

# Universidade Federal do Rio de Janeiro Escola de Química

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos

### Avaliação das Espécies Reativas do Oxigênio na Oxidação de Substância Recalcitrante

**André Rodrigues Pereira** 

Tese de Doutorado

**Orientadores** 

Prof<sup>a</sup>. Lídia Yokoyama, D.Sc. Prof<sup>a</sup>. Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc.

Dezembro de 2014

André Rodrigues Pereira

# AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO NA OXIDAÇÃO DE SUBSTÂNCIA RECALCITRANTE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, da Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

#### Orientadores:

Profa. Lídia Yokoyama, D.Sc.

Profa. Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil Dezembro de 2014 Pereira, André Rodrigues

P436a

Avaliação das Espécies Reativas do Oxigênio na Oxidação de

Substância Recalcitrante / André Rodrigues Pereira. -- Rio de Janeiro, 2014.

110 f.

Orientadora: Lídia Yokoyama.

Coorientadora: Eliana Mossé Alhadeff.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2014.

- 1. Oxigênio Singlete. 2. Horseradish peroxidase.
- 3. Azul de Metileno. 4. Oxidação Avançada. I. Yokoyama, Lídia, orient. II. Mossé Alhadeff, Eliana, coorient.

III. Título

#### Avaliação das Espécies Reativas do Oxigênio na Oxidação de Substância Recalcitrante

#### André Rodrigues Pereira

Tese submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientada por:	
	Prof <sup>a</sup> . Lídia Yokoyama, D.Sc.
Aprovada por:	Prof <sup>a</sup> . Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc.
	Prof. Clenilson da Silva Sousa Junior, D.Sc.
	Marco Antônio Magalhães de Menezes, D.Sc.
	Prof. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.
	Prof. Antônio Carlos Augusto da Costa, D.Sc.
	Prof. Selma Gomes Ferreira Leite. D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil Dezembro de 2014

#### Agradecimentos

À Deus pelo dom da vida e por nunca me deixar só.

À meus pais Adelino Pereira e Silvia Fátima Pereira por todo o carinho e compreensão que tiveram por todo esta longa jornada.

À minha esposa Renata que completa a minha vida e ao Pedro Henrique que está chegando

Ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Thaís e as minhas sobrinhas Amanda e Maria Eduarda.

À professora Lídia Yokoyama que sempre me apoiou e ajudou para meu aperfeiçoamento profissional.

À professora Eliana Mossé Alhadeff por todas as contribuições muito relevantes para este trabalho.

Aos sempre amigos Layla Freire, Carlos Alberto, Jéferson, Roberta, Renê, Leandra, Evilásio, Peterson, Flávia Moreira, Leonardo Almeida, Giulia, Leonardo Hermogenes, Soraia Azeredo, Camila Faria, Marcos que estiveram sempre ao meu lado neste período.

A todos os amigos do Laboratório de Tratamento de Águas e Reúso de Efluentes (LabTare) Leandro, Mariana Lemos, Carla Renes, Yuri, Kleby, Érica e Laís pelo carinho e amizade.

Aos amigos que me ajudaram de alguma maneira, desde o início do trabalho em especial Hélinah Moreira e Rafael Souza, a vocês minha gratidão por toda ajuda neste trabalho.

A todos os amigos que estiveram sempre presentes em conversas descontraídas e construtivas, em especial Reinaldo Mirre, Thaís Delazare, Ladimir, e Valéria Castro.

Aos técnicos de laboratório do DPI/EQ/UFRJ Hélio, Wilson e Alice pelas ajudas prestadas no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Rodrigo José que coordena o Laboratório de Fotoquímica David Ernest Nicodem do Instituto de Química da UFRJ e ao Rodolfo Teixeira que me auxiliou nas medidas de oxigênio singlete com muita dedicação.

A Toyobo do Brasil pela doação da enzima liofilizada.

Ao CNPq pela bolsa concedida a este projeto.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

### AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO NA OXIDAÇÃO DE SUBSTÂNCIA RECALCITRANTE

André Rodrigues Pereira Dezembro, 2014

Orientadores: Profa. Lídia Yokoyama, D.Sc.

Profa. Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc.

#### RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a ação de espécies reativas do oxigênio. Para avaliar a geração das espécies reativas do oxigênio foi utilizado dois processos: um processo químico e um processo enzimático. O processo químico utilizou a mistura entre o peróxido de hidrogênio e o hipoclorito de sódio e o processo enzimático utilizou a enzima Horseradish peroxidase (HRP) juntamente com o peróxido de hidrogênio. Para avaliar o poder oxidante destes processos foi utilizado o corante básico azul de metileno. Os parâmetros cinéticos K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> foram determinados em relação ao peróxido de hidrogênio na ausência do azul de metileno e na presença do azul de metileno. Os parâmetros cinéticos K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> para o corante foram respectivamente também foram determinados. Foram realizados três delineamentos de dois níveis para a obtenção das condições ótimas da reação enzimática. A análise dos resultados possibilitou observar que a relação molar AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP são relevantes para a remoção de cor. Foi verificado um percentual de descoloração de até 82,4 % com uma concentração de peróxido de hidrogênio igual a 68,0 mg/L, atividade inicial da enzima igual a 30,0 U/mL no tratamento de 15,0 mg de corante/L em meio aguoso. Em relação à quantidade utilizada de peróxido de hidrogênio e a eficiência do processo de descoloração, o processo enzimático se mostrou mais econômico e eficiente que o processo químico nas condições estudadas. Foi comprovada a presença de espécies reativas de oxigênio na forma de oxigênio singlete pela reação redox entre a enzima HRP e o peróxido de hidrogênio. A existência desta espécie reativa depende diretamente da concentração de peróxido de hidrogênio no meio reacional.

Palavras-Chave: Oxigênio Singlete; Horseradish peroxidase; Azul de Metileno; Oxidação Avançada

Abstract of Thesis presented to Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (EQ/UFRJ) as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science.

### EVALUATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE OXIDATION OF RECALCITRANT SUBSTANCE

André Rodrigues Pereira December, 2014

Advisors: Prof<sup>a</sup>. Lídia Yokoyama, D.Sc.

Profa. Eliana Mossé Alhadeff, D.Sc.

This paper aims to assess the effect of reactive oxygen species. Two processes were used to assess the generation of reactive oxygen species: a chemical and an enzymatic process. The chemical process is the mixture of hydrogen peroxide and sodium hypochlorite and the enzymatic process is the enzyme Horseradish peroxidase (HRP) with hydrogen peroxide. A basic methylene blue dye was used to assess the oxidizing power. The kinetic parameters K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> were determined with relation to the hydrogen peroxide in the absence of methylene blue and in the presence of methylene blue. The kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  for dye were also determined, respectively. Three designs of two levels in order to obtain the optimal conditions for the enzyme reaction were performed. The analysis of results shows the molar ratio AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the ratio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP are relevant for the color removal. A destaining percentage of 82.4% with a hydrogen peroxide concentration of 68.0 mg/L and the same initial enzyme activity of 30.0 U/mL in the treatment of 15.0 mg of dye/L in aqueous media was noted. Comparing the amount of hydrogen peroxide used and the efficiency of destaining process, the enzymatic process was more economical and efficient than the chemical process according to the conditions studied. The presence of reactive oxygen species in the form of singlet oxygen in the redox reaction between HRP enzyme and hydrogen peroxide was proved. The existence of this reactive species depends directly on the hydrogen peroxide concentration in the reaction media.

Keywords: Singlet oxygen; Horseradish peroxidase; Methylene Blue; Advanced oxidation

#### Sumário

1.	Intr	odução	1
2.	Obj	etivos	3
	2.1.	Objetivo Geral	3
	2.2.	Objetivos específicos	3
3.	Rev	isão Bibliográfica	4
	3.1.	Os corantes	4
	3.1.1.	Classificação de Corantes.	5
	3.2.	Oxigênio Singlete	6
	3.3.	Estabilidade do <sup>1</sup> O <sub>2</sub>	9
	3.4.	Geração do Oxigênio Singlete	.11
	3.4.1.	Produção em organismos vivos (via do metabolismo celular)	.11
	3.4.2.	Produção com reagentes químicos auxiliados por enzimas (rotas bioquímicas)	.11
	3.4.3.	Produção por reagentes químicos (rotas químicas)	.12
	3.5.	Remoção de Cor do Azul de Metileno por Via Química	.13
	3.6.	Variáveis que influenciam a Geração do Oxigênio Singlete em Sistemas Químicos	s 13
	3.7.	Variáveis que Influenciam na Oxidação Enzimática	.15
	3.8.	Horseradish peroxidase (HRP)	.17
	3.8.1.	Cinética Enzimática	.19
	3.8.2.	Remoção de Substâncias Recalcitrantes Utilizando HRP	.22
4.	Mat	eriais e Métodos	.27
	4.1.	Corante	.28
	4.2.	Remoção de Cor	.28
	4.3.	Peróxido de Hidrogênio	.28
	4.3.1.	Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogênio	.29
	4.4.	A Enzima	.29
	4.4.1.	Extração da Enzima e Medida da Atividade Enzimática	.29
	4.5.	Hipoclorito de Sódio	.30
	4.6.	Reações Via Química	.30
	4.6.1.	Definição das Concentrações nas Reações Via Processo Químico	.31
	4.7.	Reações do Sistema Enzimático	.32
	4.8.	Avaliação do Efeito do pH e da Temperatura na Atividade Enzimática da HRP	.33
	4.9.	Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ da HRP	
	4.10.	Avaliação da Cinética de Inibição da HRP na Presença de Corante	
	4.11.	Avaliação das Condições Estequiométricas AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e da Relação H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP.	.36
	4.11.1		

	4.12.	Identificação de Oxigênio Singlete no Sistema Enzimático	40
5.	Res	ultados	42
	5.1.	Determinação do pico de absorção do azul de metileno	42
	5.2.	Degradação de Azul de Metileno por Via Química	44
	5.3.	Efeito do pH e da Temperatura nas Reações Enzimáticas	46
	5.4.	Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ da HRP	48
	5.4.1.	K <sub>m</sub> e V <sub>max</sub> na Ausência de Corante	48
	5.4.2.	K <sub>m</sub> e V <sub>max</sub> na Presença de Corante	50
	5.5.	Avaliação da Cinética de Inibição da HRP pelo Peróxido de Hidrogênio	54
	5.6.	Medidas de Oxigênio Singlete	61
	5.7.	Otimização da Reação Enzimática	66
	5.7.1.	Primeiro Delineamento	66
	5.7.2.	Segundo Delineamento	68
	5.7.3.	Terceiro Delineamento	70
	5.8.	Comparação entre a Via Química e Via Enzimática	76
6.	Con	clusões	78
7.	Rec	omendações e Trabalhos Futuros	80
8.	Ref	erências Bibliográficas	81
A	pêndic	e 1 – Determinação da Constante de Velocidade para Reações Irreversíveis	90
A	pêndic	e 2 – Escolha do Corante Azul de Metileno para os ensaios	93
A	nexo 1	- Espectro de Absorção Infra-vermelho do Azul de Metileno	97

#### Lista de Siglas

AM – Azul de Metileno

UV – Ultra Violeta

MPO – myeloperoxidase

SOD – Superóxido dismutase

IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology

HRP – Enzima Horseradish peroxidase

KDa – Quilo Dalton (unidade de massa)

PI – Ponto Isoelétrico

ATP – Trifosfato de Adenosina

[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] - Concentração de peróxido de hidrogênio

[ClO<sup>-</sup>] – Concentração de hipoclorito

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> - Oxigênio singlete

[  ${}^{1}O_{2}$  ] – Concentração de oxigênio singlete

PEG – Polietilenoglicol

NBB – Naphthol blue Black (corante)

mM – milimolar (unidade de concentração)

U – Unidades de atividade enzimática

#### Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Principais oxidantes existentes e seus respectivos potenciais de oxidação	9
Tabela 3.2 - Estabilidade (tempo de vida) do oxigênio singlete em solventes	9
Tabela 3.3 - Constante de velocidade na formação do oxigênio singlete com diferentes solventes	10
Tabela 3.4 – Condições das principais variáveis estudadas na degradação de substâncias recalcitrantes	na
presença de HRP e peróxido de hidrogênio e resultados	25
Tabela 4.1 - Níveis e relações utilizadas nos delineamentos realizados na remoção de cor do corante azul	de
metileno utilizando HRP e peróxido de hidrogênio	37
Tabela 4.2 – Concentração de cada variável independente nos delineamentos realizados na remoção de cor	do
corante azul de metileno utilizando HRP e peróxido de hidrogênio	39
Tabela 5.1 - Remoção de cor do azul de metileno por via química com concentração inicial de corante igual a	20
mg/L	44
Tabela 5.2 - Remoção de cor do azul de metileno por via química com concentração inicial de corante igual a	10
mg/L	44
Tabela 5.3 - Efeitos das variáveis independentes na remoção de cor do azul de metileno por via química	45
Tabela 5.4 - Valores de K <sub>m</sub> encontrados na literatura para diferentes corantes	53
Tabela 5.5 - Condições de cada ensaio para determinar o oxigênio singlete no sistema enzimático	65
Tabela 5.6 - Remoção de cor do corante azul de metileno no primeiro delineamento	
Tabela 5.7 - Remoção de cor do corante azul de metileno no segundo delineamento	68
Tabela 5.8 - Dados de efeito, valor de F e "p-valor" para o segundo delineamento da reação via enzimática	70
Tabela 5.9 - Remoção de cor do corante azul de metileno no terceiro delineamento	
Tabela 5.10 - Dados de efeito, valor de F e "p-valor" para o terceiro delineamento da reação via enzimática	
Tabela 5.11 – Comparação entre o pH e o valor estequiométrico de peróxido de hidrogênio utilizados	
melhor condição de geração de oxidante por via química e por via enzimática	76

### Lista de Figuras

Figura 3.1 - Estrutura molecular do corante azul de metileno	. 5
Figura 3.2 - Orbital molecular "p" do oxigênio em seu estado fundamental (a) e de seus respectivos estado	
excitados (b) e (c). Baseado em Martinez et al, 2000.	. 7
Figura 3.3 - Métodos de obtenção do oxigênio singlete. Elaboração própria	. 8
Figura 3.4 - Ação da temperatura numa reação enzimática	
Figura 3.5 - Curva típica do inverso da equação de Michaelis-Menten com inibição de acompetitiva possibilitation substrato	
Figura 4.1 - Aparato experimental para a realização da reação de geração de oxigênio singlete por via químic	
(a) e geração gasosa durante a reação (b).	
Figura 4.2 - Aparato Experimental das Reações Enzimáticas (a) e Vista do tubo contendo os reagentes fixado r	no
Shaker para avaliação das reações enzimáticas (b)	33
Figura 4.3 - Fluorímetro utilizado para fazer a medidas de oxigênio singlete	40
Figura 4.4 - Detalhe do local de análise de oxigênio singlete4	41
Figura 5.1 - Espectro de absorção no visível do azul de metileno em diferentes concentrações	43
Figura 5.2 - Absorvância de uma solução sintética de azul de metileno em diferentes concentrações a 660 nm <sup>4</sup>	43
Figura 5.3 - Efeito do pH na remoção de cor com concentração inicial de corante igual a 20,0 mg/L; $[H_2O_2] = 6$ mg/L; Atividade Inicial da HRP = 25,0 U/mL; T = 25 $^{\circ}$ C	
Figura 5.4 - Efeito da temperatura na remoção de cor com concentração inicial de corante igual a 20,0 mg/	
$[H_2O_2] = 6.0 \text{ mg/L}$ ; Atividade Inicial da HRP = 25.0 U/mL; pH = 5.0.	
Figura 5.5 - Cinética da degradação de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por ação da HRP na ausência de corante em diferent	
concentrações de $H_2O_2$ . Atividade Inicial de HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; Temperatura = 30 $^{\circ}$ C; $C_i$	
Concentração de peróxido de hidrogênio remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de peróxido de hidrogên inicial	
Figura 5.6 – Gráfico de Michaelis-Menten na reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima HRP r	
ausência de corante. Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; Temperatura = 30°C4	49
Figura 5.7 - Cinética de remoção de cor por ação da HRP na presença de corante em diferentes concentraçõo	es
de $H_2O_2$ (10, 20, 35, 50, 75, 100) em mg/L. [AM] = 20,0 mg/L; Atividade Inicial de HRP = 25 U/mL; pH	
5,0; Temperatura = 30 ºC; C <sub>i</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração de azul	de
azul de metileno inicial	51
Figura $5.8$ - Cinética de remoção de cor por ação da HRP na presença de $ m H_2O_2$ em diferentes concentrações $ m G$	de
azul de metileno (1, 5, 10, 15, 20) em mg/L. $[H_2O_2] = 5.0$ mg/L; Atividade Inicial de HRP = 25 U/mL; pH	ı =
5,0; Temperatura = 30 ºC; C₁ = Concentração de azul de metileno remanescente; C₀ = Concentração de azul de metileno de azul de az	de
azul de metileno inicial	52
Figura 5.9 - Gráfico de Michaelis-Menten na reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima HRP na presen	ça
de corante. Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração de Azul de Metileno = 20,0 mg/L; pH = 5, Temperatura = 30°C	
Figura 5.10 - Gráfico de Lineweaver e Burk para a determinação do K <sub>m</sub> e V <sub>max</sub> em relação ao peróxido o	
hidrogênio ( $\square$ ) ([AM] fixo em 20 mg/L) e em relação ao corante ( $\blacktriangle$ ) ([ $H_2O_2$ ] fixo em 5,0 mg/L; ). Todos o	
ensaios com atividade inicial de HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; temperatura igual a 30°C)	
Figura 5.11 - Cinética da reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima HRP na presença de corante e	
diferentes concentrações de $H_2O_2$ (50, 75, 100) em mg/L. Atividade inicial da HRP = 25 U/m	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; C <sub>i</sub> = Concentração de az	
de metileno remanescente; C <sub>0</sub> = Concentração inicial de azul de metileno	
Figura 5.12 - Teste cinético para verificar ordem zero na reação entre a enzima HRP e o corante azul o	
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. [ $H_2O_2$ ] = 50 mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/m	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM . 5	
Figura 5.13 - Teste cinético para verificar primeira ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul c	
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. [ $H_2O_2$ ] = 50 mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/m	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM . 5	
Figura 5.14 - Teste cinético para verificar segunda ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul c	
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. [ $H_2O_2$ ] = 50 mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/m	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM . 5	

Figura 5.15 - Teste cinético para verificar ordem zero na reação entre a enzima HRP e o corante azul	de
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 75 mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/	mL;
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM	. 57
Figura 5.16 - Teste cinético para verificar primeira ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul	l de
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. $[H_2O_2] = 75$ mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/	mL;
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM	. 58
Figura 5.17 - Teste cinético para verificar segunda ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul	
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. $[H_2O_2] = 75$ mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM	
Figura 5.18 - Teste cinético para verificar ordem zero na reação entre a enzima HRP e o corante azul	
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. $[H_2O_2] = 100$ mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/I	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM	
Figura 5.19 - Teste cinético para verificar primeira ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul	
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. $[H_2O_2] = 100$ mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/I	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM	
Figura 5.20 - Teste cinético para verificar segunda ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul	
metileno na presença de peróxido de hidrogênio. $[H_2O_2] = 100$ mg/L Atividade inicial da HRP = 25 U/I	
Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C; X <sub>A</sub> = Conversão do AM	
Figura 5.21 - Absorção do oxigênio singlete em 1270 nm nas reações via enzimática em pH = 5,0; temperatur	
25°C; concentração inicial de corante igual a 20 mg/L; relação $H_2O_2/HRP = 1/33$ (a); $1/136$ (b); $1/272$	
25 C, Concentração inicial de Corante igual à 26 mg/L, Telação m <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /mi = 1/35 (a), 1/130 (b), 1/272	
Figura 5.22 - Curva padrão de geração de oxigênio singlete obtida por análise de fosforescência em solu	
alcoólica da perinaftenona	-
Figura 5.23 – Curva de contorno gerada no primeiro delineamento com $[H_2O_2] = 0.3$ a 1.0 mM; HRP = (v	
Tabela 5.6); [AM] = 0,02 a 0,05 mM em pH = 5,0 e temperatura igual a 30,0°C. Região vermelha inc	
maior percentual de remoção de cor	
Figura 5.24 – Curva de contorno gerada no segundo delineamento com $[H_2O_2] = 0.4$ a 2,0 mM; HRP = (v	
Tabela 5.7); [AM] = 0,02 a 0,05 mM em pH = 5,0 e temperatura igual a 30,0°C. Região vermelha inc	
maior percentual de remoção de cor	
Figura 5.25 – Superfície gerada no terceiro delineamento com $[H_2O_2] = 0.4$ a 2,0 mM; HRP = (vide Tabela 5	
[AM] = 0,02 a 0,05 mM em pH = 5,0 e temperatura igual a 30,0°C. Região vermelha indica ma	
percentual de remoção de cor	
Figura 5.26 - Gráfico de Pareto gerado no terceiro delineamento com grau de confiança de 95%	
Figura 5.27 – Curvatura gerada no terceiro delineamento com $[H_2O_2] = 0.4$ a 2,0 mM; HRP = (vide Tabela 5	
[AM] = 0,02 a 0,05 mM em pH = 5,0 e temperatura igual a 30,0°C. Região vermelha indica ma	
percentual de remoção de cor	
1 1 2 2 2 2 2 2	_

#### 1. Introdução

Nas últimas décadas, as reservas de água com qualidade estão cada vez mais escassas, pois os despejos de efluentes estão acima da capacidade de carga assimilável dos corpos receptores, gerando assim um acúmulo de carga orgânica e um desequilíbrio da flora e fauna, principalmente nas regiões onde há uma alta densidade populacional. Isso provoca um efeito negativo entre disponibilidade qualitativa e a quantitativa dos recursos hídricos naturais presentes nestas regiões (AGENCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2013).

A necessidade da indústria por água acarreta um aumento de captação de água dos corpos hídricos, que por sua vez estão no limite máximo da capacidade de outorgas. Com isso a indústria não tendo o recurso natural disponível precisa realizar reúso dos seus próprios efluentes ou ainda adquirir água proveniente de estações de tratamentos biológicos de esgotos para utilizar em seus processos (PETRUS e SOARES, 2013).

Diante do cenário onde a prática de reúso se faz necessário, existe a necessidade de remoção de substâncias recalcitrantes ou mesmo tóxicas que não são comuns às águas naturais, substâncias estas sintetizadas e normalmente utilizada pelas indústrias. Com isso, várias tecnologias surgem para o reaproveitamento e reúso de efluente nas diversas etapas do processo, principalmente nos sistemas de resfriamento.

Dentro deste contexto, a geração de espécies reativas de oxigênio que apresentam elevados potenciais de oxidação pode ser uma alternativa para a oxidação de substâncias recalcitrantes presentes nos efluentes para adequação ao reúso. Uma das espécies de oxigênio reativo seria o oxigênio singlete que pode ser gerado por processos químico e enzimático. O oxigênio singlete é o oxigênio em um estado não-estável do oxigênio fundamental, obtido através de transferência de elétrons e energia para o oxigênio fundamental (O<sub>2</sub>).

Portanto esta tese tem como objetivo avaliar eficiência de espécies oxidantes geradas a partir de dois processos distintos: um processo químico que utiliza a mistura de peróxido de hidrogênio com hipoclorito de sódio e outro processo enzimático que utiliza a mistura da enzima horseradish peroxidase com o peróxido de hidrogênio. O corante azul de metileno será usado para avaliar a eficiência da geração de espécies oxidantes

Inicialmente uma descrição dos objetivos (gerais e específicos) é apresentada no Capítulo 2. No Capítulo 3 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre a tecnologia proposta. No Capítulo 4 é abordada a metodologia adotada para atingir os objetivos e, finalmente no Capítulo 5 são apresentados os resultados e discussões gerados neste trabalho. O Capítulo 6 contém as conclusões do trabalho seguido do Capítulo 7 com as sugestões para futuros trabalhos e, finalmente o Capítulo 8 é dedicado às referências bibliográficas. Após este capítulo são apresentados os apêndices como complemento dos resultados numéricos deste trabalho.

#### 2. Objetivos

#### 2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a ação das espécies reativas do oxigênio e identificar pelo menos uma espécie reativa do oxigênio, conhecido como oxigênio singlete em sistemas enzimáticos.

#### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros que influenciam na geração das espécies reativas de oxigênio, via rota química e encontrar as melhores condições na descoloração do corante;
- Verificar os principais parâmetros que influenciam a descoloração do corante via rota enzimática;
- Identificar e medir a concentração de oxigênio singlete gerada na rota enzimática;
- Comparar as condições de geração e de remoção de cor do corante gerado por via química e via enzimática;

#### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Os corantes

Os corantes são substâncias químicas de estrutura complexa contendo anéis aromáticos e radicais com certo grau de insaturação e ainda, um grupo cromóforo e um grupo auxocromo. O grupo cromóforo é aquele que vai conferir cor ao corante e possui algum radical químico como: nitroso; nitro; azo; etileno; carbonila; carbono-nitrogênio e enxofre. O grupo auxocromo tem usualmente a função da categorização do corante e está relacionada com a capacidade de fixação em função das fibras específicas e possui radicais como: amina; hidroxila; carboxila e sulfônico (SHREVE e BRINK JUNIOR, 1977).

Os despejos industriais da indústria têxtil contendo este tipo de molécula são gerados principalmente na etapa de tingimento. O tingimento é uma etapa destinada a colorir uniformemente os materiais têxteis. Nessa etapa deve-se considerar o material a tingir, o tipo de corante e a utilização de produtos auxiliares (ácidos, bases, sais, etc). Os efluentes gerados na operação de tingimento apresentam elevada DQO, alta condutividade, elevada coloração, grande quantidade de sólidos suspensos e grande variação de temperatura (BRAILE e CAVALCANTI, 1979). As características das moléculas de corante corroboram com a recalcitrância dos efluentes gerados na indústria têxtil.

No Brasil, 20% dos corantes consumidos na indústria têxtil são descartados como efluente e a principal fonte desta perda corresponde à fixação incompleta dos corantes à fibra durante o processo de tingimento (DALLAGO *et al*, 2005). A resolução número 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece um limite máximo de cor para rios de classe 2, 3 e 4. O que comprova a necessidade de tratamento deste efluente antes do seu descarte.

#### 3.1.1. Classificação de Corantes

Os corantes estão divididos em várias classes (ou categorias), e estão diretamente relacionadas aos grupos cromóforos dos corantes. Dentre essas classes estão os corantes ácidos, básicos, dispersos, diretos, ao enxofre e os reativos (ARAÚJO, 2008). Um dos corantes do tipo básico, é o objeto de estudo desta tese, possui dois grupamentos amino e dois anéis aromáticos separados por heteroátomos de nitrogênio e enxofre. O corante azul de metileno (AM) (C.I. 52015) pode ser observado na Figura 3.1.

$$(CH_3)_2N$$
 $S_1^+$ 
 $CI^ N(CH_3)_2$ 

Figura 3.1 - Estrutura molecular do corante azul de metileno Fonte: *Merck Chemical* (2013)

O azul de metileno é um corante catiônico, e possui uma variedade de aplicações, sendo utilizado no tingimento de algodão, lãs, papel e tinturas temporárias para cabelos. A exposição aguda pode causar efeitos prejudiciais à saúde como aumento do batimento cardíaco, dor de cabeça intensa, náuseas, vômitos, diarreia e necrose do tecido humano. Seu aquecimento pode gerar óxido de enxofre e óxido nítrico, além de causar efeitos tóxicos em organismos aquáticos e na qualidade da água. O inverso do logaritmo decimal da constante de acidez (pK<sub>a</sub>) do grupamento amina é 5,6 e Possui uma concentração letal, por via oral em ratazanas de 1.180 mg/Kg. (POGGERE *et al*, 2011; OLIVEIRA *et al* 2013; MERCK, 2013).

O AM é também utilizado como indicador de oxi-redução. Em ambiente oxidante o AM possui uma coloração azul e em ambientes redutores, o AM fica incolor. É um corante citológico utilizado em diversos testes como o "teste de gram" (DIAS *et al*, 2006; FIGUEIRA, 2012).

Com as características de apresentar cadeias de difícil degradação (anéis aromáticos) e possuir diversas aplicações industriais, o corante azul de metileno torna-se um modelo de contaminante recalcitrante gerado pela indústria têxtil que pode simular um efluente real.

#### 3.2. Oxigênio Singlete

O oxigênio singlete possui duas principais características: a de oxidar substâncias recalcitrantes e apresentar propriedades biocidas. O oxigênio singlete é o oxigênio em um estado não-estável do oxigênio fundamental, obtido por meio de transferência de elétrons e energia para o oxigênio fundamental (O<sub>2</sub>).

O oxigênio em seu estado fundamental (O<sub>2</sub>) contém dois elétrons em seu orbital de maior energia. Ao absorver energia, este orbital passa a ter dois estados energéticos não fundamentais e, portanto mais reativos que o oxigênio em seu estado fundamental, sendo estes chamados de oxigênio singlete (ATKINS, 2004).

Considerando o estado fundamental do oxigênio como referência (Figura 3.2 (a)), os dois estados gerados a partir da absorção de energia apresentam 37,5 Kcal/mol (Figura 3.2 (b)) e 22,5 Kcal/mol (Figura 3.2 (c)), sendo esta última a forma mais estável do oxigênio singlete e a de menor energia. Sua estabilidade depende diretamente da polaridade do solvente em que se encontra (MACHADO *et al*, 1994 e MARTINEZ *et al*, 2000). Na representação gráfica do oxigênio singlete demonstrada na Figura 3.2 é possível observar o orbital molecular mais energético do oxigênio (orbital "p") em seu estado fundamental

(Figura 3.2 (a)) e em seu estado excitado mais estável (Figura 3.2 (c)) sendo este chamado de oxigênio singlete. É observada também a presença de um orbital molecular sem elétrons, o que proporciona o caráter oxidante do oxigênio singlete. Além de ser um oxidante, estudos afirmam o caráter biocida do oxigênio singlete, sendo capaz de atuar na parede celular e atingir todas as organelas, através de oxidação, do interior de bactérias (NAKANO *et al*, 1998b).

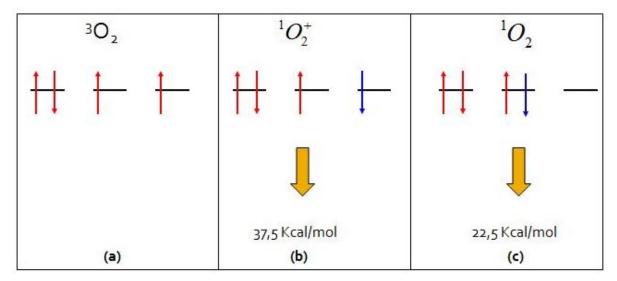


Figura 3.2 - Orbital molecular "p" do oxigênio em seu estado fundamental (a) e de seus respectivos estados excitados (b) e (c). Baseado em Martinez et al, 2000.

Portanto o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) pode ser obtido a partir de uma fonte de oxigênio no estado fundamental sendo excitado por uma fonte de energia externa (radiação UV, enzimas, etc), podendo ser catalisada por metais (cobre, molibdênio, prata) ou ametais (cloretos, brometos). O oxigênio singlete é altamente reativo e oxida várias funções orgânicas ricas em elétrons com sulfetos, aminas e fenóis. As possíveis fontes de oxigênio para a geração de oxigênio singlete são o peróxido de hidrogênio, os endoperóxidos — hidrocarbonetos que contêm em sua molécula o superóxido que por quebra de ligação pode gerar oxigênio fundamental —; ar atmosférico, oxigênio puro e óxidos metálicos como o óxido de titânio (MACHADO *et al*, 1994; NAKANO *et al*, 1998a; NAKANO *et al*, 1998b;

KONAKA *et al*, 1999; MARTINEZ *et al*, 2000; TOKUNAGA *et al*, 2005; ORELLANA *et al*, 2006; SONG *et al*, 2007). A Figura 3.3 ilustra as diversas formas de obtenção do oxigênio singlete.

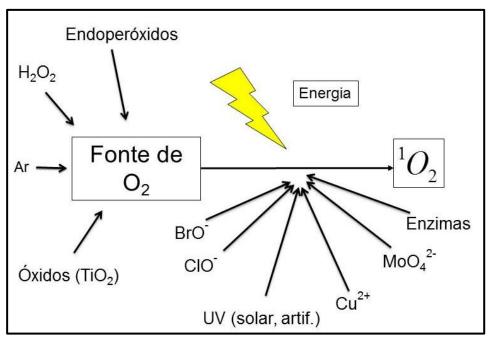


Figura 3.3 - Métodos de obtenção do oxigênio singlete. Elaboração própria

Conforme já mencionado, o oxigênio singlete é um possível agente oxidante devido a sua estrutura eletrônica com "vacâncias" de elétrons em seu orbital "p", o que o torna bastante reativo, com potencial de oxidação padrão de 2,42 volts, sendo portanto, uma alternativa para a degradação de substâncias recalcitrantes, por exemplo, os corantes. Quando comparado com outros oxidantes (Tabela 3.1), o oxigênio singlete possui grandes possibilidades de mineralizar substâncias recalcitrantes à degradação biológica (GARDINGO, 2010).

Tabela 3.1 Principais oxidantes existentes e seus respectivos potenciais de oxidação

	<u> </u>
Oxidante	Potencial de Oxidação (Volts)
$F_2$	3,06
•OH	2,80
$^{1}O_{2}$	2,42
$O_3$	2,07
$H_2O_2$	1,77
HClO	1,49
$Cl_2$	1,39

Fonte: ECKENFELDER, 1992

#### 3.3. Estabilidade do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

O tempo médio de vida do oxigênio singlete é diretamente proporcional à polaridade do solvente onde ocorre a reação, e quanto mais apolar for o solvente, maior será a estabilidade (tempo médio de vida) do oxigênio singlete (KREITNER *et al*, 1993; MACHADO *et al*, 1994). Por outro lado, a velocidade das reações químicas envolvendo o oxigênio singlete se dá em uma relação inversa, ou seja, enquanto a estabilidade é favorecida por solventes apolares, a cinética de reação é desfavorecida em solventes apolares (NAKANO *et al*, 1998a), sendo, portanto, uma boa opção para o tratamento de efluentes industriais já que se apresentam em meio aquoso. A Tabela 3.2 mostra valores do tempo de vida do oxigênio singlete em solventes de diferentes polaridades.

Tabela 3.2 - Estabilidade (tempo de vida) do oxigênio singlete em solventes

Solvente	Tempo de meia vida (μs)
Água	3 a 5 <sup>I</sup>
Metanol	5 a 11 <sup>II</sup>
Clorofórmio	60 <sup>II</sup>
Alifáticos e Aromáticos	20-30 <sup>III</sup>
Tetra Cloreto de Carbono	$900 - 26.000^{III}$

Fontes: I - Machado et al, 1994.

II - Nakano et al, 1998a.

III – Kreitner, 1993

Na Tabela 3.3 podem ser observados valores das constantes de velocidade de formação de oxigênio singlete gerado pela degradação de endoperóxidos.

Tabela 3.3 - Constante de velocidade na formação do oxigênio singlete com diferentes solventes

Solvente	Constante cinética (10 <sup>-4</sup> s <sup>-1</sup> )
Água (pH = $7,2$ )	4,16
Água (pH = $4.5$ )	4,65
Metanol	1,64
Clorofórmio	1,55

Fonte: Nakano et al, 1998a.

Quanto maior o tempo de vida do oxigênio singlete, maior facilidade de sua detecção. O oxigênio singlete pode ser detectado através de espectroscopia e por reações de formação de cristais. Duas moléculas de oxigênio singlete reagem entre si e retornam a oxigênio no estado fundamental, ao retornar a este estado são capazes de emitir energia na região de absorção do vermelho do espectro visível (DURAN et al,1979; TSUKAGOSHI et al, 2009). Uma molécula de oxigênio singlete libera energia ao retornar ao estado fundamental, é possível detectar esta energia através da emissão em 1270nm (DI MASCIO et al, 2003; SONG et al, 2011; CORRÊA et al, 2012). O oxigênio singlete também ser determinado por espectroscopia de ressonância de spin (TAKAYAMA et al, 2001; YUAN et al, 2007). Ao reagir com o dimetilfurano o oxigênio singlete forma um cristal que tem seu ponto de fusão na faixa de 75-76°C, sendo possível determinar qualitativamente o oxigênio singlete no sistema (KREITNER et al, 1993; KREITNER et al, 1996).

#### 3.4. Geração do Oxigênio Singlete

Pode-se destacar uma grande variedade de processos de geração de oxigênio singlete e estes processos podem ser divididos em três grandes grupos:

#### 3.4.1. Produção em organismos vivos (via do metabolismo celular)

Os neutrófilos, células especializadas pertencentes ao sistema imunológico, produzem o oxigênio singlete através de uma enzima contida em grânulos em seu citoplasma. Esses grânulos são ricos na enzima mieloperoxidase (MPO). A produção de oxigênio singlete se dá na fagocitose das células, agindo assim como um mecanismo de defesa das células (KAKINUMA *et al*, 1998).

## 3.4.2. Produção com reagentes químicos auxiliados por enzimas (rotas bioquímicas)

As enzimas peroxidases na presença de íons cloretos e peróxido de hidrogênio são capazes de transformar (oxidar) os íons cloretos em hipoclorito, que tem características bactericidas e é um intermediário de reação de formação do oxigênio singlete, pois quando em contato com alguma fonte de oxigênio (o próprio peróxido de hidrogênio) é capaz de produzir oxigênio singlete e regenerar os íons cloretos como podemos observar nas reações 3.1 e 3.2. Nakano *et al* (1998b) sugerem ainda que os íons cloro também podem ser substituídos por íons bromo ou ainda mais genericamente pelos halogênios (PIATT *et al*, 1977; DURAN *et al*, 1979; KAKINUMA *et al*, 1998).

$$O_2 + Cl^- \xrightarrow{\text{peroxidase}} H_2O + OCl^-$$
 (3.1)

$$H_2O_2 + ClO^- \rightarrow H_2O + Cl^- + {}^1O_2$$
 (3.2)

#### 3.4.3. Produção por reagentes químicos (rotas químicas)

Uma das rotas para a produção de oxigênio singlete é por meio da combinação de dois reagentes químicos o hipoclorito de sódio e o peróxido de hidrogênio, representada pela Reação 3.2 (COTTON e WILKINSON, 1978; TSUKAGOSHI *et al*, 2009). Esta reação pode ainda ser catalisada por metais como cobre, paládio ou rutênio (TOKUNAGA *et al*, 2005; YUAN *et al*, 2006).

Diversos trabalhos descrevem o poder oxidante do oxigênio singlete na degradação de substâncias recalcitrantes por via química (reação 3.2). Teixeira *et al* (2012) estudaram a remoção de substância surfactante numa faixa de meio alcalino (6,0 a 8,0) e obteve 95% de remoção desta substância utilizando uma dosagem 5 vezes a quantidade estequiométrica para o oxigênio singlete, em pH igual a 6. Teixeira *et al* (2013) estudaram a oxidação de cianeto, e observaram que a cinética de oxidação de cianeto pelo oxigênio singlete por via química não é de primeira ordem, sugerindo assim que a reação de geração de oxigênio singlete seja realizada em várias etapas com diversos intermediários de reação. Os autores obtiveram 99,8% de remoção de cianeto em meio alcalino utilizando a mistura de 2 mols de peróxido de hidrogênio e 2 mols de hipoclorito de sódio.

#### 3.5. Remoção de Cor do Azul de Metileno por Via Química

A reação de oxidação do azul de metileno pelo oxigênio singlete gerado por via química ocorre conforme a reação 3.3. O azul de metileno também pode reagir com o peróxido de hidrogênio segundo a reação 3.4 (SALEM e EL-MAAZAWI, 2000) e uma terceira reação que pode ocorrer seria entre o azul de metileno e o hipoclorito de sódio (na sua forma de ácido hipocloroso) representada pela reação 3.5.

$$C_{16}H_{18}N_3SCl + \frac{51}{2} \stackrel{1}{}_{02} \rightarrow 16CO_2 + 6H_2O + 3HNO_3 + H_2SO_4 + HCl$$
 (3.3)

$$C_{16}H_{18}N_3SCl + 51H_2O_2 \rightarrow 16CO_2 + 57H_2O + 3HNO_3 + H_2SO_4 + HCl$$
 (3.4)

$$C_{16}H_{18}N_3SCl + 51 HClO \rightarrow 16 CO_2 + 6 H_2O + 3HNO_3 + H_2SO_4 + 52 HCl$$
 (3.5)

Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho de degradação do azul de metileno por oxigênio singlete utilizando a via química (peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio) e nenhum trabalho utilizando hipoclorito de sódio, referente à Reação 3.5, foi encontrado.

# 3.6. Variáveis que influenciam a Geração do Oxigênio Singlete em Sistemas Químicos

Uma variável importante e que está diretamente relacionada com o poder oxidante do oxigênio singlete é o pH. Não existe na literatura um consenso para um valor ótimo de pH na geração do oxigênio singlete, mas de modo geral em sistemas que utilizam enzimas (sistemas biológicos) para catalisar as reações que geram o oxigênio singlete, o pH utilizado

é menor que 7,0 enquanto que reações que não utilizam sistemas biológicos, ou seja, em sistemas químicos o pH utilizado é maior que 7,0.

O aumento e a diminuição do pH de um meio reacional está diretamente relacionado à concentração de íons H<sup>+</sup>. A equação que correlaciona a concentração de uma dada substância e/ou um íon (como é o caso dos íons H<sup>+</sup>) com o seu potencial de oxidação é a equação de Nernst, visto na Equação 3.1 para temperatura de 25°C. Nesta equação a concentração hidrogeniônica influencia as reações de oxi-redução (GENTIL,1994).

$$E = E^{0} - \frac{0,0591}{n} * log \frac{Concentração de Oxidante}{Concentração do Redutor}$$
 (3.1)

Onde:

E – Potencial observado

E<sup>0</sup> – Potencial padrão

n – número de elétrons envolvidos

Já a concentração de peróxido de hidrogênio, está diretamente relacionada à disponibilidade de oxigênio em seu estado fundamental e por consequência, aos intermediários de reação para a formação do oxigênio singlete, que são: Radical Hidroxila (HO $\bullet$ ); Ânion Peroxidrila ( $HO_2^-$ ); Ânion Radical Superóxido ( $O_2^{--}$ ) (MACHADO *et al*, 1994).

No caso do ânion radical superóxido, existe divergência entre alguns autores sobre o aspecto deste ânion atuar efetivamente como um intermediário na reação de produção de oxigênio singlete. Konaka *et al* (1999) quando estudaram a reação de oxigênio singlete utilizando radiação UV catalisada com óxido de titânio sugeriram um possível caminho de reação para se chegar no oxigênio singlete, através da formação do ânion radical superóxido. Yuan *et al* (2006) estudaram a geração do oxigênio singlete a partir da oxidação de ácido ascórbico catalisado por íons cobre e afirmaram que a oxidação do ácido ascórbico

produz o ânion superóxido. Porém, seus resultados mostram que ao adicionar um supressor do ânion (a enzima superóxido dismutase - SOD) a reação não é inibida, demostrando que este íon não faz parte do meio reacional estudado pelos autores.

A concentração de hipoclorito de sódio a ser adicionada está intimamente ligada à concentração do peróxido de hidrogênio, já que em uma reação de oxi-redução, a quantidade de elétrons que será transferida do agente oxidante (peróxido de hidrogênio) está diretamente ligada à concentração do agente redutor (hipoclorito de sódio). Portanto, o procedimento usual para a determinação da concentração ótima do hipoclorito de sódio é por meio da relação mássica ou molar com o peróxido de hidrogênio (TEIXEIRA *et al*, 2012).

#### 3.7. Variáveis que Influenciam na Oxidação Enzimática

As principais variáveis que influenciam a produção das espécies reativas do oxigênio via rota enzimática são as mesmas variáveis que afetam o desempenho de uma enzima em qualquer processo enzimático, ou seja, o pH do meio e a temperatura.

O pH apresenta maior influência no grau de ionização dos grupamentos existentes na enzima ou até mesmo no seu centro catalítico. A concentração de íons H<sup>+</sup> pode influenciar também na ação efetiva do substrato. O pH pode influenciar os sistemas enzima-substrato e as enzimas, de forma individualizadas, e, portanto, para cada caso, o efeito do pH deverá ser estudado de forma isolada (ELLIOTT, 2005). Guerrero *et al* (2008) estudaram a remoção de compostos fenólicos com a peroxidase oriunda do nabo e encontraram melhor resultado em pH igual a 6,0; já Husain e Matto (2009) estudaram a enzima extraída do nabo na descoloração de corantes diretos verificaram que no pH igual a 5,0 obtiveram maior remoção de cor. Para a enzima peroxidase tendo como fonte a raiz forte, tanto Alemzadeh *et* 

al (2009) na remoção de fenol, quanto De Souza et al (2007) na remoção de cor em corantes têxteis, encontraram o mesmo valor de pH ótimo para suas reações e igual a 7,0. Portanto, é importante a avaliação do parâmetro pH em cada sistema enzima-substrato e para enzimas de diferentes fontes.

Em uma reação bioquímica, a temperatura pode atuar de duas formas distintas. Pode favorecer a cinética da reação, pois a equação de Arrhenius mostra que ao aumentar a temperatura de uma reação química e/ou bioquímica, a velocidade da reação pode ser aumentada numa razão exponencial. Já no caso particular de reações enzimáticas, existe um limite no qual a temperatura começa a inibir a reação enzimática, por desnaturação da enzima e, portanto, acarretando perda no poder catalítico da enzima como mostrado na Figura 3.4. A temperatura também apresentará uma faixa ótima de ação, não podendo ser tão baixa na qual apresentará uma cinética muito lenta e nem tão alta para evitar a desnaturação térmica da enzima (CONN e STUMPF, 1976).

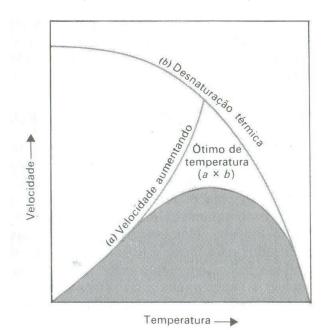


Figura 3.4 - Ação da temperatura numa reação enzimática Fonte: Conn e Stumpf, 1976.

#### 3.8. Horseradish peroxidase (HRP)

A horseradish (*Armoracia rusticana*) é uma erva cultivada em regiões temperadas e sua raízes utilizadas para fins culinários, porém são ricas em peroxidase (VEITCH, 2004). A peroxidase proveniente da horseradish (ou horseradish peroxidase) é classificada como uma enzima da classe oxidorredutase e, de acordo com a IUBMB a sua referencia é E.C. 1.11.1.7 e possui outros sinônimos relacionados principalmente com a fonte que a gerou (IUBMB, 2011).

O seu desempenho em relação ao pH varia de acordo com as condições ambientais em que se encontra e seus substratos, podendo variar de 3 a 10 e o seu ponto isoelétrico (PI) varia de 3,5 a 11, dependendo do meio em que está inserida. A faixa de temperatura mais favorável para a atividade enzimática vai de 20 a 60 °C. Sua massa molecular pode variar de 27 a 220 KDa (BRENDA, 2011) e possui um átomo de ferro ligado a átomos de nitrogênio em seu centro catalítico. (NICELL *et al*, 1997; WU *et al*, 1997; BHUNIA *et al*, 2000; VEITCH, 2004; LIU *et al*, 2006).

A HRP reage com o peróxido de hidrogênio formando um composto intermediário oxidante (HRP-I) que atua na oxidação de compostos químicos (representados por AH<sub>2</sub>), produzindo radical livre e outro composto intermediário (HRP-II), também capaz de gerar radical, conforme modelo citado por (BJÖRKSTÉN, 1968; COURTEIX e BERGEL, 1995) e apresentado pelas reações 3.8, 3,9 e 3.10.

$$HRP + H_2O_2 \to HRP - I + H_2O$$
 (3.6)

$$HRP - I + AH_2 \rightarrow HRP - II + \bullet AH + H_2O$$
 (3.7)

$$HRP - II + AH_2 \rightarrow HRP + \bullet AH + H_2O$$
 (3.8)

Na primeira etapa da reação, o corre uma reação de oxi-redução entre a enzima HRP e o peróxido de hidrogênio. No centro catalítico da enzima ocorre a oxidação. Ao formar o composto HRP-I da Reação 3.8 o ferro contido no centro catalítico da enzima HRP (inicialmente com número de oxidação igual a 3) perde um elétron e fica com o número de oxidação igual a 4. O ferro permanece com este estado de oxidação no composto HRP-II e retorna ao seu estado de oxidação inicial representado na Reação 3.10 (SHELDON *et al* 2001). A HRP, portanto possui dois substratos: o peróxido de hidrogênio que participa na oxidação inicial da enzima e qualquer outra substância que será oxidada pela HRP, sendo esta substância responsável pela redução do sítio catalítico da HRP e consequente retorno da enzima ao seu estado de oxidação inicial.

Se a concentração do peróxido de hidrogênio atingir valores elevados, a enzima HRP poderá perder sua atividade (NICELL *et al*, 1997; BHUNIA *et al*, 2000; ONDER *et al*, 2011). Portanto a avaliação da relação entre a quantidade de enzima e a concentração de peróxido de hidrogênio é importante para definir em que concentrações a HRP é inibida pelo agente que oxida seu centro catalítico.

Mano *et al* (2014) e Pereira *et al* (2014) mostram que no mecanismo apresentado nas reações 3.8, 3.9 e 3.10 uma das espécies de radical livre produzido pela reação entre a enzima HRP e o peróxido de hidrogênio é o oxigênio singlete, porém ainda não se conhece o mecanismo desta geração.

#### 3.8.1. Cinética Enzimática

Segundo Lehninger (2002), o modelo cinético que se adequa a maioria dos sistemas enzimáticos é o de Michaelis-Meten que considera a reação entre o substrato [S] e a enzima [E] passando pela formação de um complexo enzima substrato [ES] para posterior formação de produto [P], como apresentado na Reação 3.9.

$$E + S \xrightarrow{\frac{k-1}{k-1}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \tag{3.9}$$

A cinética de Michaelis-Menten admite diversas aproximações tais como (PINTO e DE MENEZES, 2009):

- Estado estacionário O complexo [ES] é consumido e formado na mesma velocidade;
- A velocidade máxima se dá quando toda a concentração inicial de enzima está na forma do complexo [ES];
- A razão entre a concentração inicial de enzima e a concentração inicial de substrato
   ([E]<sub>0</sub> / [S]<sub>0</sub>) é baixa, ou seja, considera-se a concentração inicial de enzima muito menor do que a concentração inicial de substrato.

Com estas aproximações é possível escrever a taxa de formação do produto [P] apresentada na Equação 3.2:

$$V_P = \frac{V_{max}^*[S]_0}{K_m + [S]_0} \tag{3.2}$$

Onde:

[S]<sub>0</sub> – Concentração Inicial de Substrato

 $V_{max}$  – Velocidade máxima da reação, equivalente ao produto da constante cinética  $k_2$  e a concentração inicial de enzima.

K<sub>m</sub> – Constante de afinidade entre a enzima e o substrato, definida na Equação 3.3 (a seguir)

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \tag{3.3}$$

Quando existe ação de inibição da enzima e este inibidor de liga ao complexo ES formando outro complexo intermediário (ES<sub>2</sub>) temos inibição acompetitiva. Este complexo intermediário não é capaz de formar produto. O mecanismo cinético de inibição pode será representado pela Reação 3.10, com ação de inibição no complexo [ES] (PINTO e DE MENEZES, 2009).

Onde:

K<sub>S</sub> – Constante de equilíbrio de formação do complexo [ES]

 $k_{\text{p}}-\text{Constante}$  cinética de formação do produto [P]

[ES<sub>2</sub>] – Complexo inibidor

Na Figura 3.5 está representado o perfil típico do inverso das concentrações de substrato (eixo horizontal) e dos valores de velocidades (eixo vertical) da equação de Michaelis-Menten (Equação 3.2) para sistema com inibição do tipo acompetitiva por substrato (TONG *et al*, 1998; PINTO e MENEZES, 2009).

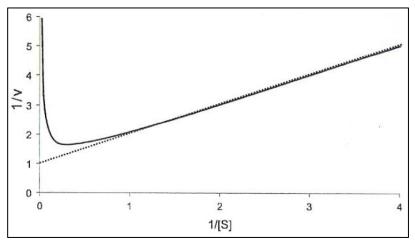


Figura 3.5 - Curva típica do inverso da equação de Michaelis-Menten com inibição de acompetitiva por substrato.

Fonte: Pinto e Menezes, 2009

Taylor *et al* (1994) investigaram a cinética de inativação da Horseradish peroxidase por peróxido de hidrogênio na presença de fenol. Os autores consideraram que a cinética de inativação da enzima ocorre de acordo com a Equação 3.4 (LEVENSPIEL, 1974):

$$\frac{d\mathcal{C}_A}{dt} = k[\mathcal{C}_A]^n \tag{3.4}$$

Onde:

 $\frac{dC_A}{dt}$  = Decaimento da concentração de fenol ao longo do tempo.

k = Constante da velocidade da reação

C<sub>A</sub> = Concentração de Fenol

n = pseudo-ordem da reação

Foi possível assim, determinar a constante de velocidade da reação de inativação da HRP por peróxido de hidrogênio na degradação do fenol. No Apêndice 1 encontra-se a teoria da determinação da constante da velocidade.

#### 3.8.2. Remoção de Substâncias Recalcitrantes Utilizando HRP

A enzima HRP na presença de peróxido de hidrogênio é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio como o radical hidroxila (HO•) (COURTEIX e BERGEL, 1995) e o oxigênio singlete (¹O₂) (PIATT *et al*,1977; DURAN *et al*, 1979; MANO *et al*, 2014). Ambas espécies são oxidantes fortes e não seletivos, podendo reagir com qualquer outra substância

Wu et al (1997) afirmaram que uma das barreiras enfrentadas na degradação de substâncias recalcitrantes é a grande quantidade de enzima a ser utilizada refletindo nos custos do processo. Os autores estudaram a degradação de fenóis e cloro-fenóis por HRP, utilizando aditivos como o polietileno glicol (PEG) e polieletrólitos com o objetivo de fornecer à enzima uma maior estabilidade. A partir dos resultados foi verificado que:

- Para cada aditivo existe uma condição de pH, concentração de enzima e razão
   H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/contaminante que fornecia a melhor remoção de fenóis;
- O PEG é o aditivo que fornece a melhor estabilidade para a HRP, porém sua eficácia não é significativa, pois altera (aumentando) a dosagem de HRP no sistema;
- Em relação à cinética da reação enzimática, os autores relatam que seria uma cinética do tipo "ping-pong", que é confirmada também por Tong et al (1998) que estudaram a cinética de degradação de cloro-fenóis na ausência de aditivos.

A HRP sempre foi conhecida por oxidar substâncias que tenham em sua estrutura anéis aromáticos, os quais são atacados pelos radicais gerados pela reação da HRP com peróxido de hidrogênio como descrito por Nicell *et al* (1997).

Bhunia *et al* (2000) descreveram pela primeira vez a HRP sendo utilizada na degradação de corantes comerciais e conseguiram uma remoção de até 10% com o corante *Remazol blue* e de até 30% com o corante Cristal Violeta. As condições experimentais estão resumidas na Tabela 3.4. Na revisão da literatura, os autores sugerem o uso de enzimas em decorrência das técnicas convencionais de tratamento biológico (anaeróbios e aeróbios) gerarem compostos carcinogênicos além da própria recalcitrância dos corantes.

Forgacs *et al* (2004) citam que o futuro do tratamento de corantes com microrganismos pode estar baseado na engenharia genética, para potencializar características dos micro-organismos a fim de produzir enzimas capazes de degradar corantes e outras substâncias recalcitrantes.

Onder *et al* (2011) estudaram a degradação do corante *Naphthol blue Black* (NBB), com a HRP, e avaliaram a influência do pH e da temperatura na reação enzimática. Análises de varredura do espectro na faixa do UV, de 200 a 400 nm representavam as transformações ocorridas nos anéis aromáticos e na faixa do visível, de 400 a 700 nm foram responsáveis pelas transições na ligação azo. Para complementar todo o entendimento do mecanismo de reação, foi realizada análise por cromatografia líquida, espectroscopia de massa e um levantamento cinético de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> mostrados na Tabela 3.4.

Ferreira-Leitão *et al* (2003) estudaram a degradação do azul de metileno na presença de dois tipos diferentes de peroxidase: a lignina peroxidase (LiP) e a horseradish peroxidase (HRP). Os autores observaram que na degradação de azul de metileno há formação de diferentes intermediários dependendo da relação molar AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e atingiram uma degradação de até 60 % utilizando relações molares AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de até 1/40.

Alguns autores estudaram a inibição da HRP durante a reação de degradação de substâncias recalcitrantes, tanto na degradação de fenóis quanto na degradação de corantes. Observaram que a enzima foi inibida por peróxido de hidrogênio, porém não reportam a concentração a partir da qual o peróxido de hidrogênio começa a inibir a atividade enzimática (WU *et al*, 1997; TONG *et al*, 1998; BHUNIA *et al*, 2000). É importante avaliar a inibição da HRP nos estudos envolvendo a combinação com peróxido de hidrogênio.

Diversos autores (NICELL et al, 1996; TONG, et al, 1998; WU et al, 1999) observaram que ao degradar fenol na presença de HRP e peróxido de hidrogênio há formação de substâncias poliméricas insolúveis em água que precipitam assim que são formadas. Por outro lado, Bhunia et al (2000) estudando a degradação de corantes não conseguiram definir se ocorria exatamente a formação do precipitado, pois com alguns corantes foi observada a formação de um precipitado insolúvel e, com outros, a formação de substâncias solúveis em água, porém incolores. Os autores citam a necessidade de uma investigação mais detalhada para determinar os mecanismos da degradação.

Na Tabela 3.4 encontram-se as condições de algumas variáveis avaliadas na degradação de algumas substâncias utilizando HRP e peróxido de hidrogênio e suas constantes cinéticas quando investigadas.

Tabela 3.4 – Condições das principais variáveis estudadas na degradação de substâncias

recalcitrantes na presenca de HRP e peróxido de hidrogênio e resultados

recalcitrantes na presença de HRP e peróxido de hidrogênio e resultados					
Variável	Condições	Ótimo	Contaminante	Referência	
pH <sup>1</sup>	4-10	7	4-clorofenol		
pH <sup>1</sup>	4-10	5	2-clorofenol		
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]/poluente <sup>1</sup>	0,45 a 2 mM	0,9 mM	2-clorofenol	Wu <i>et al</i> , 1997	
PEG	0 a 0,3 g/L	0,1 g/L	4-clorofenol		
HRP <sup>1</sup>	0 a 0,3 U/ml	0,1	4-clorofenol		
$[H_2O_2]^2$	0 a 3 mM	0,6 mM	4-clorofenol		
$K_{\rm m}^{-3}$	21,77 mg/L	-	fenol	Tong <i>et al</i> , 1998	
V <sub>max</sub> <sup>3</sup>	5,54 mg/L*min	-	fenol		
pH <sup>4</sup>	2 a 8	2,5	Remazol Blue		
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]/poluente	1,0 molar	-	Remazol Blue		
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ]/poluente	0,5 molar	-	Cristal Violeta		
K <sub>m</sub> <sup>5</sup>	0,044 mM	-	Remazol Blue	Bhunia et al 2000	
V <sub>max</sub> <sup>5</sup>	0,015 mM/min	-	Remazol Blue		
K <sub>m</sub> <sup>5</sup>	0,021 mM	-	Cristal Violeta		
$V_{max}^{5}$	0,0028 mM/min	-	Cristal Violeta		
pH <sup>6</sup>	3 a 8	6	NBB <sup>9</sup>		
Temperatura <sup>7</sup>	25 a 70℃	30°C	NBB		
Temperatura <sup>8</sup>	25 a 70° C	25 a 70°C	NBB	Onder <i>et al</i> , 2011	
K <sub>m</sub>	39 x 10 <sup>-3</sup> mM	-	NBB		
V <sub>max</sub>	0,227 mM/min	-	NBB		

<sup>1 –</sup> Na presença de PEG (Polietileno Glicol);

<sup>2 –</sup> Concentração de HRP = 0,1 U/mL

<sup>3 –</sup> Concentração de HRP = 1,9 U/ml e  $[H_2O_2]$  = 2 mM 4 – Concentração de HRP = 0,14 U/ml;  $[H_2O_2]$  = 0,2 mM; Concentração de corante = 15 mg/L

 $<sup>5 - [</sup>H_2O_2] = 0.2 \text{ mM}; \text{ pH } 2.5$ 

- 6 Concentração de HRP = 5,88 U/ml;  $[H_2O_2]$  = 0,3 mM; Concentração de corante = 0,6 mM; Temperatura =
- 7 Concentração de HRP = 5.88 U/ml;  $[H_2O_2] = 0.3$  mM; Concentração de corante = 0.6 mM; pH = 7.0 8 Concentração de HRP = 5.88 U/ml;  $[H_2O_2] = 0.3$  mM; Concentração de corante = 0.6 mM; pH = 5.0
- 9 Naphthol blue Black

# 4. Materiais e Métodos

O capítulo de materiais e métodos inicialmente apresenta os materiais e métodos analíticos utilizados nesta tese e, posteriormente, as metodologias utilizadas nos ensaios experimentais.

Os experimentos seguiram as seguintes etapas:

- Avaliação da concentração de peróxido de hidrogênio utilizada na reação convencional de geração de oxigênio singlete por via química;
- Determinação das melhores condições de pH e temperatura nas quais a atividade da enzima HRP apresente maior eficiência no processo de remoção de cor utilizando o peróxido de hidrogênio;
- Determinação dos parâmetros cinéticos (K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub>) nos sistemas "enzima / peróxido de hidrogênio" na ausência e na presença de corante;
- Avaliação da inibição da cinética da reação de HRP com o peróxido de hidrogênio na presença e na ausência de azul de metileno;
- Avaliação das condições estequiométricas  $AM/H_2O_2$  e da relação substrato-atividade enzimática inicial ( $H_2O_2/HRP$  dada em mM\*mL/U);
- Determinação da presença de oxigênio singlete gerado no sistema enzimático.

#### 4.1. Corante

Para avaliar a possibilidade de degradação por espécies reativas de oxigênio, tanto pelo sistema químico e enzimático, foi utilizado o corante do tipo básico azul de metileno, fornecido pela VETEC. As soluções de corante foram preparadas com água destilada. A estrutura deste corante pode ser vista na Figura 3.1. A seleção do corante se deu através das análises dos picos de absorção em comprimentos de onda diferentes dos picos de absorção da HRP. Este levantamento se encontra no Apêndice 2.

#### 4.2. Remoção de Cor

A avaliação da remoção de cor do corante azul de metileno foi realizada através da medida da absorvância em 660 nm. O comprimento de onda de maior absorção do azul de metileno ocorreu em 660 nm, sendo proporcional à concentração do azul de metileno no intervalo entre 0 e 20 mg/L. As leituras da absorvância foram realizadas no espectrofotômetro SHIMADZU – Modelo UV MINI 1240.

# 4.3. Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio utilizado nos ensaios foi diluído a partir de uma solução comercial concentrada a 600 g/L fabricada pela empresa Peróxidos do Brasil. Sua concentração era monitorada através da titulação com permanganato de potássio.

#### 4.3.1. Determinação da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada por colorimetria através da reação do peróxido de hidrogênio com o metavanadato de amônia que gera um complexo avermelhado com absorção máxima em 446 nm. Uma curva padrão relacionando a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a absorvância a 446nm foi construída através da adição de 4 mL de amostra e 1,6 mL de metavanadato de amônia conforme descrito por Oliveira *et al*, 2001.

#### 4.4. A Enzima

A enzima utilizada foi a *Horseradish peroxidase* (HRP) (EC 1.11.17), a qual foi cedida pela Toyobo do Brasil na forma sólida liofilizada misturada com terra diatomácea para posterior extração. O sólido é de cor marrom e a atividade específica informada pelo fabricante foi de 13 U/mg.

#### 4.4.1. Extração da Enzima e Medida da Atividade Enzimática

Após a solubilização da enzima liofilizada, em tampão fosfato de sódio pH 7,0, a solução foi filtrada em papel comum e dialisada contra água desionizada em membrana (SPECTRUM®) de 8 kDa. A atividade da enzima bruta era então determinada pelo método da 4-aminoantipirina. O método consiste em adicionar 300μL de fenol (0,2M); 4,5mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (0,2M); 300μL de 4-aminoantipirina (Sigma) (0,05M); 600μL de peróxido de hidrogênio (60mg/L) e 300μL de enzima, nesta ordem, totalizando 6,0 mL, como descrito por Nicell *et al.* (1997). Estes autores definem uma unidade de atividade enzimática como sendo o consumo de peróxido de hidrogênio (em μmol) durante

1,0 minuto de reação. Esse consumo é acompanhado pela absorvância do complexo vermelho formado pela reação entre o radical hidroxila do fenol e a 4-aminoantipirina. Este complexo tem absorção em 510 nm e a coloração formada é proporcional ao consumo de peróxido de hidrogênio. A absorvância foi medida com o espectrofotômetro da HACH modelo DR 2800. Antes de realizar os ensaios, a atividade foi calculada pela equação 4.1 com coeficiente de absortividade igual a 7210 L/mol.cm baseado em Nicell *et al*, 1997:

$$A = \frac{\Delta Abs_{510}/min*Volume\ total\ do\ ensaio*1000}{7210*Volume\ de\ amostra} \tag{4.1}$$

Onde:

ΔAbs<sub>510</sub>/min – Variação da absorvância no primeiro minuto de reação a 510nm.

#### 4.5. Hipoclorito de Sódio

Os testes de degradação do azul de metileno via rota química foram realizados utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a 20,0 g/L vendida pela VETEC Química/Sigma-Aldrich. Periodicamente, a concentração de cloro ativo era analisada.

#### 4.6. Reações Via Química

As reações de geração do oxigênio singlete por via química foram realizadas em béquer de 250 mL com volume reacional de 150 mL. A concentração inicial de corante era de 20 mg/L. O pH era ajustado com soluções de hidróxido de sódio (0,1 M) e ácido sulfúrico (0,1 M) e monitorado através de um medidor de pH TECNOPON modelo

mPA210. A reação era iniciada pela adição de uma alíquota de peróxido de hidrogênio referente à concentração definida pelo planejamento experimental para um volume reacional de 150 mL. Logo após a adição do peróxido de hidrogênio, uma alíquota de hipoclorito de sódio também era adicionada ao sistema de acordo com as concentrações definidas pelo planejamento fatorial. O sistema era agitado com uma placa de agitação da marca IKA com o auxílio de um agitador magnético durante 60 minutos. A Figura 4.1 contém o aparato experimental da reação de geração de espécies reativas de oxigênio por via química (a), onde pode ser observada a geração de gases durante a reação (b).



Figura 4.1 - Aparato experimental para a realização da reação de geração de oxigênio singlete por via química (a) e geração gasosa durante a reação (b).

#### 4.6.1. Definição das Concentrações nas Reações Via Processo Químico

A avaliação da descoloração do corante azul de metileno pelas espécies reativas de oxigênio via rota química, foi realizada por meio de um planejamento experimental em dois níveis. O planejamento experimental visou avaliar os efeitos das variáveis pH e relação  $H_2O_2/ClO^-$  na remoção de cor do corante azul de metileno. Os efeitos principais foram calculados de acordo com Rodrigues e Iemma (2005).

As faixas de concentração de peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio foram definidas a partir de valores estequiométricos para a geração de oxigênio singlete na reação 3.2. O nível inferior do planejamento foi definido como sendo a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ClO<sup>-</sup> para a geração de 1,0 mol de oxigênio singlete teórico gerado pela reação entre 1,0 mol de peróxido de hidrogênio e 1,0 mol de hipoclorito de sódio. A notação utilizada então foi (1+1). Para o nível superior do planejamento foi escolhido aleatoriamente a relação para geração de 5,0 mols de oxigênio singlete com a notação de (5+5), ou seja, que a reação entre 5,0 mols de peróxido de hidrogênio e 5,0 mols de hipoclorito de sódio estequiometricamente geram 5,0 mols de oxigênio singlete.

Para verificar o efeito da diminuição da concentração inicial do corante azul de metileno, duas concentrações iniciais do corante azul de metileno foram utilizadas baseadas na medida da absorvância limite do azul de metileno, segundo a Lei de Beer Lambert e a concentração inferior definida como 50 % da concentração limite, ou seja, 20,0 e 10,0 mg/L. Como a literatura afirma que melhores rendimentos, via rota química para a geração de oxigênio singlete ocorre na faixa alcalina, e, portanto, o pH foi fixado entre 7,0 e 9,0 para as duas concentrações.

#### 4.7. Reações do Sistema Enzimático

Os experimentos realizados por via enzimática foram conduzidos em tubo de polipropileno de 50 mL com volume reacional de 20,0 mL, sob agitação constante de 200,0 rpm utilizando um *shaker* "SOLAB Refrigerado modelo SL-223", durante o tempo prédeterminado. A enzima era adicionada ao sistema de modo que a atividade inicial do meio reacional fosse a mesma atividade utilizada durante os ensaios de atividade enzimática (item 4.4.1) que foi de 25,0 U/mL, exceto quando a atividade inicial na reação de descoloração era investigada. O peróxido de hidrogênio foi adicionado no meio reacional de forma a obter

uma concentração inicial de 6,0 mg/L, exceto nos ensaios de investigação do K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> em relação ao peróxido de hidrogênio. A concentração inicial de corante foi igual a 20 mg/L, exceto nos ensaios de investigação do K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> em relação ao corante e no sistema em ausência de corante. O pH foi mantido constante com uma solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M e a temperatura era controlada pelo termostato do *shaker*. A Figura 4.2 mostra o aparato experimental (Figura 4.2 (a)) e o tubo de polipropileno utilizado para realizar as reações enzimáticas (Figura 4.2 (b)) "enzima/peróxido de hidrogênio" na presença de corante.



Figura 4.2 - Aparato Experimental das Reações Enzimáticas (a) e Vista do tubo contendo os reagentes fixado no Shaker para avaliação das reações enzimáticas (b)

# 4.8. Avaliação do Efeito do pH e da Temperatura na Atividade Enzimática da HRP

Nos ensaios realizados para avaliar o efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática da HRP, a enzima era adicionada ao sistema de modo que a atividade inicial do meio reacional fosse de 25,0 U/mL. O peróxido de hidrogênio foi adicionado para que no meio reacional para obtenção de uma concentração inicial de 6,0 mg/L. O pH foi investigado nos valores de 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0, mantendo-se a concentração

de corante e de peróxido de hidrogênio constantes em 20,0 mg/L e 6,0 mg/L, respectivamente e a remoção de cor do AM foi utilizada para avaliar a reposta. Para avaliar o efeito da temperatura na atividade do HRP para a remoção de cor do AM, foram mantidos os mesmos valores de concentração inicial de corante e de peróxido de hidrogênio, o pH fixado no valor mais favorável encontrado nos ensaios anteriores. A temperatura foi investigada em 25,0°C, 30,0°C, 35,0°C,40,0°C, 45,0°C e 50,0 °C.

#### 4.9. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ da HRP

Experimentos foram conduzidos para avaliar o comportamento cinético da enzima *Horseradish peroxidase* tanto em relação ao peróxido de hidrogênio quanto ao corante, visando a determinação de parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$ . Os ensaios foram realizados nas mesmas condições reacionais do item 4.7 e nas melhores condições de pH e da temperatura obtidas no item 4.8. Nos ensaios conduzidos para determinar o  $K_m$  e  $V_{max}$  da enzima em relação ao peróxido de hidrogênio, foi utilizada uma concentração inicial de corante igual a 20 mg/L, a atividade enzimática inicial da reação de 25 U/mL e a concentração de peróxido de hidrogênio variada de 0 a 100 mg/L. Para determinar o  $K_m$  e  $V_{max}$  da enzima em relação ao corante, foi utilizada uma concentração inicial de peróxido de hidrogênio de 5 mg/L, a atividade enzimática inicial de 25 U/mL e a concentração de corante foi variada de 0 a 20 mg/L.

Na determinação do  $K_m$  e  $V_{max}$  do peróxido de hidrogênio na ausência de corante o sistema reacional era uma solução tampão de fosfato no pH ideal (obtido no item 4.8), a atividade enzimática inicial da reação de 25 U/mL, e a concentração inicial de peróxido de hidrogênio variada de 10 a 1.500 mg/L, mantendo-se a temperatura constante igual a 30°C.

Com exceção do cálculo do K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> para o corante, a taxa considerada para a construção do gráfico de Lineweaver-Burk (eixo das ordenadas) foi a taxa média de reação. A taxa média de reação na presença de corante foi definida como sendo a razão entre remoção total de cor e o tempo de reação enquanto que nas reações onde não havia presença de corante, a taxa média de reação foi definida como sendo a taxa inicial. O tempo final de reação foi definido como sendo o tempo em que não há mais alteração de concentração de cor e/ou de peróxido de hidrogênio.

#### 4.10. Avaliação da Cinética de Inibição da HRP na Presença de Corante

Nos ensaios do item 4.9 foi possível estabelecer a concentração de peróxido de hidrogênio que inibe a atividade enzimática de 25,0 U/mL, e, a partir desta concentração foram realizados ensaios cinéticos visando estudar a ordem da reação a partir da concentração inibitória de peróxido de hidrogênio.

Os ensaios foram realizados com o mesmo aparato experimental do item 4.7. O pH e a temperatura foram mantidos os valores favoráveis obtidos nos ensaios do item 4.8; o volume reacional foi mantido em 20 mL; a atividade inicial da enzima foi de 25 U/mL; a concentração de azul de metileno foi de 20 mg/L e as concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas nos ensaios foram 50,0 mg/L, 75,0 mg/L e 100,0 mg/L. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e as reações foram acompanhadas até a estabilização na remoção de cor máxima.

# 4.11. Avaliação das Condições Estequiométricas $AM/H_2O_2$ e da Relação $H_2O_2/HRP$

A partir dos melhores resultados de pH e temperatura na descoloração do corante azul de metileno obtidos no item 4.8, foram realizados experimentos utilizando planejamento experimental de dois níveis com duas variáveis. A sequência de experimentos visou identificar os efeitos da relação molar AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a relação substrato-atividade enzimática inicial (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP) dada por mM\*mL/U na reação entre a HRP, peróxido de hidrogênio e azul de metileno.

Foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>k</sup> com duas variáveis independentes (AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP) para a obtenção das condições ótimas de remoção de cor. No primeiro e no segundo delineamento do planejamento experimental foram investigados os efeitos das variáveis independentes (AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP). No terceiro delineamento foi investigado a curvatura da superfície dentro dos limites inferior e superior, sendo possível obter condições otimizadas do processo de descoloração do AM, obtendo-se assim, a superfície de resposta e respectivos efeitos. Em todos os delineamentos foi utilizado o software *Statistica*® versão 8.0.

#### 4.11.1. Definição das Faixas de Estudo

Os efluentes que entram na estação de tratamento para reúso encontram-se em baixas concentrações, pois já passaram por tratamento que reduzem significativamente a carga poluidora (BARBOSA, 2009) com isso foi possível estabelecer os limites inferior e superior para o azul de metileno que foram respectivamente 5 e 15 mg/L (0,02 a 0,05 mM) para o primeiro delineamento.

Baseado em Ferreira-Leitão *et al* (2003) que observaram a importância da relação molar AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> os limites superior e inferior estabelecidos para iniciar a investigação nesta relação molar foram respectivamente de 1/15 e 1/20. A relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP para a enzima HRP se configura como a relação entre o inibidor/enzima ou substrato/enzima. Os limites superior e inferior investigados no primeiro delineamento para a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP foram respectivamente 1/3 e 1/15.

Os cálculos das faixas de concentração foram realizados de forma que os pontos axiais do planejamento em relação às concentrações e/ou atividade enzimática não atingissem valores negativos das variáveis. A Tabela 4.1 apresenta as relações utilizadas em cada delineamento.

Tabela 4.1 - Níveis e relações utilizadas nos delineamentos realizados na remoção de cor do

corante azul de metileno utilizando HRP e peróxido de hidrogênio

Delineamentos	Parâmetros	Níveis				
Defineamentos	Parametros	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Primeiro delineamento	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (molar)	-	1/20	1/17,5	1/15	ı
(Fatorial Linear)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP (mM*U/mL)	-	1/15	1/9	1/3	ı
Segundo delineamento	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (molar)	-	1/40	1/30	1/20	ı
(Fatorial Quadrático)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP (mM*U/mL)	-	1/30	1/22	1/15	ı
Terceiro delineamento	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (molar)	1/44	1/40	1/30	1/20	1/16
(Fatorial Multivariável)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP (mM*U/mL)	1/57	1/50	1/30	1/15	1/8

Para obter a concentração utilizada de cada variável o seguinte procedimento de cálculo foi adotado:

- $1^{\circ}$ ) Estabelecer o limite (inferior ou superior) para a relação  $AM/H_2O_2$  a ser calculado;
  - 2°) Verificar qual é a concentração de azul de metileno referente a este limite;

- 3°) Verificar qual é a relação AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para este limite;
- 4°) Calcular a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- 5°) Verificar qual é a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP do limite;
- 6°) Calcular a atividade inicial da HRP a ser adicionado na reação.

Tomando como exemplo o primeiro delineamento e limite inferior, temos:

- 1°) Limite inferior;
- 2°) Para o limite inferior a concentração de AM é igual a 0,05 mM;
- 3°) Para o limite inferior AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> igual a 1/20;

$$4^{\rm o}$$
)  $\frac{[AM]}{[H_2O_2]} = \frac{0,05}{H_2O_2} = \frac{1}{20}$ 

Logo:  $[H_2O_2] = 1.0 \text{ mM}$ 

5°) 1/15

$$6^{\circ}$$
)  $\frac{[H_2O_2]}{HRP} = \frac{1}{15} = \frac{1.0}{HRP}$ 

Logo: HRP = 15 U/mL

Com este procedimento foi possível elaborar a Tabela 4.2 com as concentrações utilizadas em cada ensaio do delineamento.

Tabela 4.2 – Concentração de cada variável independente nos delineamentos realizados na remoção de cor do corante azul de metileno utilizando HRP e peróxido de hidrogênio

1° Delineamento							
Relações		Concentrações Utilizadas					
Ensaio	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP	AM	$H_2O_2$	HRP		
1	1/20	1/15	0,05 mM	1,00 mM	15,0 U/mL		
2	1/20	1/3	0,05 mM	1,00 mM	3,0 U/mL		
3	1/15	1/15	0,02 mM	0,30 mM	4,5 U/mL		
4	1/15	1/3	0,02 mM	0,30 mM	0,9 U/mL		
2° Delineamento							
5	1/20	1/15	0,05 mM	2,00 mM	60,0 U/mL		
6	1/20	1/30	0,05 mM	2,00 mM	30,0 U/mL		
7	1/40	1/15	0,02 mM	0,40 mM	12,0 U/mL		
8	1/40	1/30	0,02 mM	0,40 mM	6,0 U/mL		
9	1/30	1/22	0,04 mM	1,05 mM	23,0 U/mL		
10	1/30	1/22	0,04 mM	1,05 mM	23,0 U/mL		
11	1/30	1/22	0,04 mM	1,05 mM	23,0 U/mL		
	3° Delineamento						
12	1/20	1/15	0,05 mM	2,00 mM	100,0 U/mL		
13	1/20	1/50	0,05 mM	2,00 mM	30,0 U/mL		
14	1/40	1/15	0,02 mM	0,40 mM	20,0 U/mL		
15	1/40	1/50	0,02 mM	0,40 mM	6,0 U/mL		
16	1/30	1/33	0,04 mM	1,05 mM	35,0 U/mL		
17	1/30	1/33	0,04 mM	1,05 mM	35,0 U/mL		
18	1/30	1/33	0,04 mM	1,05 mM	35,0 U/mL		
19	1/16	1/33	0,06 mM	2,47 mM	60,0 U/mL		
20	1/44	1/33	0,01 mM	0,22 mM	8,0 U/mL		
21	1/30	1/8	0,04 mM	1,05 mM	81,5 U/mL		
22	1/30	1/57	0,04 mM	1,05 mM	7,3 U/mL		

# 4.12. Identificação de Oxigênio Singlete no Sistema Enzimático

Para identificar a geração do oxigênio singlete, a sua concentração no sistema enzimático foi determinada nas medidas de emissão de energia luminosa em 1270,0 nm em um fluorímetro da *Edinburgh Instruments* modelo FL900 CD acoplado ao laser de 355,0 nm e a um controlador de voltagem da Hamamatsu, o qual foi fixado em 800 volts como pode ser visto na Figura 4.3. A medida de emissão foi realizada numa cubeta de vidro com volume últil de 3 mL e qualquer emissão de luz nesta cubeta era direcionado para o detector por meio de lentes como pode ser observado na Figura 4.4. Foram realizados três ensaios aleatórios para identificar o oxigênio singlete no sistema enzimático e nestes ensaios foi usada uma concentração de corante igual a 20 mg/L e avaliadas três relações H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP (mM \* mL/U): (1/33; 1/136 e 1/272).

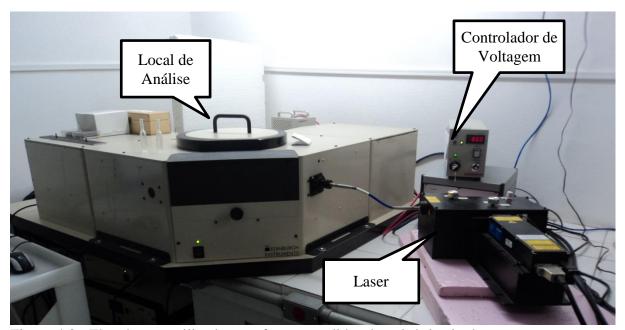


Figura 4.3 - Fluorímetro utilizado para fazer a medidas de oxigênio singlete



Figura 4.4 - Detalhe do local de análise de oxigênio singlete.

A emissão de energia foi correlacionada com a concentração a partir de uma curva padrão de oxigênio singlete utilizando padrão de perinaftenona. Para cada mol de perinaftenona é gerado 1 mol de oxigênio singlete (NONELL e FLORS, 2004) As soluções padrão foram preparadas por meio de diluição a partir de uma solução alcoólica padrão de 16,0 mg/L. Os ensaios para determinar a concentração de oxigênio singlete no meio aquoso foram realizados nas condições ótimas de pH e temperatura obtidas no item 4.8, com um volume reacional de 3,5 mL e concentração de corante de 20,0 mg/L.

#### 5. Resultados

Os resultados serão apresentados segundo os seguintes itens: ensaio preliminar para determinar o pico de absorção de cor do azul de metileno; ensaios de degradação do AM por via química; ensaios para avaliação dos efeitos de pH e da temperatura na remoção de cor de AM por via enzimática; ensaios cinéticos da enzima HRP para levantamento de  $K_m$  e  $V_{max}$  e investigação da cinética de inibição; ensaios de geração qualitativa e quantitativa do oxigênio singlete; ação do sistema enzimático utilizando o planejamento experimental e comparação entre a via química e a via enzimática de produção de espécies de oxigênio ativos.

# 5.1. Determinação do pico de absorção do azul de metileno

A Figura 5.1 mostra a varredura no espectro visível de uma solução sintética de azul de metileno. Variando-se a concentração de 1 a 100,0 mg/L é possível observar o pico de maior intensidade de absorção da cor a 660,0 nm e as curvas proporcionais a concentração do azul de metileno. Este pico somente é proporcional à cor da solução de azul de metileno em água até uma concentração de 20 mg/L. Acima deste valor da concentração, a curva do AM não segue a linearidade da Lei de Beer-Lambert, como pode ser visto na Figura 5.2. Este resultado simplificou as análises, já que a concentração de azul de metileno utilizada nas reações posteriores não ultrapassaram 20 mg/L.

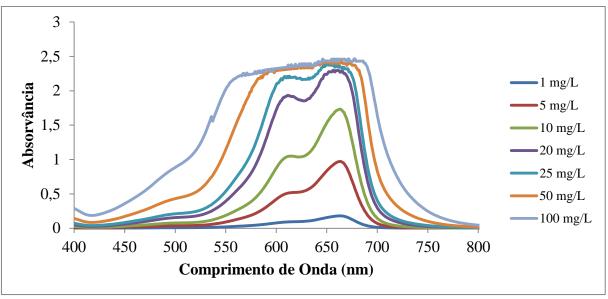


Figura 5.1 - Espectro de absorção no visível do azul de metileno em diferentes concentrações

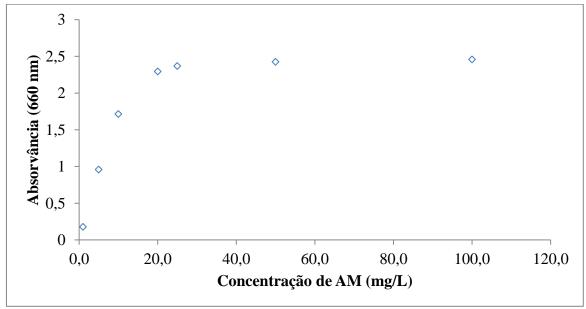


Figura 5.2 - Absorvância de uma solução sintética de azul de metileno em diferentes concentrações a 660 nm

# 5.2. Degradação de Azul de Metileno por Via Química

As Tabelas 5.1 e 5.2 mostram a remoção de cor do azul de metileno em função das variáveis concentração teórica de oxigênio singlete gerado ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] + [ClO<sup>-</sup>]) e pH em diferentes concentrações iniciais de azul de metileno: 20 mg/L (Tabela 5.1) e 10 mg/L (Tabela 5.2). Em 60 minutos de reação, encontra-se um pequeno aumento na remoção de cor ao diminuir a concentração inicial do corante azul de metileno de 20 mg/L para 10 mg/L nas mesmas condições da relação [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] + [ClO<sup>-</sup>].

Tabela 5.1 - Remoção de cor do azul de metileno por via química com concentração inicial de corante igual a 20 mg/L

pН	[H2O2] + [ClO] (mM + mM)	Remoção de Cor (%)
9	10 (5+5)	5,3
9	2 (1+1)	1,0
7	10 (5+5)	3,6
7	2 (1+1)	1,0

Tabela 5.2 - Remoção de cor do azul de metileno por via química com concentração inicial de corante igual a 10 mg/L

pН	[H2O2] + [ClO] (mM + mM)	Remoção de Cor (%)
9	10 (5+5)	7,1
9	2 (1+1)	6,1
7	10 (5+5)	9,8
7	2 (1+1)	5,7

A Tabela 5.3 mostra os efeitos das variáveis concentração teórica de oxigênio singlete gerado ( $[H_2O_2] + [ClO^-]$ ) e pH nas diferentes concentrações iniciais de azul de metileno estudadas: 20 mg/L e 10 mg/L.

Tabela 5.3 - Efeitos das variáveis independentes na remoção de cor do azul de metileno por via química

Concentração Inicial de AM = 20 mg/L				
Variável	Efeito			
pН	+ 0,8 %			
[H2O2] + [ClO] (mM + mM)	+ 3,5 %			
Concentração Inicial de AM = 10 mg/L				
Variável	Efeito			
pН	-1,1 %			
[H2O2] + [ClO] (mM + mM)	+ 2,6 %			

Ao analisar o efeito do pH nas reações de geração do oxigênio singlete por via química foi possível observar que tanto nas reações onde a concentração inicial de azul de metileno é igual a 20 mg/L quanto nas reações com a concentração inicial de azul de metileno é igual a 10 mg/L, a variação de pH não influencia na remoção de cor devido a pequena contribuição do efeito para a remoção de cor do azul de metileno. Este resultado levanta a hipótese que, em pH alcalino o azul de metileno, que possui pKa ser igual a 5,6, e portanto, está em sua forma catiônica, pode ser estabilizado pela densidade eletrônica contida nos átomos de nitrogênio de sua molécula. Esta estabilização provoca uma diminuição da reatividade mesmo diante de um oxidante forte.

O aumento da relação [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] + [ClO<sup>-</sup>] para a concentração inicial de AM igual a 20 mg/L ocasiona um aumento de 3,4% na remoção de cor. Na reação cuja concentração inicial de azul de metileno é igual a 10 mg/L, o aumento da relação [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] + [ClO<sup>-</sup>] gera um aumento de 2,6% na remoção de cor. Os resultados mostram que ao aumentar a concentração teórica de oxigênio singlete no sistema ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] + [ClO<sup>-</sup>]) a resposta em ambos os casos aumenta positivamente, resultado que está de acordo com a estequiometria da reação, porém o ganho desta remoção de cor na faixa estudada é baixo. É possível que o tempo de formação e desaparecimento (tempo de vida) das espécies reativas formadas nesta reação tenha sido pequeno de tal forma a não atingir um desempenho satisfatório.

# 5.3. Efeito do pH e da Temperatura nas Reações Enzimáticas

As melhores condições de pH e temperatura obtidas para a remoção de cor pela combinação da enzima *Horseradish peroxidase* e do peróxido de hidrogênio em solução aquosa foram reportadas em relação aos valores médios de experimentos realizados em triplicata, visando avaliar as influências do pH e da temperatura na eficiência da remoção de cor.

As Figura 5.3 e 5.4 mostram a influência do pH e da temperatura na remoção de cor do corante, respectivamente. Pode-se observar que no pH igual a 5,0 foi obtido o melhor para a remoção de cor. A literatura consultada não define um melhor pH na degradação de corantes por HRP, tendo portanto uma grande faixa de pH onde é possível se obter uma melhor remoção de cor.

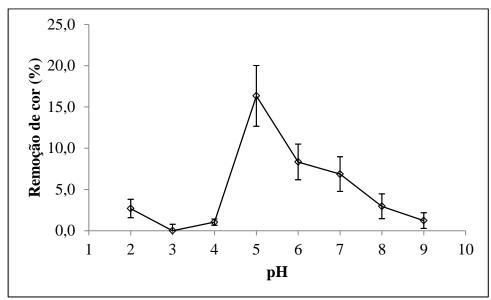


Figura 5.3 - Efeito do pH na remoção de cor com concentração inicial de corante igual a 20.0 mg/L;  $[H_2O_2] = 6.0 \text{ mg/L}$ ; Atividade Inicial da HRP = 25.0 U/mL; T =  $25^{\circ}$ C.

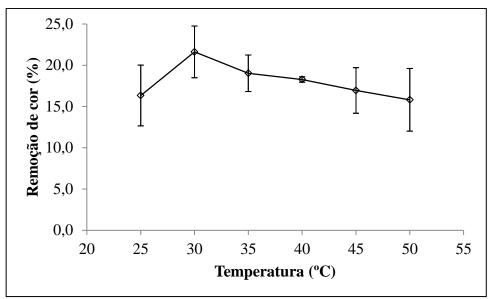


Figura 5.4 - Efeito da temperatura na remoção de cor com concentração inicial de corante igual a 20.0 mg/L;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 6.0 \text{ mg/L}$ ; Atividade Inicial da HRP = 25.0 U/mL; pH = 5.0 mg/L;

Resultado semelhante foi obtido por Wu *et al* (1997) ao estudar a influência do pH na degradação do 2-clorofenol utilizando a enzima HRP. Estes autores encontraram, um valor ótimo de pH igual a 5,0. Em relação a temperatura foi possível observar que, dentro da faixa estudada, não houve significativa influência da temperatura na remoção de cor. Porém 30,0 °C foi a temperatura considerada no presente trabalho, sendo este valor, o mesmo encontrado por Onder *et al*, (2011) ao degradar o Naphthol Blue Black. Os autores observaram que a enzima *Horseradish peroxidase* não era inativada, por ação de temperatura, na faixa investigada (25° a 70° C) por eles, propriedade de grande importância na degradação de efluentes industriais.

# 5.4. Determinação dos parâmetros cinéticos $K_m$ e $V_{max}$ da HRP

# 5.4.1. K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> na Ausência de Corante

Os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> calculados para o peróxido de hidrogênio, nos ensaios realizados na ausência de corante foram, respectivamente, 17,3 mM e 1,97 mM/min. A Figura 5.5 mostra a curva cinética para determinação de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ausência de corante azul de metileno em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que deu origem à Figura 5.6, o gráfico de Michaelis-Menten para o peróxido de hidrogênio na ausência de corante. É uma curva típica de inibição por substrato como previsto na literatura (TONG *et al*, 1998; PINTO e MENEZES, 2009). Um valor que é pouco citado na literatura é a concentração de peróxido de hidrogênio que promove a inibição enzimática. No presente trabalho foi possível observar que em concentrações de peróxido de hidrogênio igual e superiores a 800 mg/L há redução da velocidade de reação promovida pelo aumento da concentração de substrato quando a atividade inicial da enzima é igual a 25,0 U/mL.

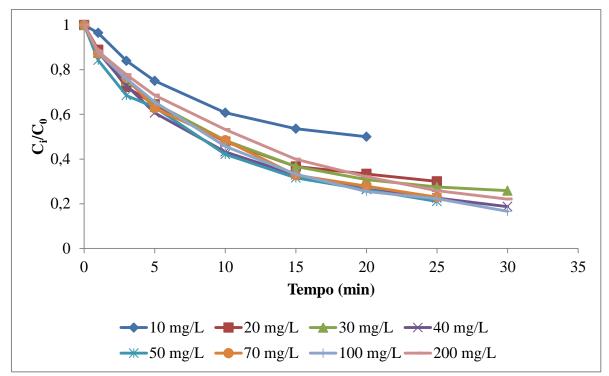


Figura 5.5 - Cinética da degradação de  $H_2O_2$  por ação da HRP na ausência de corante em diferentes concentrações de  $H_2O_2$ . Atividade Inicial de HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; Temperatura = 30 °C;  $C_i$  = Concentração de peróxido de hidrogênio remanescente;  $C_0$  = Concentração de peróxido de hidrogênio inicial.

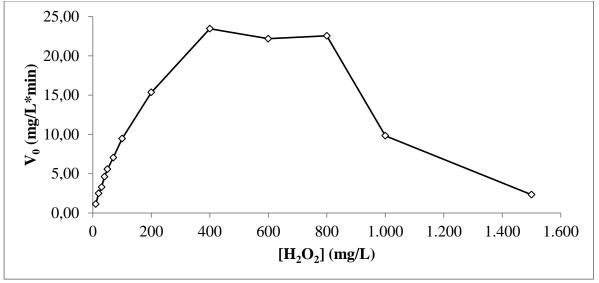


Figura 5.6 – Gráfico de Michaelis-Menten na reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima HRP na ausência de corante. Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; Temperatura = 30°C.

#### $5.4.2.~K_m$ e $V_{max}$ na Presença de Corante

Na presença de corante, os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  para o peróxido de hidrogênio foram respectivamente 0,10 mM e 8,0  $\mu$ M/min. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  determinados para o corante foram de 0,01 mM e 1,6  $\mu$ M/min, respectivamente.

Comparando os resultados obtidos de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> para o peróxido de hidrogênio na presença e na ausência de corante, é possível verificar que ao adicionar o corante no sistema reacional há um aumento acentuado da afinidade da enzima pelo peróxido de hidrogênio evidenciado pela diminuição do K<sub>m</sub> (de 17,3 mM para 0,10 mM), mostrando que a adição de corante no sistema pode ser benéfica à interação da enzima com o agente que fornece oxigênio para o sistema, ou seja, o peróxido de hidrogênio. Esta hipótese pode indicar um aumento da possibilidade de gerar espécies reativas de oxigênio (dentre elas o oxigênio singlete) na reação.

Por outro lado, a velocidade máxima de geração de espécies oxidantes na presença de corante fica cerca de 1.000 vezes menor do que na ausência de corante, onde a velocidade decai de 1,97 mM/min para 8,0 μM/min. A presença de corante provavelmente provoca uma maior influência da reação envolvendo o intermediário HRP-II (vide Reação 3.10) que é a etapa mais lenta do processo (HE *et al*, 1996).

A Figura 5.7 e a Figura 5.8 contêm respectivamente os ensaios cinéticos para determinação de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de corante azul de metileno em diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e os ensaios cinéticos para determinação de K<sub>m</sub> e V<sub>max</sub> do corante azul de metileno em diferentes concentrações de azul de metileno. A Figura 5.9 mostra o gráfico de Michaelis-Menten para o peróxido de hidrogênio na presença de corante. A Figura 5.9 apresenta o mesmo perfil de inibição por substrato quando na ausência de corante. Na presença de corante a concentração de peróxido de hidrogênio que inibe a

enzima é de 35 mg/L. A diferença entre a concentração inibitória na ausência de corante (800 mg/L) e na presença de corante (35 mg/L) pode ser explicada pela ação dos átomos de nitrogênio que agem no mecanismo de ação enzimática, inibindo a enzima (MONTELLANO *et al*, 1987).

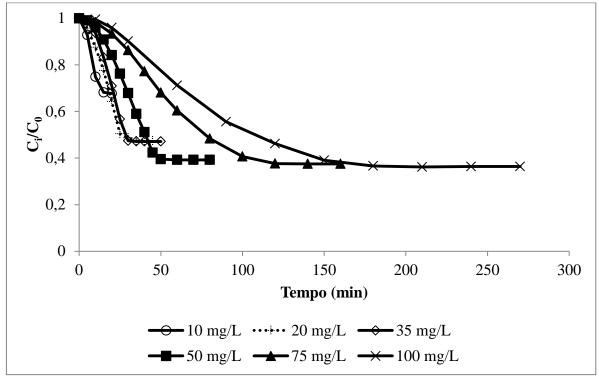


Figura 5.7 - Cinética de remoção de cor por ação da HRP na presença de corante em diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (10, 20, 35, 50, 75, 100) em mg/L. [AM] = 20,0 mg/L; Atividade Inicial de HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; Temperatura = 30 °C;  $C_i$  = Concentração de azul de metileno remanescente;  $C_0$  = Concentração de azul de metileno inicial.

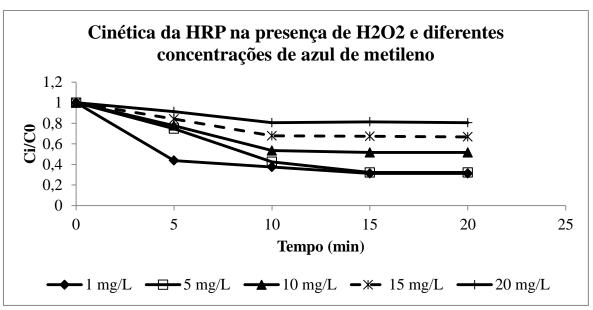


Figura 5.8 - Cinética de remoção de cor por ação da HRP na presença de  $H_2O_2$  em diferentes concentrações de azul de metileno (1, 5, 10, 15, 20) em mg/L.  $[H_2O_2] = 5.0$  mg/L; Atividade Inicial de HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; Temperatura = 30 °C;  $C_i$  = Concentração de azul de metileno remanescente;  $C_0$  = Concentração de azul de metileno inicial

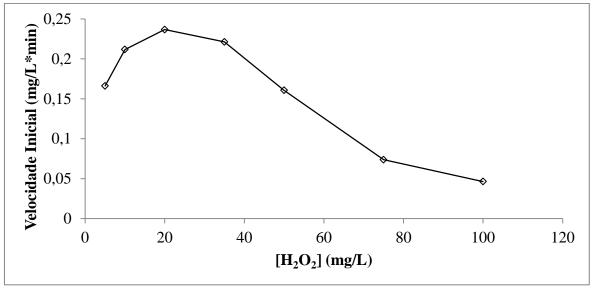


Figura 5.9 - Gráfico de Michaelis-Menten na reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima HRP na presença de corante. Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração de Azul de Metileno = 20,0 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C.

A literatura fornece diversos valores de  $K_{\rm m}$  para sistemas reacionais contendo corante e a enzima HRP relacionados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Valores de K<sub>m</sub> encontrados na literatura para diferentes corantes

Corante	Valor de K <sub>m</sub>	Autor	
Bromophenol blue <sup>1</sup>	25,95 μΜ	Liu <i>et al</i> , 2006	
Methyl Orange <sup>2</sup>	37,39 μM	Liu <i>et at</i> , 2000	
Remazol Brillant Blue R <sup>3</sup>	454,5 μM	Altikatoglu <i>et al</i> , 2012	
Naphthol Blue Black <sup>4</sup>	39,2 μΜ	Onder <i>et al</i> , 2011	

- 1 pH = 5;  $H_2O_2 = 0.3$  mM; Concentração de Corante = 8 a 24  $\mu$ M;  $T = 30^{\circ}$  C; HRP = 0.15 U/mL.
- 2 pH = 3;  $H_2O_2 = 0.3$  mM; Concentração de Corante = 8 a 24  $\mu$ M;  $T = 30^{\circ}$  C; HRP = 0.15 U/mL.
- 3 pH = 5;  $H_2O_2 = 3.0$  mM; Concentração de Corante = 28 a 263 mg/L;  $T = 30^{\circ}$  C; HRP = 27.9 U/mL.
- $4-pH=5;\,H_2O_2=0,3$  mM; Concentração de Corante = 0,01 a 0,05mM; T = 30° C; HRP = 5,88 U/mL.

Os resultados da Tabela 5.4 mostram que o  $K_m$  depende da estrutura do corante e que o azul de metileno tem uma menor afinidade com a enzima do que os outros corantes citados na literatura. A Figura 5.10 mostra o gráfico do inverso da equação de Michaelis-Menten que foi utilizado para determinar o  $K_m$  e  $V_{max}$  em relação ao peróxido de hidrogênio e em relação ao corante. Observa-se que os dados experimentais seguem a cinética de Michaelis-Menten.

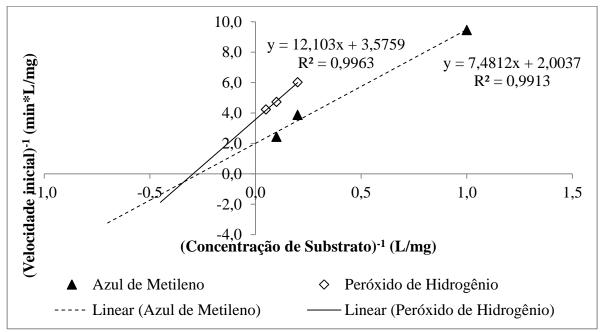


Figura 5.10 - Gráfico de Lineweaver e Burk para a determinação do  $K_m$  e  $V_{max}$  em relação ao peróxido de hidrogênio ( $\square$ ) ([AM] fixo em 20 mg/L) e em relação ao corante ( $\blacktriangle$ ) ([H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] fixo em 5,0 mg/L; ). Todos os ensaios com atividade inicial de HRP = 25 U/mL; pH = 5,0; temperatura igual a 30°C)

## 5.5. Avaliação da Cinética de Inibição da HRP pelo Peróxido de Hidrogênio

A Figura 5.11 mostra a cinética da reação da enzima HRP com o peróxido de hidrogênio na faixa de concentração em que há inibição pelo próprio peróxido de hidrogênio. Pode-se observar que a partir da concentração de 50 mg/L o mesmo valor de remoção de cor é alcançado (aproximadamente 60,0 % de remoção) em diferentes tempos, evidenciando que a inibição pelo peróxido de hidrogênio não é uma inibição total. Esta inibição altera o regime cinético da reação, porém não altera a capacidade de oxidação da enzima HRP.

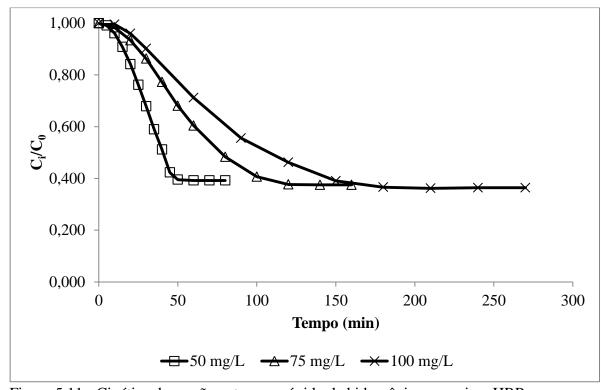


Figura 5.11 - Cinética da reação entre o peróxido de hidrogênio e a enzima HRP na presença de corante em diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (50, 75, 100) em mg/L. Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C;  $C_i$  = Concentração de azul de metileno remanescente;  $C_0$  = Concentração inicial de azul de metileno

Com os dados obtidos na Figura 5.11 foi possível determinar as constantes cinéticas das reações de inibição nas condições estudadas. Nas Figuras 5.12, 5.13, 5.14

contém os gráficos (com suas respectivas regressões lineares, de acordo com a teoria desenvolvida no Apêndice 1) referentes aos testes realizados para verificar a ordem de reação na remoção de cor do corante AM por ação da HRP na concentração de peróxido de hidrogênio é igual a 50 mg/L. É possível observar que o melhor ajuste linear entre os pontos foi dado para um  $R^2 = 0.9314$  no teste de ordem zero. Portanto, quando a concentração de peróxido de hidrogênio é de 50 mg/L, a cinética procedeu segundo uma reação de ordem zero, tendo o valor de "k" igual a  $0.226 L*(min*mg)^{-1}$ .

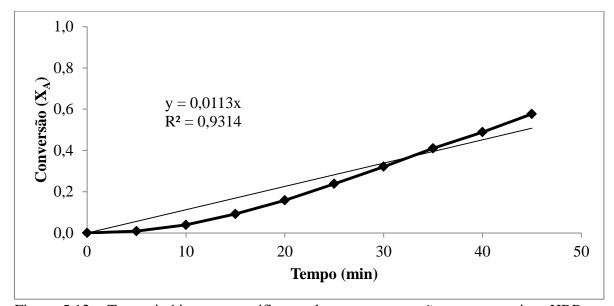


Figura 5.12 - Teste cinético para verificar ordem zero na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2] = 50 \text{ mg/L}$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C;  $X_A$  = Conversão do AM

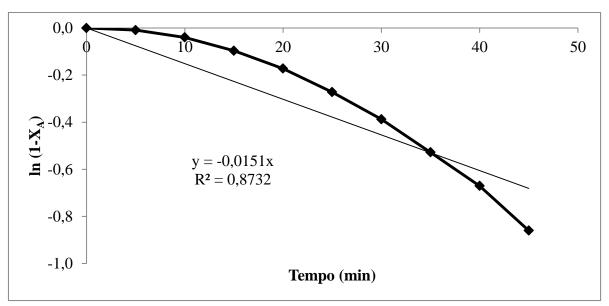


Figura 5.13 - Teste cinético para verificar primeira ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2] = 50 \text{ mg/L}$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C;  $X_A$  = Conversão do AM

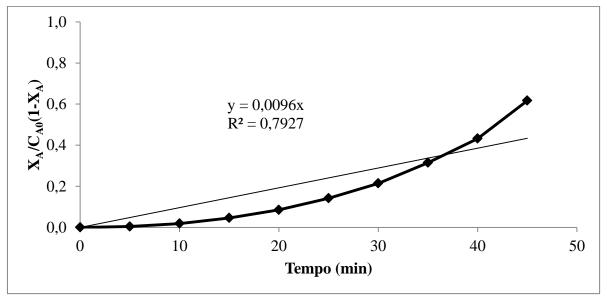


Figura 5.14 - Teste cinético para verificar segunda ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2] = 50 \text{ mg/L}$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura =  $30^{\circ}$ C;  $X_A$  = Conversão do AM

Nas Figuras 5.15, 5.16 e 5.17 contém os gráficos (com suas respectivas regressões lineares, de acordo com a teoria desenvolvida no Apêndice 1) referentes aos testes realizados para verificar a ordem de reação na remoção de cor do corante AM por ação da HRP na concentração de peróxido de hidrogênio é igual a 75 mg/L. É possível observar que o melhor ajuste linear entre os pontos foi dado para um R<sup>2</sup> = 0,9745 no teste de ordem zero. Portanto, quando a concentração de peróxido de hidrogênio é de 75 mg/L, a cinética procedeu segundo uma reação de ordem zero, tendo o valor de "k" igual a 0,12 L\*(min\*mg)<sup>-1</sup>.

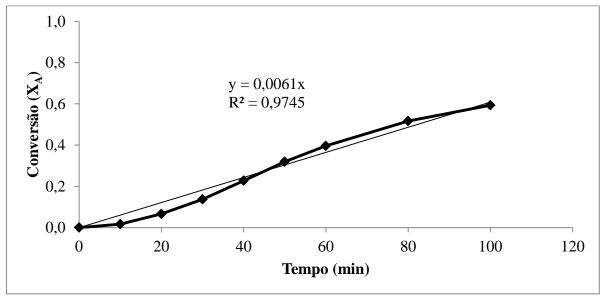


Figura 5.15 - Teste cinético para verificar ordem zero na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2] = 75 \text{ mg/L}$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C;  $X_A$  = Conversão do AM

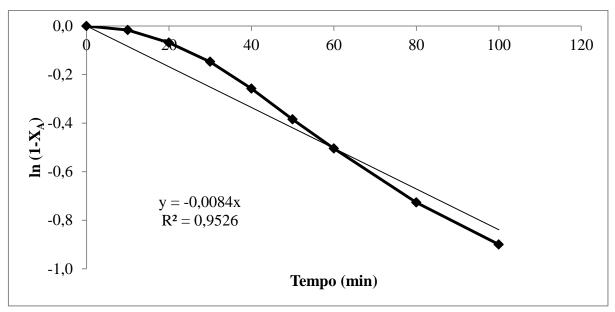


Figura 5.16 - Teste cinético para verificar primeira ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2]=75\ mg/L$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura =  $30^{\circ}$ C;  $X_A$  = Conversão do AM

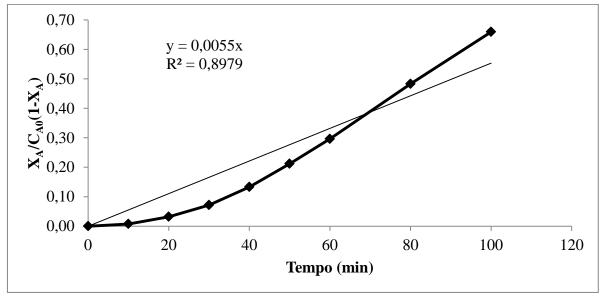


Figura 5.17 - Teste cinético para verificar segunda ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2]=75~mg/L$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C;  $X_A$  = Conversão do AM

Nas Figuras 5.18, 5.19 e 5.20 contém os gráficos (com suas respectivas regressões lineares, de acordo com a teoria desenvolvida no Apêndice 1) referentes aos testes realizados para verificar a ordem de reação na remoção de cor do corante AM por ação da HRP na concentração de peróxido de hidrogênio é igual a 100 mg/L. É possível observar que o melhor ajuste linear entre os pontos foi dado para um  $R^2 = 0.9797$  no teste de ordem zero. Portanto, quando a concentração de peróxido de hidrogênio é de 75 mg/L, a cinética procedeu segundo uma reação primeira ordem , tendo o valor de "k" igual a 0,006 min<sup>-1</sup>.

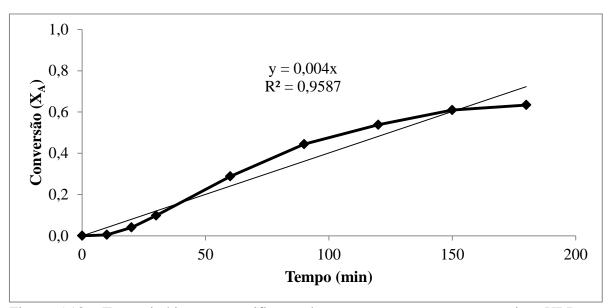


Figura 5.18 - Teste cinético para verificar ordem zero na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2] = 100 \text{ mg/L}$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C;  $X_A$  = Conversão do AM

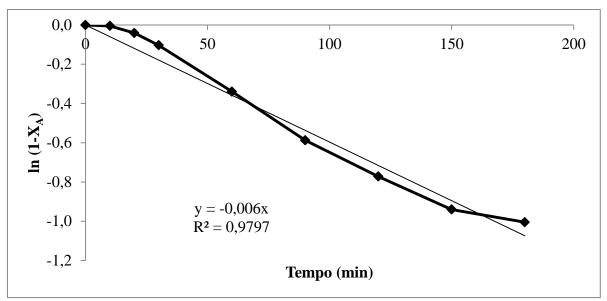


Figura 5.19 - Teste cinético para verificar primeira ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2] = 100 \text{ mg/L}$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura = 30°C;  $X_A$  = Conversão do AM

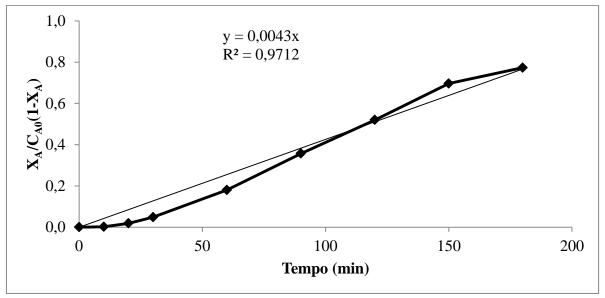


Figura 5.20 - Teste cinético para verificar segunda ordem na reação entre a enzima HRP e o corante azul de metileno na presença de peróxido de hidrogênio.  $[H_2O_2]=100~mg/L$  Atividade inicial da HRP = 25 U/mL; Concentração inicial de Corante igual a 20 mg/L; pH = 5,0; Temperatura =  $30^{\circ}$ C;  $X_A$  = Conversão do AM

Taylor *et al* (1994) encontraram cinética de "pseudo" segunda ordem para a inativação da HRP na presença de fenol e tampão fosfato em pH = 7,0, mostrando que a cinética de inativação irá depender diretamente do contaminante que está sendo degradado e das condições das variáveis HRP e peróxido de hidrogênio e da reação.

### 5.6. Medidas de Oxigênio Singlete

A Figura 5.21 mostra a intensidade do sinal de 1270 nm nas três reações realizadas em diferentes relações H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP (mM\*mL/U): 1/33 (a); 1/136 (b); 1/272 (c). Pode-se observar que existe um ruído em torno do pico de 1270 nm já previsto na literatura. Li *et al* (2013) mostram que a concentração de oxigênio no estado fundamental influencia na detecção do oxigênio singlete por luminescência e quanto menor disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio, maior é o nível de ruídos e quanto maior a concentração de oxigênio fundamental, maior é a qualidade do sinal detectado pelo equipamento. O espectro infra-vermelho do azul de metileno (Anexo 1) mostra que o corante não absorve em 1270 nm e os comprimentos de onda de absorção mais próximos ao de absorção do oxigênio singlete são os de 1252 nm e 1226 nm, sendo estes de pouca intensidade.

A Figura 5.21, evidencia que os picos apresentados ao redor de 1270 nm são picos fornecidos pela baixa concentração de oxigênio fundamental durante a análise. Com este resultado foi possível identificar qualitativamente o oxigênio singlete gerado no sistema HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/AM em pH = 5,0 com concentração de corante igual a 20 mg/L.

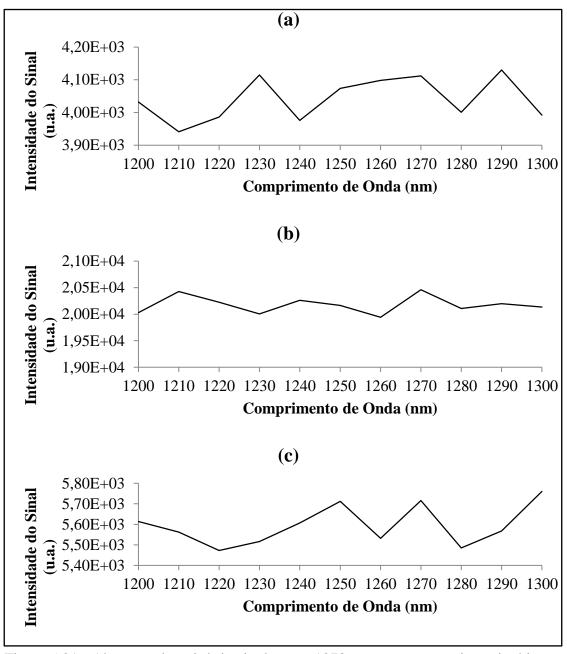


Figura 5.21 - Absorção do oxigênio singlete em 1270 nm nas reações via enzimática em pH = 5,0; temperatura = 25°C; concentração inicial de corante igual a 20 mg/L; relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP = 1/33 (a); 1/136 (b); 1/272 (c))

Os resultados da Figura 5.21 mostram que a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP não influencia na presença de oxigênio singlete no sistema tanto quanto a concentração de peróxido de hidrogênio. Na relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP de 1/136 (Figura 5.21(b)) foi realizada com uma concentração de peróxido de hidrogênio maior (45 mg/L) e, portanto obteve maior intensidade de absorção em 1270 nm, ou seja, nesta relação uma maior quantidade de oxigênio no estado fundamental estava disponível para ir ao nível energético singlete. Logo, o pico de absorção foi maior que das relações H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP de 1/33 e 1/272 (Figura 5.21 (a) e (c) respectivamente) que utilizaram uma menor concentração de peróxido de hidrogênio (30 mg/L). Mano *et al*, (2014) reportou a mesma emissão em 1270 nm na degradação de iso-butiraldeído em solução de acetona e tampão deuterado de fosfato (pD = 7,4) na presença de HRP, corroborando assim Piatt *et al*,(1977) que afirma a possibilidade de geração de oxigênio singlete através da reação com a HRP.

Após a identificação do oxigênio singlete nas reações correspondentes às Figuras 5.9 (a), (b), (c) foi determinada a concentração de oxigênio singlete gerada em cada reação. A Figura 5.22 mostra o comportamento da energia emitida em 1.270 nm e a concentração de oxigênio singlete gerada na solução alcóolica de perinaftenona. É possível observar uma correlação de proporcionalidade entre a energia emitida a 1.270 nm e a concentração de oxigênio singlete gerada no sistema.

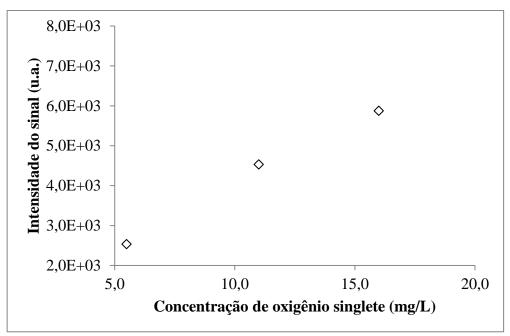


Figura 5.22 - Curva padrão de geração de oxigênio singlete obtida por análise de fosforescência em solução alcoólica da perinaftenona

Com o ajuste linear dos pontos, foi possível escrever a Equação 5.1 que correlaciona a energia emitida em 1.270 nm com a concentração de oxigênio singlete, apresentando uma correlação,  $R^2 = 0.9929$ .

$$E.E.(1.270nm) = 318.84 * Concentração de {}^{1}O_{2} (mg/L) + 857.27$$
 (5.1)

Onde: "E.E. (1.270nm)" é a energia emitida no sistema em 1.270 nm. Com esta curva é possível calcular a concentração de oxigênio singlete a partir da energia emitida em 1.270 nm de um sistema capaz de gerar oxigênio singlete.

A Tabela 5.5 apresenta a quantidade de oxigênio singlete medida em diferentes condições reacionais do sistema enzimático.

Tabela 5.5 - Condições de cada ensaio para determinar o oxigênio singlete no sistema enzimático

Ensaio*	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mg/L)	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (mM)	Atividade Inicial da HRP (U/mL)	Relação H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP (mM*mL/U)	Energia Emitida (u.a.)	<sup>1</sup> O <sub>2</sub> Gerado (mg/L)
a	30,0	0,88	29,0	1/33	$4,11*10^3$	10,1
b	45,0	1,32	179,0	1/136	$2,05*10^4$	> 16
С	30,0	0,88	239,0	1/272	$5,72*10^3$	15,1

 $<sup>\</sup>ast$  Todos os ensaios foram realizados com concentração inicial de Azul de Metileno igual a 20 mg/L

No ensaio correspondente a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP de 1/33 (Ensaio "a") foram gerados 4,11E+03 de unidades, o equivalente a 10,1 mg/L de oxigênio singlete, cerca de 20,0% do valor estequiométrico para a degradação completa do azul de metileno de acordo com a reação 3.4. Para o terceiro ensaio (Ensaio "c"), quando a atividade inicial da enzima foi elevada para 239,0 U/mL, e a concentração de peróxido de hidrogênio foi mantida em 30,0 mg/L (0,88 mM), o sistema gerou uma energia de 5,72E+03 unidades equivalente a 15,1 mg/L de oxigênio singlete. Observa-se que para um aumento correspondente a 8,2 vezes (de 29 U/mL para 239 U/mL) do valor da atividade inicial da enzima HRP, a concentração gerada de oxigênio singlete aumentou apenas 1,5 vezes. Já no segundo ensaio (Ensaio "b"), a concentração de peróxido de hidrogênio foi elevada para 45,0 mg/L (1,32 mM) e a atividade inicial da enzima utilizada foi de 179,0 U/mL, a energia gerada ultrapassou os limites da curva padrão e foi para o valor de 2,05E+04 unidades mostrando que a concentração de oxigênio singlete depende diretamente da concentração de peróxido de hidrogênio e não da atividade inicial da enzima.

## 5.7. Otimização da Reação Enzimática

#### 5.7.1. Primeiro Delineamento

No primeiro delineamento, foi utilizado o planejamento fatorial  $2^2$  sendo a relação  $AM/H_2O_2$  (molar) e a relação  $H_2O_2/HRP$  (mM\*mL/U) as variáveis independentes e a remoção de cor a variável resposta. Os limites inferior e superior da variável independente  $AM/H_2O_2$  foram respectivamente, 1/20 e 1/15 enquanto que para a variável independente  $H_2O_2/HRP$  foram respectivamente, 1/15 e 1/3. A Tabela 5.6 mostra os resultados gerados no primeiro delineamento.

Tabela 5.6 - Remoção de cor do corante azul de metileno no primeiro delineamento.

Engoio	Relações		Conce	Remoção		
Ensaio	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP	AM	$H_2O_2$	HRP	de Cor (%)
1	1/20	1/15	0,05 mM	1,00 mM	15,0 U/mL	62,0
2	1/20	1/3	0,05 mM	1,00 mM	3,0 U/mL	2,9
3	1/15	1/15	0,02 mM	0,30 mM	4,5 U/mL	31,4
4	1/15	1/3	0,02 mM	0,30 mM	0,9 U/mL	7,1

Com os resultados da Tabela 5.6 foi possível obter a Figura 5.23 mostra curva de contorno gerada no primeiro delineamento do planejamento experimental. É possível observar que o maior percentual de remoção de cor é encontrado nas menores relações das variáveis: 1/20 para a relação molar entre AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o mesmo valor, 1/20 para a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP (mM\*mL/U), sendo possível assim definir as faixas das variáveis independentes para o segundo delineamento.

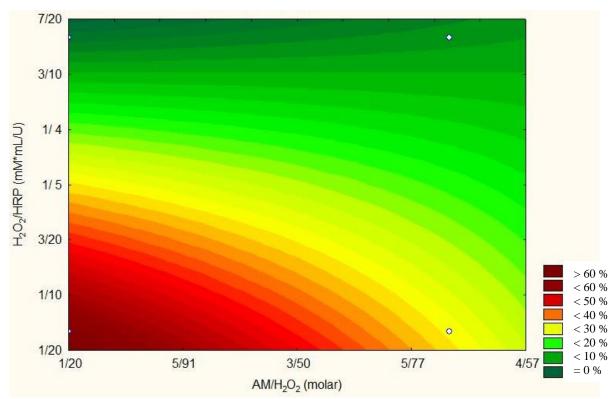


Figura 5.23 – Curva de contorno gerada no primeiro delineamento com  $[H_2O_2] = 0.3$  a 1,0 mM; HRP = (vide Tabela 5.6); [AM] = 0.02 a 0.05 mM em pH = 5.0 e temperatura igual a 30,0°C. Região vermelha indica maior percentual de remoção de cor

Com as variáveis independentes estudadas no primeiro delineamento é possível observar que tanto a variável AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quanto a variável H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP influenciam na resposta remoção de cor, sendo então variáveis importantes para serem estudadas nos processos de oxidação enzimática utilizando HRP. Ferreira-Leitão *et al*, 2003 já havia estudado a relação AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na degradação do azul de metileno e observaram a importância desta variável na degradação do azul de metileno, que é referente a estequiometria da reação entre o azul de metileno e o peróxido de hidrogênio da reação 3.4 cujo valor estequiométrico é a relação AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1/51. Como o peróxido de hidrogênio além de ser um substrato para a enzima HRP, é também, um inibidor da enzima a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP se torna uma variável importante para ser investigada.

### 5.7.2. Segundo Delineamento

No segundo delineamento, foi utilizado o planejamento fatorial  $2^2$  sendo a relação  $AM/H_2O_2$  (molar) e a relação  $H_2O_2/HRP$  (mM\*mL/U) as variáveis independentes e a remoção de cor a variável resposta. Os limites inferior e superior da variável independentes  $AM/H_2O_2$  foi respectivamente 1/40 e 1/20 enquanto que para a variável independente  $H_2O_2/HRP$  foi respectivamente 1/30 e 1/15. A Tabela 5.7 mostra os resultados gerados no primeiro delineamento.

Tabela 5.7 - Remoção de cor do corante azul de metileno no segundo delineamento.

Ensaio	Relações		Conc	Remoção		
	$AM/H_2O_2$	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP	AM	$H_2O_2$	HRP	de Cor (%)
5	1/20	1/15	0,05 mM	2,00 mM	60,0 U/mL	49,3
6	1/20	1/30	0,05 mM	2,00 mM	30,0 U/mL	77,0
7	1/40	1/15	0,02 mM	0,40 mM	12,0 U/mL	72,3
8	1/40	1/30	0,02 mM	0,40 mM	6,0 U/mL	67,8
9	1/30	1/22	0,04 mM	1,05 mM	23,0 U/mL	81,1
10	1/30	1/22	0,04 mM	1,05 mM	23,0 U/mL	81,7
11	1/30	1/22	0,04 mM	1,05 mM	23,0 U/mL	81,0

A Figura 5.24 apresenta a curva de contorno gerada no segundo delineamento onde pode ser observado que a variável AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está inserida na região em que ocorre maior remoção de cor e a variável H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP, indicando que maiores remoções são obtidas em regiões abaixo da estudada. Portanto para o terceiro delineamento os limites superiores e inferiores da variável AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram mantidos e o limite superior da variável H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP também foi mantido.

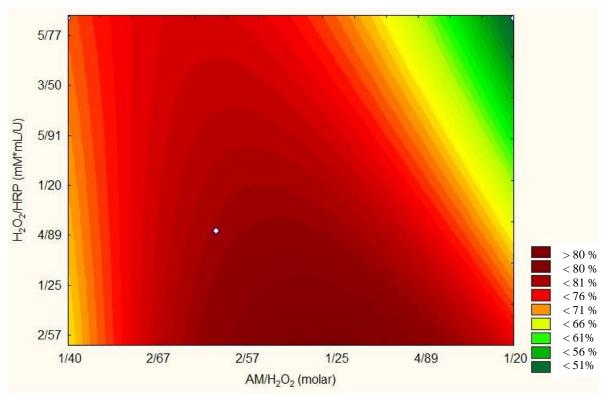


Figura 5.24 – Curva de contorno gerada no segundo delineamento com  $[H_2O_2] = 0.4$  a 2.0 mM; HRP = (vide Tabela 5.7); [AM] = 0.02 a 0.05 mM em pH = 5.0 e temperatura igual a  $30.0^{\circ}$ C. Região vermelha indica maior percentual de remoção de cor

A Tabela 5.8 apresenta os seguintes dados para os ensaios do segundo delineamento: os efeitos das variáveis independentes e os efeitos das interações entre as variáveis; o valor de "F" calculado dos termos lineares do modelo matemático; o "p-valor" para 95% de confiança.

Tabela 5.8 - Dados de efeito, valor de F e "p-valor" para o segundo delineamento da reação via enzimática.

via chizhinatica.				
	Variáveis			
	$AM/H_2O_2$	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP*	
Efeito Linear	-0,07	-0,05	-0,29	
p-valor (Efeito Linear)	0,003	0,001	< 0,001	
Efeito Quadrático	N.A.	N.A.	N.A.	
p-valor (Efeito Quadrático)	N.A.	N.A.	N.A.	
Valor de F (Linear)	323,5	913,2	1764,5	
p-valor ("F" Linear)	0,003	0,001	< 0,001	
Valor de F (Quadrático)	N.A.	N.A.	N.A.	
p-valor ("F" Quadrático)	N.A.	N.A.	N.A.	

<sup>\* -</sup> Interação entre as variáveis

N.A. - Não aplicável

Com os dados da Tabela 5.8 é possível dizer que na faixa estudada no segundo delineamento todas as variáveis são significativas com confiança de 95 % e possuem um efeito negativo em relação à resposta remoção de cor. O "p-valor" do F calculado comprova que os dados das variáveis estudadas se ajustam ao modelo matemático na faixa investigada com confiança de 95%.

#### 5.7.3. Terceiro Delineamento

No terceiro delineamento, as variáveis independentes e a variável reposta foram mantidas sendo acrescido de pontos axiais para se obter a curvatura da superfície. Os limites inferior e superior da variável independentes AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi respectivamente 1/40 e 1/20 enquanto que para a variável independente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP foi respectivamente 1/50 e 1/15. A Tabela 5.9 mostra os resultados gerados no primeiro delineamento.

Tabela 5.9 - Remoção de cor do corante azul de metileno no terceiro delineamento.

Ensaio	Relações		Conce	Remoção		
Liisaio	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP	AM	$H_2O_2$	HRP	de Cor (%)
12	1/20	1/15	0,047 mM	2,00 mM	100,0 U/mL	42,6
13	1/20	1/50	0,047 mM	2,00 mM	30,0 U/mL	82,4
14	1/40	1/15	0,020 mM	0,40 mM	20,0 U/mL	76,1
15	1/40	1/50	0,020 mM	0,40 mM	6,0 U/mL	50,0
16	1/30	1/33	0,035 mM	1,05 mM	35,0 U/mL	74,1
17	1/30	1/33	0,035 mM	1,05 mM	35,0 U/mL	75,1
18	1/30	1/33	0,035 mM	1,05 mM	35,0 U/mL	74,9
19	1/16	1/33	0,056 mM	2,47 mM	60,0 U/mL	60,1
20	1/44	1/33	0,014 mM	0,22 mM	8,0 U/mL	78,1
21	1/30	1/8	0,035 mM	1,05 mM	81,5 U/mL	18,9
22	1/30	1/57	0,035 mM	1,05 mM	7,3 U/mL	60,9

A Figura 5.25 mostra a superfície gerada no terceiro e último delineamento. É possível perceber que para relação AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> próxima ao limite superior (1/20) a remoção de cor é mais eficiente quando a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP está próxima ao limite inferior (1/50). Já para relação AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> próxima ao limite inferior (1/40) a remoção de cor é mais eficiente quando a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP está próxima do limite superior (1/15).

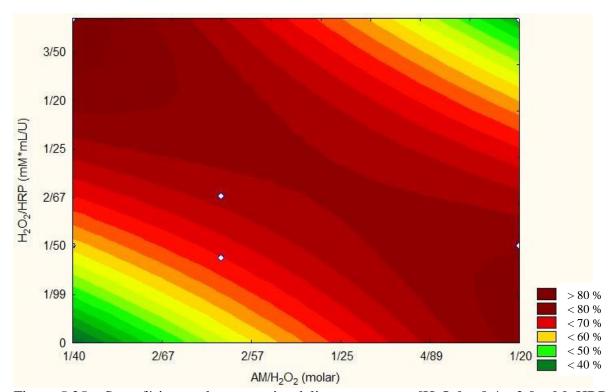


Figura 5.25 – Superfície gerada no terceiro delineamento com  $[H_2O_2]$  = 0,4 a 2,0 mM; HRP = (vide Tabela 5.9); [AM] = 0,02 a 0,05 mM em pH = 5,0 e temperatura igual a 30,0°C. Região vermelha indica maior percentual de remoção de cor

A Tabela 5.10 apresenta os seguintes dados para os ensaios do terceiro delineamento: os efeitos das variáveis independentes e os efeitos das interações entre as variáveis; o valor de "F" calculado dos termos lineares do modelo matemático; o "p-valor" para 95% de confiança.

Tabela 5.10 - Dados de efeito, valor de F e "p-valor" para o terceiro delineamento da reação via enzimática.

	Variáveis			
	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP	AM/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HRP*	
Efeito Linear	-0,10	-0,05	-0,29	
p-valor (Efeito Linear)	0,2	0,5	0,02	
Efeito Quadrático	-0,09	-0,10	N.A.	
p-valor (Efeito Quadrático)	0,2	0,02	N.A.	
Valor de F (Linear)	2,14	0,5	12,9	
p-valor ("F" Linear)	0,2	0,5	0,01	
Valor de F (Quadrático)	2,07	11,5	N.A.	
p-valor ("F" Quadrático)	0,2	0,02	N.A.	

<sup>\* -</sup> Interação entre as variáveis

N.A. - Não aplicável

A partir do resultado gerado no terceiro delineamento é possível verificar que a geração de espécies oxidantes é determinada pela relação molar entre o azul de metileno e peróxido de hidrogênio (AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no sistema e controlada pela relação atividade inicial da enzima e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP). Para a variável AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> próxima ao limite inferior é necessário que a variável H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP esteja próxima ao seu limite superior para que o sistema possa manter a eficiência de remoção maior possível e o mesmo é observado quando a variável AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está próxima ao limite superior é necessário que a variável H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP esteja próxima ao seu limite inferior.

Os resultados da Tabela 5.10 mostram que a variável AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não é significativa para a faixa investigada, porém esta variável "contaminante (substrato)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>" é relevante para sistemas enzimático utilizando HRP e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (FERREIRA-LEITÃO *et al*, 2003; BON *et al*, 2008). A variável equivalente a grandeza "inibidor (substrato)/enzima" (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP) é significativa para a faixa estudada apresentando efeitos negativos para a remoção de cor

provavelmente devido ao fato do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se apresentar como inibidor da enzima em elevadas concentrações relativas à HRP (relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP elevada). A enzima HRP em elevadas concentrações (relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP baixa) aumenta a eficiência de remoção de cor em corantes (SARMA *et al*, 2005).

O gráfico de pareto (Figura 5.26) para este terceiro delineamento corrobora os resultados obtidos na Figura 5.25, pois mostra a importância estatística que a interação entre as variáveis AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP tem sobre a remoção de cor. Uma provável explicação para que a variável AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não apresente significância estatística é a superfície de resposta do terceiro delineamento ser caracterizada por uma função do tipo "sela" (vide Figura 5.27) onde se observa uma região em que altas eficiências de remoção de cor encontram-se numa faixa que abrange tanto o limite inferior quanto o limite superior.

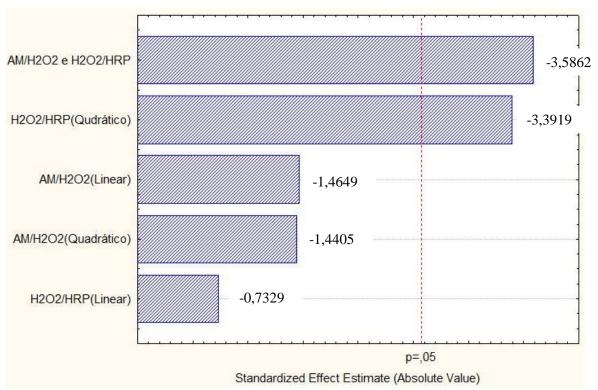


Figura 5.26 - Gráfico de Pareto gerado no terceiro delineamento com grau de confiança de 95%.

Com os pontos axiais do terceiro delineamento foi possível obter a curvatura da superfície gerada (Figura 5.27) e foi possível escrever a Equação 5.2, com os termos codificados e R<sup>2</sup> igual a 90,4%, gerada para a descoloração do azul de metileno (Equação 5.2) que prevê uma remoção de cor de até 90%.

$$Remoção \ de \ Cor(\%) = 0,75 - 0,05 * \frac{AM}{H_2O_2} - 0,05 * \left(\frac{AM}{H_2O_2}\right)^2 - 0,03 * \frac{H_2O_2}{HRP} - 0,05 * \left(\frac{H_2O_2}{HRP}\right)^2 - 0,14 * \frac{AM}{H_2O_2} * \frac{H_2O_2}{HRP}$$
(5.2)

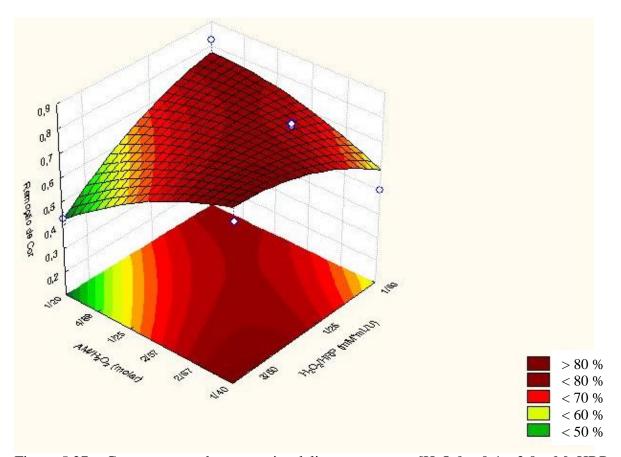


Figura 5.27 – Curvatura gerada no terceiro delineamento com  $[H_2O_2] = 0.4$  a 2,0 mM; HRP = (vide Tabela 5.9); [AM] = 0.02 a 0.05 mM em pH = 5.0 e temperatura igual a 30.0°C. Região vermelha indica maior percentual de remoção de cor.

Kariminia e Yousefi (2010), utilizando planejamento fatorial associado à metodologia de superfície de resposta, estudaram a descoloração do corante "*Orange 7*" com peroxidase proveniente de fungo e encontraram um R<sup>2</sup> de 97,18%, conseguindo remover até 100% de cor do corante. Já Palvannan e Kalaiarasan (2014) utilizaram o planejamento fatorial completo composto com pontos centrais e as superfícies de resposta geradas para otimizar a adição de estabilizadores à HRP na reação de degradação de fenol, obtendo 60% de remoção.

### 5.8. Comparação entre a Via Química e Via Enzimática

A principal análise que pode ser feita na comparação da geração de espécies oxidantes por via química e por via enzimática é por meio do pH e da concentração estequiométrica de peróxido de hidrogênio necessária para remoção de cor no azul de metileno. A Tabela 5.11 mostra o efeito de pH e da concentração estequiométrica de peróxido de hidrogênio da condição em que foi obtida maior remoção de cor do corante azul de metileno, tanto na via química quanto na via enzimática. Entende-se a melhor condição como aquela que gera uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio.

Tabela 5.11 – Comparação entre o pH e o valor estequiométrico de peróxido de hidrogênio utilizados na melhor condição de geração de oxidante por via química e por via enzimática

	рН	Valor Estequiométrico de	Concentração de	Remoção de Cor	
	pm	$H_2O_2$	$H_2O_2$ (mg/L)	máxima (%)	
Via Química <sup>a</sup>	7,0	0,16	276,8	9,8	
Via Enzimática <sup>b</sup>	5,0	0,04	68,0	82,4	

a – Concentração inicial de azul de metileno igual a 10 mg/L; Temperatura = 25° C

b – Obtido no ensaio 13 (vide Tabela 5.9) do planejamento experimental

A maior eficiência de remoção de cor no azul de metileno por via química na faixa estudada foi em pH neutro e obteve uma eficiência de remoção de cor aproximadamente 8,0 vezes menor que da via enzimática. Já a via enzimática possui uma região da faixa ácida a neutra onde tem ação oxidante (vide Figura 5.3), configurando assim uma vantagem em relação ao processo por via química, pois não necessita de alcalinização ou acidificação.

A quantidade estequiométrica de peróxido de hidrogênio (dado pela reação 3.4) necessária para a degradação do corante azul de metileno por via química variou de 1,0 a 5,0 vezes e obteve uma remoção de cor de no máximo 9,8% na condição de 0,16 vezes a quantidade estequiométrica de peróxido de hidrogênio em pH 7,0. Já na via enzimática uma remoção de 82,4% de cor foi obtida utilizando uma concentração de peróxido de hidrogênio 0,04 vezes a quantidade estequiométrica, ou seja, 4 vezes menor que a concentração de peróxido de hidrogênio utilizado na via química.

Considerando que o peróxido de hidrogênio é utilizado para gerar oxigênio reativo tanto por via química (peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio) quanto por via enzimática (peróxido de hidrogênio e HRP), os resultados de descoloração do azul de metileno por ação enzimática indicam que a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizada no sistema enzimático é 4 vezes menor que a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado no sistema químico (reação do peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio), demonstrando uma vantagem do processo enzimático utilizado.

#### 6. Conclusões

Foi possível a remoção de cor da solução aquosa do corante azul de metileno (20,0 mg/L) pela ação combinada entre a enzima *Horseradish peroxidase* e o peróxido de hidrogênio, em pH 5,0 e temperatura de 30,0 °C, obtendo-se uma eficiência de remoção de cor de cerca de 80,0 %.

Ao comparar os valores de K<sub>m</sub> para os sistemas estudados neste trabalho entre as combinações de HRP, peróxido de hidrogênio e azul de metileno, é possível que ao adicionar azul de metileno na solução contendo peróxido de hidrogênio e HRP, haja um aumento da afinidade da enzima em relação ao peróxido de hidrogênio devido a diminuição do K<sub>m</sub> (de 17, mM para 0,1 mM) para o mesmo substrato, sugerindo que a reação redox entre a enzima e o peróxido de hidrogênio se intensifique, tendo uma maior possibilidade geração de espécies reativas de oxigênio.

A enzima é inibida pelo substrato peróxido de hidrogênio. Na ausência de corante, a concentração inibitória de peróxido de hidrogênio é de 800,0 mg/L e na presença de corante, 35,0 mg/L. A inibição não é total e a cinética de inibição da HRP pelo peróxido de hidrogênio mostra uma tendência permanecer como ordem zero e, com aumento da concentração de peróxido de hidrogênio, aumentar a ordem de reação para reação de primeira ordem.

A reação entre a *Horseradish peroxidase*, peróxido de hidrogênio e azul de metileno é capaz de gerar oxigênio singlete numa concentração maior que 15,18 mg/L. O fator determinante na geração do oxigênio singlete é a concentração do peróxido de hidrogênio e não a atividade da enzima.

A reação entre a enzima HRP, o peróxido de hidrogênio e o azul de metileno segue a cinética de Michaelis-Menten até a concentração limite de 35 mg/L de peróxido de

hidrogênio. Após esta concentração a velocidade da reação é diminuída proporcionalmente ao aumento da concentração inicial de peróxido de hidrogênio.

A via enzimática se mostrou mais eficiente que a via química em relação à quantidade de peróxido de hidrogênio utilizada. Na via química foi 4 vezes maior que a quantidade estequiométrica utilizada na via enzimática. Além disso, a eficiência na descoloração do azul de metileno na via química foi 8 vezes menor que da via enzimática, mostrando que a via enzimática foi o processo que gera maior quantidade de oxidante que a via química nas condições estudadas.

As principais variáveis que influenciam na remoção de cor pela ação da enzima HRP e peróxido de hidrogênio é a relação molar AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP dada em mM\*mL/U. Remoções de cor maiores que 80 % são previstas pelo modelo estatístico estudado quando a relação AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encontra no nível inferior (1/40) e a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP no nível superior (1/15) ou quando a relação AM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no nível superior estudado (1/20) e a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HRP no seu nível inferior (1/50).

## 7. Recomendações e Trabalhos Futuros

Diante das conclusões deste trabalho é possível verificar uma série de estudos que podem ser realizados a fim de complementar os resultados que já foram aqui apresentados, dentre os quais é possível destacar:

- O Estudo da utilização da enzima imobilizada, já que sua utilização na "forma livre" leva à inativação. Estudos indicam que o encapsulamento tem a função de proteger a enzima da inativação após a primeira utilização.
- O estudo da melhor matriz de encapsulamento da enzima (gel, vidro, polissacarídeos, etc) para uma aplicação específica em tratamento de efluente industrial.
- É necessário investigar fontes alternativas de peroxidase e/ou sua utilização direta, sem a necessidade de purificação ou algum processo de liofilização para diminuir o custo do tratamento enzimático de efluentes.
- Realizar testes com efluentes industriais oriundos de tratamento secundário para verificar a eficiência oxidante do oxigênio singlete e/ou sua eficiência biocida. Após os testes verificar a viabilidade econômica do processo.
- Estudar como medir o oxigênio singlete "on-line" para determinar se existe inativação
  da enzima HRP pelo oxigênio singlete formado (inativação por produto) e acompanhar a
  reação em termos de formação de oxigênio singlete.

# 8. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Águas (Brasil); **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: 2013.** Disponível em: <a href="http://arquivos.ana.gov.br/institucional/spr/conjuntura/webSite\_relatorio\_Conjuntura/projeto/index.html">http://arquivos.ana.gov.br/institucional/spr/conjuntura/webSite\_relatorio\_Conjuntura/projeto/index.html</a> - Acessado em 8 de abril de 2014.

ALEMZADEH I.; NEJATIA S.; **Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase.** Journal of Hazardous Materials, Vol. 166, p. 1082-1086, 2009.

ALTIKATOGLU M.; CELEBI M.; AKDESTE Z. M.; YILDIRIM H.; **Determination of decolorization properties of Reactive Blue 19 dye using Horseradish Peroxidase enzyme.** Turkish Journal of Biochemistry, Vol. 37 n°2, p. 200-206, 2012.

ARAUJO, F. V. F.; Estudo do processo Fenton Heterogêneo utilizando hematita (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como catalisador na descoloração de soluções de corante reativo. Tese de doutorado – UFRJ, 2008.

ATKINS, P.W.; Físico-Química. LTC Editora, Volume 2, Rio de Janeiro 2004.

BARBOSA I. L.; Avaliação de Processos de Separação por Membranas para Geração de Águas de Reúso em um Centro Comercial. Dissertação de mestrado, UFRJ, 2009.

BHUNIA A.; DURANI S.; WANGIKAR P.P.; Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Biotechnology Bioengineer, Vol. 72, p. 562 – 567, 2000.

BON E. P. da S.; MADEIRA L. da S.; Ferreira-Leitão V. S.; **Dibenzothiophene oxidation** by horseradish peroxidase in organic media: Effect of the DBT:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molar ratio and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition mode. Chemosphere, Vol. 71, p. 189-194, 2008.

BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.W.A. Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais, CETESB-SP p. 319-337, 1979.

BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System, Disponível em: <a href="http://www.brenda-enzymes.info/">http://www.brenda-enzymes.info/</a> - Acessado em 2 de Agosto 2011.

BJÖRKSTÉN F.; A Kinetic Study of the Horse-Radish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Iodide. European Journal Biochemistry, Vol. 5 p. 133-142, 1968.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K.; **Introdução à Bioquímica.** Editora Edgard Blücher LTDA, 1976.

CORRÊA R. J.; SEVERINO D.; SOUZA R. S.; DE SANTANA E. F.; MAURO L. L.; ALVARENGA S. D. S.; NICODEM D. E.; **The generation of singlet oxygen by petroleum and its fractions.** Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, Vol. 236, p. 9-13, 2012.

COTTON A.; WILKINSON G.; Química Inorgânica, Editora Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1978.

COURTEIX A.; BERGEL A.; Horseradish peroxidase catalyzed hydroxylation of phenol: II. Kinetic model. Enzyme and Microbial Technology, Vol. 17, p. 1094-1100, 1995.

DALLAGO, R.M.; SMANIOTTO, A.; DE OLIVEIRA, L.C.A.; **Resíduos Sólidos de Curtumes como Adsorventes para a Remoção de Corantes em Meio Aquoso.** Química Nova, Vol. 28, nº 3, p. 433-437, 2005.

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

DI MASCIO P.; ALMEIDA E. A.; MIYAMOTO S.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; Direct evidence of singlet molecular oxygen  $[O_2(^1\Delta_g)]$  production in the reaction of acetonitrile with hydrogen peroxide in alkaline solutions. Analytica Chimica Acta, Vol. 482, p. 99–104, 2003.

DIAS S. L. P.; SCOTTI R.; LIMA E.C.; BENVENUTTI E. V.; PIATNICKI C. M. S.; GUSHIKEM Y.; KUBOTA L. T.; **Azul de Metileno Imobilizado na Celulose/TiO2 e SiO2/TiO2: Propriedades Eletroquímicas e Planejamento Fatorial.** Química Nova, Vol. 29 n° 2, p. 208-212, 2006.

DURAN N.; MARTINELLI V.C.; ZINNER K.; KACHAR B; CILENTO G.; Emission From Singlet Oxygen During the Peroxidase-Catalyzed oxidation of malonaldehyde. FEBS Lettes, Vol. 108 n° 1, p. 266-268, 1979.

ELLIOTT W. H.; ELLIOTT D. C.; **Biochemisty and Molecular Biology.** 3<sup>a</sup> ed. OXFORD University Press, 2005.

ECKENFELDER, W. W.; **Industrial water pollution control.** 3ª ed. USA: Editora McGraw-Hill Ltda., 1992

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

FIGUEIRA C. D.; Determinação Espectrofotométrica de Azul de Metileno na Presença de Verde de Malaquita em Antiparasitários de Uso Veterinário. Dissertação de Mestrado, UFF, 2012.

FORGACS E.; CSERHÁTI T.; OROS G.; **Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review**. Environment International, Vol. 30, p. 953 – 971, 2004.

GARDINGO, M. F.; Tratamento de águas e efluentes contendo surfactantes através do sistema peróxido de hidrogênio. Dissertação de Mestrado, PUC-RJ 2010.

GENTIL V.; Corrosão. Editora LTC, Rio de Janeiro, 1994.

GUERRERO F. Q.; DUARTE-VÁZQUEZ M. A.; GARCÍA-ALMENDAREZ B. E.; TINOCO R.; VAZQUEZ-DUHALT R.; REGALADO C.; **Polyethylene glycol improves phenol removal by immobilized turnip peroxidase.** Bioresource Technology, Vol. 99, p. 8605-8611, 2008.

HE B.; SINCLAIR R.; COPELAND B. R.; MAKINO R.; POWERS L. S.; YAMAZAKI I.; The Structure -Function Relationship and Reduction Potentials of High Oxidation States of Myoglobin and Peroxidase. Biochemistry, Vol. 35, p. 2413-2420, 1996.

HUSAIN Q.; MATTO M.; **Decolorization of direct dye by immobilized turnip peroxidase in batch and continupous processes.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 72, p. 965-971, 2009.

IUBMB - Nomenclatura das Enzimas - Disponível em: <a href="http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme">http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme</a>. Acessado em 20 de julho de 2011.

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

KAKINUMA K.; KIRYU C.; MAKIUCHI M.; MIYAZAKI J.; FUJINAGA T.; Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-chloride system. FEBS Letters, Vol. 443, p. 154-158, 1999.

KREITNER M.; ALTH G.; KOREN H.; LOEW S. EBERMANN R.; **A Quantitative Determination of Singlet Oxygen with Horseradish Peroxidase.** Analytical Biochemistry, Vol. 213, p. 63-67, 1993

KREITNER M.; EBERMANN R.; ALTH G.; Quantitative determination of singlet oxygen. Production by porphyrins. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology Vol. 36 p. 109-111, 1996

KONAKA R.; YAMAMOTO Y.; INOUE M.; CHIEN K. C.; DUNLAP W. C.; KASAHARA E.; Irradiation of Titanium Dioxide Generates Both Singlet Oxygen and Superoxide Anion. Free Radical Biology & Medicine, Vol. 27, n° 3/4 p. 294-300, 1999.

LEHNINGER A. L.; Princípios de bioquímica. Editora Savier, São Paulo 2002

LEVENSPIEL, O.; **Engenharia das Reações Químicas.** Tradução: Sérgio Fuchs Calil e Pedro Maurício. Ed. Edgard Blücher, 1974.

LI B.; CHEN L; LIN L.; LI Y.; LIN H.; QIU Z.; GU Y.; Effect of oxygen concentration on singlet oxygen luminescence detection. Journal of Luminescence, 2013.

LIU J.; WANG T.; JI L.; **Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Vol. 41, p. 81–86, 2006.

LOWRY O.H.; ROSEBROUGH N.J.; FARR A. L.; RANDALL R.J.; **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, p. 265-275, 1951.

MACHADO A. E. H.; RUGGIERO R.; NEUMANN M.G.; Fotodegradação de Lignina Acelerada por Peróxido de Hidrogênio: Evidência de Participação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> nas Reações em Meio Alcalino. Química Nova, Vol. 17 n°2, p. 111-118, 1994.

MANO, C.M.; PRADO F. M.; MASSARI J.; RONSEIN G. E.; MARTINEZ G. R.; MIYAMOTO S.; CADET J.; SIES H.; MEDEIROS M. H; G.; BECHARA E. J. H.; DI MASCIO P.; Excited singlet molecular  $O_2$  ( $^1\Delta_g$ ) is generated enzymatically from excited carbonyls in the dark. Scientific. Reports, 4:5938 p. 1-10, 2014.

MARTINEZ G. R.; MEDEIROS M. H. G.; DI MASCIO P.; Utilização de Endoperoxidos de Derivados de Naftaleno como Fontes Químicas de Oxigênio Singlete em Sistemas Biológicos. Química Nova, Vol. 23 n° 5, p. 686-689, 2000.

MERCK, Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – FISQP. Data de revisão 28/01/2013. Disponível em:

http://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-INTL-Site/en\_US/-/USD/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA\_CHEM-

<u>115943&DocumentType=MSD&Language=PT&Country=PT</u>. Acessado em 23 de dezembro de 2014.

MONTELLANO P. R. O.; ATOR M. A.; DAVID S. K.; **Structure and Catalytic Mechanism of Horseradish Peroxidase – Regiospecific Meso Alkylation of the Prosthetic Heme Group by Alkylhydrazines.** The Journal of Biological Chemistry, Vol. 262 n° 31, p. 14954-14960, 1987

NAKANO M.; KAMBAYASHI Y.; TATSUZAWA H.; KOMIYAMA T.; FUJIMORI K. - Useful  $^{1}O_{2}$  ( $^{1}\Delta_{g}$ ) generator, 3-(4'-methyl-1'-naphthyl)-propionic acid, 1',4'-endoperoxide (NEPO), for dioxygenation of squalene (a skin surface lipid) in an organic solvent and bacterial killing in aqueous medium. FEBS Letters, Vol. 432, p. 9-12, 1998a.

NAKANO M., KAMBAYASHI Y.; SANO Y.; HORI K.; FUJIMORI K.; MISAWA N.; MARUYAMA T.; TATSUZAWA H.; Inactivation of Bacterial Respiratory Chain Enzymes by Singlet Oxygen. FEBS Letters, Vol. 439, p. 329-333, 1998b

NICELL J.A.; COOPER V.A.; Removal Of Phenols From A Foundry Wastewater Using Horseradish Peroxidase. Water Research, Vol. 30 n° 4, p. 954-964, 1996.

NICELL J.A.; WRIGHT H.; **A model of peroxidases activity with inhibition by hydrogen peroxide.** Enzyme and Microbial Technology, Vol. 21, p. 302-310, 1997.

NONELL S.; FLORS C.; Radical species derived from phenalenone: characterization and role of upper excited states. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry Vol. 163, p. 9–12, 2004.

OLIVEIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. F. P.; NETO, J. A. G.; JARDIM W. F.; ROHWEDDER J. J. R.; Sistema de injeção em fluxo espectrofotométrico para monitorar peróxido de hidrogênio residual em processo de fotodegradação por reação foto-Fenton. Química Nova, Vol. 24, p. 188-190, 2001.

OLIVEIRA S. P.; SILVA W. L. L.; VIANA R. R.; Avaliação da capacidade de adsorção do corante azul de metileno em soluções aquosas em caulinita natural e intercalada com acetato de potássio. Cerâmica, Vol. 59, p. 338-344, 2011.

ONDER S.; CELEBI M.; ALTIKATOGLU M.; HATIPOGLU A.; KUZU H.; **Decolorization of Naphthol Blue Black using the Horseradish Peroxidase.** Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 163 n°3, p. 433-443, 2011

ORELLANA G.; VILLÉN L.; MANJÓN F.; FRESNADILLO D. G.; Solar Water Disinfection by Photocatalytic Singlet Oxygen Production in Heterogeneous Medium. Applied Catalysis B: Environmental, Vol. 69, p. 1-9, 2006.

PALVANNAN T.; KALAIARASAN E.; **Removal of phenols from acidic environment by horseradish peroxidase (HRP): Aqueous thermostabilization of HRP by polysaccharide additives.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, Vol. 45, p. 625–634, 2014.

PEREIRA A. R.; DA COSTA R. S.; YOKOYAMA L.; ALHADEFF E. M.; TEIXEIRA L. A. C.; **Evaluation of Textile Dye Degradation Due to the Combined Action of Enzyme Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide.** Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 174 n° 8, p. 2741-2747, 2014.

PETRUS J. C. C.; SOARES H. M.; (organizadoes) - **Gestão e Reúso de Água na Indústria**, IX Workshop, Florianópolis, Brasil, 2013.

PIATT, J. F.; CHEMMA A. S.; O'BRIEN P. J.; **Peroxidase Catalyzed Singlet Oxygen Formation From Hydrogen Peroxide.** FEBS Letters, Vol. 74 n°2, p. 251-254, 1977.

PINTO, G. F.; DE MENEZES R. R.; Cinética Enzimática. editora e-papers, 2009

POGGERE, P. A.; DAVIS, R.; MONTANHER, S. F.; LOBO, V. S.; **Azul de Metileno: Propriedades e Tratamentos**. Anais do III ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR, 2011. Disponível em: <a href="http://www.utfpr.edu.br/toledo/estrutura-universitaria/diretorias/dirppg/anais-do-endict-encontro-de-divulgacao-cientifica-e-tecnologica/anais-do-iii-endict/AZUL%20DE%20METILENO%20PROPRIEDADES%20E%20TRATAMENTOS.pdf — Acessado em 22 de dezembro de 2014.

Revista eletrônica do Departamento de Química da UFSC. **Corante: A Química nas Cores**. Disponível em: <a href="http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html">http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dye/corantes.html</a>. Acessado em 27 de julho de 2011

RODRIGUES M. I.; IEMMA A.F.; Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma Estratégia Sequencial de Planejamentos. 1ª Ed. Campinas – Editora Casa do Pão, 2005.

SARMA P.N.; MOHAN S.V.; PRASAD K.K.; RAO N.C.; **Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process**. Chemosphere, Vol. 58, p. 1097–1105, 2005.

SHELDON R. A.; DE VELDE F. V.; RANTWIJK F. V.; **Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis.** TRENDS in Biotechonology, Vol 19 n° 2, p. 73-80, 2001.

SHREVE R. N.; BRINK JUNIOR J. A.; **Indústria de Processos Químicos**. Editora Guanabara Koogan – 4ª edição, 1977.

SINGH S.; PAKSHIRAJAN K.; Enzyme activities and decolourization of single and mixed azo dyes by the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium. International Biodeterioration & Biodegradation Vol. 64, p. 146-150, 2010.

SMWW, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Eds: L. S. Clesceri, A. E. Greenberg, A. D. Eaton, E. W. Rice), American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation, Washington, DC 2005.

SONG Q.; WU H.; RAN G.; LU X.; XU B.; Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30 n°1, p. 133-141, 2011

STRYER L.; TYMOCZKO J. L.; BERG J. M.; **Bioquímica**. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2004.

TAKAYAMA F.; EGASHIRA T.; YAMANAKA Y.; Singlet oxygen generation from phosphatidylcholine hydroperoxide in the presence of copper. Life Sciences, Vol. 68, p. 1807-1815, 2001.

TATSUZAWA H.; MARUYAMA T.; MISAWA N.; FUJIMORI K.; HORI K.; SANO Y.; KAMBAYASHI Y.; NAKANO M. – **Inactivation of bacterial respiratory chain enzymes by singlet oxygen.** FEBS Letters, Vol. 439, p. 329-333, 1998

TAYLOR K. E.; BISWAS N.; J. K. BEWTRA; K. J. BAYNTON; **Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide: a kinetic investigation.** Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1206 p. 272 – 278, 1994

TEIXEIRA L. A. C.; GARDINGO M. F.; YOKOYAMA L.; ARAÚJO F. V. F.; **Degradation of surfactant SLS in waters by singlet oxygen generated by the reaction between hydrogen peroxide and hypochlorite**. Water Science & Technology: Water Supply, Vol. 12 n°6, p. 810–817, 2012.

TEIXEIRA L. A. C.; ARELLANO M. T. C.; SARMIENTO C. M.; YOKOYAMA L.; ARAÚJO F. V. F.; Oxidation of cyanide in water by singlet oxygen generated by the reaction between hydrogen peroxide and hypochlorite. Minerals Engineering, Vol. 50–51, p. 57–63, 2013.

TOKUNAGA M.; SHIROGANE Y.; AOYAMA H.; OBORA Y.; TSUJI Y. – Coppercatalyzed oxidative cleavage of carbon–carbon double bond of enol ethers with molecular oxygen. Journal of Organometallic Chemistry, Vol. 690, p. 5378-5382, 2005.

TONG Z.; QINGXIANG Z.; HUI H.; QIN L.; YI Z.; **Kinetic study on the removal of toxic phenol and chlorophenol from waste water by horseradish peroxidases.** Chemosphere, Vol. 37, p. 1571-1577, 1998.

TSUKAGOSHI K.; HARADA Y.; SUZUKI K.; HASHIMOTO M.; KIMOTO H.; Chemiluminescence from singlet oxygen that was detected at two wavwlengths and effects of biomolecules on it. Talanta, Vol. 77, p. 1223-1227, 2009.

VAN DER ZEE, F.P.; *Anaerobic azo dye reduction*. Tese de doutorado. Wageningen University, 2002. Disponível em – <a href="http://www.docstoc.com/docs/8494166/THESIS---Anaerobic-azo-dye-reduction">http://www.docstoc.com/docs/8494166/THESIS---Anaerobic-azo-dye-reduction</a> - Acessado em 27 de julho 2011

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

ZERAIKI A. E.; DE SOUZA F. S.; FATIBELLO-FILHO O.; LEITE O. D.; **Desenvolvimento de um** *spot test* **para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação.** Química Nova, Vol.31 nº4, p. 731-734, 2008.

YU, S. M.; CHENG J.; ZUO P.; Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. Water Research, Vol. 40, p. 283-290, 2006.

YUAN J.; SONG B.; WANG G.; Measurement and characterization of singlet oxygen production in copper ion-catalyzed aerobic oxidation of ascorbic acid. Talanta, Vol. 72, p. 231-236, 2007.

WU, Y.; TAYLOR K. E.; BISWAS N.; BEWTRA J.K.; Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. Water Research, Vol. 31, p. 2699-2704, 1997.

# Apêndice 1 – Determinação da Constante de Velocidade para Reações Irreversíveis

Segundo Levenspiel (1974) a constante cinética do decaimento de um reagente "A" em uma reação homogênea na qual o reagente "A" gera produto "P"  $(A \rightarrow P)$  pode ser determinada empiricamente seguinte forma: o decaimento da concentração do reagente "A" pode ser escrito pela equação:

$$\frac{d\mathcal{C}_A}{dt} = k[\mathcal{C}_A]^n \tag{Equação A1.1}$$

Onde:

 $\frac{dC_A}{dt}$  = Decaimento da concentração de reagente ao longo do tempo.

k = Constante da velocidade da reação

C<sub>A</sub> = Concentração de reagente

n = pseudo-ordem da reação

Se a reação possuir ordem zero (n = 0) a resolução da equação A1.1 será:

$$C_{A0} * X_A = k * t$$
 (Equação A1.2)

Onde:

C<sub>A0</sub> = Concentração inicial de reagente "A"

 $X_A$  = Conversão do reagente "A" dado por:  $(\frac{C_{A0}-C_{AF}}{C_{A0}})$ 

C<sub>AF</sub> = Concentração final do reagente "A"

k = Constante da velocidade da reação

t = tempo de reação

Portanto o gráfico que possui uma relação linear entre o eixo da abscissa (tempo de reação) o eixo da ordenada (conversão da reação) tem características de uma reação de ordem zero e o coeficiente angular da reta é a própria constante de velocidade

Se a reação for de primeira ordem (n = 1) a resolução da equação A1.1 será:

$$ln(1 - X_A) = -k * t$$
 Equação (A1.3)

Onde:

 $X_A$  = Conversão do reagente "A" dado por:  $(\frac{C_{A0}-C_{AF}}{C_{A0}})$ 

C<sub>AF</sub> = Concentração final do reagente "A"

k = Constante da velocidade da reação

t = tempo de reação

Portanto o gráfico que possui uma relação linear entre o eixo da abscissa (tempo de reação) o eixo da ordenada (logaritmo neperiano de " $1-X_A$ ") tem características de uma reação de primeira ordem o coeficiente angular da reta é a própria constante de velocidade em valor absoluto

Se a reação for de segunda ordem (n = 2) a resolução da equação A1.1 será:

$$\frac{X_A}{(1-X_A)} = k * C_{A0} * t$$
 Equação (A1.4)

Onde:

 $X_A$  = Conversão do reagente "A" dado por:  $(\frac{C_{A0} - C_{AF}}{C_{A0}})$ 

C<sub>AF</sub> = Concentração final do reagente "A"

k = Constante da velocidade da reação

C<sub>A0</sub> = Concentração inicial de reagente "A"

t = tempo de reação

Portanto o gráfico que possui uma relação linear entre o eixo da abscissa (tempo de reação) o eixo da ordenada  $(\frac{X_A}{(1-X_A)})$  tem características de uma reação de segunda ordem o coeficiente angular da reta é a constante de velocidade multiplicada pela concentração inicial do reagente "A"

# Apêndice 2 - Escolha do Corante Azul de Metileno para os ensaios

Para esta seleção foram escolhidos três corantes: Preto de Drimaren RD BRX 300 ( $C_{26}H_{21}N_5Na_4O_{19}S_6$ ), Vermelho de Drimaren X-6BN ( $C_{38}H_{28}N_{10}Na_4O_{17}S_4$ ) e Azul de metileno (Com fórmula molecular –  $C_{16}H_{18}ClN_3S.XH_2O$ ). O espectro visível foi obtido através de uma varredura da solução de cada corante com uma concentração de 100mg/L no equipamento da *Shimadzu* modelo UV mini – 1240. A partir destes espectros, foi possível analisar as interferências causadas pela absorção da enzima HRP, pelo peróxido de hidrogênio e consequentemente a interferência na medida da cor.

Com a análise dos espectros de absorção dentro do visível dos três corantes selecionados, da enzima numa concentração elevada (750 mg/L) e outra concentração baixa (150 mg/L) e do peróxido de hidrogênio a 600.000 e a 6,0 mg/L, foi possível observar que: O corante Preto de Drimaren RD BRX 300 (Figura A2.1) tem uma banda de absorção entre 400nm a 800nm, logo não apresenta nenhum pico de absorção; O Vermelho de Drimaren X-6BN (Figura A2.2) tem seu pico de absorção em 516nm e o Azul de metileno (Figura A2.3) em 660nm; A enzima (Figura A2.4) possui uma banda de absorção que vai de 190 a 600nm e um pico máximo em 400nm e o peróxido de hidrogênio (Figura A2.5) tem sua absorção máxima em 220nm. Com isso foi realizado a seleção do corante que não tenha absorção nos mesmos comprimentos de onda da enzima e do peróxido de hidrogênio, para que não haja sobreposição dos seus respectivos espectros e com isso não interfira na real remoção de cor.

Portanto o corante que possui as características de não sobrepor o espectro da enzima e do peróxido de hidrogênio, e que apresenta um pico de absorção bem definido que é diretamente proporcional à sua cor, é o azul de metileno como é possível observar na sobreposição de todos os espectros de absorção Figura A2.6.

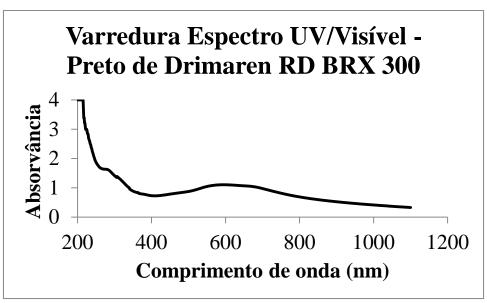


Figura A2.1 – Varredura no espectro UV-Vis do corante Preto de Drimaren RD BRX 300

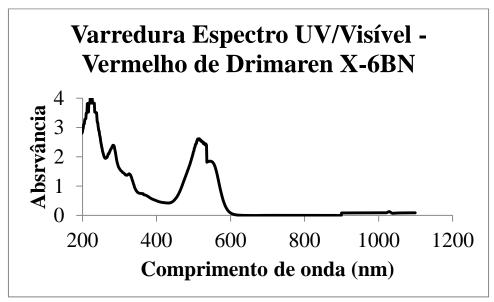


Figura A2.2 – Varredura no espectro UV-Vis do corante Vermelho de Drimaren X-6BN

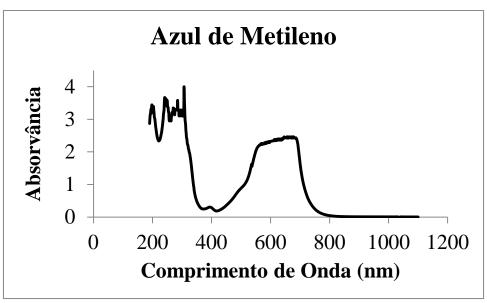


Figura A2.3 – Varredura no espectro UV-Vis do corante Azul de Metileno

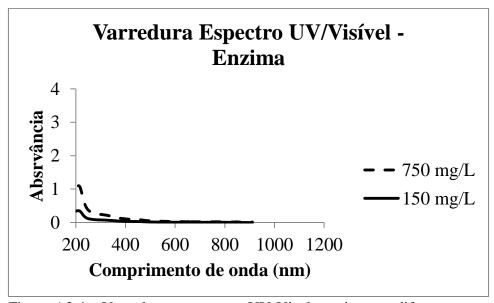


Figura A2.4 – Varredura no espectro UV-Vis da enzima em diferentes concentrações

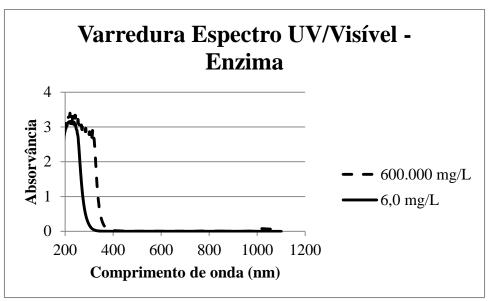


Figura A2.5 – Varredura no espectro UV-Vis do peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações

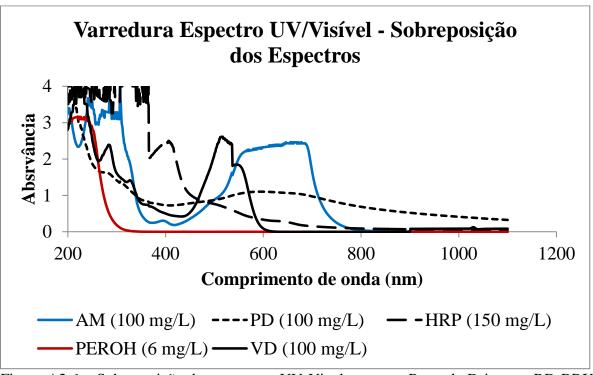
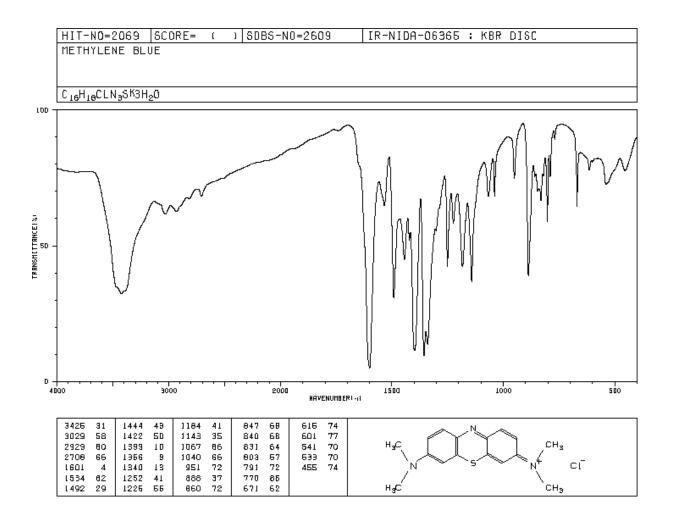


Figura A2.6 – Sobreposição dos espectros UV-Vis do corante Preto de Drimaren RD BRX 300; do corante Vermelho de Drimaren X-6BN; do corante Azul de Metileno; da enzima a 150 mg/L; e do peróxido de hidrogênio a 6 mg/L. Onde: AM – Azul de Metileno; PD – Preto de Drimaren RD BRX 300; HRP – Enzima; PEROH – Peróxido de Hidrogênio; VD – Vermelho de Drimaren X-6BN

# Anexo 1 - Espectro de Absorção Infra-vermelho do Azul de Metileno



Fonte: Spectral Database for Organic Compounds SDBS <a href="http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\_frame\_top.cgi">http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\_frame\_top.cgi</a>