



DEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO POR PROCESSO ENZIMÁTICO
(PEROXIDASE DE *BRASSICA RAPA*) E BIOFILTRO ANAERÓBIO-AERÓBIO

Mairely Alfonso Almaguer

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: João Paulo Bassin

Tito Lívio Moitinho Alves

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018

DEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO POR PROCESSO ENZIMÁTICO
(PEROXIDASE DE *BRASSICA RAPA*) E BIOFILTRO ANAERÓBIO-AERÓBIO

Mairely Alfonso Almaguer

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. João Paulo Bassin, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

Prof^a. Juacyara Carbonelli Campos, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
FEVEREIRO DE 2018

Almaguer, Mairely Alfonso

Degradação de corantes azo por processo enzimático (peroxidase de *Brassica rapa*) e biofiltro anaeróbio-aeróbio/Mairely Alfonso Almaguer. –Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XVIII, 101 p.: il.; 29,7cm.

Orientadores: João Paulo Bassin

Tito Lívio Moitinho Alves

Dissertação (mestrado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 78 – 92.

1. Degradação de corantes azo. 2. Tratamentos sequenciais de processos biológico e enzimático. 3. Peroxidase de nabo (*Brassica rapa*). I. Bassin, João Paulo *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*À minha mãe, esposo e filha:
Amo muito vocês!*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que colaboraram com a realização desse trabalho. Primeiramente a minha família e de modo especial ao meu esposo e a minha filha, que estão sempre junto a mim me dando forças, e sem dúvidas, fazem parte desse sucesso.

Agradeço aos meus orientadores, os professores João Paulo Bassin e Tito Lívio Moitinho Alves, pelo apoio oferecido desde muito antes do início da pesquisa, pela disponibilidade a qualquer momento, pelas sugestões, pelo incentivo de desenvolver uma boa pesquisa e por me acompanhar no decorrer dessa trajetória.

Aos colegas do LabPol, especialmente à Natália e ao Maurício, pelo auxílio durante as análises. Também a Bruno, Haline, Reynel, Erimar, Kalina, Leonardo, Giselle, Mary e Cynthia pela ajuda e pelo nosso intercâmbio inesquecível.

Também a Sabrina, Pepe, Mônica, Aline, Isis e demais colegas de Bioprocessos.

Aos meus amigos Felipe, Marcel e Bruno, pela ajuda incondicional e sugestões.

Aos meus colegas de curso, principalmente ao Daniel, pelas conversas construtivas e pelo apoio no período de realização das matérias.

Aos professores do PEQ, por compartilharem seus conhecimentos.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos os que contribuíram de alguma forma, MINHA ETERNA GRATIDÃO!

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

DEGRADAÇÃO DE CORANTES AZO POR PROCESSO ENZIMÁTICO
(PEROXIDASE DE *BRASSICA RAPA*) E BIOFILTRO ANAERÓBIO-AERÓBIO

Mairely Alfonso Almaguer

Fevereiro/2018

Orientadores: João Paulo Bassin

Tito Lívio Moitinho Alves

Programa: Engenharia Química

Nesse trabalho, estudou-se o potencial da enzima peroxidase de nabo (*Brassica rapa*) em catalisar a descoloração dos corantes azo Crystal Ponceau 6R (CP6R) e Vermelho 239 (RR239). Os parâmetros ótimos da oxidação enzimática dos corantes CP6R e RR239 foram determinados. A enzima mostrou ser um catalisador altamente efetivo na descoloração do corante CP6R em pH 3, 4 e 5. No entanto, o pH ótimo foi de 4 para ambos os corantes. O tempo de contato ótimo para a remoção de CP6R e RR239 foi de 0,75 min e 48,3 min, respectivamente. Nas condições ótimas, obteve-se uma remoção de cor de 98% para o CP6R e de 79% para o RR239. Os resultados mostraram que o corante RR239 é muito mais resistente à degradação pela peroxidase empregada. A degradação de um efluente sintético contendo o corante RR239 por meio de tratamento sequencial biológico - enzimático (B+E) e enzimático - biológico (E+B) também foi investigada no âmbito desse trabalho. O processo enzimático foi o principal responsável pela remoção de cor, embora não tenha sido efetivo na remoção de matéria orgânica. O processo biológico (biofiltro anaeróbio-aeróbio) facilitou a remoção de DQO (reator anaeróbio) e de nitrogênio amoniacal (reator aeróbio). O tratamento sequencial B+E mostrou-se efetivo na degradação do efluente e apresentou melhor desempenho que o tratamento E+B, atingindo percentuais de remoção de cor, DQO e nitrogênio amoniacal de 94%, 90% e 98%, respectivamente.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

DEGRADATION OF AZO DYES BY TURNIP PEROXIDASE (*BRASSICA RAPA*) AND ANAEROBIC-AEROBIC TREATMENT

Mairely Alfonso Almaguer

February/2018

Advisors: João Paulo Bassin
Tito Lívio Moitinho Alves

Department: Chemical Engineering

In this study, the potential of a turnip peroxidase (*Brassica rapa*) in catalyze the degradation of the textile azo dyes Crystal Ponceau 6R (CP6R) and Reactive Red 239 (RR239) was evaluated. The optimum parameters of the enzymatic oxidation of CP6R and RR239 dyes were determined. The enzyme showed to be a highly effective catalyst in discoloration of CP6R dye at pH 3, 4 and 5. However, the optimum pH for both dyes was found to be 4. The optimal contact time for removal of CP6R and RR239 was 0.75 min and 48.3 min, respectively. Under optimal conditions, 98% color removal was achieved for CP6R and 79% for RR239. The results showed that RR239 dye is much more resistant to degradation by the used peroxidase. The degradation of a synthetic wastewater containing the RR239 dye by means of sequential biological - enzymatic (B+E) and enzymatic - biological (E+B) treatment was also investigated in this work. The enzymatic process was the main responsible for the removal of color, although it was not effective in the removal of organic matter. The biological process (anaerobic-aerobic biofilter) facilitated the removal of COD (anaerobic reactor) and ammonium (aerobic reactor). The B+E sequential treatment was effective in the degradation of the wastewater and exhibited better performance than the E+B treatment, reaching color, COD and ammonium removal percentages of 94%, 90% and 98%, respectively.

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Símbolos	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	5
2.1 Efluentes da indústria têxtil	5
2.2 Corantes	7
2.2.1 Classificação dos corantes	9
2.2.2 Crystal Ponceau 6R (CP6R)	11
2.2.3 Vermelho 239 (RR239)	11
2.3 Técnicas utilizadas na degradação de corantes	12
2.3.1 Ozonização	13
2.3.2 Processos biológicos	16
2.3.3 Processos enzimáticos	22
2.4 Remoção dos corantes azo CP6R e RR239 por diversas técnicas	32
2.5 Conclusões do capítulo e justificativa do sistema adotado	33
3 Materiais e métodos	35
3.1 Enzima	35
3.1.1 Caracterização da enzima peroxidase de nabo (<i>Brassica rapa</i>)	35
3.2 Mediador de elétrons	37
3.3 Corantes	37
3.4 Degradação enzimática empregando soluções puras de corante CP6R e RR239	37
3.4.1 Condições experimentais gerais	37

3.4.2	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max})	38
3.4.3	Teste F de Fisher	38
3.4.4	Determinação das curvas de calibração	38
3.4.5	Estudo do efeito catalisador da enzima	39
3.4.6	Determinação do pH ótimo	39
3.4.7	Determinação do tempo ótimo de contato	40
3.5	Tratamentos sequenciais empregando efluente sintético	40
3.5.1	Meio sintético	40
3.5.2	Sistema biológico anaeróbico – aeróbico	40
3.5.3	Testes preliminares enzimáticos	43
3.5.4	Tratamento sequencial biológico - enzimático (B+E)	43
3.5.5	Tratamento sequencial enzimático - biológico (E+B)	43
3.6	Parâmetros avaliados nos tratamentos sequenciais B+E e E+B. Procedimentos de cálculos	44
3.6.1	Demanda Química de Oxigênio (DQO)	44
3.6.2	Nitrogênio	46
3.6.3	Concentração de Sólidos Aderidos Totais (SAT), Fixos (SAF) e Voláteis (SAV)	47
3.6.4	pH, Temperatura e Oxigênio Dissolvido (OD)	48
3.6.5	Corante RR239	48
3.7	Frequência, regime e pontos de amostragem dos parâmetros analisados nos tratamentos sequenciais B+E e E+B	48
4	Resultados e Discussão	50
4.1	Caracterização da enzima peroxidase de nabo (<i>Brassica rapa</i>)	50
4.1.1	Atividade enzimática	50
4.2	Degradação enzimática dos corantes azo CP6R e RR239	51
4.2.1	Comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) dos corantes azo CP6R e RR239	51
4.2.2	Teste F de Fisher	53
4.2.3	Curvas de calibração	53
4.2.4	Avaliação da enzima como catalisadora da reação, utilizando o corante CP6R	53
4.2.5	pH ótimo	55
4.2.6	Tempo ótimo de contato	57
4.3	Tratamentos sequenciais B+E e E+B	59
4.3.1	Testes preliminares enzimáticos	59

4.3.2	Operação dos reatores biológicos e tratamentos sequenciais	
	B+E e E+B	61
4.3.3	Remoção de DQO	62
4.3.4	Remoção de Nitrogênio	66
4.3.5	Remoção de Amônia	68
4.3.6	Teor de Sólidos Aderidos	70
4.3.7	Remoção de corante RR239	71
5	Conclusões	75
6	Sugestões para trabalhos futuros	77
	Referências Bibliográficas	78
A	Método Bradford para dosagem de proteínas totais	93
B	Determinação da atividade específica da enzima	94
C	Determinação da concentração de sólidos (SAT, SAF e SAV)	95
D	Curva de calibração para determinar a concentração de proteínas	97
E	Curva utilizada para calcular a taxa de reação	98
F	Curvas de calibração do corante azo CP6R usando E-MEBTI	99
G	Curvas de calibração do corante azo RR239 usando E-MEBTI	100
H	Curvas de calibração do corante azo RR239 usando E-HDR2800	101

Lista de Figuras

2.1	Poluentes e resíduos gerados no processamento de tecidos.	6
2.2	Esquema geral dos mecanismos de ação do ozônio.	15
2.3	Degradação de corantes azo e aminas aromáticas no tratamento biológico anaeróbio-aeróbio combinado.	19
2.4	Mecanismo proposto para a degradação de corantes azo por azoredutases em presença de mediadores redox.	20
2.5	Representação de uma reação catalisada e não catalisada por enzima.	23
2.6	Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial, em reações catalisadas por enzimas.	26
2.7	Grupo prostético das peroxidases.	27
3.1	Esquema da reação que acontece durante a determinação da atividade específica da peroxidase.	36
3.2	Esquema da operação dos reatores biológicos (anaeróbio – aeróbio).	41
3.3	Configuração experimental (montagem dos reatores R1 e R2).	42
3.4	Vista detalhada dos reatores R1 e R2 (<i>Start-up</i>).	42
3.5	Esquema do tratamento sequencial biológico – enzimático (B+E).	44
3.6	Configuração experimental (B+E).	45
3.7	Esquema do tratamento sequencial enzimático - biológico (E+B).	45
3.8	Configuração experimental (E+B).	46
4.1	Espectro visível do corante azo CP6R para diferentes valores de pH.	51
4.2	Espectro visível do corante azo RR239 para diferentes valores de pH.	52
4.3	Detalhe da zona de λ_{max} do corante azo CP6R.	52
4.4	Detalhe da zona de λ_{max} do corante azo RR239.	52
4.5	Concentração de corante CP6R ao longo do tempo sem adição de enzima.	54
4.6	Concentração de corante CP6R ao longo do tempo com adição de enzima.	54
4.7	Efeito do pH na remoção de corante CP6R após 1 min de reação.	55
4.8	Efeito do pH na remoção de corante RR239 após 20 min de reação.	55

4.9	Taxa de reação do corante azo CP6R.	57
4.10	Taxa de reação do corante azo RR239.	57
4.11	Remoção de corante azo CP6R.	58
4.12	Remoção de corante azo RR239.	58
4.13	Concentração de corante RR239 ao longo do tempo quando aplicado o tratamento enzimático em amostras de entrada R1 e saída R2 sem ajuste do pH até valor 4 (teste sem modificação do pH).	60
4.14	Concentração de corante RR239 ao longo do tempo quando aplicado o tratamento enzimático em amostras de entrada R1 e saída R2 com ajuste do pH até valor 4 (teste com modificação do pH).	60
4.15	Valores de pH ao longo do tempo, no tratamento sequencial E+B.	62
4.16	DQO ao longo do tempo, nos regimes de <i>Start-up</i> e tratamento sequencial B+E.	63
4.17	DQO ao longo do tempo, no tratamento sequencial E+B.	64
4.18	Valores médios de remoção global de DQO, nos regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B.	64
4.19	Valores médios de nitrogênio inorgânico total e sua remoção, nos regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B.	66
4.20	Valores médios dos compostos nitrogenados (saída R2), nos regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B.	67
4.21	Concentração de amônia ao longo do tempo, nos regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B.	68
4.22	Valores médios de remoção global de amônia (sistema biológico), nos regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B.	69
4.23	Concentração de SAT, nos regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B.	71
4.24	Relação de SAV/SAT, no tratamento sequencial B+E e E+B.	72
4.25	Concentração de corante RR239 ao longo do tempo, no tratamento sequencial B+E.	72
4.26	Concentração de corante RR239 ao longo do tempo, no tratamento sequencial E+B.	73
4.27	Valores médios de remoção global de corante RR239, nos tratamentos sequenciais B+E (a) e E+B (b).	74
D.1	Curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas.	97
E.1	Curva utilizada para calcular a taxa de reação durante a determinação da atividade específica da enzima.	98

F.1	Curvas de calibração do corante CP6R para diferentes pH, usando E-MEBTI.	99
G.1	Curvas de calibração do corante RR239 para diferentes pH, usando E-MEBTI.	100
H.1	Curvas de calibração do corante RR239 para pH 4 e 7, usando E-HDR2800.	101

Lista de Tabelas

2.1	Características típicas dos resíduos do processo de tingimento têxtil . . .	6
2.2	Corantes utilizados nas indústrias têxteis e suas principais propriedades	8
2.3	Grau de fixação e perda nos efluentes de várias classes de corantes . . .	11
2.4	Vantagens e desvantagens das principais técnicas utilizadas na remoção de corantes	14
2.5	Efeito das estruturas de diferentes corantes na remoção de DQO e cor	21
2.6	Classificação da superfamília peroxidase vegetal	28
3.1	Propriedades do mediador de elétrons HOBT	37
3.2	Reagentes e concentrações utilizadas nos ensaios de descoloração . . .	38
3.3	Definição do pH ótimo para os corantes CP6R e RR239	39
3.4	Volume nominal e útil dos reatores R1 e R2	41
3.5	Parâmetros analisados, frequência, regime e pontos de amostragem . . .	49
4.1	Valores de absorvância das amostras contendo peroxidase de nabo . . .	50
4.2	Resultado do teste estatístico F de Fisher	53
4.3	Remoção de cor do corante azo CP6R em ausência e presença de enzima	54
4.4	Valores da taxa de reação e eficiências de remoção de cor dos corantes CP6R e RR239	59
4.5	Valores médios de pH em diferentes pontos de amostragem durante os regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B	61
4.6	Valores de OD utilizado em diferentes estudos	62
4.7	Valores médios de DQO em diferentes pontos de amostragem durante os regimes de <i>Start-up</i> , tratamento sequencial B+E e E+B	65
4.8	Valores médios de pH e amônia em diferentes períodos de operação do regime E+B	69
4.9	Valores de probabilidade de significância (p-value) obtidos nas comparações da concentração de SAT entre os diferentes regimes avaliados	71

Lista de Símbolos

C_0	Concentração inicial de corante, p. 39
C_e	Concentração do parâmetro na entrada , p. 46
C_s	Concentração do parâmetro na saída, p. 46
C_t	Concentração de corante no tempo t, p. 39
C	Concentração de corante, p. 39
K_m	Constante de Michaelis-Menten, p. 24
N	Número de suportes totais do reator, p. 47
$P0'$	Massa do cadinho (SAF), p. 48
$P0$	Massa do cadinho (SAT), p. 47
$P1$	Massa do cadinho contendo os suportes com a biomassa, p. 47
$P2'$	Massa do cadinho após 1h na mufla a 560°C, p. 48
$P2$	Massa do cadinho contendo os suportes limpos, p. 47
S	Concentração do substrato, p. 24
V	Volume do reator, p. 47
k_1	Constante de velocidade para a formação do complexo ES, p. 24
k_2	Constante de velocidade para a dissociação de ES, p. 24
k_3	Constante de velocidade para a formação do produto P e liberação do sítio ativo, p. 24
k	Constante de velocidade, p. 26
t	Tempo, p. 26

v	Velocidade da reação unimolecular, p. 26
v_o	Velocidade inicial da reação, p. 24
v_{max}	Velocidade máxima atingida sob condições de saturação da enzima, p. 24

Lista de Abreviaturas

AOB	Bactérias Oxidadoras de Amônia, p. 67
APG	Aquaporousgel, p. 18
CECA	Comissão Estadual de Controle Ambiental do Rio de Janeiro, p. 63
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente, p. 1
COT	Carbono Orgânico Total, p. 16
CP6R	Crystal Ponceau 6R, p. 11
CSTR	Reator de tanque agitado contínuo, p. 21
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio, p. 6
DQO	Demanda Química de Oxigênio, p. 6
E-HDR2800	Espectrofotômetro HACH DR 2800, p. 45
E-MEBTI	Espectrofotômetro de microplacas Epoch Bio Tek Instruments, p. 38
EPU	Espumas de poliuretano, p. 18
FPB	Fungos da Podridão Branca, p. 12
HOBT	1-Hidroxibenzotriazol hidrato (Mediador de elétrons), p. 28
HPLC/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, p. 32
HRP	Horsehadish peroxidase ou peroxidase de raiz-forte, p. 3
LiP	Lignina peroxidase, p. 12
MnP	Manganês peroxidase, p. 12

NOB	Bactérias Oxidadoras de Nitrito, p. 67
OCED	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, p. 22
OD	Oxigênio dissolvido, p. 48
POA	Processos Oxidativos Avançados, p. 12
RBS	Reator Batelada Sequencial, p. 17
RR239	Vermelho 239, p. 11
SAF	Sólidos Aderidos Fixos, p. 47
SAT	Sólidos Aderidos Totais, p. 47
SAV	Sólidos Aderidos Voláteis, p. 47
SST	Sólidos Suspensos Totais, p. 6
TRH	Tempo de Retenção Hidráulica, p. 17
UASB	Reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo, p. 17

Capítulo 1

Introdução

O setor têxtil desempenha um papel de grande importância na maioria dos países, destacando-se entre os segmentos de maior tradição na história da humanidade (DOS SANTOS e VEIBER, 2009).

Os corantes usados na indústria têxtil representam o maior problema do ponto de vista ambiental, uma vez que estão presentes nas águas residuárias geradas por essas indústrias. Apresentando forte coloração, esses efluentes são, em sua maioria, resistentes ao tratamento biológico convencional. Os corantes são misturas de compostos com estrutura molecular complexa, sendo, na maioria dos casos, produtos estáveis e de difícil biodegradação (DOS SANTOS e VEIBER, 2009).

Estudos indicam que cerca de 15% da produção mundial de corantes é perdida para o meio ambiente, o que representa 1,20 ton/dia (GUARATINI e ZANONI, 2000). Os principais responsáveis pela poluição das indústrias têxteis são os corantes da classe azo, que são caracterizados por conter ao menos um grupo funcional azo (-N=N-). Esses compostos têm um tempo de vida médio, na água, de 50 anos (DOS SANTOS e VEIBER, 2009).

No Brasil, não há uma legislação vigente que restrinja a concentração de corantes nos efluentes. No entanto, a Resolução No. 357/2005 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) limita a descarga deles, estabelecendo que os corantes provenientes de fontes antrópicas devem estar virtualmente ausentes.

As águas residuárias coloridas constituem uma fonte de poluição visual e provocam sérios riscos de impacto ambiental, acarretando prejuízos à biota aquática. Esse tipo de poluição afeta a atividade fotossintética nos sistemas hídricos, uma vez que os corantes absorvem e restringem a penetração da radiação solar, reduzindo o nível de oxigenação do meio. Além disso, alguns corantes têm sido identificados como substâncias bioacumulativas, tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (COGO, 2011; COSTA *et al.*, 2010; DE LIMA *et al.*, 2007).

Entre as alternativas de tratamentos para reduzir a carga poluente de efluentes coloridos, estão os processos de coagulação/floculação (LAU *et al.*, 2014;

RODRIGUES *et al.*, 2013), adsorção (DE LUNA *et al.*, 2013; WANG, 2012; ZUBAIR *et al.*, 2017) e filtração por membranas (DASGUPTA *et al.*, 2015). Os dois últimos, envolvem a transferência de poluentes de uma fase para outra, enquanto o processo de coagulação/floculação requer a disposição final do lodo gerado (SINGH *et al.*, 2015). Outra desvantagem desses métodos é o fato de apresentarem, muitas vezes, baixas eficiências de remoção de cor, além dos problemas operacionais e altos custos envolvidos (LEENA e RAJ, 2008). O processo biológico convencional é um método sustentável e efetivo para o tratamento de muitos despejos industriais (SARATALE *et al.*, 2011). No entanto, os corantes não são facilmente removíveis por meio desses processos. O tratamento biológico combinado (anaeróbio-aeróbio) tem sido eficaz na remoção de matéria orgânica de efluentes coloridos. Entretanto, a efetividade desse tratamento na remoção de cor é dependente da estrutura química e recalcitrância dos corantes, sendo muitas vezes insuficiente e requerendo um tratamento complementar.

Diante desse contexto e das exigências ambientais, novas tecnologias têm sido desenvolvidas para degradar esses poluentes recalcitrantes ou convertê-los em compostos mais facilmente biodegradáveis. Por exemplo, pode-se citar os processos oxidativos avançados (ALMEIDA *et al.*, 2004; CASTRO, 2016; ERTUGAY e ACAR, 2014) e os processos enzimáticos (AHMEDI *et al.*, 2012; HADDAJI *et al.*, 2015; PATIL e JADHAV, 2013).

Estudos de bancada e piloto mostram que o tratamento de efluentes por via enzimática pode ser uma opção viável para a biodegradação de contaminantes recalcitrantes, e um processo alternativo para o tratamento de diversos efluentes líquidos (ELY *et al.*, 2016). Em particular, enzimas da classe das oxirredutases, tais como lacases (MOHAJERSHOJAEI *et al.*, 2014; THIRUGNANASAMBANDHAM e SIVAKUMAR, 2015), azoreductases (MATE e PATHADE, 2012; SINGH *et al.*, 2015) e peroxidases (AHMEDI *et al.*, 2012; CELEBI *et al.*, 2013; SURENDIRAN e SUBRAMANI, 2016) têm sido utilizadas na degradação de corantes azo.

O uso de enzimas é atraente porque fornece a possibilidade de descolorir efluentes têxteis em temperaturas próximas àquelas do ambiente e, em alguns casos, em pH neutro (FARIAS, 2013). Além disso, elas apresentam propriedades interessantes, tais como: elevada solubilidade em águas contaminadas (AMARAL, 2011), alta seletividade e eficiência na remoção de compostos específicos, reduzida suscetibilidade à inibição por substâncias tóxicas presentes nos efluentes (HAMID, 2009), baixo requerimento de energia, e reduzido impacto sobre os ecossistemas (DURAN e ESPOSITO, 2000). As enzimas usualmente apresentam elevada especificidade pelos seus substratos e as reações ocorrem em curtos períodos de tempo, o que torna os métodos enzimáticos práticos e com menor margem de erro do que os métodos químicos (SOUSA, 2010).

Face às características mencionadas, os tratamentos oxidativos enzimáticos têm

se tornado cada vez mais atraentes. No entanto, os elevados custos de produção das enzimas dificultam seu uso generalizado em escala industrial. Nesse sentido, alguns pesquisadores têm utilizado os extratos enzimáticos brutos, ou seja, sem nenhum processo de purificação, para diminuir os custos associados ao processo (SILVA, 2011; SILVA *et al.*, 2012). Outra técnica empregada é o uso de enzimas produzidas a partir de culturas microbianas, tais como bactérias, fungos, leveduras e algas (TALARPOSHTI *et al.*, 2001), e também o uso de enzimas imobilizadas (BASTOS *et al.*, 2015).

Diversas são as fontes naturais a partir das quais pode-se obter as enzimas, dentre elas tecidos de animais, de vegetais e de microrganismos (MONTEIRO e SILVA, 2009). As peroxidases, por exemplo, podem ser obtidas a partir de fontes vegetais, tais como o tomate (PAISIO *et al.*, 2010), a batata (KURNIK *et al.*, 2015), a soja (ALI *et al.*, 2013), dentre outros. A peroxidase de raiz-forte (HRP) é amplamente utilizada e a mais popular das peroxidases. No entanto, a disponibilidade desta enzima é limitada, pois as plantas são cultivadas em países de clima frio. Além disso, são altos os requerimentos de purificação. Isso eleva os custos e inviabiliza economicamente a utilização da enzima no tratamento de efluentes em larga escala (DA SILVA *et al.*, 2011; SILVA, 2011).

Há, portanto, um interesse crescente por novas fontes de peroxidases e por processos de obtenção de baixo custo, que possibilitem a sua utilização como biocatalisador ambiental. Nabo e soja têm sido recomendados como fontes alternativas de peroxidase (ELY *et al.*, 2016). Estudos indicam eficiências de remoção superiores a 90% para alguns corantes quando são utilizadas enzimas obtidas a partir dessas fontes (AHMEDI *et al.*, 2012; ALI *et al.*, 2013). Por outro lado, recomenda-se o uso de processos combinados para aumentar a efetividade do tratamento enzimático, uma vez que as enzimas atuam apenas no grupo cromóforo da molécula de corante (FORGIARINI e DE SOUZA, 2007).

Nesse contexto, propõem-se os seguintes objetivos gerais no presente trabalho:

- ☞ Estudar o potencial da enzima peroxidase de nabo (*Brassica rapa*) em catalisar a descoloração dos corantes azo Crystal Ponceau 6R e Vermelho 239, em soluções puras de corantes;
- ☞ Investigar a degradação de um efluente sintético contendo o corante Vermelho 239 utilizando a combinação de processo biológico (biofiltro anaeróbio-aeróbio) e enzimático (peroxidase de *Brassica rapa*).

Para tanto, os objetivos específicos propostos são:

- ☞ Avaliar o efeito catalisador da peroxidase de nabo (*Brassica rapa*) na descoloração do corante Crystal Ponceau 6R;

- ∞ Determinar os parâmetros ótimos (pH e tempo de contato) para a oxidação enzimática dos corantes azo Crystal Ponceau 6R e Vermelho 239, mantendo constantes a temperatura e a concentração de corante;
- ∞ Determinar a remoção de matéria orgânica, nitrogênio amoniacal e cor de um efluente sintético contendo o corante Vermelho 239, por meio dos tratamentos sequenciais enzimático-biológico e biológico-enzimático;
- ∞ Avaliar o impacto dos produtos de oxidação enzimática no desempenho dos reatores biológicos, durante o tratamento sequencial enzimático-biológico.

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. O primeiro capítulo contém a introdução ao tema da pesquisa, além dos objetivos gerais e específicos. O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica, mostrando o estado da arte acerca dos corantes como fonte de poluição dos efluentes líquidos da indústria têxtil, alguns tratamentos utilizados na remoção de corantes, assim como uma breve abordagem teórica sobre as enzimas. Em particular, aprofunda-se nas peroxidases e em alguns fatores que afetam a sua atividade enzimática. No capítulo 3 são descritos os materiais e métodos empregados, enquanto o capítulo 4 apresenta os resultados obtidos. O capítulo 5 contém as conclusões e, por fim, as sugestões para trabalhos futuros estão descritas no capítulo 6.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Nesse capítulo é realizada uma abordagem sobre os efluentes líquidos da indústria têxtil, nos quais os corantes figuram entre os principais poluentes. Também são aprofundados alguns métodos utilizados na degradação dos corantes e a sua aplicação em processos combinados. Dar-se-á ênfase às enzimas, particularmente às peroxidases e aos fatores que influenciam a sua atividade enzimática.

2.1 Efluentes da indústria têxtil

O processamento têxtil é gerador de grande quantidade de despejos altamente poluidores, contendo elevada carga orgânica, cor acentuada e compostos químicos tóxicos. Os processos da indústria têxtil e os efluentes associados aos mesmos variam à medida que a pesquisa e o desenvolvimento produzem novos reagentes, novos processos e novas técnicas, e também de acordo com a demanda do consumo por outros tipos de tecidos e cores. Diversas operações são necessárias a fim de dar ao tecido as propriedades desejadas, gerando assim, em cada etapa, diferentes despejos (HASSEMER e SENS, 2002). A Figura 2.1 apresenta os processos básicos utilizados na preparação de tecidos, bem como os compostos descartados em cada um deles.

Como mostrado na Figura 2.1, diversos são os resíduos encontrados nos processos da indústria têxtil, em volumes e composições que variam conforme seu segmento de atuação e nível produtivo.

Assim, a composição dos efluentes gerados nestas indústrias é muito variável. Essa variabilidade depende do tipo de fibra, da classe de corante utilizado e do processo têxtil (DOS SANTOS *et al.*, 2007; LAU e ISMAIL, 2009). Na produção de algodão, ao contrário de outras fibras, são gerados resíduos altamente poluentes devido à presença de corantes reativos, os quais são recalcitrantes ao tratamento biológico convencional (HOLKAR *et al.*, 2016).

Na Tabela 2.1, observam-se os principais indicadores que caracterizam a água residuária advinda do processo de tingimento da indústria têxtil. O efluente

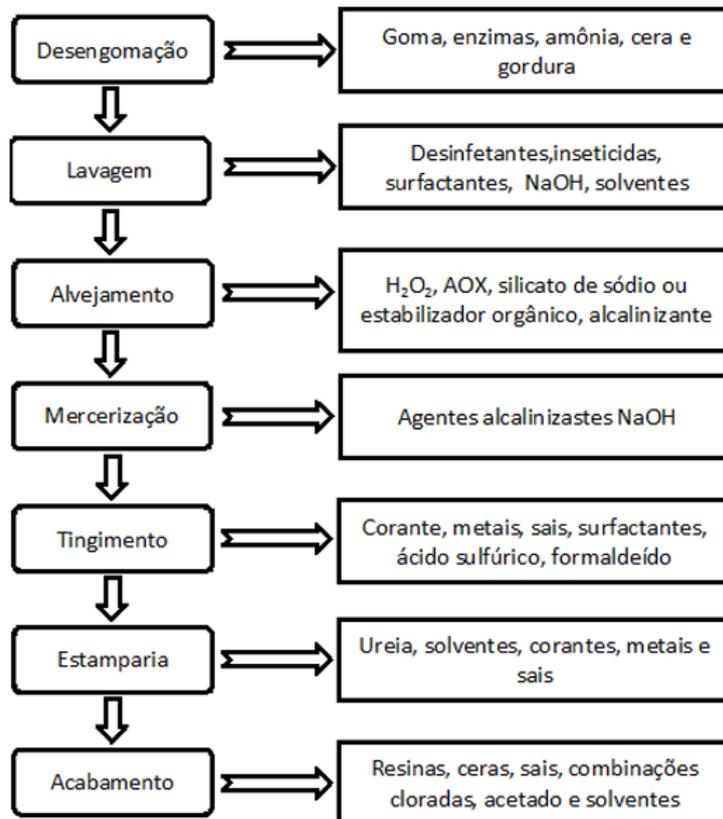


Figura 2.1: Poluentes e resíduos gerados no processamento de tecidos.

Fonte: Adaptado de (MATTIOLI *et al.*, 2002).

apresenta Demanda Química de Oxigênio (DQO) que pode variar de 50 a 5000 mg/L, o que confirma a grande variabilidade dos rejeitos deste processo. Já a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) exibe uma faixa muito mais estreita, na ordem de 200 a 300 mg/L. A partir dessas características, pode-se deduzir que o efluente têxtil apresenta baixa biodegradabilidade, já que a relação DQO/DBO média é de aproximadamente 10. Considera-se que quando a relação DQO/DBO for superior a 2, a existência de matéria orgânica não biodegradável pode inviabilizar o tratamento biológico (DEZOTTI, 2008).

Tabela 2.1: Características típicas dos resíduos do processo de tingimento têxtil

Parâmetros	Valor
Temperatura (°C)	30-80
pH (-)	2-10
DQO (mg/L)	50-5000
DBO (mg/L)	200-300
SST (mg/L)	50-500
Nitrogênio orgânico (mg/L)	18-39
Fósforo total (mg/L)	0,3-15
Cor (mg/L)	>300

Fonte: Adaptado de (LAU e ISMAIL, 2009).

De maneira geral, os efluentes dos processos de tingimento, estamparia e acabamento, são extremamente difíceis de se tratar devido ao seu elevado teor de poluentes, tais como: corantes, surfactantes, metais, solventes, entre outros (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

Os despejos líquidos destas indústrias caracterizam-se por serem altamente coloridos, devido à presença de corantes que não se fixam na fibra durante o processo de tingimento. Estima-se que aproximadamente 10-15% dos corantes utilizados no processo de tingimento são perdidos com o efluente, devido à não fixação ao tecido (SINGH *et al.*, 2015). Muitos dos corantes utilizados nestas indústrias são produzidos para serem resistentes aos produtos químicos, à luz e à degradação microbiológica (DEMARCHE *et al.*, 2012). Desta forma, eles se mantêm recalcitrantes no meio ambiente. Por isso, os corantes que são liberados sem nenhuma forma de tratamento causam muita preocupação do ponto de vista ambiental. Eles podem alterar a cor dos corpos d'água receptores, prejudicando a fotossíntese, levando à redução da concentração de oxigênio dissolvido nas águas e podendo causar a morte de organismos aquáticos. Além disso, podem causar doenças como hemorragia, náusea, ulceração e irritação severa da pele e dermatites (GHALY *et al.*, 2014).

Mesmo em pequenas concentrações, os corantes se tornam perceptíveis e causam severos danos aos corpos hídricos. Alguns deles são visíveis até em concentrações de apenas 1 mg/L (GUARATINI e ZANONI, 2000). Além disso, muitos corantes e seus subprodutos podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (COGO, 2011; COSTA *et al.*, 2010; DE LIMA *et al.*, 2007). De fato, algumas aminas aromáticas utilizadas na fabricação de corantes foram reportadas como sendo carcinogênicas (WEISBURGER, 2002). Pode-se citar, por exemplo, estudos com o corante Amarelo Metanil, testado em ratos albinos, animais nos quais foi demonstrada a toxicidade do composto (SINGH *et al.*, 2015).

2.2 Corantes

Segundo DE FREITAS (2002), os corantes são geralmente moléculas pequenas, compostas por dois grupos: um grupo chamado “cromóforo” (aceptor de elétrons), que é responsável pela cor, e um grupo funcional, que une o corante à fibra, sendo responsável pelo tingimento. Este último grupo é chamado também de “auxocromo” (doador de elétrons). Os corantes podem ser classificados tanto pelo modo de fixação nas fibras dos tecidos, quanto pela sua estrutura química. Alguns exemplos podem ser observados na Tabela 2.2, na qual estão apresentados alguns tipos de corantes encontrados nas indústrias têxteis.

Tabela 2.2: Corantes utilizados nas indústrias têxteis e suas principais propriedades

Corante	Estrutura química	Propriedades	Classificação		Referências
			Modo de fixação à fibra	Estrutura química	
Durazol Blue 2R (CI Direct Blue 71)		MM = 1029,9 g/mol $\lambda_{max} = 587 \text{ nm}$ $C_{40}H_{27}N_7Na_4O_{13}S_4$	Direto	Azo	(ERTUGAY e ACAR, 2014)
Crystal Ponceau 6R (CI Acid Red 44)		MM = 502,43 g/mol $\lambda_{max} = 509\text{-}514 \text{ nm}$ $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	Ácido	Azo	(ALI <i>et al.</i> , 2013; GLENTHAM, 2017)
Vermelho 239 (CI Reactive Red 239)		MM = 1026,37 g/mol $\lambda_{max} = 540\text{-}542 \text{ nm}$ $C_{31}H_{24}ClN_7O_{19}S_6$	Reativo	Azo	(CRISTÓVÃO, 2010; CERRON, 2015)
Orange II (CI Acid Orange 7)		MM = 350,32 g/mol $\lambda_{max} = 485 \text{ nm}$ $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S$	Ácido	Azo	(KOUSHA <i>et al.</i> , 2012; WAWRZKIEWICZ <i>et al.</i> , 2015)

2.2.1 Classificação dos corantes

Classificação quanto ao modo de fixação à fibra

Os corantes podem ser agrupados de acordo com a seguinte classificação:

Diretos: São corantes solúveis em água. Tingem diretamente as fibras de celulose (algodão, viscose, etc.) através das interações de Van der Waals. Este grupo de corantes é constituído principalmente por substâncias que contêm mais de um grupo azo (diazo, triazo, etc.) ou pré-transformados em complexos metálicos. A principal vantagem desta classe é o alto grau de eficiência da sua aplicação, que reduz o conteúdo de corante nas águas residuárias (COGO, 2011).

Ácidos: São altamente solúveis em água. Tingem diretamente as fibras proteicas e poliamídicas. O termo corante ácido corresponde a um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes corantes caracterizam-se por serem substâncias com estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, cetonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação (COGO, 2011).

Azóicos: São obtidos sinteticamente sobre as fibras no momento do tingimento, a partir da aplicação de dois compostos no material têxtil, o naftol e uma base. O naftol é um composto aromático insolúvel em água, porém pela solubilização com hidróxido de sódio, torna-se um naftolato, que fixa na celulose. Por sua vez, a base é um composto químico insolúvel em água, solubilizada por meio de nitrito de sódio e ácido clorídrico. Após a obtenção dessa base, faz-se sua montagem sobre o material têxtil naftolado. A ligação do naftol com a base produz o corante através de um processo que se denomina copulação (SILVA, 2016).

À cuba: Também chamados de corantes à tina e de redução, são insolúveis em água. Através de redução com hidrossulfito de sódio em meio alcalino, se transformam em derivados solúveis e tingem os materiais têxteis celulósicos (DE FREITAS, 2002). A maior aplicação deste tipo de corante tem sido a tintura de algodão, embora outros materiais também são utilizados devido às suas excelentes propriedades de fixação (GUARATINI e ZANONI, 2000). Como a produção química de hidrossulfito de sódio pode causar problemas ecológicos, o custo desta classe de corantes tem sido bastante alto.

Ao enxofre: São insolúveis em água. Após a montagem são oxidados convertendo-se nos corantes insolúveis originais. São ideais para fibras celulósicas na obtenção de cores intensas (castanho, azul marinho, preto). Pode ser considerado o tingimento mais ecológico sobre fibras celulósicas e suas misturas. Porém apresenta elevado consumo de água (aproximadamente 100 litros por kg de algodão), sobretudo nos processos de lavagem por transbordamento (DE FREITAS, 2002).

Dispersos: Esta classe de corantes é insolúvel em água. São aplicados em fibras

de celulose e outras fibras hidrofóbicas através de suspensão. Durante o processo de tingimento, o corante sofre hidrólise e a forma originalmente insolúvel é lentamente precipitada na forma dispersa (finamente dividido) sobre o substrato têxtil. Para sua aplicação, são necessários os agentes dispersantes, os quais facilitam o contato entre o corante e a fibra (GUARATINI e ZANONI, 2000).

Pré-Metalizados: Tingem principalmente fibras protéicas e poliamida. São caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos. A desvantagem ecológica deste tipo de corante está associada ao alto conteúdo de metal (cromo) nas águas de rejeito (GUARATINI e ZANONI, 2000).

Branqueadores: São também chamados de branqueadores ópticos ou mesmo branqueadores fluorescentes. Estes corantes apresentam grupos carboxílicos, azometino (-N=CH-) ou etilênicos (-CH=CH-) aliados a sistemas benzênicos, naftalênicos, pirênicos e anéis aromáticos que proporcionam reflexão por fluorescência na região de 430 a 440 nm quando excitados por luz ultra-violeta (GUARATINI e ZANONI, 2000). São aplicados para diminuir a aparência amarelada das fibras.

Reativos: Os corantes deste grupo possuem como característica alta solubilidade em água. No Brasil, a classe mais importante para a tintura de algodão é a dos corantes reativos, devido à sua facilidade de tingimento da fibra de algodão. Neste processo se alcançam todas as tonalidades desejadas, com bons índices de solidez. O Brasil é responsável por quase 4% do consumo mundial e sua demanda interna representa cerca de 70% da produção da indústria têxtil brasileira (GUARATINI e ZANONI, 2000).

Os corantes reativos apresentam o menor grau de fixação (50-90%) e, portanto, maior percentual de perda nos efluentes (10-50%) (Tabela 2.3). Há diversos corantes reativos, sendo que os principais contêm a função azo e antraquinona como grupo cromóforo e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos (GUARATINI e ZANONI, 2000). Cerca de 30% do mercado total de corantes é formado pelos azo-reativos (PEARCE *et al.*, 2003).

Classificação quanto à estrutura química

Segundo a estrutura química das moléculas, os corantes podem ser antraquinônicos, indigóides, xantenos, azos, etc.

Dentre todas essas classes, os corantes azo são os mais empregados, para diversos fins, representando quase dois terços de todos os corantes orgânicos (CARMEN e DANIELA, 2012). Eles são corantes sintéticos que se utilizam em diversas indústrias, tais como: têxtil, alimentícia, papel e celulose, couro e cosmética (SINGH *et al.*, 2015).

Tabela 2.3: Grau de fixação e perda nos efluentes de várias classes de corantes

Classe de corante	Grau de fixação (%)	Perda no efluente (%)
Direto	70-95	5-30
Ácido	80-95	5-20
À cuba	80-95	5-20
Ao enxofre	60-90	10-40
Disperso	90-100	0-10
Reativo	50-90	10-50

Fonte: Adaptado de (JOSHI *et al.*, 2004).

Os corantes dessa classe possuem como cromóforo o grupo azo, que pode ser identificado pela presença de uma ou mais ligações duplas entre átomos de nitrogênio (-N=N-) na molécula. Dependendo do número de ligações azo, classificam-se em: monoazo, diazo, triazo e poliazo. Esses compostos são caracterizados por grupos reativos que formam ligações covalentes com os grupamentos OH-, NH- ou SH-, presentes nas fibras de algodão, lã, seda e nylon. Eles são principalmente usados para as cores amarela, alaranjada e vermelha (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

Os corantes Crystal Ponceau 6R e Vermelho 239 são exemplos de corantes azo. Por serem os corantes de interesse nesta pesquisa, os mesmos são abordados em tópicos específicos a seguir.

2.2.2 Crystal Ponceau 6R (CP6R)

O CP6R, conhecido também como CI Acid Red 44, com referência CI 16250 (ALI *et al.*, 2013), é um corante ácido que tem na sua estrutura molecular um grupo cromóforo azo, como mostrado na Tabela 2.2. Ele é solúvel em água e ligeiramente solúvel em álcool. Esse tipo de corante é utilizado na indústria têxtil para o tingimento das fibras de algodão, lã, seda e outros materiais de origem sintéticos como o poliéster, o acrílico e o raiom (GLENTHAM, 2017). Também é empregado como corante alimentício e no campo da histologia (EL-ZOMRAWY, 2013).

2.2.3 Vermelho 239 (RR239)

O RR239, também conhecido como CI Reactive Red 239 (SANCHEZ *et al.*, 2012), é um corante azo reativo, amplamente utilizado no processo de tingimento da indústria têxtil (LIU e CHIOU, 2005). Esse composto se caracteriza por ter uma estrutura poli aromática de alta massa molar. Além disso, ele contém átomos de nitrogênio e grupos sulfonados (KARADAG *et al.*, 2007), que dificultam a quebra da molécula. Assim, os tratamentos biológicos convencionais não são muito eficientes para sua degradação. A estrutura molecular do corante RR239 e outras propriedades

podem ser observadas na Tabela 2.2.

Os corantes podem produzir efeitos maléficos que vão além da poluição visual. A alteração na penetração de luz na água devido à interação desta com o corante pode interferir nos ciclos biológicos da biota aquática. Há, portanto, a necessidade do tratamento das águas residuárias têxteis, através de processos que podem ser físicos, físico-químicos, químicos, biológicos (utilizando inúmeras culturas microbianas) e enzimáticos.

2.3 Técnicas utilizadas na degradação de corantes

Diversos são as técnicas usadas no tratamento dos efluentes da indústria têxtil para a degradação de corantes. Em geral, as indústrias têxteis no Brasil tratam seus efluentes empregando a tecnologia de lodos ativados, sendo muitas vezes necessária a aplicação de tratamentos complementares para a redução da cor (DE AMORIM *et al.*, 2009).

Métodos como a coagulação/floculação (LAU *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2013), a adsorção (DE LUNA *et al.*, 2013; WANG, 2012; ZUBAIR *et al.*, 2017) e a filtração por membranas (DASGUPTA *et al.*, 2015) conseguem remover corantes. Porém, esses métodos precisam de um pós-tratamento dos resíduos sólidos gerados ou regeneração do material adsorvente (DE AMORIM *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, a necessidade da disposição final dos sólidos (SINGH *et al.*, 2015). Em resumo, eles não resolvem essencialmente o problema, pois só transferem o corante de fase.

Por outro lado, os efluentes coloridos apresentam uma diversidade de corantes, que proporcionam uma ampla variedade de cores, dificultando a utilização de um único método de tratamento (SILVA, 2011). Além disso, alguns corantes podem sofrer biodegradação e os metabólitos formados podem ser muito mais tóxicos do que aqueles que lhe deram origem (DOS SANTOS e VEIBER, 2009).

Nesse contexto e levando em conta a eminente necessidade de melhora na qualidade dos descartes, têm surgido alternativas tecnológicas bastantes eficazes, que permitem a destruição de substâncias orgânicas de difícil degradação. Dentre esses processos alternativos encontram-se: a ozonização, os processos oxidativos avançados (POA) e os processos enzimáticos. Fungos, principalmente os da podridão branca (FPB), em combinação com tratamentos biológicos e químicos, também têm sido utilizados, mostrando-se bastante eficientes na descoloração de efluentes e corantes têxteis (KUNZ *et al.*, 2002). Nesse caso, o mecanismo de degradação do corante ocorre pela ação das enzimas ligninolíticas (Lignina peroxidase (LiP), Manganês peroxidase (MnP) e Lacase), produzidas pelos fungos (SOUZA e ROSADO, 2009).

Das diversas técnicas existentes, pode se dizer que cada uma apresenta sua própria restrição em termos de custo, viabilidade, funcionalidade, impacto ambiental, geração de lodo, necessidade de tratamentos adicionais e geração de intermediários potencialmente tóxicos. A Tabela 2.4 resume as vantagens e desvantagens dos principais métodos utilizados na remoção de corantes.

A escolha do método a ser utilizado é uma tarefa difícil em função da complexa composição dos efluentes têxteis. A melhor opção é, na maioria das vezes, a utilização de processos integrados (DE AMORIM *et al.*, 2009). A escolha de tais processos irá depender da composição do efluente, características do corante, custo, toxicidade dos produtos de degradação e futura utilização do efluente tratado (SOLÍS *et al.*, 2012).

Em geral, as técnicas que apenas transferem os poluentes de fase ou contribuem para a formação de compostos tóxicos (que não podem ser removidos por combinação com outros processos) se tornam pouco interessantes e, portanto, não são muito aceitas na prática (SILVA, 2011).

A seguir, são aprofundadas algumas técnicas que têm mostrado resultados satisfatórios na degradação de corantes usados nas indústrias têxteis. Também são apresentados exemplos da utilização dessas técnicas, assim como tratamentos sequenciais que empregam a combinação de diversos processos.

2.3.1 Ozonização

A ozonização é uma técnica de oxidação química que tem como agente oxidante o ozônio. Essa técnica tem sido sugerida na literatura como um potencial alternativo na descoloração, já que o ozônio reage facilmente com a maior parte dos corantes utilizados nas indústrias têxteis e oferece eficiência satisfatória, resultando um efluente com pouca cor.

A adição de um oxidante forte como o ozônio permite a remoção de cor de águas bastante coloridas. Essa remoção é mais ou menos intensa dependendo da dosagem de ozônio e da quantidade do material colorido (corantes) presente no despejo. A ozonização é empregada principalmente para quebrar as moléculas de corantes e produzir sua descoloração (HASSEMER e SENS, 2002).

O ozônio é produzido a partir do ar, do oxigênio puro ou da água altamente pura (BILA *et al.*, 2008). É um gás incolor e de odor característico. Em virtude de seu alto potencial de oxidação, ele é muito utilizado para aumentar o grau de biodegradabilidade de compostos orgânicos com o objetivo de remover a cor e o odor. Sua efetividade na descoloração de efluentes têxteis deve-se ao fato de que ele reage atacando as duplas ligações dos corantes que estão associadas à cor (-N=N-), permitindo uma descoloração rápida e eficaz.

Tabela 2.4: Vantagens e desvantagens das principais técnicas utilizadas na remoção de corantes

Tratamento	Técnica	Vantagens	Desvantagens
Físico	Adsorção	Alta eficiência de remoção para vários tipos de corantes	Precisa da regeneração do material adsorbente ou sua disposição. Alto custo do material adsorbente, exemplo: carvão ativado
	Filtração por membranas (MF, UF, NF, OR)	Remove todo tipo de corantes	Transfere o corante de fase. Problemas de fouling das membranas. Alto custo de investimento
Físico-químico	Coagulação/floculação	Efetivo na remoção de corantes dispersos e sulfurosos	Alta produção de lodo. Utilização de agentes químicos. Baixa eficiência de remoção para outras classes de corantes
Químico	Ozonização	Efetivo na remoção de corantes azo	Baixa eficiência de remoção em corantes dispersos e insolúveis em água. Curto tempo de vida média da molécula de ozônio (20 min). Alto custo de investimento
Biológico	POA	Processos rápidos e destrutivos	Geralmente há formação de subprodutos tóxicos
	Bactérias	Processos práticos e de baixo custo operacional	Taxas de conversão lenta e sensível ao tempo. Condições anaeróbias - Produção de aminas tóxicas
Enzimático	Fungos (FPB)	Efetivo na remoção de vários corantes. Recuperação de ambientes contaminados	Condições aeróbias - Baixa eficiência de remoção de corantes. Alto custo associado à geração de oxigênio
	Enzimas (Peroxidases, lacases, azoreductases)	Processos rápidos. Requerem baixa energia. São de fácil controle. Efetivos na remoção de corantes e outras substâncias recalitrantes	Sensibilidade às condições de cultura que podem afetar a atividade das enzimas ligninolíticas
			Altos custos de obtenção associados aos processos de isolamento e purificação. Sensibilidade à temperatura e o pH

A classe de corante utilizada tem um impacto significativo no comportamento desses compostos durante a ozonização. Dosagens razoáveis de ozônio permitem uma boa eficiência na remoção de cor para corantes ácidos, diretos, reativos e ao enxofre. Corantes dispersos são mais difíceis de remover, mesmo quando altas concentrações de ozônio são aplicadas (HASSEMER e SENS, 2002).

Na ozonização, a oxidação dos compostos orgânicos e inorgânicos pode acontecer pela ação de dois oxidantes, o ozônio molecular (O_3) e os radicais HO^\bullet (BILA *et al.*, 2008). O O_3 pode reagir diretamente com um poluente M (reação direta - RD) ou pode se decompor em radicais HO^\bullet e HO_2^\bullet , que, por sua vez, irão reagir com os poluentes (reação indireta - RI), como mostrado na Figura 2.2.

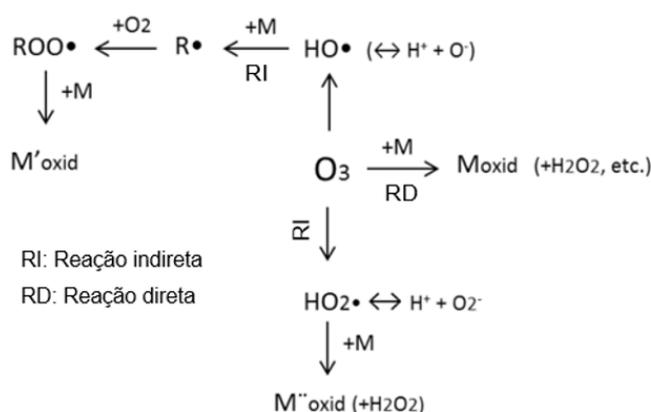


Figura 2.2: Esquema geral dos mecanismos de ação do ozônio.
 Fonte: Adaptado de (CASTRO, 2016).

As reações direta ou indireta podem ocorrer simultaneamente. Um ou outro mecanismo irá predominar dependendo das condições do meio reacional, ou seja, da temperatura, do pH e da composição química das substâncias presentes no meio (BILA *et al.*, 2008).

A reação indireta é muito mais eficiente porque o potencial de oxidação do radical hidroxila ($E_o = 2.80$ v) é mais elevado do que o do ozônio molecular ($E_o = 2.07$ v), podendo assim promover uma oxidação mais enérgica. As reações do ozônio por via direta ou molecular tendem a ser muito seletivas (ataque a centros nucleofílicos), enquanto que os radicais hidroxila não reagem seletivamente.

Uma das principais desvantagens da ozonização é o alto custo do ozônio e a limitação para a remoção de algumas classes de corantes como os dispersos e os insolúveis em água (DOS SANTOS *et al.*, 2007).

Na remoção de corantes azos, essa técnica tem sido bastante estudada, principalmente como tratamento complementar aos processos convencionais, permitindo obter resultados satisfatórios com custos relativamente razoáveis (ULSON *et al.*, 2010). Como exemplo, pode-se mencionar o estudo da remoção do corante azo Laranja Reativo 16 por combinação dos métodos ozonização e biológico

(reator de leito móvel com biofilme) realizado por CASTRO *et al.* (2016). Nessa pesquisa, a ozonização foi utilizada como pré-tratamento para a remoção de cor, obtendo-se eficiências de descoloração de 97% em 5 min para concentrações do corante na faixa entre 25 e 100 mg/L.

PUNZI *et al.* (2015) realizaram um tratamento sequencial para a remoção de matéria orgânica e cor de um efluente sintético e de um efluente real da indústria têxtil. Esses autores utilizaram a combinação de um processo biológico anaeróbio e a ozonização. O processo biológico permitiu reduzir a DQO e a cor. No entanto, a ozonização como etapa de pós-tratamento foi utilizada para degradar as amins aromáticas e outros poluentes orgânicos formados ou não removidos pelo sistema biológico. O tratamento sequencial do corante azo Remazol Red permitiu remoção de cor de 99% e redução de DQO superior a 85%.

Por outro lado, quando utilizada de forma isolada, a ozonização apresenta efetividade parcial na degradação de corantes. Isso porque os compostos não chegam a ser mineralizados completamente, ocorrendo a formação de outras substâncias mais facilmente biodegradáveis e de menor massa molar. Um estudo desenvolvido por DE MORAES *et al.* (2000) permitiu consolidar a afirmação anterior. Os autores avaliaram três alternativas para degradar um efluente têxtil. Na primeira utilizaram um tratamento por ozonização, na segunda por fotocatalise e na terceira por combinação dos dois processos (ozonização e fotocatalise). O melhor resultado se obteve quando foi utilizado o tratamento combinado, no qual se observou total descoloração e uma redução de Carbono Orgânico Total (COT) maior de 60%. No entanto, quando utilizada a ozonização de forma independente, se observou apenas 60% de remoção de cor e uma redução não significativa de COT.

2.3.2 Processos biológicos

Para o tratamento dos despejos da indústria têxtil visando à descoloração destes, têm-se utilizado os processos biológicos com inúmeras culturas microbianas. Entre as mais comuns pode-se citar as bactérias, os fungos, as leveduras e as algas (PIZATO, 2013).

Os processos biológicos utilizam diferentes tipos de reatores que diferem segundo o modo de aglomeração da biomassa, como descrito a seguir.

Classificação dos reatores segundo o modo de aglomeração da biomassa

Os reatores biológicos podem ser classificados em dois grupos: os de biomassa em suspensão e os de biomassa fixa ou imobilizada. Nos sistemas com biomassa em suspensão, o crescimento dos microrganismos ocorre em mistura com o efluente. No entanto, nos processos com biomassa imobilizada o crescimento biológico acontece

a partir da formação de biofilmes aderidos a suportes (NOGUEIRA, 2013).

Os reatores com biomassa fixa são de grande interesse porque oferecem condições de adaptação a organismos que apresentam velocidades de crescimento reduzidas. Além disso, permitem obter altas velocidades de remoção dos poluentes (BASSIN e DEZOTTI, 2008). Este fato é fundamental para desenvolver os microrganismos anaeróbios, os quais são de crescimento lento.

Contudo, tem-se utilizado tanto reatores de biomassa em suspensão quanto de biomassa imobilizada no tratamento anaeróbio de efluentes da indústria têxtil. Podem-se mencionar, por exemplo, as seguintes tecnologias: reator de leito fluidizado (AYED *et al.*, 2011), reator batelada sequencial (RBS) (BONAKDARPOUR *et al.*, 2011; TOMEI *et al.*, 2016), reator anaeróbio de fluxo ascendente com manta de lodo (UASB) (AMARAL, 2015) e reatores de leito fixo (ATHALATHIL *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2009; ENAYATZAMIR *et al.*, 2009).

Reatores de leito fixo

Os reatores de leito fixo, como seu nome indica, são dotados de um leito fixo completamente submerso. Esses reatores também são conhecidos pelo nome de biofiltros ou filtros biológicos submersos, os quais podem ser do tipo aeróbio ou anaeróbio.

Os reatores de leito fixo são caracterizados pela presença de um leito reacional empacotado estacionário, onde a biomassa permanece aderida na superfície do material suporte ou mantida entre os interstícios do leito. No reator, a massa de microrganismos degrada o substrato presente no efluente que permeia o leito (BASSIN e DEZOTTI, 2008).

Nesses reatores, o escoamento do fluido pode ser ascendente ou descendente, sendo que o primeiro é o mais usual (BASSIN e DEZOTTI, 2008). A principal desvantagem dos filtros de fluxo ascendente é o acúmulo de biomassa no fundo dos reatores, podendo levar ao entupimento ou formação de zonas mortas (ARAÚJO, 2014). Esse problema de colmatção do leito é agravado quando se trabalha com águas residuárias contendo grande quantidade de material particulado. Assim, as retrolavagens periódicas do leito, tornam-se necessárias. O uso de novas tecnologias de material suporte também tem auxiliado na diminuição dessa dificuldade e na possibilidade de aplicar maiores cargas orgânicas (BASSIN e DEZOTTI, 2008).

Outra desvantagem desses sistemas é a necessidade de uma distribuição uniforme da corrente de entrada, pois do contrário é favorecida a formação de caminhos preferenciais, diminuindo assim o Tempo de Retenção Hidráulica (TRH) no leito (RUSTEN *et al.*, 2006).

Embora os biofiltros submersos sejam considerados de difícil operação por conta dos problemas de entupimento, perda de carga e formação de caminhos preferenciais

(RUSTEN *et al.*, 2006), esses reatores também apresentam grandes vantagens.

Uma das vantagens que têm sido reportadas com a sua utilização é a compacidade das estações de tratamento, o que possibilita baixos custos de implantação, operação e manutenção. Além disso, possuem baixa produção de lodo e elevadas concentrações de biomassa ativa no seu interior, mesmo sem recirculação de lodo, gerando várias facilidades operacionais. Por outro lado, a biomassa aderida ao recheio aumenta o tempo de retenção dos sólidos (ou idade do lodo), tornando o sistema mais resistente a choques de cargas hidráulica e orgânica (GONÇALVES *et al.*, 2001). Desse modo, os biofiltros se constituem numa opção de tratamento recomendada por diversos autores (GONÇALVES *et al.*, 1993; PEREIRA, 2008).

Suportes utilizados para a imobilização da biomassa

Diferentes tipos de materiais podem ser empregados nos reatores de leito fixo, tais como: argila expandida, pedras, enchimentos plásticos, espumas de poliuretano, dentre outros. Independentemente do material escolhido, eles devem propiciar uma alta área de contato entre os microrganismos e o efluente (NOGUEIRA, 2013).

Estudos realizados demonstram que as espumas de poliuretano (EPU) são um excelente suporte para a adesão da biomassa (GUO *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2011). Estes suportes se caracterizam por ter uma alta porosidade, facilitando a retenção da biomassa e apresentam baixo custo (ARAUJO, 2014).

Existem ainda outros suportes com excelentes propriedades. Por exemplo, o Aquaporousgel (APG), que se caracteriza por afundar completamente na água em contraste às EPU, além de ter um tempo de vida útil maior. O APG é uma esponja com uma estrutura própria, de parede porosa. Essa estrutura incha na água, fornecendo elevadas propriedades hidrofílicas ao material. O suporte foi concebido e desenvolvido como um meio de imobilização de microrganismos para o tratamento de águas residuárias no Japão e tem sido utilizado em indústrias de alimentos e corantes. Tem-se comprovado boas eficiências de remoção de matéria orgânica com o emprego do APG. Conforme dados reportados pelo fabricante, uma eficiência de 85% na remoção de DBO e 44% na remoção de DQO tem sido obtida em águas residuárias de processos de tingimento (NISSHINBO, 2017). Um estudo desenvolvido por WANG *et al.* (2017), comparou 4 tipos de suportes para remover o composto 1,1,1-Tricloroetano de águas subterrâneas contaminadas. O APG apresentou maior retenção de sólidos quando comparado com outros tipos de suportes, inclusive quando comparado com EPU. A eficiência de remoção do composto também foi superior quando utilizou-se o APG.

Degradação de corantes por processo biológico (anaeróbio-aeróbio)

A aplicação de microrganismos para a biodegradação de corantes é um método atraente de simples operação. Apesar disso, os processos biológicos podem ser extremamente complexos devido à diversidade, concentração e composição das espécies químicas presentes em cada efluente (KUNZ *et al.*, 2002).

No trabalho de DOS SANTOS *et al.* (2007) foi demonstrado que os microrganismos são capazes de degradar corantes da classe azo em condições anaeróbias, com a formação de aminas aromáticas que posteriormente são degradadas na presença de oxigênio.

Em condições aeróbias, baixa eficiência de remoção de corantes é reportada, uma vez que o oxigênio é um acceptor de elétrons muito mais forte que o grupo cromóforo da molécula de corante (SINGH *et al.*, 2015). Assim, a degradação de corantes azo geralmente acontece em dois estágios (Figura 2.3). Inicialmente, sob condições anaeróbias, ocorre a descoloração redutiva do corante na presença de um co-substrato, sendo requeridos 4 elétrons para a quebra de cada ligação azo. Em seguida, sob condições aeróbias, as aminas aromáticas são mineralizadas, por oxidação, resultando em compostos nitrogenados, água e gás carbônico (AMARAL, 2015).

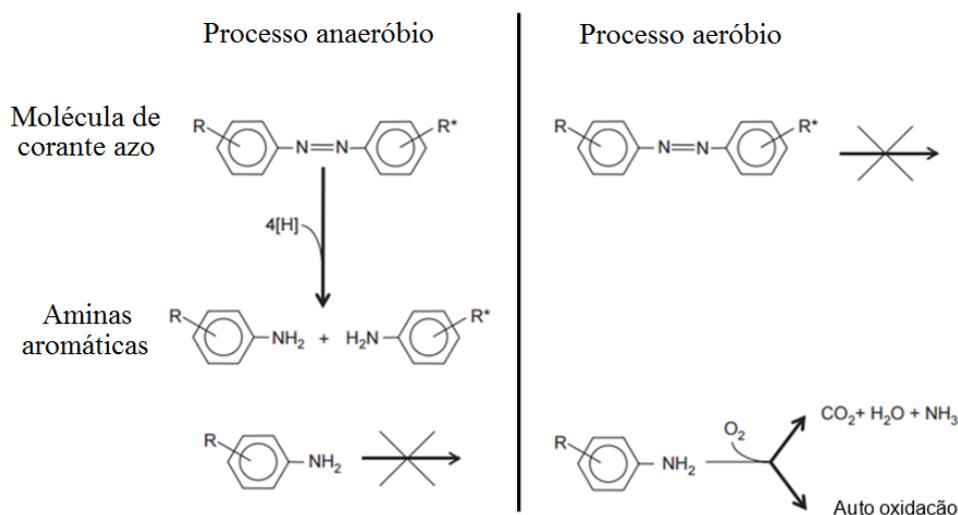


Figura 2.3: Degradação de corantes azo e aminas aromáticas no tratamento biológico anaeróbio-aeróbio combinado.

Fonte: Adaptado de (VAN DER ZEE e VILLAVARDE, 2005).

Aminas aromáticas são produzidas como compostos intermediários da degradação anaeróbia de corantes azo e são conhecidas por apresentarem toxicidade igual ou superior à dos corantes que lhes deram origem. Além disso, muitas aminas são cancerígenas (DOS SANTOS *et al.*, 2007). Sendo assim, é extremamente importante que a etapa aeróbia seja realizada.

A degradação dos corantes azo ocorre pela ação de enzimas azoredutases. Sugere-se que os elétrons produzidos pela oxidação de substratos auxiliares são transferidos ao corante, pela ação destas enzimas. O corante age como acceptor de elétrons, sendo reduzido e, conseqüentemente, é produzida a quebra da ligação azo em aminas aromáticas (PEARCE *et al.*, 2003; YOO *et al.*, 2001). A transferência de elétrons pode acontecer por via enzimática direta ou indireta (pela ação de mediadores redox), como representado na Figura 2.4. Nessa última via, os mediadores podem ser produzidos durante o metabolismo celular de certos substratos ou adicionados ao sistema (SINGH *et al.*, 2015).

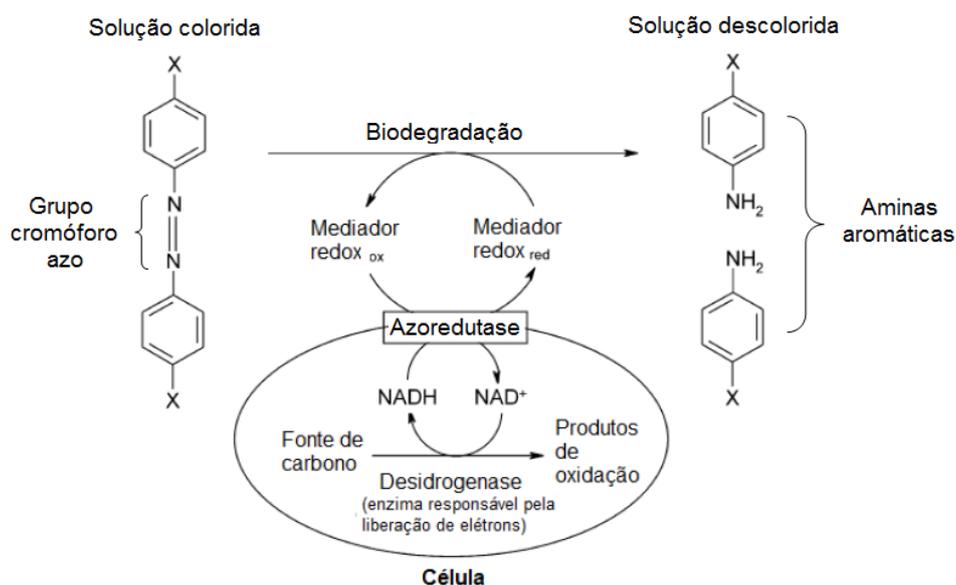


Figura 2.4: Mecanismo proposto para a degradação de corantes azo por azoredutases em presença de mediadores redox.

Fonte: Adaptado de (CASTRO, 2016).

As azoredutases catalisam a redução da ligação azo tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (CHENGALROYEN e DABBS, 2013). Porém, para que as enzimas sejam produzidas em sistemas aeróbios, um longo período de adaptação na presença de uma substância azo simples é requerido. Desta forma, a azoredutase produzida poderá remover só o composto específico que lhe deu origem. Por outro lado, em sistemas anaeróbios, o processo é não específico, ou seja, qualquer corante azo adicionado pode ser removido, com maior ou menor eficiência, dependendo da estrutura molecular e das condições de operação utilizadas. Com isso, processos anaeróbios são mais utilizados do que os aeróbios (PEARCE *et al.*, 2003).

A combinação do processo anaeróbio seguido de aeróbio para o tratamento de efluentes contendo corantes tem propiciado bons resultados em alguns estudos conduzidos com efluentes sintéticos e/ou reais (SARATALE *et al.*, 2011; VAN DER ZEE e VILLAVERDE, 2005). No entanto, alcançar boas eficiências no tratamento depende das características do efluente a ser tratado e das condições

operacionais do sistema.

FRIJTERS *et al.* (2006) reportaram eficiências de remoção de cor entre 80-95% utilizando um tratamento sequencial anaeróbio-aeróbio. Os autores destacaram que o principal responsável pela descoloração do efluente têxtil foi o biorreator anaeróbio de leito fluidizado.

Também foi investigado o tratamento combinado anaeróbio-aeróbio para remover o corante azo Vermelho do Congo (BARBOSA *et al.*, 2009). Nesse estudo, o reator aeróbio foi inoculado com a espécie fúngica *Aspergillus niger AN400*. A capacidade dos fungos em remover corantes azo se relaciona ao fato desses microrganismos secretarem enzimas que agem para a ruptura dos grupamentos das ligações azo (JIN *et al.*, 2007). Na pesquisa foram utilizados reatores de leito fixo com escoamento ascendente e EPU como suporte do leito. O efluente sintético tinha uma concentração de corante de 12 ± 4 mg/L e uma DQO bruta de 577 ± 113 mg/L. O tratamento sequencial anaeróbio-aeróbio do corante estudado não apresentou eficiências muito elevadas, principalmente quanto à remoção de cor. No primeiro reator obteve-se remoção de cor de 63% e remoção de matéria orgânica de 71%, para um TRH de 8h. No segundo reator as eficiências foram similares, 53% e 72% para cor e matéria orgânica, respectivamente, no mesmo TRH.

DA SILVA *et al.* (2012) também estudaram a remoção de cor e DQO, dessa vez de um efluente sintético contendo corante Reactive Black 5. Os autores utilizaram um reator do tipo UASB seguido de um RBS aeróbio com um TRH de 12h e 24 h, respectivamente. Após o tratamento sequencial, se obteve uma remoção de 75% de cor e 88% de matéria orgânica.

LUANGDILOK e PANSWAD (2000) utilizaram um RBS aneróbio-aeróbio com um TRH de 18h e 5h, respectivamente. Uma concentração de 100 mg/L foi usada no tratamento de diferentes estruturas de corantes. Os resultados obtidos após o tratamento mostraram que o tipo de corante influenciou na remoção de cor, embora não tenha afetado a remoção de DQO significativamente (Tabela 2.5).

Tabela 2.5: Efeito das estruturas de diferentes corantes na remoção de DQO e cor

Corante	Estrutura	Remoção	
		DQO (%)	Cor (%)
Reactive Black 5	Azo	93	58
Reactive Blue 5	Antraquinônico	91	41
Reactive Blue 198	Oxazine	92	11

Um sistema de reatores sequenciais do tipo UASB e reator de tanque agitado contínuo (CSTR) foi utilizado para tratar o corante azo CI Direct Red 28. A maior remoção de corante e matéria orgânica observou-se via anaeróbia, resultando em alta produção de gás metano. No sistema também foi encontrada uma remoção de

nitrogênio amoniacal de 74% e uma concentração de nitrato de 26 mg/L no final do tratamento (SPONZA e IŞIK, 2005).

O estudo anterior permitiu demonstrar que não só a remoção de cor e poluentes biodegradáveis pode ser obtida no tratamento de efluentes coloridos. Os nutrientes, particularmente amônia, podem ser removidos na fase aeróbia. O problema fundamental surge quando altas concentrações de nitrato ou nitrito são obtidas durante a conversão de amônia a outros compostos nitrogenados. Nesse caso, um tratamento complementar deve ser efetuado, afim de reduzir o conteúdo de nitrogênio a níveis adequados ou mesmo remover completamente os compostos.

Por outro lado, alguns estudos reportaram baixas eficiências de remoção de nitrogênio amoniacal. Por exemplo, MURALI *et al.* (2013) obtiveram eficiências de remoção do nutriente entre 13-25% em um reator anaeróbio-aeróbio. Nesse trabalho também foi comprovado que um aumento da concentração do corante azo Alaranjado de metila reflete em queda da eficiência. Alguns autores referem que a presença de corantes azo inibe as bactérias oxidadoras de amônia (MARTIN *et al.*, 2005; TOPAÇ *et al.*, 2009)

Outro aspecto importante na remoção de nitrogênio amoniacal nos reatores aeróbios é o fato das bactérias autotróficas nitrificantes apresentarem crescimento mais lento do que as heterotróficas. Se no reator anaeróbio não é removida a maior parte da matéria orgânica, os microrganismos heterotróficos podem se desenvolver no reator aeróbio e dificultar o processo de nitrificação, resultando em baixas taxas de remoção de amônia (SUGUMAR e SADANANDANL, 2010).

2.3.3 Processos enzimáticos

Nas últimas décadas o desenvolvimento de alternativas biotecnológicas para a remediação de poluentes específicos vem sendo objeto de inúmeros trabalhos (FORGIARINI, 2006). O uso de enzimas é cada vez mais reconhecido. A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCED), constituída em 1961, reconhece a tecnologia enzimática como um importante componente de desenvolvimento industrial sustentável (CARDOSO *et al.*, 2009).

Pelo protagonismo das enzimas nos processos oxidativos enzimáticos, apresenta-se a seguir uma abordagem dos seus fundamentos básicos. Dar-se-á ênfase às peroxidases e aos fatores que influenciam a atividade enzimática.

Fundamentos básicos das enzimas

As enzimas são proteínas que têm como função acelerar as reações químicas que ocorrem sob condições termodinâmicas não favoráveis. Elas aceleram consideravelmente a velocidade das reações químicas em sistemas biológicos (por

diminuição da energia de ativação requerida), quando comparadas com as reações não catalisadas (Figura 2.5).

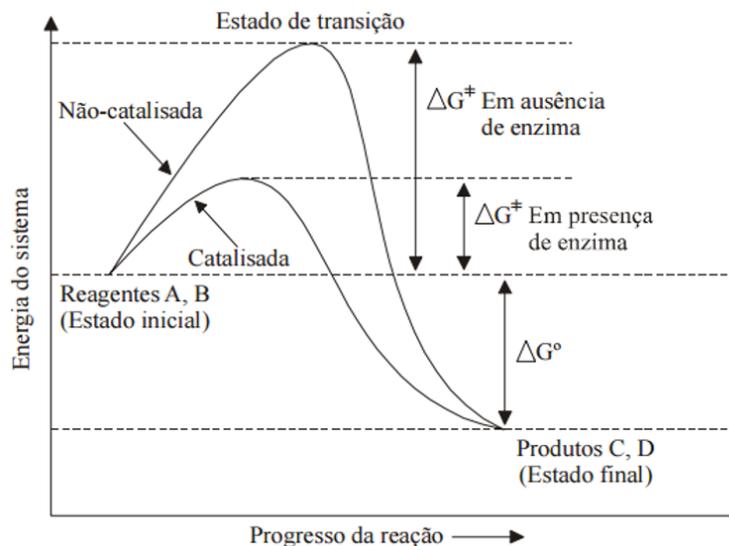


Figura 2.5: Representação de uma reação catalisada e não catalisada por enzima.
Fonte: Adaptado de (MOTTA, 2006).

A velocidade de uma reação é inversamente proporcional ao valor de sua energia livre de ativação (ΔG^\ddagger). Assim, quanto menor for o valor de ΔG^\ddagger , maior será a velocidade da reação. Estima-se que a velocidade de uma reação química catalisada por enzima pode aumentar na ordem de 10^6 a 10^{12} vezes em relação à reação correspondente não catalisada (MOTTA, 2006).

As enzimas são as biomoléculas mais notáveis que se tem conhecimento devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico (MELO, 2009). A ação catalítica delas é extremamente seletiva e eficiente quando comparada com a ação dos catalisadores químicos convencionais. Isto possibilita a sua atuação em uma grande variedade de processos químicos sob condições reacionais diversas. Por isso, são muito utilizadas no tratamento de poluentes específicos, como, por exemplo, na remoção de compostos recalcitrantes ou transformação em outros produtos de mais fácil degradação (DURAN e ESPOSITO, 2000).

A especificidade enzimática se baseia nas interações entre a molécula do substrato e o sítio ativo da enzima. Essas interações não covalentes podem ser: eletrostáticas, por ligações de hidrogênio, hidrofóbicas e de Van der Waals (MOTTA, 2006). É necessário que várias delas aconteçam simultaneamente para promover o processo reacional.

O mecanismo de atuação se inicia quando um determinado substrato (S) se liga ao sítio ativo de uma enzima (E). Nessa interação, é formado um complexo enzima-substrato (ES) que logo se desfaz. Durante o estado de transição, o substrato é convertido em produto (P) e após um breve período de tempo o produto se dissocia

da enzima (FARIAS, 2013). Na Equação 2.1, é apresentado o modelo simplificado para uma molécula de substrato.



Onde:

k_1 , é a constante de velocidade para a formação do complexo ES;

k_2 , é a constante de velocidade para a dissociação de ES;

k_3 , é a constante de velocidade para a formação do produto P e liberação do sítio ativo.

Assim que ocorre a reação química e liberam-se os produtos, a enzima volta a atrair novos substratos para a formação de outros complexos.

A teoria geral da ação e cinética enzimática foi postulada por MENTEN e MICHAELIS (1913). A relação quantitativa entre a velocidade da reação enzimática e a concentração do substrato pode ser definida pela Equação 2.2, a qual relaciona a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima com a concentração do substrato e denomina-se, equação de Michaelis-Menten.

$$v_o = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.2)$$

Onde:

v_o , é a velocidade inicial da reação;

K_m , é a constante de Michaelis-Menten;

v_{max} , é a velocidade máxima atingida sob condições de saturação da enzima;

S , é a concentração do substrato.

Um fator importante na catálise enzimática é a inibição das enzimas. As mesmas podem ser inibidas por substâncias que se ligam à enzima livre ou ao complexo ES, ou competem pelo sítio catalítico da enzima. O resultado final é uma diminuição ou interrupção da atividade enzimática (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Na inibição competitiva, o inibidor se liga à enzima livre e impede a sua ligação ao seu substrato. Neste caso, o substrato e o inibidor possuem semelhanças estruturais. Existe também a inibição incompetitiva, onde o inibidor não se liga à enzima no estado livre, mas sim ao complexo ES e neste caso o complexo fica inativo. Ainda existem casos onde os dois tipos de inibição podem ocorrer ao mesmo tempo, chamada de inibição mista (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Fatores que influenciam a atividade enzimática

Vários fatores influenciam a atividade enzimática, entre eles destacam-se: a temperatura, o pH, a concentração do substrato, a concentração da enzima e o tempo de contato dos componentes reacionais (MOTTA, 2006). A seguir alguns fatores são abordados.

Temperatura

Na maioria das reações catalisadas por enzimas, um aumento na temperatura produz uma maior velocidade de reação. A velocidade aumenta devido ao aumento da energia cinética das moléculas participantes da reação. Toda enzima apresenta uma temperatura ótima, na qual atua com máxima eficiência. Acima desse valor, a atividade das enzimas declina devido à desnaturação proteica (MOTTA, 2006). Em geral, a maioria das enzimas apresentam um desempenho melhor entre 30-70°C (COSTA, 2016).

Um estudo do efeito da temperatura, realizado por DA SILVA *et al.* (2011), determinou a estabilidade da peroxidase de nabo em temperaturas até 40°C. Temperaturas superiores levaram a uma diminuição da atividade e eficiência enzimática.

Por outro lado, em condições de hipotermia a atividade enzimática se torna muito baixa (MOTTA, 2006).

pH

Um efeito similar à temperatura acontece com o pH. Valores extremos (altos ou baixos) podem provocar a desnaturação da enzima e modificar sua atividade. Por isso, é recomendado trabalhar no pH ótimo, valor no qual a atividade da enzima é máxima (COSTA, 2016).

Além disso, os substratos também podem ser afetados. Se um substrato contém um grupo ionizável, as mudanças no pH podem afetar a capacidade de ligação deste no sítio ativo da enzima. Alterações nos grupos ionizáveis também podem modificar a estrutura terciária dos biocatalisadores (MOTTA, 2006).

Concentração do substrato

O efeito da concentração do substrato na velocidade da reação enzimática é esquematizado na Figura 2.6.

Observa-se que as reações catalisadas por enzimas exibem cinéticas de saturação. Em baixas concentrações do substrato, a velocidade inicial da reação é diretamente proporcional à concentração do substrato, sendo considerada uma reação cinética de primeira ordem.

Em uma reação unimolecular do tipo $S \rightarrow P$, a cinética de primeira ordem é representada pela Equação 2.3.

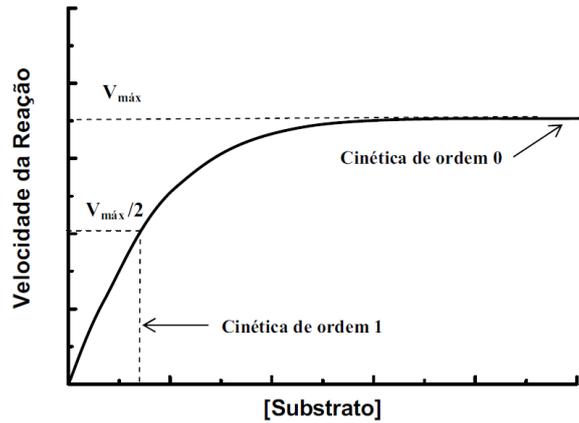


Figura 2.6: Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade inicial, em reações catalisadas por enzimas.

Fonte: Adaptado de (MELO, 2009).

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k[S] \quad (2.3)$$

Onde:

v , é a velocidade da reação unimolecular;

t , é o tempo;

k , é a constante de velocidade.

Nota-se na Figura 2.6 que, à medida que aumenta a concentração do substrato, a velocidade inicial é reduzida e a ordem da reação situa-se entre 0 e 1.

Já quando as concentrações do substrato são mais elevadas, a velocidade torna-se independente da concentração deste, se mantendo praticamente constante. Ou seja, um aumento da concentração de substrato não produz efeito considerável na velocidade da reação. Nesse caso, a quantidade do reagente (substrato) é suficientemente grande para saturar todos os sítios ativos das moléculas enzimáticas. Nessas condições a reação é considerada de ordem zero (Equação 2.4) e a enzima encontra-se saturada pelo substrato.

$$v = k[S]^0 = k \quad (2.4)$$

Cada enzima é classificada de acordo com o tipo de reação que catalisa. Existem seis tipos de categorias enzimáticas: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (FARIAS, 2013). As enzimas oxidoredutases catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxidação-redução (DOS SANTOS e VEIBER, 2009). Dentre as oxidoredutases se encontram as peroxidases, as quais apresentam grande potencial para descolorir corantes azo.

Peroxidasas

As enzimas peroxidases podem ser classificadas de acordo com a presença ou ausência de um grupo heme, como hemicas ou não hemicas. As peroxidases hemicas são heme proteínas que catalisam a oxidação de uma ampla variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (MOELLER *et al.*, 2013). Para isso, utilizam a capacidade dos peróxidos, como o peróxido de hidrogênio, que é um agente oxidante.

Elas possuem uma parte proteica (apoenzima) e o grupo prostético ferriprotoporfirina IX (tipo heme) que contém o cofator Fe^{3+} ligado fortemente ao sítio ativo da enzima (Figura 2.7).

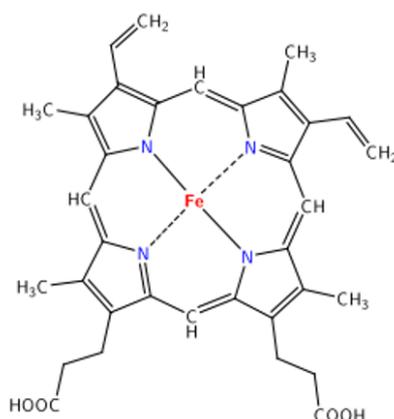
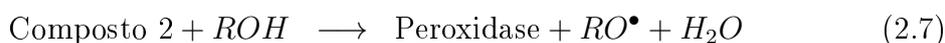


Figura 2.7: Grupo prostético das peroxidases.
Fonte: Adaptado de (FORGIARINI, 2006).

O grupo prostético é quem promove a doação de elétrons na reação de oxidação dos substratos aromáticos (FARIAS, 2013).

As etapas do ciclo catalítico destas enzimas podem ser expressas pelo seguinte conjunto de equações:

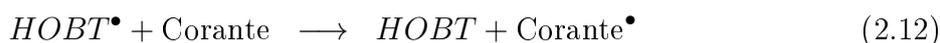


Na primeira etapa (Equação 2.5), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) oxida a enzima peroxidase nativa (Fe^{3+}). Nesta reação, o H_2O_2 é reduzido e são formados o Composto 1 ($\text{Fe}^{4+}\text{-R}^\bullet$) e água. Posteriormente (Equação 2.6), o Composto 1 oxida uma molécula de substrato, gerando o substrato radicalar RO^\bullet e o Composto 2 (Fe^{4+}). O Composto 2 (Equação 2.7) reage com uma segunda molécula de substrato, fazendo com que a enzima retorne a seu estado nativo (estado reduzido Fe^{3+}) e

liberando um segundo substrato radicalar (RO^\bullet). Por outro lado, a Equação 2.8 ocorre quando há inibição da enzima por excesso de H_2O_2 . Nesse caso, o composto 3 é uma forma reversivelmente inativa da enzima (ELY *et al.*, 2016).

Segundo MOELLER *et al.* (2013), os radicais livres formados podem se juntar e formar cadeias de polímeros com baixa solubilidade e assim precipitar na solução.

As reações envolvidas na degradação de corantes através de enzimas poderiam ser muito mais complexas do que um conjunto de reações catalíticas enzimáticas. Alguns autores propõem diversos mecanismos na tentativa de representar essas reações. ALI *et al.* (2013) propuseram um mecanismo quando utilizado o mediador de elétrons 1-Hidroxibenzotriazol hidrato (HOBT). Nesse mecanismo, acoplam-se tanto reações enzimáticas (Equações 2.9 a 2.11) quanto química (Equação 2.12), como apresentado a seguir:



No conjunto de reações destaca-se a presença do radical HOBT^\bullet reagindo com a molécula de corante (Equação 2.12). Além disso, observa-se a regeneração da peroxidase nativa (Equação 2.11) e do mediador de elétrons (Equação 2.12).

As peroxidases se encontram distribuídas no reino vegetal, nos tecidos animais e nos microrganismos (MOELLER *et al.*, 2013). Podem ser classificadas em três superfamílias: peroxidase vegetal, peroxidase animal e catalase peroxidase. A Tabela 2.6 apresenta as distintas classificações da superfamília peroxidase vegetal.

Tabela 2.6: Classificação da superfamília peroxidase vegetal

Classes	Exemplos
I. Peroxidases intracelulares	Citocromo C peroxidase (CCP) Ascorbato peroxidase (APX) Catalase-peroxidases de bactérias
II. Peroxidases secretadas por fungos	LiP MnP
III. Peroxidases secretadas por plantas	HRP Peroxidase de soja, nabo, cevada, etc

Fonte: Adaptado de (GONZALEZ, 2010).

As peroxidases são utilizadas na indústria química, farmacêutica e biotecnológica. Também são muito empregadas no tratamento ambiental, sendo efetivas na remoção de uma ampla variedade de compostos orgânicos como fenóis, anilinas, e corantes. (FORGIARINI e DE SOUZA, 2007). Elas catalisam a

transformação/degradação de corantes azos, tanto por precipitação quanto pela ruptura do anel aromático (DA SILVA *et al.*, 2011).

A aplicação de enzimas no tratamento de efluentes foi proposta pela primeira vez em 1930. Porém, a sua utilização para remover poluentes químicos específicos só foi desenvolvida no ano 1976 (DEMARCHE *et al.*, 2012).

Os efluentes reais da indústria têxtil são muito versáteis. Geralmente apresentam misturas de corantes, sendo difícil avaliar o comportamento da sua degradação pelo método enzimático. Cada corante tem uma estrutura particular e as enzimas são altamente específicas, o que limita as potencialidades do tratamento em matrizes residuais reais e sua implementação em larga escala. A capacidade que as enzimas têm para atuar sobre os poluentes também é afetada pela temperatura e o pH (AMBATKAR e MUKUNDAN, 2012), como já discutido nessa seção. Ainda assim, muitos estudos têm mostrado resultados promissores na degradação de corantes utilizando lacases, peroxidases e outras enzimas (ALI *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2011; FORGIARINI e DE SOUZA, 2007; KULSHRESTHA e HUSAIN, 2007; SINGH *et al.*, 2015). Contudo, a maioria deles, utilizam meios sintéticos e não efluentes reais (ELY *et al.*, 2016).

A HRP é uma das peroxidases mais utilizadas tradicionalmente. Essa enzima é adequada para o tratamento de corantes devido a sua elevada atividade catalítica e sua capacidade para oxidar uma ampla gama de substratos (ZHOU *et al.*, 2016). Porém, a disponibilidade da enzima é limitada e restrita a determinadas regiões, uma vez que as plantas são cultivadas em países de clima frio (SILVA, 2011), gerando assim altos custos de importação (DA SILVA *et al.*, 2011). Além disso, os custos inerentes aos processos de purificação inviabilizam o uso desta enzima em larga escala (SILVA, 2011).

Por isso, outras fontes alternativas de fácil disponibilidade estão sendo utilizadas, por exemplo, a peroxidase de soja e de nabo. Vários autores reportam que as propriedades bioquímicas e cinéticas da peroxidase de nabo são semelhantes a outras peroxidases disponíveis comercialmente, como a HRP (AKHTAR *et al.*, 2004; KULSHRESTHA e HUSAIN, 2007).

A seguir são apresentados os resultados mais relevantes de alguns estudos, nos quais foram utilizadas fontes alternativas de peroxidases.

AHMEDI *et al.* (2012) investigaram as condições ótimas para maximizar a remoção do corante Congo Red usando peroxidase de nabo (*Brassica rapa*). Os autores comprovaram a ausência de sub-produtos tóxicos, assim como a não formação de precipitados poliméricos.

De acordo com ALI *et al.* (2013), o mecanismo enzimático de degradação do corante azo Crystal Ponceau 6R apresenta duas vias, uma simétrica e outra assimétrica. No estudo desenvolvido pelos autores, a peroxidase de soja mostrou-se

efetiva na remoção do corante, com 100% de remoção em 1 min e mineralização quase total do corante.

O estudo de SILVA *et al.* (2012) utilizando a mesma enzima, avaliou a remoção de vários corantes reativos. O tratamento mostrou que a eficiência de remoção de cor diminui na presença de produtos auxiliares de tingimento, empregados na indústria têxtil. Por outro lado, se obteve um incremento significativo da DQO. Os autores atribuíram esse aumento às possíveis causas: matéria orgânica adicionada na forma de extrato enzimático vegetal bruto, presença de corante residual e produtos formados durante o processo oxidativo.

Por outro lado, URREA e CONTRERAS (2015) estudaram a cinética de descoloração do corante azo Orange II, usando peroxidase de soja. Uma cinética de primeira ordem foi observada pelos autores nesse estudo.

Fontes de peroxidases provenientes de distintos vegetais como abóbora, cenoura e batata também têm sido utilizadas. Eficiências de remoção de cor de 75, 82 e 69%, respectivamente, foram encontradas na degradação do corante azo Yellow utilizando tais enzimas. Adicionalmente, o efluente tratado não apresentou toxicidade (SURENDIRAN e SUBRAMANI, 2016).

No caso das peroxidases, um fator importante que deve ser considerado é a inativação da enzima pelo peróxido de hidrogênio, que é o seu substrato primário natural (AMARAL, 2011). Isso deve ser estudado para evitar problemas operacionais, fundamentalmente quando leva-se em conta o escalonamento do processo. Esse e outros fatores que são discutidos a seguir constituem os grandes desafios da tecnologia enzimática.

Desafios tecnológicos e áreas de pesquisa em desenvolvimento

Na atualidade, existe um grande interesse pelo uso de enzimas provenientes de fontes mais econômicas, que possuam alta atividade e estabilidade (SURENDIRAN e SUBRAMANI, 2016).

São necessárias enzimas que possam suportar os requerimentos industriais, como pH e temperatura. Muitas vezes esses fatores não são compatíveis com a atividade e estabilidade fisiológica das enzimas (DEMARCHE *et al.*, 2012). As enzimas isoladas de microrganismos extremófilos, também chamadas de extremozimas, constituem uma descoberta na solução deste problema (BULL *et al.*, 2000). Os biocatalisadores provenientes dos microrganismos extremófilos são superiores aos tradicionais, porque permitem que os processos industriais decorram sob condições extremas, tais como: temperaturas elevadas, presença de solventes orgânicos ou de forças iônicas fortes.

Por outro lado, há uma grande necessidade de conhecer os compostos intermediários e finais da rota de degradação, para uma melhor compreensão das etapas de oxidação. Os mecanismos de degradação enzimática para muitas moléculas

de corantes são desconhecidos (ALI *et al.*, 2013; SILVA, 2011) e as informações acerca desse processo são limitadas. Esse fato dificulta a compreensão das etapas nas quais acontece a formação de novos metabólitos, o que limita o desenvolvimento da engenharia de bioprocessos e a utilização do tratamento enzimático em escala industrial (SARATALE *et al.*, 2011).

Outro aspecto a considerar é o emprego de técnicas que permitam reduzir os custos do catalisador. A utilização de extratos enzimáticos brutos sem necessidade do emprego de processos de purificação (BETTIN *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2011), o emprego de enzimas a partir de novas fontes alternativas (ALI *et al.*, 2013; ELY *et al.*, 2016; KURNIK *et al.*, 2015; PAISIO *et al.*, 2010; SURENDIRAN e SUBRAMANI, 2016) e sua imobilização em diferentes suportes (BASTOS *et al.*, 2015; SURYAVATHI *et al.*, 2005), constituem métodos efetivos para diminuir os custos do tratamento.

A imobilização de enzimas em diferentes tipos de suportes, como matriz de acrilamida, alginato de cálcio, cavacos de madeira, entre outros, permite utilizar diferentes configurações de reator e reutilizar o catalisador, preservando a enzima (DEMARCHE *et al.*, 2012).

Os tratamentos enzimáticos, também como acontece com outras técnicas, podem ser insuficientes em caso de ser utilizados de forma isolada. Por isso, a sua utilização como pré-tratamento pode ser interessante para melhorar a biodegradabilidade e produzir um efluente que possa ser tratado biologicamente (ELY *et al.*, 2016).

De acordo com SILVA *et al.* (2012), o corante residual e os subprodutos solúveis da reação contribuem para o aumento da DQO, o que implica em impactos adversos ao meio aquático.

Segundo FORGIARINI e DE SOUZA (2007), o tratamento enzimático atua apenas no grupo cromóforo da molécula. Por isso, há a necessidade de utilizar um processo complementar que permita remover os compostos orgânicos.

O trabalho desenvolvido por KARIMI *et al.* (2009) utilizou um processo enzimático seguido de foto-fenton para a remediação da cor em efluentes industriais. No tratamento enzimático foram aplicadas duas enzimas (lacase e peroxidase) e ambas descoloriram o efluente. Verificou-se que o tratamento combinado apresentou um melhor desempenho quando comparado à aplicação dos processos separadamente.

Na revisão bibliográfica realizada se encontraram poucos trabalhos que avaliam a combinação do tratamento enzimático com algum outro tratamento. Como apontado por alguns autores no decorrer desta seção, as enzimas são muito específicas, de maneira que resultados mais promissores poderiam ser obtidos quando as tecnologias convencionais e as enzimáticas fossem combinadas.

2.4 Remoção dos corantes azo CP6R e RR239 por diversas técnicas

De forma geral, há importante produção de material científico e de pesquisas voltadas a reduzir o impacto negativo que os corantes ocasionam ao meio ambiente, quando não tratados. Especialmente, estudos dirigidos à remoção dos corantes azo CP6R e RR239 têm sido realizados. A seguir são apresentados alguns exemplos.

EL-ZOMRAWY (2013) utilizou a técnica fotoeletrocatalítica para degradar o corante CP6R, empregando persulfato de amônio como agente oxidante, em pH 2. No estudo, foi comprovado um aumento da eficiência de degradação do corante quando incrementada a concentração do oxidante.

Outra proposta de descoloração do CP6R foi introduzida por AHMED *et al.* (2015) com a adição de um agente oxidante inorgânico, o dicromato de potássio (K_2CrO_4), sob diferentes concentrações de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e temperaturas. Foi observada depois de 48 h de reação a redução da cor, com eficiências próximas a 90% quando utilizadas altas concentrações de oxidante. Também, comprovou-se o aumento da eficiência com o incremento das concentrações do ácido.

Não somente técnicas oxidativas químicas e foto-químicas têm sido empregadas no estudo da degradação do corante CP6R. A utilização da tecnologia enzimática também tem mostrado um caminho de interesse na comunidade científica. Um exemplo disso foi o estudo realizado por ALI *et al.* (2013), no qual os autores avaliaram as condições e parâmetros ótimos de operação utilizando uma peroxidase de soja, em presença de um mediador redox. Nas condições ótimas, obtiveram-se eficiências de remoção de 100% em apenas 1 min e mineralização quase total do CP6R. Outro aspecto interessante foi a identificação de intermediários formados durante o processo, o qual não é recorrente nas pesquisas realizadas na área. Os autores mostraram duas vias enzimáticas de degradação a partir dos resultados obtidos por HPLC/MS.

Um dos métodos utilizados para a remoção do corante azo RR239 foi a ozonização. No estudo desenvolvido por GÜNEŞ *et al.* (2012), foi comprovado que a descoloração por ozonização depende do grupo cromóforo da molécula de corante, sendo que o Vermelho 239 de classe azo foi removido em menor proporção quando comparado com outras estruturas químicas, como por exemplo corantes do tipo antraquinônico.

Também foi comprovada a eficiência de descoloração do corante RR239 quando utilizaram-se outros tratamentos, como a fotocatalise. LIU e CHIOU (2005) observaram uma eficiência de descoloração de 99,82% do corante Vermelho 239, em pH 2,64, empregando um processo de degradação fotocatalítica com concentração de TiO_2 de 3,06 g/L e intensidade de luz UV de 16,08 W/m².

Enzimas como a lacase têm sido utilizada na descoloração do corante RR239. As eficiências de remoção obtidas por alguns autores não foram significativamente altas. No entanto, tem-se demonstrado o potencial das lacases como catalisadoras destas reações de oxidação-redução. Por exemplo, CRISTÓVÃO *et al.* (2009), obtiveram 71% de remoção do corante RR239 utilizando uma lacase comercial. Os autores atribuíram esse baixo percentual de descoloração às possíveis causas: competição dos corantes participantes na mistura reacional pelos sítios ativos da enzima, desativação da lacase e formação de produtos de polimerização obtidos durante o processo de degradação.

Adicionalmente, outro estudo demonstrou que a oxidação do corante RR239 ocorre na presença do mediador de elétrons HOBT, e é dependente do potencial redox do mediador utilizado (TAVARES *et al.*, 2009). Por outro lado, experimentos realizados sem lacase e com mediador não foram efetivos na descoloração do corante, indicando que a sua redução só ocorre quando o mediador e a enzima estão presentes (TAVARES *et al.*, 2008).

2.5 Conclusões do capítulo e justificativa do sistema adotado

Os efluentes líquidos das indústrias têxteis apresentam forte coloração devido à presença de corantes. Os corantes azo, em particular, são os mais utilizados nessas indústrias.

Esses compostos alteraram a cor dos corpos d'água receptores, prejudicando a fotossíntese e conseqüentemente reduzindo a concentração de oxigênio dissolvido nas águas, o que pode causar a morte de muitos organismos aquáticos. Além disso, tem-se comprovado que alguns corantes são bioacumulativos, tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, precisando portanto de um tratamento adequado antes de serem lançados nos corpos hídricos.

Os tratamentos biológicos convencionais são processos sustentáveis, porém, os corantes não são facilmente removidos através desses processos. No entanto, os processos biológicos combinados (anaeróbio-aeróbio) têm mostrado capacidade para remover DQO de efluentes coloridos. Tendo em vista que a efetividade do tratamento na remoção de cor depende muito da estrutura química e recalcitrância dos corantes, o emprego de uma estratégia isolada de tratamento muitas vezes torna-se insuficiente, sendo necessário outro processo complementar.

Por outro lado, as enzimas são muito seletivas e altamente efetivas na remoção de compostos específicos. Diversos estudos mostraram ser promissores no uso da tecnologia enzimática, empregando a enzima peroxidase. Porém, muitas vezes,

a utilização de fontes comerciais dessa enzima, como por exemplo a HRP, torna o processo inviável economicamente. Outro aspecto importante é que alguns estudos indicam que o tratamento enzimático atua apenas no grupo cromóforo da molécula. Devido a esse fato, a utilização de processos combinados resultaria em uma alternativa efetiva, a qual tem sido pouco avaliada na literatura.

Desta forma, o presente trabalho é justificável, uma vez que:

- ☞ Será utilizada uma fonte alternativa de peroxidase de menor custo que outras fontes comerciais tradicionais;
- ☞ Serão utilizados corantes azo, os quais são os representativos dos efluentes das indústrias têxteis;
- ☞ Será avaliada a degradação do corante RR239, de estrutura molecular complexa, através do uso combinado de processos biológico (anaeróbio-aeróbio) e enzimático.

Capítulo 3

Materiais e métodos

Neste capítulo é apresentada, de forma detalhada, a metodologia usada para a realização dos objetivos propostos. O presente trabalho foi desenvolvido em duas grandes etapas. A primeira etapa foi dedicada ao estudo da degradação enzimática de soluções puras dos corantes CP6R e RR239, utilizando uma peroxidase de nabo (*Brassica rapa*). Na segunda etapa, foram estudados dois tratamentos sequenciais para a degradação de um efluente sintético contendo o corante RR239. Os tratamentos sequenciais utilizaram processos enzimáticos e biológicos.

3.1 Enzima

Foi utilizada a enzima peroxidase de nabo (*Brassica rapa*) (E.C. 1.11.1.7), produzida pela Empresa Engene Tech Farmacêutica e Biotecnológica Ltda. Esta enzima, constituída por uma família de isoenzimas, foi obtida em forma de pó liofilizado. Para o estudo de degradação enzimática em soluções puras de corante, uma solução de 1 g/L foi preparada e conservada em geladeira, durante toda a etapa de experimentação. No entanto, para os tratamentos sequenciais foi utilizado diretamente o pó liofilizado.

3.1.1 Caracterização da enzima peroxidase de nabo (*Brassica rapa*)

Método de Bradford para a determinação da concentração de proteína

O método colorimétrico de Bradford é uma técnica utilizada para quantificar proteínas totais, sendo descrito pela primeira vez por BRADFORD (1976).

Nesse ensaio, o analito é colocado em contato com uma solução do corante Coomassie G-250 azul brilhante. Esta interação produz uma mudança na coloração da solução para uma cor avermelhada, que absorve em 595 nm. O corante se liga

às macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Devido a essa ligação, o complexo é formado rapidamente (2 min) e permanece em solução por um tempo relativamente longo (1 h) (BRADFORD, 1976).

A absorbância das amostras, em triplicata, foi lida no espectrofotômetro Agilent 8453. Através da aplicação de uma curva de calibração e da Lei de Lambert-Beer, a concentração de proteína foi calculada a partir da absorbância (WENRICH e TRUMBO, 2012). O procedimento detalhado de Bradford encontra-se no Apêndice A.

Determinação da atividade específica da enzima

Para determinar a atividade específica da peroxidase, foi utilizado o ensaio descrito por WORTHINGTON (1993). Nesse ensaio é utilizado o reagente 4-aminoantipirina como doador de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, conforme reação química representada na Figura 3.1. Por oxidação, ocorre a formação da antipirilquinonimina, cuja taxa de geração de cor é proporcional à taxa de H_2O_2 consumido, que por sua vez, é proporcional à concentração de enzima ativa no ensaio (NICELL e WRIGHT, 1997).

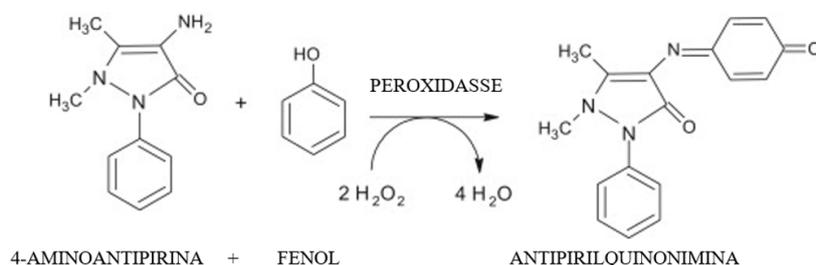


Figura 3.1: Esquema da reação que acontece durante a determinação da atividade específica da peroxidase.

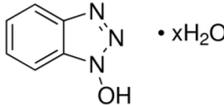
Fonte: Adaptado de (CÓRDOBA *et al.*, 2015).

A velocidade de reação foi determinada medindo o aumento da absorbância a 510 nm resultante da decomposição do peróxido de hidrogênio, sendo que uma unidade de atividade enzimática (U) resulta na decomposição de $1 \mu\text{mol}$ de peróxido de hidrogênio por minuto, em pH 7 a 25°C (WORTHINGTON, 1993). O procedimento para a determinação da atividade específica da enzima encontra-se descrito no Apêndice B.

3.2 Mediador de elétrons

Nos experimentos realizados foi utilizado como mediador de elétron o reagente HOBT, adquirido da Sigma-Aldrich (CAS 123333-53-9). Algumas propriedades do mediador são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Propriedades do mediador de elétrons HOBT

Formula química	Massa molar (g/mol)	Estrutura molecular
$C_6H_5N_3O \cdot xH_2O$	135,12	

3.3 Corantes

Utilizou-se os corantes azo CP6R e RR239 adquiridos da Sigma-Aldrich e da Oficina de tintas Ltda (Brasil), respectivamente. As características detalhadas e propriedades desses corantes estão na Tabela 2.2

3.4 Degradação enzimática empregando soluções puras de corante CP6R e RR239

3.4.1 Condições experimentais gerais

Os experimentos foram conduzidos a uma temperatura entre 28 e 30°C, utilizando solução tampão citrato-fosfato, com o objetivo de garantir estabilidade do pH durante a oxidação enzimática. A solução tampão foi preparada segundo NBS Buffer Solutions: 0,1 mol/L de ácido cítrico e 0,2 mol/L de fosfato de sódio dibásico ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$), com valores de pH de 3, 4, 5, 6 e 7.

Depois de preparada a solução tampão, foi conferido o valor do pH e corrigido quando necessário. Para isso, empregou-se uma solução de ácido cítrico (0,1 mol/L) e fosfato de sódio dibásico (0,2 mol/L). Para o ensaio de descoloração, utilizaram-se tubos tipo falcon de 15 mL. As amostras foram preparadas em triplicata para um volume total de 3 mL, contendo os reagentes e as concentrações mostradas na Tabela 3.2. A concentração de corante utilizada no presente estudo esteve no intervalo de concentrações usadas em diferentes artigos (ALI *et al.*, 2013; KULSHRESTHA e HUSAIN, 2007; SILVA *et al.*, 2012). O ensaio foi feito para todos os valores de pH especificados anteriormente.

Tabela 3.2: Reagentes e concentrações utilizadas nos ensaios de descoloração

Reagente	Concentração	
	mg/L	$\mu\text{mol/L}$
Corante	30	60 ^a ou 29 ^b
H ₂ O ₂	3	100
Peroxidase de nabo	9	0,24 ^c
HOBT	14	100
Tampão citrato-fosfato	-	-

^a CP6R, ^b RR239, ^ccalculado considerando a massa molar da peroxidase como sendo 38474 g/mol (SINGH *et al.*, 2002)

3.4.2 Determinação do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max})

Para poder avaliar a degradação dos corantes nos diferentes experimentos, foi utilizada a correlação existente entre a concentração de corante e a absorbância (Lei de Lambert-Beer). Para isso, foi preciso, como passo preliminar, determinar o comprimento de onda correspondente à máxima absorbância do corante. O comprimento de onda de máxima absorção do corante foi estimado fazendo uma varredura no espectro de absorção visível (400-800 nm). Essa determinação foi realizada utilizando um espectrofotômetro de microplacas Epoch Bio Tek Instruments (E-MEBTI) . As amostras continham 30 mg/L de corante e tampão citrato-fosfato, em todos os valores de pH estudados. A determinação de λ_{max} dos corantes foi fundamental para a realização dos demais experimentos.

3.4.3 Teste F de Fisher

Foi realizado o teste F de Fisher para determinar se as variações de absorbância entre os diferentes pH das amostras analisadas eram atribuídas a erros do equipamento ou à influência do pH. O teste foi realizado para ambos os corantes. Para tanto, foram realizadas leituras de absorbância de 10 amostras padrão (distribuídas de forma aleatória na microplaca de 96 poços) no comprimento de onda de máxima absorção de cada corante. As amostras padrão continham apenas água destilada. Logo, foi estimada a probabilidade bicaudal de que as variações da absorbância para os diferentes pH não fossem significativamente diferentes das variações de absorbância de diferentes amostras padrão. Para isso, foi utilizada a função TESTE.F do Microsoft Excel 2016.

3.4.4 Determinação das curvas de calibração

Para converter os valores de absorbância em concentração de corante, foram realizadas curvas de calibração para as concentrações de corante de 0,5, 2, 5, 10, 20

e 30 mg/L no meio tamponado citrato-fosfato, em cada valor de pH estudado.

3.4.5 Estudo do efeito catalisador da enzima

Um estudo foi realizado para avaliar o efeito catalisador da peroxidase de nabo (*Brassica rapa*). Para isso, foram utilizadas amostras em branco (sem enzima) e comparadas com amostras que continham enzima. Foi fixado um tempo de 60 min para as reações conduzidas sem enzima e de 3 min para as reações com enzima. Nesse estudo foram utilizados valores de pH de 3, 4, 5, 6 e 7. As amostras foram preparadas em triplicatas, mantendo a concentração do corante CP6R em 30 mg/L.

3.4.6 Determinação do pH ótimo

Como descrito na seção 2.3.3, o pH é um parâmetro que influencia diretamente a atividade enzimática e, portanto, a velocidade da reação. Desse modo, a influência do pH na velocidade de remoção de cor foi avaliada e determinado o pH ótimo, nas condições experimentais especificadas na seção 3.4.1 deste capítulo. O pH ótimo para cada corante foi definido, conforme exibido na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Definição do pH ótimo para os corantes CP6R e RR239

Corante	Definição de pH ótimo
CP6R	valor no qual foi alcançada a maior remoção de cor após 1 min
RR239	valor no qual foi alcançada a maior remoção de cor após 20 min

A Remoção de cor foi determinada mediante a Equação 3.1.

$$\text{Remoção de cor (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} 100 \quad (3.1)$$

Onde:

C_0 , é a concentração inicial de corante (mg/L);

C_t , é a concentração de corante no tempo t (mg/L).

A taxa de reação foi calculada por aproximação, aplicando o método das diferenças finitas conforme a Equação 3.2.

$$\text{Taxa de reação (mg/Lmin)} = -\frac{d[C]}{dt} \approx -\frac{[C]_{i+1} - [C]_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (3.2)$$

Onde:

C , é a concentração de corante (mg/L);

t , é o tempo (min);

i , é o ponto de análise.

3.4.7 Determinação do tempo ótimo de contato

Para ambos os corantes, o tempo ótimo de contato foi definido como o tempo a partir do qual a taxa de reação não foi significativa (isto é valores inferiores a 1 mg/Lmin). Esse parâmetro foi determinado após a definição do pH ótimo, sendo avaliado para esse valor de pH.

3.5 Tratamentos sequenciais empregando efluente sintético

Como discutido na seção 2.3.3, o tratamento enzimático realizado de forma isolada não é uma boa alternativa para remover substâncias de difícil degradação. Portanto, nesse estudo foram empregados dois tratamentos sequenciais para a degradação de corante, que serão descritos nas próximas seções. No primeiro, denominado B+E, foi realizado um tratamento sequencial biológico-enzimático. No segundo, denominado E+B, foi realizado um tratamento sequencial enzimático-biológico.

Para a realização destes tratamentos foi escolhido o corante Vermelho 239, por ser o corante azo de estrutura molecular mais complexa dentre os dois corantes avaliados neste trabalho. Além disso, o RR239 é classificado como corante reativo, apresentando o menor grau de fixação à fibra e, portanto, representando a classe de corante com maior perda nos efluentes (Tabela 2.3).

3.5.1 Meio sintético

O meio sintético usado nos experimentos B+E e E+B foi preparado tendo glicose como fonte de carbono, cuja concentração foi estipulada de modo a obter uma DQO inicial em torno de 450 mg/L. O meio também continha os seguintes compostos: NH_4Cl (30 mg NH_4^+ -N/L) como fonte de nitrogênio, NaHCO_3 (270 mg/L) como fonte de alcalinidade, K_2HPO_4 (4,45 mgP/L) e KH_2PO_4 (4,55 mgP/L) como fonte de fósforo e o corante RR239 (30 mg/L). Além disso, foi adicionada uma solução de elementos traço (VISHNIAC e SANTER, 1957) em uma proporção de 0,5 mL/L de meio preparado para garantir a presença dos micronutrientes necessários para as bactérias (BASSIN, 2008).

3.5.2 Sistema biológico anaeróbio – aeróbio

Para realizar os tratamentos sequenciais, foi necessário como ponto de partida iniciar a operação dos reatores biológicos. Dois reatores de leito fixo (R1 e R2), conectados em série e operados com escoamento ascendente, foram empregados como

sistema de tratamento biológico. O meio sintético foi alimentado ao R1 por meio de uma bomba peristáltica Longer Pump BT100-2J, enquanto o R2 foi alimentado com o efluente do R1 por gravidade (Figura 3.2).

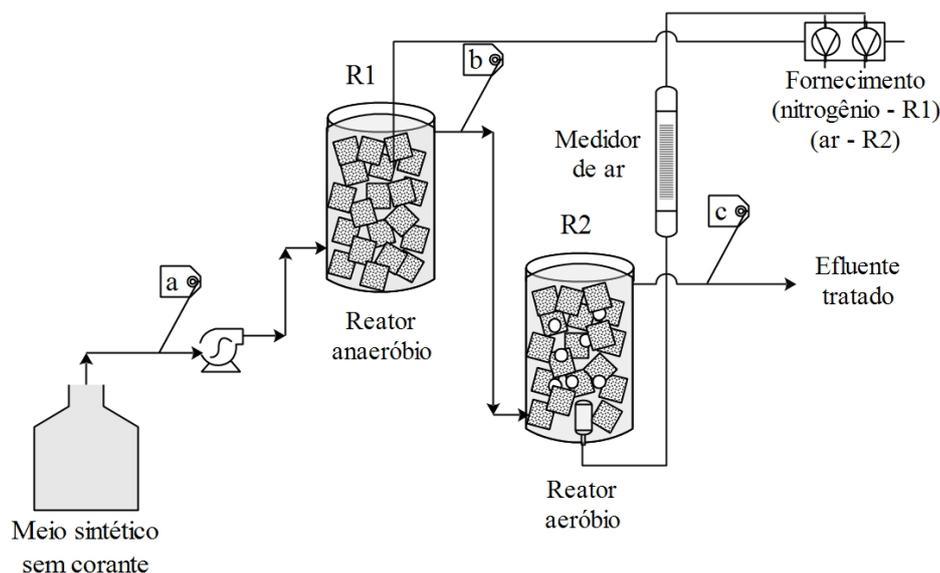


Figura 3.2: Esquema da operação dos reatores biológicos (anaeróbico – aeróbico).
 Símbolos: (a) entrada R1, (b) saída R1, (c) saída R2, todos pontos de amostragem.

Os reatores R1 e R2, fabricados em vidro, tinham forma cilíndrica com um volume nominal e útil mostrado na Tabela 3.4. O TRH do sistema foi fixado em aproximadamente 9 h para cada reator, de modo que o TRH total fosse de 18 h. A carga orgânica média aplicada ao sistema biológico foi de 0,6 kgDQO/m³.d.

Tabela 3.4: Volume nominal e útil dos reatores R1 e R2

Reator	Volume nominal mL	Volume útil mL
R1	210	172
R2	216	150

Os reatores foram operados em modo contínuo. O efluente sintético foi preparado semanalmente e colocado na geladeira (4°C) para evitar a degradação do mesmo. No período de partida dos reatores (primeiros 60 dias de operação), o sistema foi alimentado com meio sem a adição do corante. Esse período foi utilizado para promover o crescimento da biomassa e foi denominado período de *Start-up*.

A configuração experimental do sistema biológico (anaeróbico-aeróbico) na etapa de montagem é apresentada na Figura 3.3. O material empregado como inóculo consistiu em lodo biológico coletado em um sistema de lodos ativados de escala de bancada. O lodo foi adicionado manualmente pela parte superior do R1 e homogeneizado. O R2 recebeu o lodo proveniente do R1. Para a inoculação foram utilizados 16 mL de lodo, o qual representou aproximadamente 9% do volume útil

do R1. Para a imobilização da biomassa, cada um dos reatores foi preenchido com um meio suporte esponjoso (APG), em estrutura cúbica de 1 cm de aresta. A razão de enchimento ($V_{suporte}/V_{reator}$) foi de 0,18 e 0,31, respectivamente.

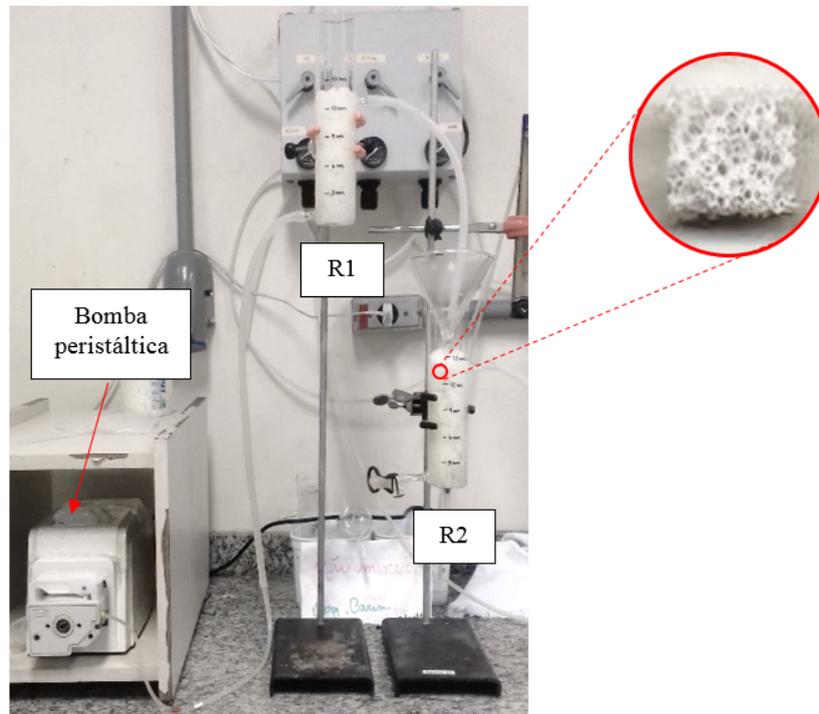


Figura 3.3: Configuração experimental (montagem dos reatores R1 e R2). Em detalhe é mostrado o material suporte utilizado.

Durante toda a operação do R2, a aeração foi fornecida por um difusor de ar poroso, situado no fundo do reator e ligado a uma linha de ar comprimido. O ar permitiu fornecer oxigênio ao meio para a biodegradação aeróbia. Por outro lado, durante a operação do R1, foi borbulhado nitrogênio através de uma linha de fornecimento desse gás, a fim de minimizar a concentração de oxigênio dissolvido nesse reator e manter a estabilidade do processo anaeróbio. Na Figura 3.4, é apresentada uma vista detalhada dos reatores R1 e R2, durante o regime de *Start-up*.

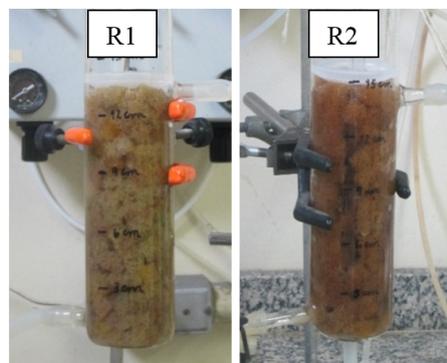


Figura 3.4: Vista detalhada dos reatores R1 e R2 (*Start-up*).

3.5.3 Testes preliminares enzimáticos

Como mencionado na seção 3.5.2, durante os primeiros 60 dias de operação, o sistema operou sem a adição do corante. Após esse período de (*Start-up*), foi adicionado o corante RR239. Durante essa última etapa, foram realizados dois testes. Para tanto, amostras das correntes de entrada e saída do sistema biológico anaeróbio-aeróbio (entrada R1 e saída R2) foram tratadas enzimaticamente.

O primeiro teste consistiu em fazer o tratamento enzimático sem modificação do pH e o segundo com a modificação desse parâmetro. No caso em que foi modificado o pH, o mesmo foi ajustado até valor 4. Na realização dos testes, foram coletadas amostras de dois dias aleatórios. A coleta se realizou nos pontos (a) e (c) (Figura 3.2). Essas amostras foram tratadas adicionando os seguintes reagentes: H_2O_2 , peroxidase de nabo e HOBT, nas concentrações estabelecidas na Tabela 3.2. Um volume total de 3 mL foi utilizado para realizar os testes em duplicata. Ao longo de 120 min, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro de microplacas Epoch Bio Tek Instruments e suas absorvâncias foram lidas no comprimento de onda de máxima absorção do corante RR239.

Os testes foram necessários para conhecer quais condições deviam ser utilizadas para realizar o tratamento enzimático, tanto no sistema sequencial B+E quanto no E+B. Assim, foi possível estabelecer o tempo total de reação e avaliar a necessidade ou não de ajuste do pH para realizar o tratamento enzimático.

3.5.4 Tratamento sequencial biológico - enzimático (B+E)

O meio sintético contendo corante RR239 foi submetido ao tratamento biológico (anaeróbio-aeróbio) contínuo e, seguidamente, o efluente (saída R2) foi submetido a um tratamento enzimático em batelada, como representado na Figura 3.5. Para a realização do tratamento enzimático, foram coletados 15 mL de amostra do ponto (c) (Figura 3.5). Seguidamente, foi ajustado o pH até valor 4 de amostras em triplicatas e posteriormente adicionados os reagentes: H_2O_2 , peroxidase de nabo e HOBT, nas concentrações apresentadas na Tabela 3.2. A configuração experimental do tratamento sequencial biológico - enzimático é apresentada na Figura 3.6.

3.5.5 Tratamento sequencial enzimático - biológico (E+B)

Neste caso, o meio sintético contendo corante RR239 foi submetido a um tratamento enzimático antes de ser utilizado para alimentar o sistema biológico (anaeróbio-aeróbio). Desta forma, o meio sintético tratado enzimaticamente constituiu a entrada do R1, como representado na Figura 3.7. Um volume de 4000 mL de meio sintético foi utilizado para realizar o tratamento enzimático, no qual

foram adicionados os mesmos reagentes e concentrações da seção anterior (3.5.4). Antes de iniciar a adição dos reagentes, foi ajustado o pH até valor 4. O experimento foi conduzido em batelada, com auxílio de uma placa agitadora (Fisatom, modelo 753A) que possibilitou homogeneizar a mistura reacional. A temperatura foi mantida entre 28 e 30°C. Após o tempo de reação fixado (determinado nos testes preliminares enzimáticos), foi aumentado o pH do meio até valores entre 7,5 e 9, com o objetivo de garantir o adequado desempenho do sistema biológico. A configuração experimental do tratamento sequencial enzimático - biológico é apresentada na Figura 3.8.

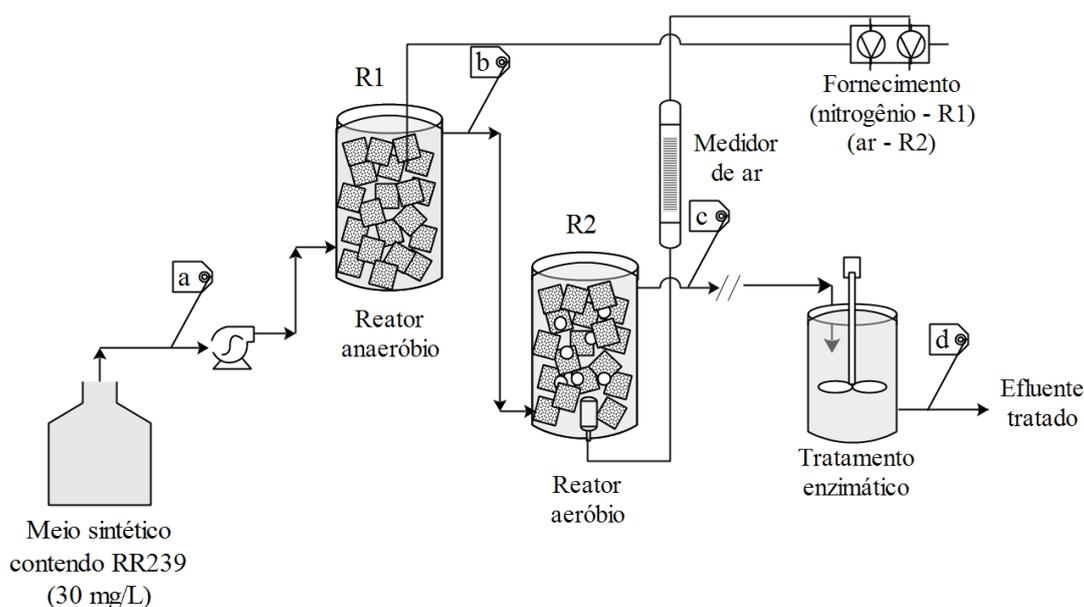


Figura 3.5: Esquema do tratamento sequencial biológico – enzimático (B+E). Símbolos: (a) entrada R1, (b) saída R1, (c) saída R2, (d) saída enzimático, todos pontos de amostragem.

3.6 Parâmetros avaliados nos tratamentos sequenciais B+E e E+B. Procedimentos de cálculos

3.6.1 Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Foram realizadas análises para quantificar a remoção de matéria orgânica, mediante a determinação da DQO, seguindo o método colorimétrico 5220 D do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2005). O método permitiu determinar a quantidade de oxigênio necessário para oxidar quimicamente a matéria orgânica presente na amostra líquida, mediante a redução de Cr^{6+} em Cr^{3+} .



Figura 3.6: Configuração experimental (B+E): sistema biológico (A), antes (B) e depois (C) do tratamento enzimático.

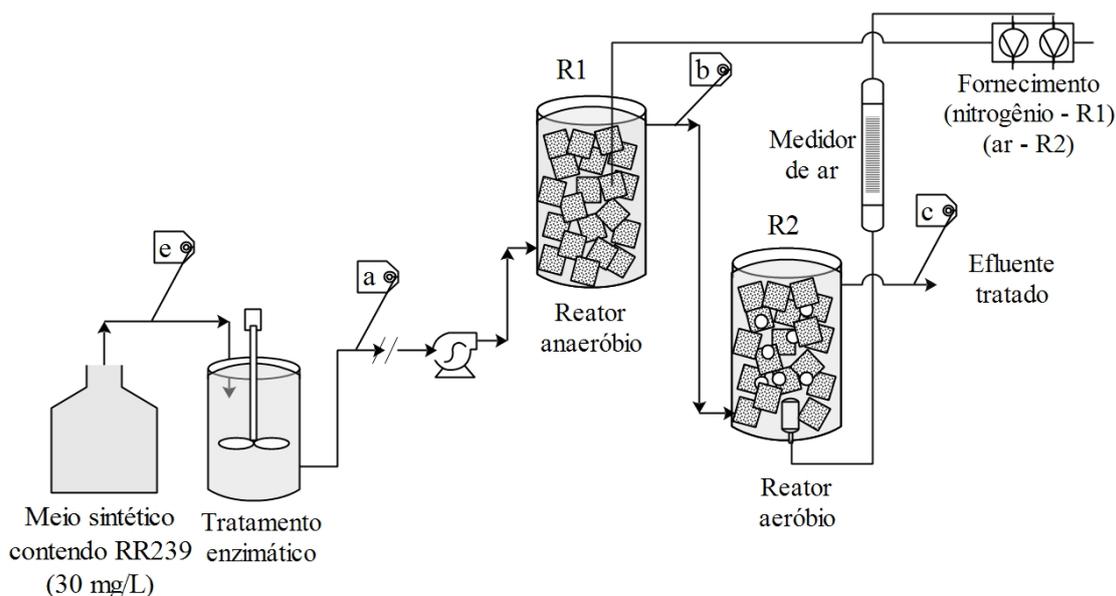


Figura 3.7: Esquema do tratamento sequencial enzimático - biológico (E+B). Símbolos: (a) entrada R1, (b) saída R1, (c) saída R2, (e) entrada enzimático, todos pontos de amostragem.

As amostras foram previamente filtradas a vácuo em membrana de acetato celulose com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$. Foram realizadas as leituras da absorbância no espectrofotômetro HACH DR 2800 (E-HDR2800) de amostras em triplicatas. Para valores de DQO de até 100 mg/L , a leitura foi realizada em 420 nm e para valores de DQO entre 100 e 1000 mg/L , em 600 nm . Finalmente, as absorbâncias foram convertidas em concentração por meio de curvas de calibração (de alta e baixa concentração) realizadas com soluções de biftalato de potássio (KHP). Os valores percentuais de remoção foram calculados conforme a Equação

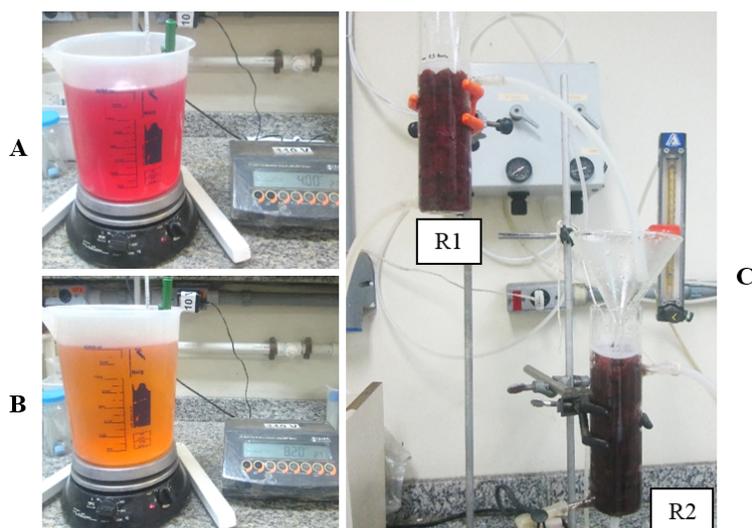


Figura 3.8: Configuração experimental (E+B): antes (A), depois (B) do tratamento enzimático e sistema biológico (C).

3.3.

$$\text{Remoção (\%)} = \frac{C_e - C_s}{C_e} 100 \quad (3.3)$$

Onde:

C_e , é a concentração do parâmetro na entrada (mg/L);

C_s , é a concentração do parâmetro na saída (mg/L).

3.6.2 Nitrogênio

Amoniacal

Para determinar o nitrogênio amoniacal (na forma de amônia) presente nas amostras foi utilizado o método colorimétrico 4500 C de Nessler (APHA, 1992). O método baseia-se na reação de nitrogênio amoniacal com os iodetos de mercúrio e potássio presentes no reagente de Nessler, onde é produzida uma dispersão coloidal castanho-amarelada. Foi realizada a leitura de absorbância de amostras em triplicatas, em espectrofotômetro HACH DR 2800, no comprimento de onda de 425 nm. Através da curva de calibração realizada com soluções padrão de cloreto de amônio, determinou-se a concentração de nitrogênio amoniacal. As amostras foram previamente filtradas em membranas de acetato celulose com diâmetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$.

Para o efluente de saída R1 não foram realizadas análises dos teores de nitrogênio amoniacal, já que esse reator foi operado em condições anaeróbias, sob as quais não ocorre a nitrificação. Os valores percentuais de remoção foram calculados de acordo com a Equação 3.3.

Nitrito e Nitrato

A determinação de concentração dos íons nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) foi realizada utilizando os kits da Hach Company.

Para a determinação de nitrito, foi utilizado o kit analítico Nitriver 2 Nitrite Reagent. Adicionou-se o reagente em pó do kit a 5 mL de amostra em tubo de ensaio e, em seguida, a mistura foi agitada. Após 10 min, a leitura da absorbância foi realizada a 585 nm no espectrofotômetro HACH DR 2800. A concentração de nitrogênio na forma de nitrito foi determinada através da curva de calibração feita com NaNO_2 .

Para a determinação do nitrato foi utilizado o kit analítico Nitriver 5 Nitrate Reagent. Adicionou-se o reagente em pó do kit a 5 mL de amostra em tubo de ensaio e, após 1 min, a mistura foi agitada. Depois de decorridos mais 5 min, a leitura da absorbância foi realizada a 500 nm no espectrofotômetro HACH DR 2800. A concentração de nitrogênio na forma de nitrato foi obtida com auxílio da curva de calibração feita com KNO_3 .

Para o efluente de saída R1 não foram realizadas análises dos teores de nitrito e nitrato, já que esse reator foi operado em condições anaeróbias, sob as quais não ocorre a nitrificação.

3.6.3 Concentração de Sólidos Aderidos Totais (SAT), Fixos (SAF) e Voláteis (SAV)

A concentração de Sólidos Aderidos Totais (SAT), Fixos (SAF) e Voláteis (SAV) foi determinada ao longo do experimento. Para tanto, foram coletados 3 materiais suportes (APG) de cada reator. As análises foram feitas em duplicatas. O procedimento empregado encontra-se detalhado no Apêndice C e constitui uma adaptação da metodologia empregada por DE OLIVEIRA (2008). O cálculo para a determinação de SAT, SAF e SAV aparece descrito nas Equações 3.4, 3.5 e 3.6, respectivamente.

$$SAT\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(P1 - P0) - (P2 - P0) N}{3} \frac{N}{V} \quad (3.4)$$

Onde:

$P0$, é a massa do cadinho (g);

$P1$, é a massa do cadinho contendo os suportes com a biomassa (g);

$P2$, é a massa do cadinho contendo os suportes limpos (g);

V , é o volume do reator (L);

N , é o número de suportes totais do reator.

$$SAF\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(P2' - P0') N}{3 V} \quad (3.5)$$

Onde:

$P0'$, é a massa do cadinho (g);

$P2'$, é a massa do cadinho após 1h na mufla a 560°C (g).

$$SAV\left(\frac{g}{L}\right) = SAT - SAF \quad (3.6)$$

3.6.4 pH, Temperatura e Oxigênio Dissolvido (OD)

As medidas de pH foram realizadas utilizando um medidor de pH (HANNA Instruments, modelo HI 2221), previamente calibrado com soluções padrões. Para ajustar o pH das amostras, quando necessário, foi utilizado HCL (1 mol/L) e NaOH (3 mol/L). A temperatura também foi determinada com o auxílio desse equipamento. O teor de OD foi medido utilizando um oxímetro (Inolab, modelo Oxi 7310).

3.6.5 Corante RR239

Para determinar a concentração de corante RR239, foram utilizadas 4 mL de amostra. O espectrofotômetro HACH DR 2800 foi usado para ler a absorbância das amostras em triplicatas no comprimento de onda de máxima absorção do corante. Curvas de calibração foram empregadas para correlacionar absorbância e concentração de RR239, em pH 4 e 7 (Figuras H.1a e H.1b apresentadas no Apêndice H). A eficiência de remoção de cor foi determinada utilizando a Equação 3.3.

3.7 Frequência, regime e pontos de amostragem dos parâmetros analisados nos tratamentos sequenciais B+E e E+B

A frequência de análises dos parâmetros operacionais e de desempenho para cada regime, assim como os pontos de amostragem utilizados, são apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Parâmetros analisados, frequência, regime e pontos de amostragem

Parâmetro	Frequência	Regime	Pontos de amostragem
DQO	Semanal	<i>Start-up</i> , B+E, E+B	(a), (b), (c), (d), (e)
Amônia	Semanal	<i>Start-up</i> , B+E, E+B	(a), (c)
Nitrito, Nitrato	Três vezes por regime	<i>Start-up</i> , B+E, E+B	(c)
SAT, OD	Uma vez por regime	<i>Start-up</i> , B+E, E+B	R1, R2
SAF, SAV	Uma vez por regime	B+E, E+B	R1, R2
pH	Semanal	<i>Start-up</i> , B+E, E+B	(a), (b), (c)
Temperatura	Semanal	<i>Start-up</i> , B+E, E+B	(b), (c)
Corante RR239	Semanal	B+E, E+B	(a), (b), (c), (d), (e)

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos durante a fase experimental do trabalho. Também é discutido e avaliado o desempenho dos tratamentos sequenciais estudados, mediante as análises dos parâmetros utilizados.

4.1 Caracterização da enzima peroxidase de nabo (*Brassica rapa*)

4.1.1 Atividade enzimática

Para determinar a atividade da enzima utilizada, foi necessário primeiro conhecer a concentração de proteínas presente na amostra de enzima preparada, contendo 1 g/L. A concentração de proteínas totais foi obtida por meio da curva de calibração (Apêndice D.1). Os resultados das amostras são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Valores de absorbância das amostras contendo peroxidase de nabo

Amostra	Absorbância (595 nm)
1	0,4499
2	0,4554
3	0,4382
Média	0,4478
Desvio padrão	0,0088

Utilizando o valor médio de absorbância das 3 réplicas (Tabela 4.1) e a função obtida no ajuste linear da curva de calibração, foi possível determinar a concentração de proteínas como sendo equivalente a 0,1479 g/L.

Seguindo o método (Apêndice B), também foi preciso conhecer a taxa de reação da mistura reacional (peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina com fenol e peroxidase de nabo). Para isso, foi realizada uma regressão linear dos valores de

absorbância (510 nm) versus tempo de reação (Apêndice E.1). O valor da tangente à curva representou o valor da taxa, sendo equivalente a $0,0332 \text{ min}^{-1}$.

A atividade enzimática foi de 102,3 U/mg, o que significa dizer que para uma concentração de enzima de 1 g/L, equivalente a 0,1479 g/L de proteína, tem-se 15,1 U/mL. Como a concentração de enzima utilizada durante os experimentos foi de 0,009 g/L, então tem-se uma atividade correspondente a 0,14 U/mL.

4.2 Degradação enzimática dos corantes azo CP6R e RR239

4.2.1 Comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) dos corantes azo CP6R e RR239

A varredura no espectro visível (400-800 nm) para cada corante, em diferentes valores de pH, é apresentada nas Figuras 4.1 e 4.2. Encontrou-se um pico de máxima absorbância em 512 nm para o corante azo CP6R e em 542 nm para o corante RR239, resultados que estão dentro da faixa de valores reportados na literatura (Tabela 2.2).

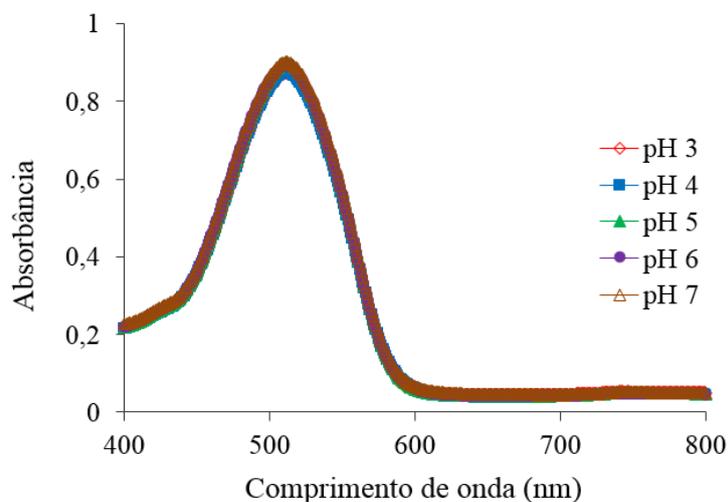


Figura 4.1: Espectro visível do corante azo CP6R para diferentes valores de pH.

Pode-se observar que, para ambos os corantes, o valor de λ_{max} é constante e independente do pH utilizado para ambos os corantes. Por outro lado, o valor da absorbância correspondente ao comprimento de onda de máxima absorção é dependente do pH (Figuras 4.3 e 4.4). Esse comportamento foi estudado em maior profundidade para determinar se as variações foram oriundas de erros do equipamento. Para isso, foi utilizado o teste F (Fisher).

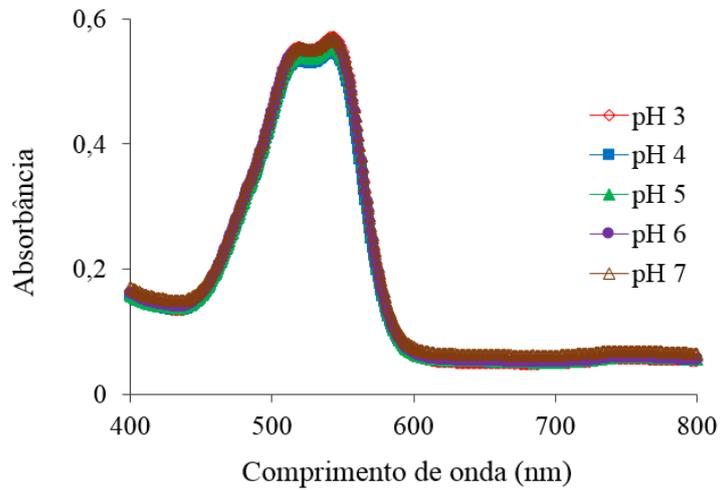


Figura 4.2: Espectro visível do corante azo RR239 para diferentes valores de pH.

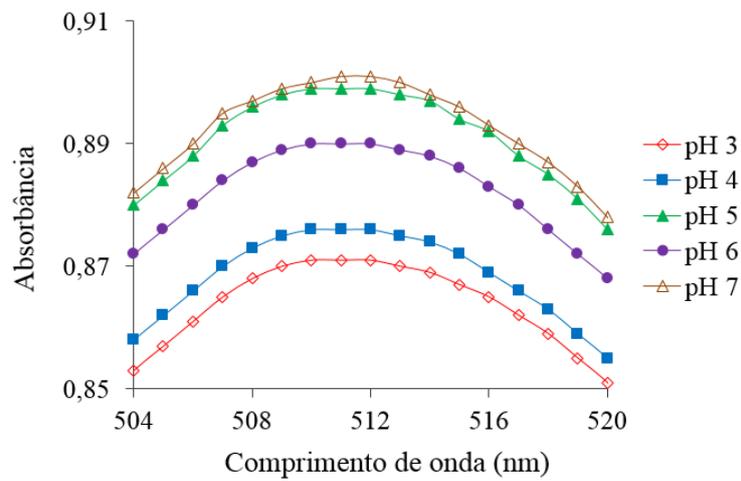


Figura 4.3: Detalhe da zona de λ_{max} do corante azo CP6R.

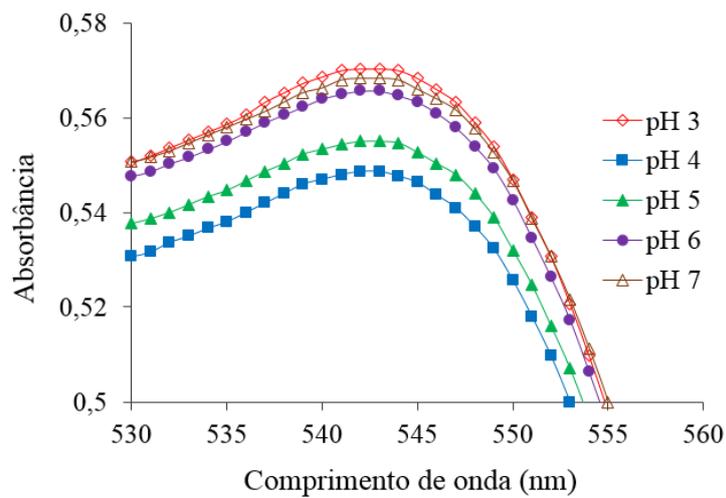


Figura 4.4: Detalhe da zona de λ_{max} do corante azo RR239.

4.2.2 Teste F de Fisher

O teste permitiu estimar a probabilidade bicaudal de que as variações da absorvância para os diferentes valores de pH não fossem significativamente diferentes das variações de absorvância de diferentes amostras padrão. O resultado desta avaliação é mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Resultado do teste estatístico F de Fisher

Parâmetro	CP6R ($\lambda_{max}=512$ nm)		RR239 ($\lambda_{max}=542$ nm)	
	Amostras com diferentes pH	Amostras padrão	Amostras com diferentes pH	Amostras padrão
Media	0,8874	0,0386	0,5620	0,0388
Desvio padrão	0,0135	0,0011	0,0091	0,0011
Variância	$1,81 \cdot 10^{-4}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$	$8,33 \cdot 10^{-5}$	$1,29 \cdot 10^{-6}$
Probabilidade (TESTE.F)	$5,17 \cdot 10^{-8}$		$2,51 \cdot 10^{-6}$	

Observa-se que a probabilidade obtida no teste é quase zero, tanto para o corante CP6R quanto para o RR239. Logo, pode-se concluir que as diferenças observadas no valor da absorvância correspondente ao comprimento de onda de máxima absorção para os diferentes valores de pH não são devidas a erros do equipamento. Logo, conclui-se que o pH influi na leitura da absorvância.

4.2.3 Curvas de calibração

Como o resultado do teste estatístico sugeriu baixa probabilidade de que as variações de absorvância para os diferentes valores de pH foram devido a erros do equipamento, determinou-se curvas de calibração independentes para cada valor de pH estudado, tanto para o corante CP6R quanto para o RR239 (Apêndice F e G).

4.2.4 Avaliação da enzima como catalisadora da reação, utilizando o corante CP6R

Testes foram conduzidos para avaliar o efeito catalisador da peroxidase de nabo na descoloração do corante azo CP6R. Pode-se observar na Tabela 4.3 que, para todos os valores de pH, a eficiência de remoção de cor foi muito baixa sem adição de enzima. No entanto, elevadas eficiências foram alcançadas em apenas 3 min de reação quando adicionou-se enzima. Os valores de pH 6 e 7 foram os mais desfavoráveis.

O comportamento da concentração de corante CP6R ao longo do tempo, para a condição na qual não houve enzima presente, é apresentado na Figura 4.5. Destaca-se a diferença destes resultados com relação aos obtidos quando adicionada a

Tabela 4.3: Remoção de cor do corante azo CP6R em ausência e presença de enzima

pH	Remoção de cor (%)	
	60 min de reação (sem adição de enzima)	3 min de reação (com adição de enzima)
3	$5,2 \pm 1,7$	$98,4 \pm 0,2$
4	$7,6 \pm 2,7$	$99,0 \pm 0,1$
5	$4,7 \pm 2,4$	$98,7 \pm 0,2$
6	$3,8 \pm 0,1$	$29,2 \pm 1,5$
7	$2,5 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,5$

enzima (Figura 4.6). Esses resultados mostraram o efeito catalisador da enzima de *Brassica rapa* na remoção de cor do corante azo CP6R. O mesmo comportamento foi demonstrado em um estudo anterior, em que foi avaliada a descoloração do corante RR239 na ausência de lacase (TAVARES *et al.*, 2008).

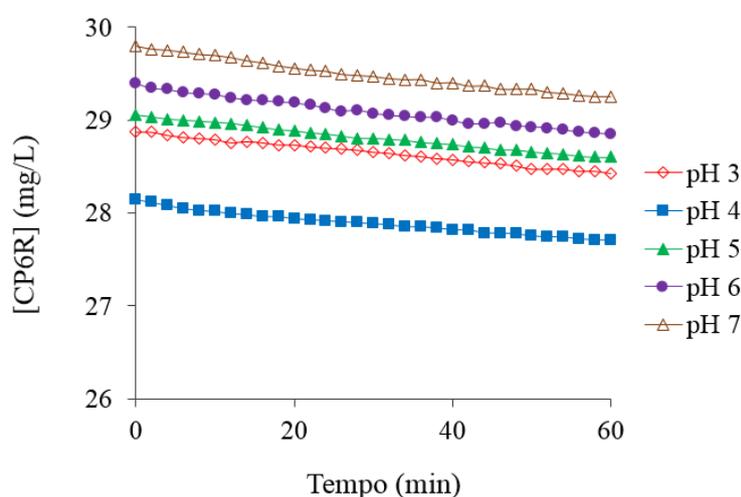


Figura 4.5: Concentração de corante CP6R ao longo do tempo sem adição de enzima.

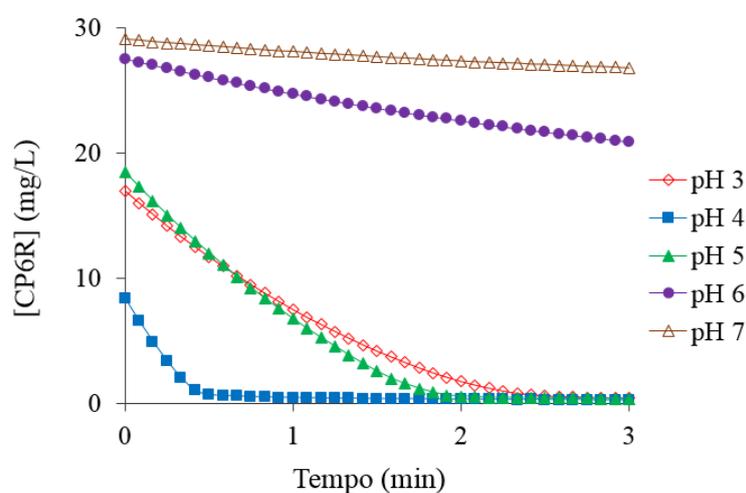


Figura 4.6: Concentração de corante CP6R ao longo do tempo com adição de enzima.

4.2.5 pH ótimo

O valor ótimo de pH para ambos os corantes foi 4, pois nessa condição obteve-se a maior eficiência de remoção de cor no tempo de reação fixado (Figuras 4.7 e 4.8), e também a maior taxa inicial de reação (Figuras 4.9 e 4.10). Observa-se que mesmo sem adição de enzima, a maior remoção de corante CP6R também foi obtida nesse pH (Tabela 4.3).

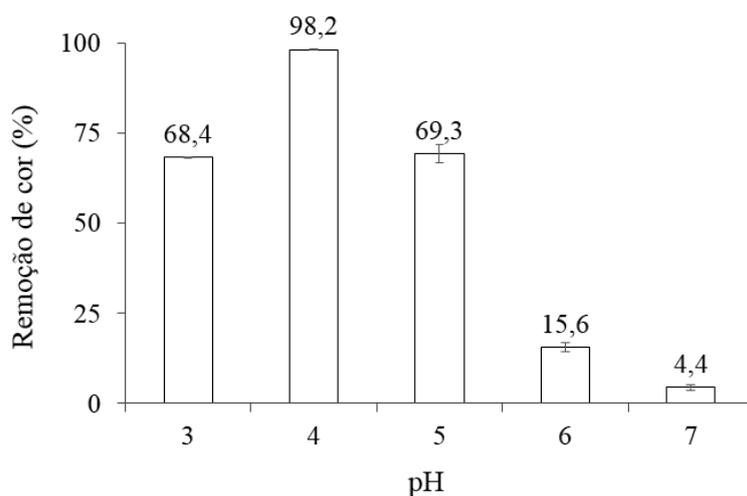


Figura 4.7: Efeito do pH na remoção de corante CP6R após 1 min de reação.

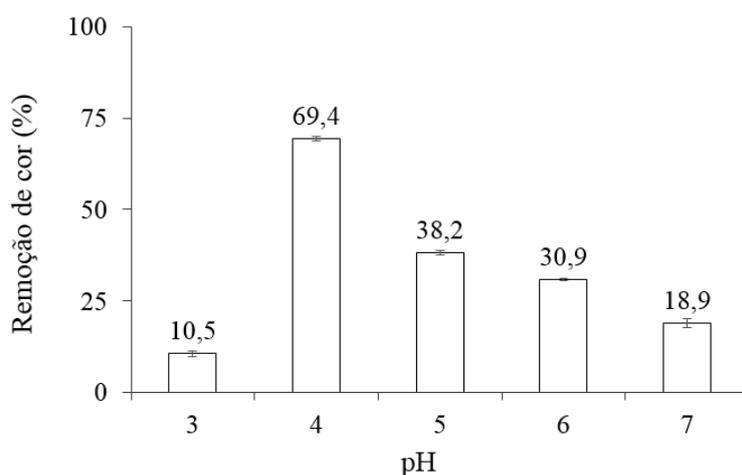


Figura 4.8: Efeito do pH na remoção de corante RR239 após 20 min de reação.

Destaca-se que o corante CP6R alcançou maior percentual de remoção em menos tempo quando comparado com o corante RR239 (Figuras 4.7 e 4.8). Isso indica que provavelmente a enzima tem mais afinidade pelo corante CP6R do que pelo corante RR239. Além disso, o fato da estrutura molecular deste último ser mais complexa pode ter dificultado as reações de oxidação-redução. Essa dependência da descoloração com a estrutura molecular do corante foi discutida na literatura por TAVARES *et al.* (2008).

Por outro lado, valores de pH acima de 6 não apresentaram valores significativos na remoção do CP6R (Figura 4.7). Efeito similar foi observado por ALI *et al.* (2013) na descoloração do mesmo corante utilizando uma peroxidase de soja. Os autores reportaram que a enzima foi mais ativa na faixa de pH entre 3 e 5. Outro estudo reportou que a remoção de corantes utilizando peroxidases provenientes de plantas é favorecida em meio ácido (NOUREN *et al.*, 2015).

Para o corante RR239, um pH ótimo de 4,5 e uma redução de cor de 58% foram encontrados por TAVARES *et al.* (2008). Para degradação do corante, os autores utilizaram uma lacase comercial (0,2 U/mL), mediador de elétrons 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (0,1 mmol/L) e uma solução de 50 mg/L de corante a 40°C. Percebe-se que o valor de pH e remoção de cor reportado pelos autores são muito similares aos obtidos no presente estudo após 20 min de reação (Figura 4.8), embora as condições reacionais tenham sido diferentes. Por outro lado, os autores não observaram nenhuma descoloração em pH 3 e atribuíram esse resultado à desnaturação da enzima em meios extremamente ácidos. De maneira similar, a enzima peroxidase de nabo utilizada no presente estudo também mostrou-se pouco efetiva nesse pH (Figura 4.8).

O efeito do pH tem forte relação com as mudanças conformacionais do sítio ativo da enzima, o que pode causar uma diminuição ou aumento da atividade enzimática. Isso porque a estrutura terciária das enzimas é formada através de interações. As interações eletrostáticas são sensíveis ao pH, de modo que variações deste podem resultar em mudanças no padrão de cargas e, conseqüentemente, na estrutura terciária da enzima (CARDOSO *et al.*, 2009).

Além disso, o pH ótimo da enzima pode ser diferente para cada substrato utilizado (FORGIARINI e DE SOUZA, 2007). No presente estudo, o pH ótimo foi coincidente para ambos os corantes (pH 4). No entanto, foram observadas diferenças nos valores de pH não ideais. Os valores de pH menos favoráveis para a degradação do corante CP6R e RR239 foram bastante distintos, correspondendo a 7 e 3, respectivamente. Nesses valores de pH observou-se o menor percentual de remoção de cor (Figuras 4.7 e 4.8) e taxas de reação bem reduzidas (Figuras 4.9 e 4.10). Desse modo, é possível concluir que, nas condições experimentais utilizadas, a atividade da enzima é menor em pH 7 para o corante CP6R e em pH 3 para o corante RR239.

Para o corante CP6R, observou-se que, após 1 min, a reação já tinha sido interrompida em pH 4, enquanto as reações seguiram acontecendo para os outros valores de pH (Figura 4.11). Por outro lado, para o corante RR239, passado 120 min nesse mesmo pH, a reação não tinha sido concluída (Figura 4.12). Isso indica que o RR239 foi mais resistente à degradação, visto que um tempo maior foi necessário para alcançar a máxima remoção de cor mesmo sob condição de pH ótimo.

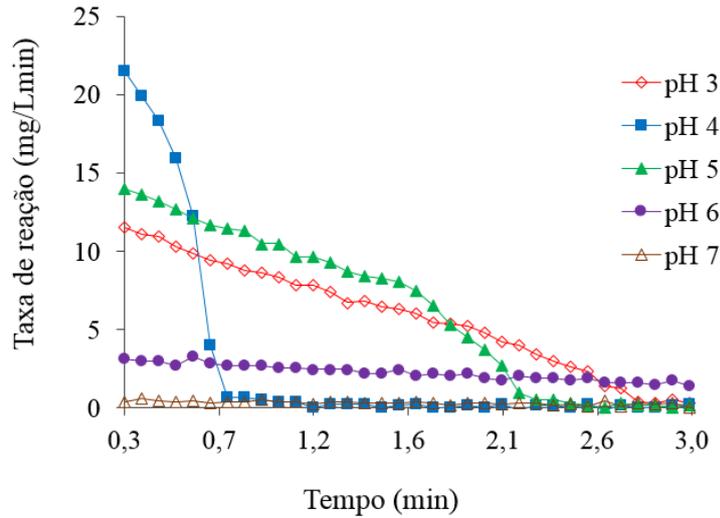


Figura 4.9: Taxa de reação do corante azo CP6R.

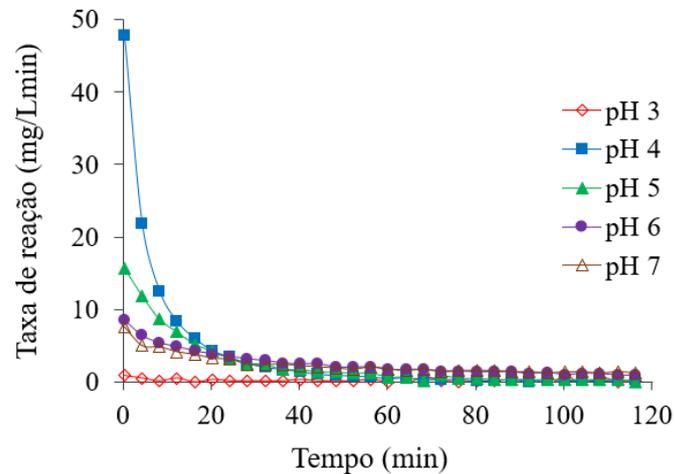


Figura 4.10: Taxa de reação do corante azo RR239.

4.2.6 Tempo ótimo de contato

O tempo ótimo de contato para o corante CP6R foi determinado em 0,75 min, tempo no qual se alcançou uma degradação significativa em pH 4. A partir desse tempo, uma descoloração lenta foi observada até o final do período de incubação (Figura 4.11). A taxa de reação caiu para 0,66 mg/Lmin quando alcançado 0,75 min, como apresentado na Figura 4.9.

Para o tempo ótimo (0,75 min), alcançou-se uma eficiência de remoção de 97,7%. Para alcançar uma degradação similar em pH 3 e 5, foi necessário um tempo de 2,7 e 2,2 min, respectivamente. Estudos anteriores também reportaram curtos tempos para a degradação deste corante por tratamento enzimático. ALI *et al.* (2013) observaram completa descoloração do CP6R em apenas 1 min em pH 5, usando uma peroxidase de soja na presença de HOBT. Por outro lado, AHMEDI *et al.* (2012) obtiveram uma degradação de 90% do corante Congo Red em 2 min de

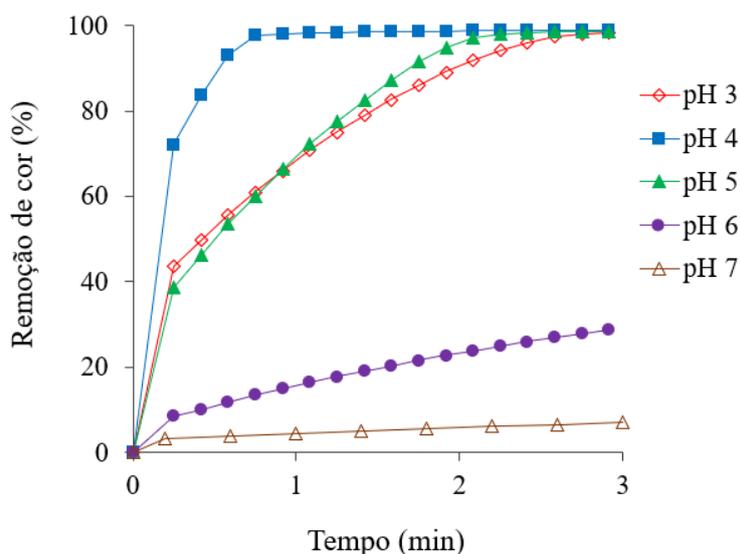


Figura 4.11: Remoção de corante azo CP6R.

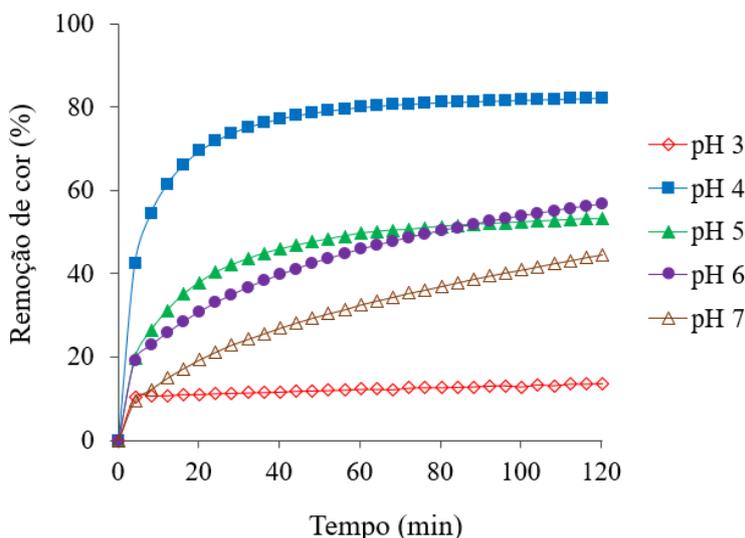


Figura 4.12: Remoção de corante azo RR239.

reação, utilizando uma peroxidase de nabo (*Brassica rapa*).

O corante RR239 mostrou-se mais resistente à degradação, pois para esse corante foi observado um tempo de contato ótimo de 48,3 min. Para esse instante de tempo, o valor da taxa foi de 0,94 mg/Lmin e obteve-se uma eficiência de remoção de 78,6%. A dificuldade em degradar o corante RR239 por via enzimática também foi observada por TAVARES *et al.* (2009). Os autores reportaram que o tempo requerido para a remoção desse corante foi maior que o requerido para outros corantes, de estrutura molecular mais simples. Desta forma, uma remoção de apenas 50% foi obtida após 50 min de reação sob condições similares às utilizadas no presente trabalho.

A Tabela 4.4 apresenta os valores da taxa de reação e eficiências de remoção de cor dos corantes estudados, no intervalo de tempo no qual a taxa de reação atingiu

valores inferiores a 1 mg/Lmin.

Tabela 4.4: Valores da taxa de reação e eficiências de remoção de cor dos corantes CP6R e RR239

Corante	Tempo (min)	Taxa de reação (mg/Lmin)	Remoção de cor (%)
CP6R	0,67	3,99	96,6
	0,75	0,66	97,7
RR239	44,3	1,05	78,0
	48,3	0,94	78,6

O tempo ótimo de contato do corante com a enzima varia dependendo da natureza química do corante e da fonte de enzima utilizada, desde que fixadas as demais condições experimentais. Estudos reportam que a maioria dos corantes tratados com peroxidases provenientes de plantas são descoloridos em até 1 h de tratamento (KALSOOM *et al.*, 2015).

4.3 Tratamentos sequenciais B+E e E+B

4.3.1 Testes preliminares enzimáticos

Os testes preliminares de degradação de cor no sistema biológico foram realizados para o efluente de entrada R1 e saída R2, considerando que o tratamento enzimático seria realizado antes (configuração E+B) e após (configuração B+E) o tratamento biológico.

O resultado do teste sem modificação do pH é apresentado na Figura 4.13. Observou-se que a degradação do corante pela enzima no pH do efluente (isto é aproximadamente 7) foi bastante reduzida, tanto na entrada R1 quanto na saída R2. O pH ao longo da operação do sistema biológico anaeróbio-aeróbio foi mantido próximo à neutralidade, como detalhado na seção 4.3.2 (Tabela 4.5). Por outro lado, como discutido na seção 4.2.5, a remoção de cor da solução pura de corante RR239 não mostrou-se muito efetiva em pH 7 (Figura 4.12).

Portanto, houve necessidade de reduzir o pH até o valor ótimo (pH 4), conforme determinado no estudo de degradação enzimática da solução pura de corante RR239. Os resultados do comportamento da concentração de RR239 ao longo do tempo após a correção do pH das amostras são apresentados na Figura 4.14. Observa-se como a concentração de corante diminuiu significativamente ao longo do tempo quando o valor do pH foi reduzido para 4, tanto nas amostras de entrada R1 quanto na saída R2.

Transcorridos 120 min, comprovou-se que a reação tinha sido completada, alcançando-se baixas concentrações de corante nas amostras analisadas. Esse estudo

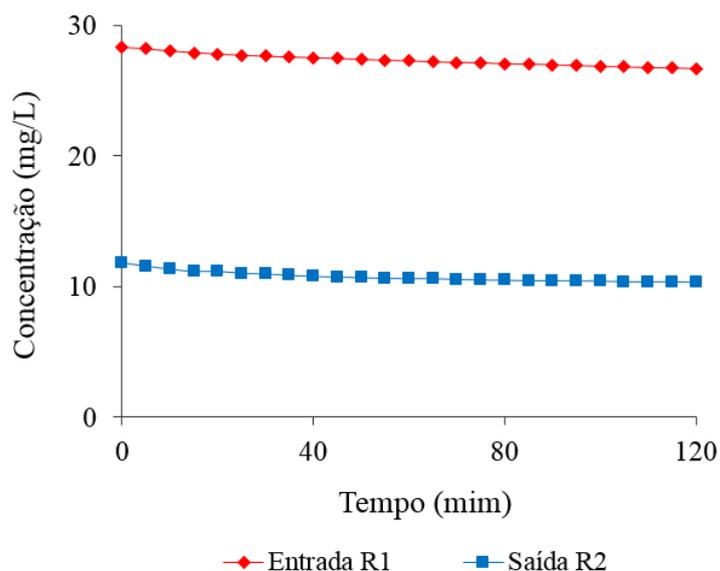


Figura 4.13: Concentração de corante RR239 ao longo do tempo quando aplicado o tratamento enzimático em amostras de entrada R1 e saída R2 sem ajuste do pH até valor 4 (teste sem modificação do pH).

permitiu demonstrar a efetividade do tratamento enzimático quando reduzido o valor do pH a 4. Além disso, foi possível estabelecer o tempo de reação necessário para realizar o tratamento enzimático nas duas configurações estudadas (B+E e E+B). Esse tempo foi estabelecido em 120 min.

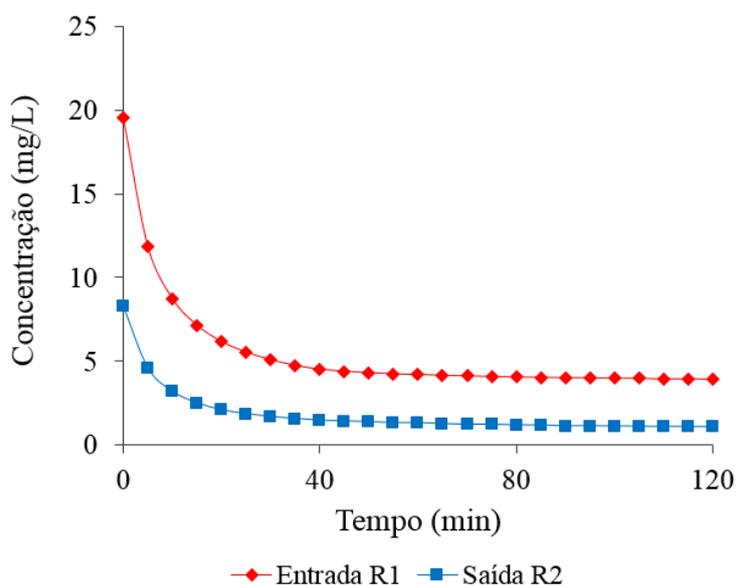


Figura 4.14: Concentração de corante RR239 ao longo do tempo quando aplicado o tratamento enzimático em amostras de entrada R1 e saída R2 com ajuste do pH até valor 4 (teste com modificação do pH).

4.3.2 Operação dos reatores biológicos e tratamentos sequenciais B+E e E+B

A fase experimental envolvendo a combinação de tratamento biológico e enzimático sequenciais teve uma duração total de 225 dias. Esse período foi dividido em 60, 85 e 80 dias para regime de *Start-up*, B+E e E+B, respectivamente. O regime *Start-up* foi finalizado uma vez comprovada a remoção completa de amônia, indicando o pleno desenvolvimento das bactérias nitrificantes. Após o regime de *Start-up*, iniciou-se a operação dos tratamentos sequenciais. Primeiramente foi realizado o tratamento sequencial B+E e posteriormente o E+B. Ambos regimes foram finalizados quando observada a completa estabilidade do sistema.

Os reatores foram operados a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. O valor médio de pH na saída R1 (reator anaeróbio) variou entre 7,5 e 7,7 e entre 6,8 e 7,4 na saída R2 (reator aeróbio) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Valores médios de pH em diferentes pontos de amostragem durante os regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B

Regime	pH		
	Entrada R1	Saída R1	Saída R2
<i>Start-up</i>	7,52	7,71	7,34
B+E	7,53	7,66	7,42
E+B	7,39	7,54	6,79

Pode-se observar que no R1, o pH na saída foi maior que na entrada, para todos os regimes. Esse comportamento pode estar associado à presença de cátions geradores de alcalinidade (íons de nitrogênio amoniacal), produzidos durante a digestão anaeróbia (SAKUMA, 2013). Segundo SARATALE *et al.* (2011), a redução biológica do corante azo também incrementa o pH devido à formação de aminas aromáticas, as quais são mais básicas do que o composto azo original. O valor médio de pH no R1 esteve próximo à neutralidade, conforme recomendado na operação de processos anaeróbios (RAJESHWARI *et al.*, 2000). De acordo com LETTINGA (1995), o pH deve ser mantido acima de 6,2.

Em contrapartida, uma redução no valor de pH foi observado no R2. Nos sistemas aeróbios, a liberação de prótons (íons hidrogênio) levam a uma redução do pH como parte do processo de nitrificação (ANTILEO *et al.*, 2013). No R2 se observou um decréscimo mais acentuado do pH durante o regime E+B, de modo que valores de pH abaixo de 7 foram observados (Tabela 4.5). Na literatura recomenda-se valores de pH na faixa entre 7 e 8 para a nitrificação efetiva nos processos aeróbios (ZOPPAS *et al.*, 2016). Devido a isso, durante os dias 177 até 203, o pH do efluente tratado enzimaticamente (afluente do sistema biológico) foi ajustado para 8,2 de modo a contrabalançar a perda de alcalinidade no reator aeróbio. Contudo, não

foram observadas mudanças significativas no comportamento do pH na saída R2, de modo que um novo ajuste foi realizado aumentando o pH para 9 a partir do dia 211 até o final da operação. Desta forma, alcançou-se um valor de pH acima de 7 na saída R2, sendo garantidas melhores condições para o processo de nitrificação (Figura 4.15). Na seção 4.3.5 será discutida a influência das mudanças de pH na resposta do sistema nesse regime de tratamento (E+B).

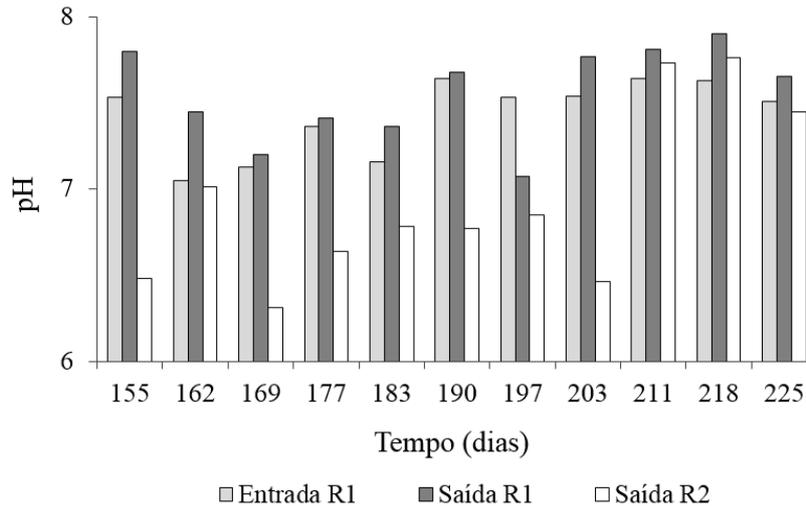


Figura 4.15: Valores de pH ao longo do tempo, no tratamento sequencial E+B.

Por outro lado, na descoloração de corantes por processos biológicos, tem sido reportada uma tolerância de pH relativamente alta, de modo que faixas de pH entre 5 e 9 não afetam o processo de descoloração (JADHAV *et al.*, 2008).

A concentração de OD no R2 esteve próxima a 5 mg/L. O oxigênio é uma variável limitante nos processos biológicos de tratamento aeróbio, pois esse parâmetro pode afetar significativamente a eficiência da nitrificação. A concentração de OD do presente estudo esteve dentro da faixa de valores reportados por outros autores, conforme mostrado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Valores de OD utilizado em diferentes estudos

OD (mg/L)	Referências
3 - 5	(KHAN <i>et al.</i> , 2010)
> 5	(CASTRO, 2016)
6	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
5,50	Presente estudo

4.3.3 Remoção de DQO

As Figuras 4.16 e 4.17, apresentam o comportamento da DQO nos regimes de *Start-up*, B+E e E+B. Como pode ser observado, a DQO na saída R2 durante o

regime de *Start-up* teve um valor em torno de 10 mg/L (Figura 4.16). Esse valor aumentou para 36 mg/L durante o tratamento B+E e para 67 mg/L durante o tratamento E+B, embora não tenha ocorrido uma variação considerável da DQO no afluente (entrada R1). A DQO no efluente de saída dos tratamentos estudados foi de 51 mg/L no regime B+E e de 67 mg/L no regime E+B. Ambos valores de DQO mostram-se adequados para o lançamento do efluente tratado em corpos hídricos. Segundo a Diretriz DZ-205, R6/2007 da Comissão Estadual de Controle Ambiental do Rio de Janeiro (CECA), o valor de DQO para efluentes da indústria têxtil não deve ultrapassar o limite de 200 mg/L.

Por outro lado, durante os primeiros dias de operação do regime E+B (dias 155 até 177), foi observado um comportamento decrescente da DQO na saída R1 e R2, que posteriormente teve uma tendência à estabilidade (Figura 4.17). Isso evidenciou a adaptação do sistema às novas condições impostas.

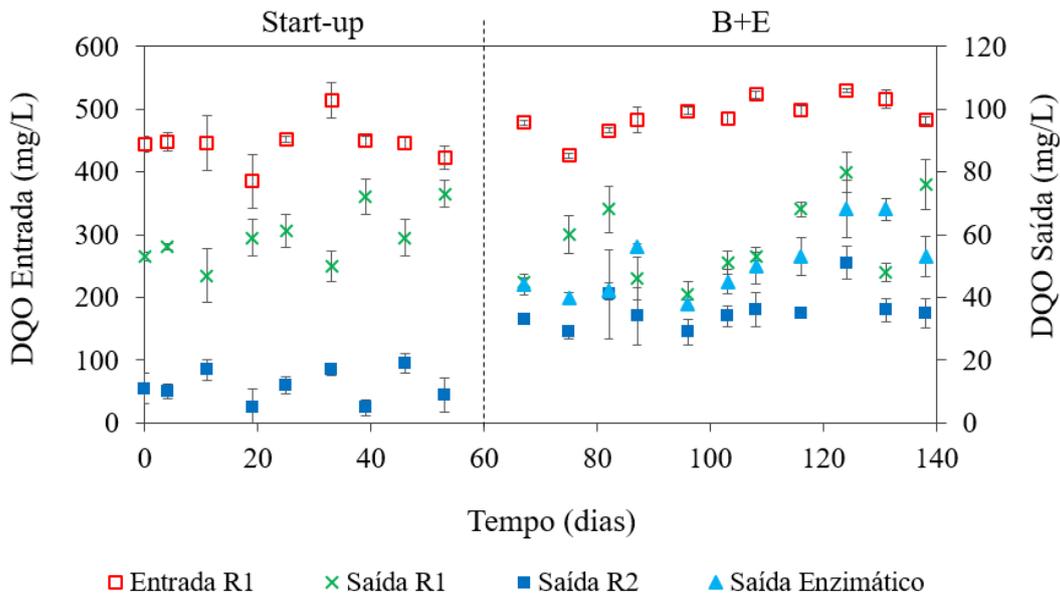


Figura 4.16: DQO ao longo do tempo, nos regimes de *Start-up* e tratamento sequencial B+E.

O tratamento enzimático aumentou ligeiramente a DQO, tanto no regime B+E quanto no E+B (Figuras 4.16 e 4.17). Por conseguinte, observou-se uma diminuição da eficiência global de remoção de DQO após realizado o tratamento enzimático (Figura 4.18). SILVA *et al.* (2012) também observaram um aumento da DQO de um efluente sintético contendo corante Turqueza Remazol G 133% de 56,4 mg/L para 238,8 mg/L, após o tratamento enzimático com peroxidase de nabo. Os autores atribuíram esse incremento à adição de matéria orgânica na forma de extrato enzimático de *Brassica campestris* ssp. *Rapifera*, ao corante residual e aos subprodutos solúveis da reação enzimática. Embora no presente estudo não tenha

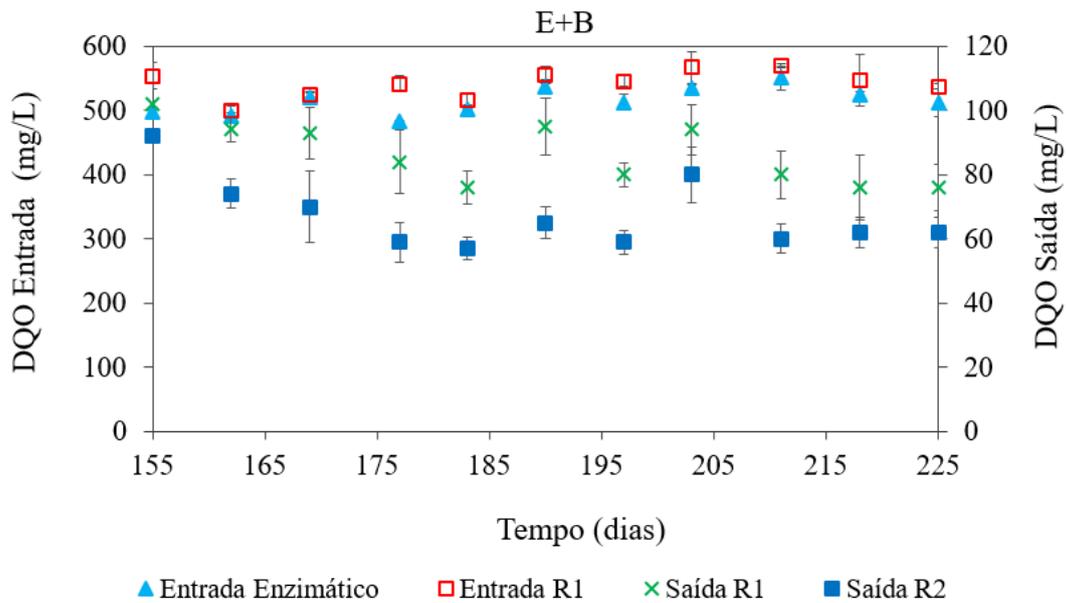


Figura 4.17: DQO ao longo do tempo, no tratamento sequencial E+B.

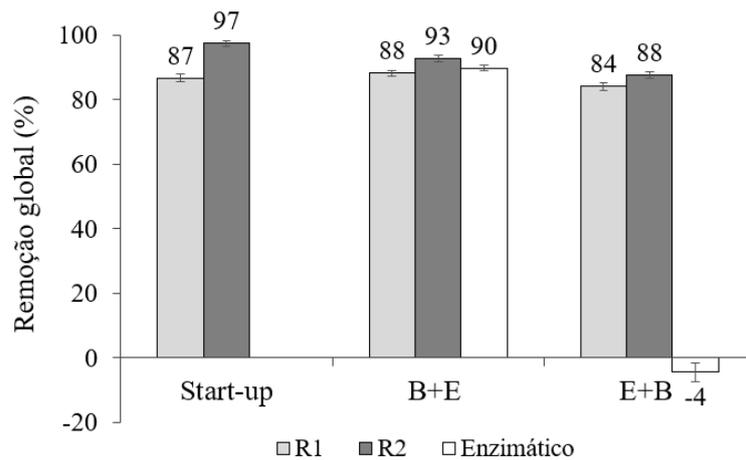


Figura 4.18: Valores médios de remoção global de DQO, nos regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B. A remoção de DQO em cada estágio do tratamento sequencial foi calculada com base no afluente (meio sintético).

vido utilizado um extrato enzimático bruto, os subprodutos da reação enzimática podem ter influenciado no ligeiro aumento da DQO observada, repercutindo em eficiência de remoção negativa de DQO. Também foi reportado por CRISTÓVÃO *et al.* (2009) um aumento da DQO de 394 mg/L para 3383 mg/L no tratamento com lacase de um efluente sintético contendo 3 corantes reativos (Reactive Black 5, Reactive Yellow 15 e Reactive Red 239). Os autores associaram esse incremento à formação de produtos resultantes do processo de tratamento.

A matéria orgânica afluente foi removida principalmente no R1, como ilustrado na Figura 4.18. Isso é um comportamento esperado devido ao R1 ter recebido

a maior carga orgânica em todos os regimes de tratamento. Os valores de DQO em cada reator e regime de tratamento podem ser observados na Tabela 4.7. Na Figura 4.18, observou-se uma pequena diminuição da eficiência de remoção de DQO no R1, de 88% para 84% do regime B+E para E+B, respectivamente. Embora pequena, essa diferença foi significativa para um intervalo de confiança de 95%, pois obteve-se um valor de p-value de 0,0003 no teste estatístico t de Student. Esse leve impacto negativo de um regime para outro está possivelmente associado à chegada dos produtos gerados durante a oxidação enzimática, que provavelmente prejudicaram a eficiência do reator. O corante, pelo contrário, não interferiu na remoção de matéria orgânica no reator anaeróbio, pois do regime de *Start-up* para o regime B+E a eficiência de remoção manteve-se praticamente constante (Figura 4.18).

Tabela 4.7: Valores médios de DQO em diferentes pontos de amostragem durante os regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B

Regime	DQO (mg/L)		
	Entrada R1	Saída R1	Saída R2
<i>Start-up</i>	445	59	12
B+E	489	58	36
E+B	542	86	67

Como observado na Figura 4.18, embora tenha favorecido a remoção de matéria orgânica, o R2 não contribuiu significativamente. A contribuição desse reator para a remoção global de DQO apresentou uma redução gradual desde o regime de *Start-up* até o regime E+B. A remoção de DQO no R2 em relação ao afluente diminuiu do regime de *Start-up* para B+E, de 10% para 5%. Do regime B+E para E+B, o decréscimo foi ainda menor, de 5% para 4%. Percebe-se, portanto, que a contribuição do R2 para a remoção global de DQO é pequena, e as reduzidas diferenças observadas de um regime para outro apresentam pouca significância. Por conseguinte, no presente estudo, o corante não afetou significativamente a atividade das bactérias heterotróficas aeróbias, embora O'NEILL *et al.* (2000) tenham reportado a inibição dessas bactérias por corantes, prejudicando a remoção de DQO no reator.

A remoção de matéria orgânica, em termos de DQO, também foi avaliada em estudo prévio cujo objetivo foi degradar o corante azo Reactive Red 141 por meio de tratamento sequencial anaeróbio - aeróbio (O'NEILL *et al.*, 2000). Esse corante de estrutura complexa e alta massa molar é bem similar ao empregado no presente estudo. Durante a sua degradação biológica, foram obtidos percentuais de remoção de DQO de 72,9% e 11,9% no reator anaeróbio e aeróbio, respectivamente. A remoção de DQO encontrada no presente trabalho foi ainda superior, de 88% no reator anaeróbio e de 37% no aeróbio, durante o tratamento B+E.

O valor médio da remoção global de DQO no tratamento sequencial B+E foi de 90%, entretanto, no tratamento sequencial E+B obteve-se 88% (Figura 4.18). Essas diferenças foram significativas para um intervalo de confiança de 95%, pois obteve-se um valor de p-value de 0,0115 no teste estatístico t de Student. Portanto, o tratamento sequencial que apresentou maior eficiência de remoção de DQO foi o B+E, com uma média de 90%. Nessa configuração, a DQO efluente do processo combinado foi de 51 mg/L.

4.3.4 Remoção de Nitrogênio

A concentração de nitrogênio inorgânico total (equivalente ao nitrogênio amoniacal, nitrito e nitrato) na entrada R1 e saída R2 do sistema biológico e o seu percentual de remoção podem ser observados na Figura 4.19. O nitrogênio na entrada R1 apresenta-se na forma de amônia, com valores médios de 30 mg/L para todos os regimes. No entanto, nitrogênio na saída R2 foi encontrado sob a forma de amônia, nitrito e nitrato. As concentrações das diferentes formas de nitrogênio na saída R2, em cada regime operacional, estão apresentadas na Figura 4.20.

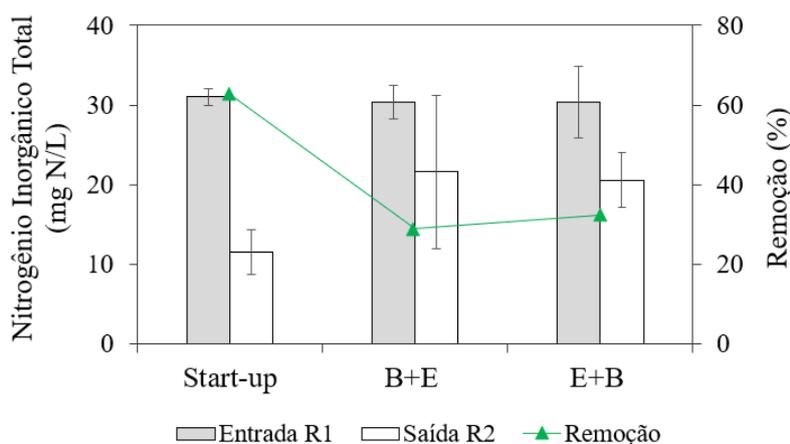


Figura 4.19: Valores médios de nitrogênio inorgânico total e sua remoção, nos regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B.

Vale lembrar que o meio sintético de alimentação usado nos experimentos é desprovido de nitrogênio orgânico. Além disso, o nitrogênio orgânico que porventura seria oriundo da quebra da molécula do corante é considerado desprezível em comparação com o nitrogênio proveniente de outras formas de nitrogênio inorgânico. Portanto, essa forma nitrogenada não foi levada em consideração nas análises.

Como ilustrado na Figura 4.19, a remoção de nitrogênio inorgânico nos regimes B+E e E+B foi muito similar, com valores em torno de 30%. A maior remoção alcançada pelo sistema foi de 63% durante o regime de *Start-up*. Os valores de remoção de nitrogênio obtidos nos tratamentos sequenciais (B+E e E+B) foram

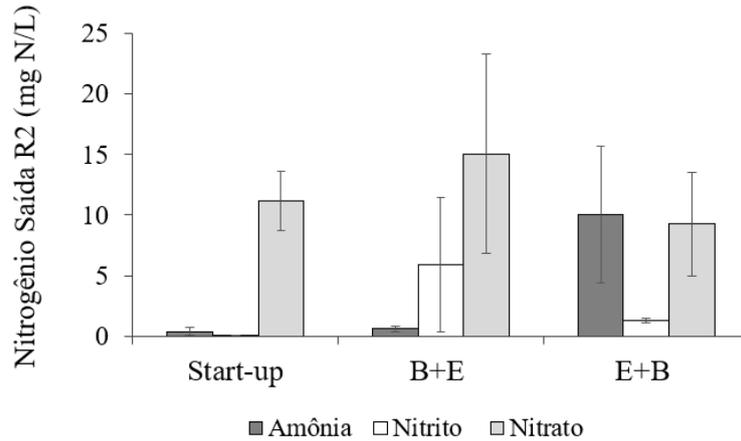


Figura 4.20: Valores de médios dos compostos nitrogenados (saída R2), nos regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B.

especialmente baixos e similares. Apesar disso, as concentrações de amônia na saída R2, para ambos os tratamentos, foram bastante distintas (Figura 4.20). No regime B+E, a concentração de amônia na saída R2 foi quase nula e no regime E+B a mesma alcançou valor em torno de 10 mg/L, o qual situa-se fora dos limites estabelecidos pela Norma Técnica NT-202, R10/1986 da CECA. Essa norma estabelece uma concentração máxima de 5 mg/L de nitrogênio amoniacal para efluentes líquidos. No regime E+B também se observou alta concentração de nitrogênio na forma de nitrato (9,2 mg/L), porém a concentração de nitrito foi menor (1,3 mg/L) (Figura 4.20).

Por outro lado, o regime B+E exibiu remoção quase total de amônia, como já dito anteriormente. Nesse regime, foi observada uma concentração de amônia na saída R2 de apenas 0,6 mg/L (Figura 4.20). Apesar disso, parcial conversão de amônia a nitrito foi observada, visto o acúmulo de 5,9 mg/L de nitrito no R2 (Figura 4.20). Esse último composto nitrogenado é considerado mais prejudicial para o meio ambiente (ZOPPAS *et al.*, 2016). O acúmulo de nitrito pode estar relacionado com a toxicidade do corante. Desta forma, o corante RR239 pode ter inibido o desenvolvimento das bactérias associadas à conversão de nitrito em nitrato (bactérias oxidadoras de nitrito-NOB), as quais mostraram-se mais sensíveis à presença do corante em relação às bactérias que fazem a conversão de amônia em nitrito (bactérias oxidadoras de amônia-AOB).

Na seção a seguir são discutidos e aprofundados os resultados de amônia, uma vez que o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a remoção deste composto nitrogenado, em particular.

4.3.5 Remoção de Amônia

As análises de amônia foram iniciadas após 39 dias de operação do sistema. A Figura 4.21 apresenta os valores de concentração de nitrogênio amoniacal obtidos ao longo do tempo, nos regimes de *Start-up*, B+E e E+B. Observa-se, durante o regime de *Start-up*, as baixas concentrações de amônia na saída R2, com valores próximos a zero. Esses resultados correspondem com o observado na Figura 4.20. Nota-se que no regime de *Start-up* a amônia foi majoritariamente removida e convertida completamente a nitrato. Isso demonstrou a efetividade do sistema no processo de nitrificação durante esse período de operação.

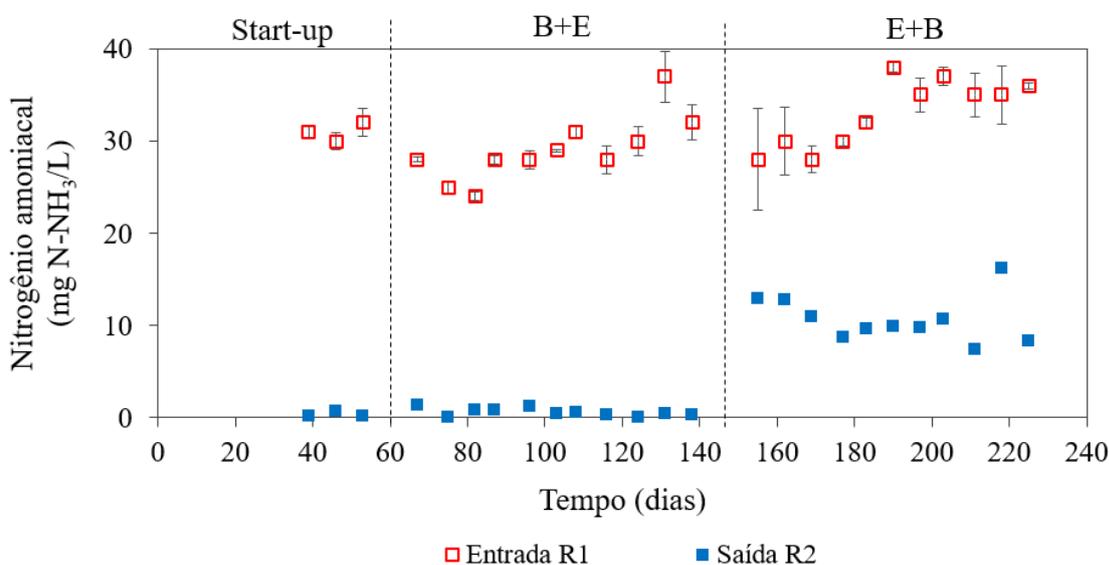


Figura 4.21: Concentração de amônia ao longo do tempo, nos regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B.

A Figura 4.22 mostra os valores médios de remoção de amônia em todos os regimes estudados. Percebe-se que, ao adicionar-se corante RR239 (regime B+E), o sistema também foi capaz de atingir bons níveis de remoção de nitrogênio amoniacal, obtendo-se uma eficiência de 98%. Entretanto, a remoção de amônia foi prejudicada com a mudança do regime, de B+E para E+B. No regime E+B obtiveram-se concentrações médias de amônia em torno a 10 mg/L na saída R2 (Figura 4.21) e em média uma remoção desse composto de 68% (Figura 4.22). Essas diferenças de remoção observadas entre um regime e outro foram bem significativas para um intervalo de confiança de 95%, pois obteve-se um valor de p-value de $1,58 \cdot 10^{-7}$ no teste estatístico t de Student.

Durante os primeiros dias de operação teve-se a suspeita de que as elevadas concentrações de amônia obtidas na saída R2 fossem devido ao comportamento do pH no reator. Na tentativa de melhorar a eficiência do sistema, aumentos

progressivos de pH foram realizados ao longo da operação, como descrito na seção 4.3.2.

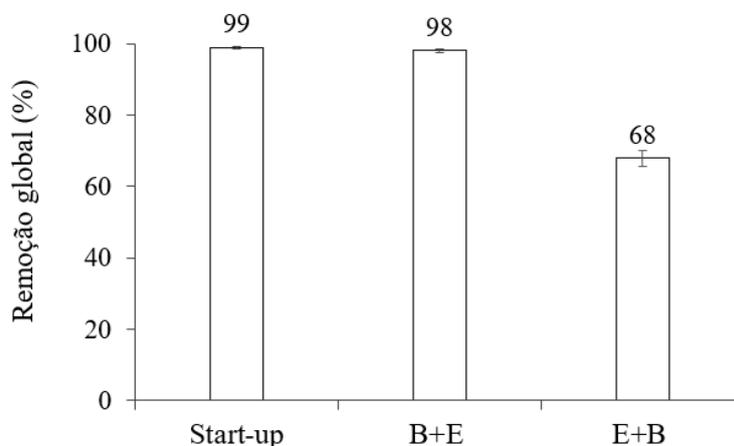


Figura 4.22: Valores médios de remoção global de amônia (sistema biológico), nos regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B.

A Tabela 4.8 apresenta a influência do pH na remoção de amônia durante períodos nos quais foram realizadas essas mudanças. Como observado, mesmo modificando o pH na entrada R1 do Período I para II, praticamente não houve mudança do pH na saída R2. No entanto, a remoção de amônia aumentou de 56% no Período I para 71% no Período II. Nesse último Período (dias 177 até 203), observou-se uma estabilidade do sistema, refletido no comportamento de amônia na saída R2 (Figura 4.21), cujos valores estiveram próximos a 10 mg/L. Na tentativa de continuar melhorando o comportamento do pH no R2 e, portanto, a eficiência de remoção de amônia do sistema, outro incremento do pH na entrada R1 foi realizado do Período II para o Período III. Percebe-se que o pH na saída R2 alcançou valores acima de 7 (como recomendado na literatura para sistemas nitrificantes), porém o sistema não conseguiu melhorar sua eficiência. Durante esse regime de tratamento (E+B), apenas foi possível obter uma remoção média de amônia de 68% (Figura 4.22). Considerando o que foi discutido anteriormente, conclui-se que os baixos percentuais obtidos podem estar relacionados aos subprodutos gerados durante a reação enzimática, que provavelmente tornaram-se prejudiciais às AOB.

Tabela 4.8: Valores médios de pH e amônia em diferentes períodos de operação do regime E+B

Período de operação/(Dias)	pH		Amônia	
	Entrada R1	Saída R2	Saída R2 (mg/L)	Remoção (%)
I (155 - 169)	7,24	6,60	12,23	56
II (177 - 203)	7,45	6,70	9,78	71
III (211 - 225)	8,00	7,65	10,66	70

Em um estudo de toxicidade realizado antes e após o tratamento enzimático de um efluente simulado contendo corante RR239 foi observado que a toxicidade do efluente tratado tinha sido aumentada após o tratamento com lacase (CRISTÓVÃO, 2010). Esse estudo indica a possibilidade de que compostos formados durante o tratamento enzimático possam ser tóxicos ao sistema biológico, especialmente às AOB, as quais tiveram seu desempenho comprometido no presente estudo.

O lançamento de nitrogênio amoniacal nos cursos hídricos pode ocasionar a aceleração do processo de eutrofização e, conseqüentemente, uma queda acentuada das concentrações de OD nas águas superficiais. Essa redução de OD também pode ser ocasionada pelo consumo de oxigênio que os processos de oxidação de amônia a nitrito e posteriormente a nitrato demandam, prejudicando severamente as espécies aquáticas (ZOPPAS *et al.*, 2016). Por isso, deve-se cumprir com o padrão de lançamento em relação a esse poluente nos corpos d'água. Igualmente deve ser considerado que o processo de transformação de amônia a outros compostos nitrogenados como nitrito e nitrato não resolvem o problema, sendo necessário processos complementares para a completa conversão de nitrogênio amoniacal a nitrogênio molecular. Embora não tenha sido objetivo desse trabalho, a remoção de nitrogênio pelo processo de nitrificação e desnitrificação deve ser estimulada.

4.3.6 Teor de Sólidos Aderidos

No tratamento biológico de efluentes usando sistemas com biomassa imobilizada, a avaliação do teor de sólidos aderidos é de extrema importância, já que influencia na degradação dos poluentes. Nesta seção, são apresentados os resultados obtidos a partir dessa análise.

A Figura 4.23 apresenta as concentrações de sólidos aderidos totais do R1 e do R2, em todos os regimes estudados. Destaca-se que o R1 apresentou o maior teor de sólidos em todos os regimes. Esse comportamento relaciona-se ao fato de que o R1 foi o responsável por receber a maior carga orgânica em todas as etapas de tratamento.

Como observado na Figura 4.23, entre um regime e outro percebem-se diferenças. A significância dessas diferenças foram avaliadas desde o ponto de vista estatístico por meio do teste t de Student. Os valores de p-value obtidos no teste podem ser observados na Tabela 4.9.

Considerando um intervalo de confiança de 95%, os resultados do teste t de Student evidenciaram que no R2 houve uma diminuição significativa de SAT do regime *Start-up* para B+E, pois o valor de p-value foi menor do que 0,05. Os sólidos totais nesse reator (R2) caíram de 7,38 g/L para 1,64 g/L, do regime de *Start-up* para B+E (Figura 4.23). ZHANG *et al.* (1995) reportaram que a presença de

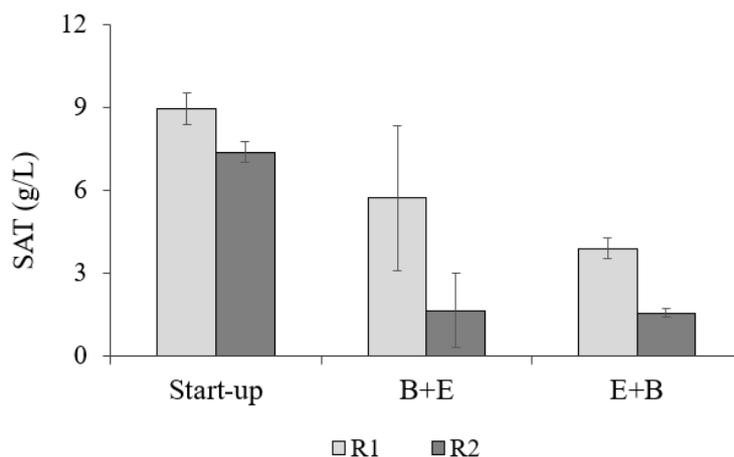


Figura 4.23: Concentração de SAT, nos regimes de *Start-up*, tratamento sequencial B+E e E+B.

Tabela 4.9: Valores de probabilidade de significância (p-value) obtidos nas comparações da concentração de SAT entre os diferentes regimes avaliados

Regimes comparados	Reator	p-value
<i>Start-up</i> - B+E	R1	0,1606
<i>Start-up</i> - B+E	R2	0,0429
B+E - E+B	R1	0,2529
B+E - E+B	R2	0,3901

corantes em reatores biológicos pode levar à queda na concentração de sólidos em comparação à situação na qual os mesmos não estão presentes. Dessa maneira, o corante azo RR239 pode ter afetado a biomassa aeróbia. Por outro lado, no R1 não foi observado um decréscimo significativo de SAT, uma vez que o valor de p-value foi de 0,1606.

Posteriormente, com a mudança do regime B+E para E+B também não foram observadas reduções significativas de SAT tanto no R1 quanto no R2, visto que os valores de p-value foram superiores a 0,05 (Tabela 4.9).

Na Figura 4.24, apresenta-se a relação de SAV/SAT. Percebe-se que essa relação foi muito similar nos regimes B+E e E+B. Os reatores R1 e R2 apresentaram valores de SAV/SAT acima de 0,69, indicando que a maior parte dos sólidos presentes nos reatores é de natureza orgânica (baixo teor de inertes).

4.3.7 Remoção de corante RR239

O comportamento da concentração de corante RR239 nos regimes B+E e E+B é apresentado nas Figuras 4.25 e 4.26, respectivamente.

No regime B+E, durante os primeiros dias de operação (67 até 103), foi observado um incremento gradual da concentração de corante no efluente de ambos os reatores

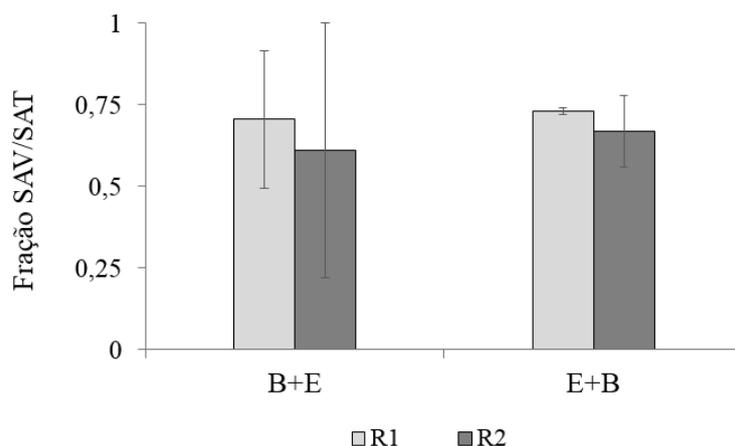


Figura 4.24: Relação de SAV/SAT, no tratamento sequencial B+E e E+B.

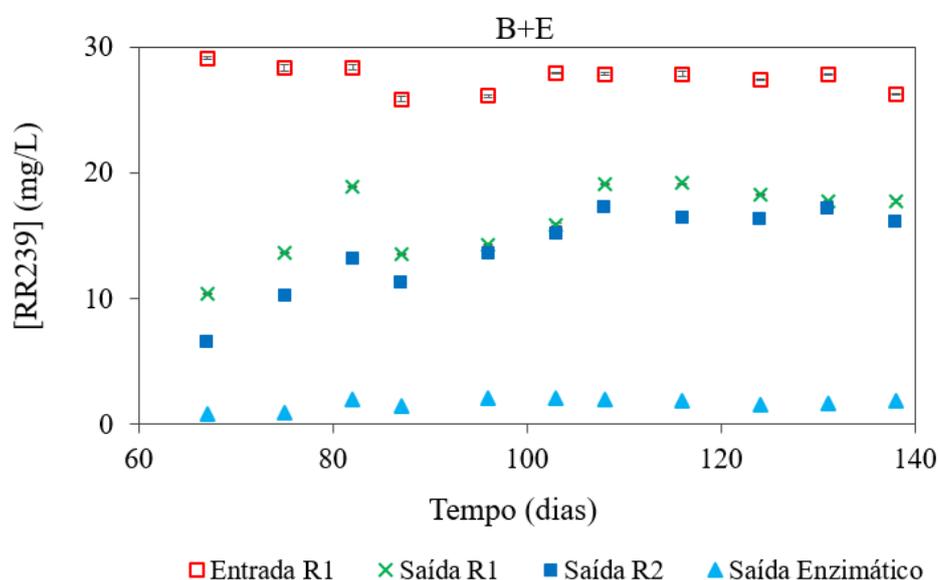


Figura 4.25: Concentração de corante RR239 ao longo do tempo, no tratamento sequencial B+E.

(R1 e R2) (Figura 4.25). Esse comportamento de diminuição da remoção do corante pode ter sido decorrente do fenômeno de biossorção, no qual parte do corante é inicialmente adsorvido pela biomassa aderida ao suporte. A biossorção é geralmente a primeira etapa da biodegradação de corantes (PEARCE *et al.*, 2003). Como parte desse fenômeno, uma intensificação da coloração avermelhada foi observada nos suportes ao longo desses dias de tratamento. A partir do dia 103, o sistema teve um comportamento estável até o final da operação, indicando que a remoção do corante via adsorção na biomassa tinha sido completada. Em outro estudo também observou-se um comportamento similar durante a etapa inicial do tratamento anaeróbio-aeróbio do corante azo Disperse Blue 79 (CRUZ e BUITRÓN, 2001). Os autores comprovaram, mediante estudo de adsorção, que 12 ciclos (aproximadamente

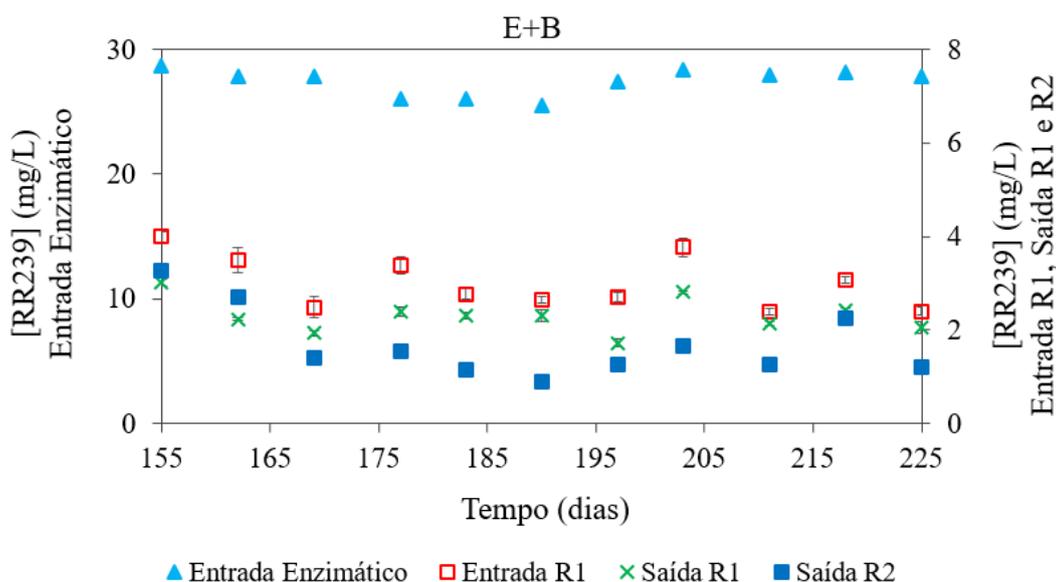


Figura 4.26: Concentração de corante RR239 ao longo do tempo, no tratamento sequencial E+B.

20 dias) foram necessários para alcançar a completa saturação da biomassa e do material suporte utilizado.

Como pode ser observado, a concentração do corante RR239 na saída R1 e R2 foram muito similares (Figuras 4.25 e 4.26). Por conseguinte, a contribuição do R2 para a remoção global de corante RR239 foi muito baixa (8% no regime B+E e 2% no E+B) (Figura 4.27). Com isso, observa-se que o reator aeróbio foi pouco efetivo na remoção do corante, assim como reportado em outros estudos. O'NEILL *et al.* (2000), avaliando o tratamento do corante azo Reactive Red 141, obtiveram eficiências de remoção de cor de 11% em reator aeróbio e de 63,9% em reator anaeróbio. De acordo com SINGH *et al.* (2015), a presença de oxigênio leva à baixa eficiência de remoção de cor, devido ao fato do oxigênio ser um acceptor de elétrons preferencial e possuir maior potencial de redução se comparado com a molécula de corante.

No regime B+E, o reator anaeróbio foi responsável por 41% de remoção do corante (Figura 4.27a) e, como já discutido anteriormente, o reator aeróbio teve pouca contribuição (8%). Estudos de descoloração por processos biológicos reportam que corantes de estrutura complexa e alta massa molar apresentam baixas eficiências de remoção de cor (SARATALE *et al.*, 2011). A complexidade da estrutura molecular apresenta relação com o tipo, a quantidade e a posição dos grupos substituintes no anel aromático. A presença desses grupos em diferentes posições no anel pode acelerar ou reduzir a taxa de descoloração ou inclusive provocar sua completa inibição. No caso dos corantes azo sulfonados, a posição e o número de

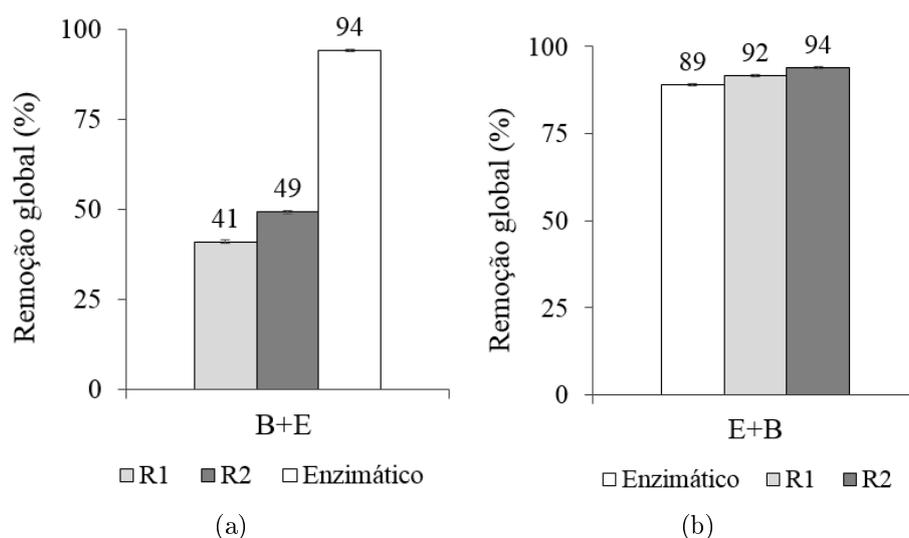


Figura 4.27: Valores médios de remoção global de corante RR239, nos tratamentos sequenciais B+E (a) e E+B (b). A remoção de corante RR239 em cada estágio do tratamento sequencial foi calculada com base no afluente (meio sintético).

grupos SO_3H afetam a velocidade de degradação do corante (SILVA *et al.*, 2012). Os fatores supramencionados podem estar relacionados com as baixas eficiências de remoção de cor obtidas na degradação biológica do corante azo sulfonado RR239.

Por outro lado, no regime B+E, uma remoção global de 94% foi obtida quando aplicado o tratamento enzimático a jusante do sistema biológico anaeróbio-aeróbio (Figura 4.27a). Também se observou um comportamento similar no regime E+B quando o efluente foi tratado enzimaticamente, alcançando-se 89% de eficiência somente pelo processo enzimático (Figura 4.27b). Esses resultados indicaram que o tratamento enzimático foi o principal responsável pela remoção de cor nos sistemas estudados.

Observa-se ainda que no regime E+B, o tratamento biológico pouco influenciou na degradação do corante RR239 (Figura 4.27b). Ao longo do tempo, a concentração de corante na saída dos reatores biológicos (saída R1 e R2) foi muito similar à concentração atingida após o tratamento enzimático (entrada R1), em média entre 1 e 3 mg/L (Figura 4.26).

Ambos os tratamentos sequenciais (B+E e E+B) apresentaram o mesmo percentual de remoção de RR239 (94%). Além disso, a concentração média de corante na saída dos tratamentos B+E e E+B foi bastante similar, correspondendo a 1,6 mg/L e 1,7 mg/L, respectivamente.

Capítulo 5

Conclusões

Neste estudo comprovou-se o efeito catalisador da peroxidase de nabo (*Brassica rapa*) na descoloração do corante azo CP6R. A enzima mostrou ser altamente efetiva, especialmente em valores de pH de 3, 4 e 5.

Os parâmetros ótimos da oxidação enzimática do corante CP6R foram encontrados em pH 4 e tempo de contato de 0,75 min. Nessas condições, foi alcançada 97,7% de remoção de cor. Por sua vez, o RR239 exibiu uma remoção de cor de quase 79%, nas condições ótimas de pH 4 e 48,3 min de reação. Esse último corante mostrou-se muito mais resistente à degradação, possivelmente devido às suas características estruturais.

O efluente sintético contendo o corante azo RR239 foi degradado por tratamento sequencial englobando processo enzimático (peroxidase de *Brassica rapa*) e biológico (biofiltro anaeróbio-aeróbio). O processo enzimático mostrou ser o principal responsável pela descoloração do corante RR239, enquanto a principal contribuição do reator anaeróbio foi a remoção de matéria orgânica. Por outro lado, o reator aeróbio permitiu a remoção de nitrogênio amoniacal por meio da nitrificação.

Alto percentual de eficiência de remoção de cor (94%) foi obtido em ambos os tratamentos sequenciais estudados (B+E e E+B), principalmente devido ao tratamento enzimático. Apesar disso, o tratamento enzimático não foi efetivo na remoção de DQO, uma vez que foi observado um ligeiro aumento desse parâmetro após esse processo, nos dois sistemas estudados. Esse comportamento pode ser atribuído à presença dos produtos gerados durante a oxidação enzimática.

A remoção de DQO foi superior no tratamento sequencial B+E, no qual alcançou-se uma eficiência de 90% e uma DQO média no efluente de saída de 51 mg/L. O valor de DQO foi adequado para o lançamento do efluente em corpos hídricos, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela CECA para esse parâmetro.

A remoção de nitrogênio amoniacal também foi superior no tratamento sequencial B+E. Nessa configuração, foi obtida uma eficiência de remoção de 98% e em média uma concentração de amônia de apenas 0,6 mg/L, na saída do tratamento.

De acordo com os padrões estabelecidos pela CECA, essa concentração foi adequada para o lançamento do poluente em corpos hídricos.

Os resultados também evidenciaram que o corante RR239 possivelmente exerceu efeito tóxico aos microrganismos anaeróbios, notadamente aos produtores de enzima azoredutase, pois apenas um percentual de 41% de remoção de cor foi obtido no reator anaeróbio. Porém, o corante RR239 não afetou a remoção de DQO nesse reator, que se manteve constante em relação à operação na ausência do corante.

O corante RR239 também pode ter exercido inibição às bactérias nitrificantes, particularmente às bactérias oxidadoras de nitrito. Tal evidência se justifica pelo acúmulo de nitrito no reator aeróbio na configuração B+E. No entanto, a remoção de amônia foi de 98% nessa configuração.

Na configuração E+B, observou-se que os produtos da oxidação enzimática provavelmente foram tóxicos à biomassa anaeróbia. Os metabólitos formados podem ter levado à ligeira redução da remoção de DQO no reator anaeróbio.

Os produtos da oxidação enzimática também exerceram efeito adverso às bactérias oxidadoras de amônia, repercutindo em remoção de amônia de apenas 68% (configuração E+B).

Em suma, os resultados apontaram o tratamento sequencial B+E como sendo mais efetivo no tratamento do efluente sintético estudado em comparação com a configuração E+B, obtendo-se elevadas remoções de cor, DQO e nitrogênio amoniacal.

Capítulo 6

Sugestões para trabalhos futuros

Para dar continuidade ao presente estudo, sugere-se:

- ∞ Determinar outros parâmetros ótimos do processo de degradação enzimática que não foram considerados nesse estudo, como: temperatura, concentração de peróxido, mediador de elétrons e enzima. Desta forma, serão conhecidas as melhores condições de operação do processo, o que permitirá economizar tempo e recursos;
- ∞ Aumentar a zona aeróbia do tratamento sequencial E+B, de modo que possa ser melhorada a remoção de nitrogênio amoniacal sem prejudicar a remoção de corante RR239;
- ∞ Aplicar novas configurações de tratamento, a partir de processos biológicos e enzimáticos com ciclos ou processos complementares, que permitam completa remoção de nitrogênio (nitrificação e desnitrificação combinadas);
- ∞ Avaliar a toxicidade do efluente tratado, principalmente do tratamento sequencial B+E que mostrou o melhor desempenho e verificar se ocorre redução ou aumento da toxicidade depois do tratamento proposto;
- ∞ Identificar os metabólitos gerados após cada etapa de tratamento, a fim de determinar exatamente quais compostos inibem o desenvolvimento dos microrganismos e o mecanismo reacional envolvido em cada processo.

Referências Bibliográficas

- AHMED, S. M., EL-ZOMRAWY, A. A., AL-KAMALI, A. S., et al., 2015, “Ponceau 6R dye decoloration and chromate reduction simultaneously in acid medium”, *Arabian Journal of Chemistry*, v. 8, n. 4, pp. 500–505.
- AHMEDI, A., ABOUSEOUD, M., COUVERT, A., et al., 2012, “Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (*Brassica rapa*) peroxidase”, *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 67, n. 7-8, pp. 429–436.
- AKHTAR, S., KHAN, A. A., HUSAIN, Q., et al., 2004, “An economical, simple and high yield procedure for the immobilization/stabilization of peroxidases from turnip roots”, *Journal of Scientific and Industrial Research*, v. 63, pp. 540–547.
- ALI, L., ALGAITHI, R., HABIB, H. M., et al., 2013, “Soybean peroxidase-mediated degradation of an azo dye—a detailed mechanistic study”, *BMC biochemistry*, v. 14, n. 1, pp. 1.
- ALMEIDA, E., ASSALIN, M. R., ROSA, M. A., et al., 2004, “Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio”, *Química Nova*, v. 27, n. 5, pp. 818–824.
- AMARAL, F. M., 2015, *Remoção de corantes azo em sistema de reator anaeróbio/aeróbio e em reator UASB micro-aerado*. Tese de Doutorado, CTG/UFPE, Recife.
- AMARAL, J. D. F., 2011, *Purificação e caracterização de uma peroxidase de raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e sua aplicação na remoção de fenóis*. Tese de Mestrado, UFC, Ceará.
- AMBATKAR, M., MUKUNDAN, U., 2012, “Enzymatic treatment of wastewater containing dyestuffs using different delivery systems”, *Scientific Reviews and Chemical Communications*, v. 2, n. 1, pp. 31–40.
- ANTILEO, C., MEDINA, H., BORNHARDT, C., et al., 2013, “Actuators monitoring system for real-time control of nitrification–denitrification via

- nitrite on long term operation”, *Chemical Engineering Journal*, v. 223, pp. 467–478.
- APHA, 1992, *Standard methods for examination of water and wastewater*. 18 ed. Washington DC, USA, American Publishing Association.
- APHA, 2005, *Standard methods for examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington DC, USA, American Public Health Association.
- ARAUJO, T. L. D. S., 2014, *Desempenho de reator anaeróbio híbrido (leito fixo e manta de lodo) tratando esgoto sanitário em escala piloto*. Tese de Mestrado, USP, São Paulo.
- ATHALATHIL, S., STÜBER, F., BENGGOA, C., et al., 2014, “Characterization and performance of carbonaceous materials obtained from exhausted sludges for the anaerobic biodecolorization of the azo dye Acid Orange II”, *Journal of hazardous materials*, v. 267, pp. 21–30.
- AYED, L., ACHOUR, S., BAKHROUF, A., 2011, “Application of the mixture design to decolourise effluent textile wastewater using continuous stirred bed reactor”, *Water SA*, v. 37, n. 1, pp. 21–26.
- BARBOSA, B. C. A., VIDAL, C. B., WANDERLEY, C. R. P., et al., 2009. “Tratamento biológico anaeróbio-aeróbio para remoção de corante de água residuária têxtil sintética”. 23 jan. 2017, 9:32.
- BASSIN, J. P., DEZOTTI, M., 2008, “Tratamento primário, secundário e terciário de efluentes”. In: *Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos*, 5 ed., cap. 3, pp. 84–197, Rio de Janeiro, Brasil, E-papers.
- BASSIN, J. P., 2008, *Nitrificação de efluentes salinos em reatores de leito móvel com biofilme e biorreatores agitados*. Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- BASTOS, A., CORREIA, P., DE LIMA, S., et al., 2015, “Aplicação de Horseradish Peroxidase imobilizada na descoloração de azul de metileno”, *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, v. 1, n. 2, pp. 7995–8002.
- BETTIN, F., BOFF, N. A., DA CONCEIÇÃO, R. S., et al., 2016. “Aplicação de Lacases bruta e comercial na descoloração de misturas de corantes das classes antraquinona, azo e trifenilmetano”. .

- BILA, D. M., AZEVEDO, E. B., DEZOTTI, M., 2008, “Ozonização e processos oxidativos avançados”. In: *Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos*, 5 ed., cap. 4, pp. 245–257, Rio de Janeiro, Brasil, E-papers.
- BONAKDARPOUR, B., VYRIDES, I., STUCKEY, D. C., 2011, “Comparison of the performance of one stage and two stage sequential anaerobic–aerobic biological processes for the treatment of reactive-azo-dye-containing synthetic wastewaters”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 65, n. 4, pp. 591–599.
- BRADFORD, M. M., 1976, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, pp. 248–254.
- BULL, A. T., WARD, A. C., GOODFELLOW, M., 2000, “Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 3, pp. 573–606.
- CARDOSO, C. L., MORAES, M. C. D., CASS, Q. B., 2009, “Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas”, *Química Nova*, v. 32, n. 1, pp. 175–187.
- CARMEN, Z., DANIELA, S., 2012, “Textile organic dyes–characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents—a critical overview”, *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention-Environmental and Analytical Update*, pp. 55–86.
- CASTRO, F. D., BASSIN, J. P., DEZOTTI, M., 2016, “Treatment of a simulated textile wastewater containing the Reactive Orange 16 azo dye by a combination of ozonation and moving-bed biofilm reactor: evaluating the performance, toxicity, and oxidation by-products”, *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, pp. 1–10.
- CASTRO, F. D., 2016, *Degradação do corante azo Laranja Reativo 16 por ozônio, identificação dos intermediários e metabolização em reator MBBR*. Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- CELEBI, M., ALTIKATOGLU, M., AKDESTE, Z. M., et al., 2013, “Determination of decolorization properties of reactive blue 19 dye using horseradish peroxidase enzyme”, *Turkish Journal of Biochemistry*, v. 38, n. 2, pp. 200–206.

- CERRÓN, L. M., ROMERO-SUÁREZ, D., VERA, N., et al., 2015, “Decolorization of Textile Reactive Dyes and Effluents by Biofilms of *Trametes polyzona* LMB-TM5 and *Ceriporia* sp. LMB-TM1 Isolated from the Peruvian Rainforest”, *Water, Air and Soil Pollution*, v. 226, n. 8, pp. 235.
- CHENGALROYEN, M. D., DABBS, E. R., 2013, “The microbial degradation of azo dyes: minireview”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 3, pp. 389–399.
- COGO, M. D. C., 2011, *Estudo de caracterização e disposição dos resíduos de uma indústria têxtil do Estado do Rio Grande do Sul*. Tese de Doutorado, UFRGS, Rio Grande do Sul.
- COSTA, M. C., SANTOS, A. B. D., MOTA, F. S. B., et al., 2010, “Reductive decolourisation of azo dyes and the effect of redox mediators in the presence of the electron acceptor sulfate”, *Química Nova*, v. 33, n. 7, pp. 1514–1519.
- COSTA, R. D. A., 2016, *Degradação enzimática de clorofenol em microrreator*. Tese de Doutorado, USP, São Paulo.
- CÓRDOBA, A., ALASINO, N., ASTEASUAIN, M., et al., 2015, “Mechanistic evaluation of hematin action as a horseradish peroxidase biomimetic on the 4-aminoantipyrine/phenol oxidation reaction”, *Chemical Engineering Science*, v. 129, pp. 249–259.
- CRISTÓVÃO, R. O., TAVARES, A. P., LOUREIRO, J. M., et al., 2009, “Treatment and kinetic modelling of a simulated dye house effluent by enzymatic catalysis”, *Bioresource technology*, v. 100, n. 24, pp. 6236–6242.
- CRISTÓVÃO, R. O., TAVARES, A. P., FERREIRA, L. A., et al., 2009, “Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase”, *Bioresource technology*, v. 100, n. 3, pp. 1094–1099.
- CRISTÓVÃO, R. O., 2010, *Degradation of dye-containing textile effluents by enzymatic catalysis*. Tese de Doutorado, Universidade do Porto, Portugal.
- CRUZ, A., BUITRÓN, G., 2001, “Biodegradation of disperse blue 79 using sequenced anaerobic/aerobic biofilters”, *Water Science and Technology*, v. 44, n. 4, pp. 159–166.
- DA SILVA, M. E. R., FIRMINO, P. I. M., DE SOUSA, M. R., et al., 2012, “Sequential anaerobic/aerobic treatment of dye-containing wastewaters:

- colour and COD removals, and ecotoxicity tests”, *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 166, n. 4, pp. 1057–1069.
- DA SILVA, M. R., DE SÁ, L. R. V., RUSSO, C., et al., 2011. “The use of HRP in decolorization of reactive dyes and toxicological evaluation of their products”. 19 mar. 2017, 16:52.
- DASGUPTA, J., SIKDER, J., CHAKRABORTY, S., et al., 2015, “Remediation of Textile Effluents by Membrane Based Treatment Techniques: A State of the Art Review”, *Journal of Environmental Management*, v. 147, n. 01, pp. 55–72.
- DE AMORIM, C. C., LEÃO, M. M. D., MOREIRA, R. D. F. P. M., 2009, “Comparação entre diferentes processos oxidativos avançados para degradação de corante azo”, *Eng Sanit Ambient*, v. 14, n. 4, pp. 543–550.
- DE FREITAS, K. R., 2002, *Caracterização e reuso de efluentes do processo de beneficiamento da indústria têxtil*. Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis.
- DE LIMA, R. O. A., BAZO, A. P., SALVADORI, D. M. F., et al., 2007, “Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 626, n. 1, pp. 53–60.
- DE LUNA, M. D. G., FLORES, E. D., GENUINO, D. A. D., et al., 2013, “Adsorption of Eriochrome Black T (EBT) dye using activated carbon prepared from waste rice hulls—Optimization, isotherm and kinetic studies”, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, n. 4, pp. 646–653.
- DE MORAES, S. G., FREIRE, R. S., DURAN, N., 2000, “Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes”, *Chemosphere*, v. 40, n. 4, pp. 369–373.
- DE OLIVEIRA, D. V. M., 2008, *Caracterização dos parâmetros de controle e avaliação de desempenho de um reator biológico com leito móvel (MBBR)*. Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- DEMARCHE, P., JUNGHANNS, C., NAIR, R. R., et al., 2012, “Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship”, *Biotechnology advances*, v. 30, n. 5, pp. 933–953.

- DEZOTTI, M., 2008, “Parâmetros para caracterização de efluentes-qualidade das águas de despejo”. In: *Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos*, 5 ed., cap. 2, pp. 22–39, Rio de Janeiro, Brasil, E-papers.
- DOS SANTOS, A. B., CERVANTES, F. J., VAN LIER, J. B., 2007, “Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology”, *Bioresource technology*, v. 98, n. 12, pp. 2369–2385.
- DOS SANTOS, R. V., VEIBER, R. E., 2009. “Foto-oxidação heterogênea aplicada na degradação de corantes reativos”. 20 nov. 2016, 17:19.
- DURAN, N., ESPOSITO, E., 2000, “Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review”, *Applied catalysis B: environmental*, v. 28, n. 2, pp. 83–99.
- EL-ZOMRAWY, A., 2013, “Kinetic studies of photoelectrocatalytic degradation of Ponceau 6R dye with ammonium persulfate”, *Journal of Saudi Chemical Society*, v. 17, n. 4, pp. 397–402.
- ELY, C., KEMPKA, A. P., SKORONSKI, E., 2016, “Aplicação de peroxidases no tratamento de efluentes”, *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 5, pp. 1537–1549.
- ENAYATZAMIR, K., ALIKHANI, H. A., COUTO, S. R., 2009, “Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor”, *Journal of hazardous materials*, v. 164, n. 1, pp. 296–300.
- ERTUGAY, N., ACAR, F. N., 2014, “The degradation of Direct Blue 71 by sono, photo and sonophotocatalytic oxidation in the presence of ZnO nanocatalyst”, *Applied Surface Science*, v. 318, pp. 121–126.
- FARIAS, S., 2013, *Utilização da enzima horseradish peroxidase na lavagem pós-tingimento para remoção de corante reativo não fixado às fibras de algodão*. Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis.
- FORGIARINI, E., 2006, *Degradação de corantes e efluentes têxteis pela enzima Horseradish Peroxidase (HRP)*. Tese de Mestrado, UFSC, Florianópolis.
- FORGIARINI, E., DE SOUZA, A. A. U., 2007, “Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP)”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 147, n. 3, pp. 1073–1078.

- FRIJTERS, C., VOS, R., SCHEFFER, G., et al., 2006, “Decolorizing and detoxifying textile wastewater, containing both soluble and insoluble dyes, in a full scale combined anaerobic/aerobic system”, *Water research*, v. 40, n. 6, pp. 1249–1257.
- GHALY, A., ANANTHASHANKAR, R., ALHATTAB, M., et al., 2014, “Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review”, *Journal of Chemical Engineering and Process Technology*, v. 5, n. 1, pp. 1.
- GLENTHAM, L. S., 2017. “Crystal Ponceau 6R, product specification”. 10 feb. 2017, 19:08.
- GÜNEŞ, Y., ATAV, R., NAMIRTI, O., 2012, “Effectiveness of ozone in decolorization of reactive dye effluents depending on the dye chromophore”, *Textile Research Journal*, v. 82, n. 10, pp. 994–1000.
- GONÇALVES, R. F., ZEGHAL, S., SAMMUT, F., et al., 1993, “Remoção de nutrientes de águas residuárias através de biofiltros submersos de alta taxa”. In: *Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 17, pp. 3–20. ABES.
- GONÇALVES, R. F., CHERNICHARO, C., ANDRADE NETO, C., et al., 2001, “Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilme”, *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbio. Projeto PROSAB*, pp. 171–199.
- GONZALEZ, S. M. I., 2010, *Actividades biocatalíticas dependientes de peróxido de hidrógeno. Estudio cinético de los mecanismos y diseño de biosensores específicos*. Tese de Doutorado, Universidade Castilla-La Mancha, Espanha.
- GUARATINI, C. C., ZANONI, M. V. B., 2000, “Corantes têxteis”, *Química nova*, v. 23, n. 1, pp. 71–78.
- GUO, W., NGO, H.-H., DHARMAWAN, F., et al., 2010, “Roles of polyurethane foam in aerobic moving and fixed bed bioreactors”, *Bioresource Technology*, v. 101, n. 5, pp. 1435–1439.
- HADDAJI, D., BOUSSELMI, L., SAADANI, O., et al., 2015, “Enzymatic degradation of azo dyes using three macrophyte species: *Arundo donax*, *Typha angustifolia* and *Phragmites australis*”, *Desalination and Water Treatment*, v. 53, n. 4, pp. 1129–1138.

- HAMID, M., 2009, “Potential applications of peroxidases”, *Food chemistry*, v. 115, n. 4, pp. 1177–1186.
- HASSEMER, M. E. N., SENS, M. L., 2002, “Tratamento do efluente de uma indústria têxtil. Processo físico-químico com ozônio e coagulação/floculação”, *Engenharia sanitária e ambiental*, v. 7, n. 1, pp. 30–36.
- HOLKAR, C. R., JADHAV, A. J., PINJARI, D. V., et al., 2016, “A critical review on textile wastewater treatments: possible approaches”, *Journal of environmental management*, v. 182, pp. 351–366.
- JADHAV, S. U., JADHAV, M. U., KAGALKAR, A. N., et al., 2008, “Decolorization of Brilliant Blue G dye mediated by degradation of the microbial consortium of *Galactomyces geotrichum* and *Bacillus* sp.” *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, n. 6, pp. 563–570.
- JIN, X.-C., LIU, G.-Q., XU, Z.-H., et al., 2007, “Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6”, *Applied microbiology and biotechnology*, v. 74, n. 1, pp. 239–243.
- JOSHI, M., BANSAL, R., PURWAR, R., 2004, “Colour removal from textile effluents”, *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, v. 29, pp. 239–259.
- KALSOOM, U., BHATTI, H. N., ASGHER, M., 2015, “Characterization of plant peroxidases and their potential for degradation of dyes: a review”, *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 176, n. 6, pp. 1529–1550.
- KARADAG, D., TURAN, M., AKGUL, E., et al., 2007, “Adsorption equilibrium and kinetics of reactive black 5 and reactive red 239 in aqueous solution onto surfactant-modified zeolite”, *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 52, n. 5, pp. 1615–1620.
- KARIMI, S., ABDULKHANI, A., GHAZALI, A. H. B., et al., 2009, “Color remediation of chemimechanical pulping effluent using combination of enzymatic treatment and Fenton reaction”, *Desalination*, v. 249, n. 2, pp. 870–877.
- KHAN, S. J., ILYAS, S., JAVID, S., et al., 2010, “Performance of suspended and attached growth MBR systems in treating high strength synthetic wastewater”, *Bioresource technology*, v. 9, pp. 5331–5336.

- KOUSHA, M., DANESHVAR, E., SOHRABI, M. S., et al., 2012, “Adsorption of acid orange II dye by raw and chemically modified brown macroalga *Stoechospermum marginatum*”, *Chemical Engineering Journal*, v. 192, pp. 67–76.
- KULSHRESTHA, Y., HUSAIN, Q., 2007, “Decolorization and degradation of acid dyes mediated by salt fractionated turnip (*Brassica rapa*) peroxidases”, *Toxicological and Environmental Chemistry*, v. 89, n. 2, pp. 255–267.
- KUNZ, A., PERALTA-ZAMORA, P., DE MORAES, S. G., et al., 2002, “Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis”, *Química nova*, v. 25, n. 1, pp. 78–82.
- KURNIK, K., TREDER, K., SKORUPA-KŁAPUT, M., et al., 2015, “Removal of phenol from synthetic and industrial wastewater by potato pulp peroxidases”, *Water, Air and Soil Pollution*, v. 226, n. 8, pp. 1–19.
- LAU, W.-J., ISMAIL, A. F., 2009, “Polymeric nanofiltration membranes for textile dye wastewater treatment: preparation, performance evaluation, transport modelling, and fouling control—a review”, *Desalination*, v. 245, n. 1-3, pp. 321–348.
- LAU, Y.-Y., WONG, Y.-S., TENG, T.-T., et al., 2014, “Coagulation-flocculation of azo dye Acid Orange 7 with green refined laterite soil”, *Chemical Engineering Journal*, v. 246, pp. 383–390.
- LEENA, R., RAJ, S. D., 2008, “Bio-decolourization of textile effluent containing Reactive Black-B by effluent-adapted and non-adapted bacteria”, *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 18, pp. 3309–3313.
- LETTINGA, G., 1995, “Anaerobic digestion and wastewater treatment systems”, *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 67, n. 1, pp. 3–28.
- LIM, J.-W., SENG, C.-E., LIM, P.-E., et al., 2011, “Nitrogen removal in moving bed sequencing batch reactor using polyurethane foam cubes of various sizes as carrier materials”, *Bioresource technology*, v. 102, n. 21, pp. 9876–9883.
- LIU, H.-L., CHIOU, Y.-R., 2005, “Optimal decolorization efficiency of Reactive Red 239 by UV/TiO₂ photocatalytic process coupled with response surface methodology”, *Chemical Engineering Journal*, v. 112, n. 1, pp. 173–179.
- LUANGDILOK, W., PANSWAD, T., 2000, “Effect of chemical structures of reactive dyes on color removal by an anaerobic-aerobic process”, *Water Science and Technology*, v. 42, n. 3-4, pp. 377–382.

- MARTIN, R. W., BAILLOD, C. R., MIHELICIC, J. R., 2005, “Low-temperature inhibition of the activated sludge process by an industrial discharge containing the azo dye acid black 1”, *Water research*, v. 39, n. 1, pp. 17–28.
- MATE, M. S., PATHADE, G., 2012, “Biodegradation of C.I. reactive Red 195 by *Enterococcus faecalis* strain YZ 66”, *World J Microbiol Biotechnol*, v. 28.
- MATTIOLI, D., MALPEI, F., BORTONE, G., et al., 2002, “Water minimization and reuse in the textile industry”, *Water and resource recovery in industry, Euro Summer School, Wageningen University*, pp. 24–42.
- MELO, E. I. D., 2009, *Desenvolvimento de biossensor potenciométrico em eletrodos de grafite modificado com aminofenóis para determinação de diclorvos em alimentos de origem vegetal*. Tese de Doutorado, UFU, Minas Gerais.
- MENTEN, L., MICHAELIS, M., 1913, “Die kinetik der invertinwirkung”, *Biochem Z*, v. 49, pp. 333–369.
- MOELLER, C. G., SANDOVAL YOVAL, L., MIJAYLOVA NACHEVA, P., 2013. “Evaluación de diferentes procesos de tratamiento para la remoción de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil”. 23 feb. 2017, 9:55.
- MOHAJERSHOJAEI, K., KHOSRAVI, A., MAHMOODI, N. M., 2014, “Decolorization of dyes using immobilized laccase enzyme on zinc ferrite nanoparticle from single and binary systems”, *Fibers and Polymers*, v. 15, n. 10, pp. 2139–2145.
- MONTEIRO, V. N., SILVA, R., 2009, “Aplicações industriais da biotecnologia enzimática”, *Revista Processos Químicos*, v. 3, n. 5, pp. 9–23.
- MOTTA, V. T., 2006, “Enzimas”. In: *Bioquímica básica*, 9 ed., v. 9, cap. 3, Autolab Análises Clínicas.
- MURALI, V., ONG, S.-A., HO, L.-N., et al., 2013, “Evaluation of integrated anaerobic–aerobic biofilm reactor for degradation of azo dye methyl orange”, *Bioresource Technology*, v. 143, pp. 104–111.
- NICELL, J. A., WRIGHT, H., 1997, “A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 21, n. 4, pp. 302–310.
- NISSHINBO, C., 2017. “AQUAPOROUSGEL”. 8 abr. 2017, 17:01. Disponível em: <https://www.nisshinbo-chem.co.jp/english/products/apgbcn/apg.html>.

- NOGUEIRA, B. L., 2013, *Modelagem matemática de reatores de leito móvel com biofilme para tratamento de efluentes*. Tese de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- NOUREN, S., BHATTI, H. N., ILYAS, S., 2015, “Recent Developments in the Biodegradation of Synthetic Dyes By plant Peroxidases: A Review”. In: *Environmental Science and Engineering*, v. 8, cap. 815, pp. 383–412.
- O’NEILL, C., LOPEZ, A., ESTEVES, S., et al., 2000, “Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 2, pp. 249–254.
- PAISIO, C. E., GONZÁLEZ, P. S., GERBAUDO, A., et al., 2010, “Toxicity of phenol solutions treated with rapeseed and tomato hairy roots”, *Desalination*, v. 263, n. 1, pp. 23–28.
- PATIL, A. V., JADHAV, J. P., 2013, “Evaluation of phytoremediation potential of *Tagetes patula* L. for the degradation of textile dye Reactive Blue 160 and assessment of the toxicity of degraded metabolites by cytogenotoxicity”, *Chemosphere*, v. 92, n. 2, pp. 225–232.
- PEARCE, C., LLOYD, J., GUTHRIE, J., 2003, “The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review”, *Dyes and pigments*, v. 58, n. 3, pp. 179–196.
- PEREIRA, E. L. D. S., 2008, *Utilização de biofiltro aerado submerso no tratamento de efluentes de curtume submetido a processo de pré-tratamentos físico-químico e anaeróbio*. Tese de Mestrado, UNESP, São Paulo.
- PIZATO, E., 2013, *Avaliação da capacidade de remoção de corante têxtil pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI em efluente sintético e industrial*. Tese de Mestrado, UTFPR, Curitiba.
- PUNZI, M., NILSSON, F., ANBALAGAN, A., et al., 2015, “Combined anaerobic–ozonation process for treatment of textile wastewater: removal of acute toxicity and mutagenicity”, *Journal of hazardous materials*, v. 292, pp. 52–60.
- RAJESHWARI, K., BALAKRISHNAN, M., KANSAL, A., et al., 2000, “State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 4, n. 2, pp. 135–156.

- RODRIGUES, C. S., MADEIRA, L. M., BOAVENTURA, R. A., 2013, "Treatment of textile dye wastewaters using ferrous sulphate in a chemical coagulation/flocculation process", *Environmental Technology*, v. 34, n. 6, pp. 719–729.
- RUSTEN, B., EIKEBROKK, B., ULGENES, Y., et al., 2006, "Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors", *Aquacultural engineering*, v. 34, n. 3, pp. 322–331.
- SAKUMA, A. C., 2013, *Desenvolvimento e análise experimental de biodigestores modulares de baixo tempo de residência*. Tese de Mestrado, UFPR, Curitiba.
- SANCHEZ, N., BENEDETTI, T. M., VAZQUEZ, M., et al., 2012, "Kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of reactive red 239 by carra sawdust Treated with Formaldehyde", *Adsorption Science and Technology*, v. 30, n. 10, pp. 881–899.
- SARATALE, R. G., SARATALE, G., CHANG, J., et al., 2011, "Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 1, pp. 138–157.
- SILVA, E. S. D., 2016, *Utilização da fotocatalise solar heterogênea no tratamento de efluentes industriais*. Tese de Mestrado, UFPB, Paraíba.
- SILVA, M. C., 2011, *Degradação de corantes e remediação de efluentes têxteis por extrato bruto de peroxidase de nabo*. Tese de Doutorado, UFLA, Minas Gerais.
- SILVA, M. C., CORRÊA, A. D., TORRES, J. A., et al., 2012, "Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*)", *Química Nova*, v. 35, n. 5, pp. 889–894.
- SINGH, N., GADE, W., SINGH, J., 2002, "Purification of turnip peroxidase and its kinetic properties", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 32, n. 1, pp. 39–49.
- SINGH, R. L., SINGH, P. K., SINGH, R. P., 2015, "Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes: A review", *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 104, pp. 21–31.
- SOLÍS, M., SOLÍS, A., PÉREZ, H. I., et al., 2012, "Microbial decolouration of azo dyes: a review", *Process Biochemistry*, v. 47, n. 12, pp. 1723–1748.

- SOUSA, T. P. D. A., 2010, *Caracterização parcial da peroxidase dos frutos de aceroleira (Malpighia emarginata DC), clones Okinawa e Emepa em três estágios de maturação*. Tese de Mestrado, UFPB, Paraíba.
- SOUZA, A. F., ROSADO, F. R., 2009, “Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis”, *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 2, n. 1, pp. 121–139.
- SPONZA, D. T., IŞIK, M., 2005, “Toxicity and intermediates of C.I. Direct Red 28 dye through sequential anaerobic/aerobic treatment”, *Process Biochemistry*, v. 40, n. 8, pp. 2735–2744.
- SUGUMAR, R. W., SADANANDAN, S., 2010, “Combined Anaerobic-Aerobic Bacterial Degradation of Dyes”, *Journal of Chemistry*, v. 7, n. 3, pp. 739–744.
- SURENDIRAN, K. P., SUBRAMANI, P., 2016, “Biobleaching of Azo yellow dye and textile effluent by the action of peroxidase extracted from five different vegetables”, *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, v. 4, n. 9, pp. 42–48.
- SURYAVATHI, V., SHARMA, S., SHARMA, S., et al., 2005, “Acute toxicity of textile dye wastewaters (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice”, *Reproductive Toxicology*, v. 19, n. 4, pp. 547–556.
- TALARPOSHTI, A. M., DONNELLY, T., ANDERSON, G., 2001, “Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor”, *Water Research*, v. 35, n. 2, pp. 425–432.
- TAVARES, A. P., CRISTÓVÃO, R. O., LOUREIRO, J. M., et al., 2008, “Optimisation of reactive textile dyes degradation by laccase-mediator system”, *Journal of chemical technology and biotechnology*, v. 83, n. 12, pp. 1609–1615.
- TAVARES, A. P., CRISTÓVÃO, R. O., GAMELAS, J. A., et al., 2009, “Sequential decolourization of reactive textile dyes by laccase mediator system”, *Journal of chemical technology and biotechnology*, v. 84, n. 3, pp. 442–446.
- THIRUGNANASAMBANDHAM, K., SIVAKUMAR, V., 2015, “Enzymatic catalysis treatment method of meat industry wastewater using laccase”, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v. 13, n. 1, pp. 86.

- TOMEI, M. C., ANGELUCCI, D. M., DAUGULIS, A. J., 2016, “Sequential anaerobic-aerobic decolourization of a real textile wastewater in a two-phase partitioning bioreactor”, *Science of the Total Environment*, v. 573, pp. 585–593.
- TOPAÇ, F. O., DINDAR, E., UÇAROĞLU, S., et al., 2009, “Effect of a sulfonated azo dye and sulfanilic acid on nitrogen transformation processes in soil”, *Journal of hazardous materials*, v. 170, n. 2, pp. 1006–1013.
- ULSON, S. M. D. A. G., BONILLA, K. A. S., DE SOUZA, A. A. U., 2010, “Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 179, n. 1, pp. 35–42.
- URREA, D. M., CONTRERAS, E., 2015, “Cinética de decoloración de Orange II con peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa de soja”, *Enfoques interdisciplinarios para la sustentabilidad del ambiente*, pp. 362–367.
- VAN DER ZEE, F. P., VILLAVERDE, S., 2005, “Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes—a short review of bioreactor studies”, *Water research*, v. 39, n. 8, pp. 1425–1440.
- VISHNIAC, W., SANTER, M., 1957, “The thiobacilli”, *Bacteriological reviews*, v. 21, n. 3, pp. 195–213.
- WANG, L., 2012, “Application of activated carbon derived from waste bamboo culms for the adsorption of azo disperse dye: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies”, *Journal of Environmental Management*, v. 102, pp. 79–87.
- WANG, W., WU, Y., ZHANG, C., 2017, “High-density natural luffa sponge as anaerobic microorganisms carrier for degrading 1,1,1-TCA in groundwater”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, n. 3, pp. 383–393.
- WAWRZKIEWICZ, M., HUBICKI, Z., NOWACKA, M., et al., 2015, “Treatment of wastewaters containing acid, reactive and direct dyes using aminosilane functionalized silica”, *Open Chemistry*, v. 13, n. 1, pp. 82–95.
- WEISBURGER, J. H., 2002, “Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 506, pp. 9–20.

- WENRICH, B. R., TRUMBO, T. A., 2012, “Interaction of nucleic acids with Coomassie Blue G-250 in the Bradford assay”, *Analytical biochemistry*, v. 428, n. 2, pp. 93–95.
- WORTHINGTON, K., 1993. “Worthington Enzyme Manual, Peroxidase Assay”. 17 mar. 2017, 16:40.
- YANG, S., YANG, F., FU, Z., et al., 2010, “Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by a novel sequencing batch moving bed membrane bioreactor for wastewater treatment”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 175, n. 1, pp. 551–557.
- YOO, E., LIBRA, J., ADRIAN, L., 2001, “Mechanism of decolorization of azo dyes in anaerobic mixed culture”, *Journal of Environmental Engineering*, v. 127, n. 9, pp. 844–849.
- ZHANG, T. C., FU, Y., BISHOP, P. L., et al., 1995, “Transport and biodegradation of toxic organics in biofilms”, *Journal of Hazardous Materials*, v. 41, n. 2, pp. 267–285.
- ZHOU, L., TANG, W., JIANG, Y., et al., 2016, “Magnetic combined cross-linked enzyme aggregates of horseradish peroxidase and glucose oxidase: an efficient biocatalyst for dye decolourization”, *Rsc Advances*, v. 6, n. 93, pp. 90061–90068.
- ZOPPAS, F. M., BERNARDES, A. M., MENEGUZZI, L., 2016, “Parâmetros operacionais na remoção biológica de nitrogênio de águas por nitrificação e desnitrificação simultânea”, *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 21, pp. 29–42.
- ZUBAIR, M., JARRAH, N., MANZAR, S. A., et al., 2017, “Adsorption of Eriochrome Black T from Aqueous Phase on MgAl-, CoAl- and NiFe-Calcined Layered Double Hydroxides: Kinetic, Equilibrium and Thermodynamic Studies”, *Journal of Molecular Liquids*, v. 230, pp. 344–352.

Apêndice A

Método Bradford para dosagem de proteínas totais

Preparo das soluções

Solução de Azul Brilhante de Coomassie 100 mg/L. Para o preparo de 1 L deste reagente, pesou-se 0,1 g do reagente Azul Brilhante de Coomassie G e dissolveu-se em 50 mL de etanol 95% sob agitação constante por 20 minutos. Após este período, adicionou-se 100 mL de ácido ortofosfórico 85%, mantendo sob agitação por cerca de 1 hora para completa homogeneização. A seguir, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e completado o volume com água destilada. A solução foi armazenada na geladeira a 4°C em frasco âmbar, já que a mesma é fotossensível. Sempre antes do uso, o reagente era filtrado.

Solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) 0,1 g/L. Pesou-se 10 mg de BSA e diluiu-se em água Mili-Q. Completou-se o volume para 100 mL em balão volumétrico. A cada dia de análise, esta solução era preparada.

Determinação da curva de calibração

A curva padrão foi construída com valores de concentração conhecidos de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 e 0,2 g/L de solução BSA.

A leitura das amostras foi realizada em triplicata a 595 nm no espectrofotômetro. Com os resultados de absorvância obtidos, foram calculados os valores da concentração de enzima utilizando a curva de calibração.

As amostras foram preparadas misturando 1 mL da solução Azul Brilhante de Coomassie com 0,1 mL da solução a ser analisada e empregando um tempo de reação de 10 min.

Apêndice B

Determinação da atividade específica da enzima

Preparo das soluções

Solução 0,2 mol/L de tampão fosfato de potássio pH 7. Pesou-se 34,84 g de Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) e 27,22 g de Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4). Cada reagente dissolveu-se em 1000 mL de água Milli-Q.

Solução 0,0017 mol/L de peróxido de hidrogênio. Diluiu-se 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% em 100 mL de água Milli-Q. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 1 mL e diluiu-se em 50 mL de 0,2 mol/L de tampão fosfato de potássio pH 7.

Solução 0,0025 mol/L de 4-aminoantipirina com 0,17 mol/L de fenol. Foi preparada dissolvendo 810 mg de fenol em 40 mL de água Milli-Q. Depois foram adicionados 25 mg de 4-aminoantipirina e avolumou-se para 50 mL com água Milli-Q.

A mistura de reação continha 1,5 mL da solução 0,0017 mol/L de peróxido de hidrogênio e 1,4 mL da solução 0,0025 mol/L de 4-aminoantipirina com 0,17 mol/L de fenol. A mistura foi incubada em espectrofotômetro em 510 nm a temperatura ambiente, estabelecendo a taxa de branco. Após, foi adicionado 0,1 mL da amostra e registrado o aumento da absorbância por 5 min. A amostra foi diluída em água para obter uma taxa de 0,02 a 0,04 ΔA 510 nm/min. Isto possibilitou o cálculo da ΔA 510 nm/min da porção linear da curva, onde a atividade específica (U/mg) é dada pela Equação B.1

$$\frac{U}{mg} = \frac{\Delta A \text{ 510 nm/min}}{6,58 \frac{mg \text{ proteína}}{mL \text{ mistura de reação}}} \quad (B.1)$$

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford como detalhado no Apêndice A .

Apêndice C

Determinação da concentração de sólidos (SAT, SAF e SAV)

Sólidos Aderidos Totais (SAT)

1. Colocou-se 2 cadinhos limpos na mufla previamente aquecida a 560°C por 1h e após esse tempo, deixou-se esfriar no dessecador;
2. Pesou-se os cadinhos em balança analítica (P0);
3. Colocou-se três suportes recém-retirados do reator em cada cadinho;
4. Levou-se os cadinhos à estufa previamente aquecida a 105°C por 24h e após esse tempo, deixou-se esfriar no dessecador;
5. Pesou-se os cadinhos em balança analítica (P1);
6. Procedeu-se à remoção do biofilme macerando os suportes cuidadosamente com uma pequena quantidade de água até completar 10 mL. Posteriormente, foram colocados os suportes e a água residual em um tubo tipo falcon. Em seguida, os tubos foram levados a banho-maria por 30 min vorterezando-os eventualmente. Depois, foram imersos no banho do aparelho de ultrassom por mais 30 min;
7. Descartou-se o produto da extração;
8. Colocou-se os suportes após limpeza nos seus cadinhos correspondentes;
9. Levou-se à estufa previamente aquecida a 105°C por 24h e após esse tempo, deixou-se esfriar no dessecador;
10. Pesou-se os cadinhos em balança analítica (P2).

Sólidos Aderidos Fixos (SAF)

1. Colocou-se 2 cadinhos limpos na mufla previamente aquecida a 560°C por 1h e após esse tempo, deixou-se esfriar no dessecador;
2. Pesou-se os cadinhos em balança analítica (P0');
3. Colocou-se o produto da extração coletado depois da limpeza dos suportes (item 7 de SAT), em cada cadinho;
4. Levou-se os cadinhos à estufa previamente aquecida a 105°C por 24h e após esse tempo, deixou-se esfriar no dessecador;
5. Pesou-se os cadinhos em balança analítica (P1');
6. Levou-se à mufla previamente aquecida a 560°C por 1h e após esse tempo, deixou-se esfriar no dessecador;
7. Pesou-se os cadinhos em balança analítica (P2').

Sólidos Aderidos Voláteis (SAV)

Os SAV foram determinados pela diferença entre SAT e SAF, uma vez que a concentração desses sólidos foi obtida.

Apêndice D

Curva de calibração para determinar a concentração de proteínas

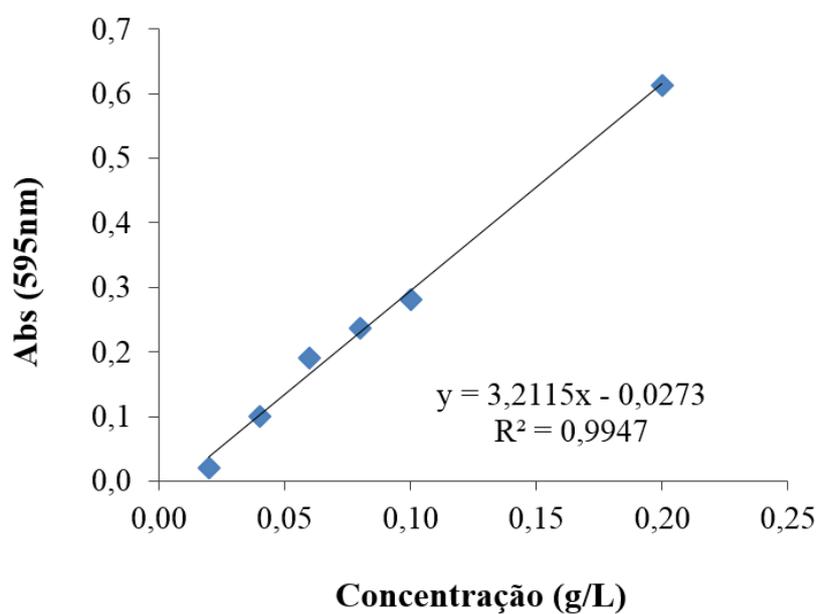


Figura D.1: Curva de calibração utilizada para determinar a concentração de proteínas pelo Método de Bradford.

Apêndice E

Curva utilizada para calcular a taxa de reação

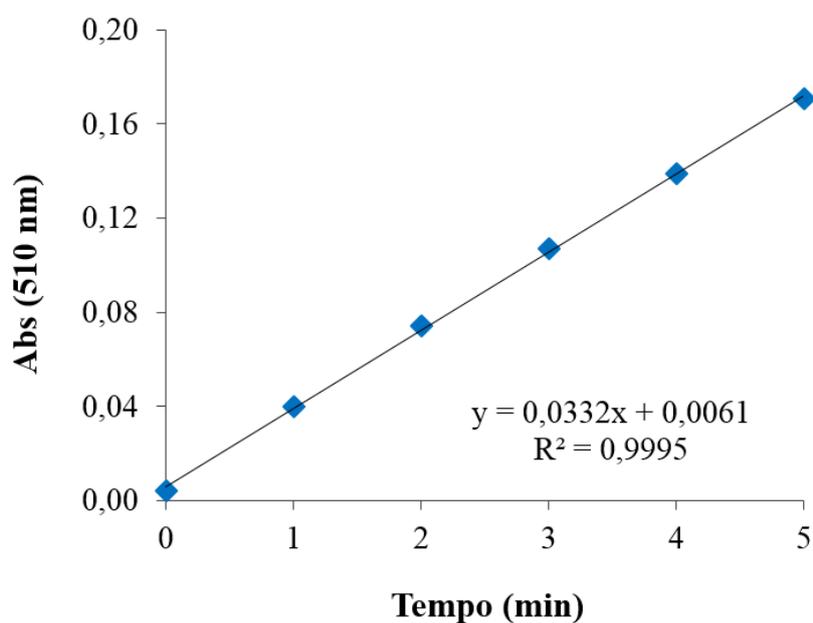


Figura E.1: Curva utilizada para calcular a taxa de reação durante a determinação da atividade específica da enzima.

Apêndice F

Curvas de calibração do corante azo CP6R usando E-MEBTI

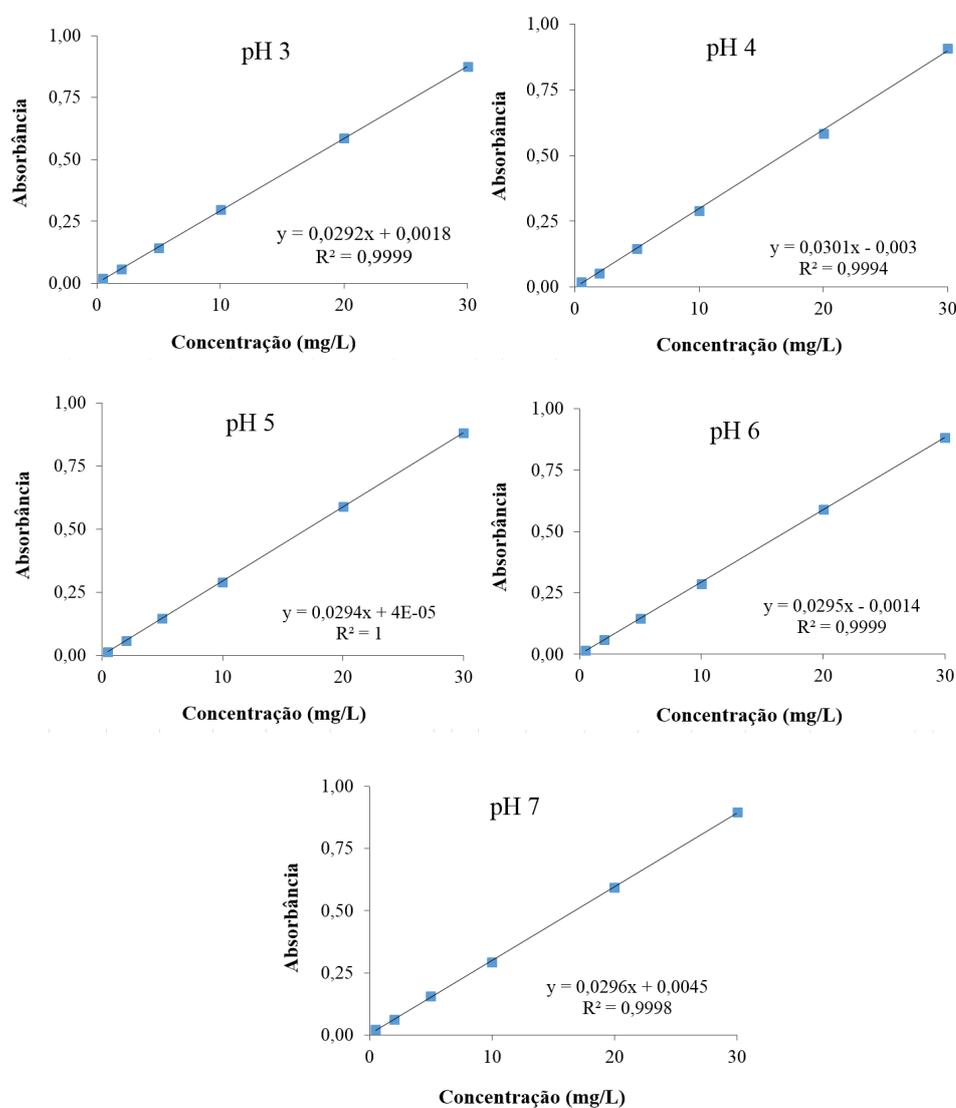


Figura F.1: Curvas de calibração do corante CP6R para diferentes pH.

Apêndice G

Curvas de calibração do corante azo RR239 usando E-MEBTI

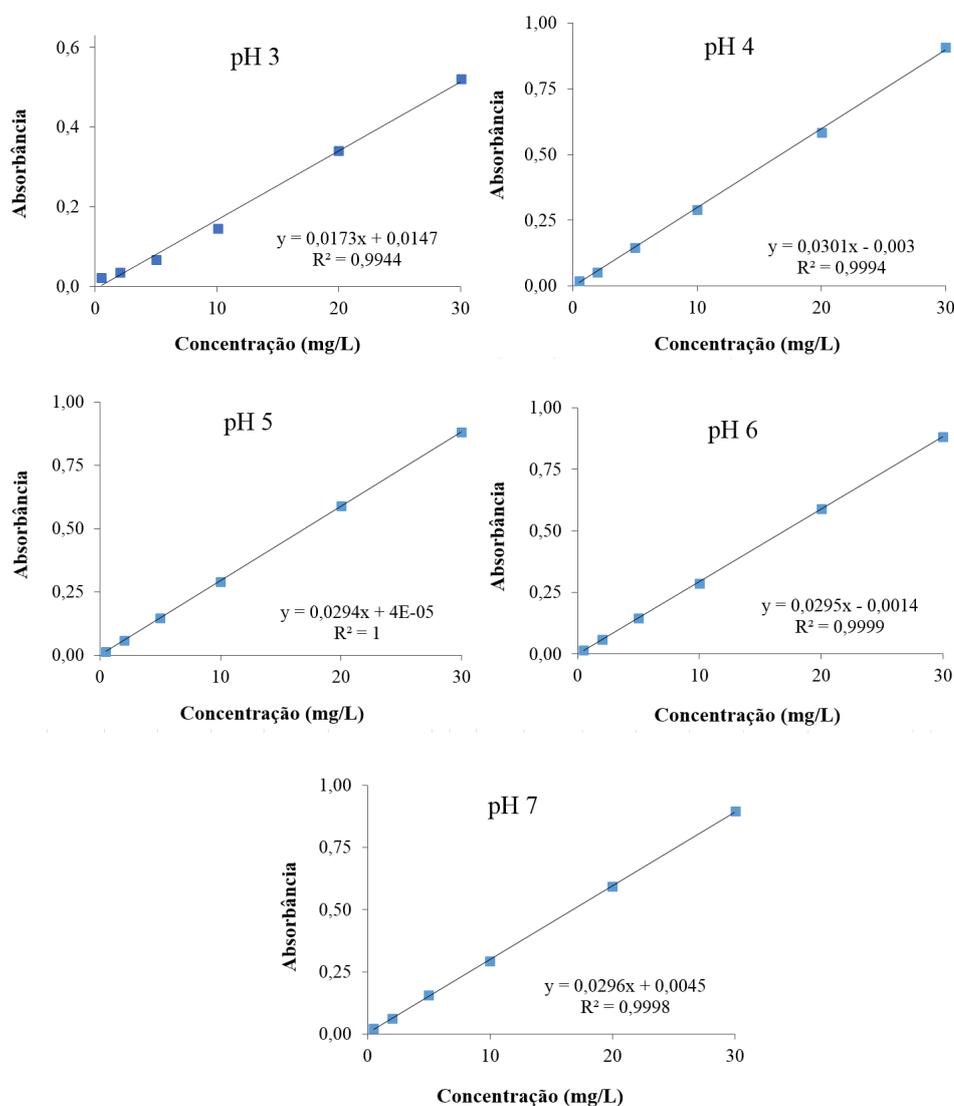


Figura G.1: Curvas de calibração do corante RR239 para diferentes pH.

Apêndice H

Curvas de calibração do corante azo RR239 usando E-HDR2800

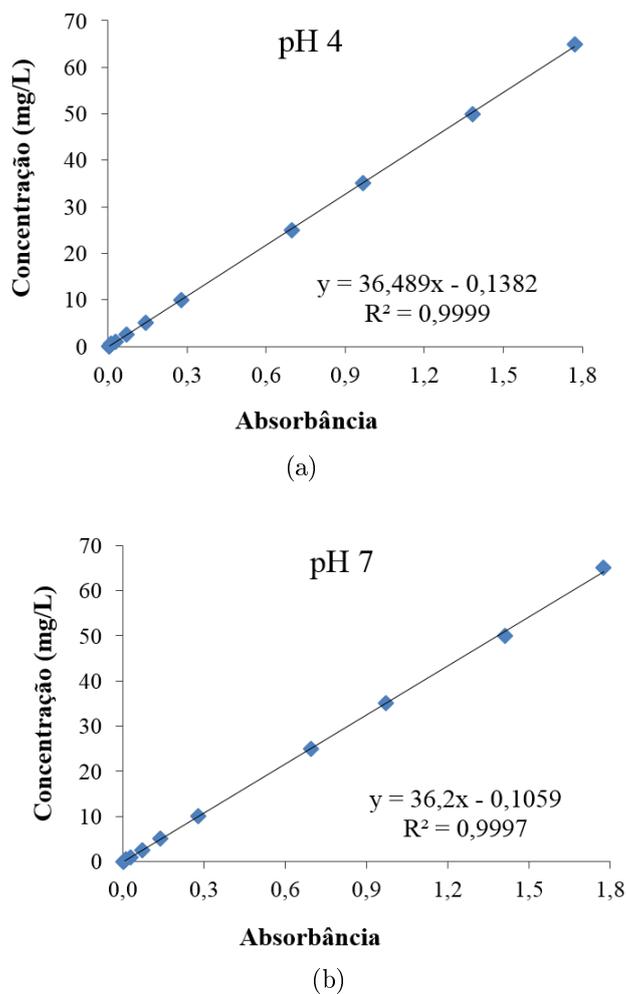


Figura H.1: Curvas de calibração do corante RR2399 para pH 4 (a) e pH 7 (b).