tornando-se mais acessível para um tratamento viável na remoção de compostos fenólicos e aminas aromáticas presentes nos efluentes indústrias têxteis (CHAGAS *et al.*, 2015).

Desta forma, conhecendo os problemas ambientais ocasionados a partir das indústrias têxteis, foi realizada a avaliação do potencial da peroxidase extraída a partir do rabanete na forma livre e imobilizada em fibra de coco na descoloração dos corantes catiônico, direto e reativo, ainda não descrito na literatura.

Capítulo II

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o processo de biodegradação de corantes têxteis utilizando o extrato bruto da peroxidase obtida a partir do rabanete (*Raphanus sativus L.*) imobilizada pela técnica de adsorção física em suporte orgânico de fibra de coco.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair a peroxidase a partir do rabanete (*Raphanus sativus L.*);
- Efetuar o tratamento alcalino da fibra de coco;
- Estudar o carregamento enzimático na imobilização da peroxidase em fibra de coco pelo método de adsorção física;
- Determinar o efeito pH e temperatura da peroxidase de rabanete livre e o biocatalisador imobilizado na atividade enzimática;
- Obter espectros de absorção dos corantes têxteis por UV-Vis: Azul de Metileno, Azul Marinho e Vermelho do Congo;
- Realizar ensaios de biodegradação dos corantes utilizando a peroxidase (PR) na forma livre (PRL) e imobilizada (PRI) em fibra de coco;
- Avaliar efeito de pH, a razão molar do meio reacional, quantidade de biocatalisador e tempo de contato para peroxidase na forma livre e imobilizada na eficiência de descoloração;
- Caracterizar por Análise por Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) a enzima livre, a fibra de coco tratada, biocatalisadores imobilizados antes e após o tratamento e os corantes catiônico, direto e reativo puro;
- Avaliar a estabilidade operacional dos biocatalisadores imobilizados na eficiência de descoloração.

Capítulo III

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica serão abordados os seguintes tópicos: Imobilização de enzimas, tipos de suportes, fibra de coco (*Coconut nucifera L.*) e sua composição, material lignocelulósico, pré-tratamento, peroxidase e a aplicação da enzima livre e imobilizada no tratamento de efluentes têxteis, além da legislação ambiental em nosso país.

3.1 Imobilização de Enzimas

Um amplo espectro de enzimas já foi estudado em várias aplicações biotecnológicas, como a biodegradação de xenobióticos e efluentes industriais, descoloração de corantes, biorremediação de solos contaminados, produção de etanol, clarificação de vinhos e chás e utilização em biossensores (SKORONSKI *et al.*, 2014).

Entretanto, a utilização de enzimas na sua forma livre em diferentes processos está associada a vários inconvenientes, como a instabilidade em diferentes temperaturas, pH e a dificuldade na recuperação desses biocatalisadores. Quando aplicadas em processos industriais torna o processo mais atrativo quando elas podem ser imobilizadas em um suporte inerte, permitindo a sua fácil separação após a reação (SKORONSKI *et al.*, 2014). Um obstáculo relevante é o elevado custo das enzimas, assim a imobilização de enzimas e sua reutilização após uma série de ciclos reacionais diminui os custos em aplicações industriais e permite o controle do processo (BOROS *et al.*, 2013).

A enzima pode ser ligada ao suporte sólido ou fisicamente confinada no interior de uma matriz e a classificação do método de imobilização pode ser considerada quanto ao tipo de interação entre a enzima e o suporte, como método químico ou físico, ou a natureza do suporte: poroso ou não-poroso (CARVALHO *et al.*, 2015).

Os tipos de imobilização podem ser: encapsulamento, ligação covalente, adsorção (química ou física), entre outras (SINGH *et al.*, 2013; SHELDON e PELT, 2013). O método por encapsulamento consiste em proteger os biocatalisadores em um único compartimento de volume definido, que representa um micro-ambiente separado do ambiente externo. A técnica de imobilização de ligação covalente consiste em uma modificação na superfície do suporte com agentes bifuncionais para imobilização

eficiente e irreversível da enzima. Portanto, é considerada uma alternativa à fraca ligação proporcionada pelos métodos de adsorção física, no entanto, por envolver tratamento químico do suporte, pode ocorrer modificação no sítio ativo da enzima incluindo a hiperativação (CARVALHO *et al.*, 2015).

A adsorção física (ADS) é um dos métodos mais simples para imobilizar enzimas e não altera facilmente o seu sítio ativo. A ligação da enzima na superfície das partículas envolvem apenas as interações fracas, tais como ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e ligação de van der Waals (MENDES *et al.*, 2012). A interação por adsorção física (Figura 1) é fraca e pode ocasionar a lixiviação da enzima nos meios reacionais, por isso se faz necessário estudos quanto a influencia da porosidade do suporte. A facilidade de dessorção leva a uma fácil perda enzimática, mas isso pode ser também visto como uma vantagem, pois permite a recuperação do suporte após desnaturação da enzima e nova imobilização (CARVALHO *et al.*, 2015).

As principais vantagens deste método de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo, baixo custo e a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada (MENDES *et al.*, 2012). Entretanto, esta técnica consiste em se colocar em contato a solução da enzima com o suporte por meio de interações intermoleculares fracas, em determinadas condições de pH, temperatura e agitação.



Figura 1: Técnica de Imobilização de Enzimas por Adsorção Física, modificada. Fonte: (IQBAL *et al.*, 2013).

A adsorção física pode ser um protocolo adequado para imobilização quando utilizados em meio apolar. No entanto, a dessorção de enzimas é a principal desvantagem deste procedimento de imobilização (CABRERA *et al.*, 2009). O suporte sólido usado nos métodos de adsorção física é classificado principalmente como três tipos: suportes hidrofílicos, hidrofóbicos e anfifílicos.

Na literatura relatam-se diversos estudos utilizando os métodos de imobilização de enzimas por adsorção física em suportes orgânicos, inorgânicos e alguns em híbridos (DA SILVA *et al.*, 2012; SHELDON e PELT, 2013; SKORONSKI *et al.*, 2014).

3.2 Tipos de Suportes

Os suportes são materiais desenvolvidos com características e estrutura que influenciam diretamente as propriedades da enzima imobilizada. Assim, diversos tipos de materiais são estudados como suportes para a imobilização de enzimas como os suportes naturais e sintéticos que podem ser classificados como orgânico (fibra de coco, bagaço de cana de açúcar, quitosana, etc.), inorgânico (sílica, zircônia, titânia, alumina, fosfato de cálcio, etc.), híbrido (sílicas com celulose e sílica com lignina), não poroso, microporoso, mesoporoso ou macroporoso (MENDES *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2016).

Sobre a composição de seus suportes em forma geral mostra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Composição Química dos Suportes Orgânicos, Inorgânicos e Híbridos.

ORGÂNICOS		INORGÂNICOS		HÍBRIDO	
Naturais	Sintéticos	Minerais	Sintéticos	Naturais	Sintéticos
Polissacarídeos	Poliestireno	Areia	Fabricados	Sílica com	Sílica com
Ágar	Poliacrilatos	Bentonita	Vidro	Celulose	PHVB
Quitina	Polivinílicos	Horneblenda	Cerâmica	Sílica com	
Quitosana	Nailon	Pedra-Pomes	Sílica	Lignina	
Amido					
Celulose					
Proteínas					
Colágeno					
Albunima					
Gelatina					
Glúten					
Seda					

Na seleção do tipo de suporte para uma determinada aplicação as suas propriedades físicas e químicas devem ser analisadas como também a viabilidade de regeneração. As propriedades de um suporte ideal incluem resistência física a compressão, hidrofobicidade, resistência ao ataque microbiano, baixo custo de produção, ser inerte quimicamente e elevada área superficial (GUISAN, 2006).

Segundo CARVALHO *et al.*, (2015) as principais características a serem observadas na seleção de um suporte são:

(i) Características químicas os suportes devem possuir grupos químicos que podem ser ativados ou modificados de modo a permitir a ligação da enzima em

condições que não a desnaturem. Sua composição é baseada em grupos funcionais, estabilidade química, composição da superfície do suporte e micros efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos).

(ii) Características mecânicas que se referem ao comportamento de compressão, tamanho da partícula, diâmetro do poro, área superficial, volume acessível da matriz e resistência.

(iii) Características morfológicas o suporte deve possuir uma área superficial associadas à porosidade do suporte, podendo ser não porosa (baixa área superficial), porosa (grande área superficial) ou estrutura em gel.

Os suportes para imobilização de enzimas são classificados em hidrofílico/hidrofóbico onde a superfície do suporte é de fundamental importância no processo de imobilização, pois na etapa de preparação de suportes hidrofóbicos a água pode ficar retida nos interstícios porosos e, conseqüentemente, ao redor da enzima imobilizada. A presença da quantidade mínima de moléculas de água no microambiente é necessária para preservação da estrutura conformacional da enzima. Todavia, o uso de suportes hidrofílicos no processo de imobilização promove a competição da água entre o suporte e a enzima durante a reação, influenciando no equilíbrio termodinâmico do sistema (CANTONE *et al.*, 2013).

Portanto, a escolha de um suporte adequado é importante para obtenção de catalisadores com propriedades melhoradas. Para atingir essa etapa a natureza físico-química, as características de textura e morfológicas são fatores limitantes do suporte, assim, a imobilização de uma mesma enzima pode variar em função do tipo do material utilizado (FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Os estudos apresentados na literatura referentes à utilização de suportes orgânicos naturais e/ou sintéticos para a imobilização de enzimas são de bastante relevância levando-se em consideração a reutilização de resíduos agroindustriais como, por exemplo, fibras de coco, palha de trigo, espigas de milho e bagaço de cana-de-açúcar (SINGH *et al.*, 2013).

A utilização da fibra de coco verde como suporte para a imobilização de enzimas é uma alternativa viável, pois o suporte apresenta um aumento na sua estabilidade, podendo ser reutilizado por vários ciclos, e assim, diminuindo na geração de resíduos e no valor final do processo de imobilização (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2015).

3.3 Cocos nucifera L. e sua Fibra

O coqueiro, (*Cocos nucifera L.*), é uma palmeira (PIMENTA *et al.*, 2015), cuja família é das *Arecaceae* (Palmae) e subfamília *Cocoidae* (DEBMANDAL e MANDAL, 2011), representa uma importante fonte de renda para milhões de pessoas em mais de 90 países tropicais (SANTANA *et al.*, 2011).

Índia, Indonésia e Filipinas são os principais produtores e representam cerca de 75% da produção mundial. O Brasil é o quarto maior produtor cerca de 26 mil toneladas de milhões de frutos (FAOAST, 2016). Dentre as Regiões do Brasil, a região Nordeste se destaca pela sua produção em torno de 75%, devido pelas condições climáticas da faixa litorânea (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de coco na Região Nordeste do Brasil em 2017 (LSPA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 2017).

Região Nordeste	Produção (Mil Frutos)	Porcentagem Anual (%)
Bahia	542.448	41,4
Sergipe	233.164	17,8
Ceara	226.499	17,3
Pernambuco	93.592	7,1
Alagoas	94.049	7,2
Rio Grande do Norte	66.348	5,1
Paraíba	38.329	2,9
Piauí	9.810	0,7
Maranhão	7.343	0,6

De acordo com (CARDOSO *et al.*, 2016) (Figura 2) o fruto do *Cocos nucifera* é considerado um fruto seco, indeiscente do tipo drupa, por ser formado por um só carpelo e conter em seu interior uma só semente. O mesocarpo parte mais desenvolvido no coco, é constituído por um conjunto muito denso de fibras bastante resistentes. Já o endocarpo é excepcionalmente espesso e duro, envolvendo a única semente desse fruto, a qual se constitui do embrião e de um tecido nutritivo muito extenso, que forma a parte comestível do coco, inclusive o líquido contido em seu interior. O epicarpo apenas reveste-o externamente.

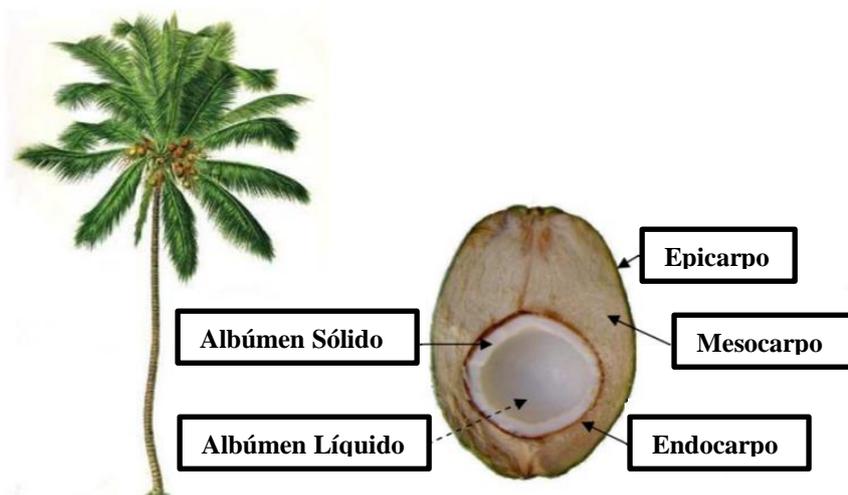


Figura 2: Ilustração do Coqueiro e corte longitudinal do coco verde com a descrição de suas partes, modificado. Fonte: (BENASSI, 2006).

A partir do coco obtêm-se grandes quantidades de resíduos que são descartados em lixões, ou seja, em áreas afastadas dos grandes centros urbanos sem os devidos cuidados ambientais e de engenharia sanitária, tornando-se um problema devido ao grande volume de resíduos (ou biomassa) gerados e à sua lenta degradação (SANTANA *et al.*, 2011).

Considerando a crescente preocupação quanto ao meio ambiente que tem impulsionado o uso de recursos não agressivos ao planeta, o uso de fibras vegetais para diversos fins se torna uma boa alternativa, por ser um material renovável, biodegradável e de baixo custo (CARDOSO *et al.*, 2016).

A biomassa é definida como qualquer material de origem biológica, exceto o material de formação geológica transformando em formas fósseis, portanto, biomassa é uma matéria derivada de plantas ou animais. Estes resíduos são resultantes após a colheita ou processamento, como exemplos a casca de arroz, bagaço de cana, casca de pneus, lixo urbano, resíduo da produção de papel, fibra de coco e o resíduo de algodão proveniente do processamento da indústria têxtil (DA COSTA *et al.*, 2007).

A aplicação dos resíduos agroindustriais em vários processos é relatada na literatura, tais como: imobilização de enzimas em suporte orgânico de fibra de coco na remoção de corantes têxteis e clarificação de sucos (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2015), produção de etanol (CARDONA *et al.*, 2010) e bioenergia utilizando o bagaço de cana de açúcar (DIAS *et al.*, 2013) e nutrição animal a partir da carnaúba (GOMES *et al.*, 2009).

A fibra de coco é um material lignocelulósico, caracterizado por elevada resistência e durabilidade, devido principalmente ao seu alto teor de lignina quando comparado com outras fibras naturais (MACHADO *et al.*, 2014).

3.4 Material lignocelulósico

As fibras naturais também conhecidas como materiais lignocelulósico possuem como principais biopolímeros constituintes a celulose, hemicelulose e lignina e são usados para várias aplicações, a depender da sua composição e propriedades físicas (BRINCHI *et al.*, 2013).

Na fibra de coco, a celulose é um biopolímero linear de anidro glucopirranose, ligadas por ligações β -1,4-glicosídica (PAN *et al.*, 2017) e sua estrutura específica favorece a ordenação das cadeias poliméricas que são estruturas cristalinas, insolúveis em água (MOSIER *et al.*, 2005). A hemicelulose é um heteropolímero ramificado amorfo de pentoses, hexoses, e o ácido de açúcar, situam-se entre a lignina e a celulose. A lignina, um heteropolímero de subunidades fenólicas, atua como um escudo protetor que dá resistência a células vegetais (PAN *et al.*, 2017).

Segundo ALMEIDA *et al.*, (2013) depois de uma extração alcalina, o material orgânico das fibras de coco é constituído por 3,1% de materiais extrativas, 37,3% de celulose, 20,3% de hemicelulose, 32,2% de lignina, e 6,8% de material mineral (cinzas).

Processos industriais fazem uso dos polissacáridos, celulose e hemicelulose, que são compostas de unidades de açúcar ligadas por β ,1-4 ligações. O processo de conversão de lignocelulósico ocorre pela quebra de polissacarídeos em seus açúcares constituintes através de processos químicos, enzimáticos ou termomecânicos. Estes processos de conversão normalmente produzem lignina como um subproduto. A lignina é um polímero amorfo altamente ramificado do polímero presente nas plantas vasculares, que é responsável por até trinta *por cento* do peso seco da biomassa vegetal. Na parede da célula da planta, a função de lignina é proporcionar rigidez e resistência. Ela está presente na parede celular ligado à celulose e hemicelulose (Figura 3) (MATHEWS *et al.*, 2016).

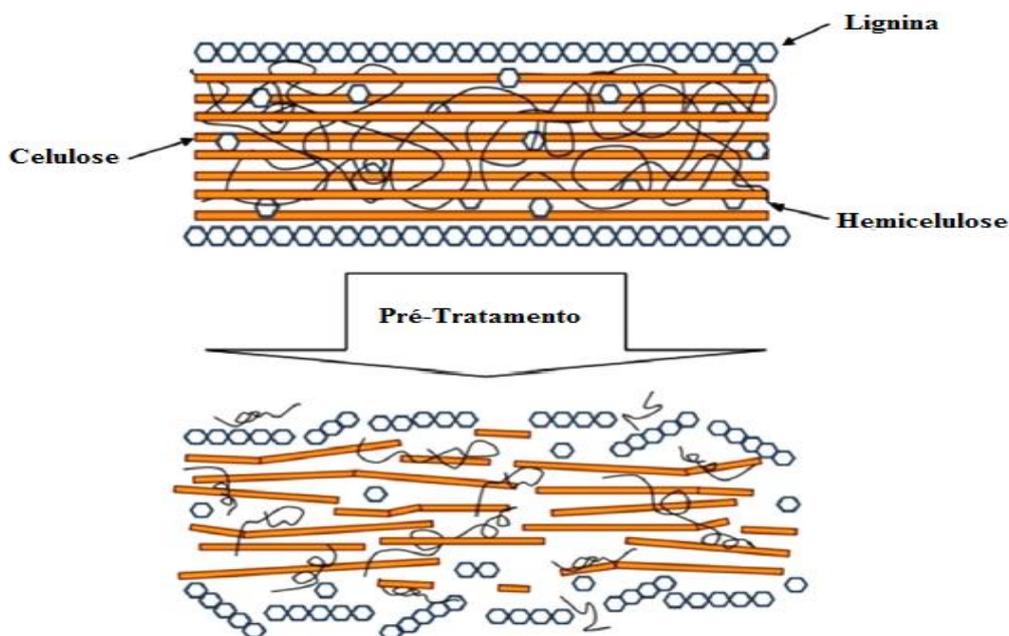


Figura 3: Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina determinadas pelo pré-tratamento, com modificações. Fonte: (MOOD *et al.*, 2013).

Desta forma, a utilização dos diferentes componentes é passível de serem obtidos a partir de biomassa lignocelulósica requer a separação seletiva dos mesmos. Isto implica na ruptura do complexo celulose-hemicelulose-lignina e na remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento por degradação biológica (Figura 3) (SANTOS *et al.*, 2012).

3.5 Pré – tratamento de resíduos lignocelulósico

O pré-tratamento é considerado como uma das etapas de processamento mais difícil, assim estas tecnologias de pré-tratamento têm a promessa de redução de custo e a melhoria da eficiência da biomassa para a conversão em combustíveis e produtos. A importância deste processo é a quebra da lignina e na desestruturação da celulose cristalina (KURIAN *et al.*, 2013), onde, o pré-tratamento permite melhor acessibilidade da celulose á hidrolise para a conversão da biomassa como pode ser visto na Figura 3.

Na literatura são descritos diversos métodos de pré-tratamento, como o biológico, térmico, físico, físico-químico, químico e combinados (CARDONA *et al.*, 2010; CRISTÓVÃO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; MOOD *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2015).

Geralmente os microrganismos degradam lentamente o resíduo lignocelulósico não tratado. No entanto é considerada uma importante área de pesquisa para a degradação da lignina. Para o pré-tratamento biológico os fungos de podridão branca, pertencem à classe *Basidiomycetes* e que são capazes de degradar um substrato de lignocelulósico e subsequente avaliaram o uso deste resíduo previamente tratado na produção de celulases pelo fungo *Penicillium echinulatum* (CAMASSOLA e DILLON, 2009).

Os estudos de fracionamento e solubilização de materiais lignocelulósico por tratamentos térmicos mostraram a eficiência desta tecnologia para melhorar os rendimentos de extração de hemicelulose (CARDONA *et al.*, 2010). Como o processo utiliza água a temperaturas elevadas e altas pressões para manter sua forma líquida, para promover a desintegração e separação da matriz lignocelulósica. As temperaturas podem variar de 160 °C a 240 °C durante longos períodos de tempo variando de alguns minutos até uma hora com temperaturas dominando os tipos de formação de açúcar e tempo dominando a quantidade de formação de açúcar (BHATIA *et al.*, 2012).

A maioria da biomassa lignocelulósica requer parte do processamento mecânico para redução de tamanho. Vários métodos de pré-tratamento, como moagem, radiação picagem, congelamento são comumente usados para melhorar a hidrólise enzimática ou a biodegradabilidade do material lignocelulósico. Os requisitos para o pré-tratamento físicos dependem do tamanho final da partícula e da redução da cristalinidade do material lignocelulósico (MENON e RAO, 2012).

Os métodos para pré-tratamentos físico-químicos são amplamente expandidos, e incluem o deslocamento de estruturais por aquecimento a vapor (termo), cisalhamento (mecânicos) e auto-hidrólise (químico) de ligações glicosídicas. Neste, pode ser utilizado como a explosão a vapor e a fibra de amônia, fluido supercrítico e oxidação. Especificamente, partículas de biomassa que são aquecidas com vapor pressionado (20 – 50 bar, 160 – 270 °C) por vários minutos e a pressão é liberada para a pressão atmosférica, onde o fluxo de calor desagrega a matriz celulósica (MOOD *et al.*, 2013).

Para os métodos de pré-tratamento químico podemos citar o alcalino, ácido, ozonólise e líquido iônico, dentre o mais utilizado para a biomassa lignocelulósico, o alcalino representa condições menos severas numa temperatura ambiente quando comparadas a outros métodos. Este envolve o uso de bases, tais como hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e o de amônio. O pH em meio básico provoca a degradação do éster e cadeias laterais glicosídicas, grupos acetilo e diferentes substituições de ácido

urônico, resultando na alteração estrutural da lignina e da hemicelulose, além da descristalização parcial da celulose (CARDONA *et al.*, 2010; BHATIA *et al.*, 2012; MENON e RAO, 2012; MOOD *et al.*, 2013).

Na biomassa da fibra de coco a literatura descreve que os pré-tratamentos mais utilizados são os químicos, como ácido e o alcalino, dos quais o ácido apresenta uma solubilização na hemicelulose, entretanto, existe um risco de formação de produtos voláteis de degradação do carbono, e o alcalino consiste numa maior remoção da lignina e expõe grupos hidroxilas (MAHESWARI *et al.*, 2012; CABRAL *et al.*, 2017).

O pré-tratamento com compostos alcalinos, como o hidróxido de sódio (NaOH), causa dilatação volumétrica da biomassa, melhora a área superficial interna facilitando assim, mecanismos reacionais e diminuindo o grau de polimerização, e cristalinidade da celulose. Possui papel importante nas modificações químicas, por exemplo, ativa as hidroxilas da celulose, transformando-as em alcóxidos e facilitando a acessibilidade do reagente ao interior das fibras (SHALWAN e YOUSIF, 2013) e para o suporte na imobilização de enzimas, apresenta-se como uma acessibilidade das enzimas para os grupos reativos presentes no material lignocelulósico (AGBOR *et al.*, 2011), devido à disponibilidade de grupos funcionais para a interação da enzima com o apoio dos métodos de imobilização (BRÍGIDA *et al.*, 2010).

A composição complexa da biomassa lignocelulósica é o principal obstáculo para o fracionamento dos componentes. Vários fatores contribuem para a resistência da biomassa *in natura*, tais como: o elevado teor em lignina, proteção da celulose por lignina, revestimento da celulose por hemicelulose, alta cristalinidade e grau de polimerização da celulose, baixa área superficial da celulose acessível e a forte resistência da fibra (AGBOR *et al.*, 2011).

Na literatura relata-se o uso destes diferentes tipos de biomassa com pré-tratamentos químicos, como suporte para a imobilização da lacase comercial e células com a finalidade de aplicação industrial (CRISTÓVÃO *et al.*, 2011; MENON e RAO, 2012; MACHADO *et al.*, 2014; BEZZERA *et al.*, 2015). Contudo, ainda não existem estudos que relatam a imobilização do extrato bruto da peroxidase de rabanete (*Raphanus sativus L.*) imobilizada em suporte orgânico de fibra de coco.

3.6 Peroxidase de *Raphanus sativus L.* e Aplicações

Raphanus sativus L. conhecida por rabanete (Figura 4) é uma hortaliça anual de raiz, cultivada desde a antiguidade e consumida no mundo todo por seu sabor adocicado, refrescante e picante. Pertence à família *Brassicaceae*, a mesma da couve, do nabo, da mostarda, do agrião e da raiz forte. É uma hortaliça de porte reduzido, que produz raízes globulares, de coloração escarlate brilhante e polpa branca (PELLOSO *et al.*, 2012). Há registros de que o rabanete seja cultivado há mais de três mil anos, provavelmente originado do sul da Europa ou do sudoeste da Ásia (LOPES, 2008).

No Brasil, o rabanete não é considerado uma cultura de muita expressão em termos de área plantada e produção. Contudo, é uma cultura de elevada rentabilidade, por se caracterizar como uma das culturas de ciclo mais curto dentre as hortaliças, o rabanete se torna uma opção ao produtor rural (CORTEZ, 2009). Apesar de ser uma cultura de pequena importância, em termos da área plantada é cultivado em grande número por pequenas propriedades dos cinturões verdes das regiões metropolitanas (CARDOSO e HIRAKI, 2001). O rabanete quando extraído constitui o extrato bruto contendo a peroxidase pertencente na classe das oxidorreduções e outros substratos orgânicos e inorgânicos (FRICKS *et al.*, 2006).



Figura 4: Amostras de Rabanete (*Raphanus sativus L.*) obtidas no mercado de Aracaju, Sergipe.

A classe das oxidorreduções caracteriza-se por enzimas que utilizam o peróxido de hidrogênio ou outros peróxidos para a oxidação fenóis e aminas aromáticas aos radicais livres ou quinonas (YE *et al.*, 2009), nesta classe destacam-se as peroxidases vegetais. Podem ser classificadas em três superfamílias: peroxidases de plantas, animais e microbianas. A superfamília das peroxidases de plantas é subdividida em três classes: a classe I, que inclui as peroxidases intracelulares; a classe II, que consiste em peroxidases fúngicas extracelulares e a classe III, que compreende as peroxidases

vegetais (SILVA *et al.*, 2012). A peroxidase vegetal é proteína heme envolvida na oxidação de uma ampla gama de substratos orgânicos e inorgânicos por peróxidos orgânicos como oxidantes terminais. Essas enzimas são bem caracterizadas, e em numerosos estudos têm sido realizados com a isoforma a partir da raiz forte (*Armoracia Rusticana*) (LOPES *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2015). As peroxidases apresentam um peso molecular de 44 kDa (KAGLIWAL e SINGHAL, 2014).

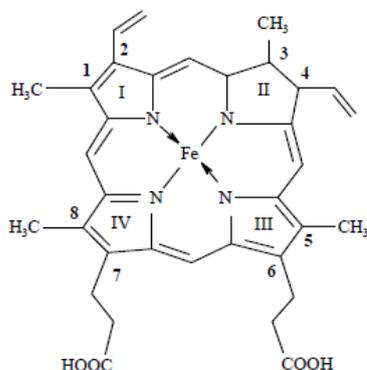
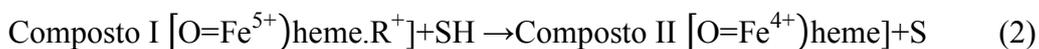


Figura 5: Estrutura química do ferro heme, modificado (VEITCH, 2004).

Na Figura 5, as posições de coordenação do ferro são numeradas, sendo que em peroxidases, posições de 1 – 4 são ocupadas pelos quatro átomos de nitrogênio pirólicos. A posição 5 está localizada na face proximal do heme e é normalmente ocupada por uma cadeia lateral imidazólica de um resíduo de histidina. A posição 6 na enzima nativa em repouso está livre e localizada sobre a face distal do heme. A cavidade distal é a região na qual muita reação de oxidação ocorre (EL-GEWELY, 2003).

A HRP (*Horseradish Peroxidase*) é uma glicoproteína constituída de 308 resíduos de aminoácidos, dois Ca^{2+} e como grupo prostético (sítio ativo da enzima) uma ferroprotoporfirina IX, sendo denominado grupo heme, que está ligado não covalentemente à cadeia polipeptídica. O íon férrico central da referida protoporfirina está coordenado a um resíduo de histidina (ULIANA *et al.*, 2008).

Para entender melhor este mecanismo, as reações que compõem o ciclo catalítico da enzima são:



Na equação 1 envolve a oxidação do grupo prostético heme da peroxidase pelo peróxido de hidrogênio (ou hidroperóxidos orgânicos) por dois elétrons, e a formação de um composto intermediário, no estado (Fe^{5+} , Composto I), consistindo do ferro oxiferril ($\text{O}=\text{Fe}^{5+}$) e do cátion radical π porfirínico. Na equação 2, o composto intermediário (Fe^{5+}) formado sofre uma reação de redução pela transferência de um elétron do doador SH, formando composto intermediário, no estado de oxidação (Fe^{4+} , Composto II). Um elétron adicional pode ser transferido, proveniente de uma segunda molécula SH (Equação 3), de forma que a enzima retorne a forma nativa (Fe^{3+}). Nas etapas 2 e 3, a espécie doadora de elétrons (SH) é oxidada (SILVA *et al.*, 2012). O resultado de todas estas conversões pode ser resumido no diagrama apresentado na Figura 6, o qual mostra a estequiometria para todas as reações envolvidas no ciclo catalítico da enzima.

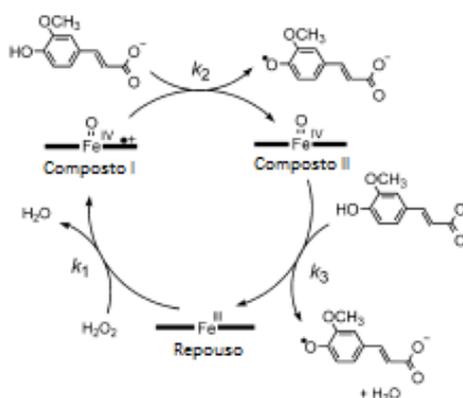


Figura 6: Ciclo catalítico da peroxidase (HRP). As constantes de taxa k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente (VEITCH, 2004).

A peroxidase de raiz forte (HRP) tem várias aplicações em diferentes processos industriais, isso é crescente devido à sua elevada estabilidade na solução, grande especificidade de substrato e tolerância à ampla gama de pH e temperatura (GHOLAMI-BORUJENI *et al.*, 2011). Trabalhos relatam o uso dessa enzima, tais como: constituinte de kits de diagnóstico (VEITCH, 2004) e de células combustíveis (RAMANAVICIUS *et al.*, 2015), construção de biossensores (WANG *et al.*, 2015), biorremediação e tratamento de águas residuais (efluentes) (VUJČIĆ *et al.*, 2015) utilizando corantes em suas reações.

3.7 Corantes Têxteis

A origem dos corantes têxteis é incerta, mas há indicações de seu uso pelo homem desde os primórdios das civilizações. No Egito, muitos dos tecidos encontrados em múmias eram coloridos (DALLAGO *et al.*, 2005). Até a metade do século XIX, todos os corantes eram derivados de folhas, ramos, raízes, frutos ou flores de várias plantas e de substâncias extraídas de animal. Embora a indústria de corantes têxteis tenha se originado na Europa desde o século XVI, o primeiro corante sintético foi descoberto apenas em 1856 na Inglaterra. Com a intensa inovação tecnológica ao redor de 1915, a Alemanha manteve o monopólio sobre a produção de corante sintético até a Segunda Guerra Mundial. Nos anos 2000, a indústria de corantes dos Estados Unidos foi a maior fonte exportadora destes produtos, colocando no mercado aproximadamente 2.000 tipos diferentes de corantes sintéticos (GUARATINI e ZANONI, 1999). No Brasil, desde seu descobrimento, sua história tem estado relacionada à produção de corantes. A começar pelo seu nome, uma vez que este é proveniente da madeira “Pau Brasil”, do qual era extraído um pigmento capaz de tingir tecidos com cores fortes, como vermelho, rosa ou marrom (DALLAGO *et al.*, 2005).

O consumo de fibra têxtil *per capita* no Brasil é estimado em 19,8 kg por ano por habitante, sendo ligeiramente maior do que a média mundial. Cerca de 75% das indústrias têxteis estão localizadas na região sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará), dados dos Anos 2014. (Fonte: IEMI, 2014)

Os corantes são formados por um grupo de átomos responsável pela cor, chamados cromóforos, e também pelo grupo dos auxocromos que funcionam como doadores ou aceptores de elétrons que provocam ou intensificam a cor dos cromóforos, ou seja, são responsáveis pela fixação do corante à fibra (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

A forma de fixação da molécula do corante a essas fibras geralmente é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente 4 tipos de interações: ligações iônicas, de hidrogênio, de Van der Waals e covalentes (GUARATINI e ZANONI, 1999).

Os corantes podem ser classificados de acordo com a estrutura química, por seu uso ou método de aplicação. Os químicos na prática adotam os termos oriundos da estrutura química tais como: azo, antraquinonas e ftalocianinas. Os tecnólogos

utilizam os termos de acordo com o uso ou método de aplicação, como corantes, ácidos, básicos, diretos, dispersivos e reativos (HAO *et al.*, 2000).

Corantes Ácidos corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras protéicas (lã, seda) e em fibras de poliamida sintética. Geralmente são brilhantes e o material tingido apresenta resistência de boa a excelente. Os Simples apresentam baixas propriedades de solidez, diferente dos metalizados (GUARATINI e ZANONI, 1999), como o ácido preto 210 que é um dos corantes negros mais utilizados pela indústria do couro, e apresenta uma preocupação toxicológica podendo gerar aminas aromáticas cancerígenas (ROCHA *et al.*, 2016).

Corantes Básicos (Catiônicos) apresenta baixa solubilidade em água. Ligações iônicas são formadas entre o cátion da molécula do corante, e os sítios aniônicos na fibra. O grupo cromóforo é um cátion e produzem cores brilhantes e boa resistência a sais e álcalis. Entretanto, devido a sua pouca solidez (principalmente à luz) há também à existência de produtos no mercado com propriedades muito superiores, seu uso têxtil é bastante reduzido (GUARATINI e ZANONI, 1999), como o corante azul de metileno utilizado muito na indústria têxteis, papel e pesticidas (PERES *et al.*, 2018).

Corantes Diretos caracteriza-se como compostos solúveis em água capazes de tingir fibras de celulose através de interações de Van der Waals. A afinidade do corante é aumentada pelo uso de eletrólitos, pela planaridade na configuração da molécula do corante ou a dupla ligação conjugada que aumenta a adsorção do corante sobre a fibra. Esta classe de corantes é constituída principalmente por corantes contendo mais de um grupo azo (diazó, triazo e etc.) ou pré-transformados em complexos metálicos (GUARATINI e ZANONI, 1999), do modo que o corante vermelho do congo que é um corante azo usado em biologia, bioquímica e indústria têxtil, é tóxico para muitos organismos e suspeito de causar câncer (ALIABADI e MAHMOODI, 2018).

Corantes Dispersivos constitui uma classe de corantes insolúveis em água aplicados em fibras de celulose e outras fibras hidrofóbicas. Apresentam boa solidez à luz e resistência à transpiração e lavagens a úmida e a seco (GUARATINI e ZANONI, 1999) como o Vermelho 167 dispersivo que apresenta características tricromáticas escuros para o setor automotivo e têxtil, e comercialmente importante capaz de dissolver em CO₂ supercrítico (ZHENG *et al.*, 2018).

Corantes Reativos apresenta grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo (-N=N-) e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfato estilsulfonila como grupos reativos. Nesse tipo de corantes, a reação química se processa diretamente através da substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose (GUARATINI e ZANONI, 1999), como por exemplo, o corante azul marinho que em suas formas originais e hidrolisados, são difíceis para degradar biologicamente e altamente tóxico para animais e humanos (MELO *et al.*, 2014).

Segundo a “Colour Index (CI)” (catálogo da “*Society of Dyers and Colourists*”) contém uma lista organizada de nomes e números para designar os diversos tipos de corantes onde estão registrados mais de oito mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil. Segundo YAGUB *et al.*, (2014) estes corantes podem ser:

Aniônicos: diretos, ácidos e reativos;

Catiônicos: básicos;

Não aniônicos: dispersivos.

Segundo BERGSTEN-TORRALBA, (2008) as classes mais importantes dos corantes que são produzidos mundialmente são:

Azo é a mais importante com mais de 50% de todos os corantes comerciais e têm sido mais estudada que qualquer outra classe. São corantes produzidos, em sua maioria, a partir da reação de diazotização de uma amina primária e se caracterizam por apresentarem um ou mais grupos azo (-N=N-) e geralmente associados a grupos auxocromos (-OH ou -NH) e sistemas aromáticos.

Antraquinonas é a 2ª classe mais importante de corantes apresentando uma larga escala de cores e inclui alguns dos mais antigos corantes. São fortemente coloridos mesmo na ausência do grupo auxocromo.

Ftalocianinas são os mais importantes cromógenos do século XX foram os derivados das ftalocianinas, introduzidos em 1934. O termo ftalocianina foi usado pela primeira vez por Linstead em 1933 para descrever uma classe de corantes orgânicos, cujas cores variam do azul ao verde amarelado. O nome ftalocianina é originado dos termos gregos *naphtha* para óleo mineral e *cyanine* para azul escuro. Estes compostos são análogos a duas porfirinas naturais: a clorofila e a hemoglobina. As ftalocianinas

formam complexos com numerosos metais, e os complexos com cobre são os mais comuns.

A eliminação de efluentes à base de corantes é uma preocupação séria entre muitas questões que desafiam a biótica. Apesar do papel importante desempenhado pelos produtos de corantes naturais e sintéticos em tornar o nosso mundo espetacular, sua descarga descontrolada é uma das principais causas da poluição não estética o que ocasiona a uma destruição do ecossistema (MEENAKUMARI e PHILIP, 2015). As concentrações elevadas dos corantes tornam a água imprópria para uso e pode dificultar a penetração da luz, afetando assim a vida aquática e ameaçando continuamente a biodiversidade. No entanto, além da cor, a presença desses corantes em ecossistemas aquosos apresenta graves preocupações com o meio ambiente e a saúde como resultado da toxicidade dos próprios corantes e sua transformação em tóxicos, amins mutagênicas e carcinogênicas, principalmente como resultado da clivagem anaeróbica e redução de microbiana da ligação azo ou mesmo causada por produtos obtidos após oxidação através do citocromo (KARIM *et al.*, 2018). Portanto, o tratamento de efluentes têxteis ainda é um grande foco das indústrias deste ramo.

3.8 Tratamento de Efluentes Têxteis

As diferenças tecnológicas entre as pequenas e grandes indústrias sejam bastante significativas, todas têm em comum a utilização de grandes quantidades de água. Este fato, associado com o baixo aproveitamento dos insumos como corantes, detergentes, engomantes e amaciantes, faz com que a indústria têxtil seja responsável pela geração de grandes volumes de resíduos, com elevada carga orgânica e forte coloração (DE SOUZA e PERALTA-ZAMORA, 2005).

Alguns dos corantes sintéticos presentes em efluentes industriais e seus produtos de degradação podem ser cancerígenos e tóxicos e, conseqüentemente, o seu tratamento não pode depender somente da biodegradação (HAMEED *et al.*, 2007).

Antes do descarte nos corpos hídricos, os efluentes provenientes da indústria têxtil devem ser submetidos a um tratamento, devido à sua toxicidade aos ecossistemas aquáticos. Dependendo do tipo de corante e do modo de aplicação requerido, a etapa final da tintura pode contribuir significativamente no lançamento de rejeitos de diversas substâncias químicas utilizadas nas etapas de montagem e fixação (GUARATINI e ZANONI, 1999).

A grande diversidade e complexidade dos efluentes têxteis, aliada a imposições da legislação que exigem tratamentos eficientes, têm levado ao desenvolvimento de novas tecnologias que buscam o melhor e mais adequado tratamento, considerando custos, tempo e eficiência dos processos existentes na eliminação de toxidade (KAMIDA *et al.*, 2005). Os seguintes processos de tratamentos tem sido uma proposta para remoção da cor: físicos, químicos, biológicos e enzimáticos (SILVA *et al.*, 2012).

Os tratamentos físicos são também amplamente usados para a remoção de cor, tais como processos de filtração com membrana (nanofiltração, osmose reversa, eletrodialise), troca iônica e técnicas de adsorção. A maior inconveniência do processo de membrana é o custo de instalação do processo e o custo de reposição periódica da membrana, inviabilizando economicamente muitas vezes sua utilização (HAO *et al.*, 2000; CRINI, 2005).

Para os tratamentos químicos em efluentes industriais incluem coagulação ou floculação combinados com flotação e filtração, eletro flotação, coagulação, eletro cinética, métodos de oxidação convencionais por agentes oxidantes (ozônio e enzimas), irradiação ou processos eletroquímicos. Estas técnicas químicas são frequentemente caras e, embora os corantes sejam removidos, o acúmulo de lodo concentrado cria um problema de disposição e a sua alta demanda de energia elétrica e o consumo de reagentes químicos são problemas comuns (CRINI, 2005; DALLOGO *et al.*, 2005).

O tratamento biológico é muitas vezes a alternativa mais econômica quando comparado com outros processos físicos e químicos. Os métodos de biodegradação, como a descoloração de fungos, a degradação microbiana, a adsorção por biomassa microbiana (viva ou morta) e sistemas de biorremediação são geralmente aplicados ao tratamento de efluentes industriais porque muitos microrganismos como bactérias, leveduras, algas e fungos são capazes de acumular e degradar diferentes poluentes. No entanto, sua aplicação é frequentemente restrita devido a restrições técnicas, como pH e temperatura (FREIRE *et al.*, 2000; CRINI, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2007).

Os processos enzimáticos correspondem a uma das mais recentes tecnologias para o tratamento de efluentes. Dentro deste contexto, cabe às enzimas ter um papel de destaque, em função da sua capacidade para degradar um grande número de substâncias tóxicas e persistentes. Obviamente, o emprego de processos enzimáticos somente será viável economicamente, se as enzimas forem imobilizadas em um suporte adequado (FREIRE *et al.*, 2000).

As principais enzimas são as oxirredutases, lacases e peroxidases que apresentam potencial no tratamento de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo corantes e seu uso pode ser uma prática interessante para a descoloração de corantes sintéticos. As peroxidases na forma livre obtida a partir de fonte vegetal mostraram um excelente potencial para descoloração do corante direto (Basazol 46L e Amarelo Direto 11) e reativo (Vermelho 120 e Azul 171), oriundas da família Brassicaceae ou da Fabaceae: raiz forte, nabo, rabanete (*Raphanus sativus L.*) e soja (SATAR e HUSAIN, 2009; KNUTSON *et al.*, 2005). Para a enzima imobilizada MOHAN *et al.*, (2005), CELEBI *et al.*, (2013) e JIANG *et al.*, (2014) utilizaram a peroxidase de raiz forte (HRP) imobilizada em diferentes tipos de suportes como gel acrilamida, polissulfona e fosfolípido de titania, apresentando potencial para descoloração dos corantes ácido, direto e reativo, diminuindo o custo de seu processo. Estas enzimas podem catalisar a transformação/degradação de corantes aromáticos, tanto por precipitação como pela ruptura do anel aromático, provocando um impacto mínimo sobre os ecossistemas (SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

Para as normas ambientais a legislação vigente brasileira dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes, de acordo com CONAMA - Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados diretamente no corpo receptor desde que obedeçam as condições e padrões previstos no artigo 16, seção II (Das condições e Padrões de Lançamentos de Efluentes) resguardadas outras exigências cabíveis:

- pH entre 5 a 9;
- Temperatura: inferior a 40°C, sendo que a variação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C no limite da zona de mistura;
- Materiais sedimentáveis: até 1 mL/L em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;
- Regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vezes a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor, exceto nos casos permitidos pela autoridade competente;
- Óleos e graxas: 1. Óleos minerais: até 20 mg/L; 2. Óleos vegetais e gorduras animais: até 50 mg/L;

- Ausência de materiais flutuantes;
- Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO 5 dias a 20°C): remoção mínima de 60% de DBO sendo que este limite só poderá ser reduzido no caso de existência de estudo de autodepuração do corpo hídrico que comprove atendimento às metas do enquadramento do corpo receptor;

O estado de Sergipe (ADEMA – Administração Estadual de Meio Ambiente) não tem regulamentação própria, seguindo, portanto a resolução CONAMA.

Neste estudo, foi avaliada a utilização da enzima peroxidase na forma livre a partir do rabanete (*Raphanus sativus L.*) e imobilizada em fibra de coco na biodegradação de corantes têxteis. Alguns parâmetros estudados foram o efeito de pH, concentrações de corantes e H₂O₂, quantidade de enzima, tempo de contato para melhorar a eficiência da degradação.

Capítulo IV

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os rabanetes foram adquiridos em estado de maturação no mercado local (Aracaju-SE), transportados a temperatura ambiente até o laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB). Os vegetais foram sanitizados com hipoclorito de sódio 2,5%, descascados, fracionados em 20 porções de 250 g e acondicionados a temperatura de - 10 °C.

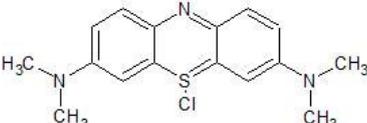
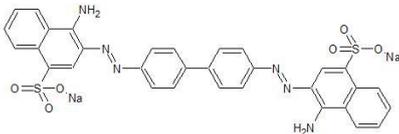
Os reagentes utilizados nos processos de extração, determinação de proteínas, imobilização da enzima e a medida da atividade da enzima foram: Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na_2HPO_4) adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); Reagente de Bradford da Sigma Aldrich; Peróxido de Hidrogênio (30% PA); Guaiacol (100 mM); Albumina de Soro Bovino (BSA) da Sigma Aldrich.

No processo de estudo de pH e temperatura da peroxidase de rabanete (*Raphanus sativus L.*), e a biodegradação a partir de corantes têxteis foram utilizados os reagentes seguintes: ácido clorídrico (HCl) 37% P.A, cloreto de potássio (KCl), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), citrato de sódio dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de sódio (NaOH).

A fibra de coco foi cedida pela Empresa Brasileira de Agropecuária (EMBRAPA - Tabuleiros Costeiros) do estado de Sergipe produzido e cultivado na Região do Litoral Sul do Estado no município de Itaporanga d'Ajuda, a 29 km de Aracaju, no km 24 da rodovia SE 100. Foram coletados 60 frutos em um período de maturação entre 7 e 8 meses.

Os Corantes direto e reativo foram cedidos pela Empresa Santa Mônica Indústria e Comercio Têxtil, da cidade de Estância/Sergipe, e o corante catiônico foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Na Tabela 3, as principais características dos corantes utilizados neste estudo:

Tabela 3: Estruturas químicas dos corantes Azul de Metileno (AM), Vermelho do Congo (VC) e Azul Marinho (AZM).

Corante	Fórmula Estrutural	Fórmula Molecular	Massa Molecular (g/mol)
Azul de Metileno (Catiônico) – AM		$C_{16}H_{18}N_3SCl$	319,85
Vermelho do Congo (Direto) – VC		$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$	696,66
Azul Marinho (Reativo) – AZM		$C_{22}H_{16}N_2Na_2O_{11}S_3$	626,55

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do Extrato Bruto do Rabanete

A extração da peroxidase foi realizada conforme procedimento descrito na literatura (FRICKS *et al.*, 2006). Para obtenção do extrato bruto (EB), as amostras de rabanete (250 g) foram homogeneizadas em liquidificador industrial com 100 mL de tampão fosfato de sódio dibásico anidro o (Na_2HPO_4) 100 mM pH 6,5. Posteriormente o extrato foi filtrado e centrifugado a 6.500 rpm, durante 30 min a 4 °C. O sobrenadante constitui o extrato bruto contendo peroxidase que é mantido a 4 °C para posterior utilização.

4.2.2 Determinação de Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de BRADFORD, 1976. O método consiste da adição de 3 mL do reagente de Bradford em tubos de ensaio e posterior adição de 100µL da amostra adequadamente diluída. Em seguida a solução é homogeneizada e após 2 minutos é feita a leitura da absorbância em 595nm. A concentração de proteínas é calculada a partir da curva de calibração construída

utilizando-se solução padrão de albumina de soro bovino (BSA, 1mg/mL) diluída para atingir concentrações entre 0,2 – 1,0 mg/mL.

4.2.3 Fibra de coco (Pré-Tratamento Alcalino)

O pré-tratamento do suporte orgânico foi realizado conforme metodologia proposta por (SANTOS *et al.*, 2008). Cinco gramas do suporte seco previamente triturado em moinho de facas foram transferidos para frascos *Erlenmeyer* contendo 250 mL de NaOH (0,5 M) e mantidos sob agitação rotativa a 120 rpm durante 24 horas. Em seguida, lavados com água destilada e secos a 100 °C até massa constante. As fibras pré-tratadas foram peneirados em peneira padrão para obter tamanho de partículas entre $42 < x \leq 60$ mesh e posterior utilização no processo de imobilização.

4.2.4 Imobilização da Peroxidase de Rabanete (*Raphanus sativus L.*)

A peroxidase de rabanete (PR) (*Raphanus sativus L.*) foi imobilizada pelo método de adsorção física (ADS) no suporte orgânico de fibra de coco pré-tratada conforme metodologia proposta pelo grupo de laboratório de pesquisa. Foi utilizado 1 g de suporte previamente seco, que foram suspensos em tampão fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) 100 mM pH 8,0 e mantidos sob agitação mecânica por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL do Extrato Bruto (EB) e acrescentou-se tampão até o volume final de 10 mL. O sistema foi mantido sob agitação por 3 horas a 25 °C, em seguida, armazenado a 4 °C, durante 24 horas. Posteriormente, o biocatalisador imobilizado (BI) foi filtrado e lavado com tampão para retirada de enzimas não adsorvidas e o filtrado foi reservado para quantificação da atividade enzimática remanescente.

Para selecionar o melhor carregamento para imobilização foi realizado um estudo variando o carregamento de 2,6 – 6,5 mg de proteína por grama de suporte.

4.2.5 Determinação da Atividade Peroxidásica

A atividade enzimática de peroxidase de rabanete foi determinada pelo método colorimétrico, baseado na mudança de absorbância a 470 nm devido à formação do produto de oxidação do guaiacol, o tetraguaiacol durante três minutos ($\epsilon_{\text{tetraguaiacol}}$:

26,6 mM⁻¹ cm⁻¹) (HIRATA *et al.*, 1998). Adotou-se metodologia já estabelecida pelo grupo de pesquisa FRICKS *et al.*, 2010. Uma unidade de enzima (U) está relacionada com a quantidade de enzima capaz de fornecer 1 µmol de produto em 1 minuto a 25 °C em pH 6,0. A Eficiência de Imobilização (EI) (%) foi determinada conforme Equação 4.

$$\text{Eficiência de Imobilização EI (\%)} = \frac{U_f - U_o}{U_f} \times 100 \quad (4)$$

Onde: U_o é o número de unidades de atividade peroxidásica oferecida e U_f é o número de unidades de enzima remanescente.

4.2.6 Efeito de pH e temperatura sobre a atividade peroxidase na forma livre e imobilizada

Para determinação do pH ótimo foram realizados ensaios de atividade conforme o item 4.2.5 à 25 °C na faixa de pH de 3 a 9. Utilizou-se tampões Ácido cítrico (C₆H₈O₇) / Citrato de sódio dihidratado (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) 0,1 M (pH 4 e 5), Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) 0,1 M (pH 6 – 8) e Bórax (NaB₄O₇·10H₂O) / Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,1 M (pH 9).

Para determinação da temperatura ótima ensaios de atividade foram realizados nas temperaturas de 25, 30, 40, 50 e 60 °C. Os resultados foram expressos sob a forma de atividade relativa, utilizando como referencial de 100 % o maior valor de atividade obtida.

4.2.7 Preparação das soluções dos Corantes Têxteis e espectros de adsorção

As soluções dos corantes azul de metileno, azul marinho e vermelho do congo foram preparadas em água destilada na concentração padrão de 5000 ppm. A solução padrão deu origem a todas as outras soluções utilizadas nos experimentos (20 mg/L Azul de Metileno (PEREIRA *et al.*, 2014), (100 mg/L Azul Marinho (CELEBI *et al.*, 2013) e (70 mg/L Vermelho do Congo (MACHADO e DA SILVA, 2013), através de uma diluição. Foram realizados os espectros de absorção para determinar os comprimentos de onda máxima (λ_{max}) de absorção dos corantes.

4.2.8 Teste de Biodegradação de Corantes Têxteis

Os experimentos de biodegradação dos corantes realizados foram com Azul de Metileno (AM-Catiônico), Azul Marinho (AZM-Reativo) e Vermelho do Congo (VC-Direto) utilizando peroxidase de rabanete (PR) na forma livre e imobilizada (PRL e PRI) foram conduzidos em um banho termostático com agitação orbital á 200 rpm com duração de 1 h a 25 °C e volume total de 10 mL. Todas as experiências foram realizadas em triplicata, utilizando o ponto inicial como controle para PRL e PRI. No controle para PRL será utilizada a mesma mistura reacional com ausência da enzima, na PRI a mesma mistura com ausência da enzima e adição de fibra de coco tratada.

A descoloração da solução será monitorada medindo a absorbância utilizando o espectrofotômetro UV- Vis (Biochrom libra S22). O percentual de biodegradação será determinado mediante a Equação (5) (BOUCHERIT *et al.*, 2013).

$$\text{Eficiência de Descoloração ED (\%)} = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100 \quad (5)$$

Onde: A_0 é Absorbância inicial (controle) e A_f é Absorbância após o tratamento.

Para a descoloração dos corantes têxteis foram avaliados os seguintes parâmetros:

4.2.8.1 Efeito de pH

O efeito do pH foi investigado na faixa de pH 3 – 9 para o AM e AZM, e de 2 – 10 o VC, à 25 °C em 200 rpm numa duração de 1 h, razão molar corante: H_2O_2 (1: 0,5). As soluções (concentração de 50 mmol/L) foram preparados em água destilada utilizando para todos os pH, um reagente específico. Para pH 2 utilizou-se Cloreto de potássio (KCl) / Ácido clorídrico (HCl), pH 3, 4 e 5 Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) / Citrato de sódio dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), pH 6, 7 e 8 Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), pH 9 e 10 Bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) / Hidróxido de sódio (NaOH). Todas as experiências foram realizadas em triplicata, utilizando o ponto inicial como controle para PRL e PRI.

4.2.8.2 Razão Molar do Corante: Peroxido de Hidrogênio (H_2O_2)

A razão molar Corante (AM, AZM e VC): Peroxido de Hidrogênio foi determinado a partir da melhor condição de pH determinado no item anterior (4.2.8.1) à 25 °C por 1 h de reação em 200 rpm. A partir da condição inicial variou-se a concentração de corante: H_2O_2 (1:0,1 – 1:100 mmol/L) para o AM e AZM, e (1:0,1 – 1:60 mmol/L) para VC. Todas as reações foram realizadas em triplicata, utilizando o ponto inicial como controle para PRL e PRI.

4.2.8.3 Quantidade de Biocatalisador

Para a quantidade de biocatalisador foram utilizadas as condições determinadas nos itens 4.2.8.1 e 4.2.8.2 para PRL e PRI. As faixas estudadas para o AM foram (PRL) 0,202 – 60,6 U e (PRI) $0,65 - 5,20 \times 10^{-3}$ U, para AZM foi 0,224 – 33,72 U (PRL) e $5,25 - 42,00 \times 10^{-3}$ U (PRI) e para o VC foram 0,09 – 11,18 U (PRL) e de $3,38 - 27,04 \times 10^{-3}$ U (PRI). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando o ponto inicial como controle para PRL e PRI, cujas faixas foram similares as descritas na literatura (FORGIARINI E DE SOUZA, 2007; BOUCHERIT et al., 2013; SKORONCKI et al., 2014).

4.2.8.4 Tempo de Contato

A Peroxidase de rabanete na forma livre e imobilizada foram incubados à 25 °C em um banho com agitação orbital de 200 rpm, nas condições otimizadas nos itens (4.2.8.1 - 4.2.8.3). Amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 – 12 h) para obtenção da eficiência de descoloração dos corantes AM, AZM e VC.

4.2.9 Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de peroxidase de rabanete livre, suporte, PRI antes e após a biodegradação foram submetidas à análise FTIR (Espectrofotômetro FTIR Argilent Cary 630) e os espectros obtidos na faixa de onda de 4000 a 650 cm^{-1} , para identificar os compostos presentes.

4.2.10 Estabilidade Operacional

Os experimentos foram realizados repetidamente utilizando a mesma amostra de PRI durante 1 h nas condições definidas nos itens (4.2.8.1 – 4.2.8.3). Uma vez completa a reação, a PRI é separada da mistura, lavada com tampão da melhor condição de pH e utilizada novamente em meio reacional da descoloração. A descoloração foi monitorada por espectrofotômetro UV-Vis (Biochrom libra S22) em comprimento de onda dos corantes utilizados.

Capítulo V

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico serão apresentados os resultados referentes à obtenção e determinação da atividade enzimática do extrato bruto de rabanete, na sequência, a imobilização da peroxidase a partir do rabanete (*Raphanus sativus L.*) em suporte orgânico de fibra de coco por adsorção física são apresentadas, estudo de pH e temperatura dos biocatalisadores. Em seguida, avaliou-se a biodegradação dos corantes têxteis mediante a eficiência de descoloração do Azul de Metileno (AM), Azul Marinho (AZM) e Vermelho do Congo (VC) utilizando a peroxidase de rabanete livre e imobilizada. A partir da determinação das melhores condições operacionais foram realizados experimentos a fim de determinar a estabilidade operacional e a caracterização físico-química por espectroscopia de infravermelho por transformada Fourier da enzima livre, fibra de coco tratada, biocatalisador imobilizado antes e após os tratamentos e dos corantes catiônico, direto e reativo.

5.1 Obtenção do Extrato bruto de Rabanete e Determinação da Atividade Peroxidásica

Os resultados referentes à obtenção e determinação da atividade enzimática da peroxidase do extrato bruto de rabanete são mostrados na Tabela 4. A atividade da peroxidase de rabanete foi determinado em tampão fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), 0,1 M e pH 6,5 sem a etapa de precipitação (pré-purificação) utilizando sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), conforme descrito por FRICKS *et al.*, (2006).

Tabela 4: Atividade enzimática de extrato bruto de rabanete preparado com tampão fosfato de sódio dibásico anidro.

Parâmetros	Extrato Bruto
Volume (mL)	175
Concentração de Proteínas (mg/mL)	0,65
Proteína Total (mg)	113,75
Atividade Enzimática (U/mL)	0,63
Atividade Específica (U/mg)	0,97

A concentração de proteína determinada no extrato bruto rabanete foi de 0,65 mg/mL (Tabela 4), o qual foi duas vezes maior ao obtido por FRICKS *et al.*, (2010) (0,33 mg/mL). A proteína total (mg) de extrato bruto que contém a peroxidase foi de 113,75 mg, indicando um resultado satisfatório em comparação com 21,6 mg de proteína total determinada por MELO *et al.*, (2015). Possivelmente devido às condições edafoclimáticas de cada região, houve uma diferença significativa nos resultados descritos por FRICKS *et al.*, (2010), DOS SANTOS *et al.*, (2014) e MELO *et al.*, (2015).

5.2 Imobilização da Peroxidase de Rabanete (PR) em fibra de coco por adsorção física

Para a imobilização de peroxidase de rabanete em fibra de coco por adsorção física foi estudado o efeito do carregamento do extrato bruto de 2,6 - 6,5 mg de proteína por g de suporte, cujos os resultados são apresentados na Figura 7.

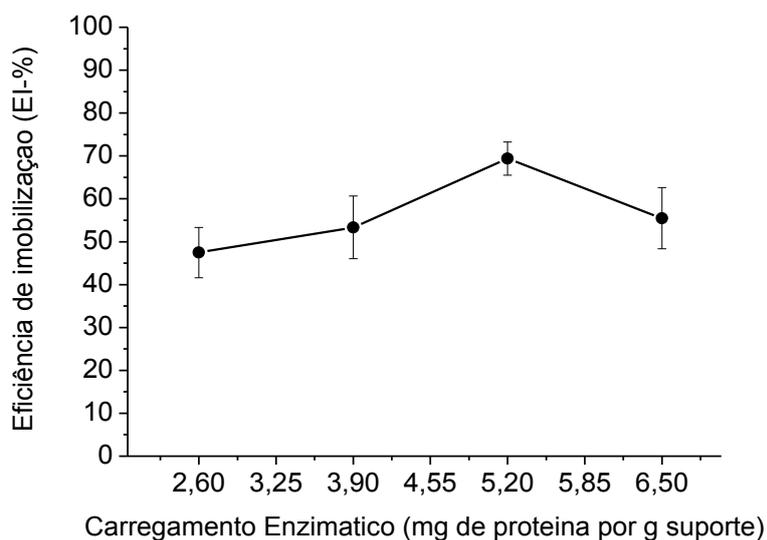


Figura 7: Eficiência de Imobilização da PR em suporte de fibra de coco por adsorção física em função do carregamento enzimático.

Conforme observado (Figura 7), a máxima eficiência de imobilização foi em torno de $70 \pm 3,8$ % para o carregamento de 5,2 mg de proteína por g de suporte. Enquanto que para carregamentos inferiores 2,6 – 3,9 mg de proteína por g de suporte não houve grandes eficiências de imobilização, isto pode estar relacionado com a redução da

afinidade da enzima imobilizada ao substrato, gerando efeitos de difusão à mudança do sítio ativo da enzima após o contato com a superfície sólida do suporte (MOHAMED *et al.*, 2013), embora para maiores cargas tem sido observado uma diminuição na eficiência, provavelmente devido á saturação da enzima no suporte (MOHAMED *et al.*, 2013).

É importante salientar que a técnica de imobilização da peroxidase por adsorção física em suporte orgânico ocorre a partir de forças intermoleculares fracas. A especificidade enzimática baseia-se também nas interações entre a molécula do substrato e o sitio ativo da enzima (CARDOSO *et al.*, 2009).

5.3 Determinação do Efeito de pH e Temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH na faixa de 3 à 9 foi avaliada sobre a atividade da enzima livre extraída a partir do rabanete e a imobilizada por adsorção física, como mostra a Figura 8. A enzima livre e imobilizada exibiram a maior atividade em pH 7, para ambos.

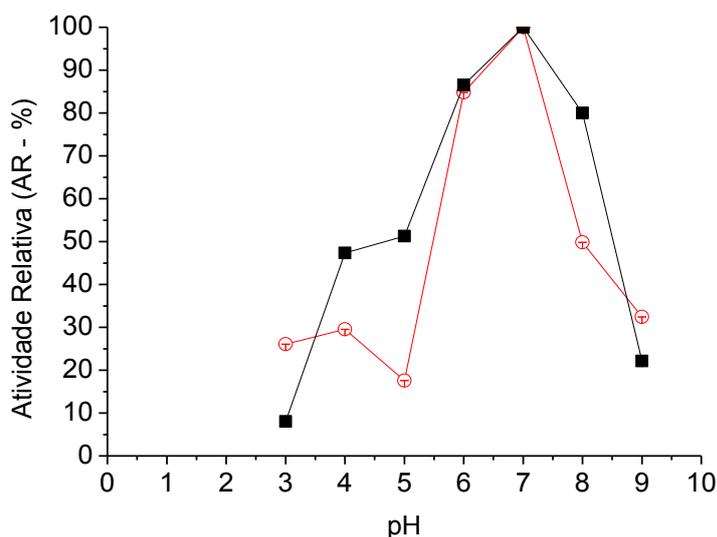


Figura 8: Efeito de pH do extrato bruto da peroxidase (■) extraída a partir do rabanete e imobilizada (○) por adsorção física na atividade relativa.

A PRL e PRI apresentam comportamentos semelhantes. Em pH ácido, a PR apresentou uma diminuição da atividade, possivelmente por alteração iônica da enzima, e da forma, conseqüentemente o seu sitio ativo. A diminuição também pode ser observado a pH 8 e 9. Segundo CHAGAS *et al.*, (2014) a enzima imobilizada era menos

sensível às mudanças de pH do que a enzima livre, devido á proteção da enzima por imobilização.

A atividade relativa em relação à temperatura da enzima livre extraída a partir do rabanete e a imobilizada em fibra de coco por adsorção física foram determinadas em uma faixa de temperatura de 25 – 60 °C como mostra a Figura 9. A atividade máxima ocorreu na faixa de 25 – 40 °C para o biocatalisador imobilizado, enquanto a enzima livre atingiu melhor atividade a 50 °C.

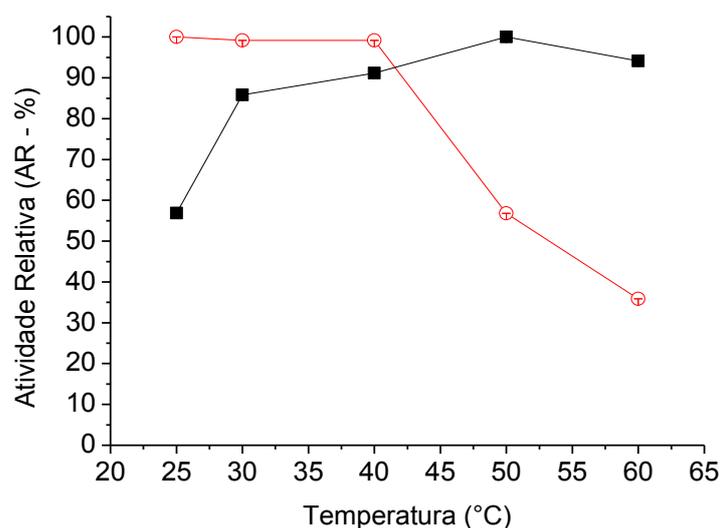


Figura 9: Efeito da temperatura do extrato bruto da peroxidase (■) extraída a partir do rabanete e a imobilizada (○) por adsorção física na atividade relativa.

De maneira geral a imobilização permitiu a atuação da peroxidase de rabanete em uma faixa mais ampla de temperatura (25 °C a 40 °C). No entanto, temperaturas elevadas dentro da faixa experimental estudada (50 e 60 °C) ocasionam diminuição brusca na atividade da enzima. Os resultados discrepantes também foram relatados por JAMAL *et al.*, (2013) que obteve a atividade catalítica em 40 °C com a peroxidase obtida a partir da couve-flor (*Brassica oleracea*) em forma livre e imobilizada em gel de alginato e a pectina.

Possivelmente, o efeito de altas temperaturas (acima de 60 °C) leva a quase 80% de perda da atividade enzimática, indicando que essas temperaturas provocam a desnaturação da enzima, resultando em alterações conformacionais irreversíveis que afetam sua atividade (GOYENECHE *et al.*, 2013).

5.4 Degradação do corante Azul de Metileno, Azul Marinho e Vermelho do Congo utilizando a peroxidase de rabanete na forma livre (PRL) e imobilizada (PRI)

5.4.1 Corante Catiônico e Reativo: Azul de Metileno e Azul Marinho

5.4.1.1 Efeito de pH

O efeito de pH foi investigado na faixa de pH (3 – 9) para AM e AZM durante 1 h a 200 rpm à 25 °C, 20 mg/L (AM) e 100 mg/L (AZM) de concentração inicial do corante, razão molar (corante): H₂O₂ (1:0,5 mmol/L) e quantidade de biocatalisador para AM: PRL (20,2 U) e PRI (3,25x10⁻³ U) e para AZM: PRL (22,48 U) e PRI (26,25x10⁻³ U). O efeito de pH na eficiência de descoloração (ED - %) do corante Azul de Metileno (AM) e Azul Marinho (AZM) são apresentados na Figura 10.

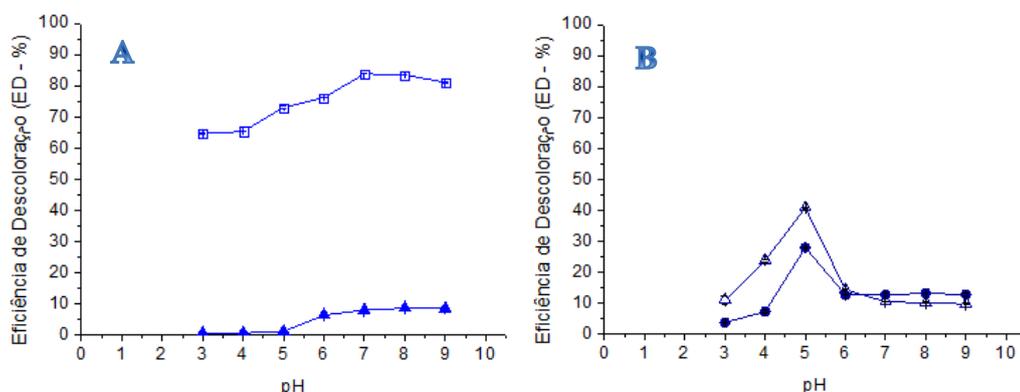


Figura 10: Efeito de pH na eficiência de descoloração do Azul de Metileno (A) (PRL —▲—) e (PRI —□—), e Azul Marinho (B) (PRL —●—) e (PRI —△—).

Para o Azul de Metileno (Figura 10A) a peroxidase de rabanete livre (PRL) apresentou valores baixos de eficiência de descoloração para pH entre 3 – 5, nesta faixa de pH a eficiência de descoloração foi mínima quando comparada com a peroxidase de rabanete imobilizada em fibra de coco (PRI). Para a PRL e PRI as maiores eficiência de descoloração foi obtida na faixa de pH de 7 a 9.

Para o Azul Marinho (Figura 10B), os valores da ED demonstram um aumento com pH de 3 a 5 para ambas as formas e para maiores valores de pH na faixa de 6 a 9, a biodegradação do corante reativo permaneceu quase constante.

De acordo com as normas brasileiras (CONAMA), o efluente tratado das indústrias têxteis devem ser descartado na faixa de pH entre 5 à 9, portanto foi selecionado o pH 8 com uma eficiência de descoloração de 8,5 % (PRL) e 83 % (PRI) para o Azul de Metileno e para o Azul Marinho em pH 5 com 28 % e 40 % de eficiência de descoloração para PRL e PRI, respectivamente.

Segundo PEREIRA *et al.*, (2014) o pH tem uma maior influência sobre o grau de ionização de grupos existentes de aminoácidos na enzima ou mesmo em sua ação catalítica. O pH pode influenciar tanto na estrutura enzimática quanto no próprio substrato que podem ser fortemente afetados pela concentração de íons H^+ , dependendo do pK de cada agrupamento de substrato, o que pode resultar em uma maior ou menor interação com a enzima.

A eficiência de descoloração do azul de metileno catalisado por PRL e PRI foi maior em pH acima de 5,0. A peroxidase de rabanete apresenta o ponto isoelétrico (pI) entre 4.7 - 5.1 (WANG *et al.*, 2004). Assim, a um pH superior a 5, a fração aniônica da enzima é favorecida, portanto com maior potencial para oxidar AM que apresenta características catiônicas (PEREIRA *et al.*, 2014). As reações que compõem o ciclo catalítico da peroxidase vegetal envolvem a oxidação do grupo protético heme da peroxidase por peróxido de hidrogênio por dois elétrons e a formação de um composto intermediário com características positivas (oxiferril $-O=Fe^{5+}$). Possivelmente, este cátion induz a biodegradação do corante catiônico (SILVA *et al.*, 2012).

O PRI apresentou maior poder de biodegradação de AM e AZM em comparação com PRL devido à presença de grupos hidroxila no biocatalisador imobilizado. Os grupos hidroxila colaboram na orientação do substrato na interação com o sitio ativo, o que justifica o melhor desempenho de PRI na biodegradação de AM e AZM (SCOTTI *et al.*, 2006).

Embora tenham sido obtidos resultados menores em termos de ED com AZM, a biodegradação máxima de AZM por PRL e PRI ocorreu a pH 5. AZM é um corante aniônico do tipo antraquinona (CELEBI *et al.*, 2013). Sobre a biodegradação do AZM, DEHVARI *et al.*, (2017) descreve que a presença de grupos hidroxilo a altos valores de pH aumenta a carga negativa do corante diminuindo a eficiência de remoção. Como mencionado anteriormente a pH 5, a forma aniônica da peroxidase de rabanete é favorecida. No entanto, as interações com o corante aniônico não são favorecidas nestas condições, reduzindo assim o poder de degradação da enzima. Resultados semelhantes foram relatados na literatura. CELEBI *et al.*, (2013) estudaram a biodegradação do

corante Reactive Blue 19 (azul marinho) catalisada pela peroxidase de rabanete na forma livre onde a enzima foi inibida em valores de pH (6 - 9) e apresentou remoção máxima a pH 5. CHAMPAGNE e RAMSAY (2007) estudaram a degradação do corante reativo blue 19 por lacase imobilizada em sílica, obteve-se o melhor resultado a pH 5.

5.4.1.2 Efeito da razão molar do corante: peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) atua como um co-substrato em reações catalisadas pela peroxidase, na oxidação de substratos que atuam como aceptores e doadores de elétrons, como as quinonas, citocromo, hidroquinona, ácido ascórbico, ferroceno e o iodeto na presença da solução de H_2O_2 (VIEIRA *et al.*, 2003; ULIANA *et al.*, 2008; CHIONG *et al.*, 2016; RODWELL *et al.*, 2016). Assim, estudou-se o efeito da razão molar do corante: H_2O_2 foi investigado na faixa de (1:0,1 – 1:100 mmol/L) para AM e AZM, a 200 rpm por 1 h à 25 °C, para o Azul de Metileno: pH 8, quantidade de biocatalisador: PRL (20,2 U) e PRI (3,25x10⁻³ U) e para o Azul Marinho: pH 5 e quantidade de biocatalisador: PRL (22,48 U) e PRI (26,25x10⁻³ U). O efeito da razão molar do corante: H_2O_2 na eficiência de descoloração (ED - %) se mostra na Figura 11.

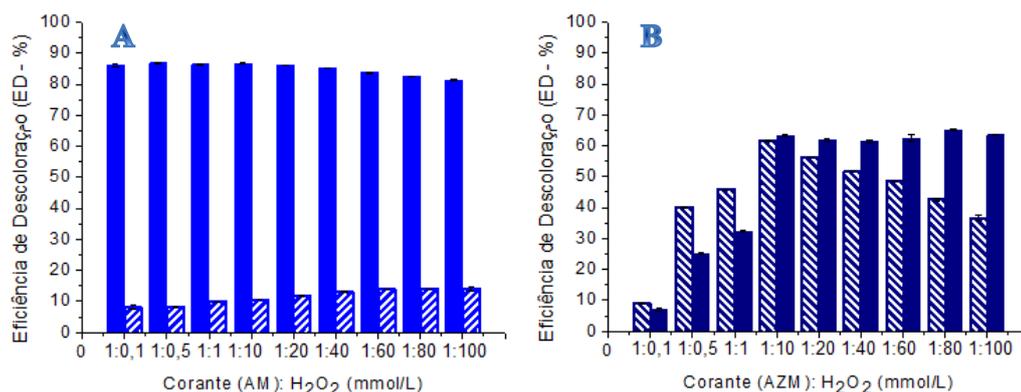


Figura 11: Efeito da razão molar do corante: H_2O_2 na eficiência de descoloração do Azul de Metileno (A) (PRL ▨) e (PRI ■) do Azul Marinho (B) (PRL ■) e (PRI ▨).

Na Figura 11A (AM), podemos observar que para ambas as formas o aumento de peróxido de hidrogênio não influenciou significativamente no processo de biodegradação. Portanto foi definido como razão molar do corante (AM): H_2O_2 para a PRL 1:1 mmol/L e para PRI 1:0,5 mmol/L, com eficiências de descoloração de 9,7 % e 86 %, respectivamente.

Na Figura 11B (AZM), a biodegradação foi mais eficiente com o aumento da razão molar corante: peróxido de hidrogênio de 0,1 mmol/L para 10 mmol/L, mas houve uma diminuição da ED nas concentrações mais elevadas de H₂O₂ para a forma imobilizada, enquanto que permaneceu constante para a forma livre. Portanto, a razão molar ideal foi de 1:10 mmol/L para a PRL e PRI, com eficiências de descoloração de 62 e 61 %, respectivamente.

SILVA *et al.*, (2013) utilizando a peroxidase a partir da soja na descoloração do corante sintético do tipo antraquinona Remazol Brilliant Blue R, apresentou uma remoção máxima de 86% de descoloração na concentração de 0,5 mmol/L de H₂O₂.

Para BOUCHERIT *et al.*, (2013) altas concentrações (valores maiores que 1:10) de H₂O₂ atua como um inibidor da atividade da peroxidase de forma irreversível oxidando o grupo férrica da enzima. Assim, a imobilização tem a vantagem de proteger a enzima contra altas concentrações de peróxido. O peróxido de hidrogênio atua como co-substrato para ativar a ação enzimática do radical.

Para o Azul Marinho resultados semelhantes foram encontrados por YOUSEFI e KARIMINIA, (2010) onde variaram a concentração de H₂O₂ (0,65 – 19,58 mmol/L) na degradação do corante do tipo monoazo Acido Laranja II apresentando uma degradação em torno de 60 % para concentrações iniciais de 8 – 12 mmol/L. Com isso geralmente o excesso de peróxido de hidrogênio na mistura de reação resulta numa inativação enzimática. No ciclo catalítico das peroxidases, a enzima é oxidada pelo peróxido de hidrogênio por dois elétrons e seguida por duas reduções de um único elétron através do composto intermediário II ao seu estado de repouso por substratos redutores apropriados (mediador redox ou compostos alvo). Na presença de peróxido de hidrogênio em excesso, o composto II pode ser adicionalmente oxidado para uma forma inativada, do composto III.

5.4.1.3 Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração.

O efeito da quantidade de biocatalisador na forma livre (PRL) e imobilizada (PRI) foi investigado na faixa de (PRL: 0,202 – 60,60 U) e (PRI: 0,65 – 5,20x10⁻³ U) para o Azul de Metileno e (PRL: 0,224 – 33,72 U) e (PRI: 5,25 – 42,00x10⁻³ U) para o Azul Marinho, durante 1 h a 200 rpm à 25 °C, pH 8 (AM) e 5 (AZM) e razão molar do corante: H₂O₂ (PRL: 1:1 mmol/L) e (PRI: 1:0,5 mmol/L) para Azul de Metileno e 1:10

mmol/L pra ambas as formas do Azul Marinho. Os resultados do efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração (ED - %) são apresentados na Figura 12.

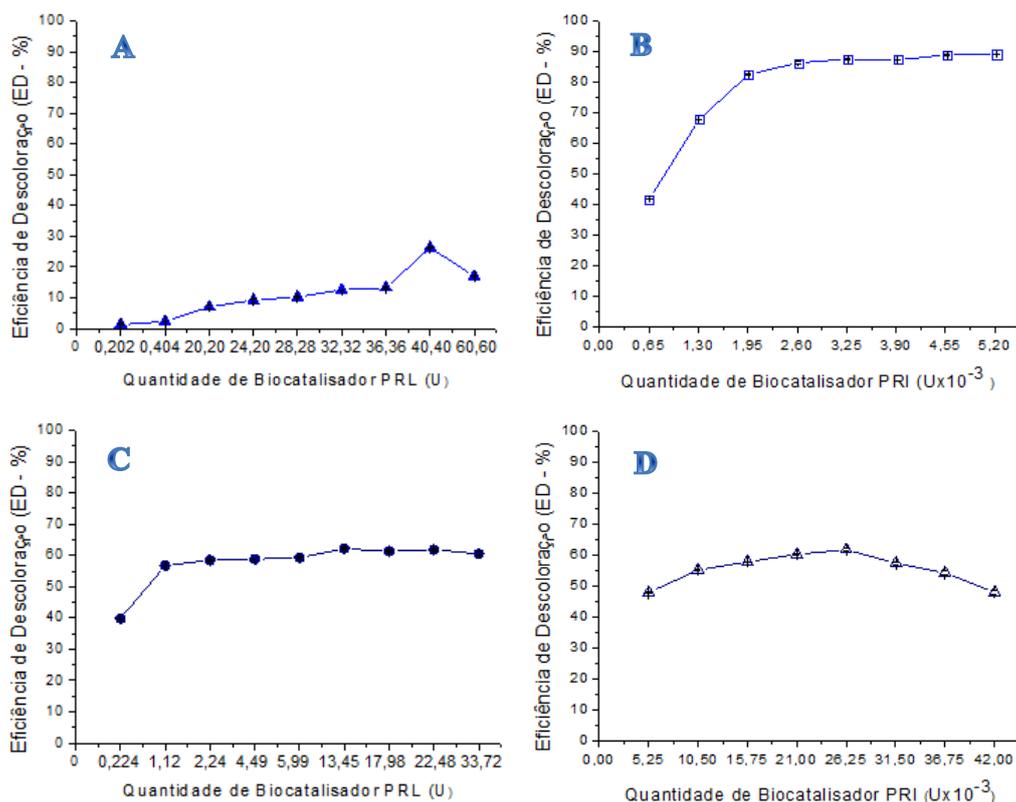


Figura 12: Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração do Azul de Metileno (A: PRL —▲—) e (B: PRI —□—) e para Azul Marinho (C: PRL —●—) e (D: PRI —△—).

Para o azul de metileno observou-se comportamentos diferentes para ambas as formas. No caso da PRL (Figura 12A) obteve-se a maior eficiência de descoloração (26 %) com 40,4 U do biocatalisador, e para PRI (Figura 12B) com $3,25 \times 10^{-3}$ U foi obtida a maior eficiência (87 %).

Para o corante azul marinho, podemos verificar o efeito da quantidade de biocatalisador na forma livre (Figura 12C) e imobilizada (Figura 12D) na biodegradação. A PRL apresentou uma eficiência de 62 %, com 13,48 U de biocatalisador, permanecendo quase constante a partir desse ponto, enquanto que para PRI a eficiência foi de 61 % com $26,25 \times 10^{-3}$ U de biocatalisador, observando um ligeira diminuição a partir desse ponto.

Na Figura 12A a baixa degradabilidade do corante pode estar relacionada à especificidade da enzima em relação a fatores que influenciam na velocidade da reação como concentração de enzima, proporção substrato: H₂O₂, concentração do corante ou a presença de mediadores (SILVA *et al.*, 2012). Embora para a forma imobilizada (Figura 12B), a boa degradabilidade pode ser atribuída à redução da limitação da difusão por convecção devido a mudanças estruturais muitas vezes causadas pelo processo de imobilização (ZHU *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados em BOUCHERIT *et al.*, (2013) utilizando a peroxidase a partir da abobrinha imobilizada por aprisionamento em microesferas de alginato de cálcio na degradação do corante direto azo, obtendo uma remoção de 76 %.

Para o Azul Marinho, Resultados semelhantes foram descrito por SATAR E HUSAIN, 2009, onde variaram de 0,1 – 1,0 U a peroxidase de rabanete branco imobilizada em Celite para a degradação dos corantes reativos Vermelho 120 e Azul 171 atingindo uma eficiência em torno de 60%.

Para a forma livre (Figura 12C), FORGIARINI E DE SOUZA, 2007 apresentaram resultados similares utilizando a enzima peroxidase de raiz forte na degradação dos corantes têxteis na faixa de 2,98 – 29,85 U, a maior eficiência de 58 % foi obtida com 14,98 U.

A otimização da quantidade de enzima (PRL e PRI) foi realizada visando obter uma alta eficiência de descoloração com menor quantidade de enzima utilizada no processo. A partir dos resultados podemos verificar que com uma quantidade mínima de enzima imobilizada no suporte (PRI) podemos obter uma boa eficiência de descoloração que com uma quantidade muito maior de enzima em sua forma livre (PRL). Conseqüentemente, reduzindo os custos do processo e conseguindo a reutilização através da imobilização.

5.4.1.4 Efeito do tempo de contato

O efeito do tempo de contato na eficiência de descoloração para a forma livre (PRL) e imobilizada (PRI) foi investigado na faixa de (0 – 12 h) a 200 rpm à 25 °C, e condições determinadas nos itens (5.4.2.1 – 5.4.2.3) para ambas as formas. Os resultados são mostrados na Figura 13.

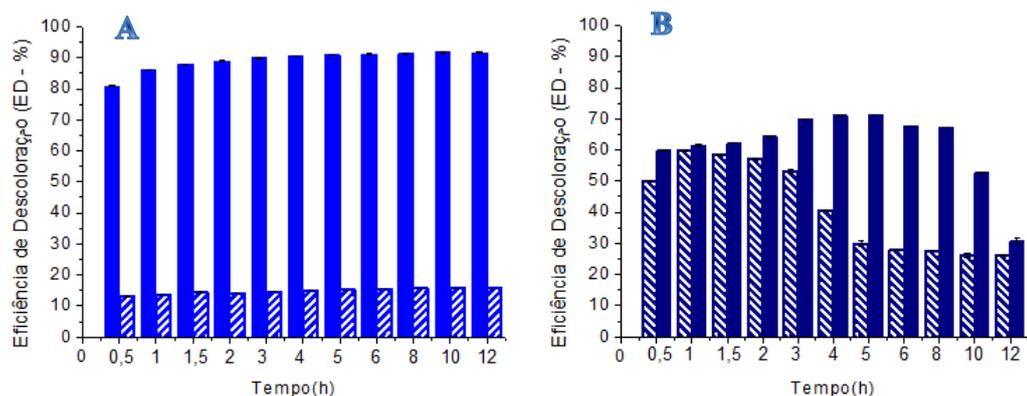


Figura 13: Efeito do tempo de contato na eficiência de descoloração do (A) Azul de Metileno pelo biocatalisador livre (PRL ▨) e imobilizada (PRI ■) para e (B) Azul Marinho (PRL ■) e (PRI ▨).

Na Figura 13A, para os biocatalisadores tanto na forma livre (PRL) como imobilizada (PRI) o aumento do tempo de contato não influencia significamente na eficiência de descoloração, portanto foi obtido como tempo de contato ótimo 1 h para a reação de biodegradação para ambas as formas. A peroxidase livre obtida a partir do rabanete mostrou uma baixa eficiência na descoloração, em relação à imobilizada. SILVA *et al.*, (2012) atingiram 9% de eficiência de descoloração do corante do tipo azo Remazol brilliant orange 3R na presença da peroxidase de nabo livre durante 110 min.

Já para PRI observou-se uma boa eficiência de descoloração até final de reação de 12 h. Resultados semelhante foram obtidos por MOHAN *et al.*, 2005 imobilizaram peroxidase de raiz forte em suporte de gel de acrilamida para a degradação do corante tipo diazo Acido Preto BX com remoção de 90% em 60 min. Normalmente, espera-se que a imobilização enzimática forneça efeito de estabilização restringindo o processo de desdobraimento da proteína como resultado de forças intermoleculares aleatórias.

Na Figura 13B, verificamos que para degradação do Azul marinho o comportamento dos biocatalisadores livre e imobilizado foi diferente, também para este corante foi definido como tempo de contato adequado 1h para reação de descoloração tanto para PRL e PRI.

Segundo DA SILVA *et al.*, (2010), que trabalhou o uso da peroxidase de raiz forte na descoloração de corantes reativos, mostrou uma alta eficiência do corante em um curto período de reação, que segundo os autores o tempo de reação está diretamente relacionado às diferentes estruturas dos corante, fato que afetou o modo de atividade enzimática e conseqüentemente poder causar uma variação no tempo de reação.

5.4.2 Corante Direto: Vermelho do Congo

5.4.2.1 Efeito de pH

O efeito de pH na eficiência de descoloração foi investigado na faixa de pH (2 – 10) durante 1 h a 200 rpm à 25 °C, 70 mg/L de concentração do corante, razão molar (VC): H₂O₂ (1:0,5 mmol/L) e quantidade de biocatalisador PRL (9,32 U) e PRI (16,90x10⁻³ U). Os resultados do efeito de pH na eficiência de descoloração (ED - %) do corante Vermelho do Congo (VC) são apresentados na Figura 14.

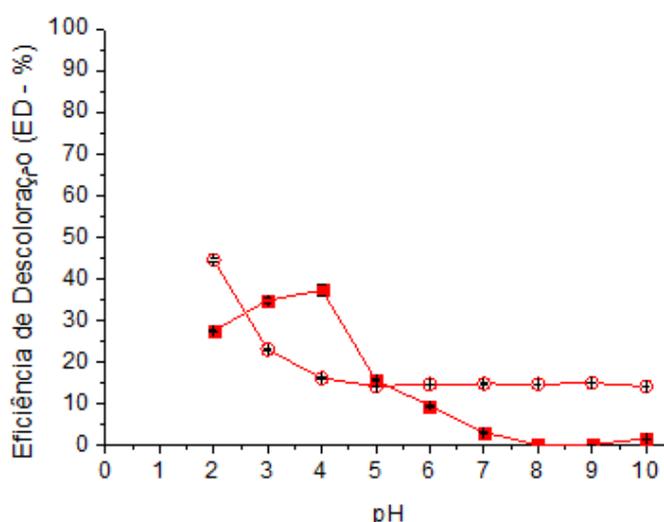


Figura 14: Efeito de pH na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo (PRL —■—) e (PRI —○—).

Ambos os biocatalisadores livre e imobilizada apresentaram a mais eficiente biodegradação em meio ácido. Para PRL foi obtida a maior eficiência de descoloração (37,2 %) em pH 4,0, a partir desse ponto foi observada uma diminuição da eficiência. Enquanto que para PRI a máxima eficiência de descoloração (44,4 %) foi em pH 2,0, quando os valores de pH aumenta até 5,0 observa-se uma diminuição da eficiência, mantendo-se praticamente constante a partir desse pH.

Para as máximas biodegradações (PRL: pH 4 e PRI: pH 2) do corante direto pode ser observada uma influência na relação ao grupo cromóforo (-N=N-) da molécula do corante. Porém, em relação ao anel benzênico, componente estrutural da molécula do corante vermelho do congo, sua remoção torna-se praticamente à mesma. Por apresentar

características na forma aniônica do tipo azo o vermelho do congo apresenta compostos que são extensivamente utilizados nos processos das indústrias têxteis, sendo caracterizado por elevada resistência (MACHADO e DA SILVA, 2013). Um dos fatores para a sua degradação pode estar caracterizado pelo grupo azo funcional, isto é $R-N=N-R'$, em que R e R' pode ser um grupo arilo ou alquilo (ALMAGUER *et al.*, 2017). Outro fato esta intimamente relacionada com as mudanças na forma dos sítios ativos da enzima, que pode modificar o estado de ionização de aminoácidos ácidos ou básicos. Quando o estado de ionização de aminoácidos em uma proteína é alterado, as ligações iônicas que influenciam a forma terciária da proteína podem ser alteradas. Consequentemente, a atividade enzimática é afetada (KALSOOM *et al.*, 2015).

KULSHRESTHA e HUSAIN, 2007 demonstraram a eficácia da peroxidase de nabo em soluções aquosas na descoloração de cinco corantes diferentes (Acid Blue 92, Acid Red 97, Acid Yellow 42, Acid Black 1 e Acid Black 210) com remoção de cor aproximadamente 75 a 100 %. Segundo MOHAN *et al.*, (2005) obtiveram resultados semelhantes utilizando a peroxidase de raiz forte (HRP) imobilizada na degradação de Acid Black 10BX em pH 2, que pertencente à mesma classe do azo corante do vermelho do congo (MACHADO e DA SILVA, 2013).

5.4.2.2 Efeito da razão molar do corante (VC): peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O efeito da razão molar do corante (VC): H_2O_2 na eficiência de descoloração foi investigado na faixa de (1:0,1 – 1:60 mmol/L) a 200 rpm por 1 h à 25 °C, 70 mg/L de concentração do corante, pH (PRL: pH 4 e PRI: pH 2) e quantidade de biocatalisador PRL (9,32 U) e PRI ($16,90 \times 10^{-3}$ U). O efeito da razão molar (VC): H_2O_2 na eficiência de descoloração (ED - %) se mostra na Figura 15.

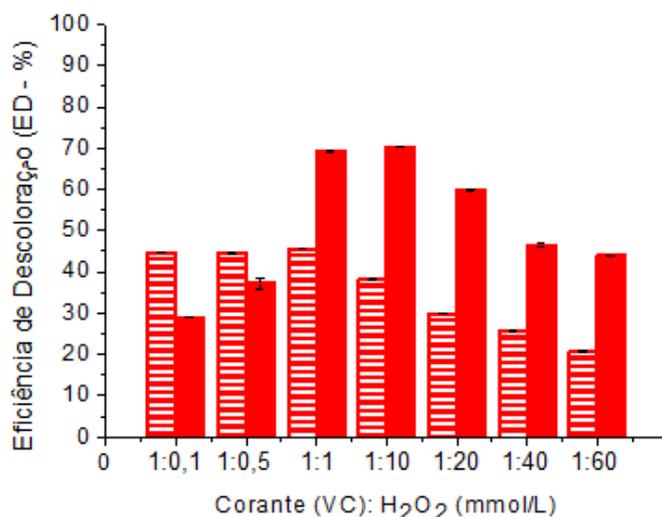


Figura 15: Efeito da razão molar do corante: H₂O₂ na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo (PRL ■) e (PRI ▨).

Na Figura 15, a peroxidase na forma livre apresenta um incremento na eficiência de descoloração com razão molar de 1:0,1 à 1:10 mmol/L, enquanto que para a sua forma imobilizada mantem-se constante (1:0,1 – 1:1 mmol/L) e logo após há um decaimento para ambas as formas até 1:60 mmol/L. Definindo-se como ótima razão molar VC: H₂O₂ (1:1 mmol/L) para PRL e PRI com máximas eficiências de descoloração de 69 % e 45,5 % respectivamente.

Baixas concentrações de H₂O₂ limitam a taxa de reação enquanto que em quantidades excessivas podem resultar em um efeito inibidor sobre a atividade enzimática. Resultados semelhantes foram descritos por CHIONG *et al.*, (2016) que utilizaram a peroxidase extraída da soja catalisada nas reações, mostrando uma eficiência de descoloração aproximadamente constante dentro da gama de concentração de H₂O₂ de 2 – 10 mmol/L em torno de 75 à 80 % de eficiência de descoloração do corante laranja metil do tipo monoazo, que para concentrações elevadas (acima de 10 mmol/L) observou-se inibição enzimática por H₂O₂ de forma irreversível oxidando o grupo da enzima heme que é vital para a peroxidase.

5.4.2.3 Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração

O efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração da forma livre (PRL) e imobilizada (PRI) foi investigado na faixa de (PRL: 0,09 – 11,18 U) e (PRI: 3,38 – 27,04x10⁻³ U) durante 1 h a 200 rpm à 25 °C, PRL: pH 4 e PRI: pH 2 e

razão molar do corante (VC): H₂O₂ (1:1 mmol/L) para PRL e PRI. Os resultados do efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração (ED - %) são apresentados na Figura 16.

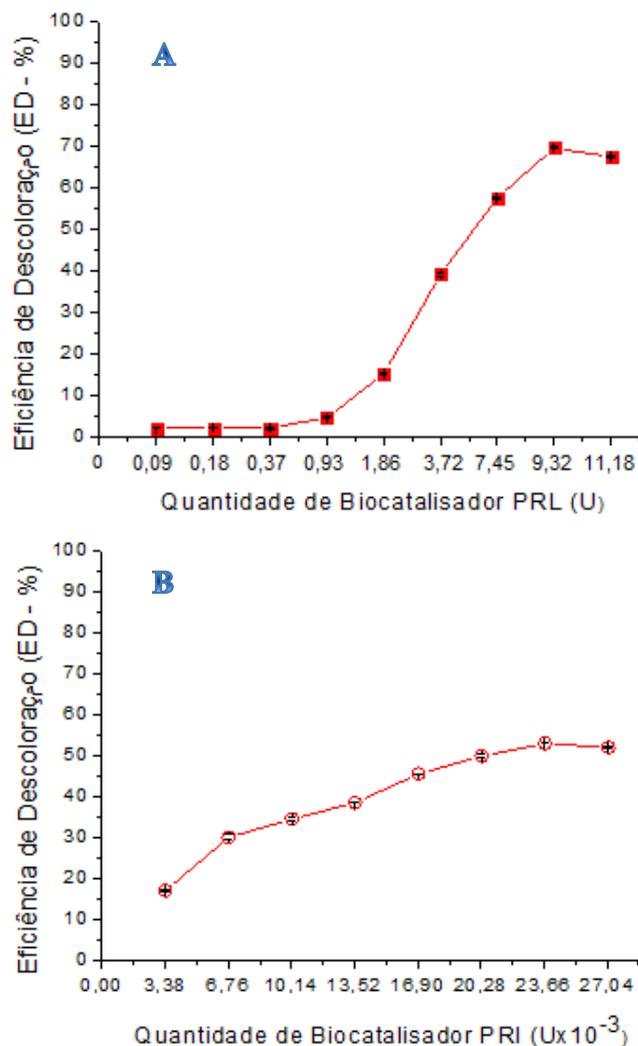


Figura 16: Efeito da quantidade de biocatalisador na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo (A: PRL —■—) e (B: PRI —○—).

Na Figura 16, mostra-se para ambos os biocatalisadores o incremento da eficiência de descoloração com o aumento da quantidade de biocatalisador, onde para PRL foi obtida como máxima eficiência 70% com 9,32 U e para PRI 50% de ED com 23,66x10⁻³ U.

O efeito da quantidade de biocatalisador na reação deve ser mantido independente na concentração de substrato de modo que qualquer variação na quantidade de produto

formada seja uma função da concentração de enzima (MOHAN *et al.*, 2005). Segundo SKORONSKI *et al.*, (2014) baixas quantidades de enzimas, existe um menor número de ligações entre enzima-suporte-meio reacional, criando, um sistema com baixa atividade enzimática. Para elevadas quantidades de enzima no meio, permite uma maior difusividade nas substâncias aplicadas.

5.4.2.4 Efeito do tempo de contato

O efeito do tempo de contato na eficiência de descoloração para a sua forma livre (PRL) e imobilizada (PRI) foi investigado na faixa de (0 – 12 h) a 200 rpm à 25 °C, e condições determinadas nos itens (5.4.3.1 – 5.4.3.3) para ambas as formas. Os resultados são mostrados na Figura 17.

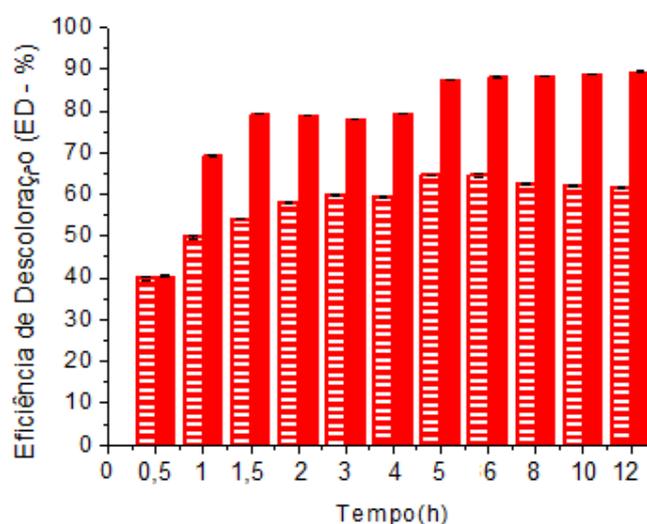


Figura 17: Efeito do tempo de contato na eficiência de descoloração do Vermelho do Congo mediante biocatalisadores na forma livre (PRL ■) e imobilizada (PRI ▨)

Na Figura 17, observa-se que ambos os biocatalisadores apresentam comportamentos semelhantes, para PRL no tempo reacional de 5 h foi obtida a máxima remoção de 90 %. Resultados que corroboram com MOHAN *et al.*, (2005) e FARACO *et al.*, (2009), onde a degradação do corante Acid Red 266 e Acid Black BX10, respectivamente apresentou remoção acima de 80 %, onde as estruturas dos corantes e a especificidade do substrato da apoenzimas da lacase e peroxidase pode ser atribuída, para a degradação do corante aniônico.

Enquanto que para PRI obteve-se somente 65 % de remoção para o mesmo tempo reacional (5 h). Segundo ZILLE *et al.*, (2003) relataram menor disponibilidade da enzima para interação com corantes aniônicos devido à imobilização em uma determinada matriz, onde o objetivo da imobilização é a reutilização da matriz do processo.

5.5 Análise por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é uma das técnicas mais utilizadas para caracterização química das fibras naturais, permite identificar bandas de absorção características de grupos funcionais. Os espectros de FTIR da enzima livre, fibra de coco tratada, biocatalisador imobilizado (BI), BI após o tratamento do azul de metileno, azul marinho e vermelho do congo, e os corantes puros azul de metileno, azul marinho e o vermelho do congo são mostrados na Figura 18.

As bandas expressas em $3500\text{ cm}^{-1} - 3000\text{ cm}^{-1}$ estão associados a vibrações de estiramento de grupos hidroxilas (O – H) presentes na composição da enzima livre (1), biocatalisador imobilizado (3), corantes azul marinho (6) e vermelho do congo (8), BI após o tratamento do AM (5), AZM (7) e VC (9) na Figura 18 a, a1, b, b1, c e c1 (BRÍGIDA *et al.*, 2010). Nas bandas de $3000\text{ cm}^{-1} - 2800\text{ cm}^{-1}$ mostram um alongamento de grupos metilo e metileno (C – H) em celulose, hemicelulose nas amostras da fibra de coco tratada (1), biocatalisador imobilizado (3) e BI após o tratamento do AM (5), AZM (7) e VC (9) na Figura 18 a, a1, b, b1, c e c1 (MAHESWARI *et al.*, 2012). Nas bandas de 910 cm^{-1} , apresenta características das ligações β 1,4-glicosídicas entre as unidades de anidro glucose na celulose presentes no biocatalisador imobilizado (3) e no BI após o tratamento do AM (5), AZM (7) e VC (9) (Figura 18 a, a1, b, b1, c e c1) (LU *et al.*, 2014).

O espectro da enzima livre (1) (Figura 18 a, a1, b, b1, c e c1) mostra a presença de bandas de absorção características de amida I a 1617 cm^{-1} e amida II a 1600 cm^{-1} que são atribuídas à ligação peptídica da enzima (CAO *et al.*, 2012).

Nas bandas de absorção no espectro do biocatalisador imobilizado (3) e o BI após o tratamento dos corantes (5, 7 e 9) foi observado uma banda em 1200 cm^{-1} devido às

vibrações de estiramento ($-S=O$), bem como uma vibração de alongamento a 1045 cm^{-1} para grupos funcionais nitrilas ($C-N$) (ZHANG *et al.*, 2010).

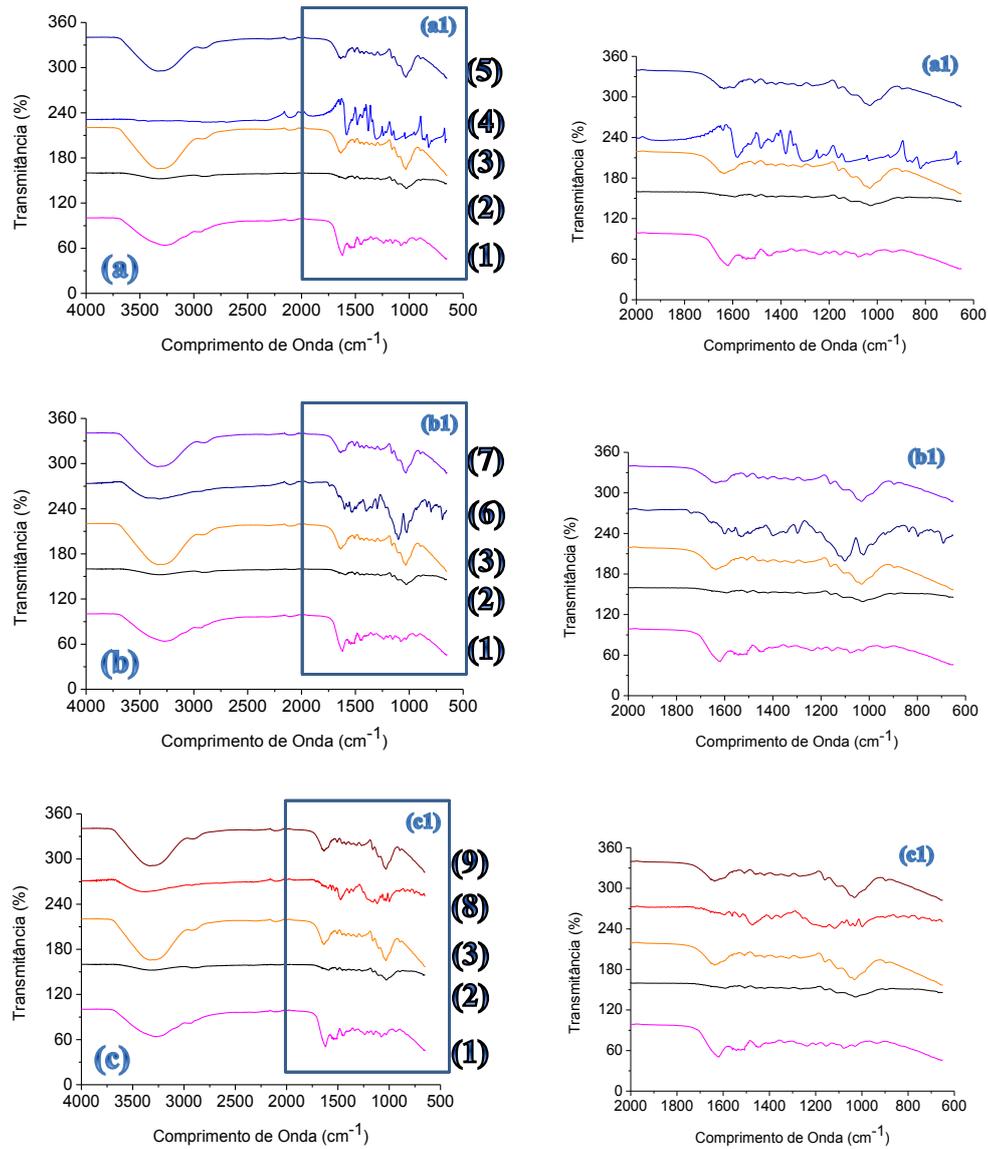


Figura 18: Espectro no infravermelho (FTIR) para as bandas características entre $4000 - 650\text{ cm}^{-1}$ são representados por (a) para o corante Azul de Metileno (AM), (b) para o corante Azul Marinho (AZM) e (c) para o corante Vermelho do Congo (VC). As amostras analisadas foram identificadas por enzima livre (1), fibra de coco tratada por (2), biocatalisador imobilizado por (3), corante azul de metileno AM por (4) e BI após o tratamento de AM por (5), corante azul marinho por (6) e BI após o tratamento de AZM por (7) e o corante vermelho do congo por (8) e BI após o tratamento de VC por (9). A ampliação da escala das mesmas amostras é descrita nos espectros a1, b1 e c1, nas bandas características entre $2000 - 650\text{ cm}^{-1}$.

A classificação entre os diferentes corantes é possível devido aos grupamentos específicos em cada molécula cujas bandas características são identificadas nos espectros dos corantes puros. As bandas de $1450 - 1460 \text{ cm}^{-1}$ e $1340 - 1360 \text{ cm}^{-1}$ está relacionado à molécula de xanteno que é um composto orgânico derivado da fluoresceína, eosinas e rodaminas, que são estruturas para referentes à intensidade da cor do corante azul de metileno (4) e do azul marinho (6) (Figura 18 a, a1, b e b1), respectivamente. Após o tratamento com o BI dos corantes AM (5) e AZM (7), as bandas características da molécula de xanteno desapareceram (Figura 18 a, a1, b e b1) indicando a biodegradação destes corantes. Nas bandas de $1450 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ são responsáveis pela presença dos compostos aromáticos dos nitros corantes, grupo alquilo ou arilo no corante vermelho do congo (8) (Figura 18 c e c1), e após a degradação com o biocatalisador imobilizado (BI) verificou-se o desaparecimento destas bandas (9) (Figura 18 c e c1). Nas bandas em torno de $1160 - 1170 \text{ cm}^{-1}$ e $1360 - 1370 \text{ cm}^{-1}$ identificou-se triarilmetanos característico dos corantes puros AZM e VC (6 e 8) e após a degradação com o BI dos corantes azul marinho (7) e vermelho do congo (9) notou-se o desaparecimento destas bandas (Figura 18 b, b1, c e c1), conforme descrito por PRATI *et al.* (2016) para especificamente a mesma molécula. Na banda de 1100 cm^{-1} corresponde aos corantes puros do tipo azo como o azul marinho (6) e vermelho do congo (8), e após a degradação com o BI (7 e 9) verificou-se a diminuição da intensidade da banca característica destes corantes de acordo com a Figura 18 b, b1, c e c1. Na banda 1649 cm^{-1} notou-se a presença de amida I e/ou aminas do corante puro azul de metileno (4) e após a degradação com o BI esta banda característica não foi identificada (5), este fato confirma a eficiência de descoloração dos corantes após o tratamento proposto (Figura 18 a e a1). Portanto, o uso da análise do espectro no infravermelho (FTIR) das bandas características de corantes antes e após a degradação complementam os dados obtidos na eficiência de descoloração para corantes similares conforme descritos na literatura por BOUCHERIT *et al.* (2013).

5.6 Estabilidade Operacional do BI na eficiência de descoloração do corante Azul de Metileno, Azul Marinho e Vermelho do Congo.

A reutilização é um dos principais indicadores para avaliar a aplicação de enzimas imobilizadas nas indústrias. A enzima imobilizada pode ser facilmente removida e avaliada quanto à sua eficiência (CHAGAS *et al.*, 2015). Para demonstrar a reutilização

da enzima imobilizada por adsorção física em um suporte orgânico de fibra de coco para remover compostos fenólicos em corantes catiônicos (AM), reativos (AZM) e diretos (VC) foi investigada. Nas Figuras de (19 – 21) mostra-se o desempenho da PRI usado na biodegradação de corantes AM, AZM e VC. O corante AM foi reutilizado dez vezes mantendo mais de 50% da eficiência inicial (Figura 19), enquanto que para o corante AZM e VC somente foram dois ciclos de reutilização (Figura 20 e 21). Portanto, peroxidase de rabanete imobilizada pode ser considerado mais eficiente na biodegradação dos corantes AM, AZM e VC, pois o sistema imobilizado é mais fácil de operar com corante catiônico (básico e não aniônico) e podem ser reusadas várias vezes com a possibilidade de ser utilizado em processos de escala industrial.

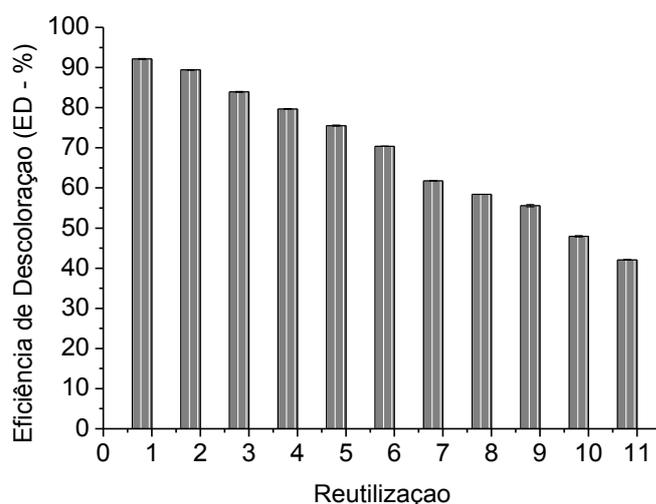


Figura 19: Ciclos de Reuso da PRI na degradação do corante catiônico Azul de Metileno.

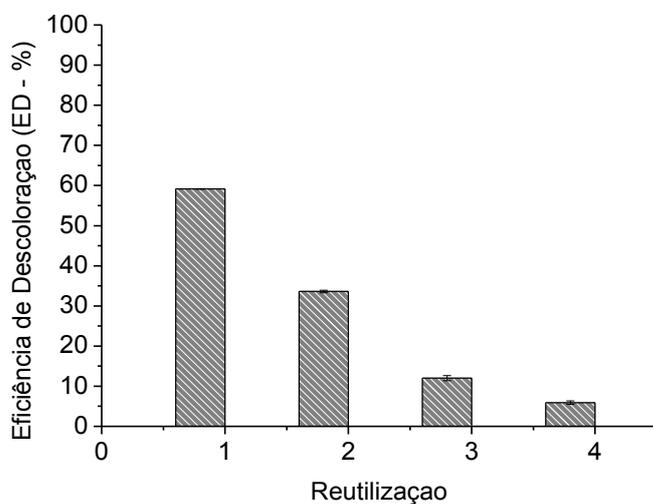


Figura 20: Ciclos de Reuso da PRI na degradação do corante reativo Azul Marinho.

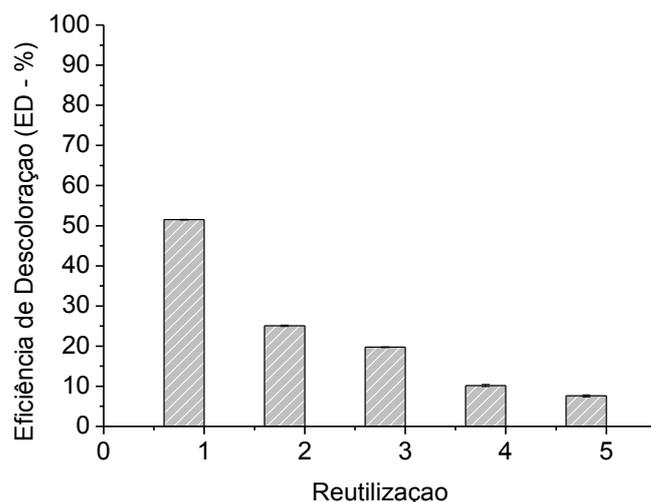


Figura 21: Ciclos de Reuso da PRI na degradação do corante direto Vermelho do Congo.

Nos biocatalisadores imobilizados por adsorção física, a estabilidade operacional foi caracterizada por baixa capacidade de reutilização com eficiência superior a 50 % do ciclo inicial. A baixa tolerância aos ciclos de reutilização no biocatalizador imobilizado obtido pela técnica de adsorção física pode ser atribuída à dessorção da enzima devido a ligações fracas ou ao suporte (KARRAT *et al.*, 2011). Também foi observada neste estudo a possibilidade da influência da degradação do corante por carga aniônica do corante reativo (AZM) e direto (VC).

O perfil da redução da eficiência pode ser devido ao menor número de unidades (10^{-3} U) do biocatalizador utilizado no processo de imobilização. Em alguns outros casos, a perda de eficiência de decoloração nos ciclos subsequentes, pode ser atribuída à limitação de transferência de massa, perda de atividade catalítica que ocorre durante o uso repetitivo. Este fato também pode ser atribuído à inativação enzimática pela reação e/ou pode ser atribuído ao bloqueamento da enzima inativada por acumulação de produtos de polimerização em partículas de peroxidase imobilizadas (BOUCHERIT *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2014).

Capítulo VI

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho verificou-se a obtenção do extrato bruto da peroxidase imobilizada pelo método de adsorção física em suporte orgânico de fibra de coco aplicado no processo de descoloração de corantes têxteis, tendo as seguintes conclusões:

- A concentração de proteínas do extrato bruto contendo enzima peroxidase foi de $0,65 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando na preparação tampão fosfato de sódio;
- O melhor carregamento enzimático para imobilização utilizando a técnica de adsorção física (ADS) em suporte orgânico foi de 5,2 mg de proteína por grama de suporte com uma eficiência de imobilização de 70 %;
- A caracterização bioquímica da peroxidase na forma livre e imobilizada por adsorção física em fibra de coco apresentou maior atividade relativa para o pH em 7 à 25 °C para ambas as formas, enquanto que para o efeito da temperatura em pH 7, a enzima livre obteve a maior atividade em 50 °C, e para a forma imobilizada as maiores atividades foram entre 25 à 40 °C.
- Nas condições otimizadas as eficiências de descoloração máximas foram: para o AM 26,2 % (PRL) e 87,3 % (PRI), para o VC foram 70 % (PRL) e 50 % (PRI), e para o AZM foram 62,1 % (PRL) e 61,5 % (PRI).
- Os resultados obtidos no presente estudo revelaram a eficácia da peroxidase de rabanete na descoloração de corantes catiônicos, diretos e reativos, principalmente a forma imobilizada, porque é necessária uma pequena quantidade (U) de extrato bruto em relação ao livre, bem como a vantagem do reuso.
- O biocatalisador imobilizado apresentou uma estabilidade operacional de dez ciclos para o Azul de Metileno e dois ciclos para o Vermelho do Congo e Azul Marinho.
- A análise por (FTIR) exibiu presença de bandas características de enzima livre, fibra de coco tratada, biocatalisador imobilizado, e os BI após o tratamento dos corantes.
- O desempenho na biodegradação de azul de metileno utilizando PRL e PRI foi altamente dependente do pH e da quantidade do biocatalisador, enquanto que

para o vermelho do congo e azul marinho era dependente do pH, razão molar: H_2O_2 , quantidade de biocatalisador e tempo de contato. Portanto, a peroxidase de rabanete imobilizada em fibra de coco pode se tornar uma alternativa eficiente e econômica no desenvolvimento de um processo biotecnológico efetivo para a remoção de efluentes têxteis em grande escala.

Capítulo VII

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste tópico serão apresentadas algumas sugestões para desenvolvimento de trabalhos futuros:

- Estudar a atuação da enzima em outras classes de corantes têxtil;
- Estudar o efeito da concentração de corante na solução catalisada pela peroxidase de rabanete (*Raphanus sativus L.*) na forma livre e imobilizada;
- Avaliar a toxicidade dos corantes após o tratamento com *Artemia salina* e *Daphnia magna*;
- Analisar os possíveis compostos químicos presente na solução após o tratamento enzimático, através do método de separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Verificar o custo operacional presente na aplicação em efluente têxtil real.

Capítulo VIII

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application, *Biotechnology advances*, 29, p. 675 – 685, 2011.
- ALIABADI, R. S.; MAHMOODI, N. O. Synthesis and characterization of polypyrrole, polyaniline nanoparticles and their nanocomposite for removal of azo dyes; sunset yellow and Congo red, *Journal of Cleaner Production*, 179, p. 235 – 245, 2018.
- ALMAGUER, M. A.; CARPIO, R. R.; ALVES, T. L. M.; BASSIN, J. P. Experimental study and kinetic modelling of the enzymatic degradation of the azo dye Crystal Ponceau 6R by turnip (*Brassica rapa*) peroxidase, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017.
- ALMEIDA, T. M.; BISPO, M. D.; CARDOSO, A. R.; MIGLIORINI, M. V.; SCHENA, T.; DE CAMPOS, M. C. V.; CARAMÃO, E. B. Preliminary studies of bio-oil from fast pyrolysis of coconut fibers, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, p. 6812 – 6821, 2013.
- BENASSI, A. C. Caracterizações biométrica, química e sensorial de frutos de coqueiro variedade Anã Verde. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2006.
- BERGSTEN-TORRALBA, L. R. Estudo de fungos da Coleção de Microrganismos de Referência do INCQS e de fungos isolados de sedimentos de igarapés em Manaus (AM) com capacidade de descolorir e detoxificar corantes têxteis. Tese de Doutorado, INCQS/FIOCRUZ, 2008.
- BEZERRA, T. M. S.; BASSAN, J. C.; DE OLIVEIRA SANTOS, V. T.; FERRAZ, A.; MONTI, R. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice, *Process Biochemistry*, 50, p. 417 – 423, 2015.

- BHATIA, L.; JOHRI, S.; AHMAD R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review, *Amb Express*, 2, p. 65, 2012.
- BOROS, Z.; WEISER, D.; MÁRKUS, M.; ABAHÁZIOVÁ, E.; MAGYAR, Á.; TOMIN, A.; POPPE, L. Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations, *Process Biochemistry*, 48, p. 1039 – 1047, 2013.
- BOUCHERIT, N.; ABOUSEOUD, M.; ADOUR, L. Degradation of direct azo dye by *Cucurbita pepo* free and immobilized peroxidase, *Journal of Environmental Sciences*, 25, p. 1235 – 1244, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72, p. 248 – 254, 1976.
- BRÍGIDA, A. I. S.; CALADO, V. M. A.; GONÇALVES, L. R. B.; COELHO, M. A. Z. Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber, *Carbohydrate Polymers*, 79, p. 832 – 838, 2010.
- BRINCHI, L.; COTANA, F.; FORTUNATI, E.; KENNY, J. M. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications, *Carbohydrate Polymers*, 94, p. 154 – 169, 2013.
- CABRAL, M. M. S.; ABUD, A. K. S.; ROCHA, M. S. R. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; GOMES, M. A. Composição da fibra da casca de coco verde in natura e após pré-tratamentos químicos, *Engvista*, 19, p. 99 – 108, 2017.
- CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUIBAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, p. 171 – 176, 2009.

- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*, *Industrial Crops and Products*, 29, p. 642 – 647, 2009.
- CANTONE, S.; FERRARIO, V.; CORICI, L.; EBERT, C.; FATTOR, D.; SPIZZO, P.; GARDOSSI, L. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods, *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6262 – 6276, 2013.
- CAO, X.; YU, J.; ZHANG, Z.; LIU, S. Bioactivity of horseradish peroxidase entrapped in silica nanospheres, *Biosensors and Bioelectronics*, 35, p. 101 – 107, 2012.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives, *Bioresource technology*, 101, p. 4754 – 4766, 2010.
- CARDOSO, A. I. I.; HIRAKI, H. Avaliação de doses e épocas de aplicação de nitrato de cálcio em cobertura na cultura do rabanete, *Horticultura Brasileira*, 19, p. 328 – 331, 2001.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C. D.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas, *Química Nova*, 32, p. 175 – 187, 2009.
- CARDOSO, M. S.; GONÇALEZ, J. C. Aproveitamento da casca do coco-verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de polpa celulósica, *Ciência Florestal*, 26, p. 321 – 330, 2016.
- CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases, *Química Nova*, 38, p. 399 – 409, 2015.
- CELEBI, M.; ALTIKATOGLU, M.; AKDESTE, Z. M.; YILDIRIM, H. Determination of decolorization properties of Reactive Blue 19 dye using Horseradish Peroxidase enzyme, *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 38, 2013.

- CELEBI, M.; KAYA, M. A.; ALTIKATOGLU, M.; YILDIRIM, H. Enzymatic decolorization of anthraquinone and diazo dyes using horseradish peroxidase enzyme immobilized onto various polysulfone supports, *Applied biochemistry and biotechnology*, 171, p. 716 – 730, 2013.
- CHAGAS, P. M. B.; TORRES, J. A.; SILVA, M. C.; NOGUEIRA, F. G. E.; SANTOS, C.; CORRÊA, A. D. Catalytic stability of turnip peroxidase in free and immobilized form on chitosan beads, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, p. 576 – 595, 2014.
- CHAGAS, P. M. B.; TORRES, J. A.; SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater, *International journal of biological macromolecules*, 81, p. 568 – 575, 2015.
- CHAMPAGNE, P. P.; RAMSAY, J. A. Reactive blue 19 decolouration by laccase immobilized on silica beads, *Applied microbiology and biotechnology*, 77, p. 819 – 823, 2007.
- CHIONG, T.; LAU, S. Y.; LEK, Z. H.; KOH, B. Y.; DANQUAH, M. K. Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, p. 2500 – 2509, 2016.
- CHRISTIE, R. *Colour Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, united Kingdom, 2001.
- CONAMA – CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE, 1986. Fonte: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html>. Acessado em Dezembro de 2017.
- CORTEZ, J. W. M. Esterco de bovino e nitrogênio na cultura de rabanete. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, 2009.

- CRINI, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review, *Bioresource technology*, 97, p. 1061 – 1085, 2005.
- CRISTÓVÃO, R. O.; TAVARES, A. P.; BRÍGIDA, A. I.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A.; MACEDO, E. A.; COELHO, M. A. Z. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, p. 6 – 12, 2011.
- DA COSTA, C. A.; RAMOS, S. J.; SAMPAIO, R. A.; GUILHERME, D. O.; ARNALDO, L. Fibra de coco e resíduo de algodão para substrato de mudas de tomateiro, *Horticultura Brasileira*, 25, 2007.
- DA SILVA, A. M.; TAVARES, A. P.; ROCHA, C. M.; CRISTÓVÃO, R. O.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A. Immobilization of commercial laccase on spent grain, *Process Biochemistry*, 47, p. 1095 – 1101, 2012.
- DA SILVA, M. R.; DE SÁ, L. R. V.; RUSSO, C., SCIO, E.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. The use of HRP in decolorization of reactive dyes and toxicological evaluation of their products, *Enzyme research*, 2010.
- DALLAGO, R. M.; SMANIOTTO, A.; OLIVEIRA, L. D. Resíduos sólidos de curtumes como adsorventes para a remoção de corantes em meio aquoso, *Química Nova*, 28, p. 433 – 437, 2005.
- DE SOUZA, C. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de corantes reativos pelo sistema ferro metálico/peróxido de hidrogênio, *Química Nova*, 28, p. 226 – 228, 2005.
- DE SOUZA, A. A. U.; FORGIARINI, E. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP), *Journal of Hazardous Materials*, 147, p. 1073 – 1078, 2007.

- DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (*Cocos nucifera* L.: *Arecaceae*): in health promotion and disease prevention, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4, p. 241 – 247, 2011.
- DEHVARI, M.; GHANEIAN, M. T.; EBRAHIMI, A.; JAMSHIDI, B.; MOOTAB, M. Removal of reactive blue 19 dyes from textile wastewater by pomegranate seed powder: Isotherm and kinetic studies, *International Journal of Environmental Health Engineering*, 5, p. 5, 2017.
- DIAS, M. O.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D.; BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane, *Applied energy*, 109, p. 72 – 78, 2013.
- DOS SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology, *Bioresource technology*, 98, p. 2369 – 2385, 2007.
- DOS SANTOS, J. C. C.; DA SILVA, C. H.; DOS SANTOS, C. S.; SILVA, C. D. S.; MELO, E. B.; BARROS, A. C. Analysis of growth and the radish crop evapotranspiration under different water depths, *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 9, p. 151 – 156, 2014.
- EL-GEWELY M.R. Biotechnology Annual Review, *Elsevier*, 9, p. 207, 2003.
- FAOSTAT – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2016. Fonte: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acessado em Janeiro de 2018.
- FARACO, V.; PEZZELLA, C.; MIELE, A.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes, *Biodegradation*, 20, p. 209 – 220, 2009.

- FERNÁNDEZ, O.; DÍAZ, I.; TORRES, C. F.; TOBAJAS, M.; TEJEDOR, V.; BLANCO, R. M. Hybrid composites octyl-silica-methacrylate agglomerates as enzyme supports, *Applied Catalysis A: General*, 450, p. 204 – 210, 2013.
- FORGIARINI, E.; DE SOUZA, A. A. U. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP), *Journal of Hazardous Materials*, 147, p. 1073 – 1078, 2007.
- FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas, *Química nova*, 23, p. 504 – 511, 2000.
- FRICKS, A. T.; SOUZA, D. P.; OESTREICHER, E. G.; ANTUNES, O. A.; GIRARDI, J. S.; OLIVEIRA, D.; DARIVA, C. Evaluation of radish (*Raphanus sativus L.*) peroxidase activity after high-pressure treatment with carbon dioxide, *The Journal of supercritical fluids*, 38, p. 347 – 353, 2006.
- FRICKS, A. T.; DARIVA, C.; ALVAREZ, H. M.; SANTOS, A. F.; FORTUNY, M.; QUEIROZ, M. L. B.; ANTUNES, O. A. C. Compressed propane as a new and fast method of pre-purification of radish (*Raphanus sativus L.*) peroxidase, *The Journal of Supercritical Fluids*, 54, p. 153 – 158, 2010.
- GHOLAMI-BORUJENI, F.; MAHVI, A. H.; NASERI, S.; FARAMARZI, M. A.; NABIZADEH, R.; ALIMOHAMMADI, M. Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution, *Journal of Chemical Environmental*, 15, p. 217 – 222, 2011.
- GOMES, J. A. F.; LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A. C. R.; CÂNDIDO, M. J. D.; LEMPP, B.; BOMFIM, M. A. D.; ROGÉRIO, M. C. P. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, p. 58 – 67 2009.
- GOYENECHE, R.; DI SCALA, K.; ROURA, S. Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish (*Raphanus sativus var. sativus*), *LWT-Food Science and Technology*, 54, p. 57 – 62, 2013.

- GUARATINI, C. C.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis, *Química nova*, 23, p. 71 – 78, 1999.
- GUISAN, J. M.. In: Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Immobilization of enzymes and cells, *Totowa: Humana Press*, p. 1-13, 2006.
- HAMEED, B. H.; AHMAD, A. L.; LATIFF, K. N. A. Adsorption of basic dye (methylene blue) onto activated carbon prepared from rattan sawdust, *Dyes and Pigments*, 75, p. 143 – 149, 2007.
- HAO, O. J.; KIM, H.; CHIANG, P. C. Decolorization of wastewater, *Critical reviews in environmental science and technology*, 30, p. 449 – 505, 2000.
- HIRATA, T.; IZUMI, S.; OGURA, M.; YAWATA, T. Epoxidation of styrenes with the peroxidase from the cultured cells of *Nicotiana tabacum*, *Tetrahedron*, 54, p. 15993 – 16003, 1998.
- IEMI – INTELIGÊNCIA DE MERCADO, 2014. Fonte: <http://www.iemi.com.br/press-release-iemi-lanca-relatorio-setorial-da-industria-textil-brasileira-2/> . Acessado em Dezembro de 2017.
- IQBAL, J.; IQBAL, S.; MÜLLER, C. E. Advances in immobilized enzyme microbioreactors in capillary electrophoresis, *Analyst*, 138, p. 3104 – 3116, 2013.
- IUBMB - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017. Fonte: <http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/iubmb.html>. Acessado em Maio de 2017.
- JAMAL, F.; SINGH, S.; QIDWAI, T.; SINGH, D.; PANDEY, P. K.; PANDEY, G. C.; KHAN, M. Y. Catalytic activity of soluble versus immobilized cauliflower (*Brassica oleracea*) bud peroxidase-concanavalin A complex and its application in dye color removal, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2, p. 311 – 321, 2013.
- JIANG, Y.; TANG, W.; GAO, J.; ZHOU, L.; HE, Y. Immobilization of horseradish peroxidase in phospholipid-templated titania and its applications in phenolic

compounds and dye removal, *Enzyme and microbial technology*, 55, p. 1 – 6, 2014.

KAGLIWAL, L. D.; SINGHAL, R. S. Enzyme–polysaccharide interaction: A method for improved stability of horseradish peroxidase, *International journal of biological macromolecules*, 69, p. 329 – 335, 2014.

KALSOOM, U.; BHATTI, H. N.; ASGHER, M. Characterization of plant peroxidases and their potential for degradation of dyes: a review, *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, p. 1529 – 1550, 2015.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; DE ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*, *Química Nova*, 28, p. 629, 2005.

KARIM, M. E.; DHAR, K.; HOSSAIN, M. T. Decolorization of textile reactive dyes by bacterial monoculture and consortium screened from textile dying effluent. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018.

KHARRAT, N.; ALI, Y. B.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y. T.; KARRACHÂBOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme, *Process Biochemistry*, 46, p. 1083 – 1089, 2011.

KNUTSON, K.; KIRZAN, S.; RAGAUSKAS, A. Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase, *Biotechnology letters*, 27, p. 753 – 758, 2005.

KULSHRESTHA, Y.; HUSAIN, Q. Decolorization and degradation of acid dyes mediated by salt fractionated turnip (*Brassica rapa*) peroxidases, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 89, p. 255 – 267, 2007.

KURIAN, J. K.; NAIR, G. R.; HUSSAIN, A.; RAGHAVAN, G. V. Feedstocks, logistics and pre-treatment processes for sustainable lignocellulosic biorefineries:

A comprehensive review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25, p. 205 – 219, 2013.

LOPES, M.A.J.B.M. Incorporação de lodo de esgoto e seus efeitos sobre alguns atributos do solo cultivado com rabanete (*Raphanus sativus L.*). Dissertação de Mestrado, Universidade Católica de Pernambuco, 2008.

LOPES, L. C.; BARRETO, M. T.; GONCALVES, K. M.; ALVAREZ, H. M.; HEREDIA, M. F.; DE SOUZA, R. O. M.; FRICKS, A. T. Stability and structural changes of horseradish peroxidase: Microwave versus conventional heating treatment, *Enzyme and microbial technology*, 69, p. 10 – 18, 2015.

LU, Q. L.; TANG, L. R.; WANG, S.; HUANG, B.; CHEN, Y. D.; CHEN, X. R. An investigation on the characteristics of cellulose nanocrystals from Pennisetum sinense, *Biomass and bioenergy*, 70, p. 267 – 272, 2014.

LSPA – LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, 2017.
Fonte: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201707.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201707.pdf) . Acessado em Agosto de 2017.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; SILVA, J. B.; CRUZ, L. S.; NUNES, I. L.; PEREIRA, F.; DRUZIAN, J. I. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol, *Química Nova*, 37, p. 1275 – 1282, 2014.

MACHADO, A. R. T.; DA SILVA, A. C. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e espectroscopia no UV/Vís para quantificação de corantes: agilidade e eficiência para estações de tratamentos de efluentes têxteis, *Revista produção e engenharia*, 4, p. 427 – 432, 2013.

MAHESWARI, C. U.; REDDY, K. O.; MUZENDA, E.; GUDURI, B. R.; RAJULU, A. V. Extraction and characterization of cellulose microfibrils from agricultural residue *Cocos nucifera L.*, *Biomass and bioenergy*, 46, p. 555 – 563, 2012.

- MARTINS, S. R.; DOS SANTOS, A.; FRICKS, A. T.; LIMA, Á. S.; MATTEDI, S.; SILVA, D. P.; CABRERA-PADILLA, R. Y. Protic ionic liquids influence on immobilization of Lipase *Burkholderia cepacia* on hybrid supports, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, p. 633 – 641, 2016.
- MATHEWS, S. L.; GRUNDEN, A. M.; PAWLAK, J. Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus gluconolyticus*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, p. 79 - 86, 2016.
- MEENAKUMARI, M.; PHILIP, D. Degradation of environment pollutant dyes using phytosynthesized metal nanocatalysts, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, p. 632 – 638, 2015.
- MELO, M. N.; LOPES, L. C.; DARIVA, C.; DOS SANTOS GIRARDI, J.; LUCCHESI, A. M.; ALVAREZ, H. M.; FRICKS, A. T. Bioepoxidation of isosafrol catalyzed by radish and turnip peroxidases, *African Journal of Biotechnology*, 14, p. 1074 – 1080, 2015.
- MELO, R. P. F.; NETO, E. B.; MOURA, M. C. P. A.; DANTAS, T. C.; NETO, A. D.; OLIVEIRA, H. N. M. Removal of Reactive Blue 19 using nonionic surfactant in cloud point extraction, *Separation and Purification Technology*, 138, p. 71 – 76, 2014.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, p. 119 – 134, 2012.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S.; TARDIOLI, P. W.; LC GIORDANO, R. L. C. Preparation and application of epoxy–chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment, *Reactive and Functional Polymers*, 73, p. 160 – 167, 2013.
- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept, *Progress in Energy and Combustion Science*, 38, p. 522 – 550, 2012.

- MOHAMED, S. A.; AL-MALKI, A. L.; KUMOSANI, T. A.; EL-SHISHTAWY, R. M. Horseradish peroxidase and chitosan: Activation, immobilization and comparative results, *International journal of biological macromolecules*, 60, p. 295 – 300, 2013.
- MOHAN, S. V.; PRASAD, K. K.; RAO, N. C.; SARMA, P. N. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process, *Chemosphere*, 58, p. 1097 – 1105, 2005.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, p. 77 – 93, 2013.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource technology*, 96, p. 673 – 686, 2005.
- PACHECO, S. M.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras, *Química Nova*, 37, p. 209 - 214, 2014.
- PAN, M.; GAN, X.; MEI, C.; IANG, Y. Structural analysis and transformation of biosilica during lignocellulose fractionation of rice straw, *Journal of Molecular Structure*, 1127, p. 575 – 582, 2017.
- PRATI, S.; MILOSEVIC, M.; SCIUTTO, G.; BONACINI, I.; KAZARIAN, S. G.; MAZZEO, R. Analyses of trace amounts of dyes with a new enhanced sensitivity FTIR spectroscopic technique: MU-ATR (metal underlayer ATR spectroscopy), *Analytica chimica acta*, 941, p. 67 – 79, 2016.
- PELLOSO, I. A.O.; VIEIRA, M. D. C.; ZÁRATE, N. A.H.; SANTOS, M. C. Produção e renda bruta da calêndula, alface e rabanete solteiros e consorciados com dois arranjos de plantas, *Semina: Ciências Agrárias*, 33, p. 459 – 470, 2012.

- PEREIRA, A. R.; DA COSTA, R. S.; YOKOYAMA, L.; ALHADEFF, E. M.; TEIXEIRA, L. A. C. Evaluation of textile dye degradation due to the combined action of enzyme horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, *Applied biochemistry and biotechnology*, 174, p. 2741 – 2747, 2014.
- PERES, E. C.; SLAVIERO, J. C.; CUNHA, A. M.; HOSSEINI-BANDEGHARAEI, A.; DOTTO, G. L. Microwave synthesis of silica nanoparticles and its application for methylene blue adsorption, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6, p. 649 – 659, 2017.
- PIMENTA, A. S.; DOS SANTOS, R. C.; DE OLIVEIRA CARNEIRO, A. C.; CASTRO, R. V. O. Utilização de resíduos de coco (*Cocos nucifera*) carbonizado para a produção de briquetes, *Ciência Florestal*, 25, p. 137 – 144, 2015.
- RAMANAVICIUS, A.; KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A.; MORKVENAITE-VILKONCIENE, I.; GENYS, P.; MIKHAILOVA, R.; SEMASHKO, T.; RAMANAVICIENE, A. Biofuel cell based on glucose oxidase from *Penicillium funiculosum* 46.1 and horseradish peroxidase, *Chemical Engineering Journal*, 264, p. 165 – 173, 2015.
- ROCHA, O. P.; CESILA, C. A.; CHRISTOVAM, E. M.; DE MORAES BARROS, S. B.; ZANONI, M. V. B.; DE OLIVEIRA, D. P. Ecotoxicological risk assessment of the “Acid Black 210” dye, *Toxicology*, 376, p. 113 – 119, 2017.
- RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; WEIL, P. A. *Bioquímica Ilustrada de Harper*, McGraw Hill Brasil, 2016
- SANTANA, I. A.; RIBEIRO, E. P.; IGUTI, A. M. Evaluation of green coconut (*Cocos nucifera* L.) pulp for use as milk, fat and emulsifier replacer in ice cream, *Procedia Food Science*, 1, p. 1447 – 1453, 2011.
- SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production, *Journal of Food Engineering*, 86, p. 542 – 548, 2008.

- SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. D.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol, *Química Nova*, 35, p. 1004 – 1010, 2012.
- SARTORI, R. A.; MORAIS, L. C. D.; CONSOLIN-FILHO, N.; MARQUES, D. D.; GESSNER, F. Adsorção do corante azul de metileno em partículas de argilominerais: análise dos tamanhos das partículas, *Química Nova*, 34, p. 584 – 588, 2011.
- SATAR, R.; HUSAIN, Q. Applications of Celite-adsorbed white radish (*Raphanus sativus L.*) peroxidase in batch process and continuous reactor for the degradation of reactive dyes, *Biochemical Engineering Journal*, 46, p. 96 – 104, 2009.
- SCOTTI, R.; LIMA, E. C.; BENVENUTTI, E. V.; PIATNICKI, C.; DIAS, S. L.; GUSHIKEM, Y.; KUBOTA, L. T. Azul de metileno imobilizado na celulose/TiO₂ e SiO₂/TiO₂: propriedades eletroquímicas e planejamento fatorial, *Química Nova*, 29, p. 208 – 212, 2006.
- SHALWAN, A.; YOUSIF, B. F. In state of art: mechanical and tribological behaviour of polymeric composites based on natural fibres, *Materials & Design*, 48, p. 14 – 24, 2013.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chemical Society Reviews*, 42, p. 6223 – 6235, 2013.
- SINGH, R. K.; TIWARI, M. K.; SINGH, R.; LEE, J. K. From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes, *International journal of molecular sciences*, 14, p. 1232 – 1277, 2013.
- SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes: A review, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, p. 21 – 31, 2015.

- SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; TORRES, J. A.; AMORIM, M. T. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*), *Química Nova*, 35, p. 889 – 894, 2012.
- SILVA, M. C.; TORRES, J. A.; DE SÁ, L. R. V.; CHAGAS, P. M. B.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; CORRÊA, A. D. The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89, p. 122 – 129, 2013.
- SKORONSKI, E.; FERNANDES, M.; FURIGO JÚNIOR, A.; SOARES, C. H. L.; JOÃO, J. J. Immobilization of laccase (*Aspergillus sp.*) on chitosan and its application in the bioconversion of phenols in packed bed reactors, *Química Nova*, 37, p. 215 – 220, 2014.
- TEIXEIRA, R. S. S.; PEREIRA, P. M.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Extraction and application of laccases from shimeji mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) residues in decolourisation of reactive dyes and a comparative study using commercial laccase from *Aspergillus oryzae*, *Enzyme research*, 2010.
- ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico, *Eclética Química*, 33, p. 57-62, 2008.
- VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65, p. 249 – 259, 2004.
- VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*), *Química Nova*, 26, p. 39 – 43, 2003.
- VUJČIĆ, Z.; JANOVIĆ, B.; LONČAR, N.; MARGETIĆ, A.; BOŽIĆ, N.; DOJNOV, B.; VUJČIĆ, M. Exploitation of neglected horseradish peroxidase isoenzymes for dye

- decolorization, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 97, p. 124 – 127, 2015.
- WANG, L.; BURHENNE, K.; KRISTENSEN, B. K.; RASMUSSEN, S. K. Purification and cloning of a Chinese red radish peroxidase that metabolise pelargonidin and forms a gene family in *Brassicaceae*, *Gene*, 343, p. 323 – 335, 2004.
- WANG, Y.; WANG, Z.; RUI, Y.; LI, M. Horseradish peroxidase immobilization on carbon nanodots/CoFe layered double hydroxides: direct electrochemistry and hydrogen peroxide sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 64, p. 57 – 62, 2015.
- YAGUB, M. T.; SEN, T. K.; AFROZE, S.; ANG, H. M. Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review, *Advances in colloid and interface science*, 209, p. 172 – 184, 2014.
- YE, F. X.; ZHU, R. F.; LI, Y. Deodorization of swine manure slurry using horseradish peroxidase and peroxides, *Journal of hazardous Materials*, 167, p. 148 – 153, 2009.
- YOUSEFI, V.; KARIMINIA, H. R. Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, p. 245 – 252, 2010.
- ZHANG, L.; ZHANG, Q.; LI, J. Direct electrochemistry and electrocatalysis of myoglobin covalently immobilized in mesopores cellular foams, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, p. 846 – 849, 2010.
- ZHENG, H.; ZHONG, Y.; MAO, Z.; ZHENG, L. CO₂ utilization for the waterless dyeing: Characterization and properties of Disperse Red 167 in supercritical fluid, *Journal of CO₂ Utilization*, 24, p. 266 – 273, 2018.
- ZHU, X.; ZHOU, T.; WU, X.; CAI, Y.; YAO, D.; XIE, C.; LIU, D. Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, p. 145 – 149, 2011.

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

ANEXO

Para determinação dos máximos comprimentos de onda de cada corante foram realizadas varreduras dos corantes Azul de Metileno (Catiônicos), Azul Marinho (Reativo) e Vermelho do Congo (Direto) na faixa de varredura de 300 à 800 nm. As varreduras realizadas no espectrofotômetro de varredura UV-Vis. Para os corantes AM, AZM e VC são apresentadas na Figura A, B e C.

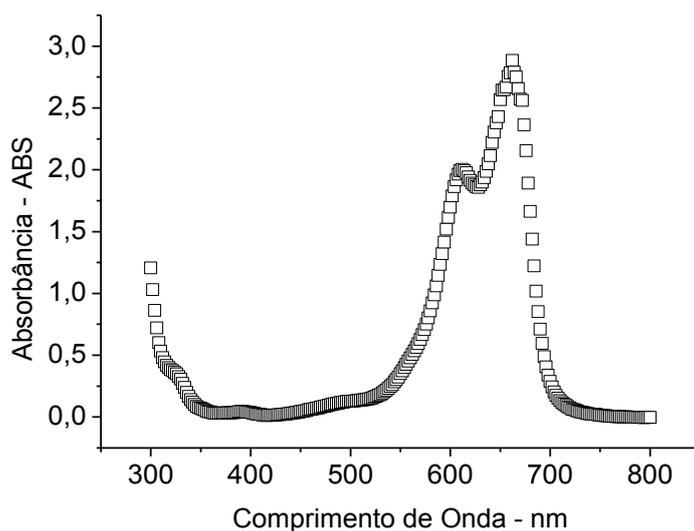


Figura A: Varredura do corante catiônico Azul de Metileno (AM □).

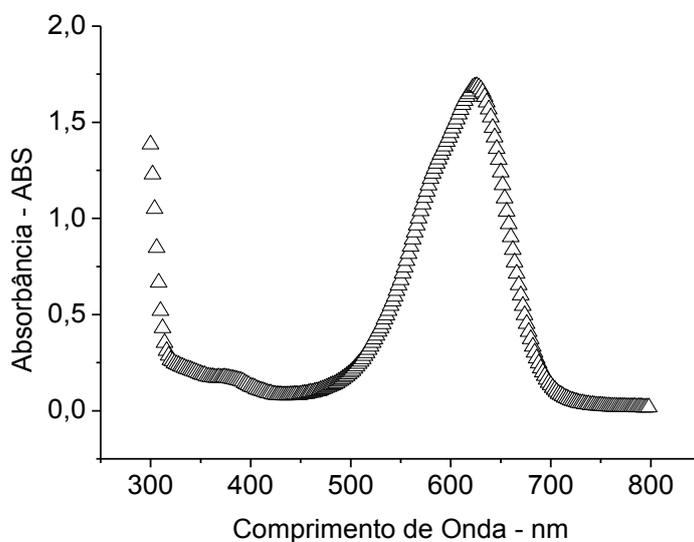


Figura B: Varredura do corante reativo Azul Marinho (AZM Δ).

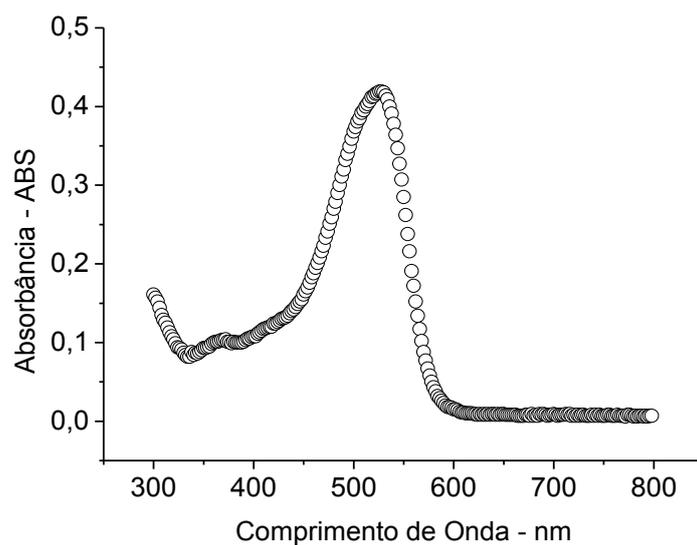


Figura C: Varredura do corante direto Vermelho do Congo (VC ○).

Os valores dos comprimentos de onda máxima absorção (λ_{\max}) foram de 660 nm, 625 nm e 527 nm para os corantes AM, AZM e VC, respectivamente. O que corrobora com a literatura (MACHADO e DA SILVA, 2013, CELEBI *et al.*, 2013 e PEREIRA *et al.*, 2014) para o AM, AZM e VC. Para o ensaios de biodegradação, foram utilizadas soluções de corante a concentração de 20 mg/L, para AM (PEREIRA *et al.*, 2014), 100 mg/L para AZM (CELEBI *et al.*, 2013) e 70 mg/L para VC (MACHADO e DA SILVA, 2013).