

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Simone Farias

**UTILIZAÇÃO DA ENZIMA *HORSERADISH* PEROXIDASE NA
LAVAGEM PÓS-TINGIMENTO PARA REMOÇÃO DE
CORANTE REATIVO NÃO FIXADO ÀS FIBRAS DE ALGODÃO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia
Química

Orientador: Prof. Dr. Ayres Ferreira
Morgado

Coorientador: Prof. Dr. Antônio
Augusto Ulson de Souza

Florianópolis
2013

Farias, Simone

Utilização da enzima Horseradish peroxidase na lavagem pós-tingimento para remoção de corante reativo não fixado às fibras de algodão [dissertação] / Simone Farias ; orientador, Ayres Ferreira Morgado ; co-orientador, Antônio Augusto Ulson de Souza. - Florianópolis, SC, 2013.

133 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Utilização de enzima Horseradish peroxidase. 3. Lavagem pós-tingimento. 4. Remoção de corante reativo de fibra de algodão. I. Morgado, Ayres Ferreira. II. Souza, Antônio Augusto Ulson de. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Simone Farias

**UTILIZAÇÃO DA ENZIMA *HORSERADISH* PEROXIDASE NA
LAVAGEM PÓS-TINGIMENTO PARA REMOÇÃO DE
CORANTE REATIVO NÃO FIXADO ÀS FIBRAS DE ALGODÃO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Florianópolis, 7 de março de 2013.

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador do Curso

Prof. Dr. Ayres Ferreira Morgado
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr^a. Débora de Oliveira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo Lanza
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico essa dissertação aos meus pais Lourdes e Waldir e ao meu irmão Charles por todo amor e apoio que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar saúde e força para realizar esse trabalho.

Aos meus orientadores, os professores Ayres Ferreira Morgado e Antônio Augusto Ulson de Souza, pela confiança depositada em mim.

A Dr^a. Ingrid Maria Dittert pelas sugestões e contribuições ao trabalho.

Aos companheiros do grupo de enzimas, MSc. Mateus Mário Montibeller, mestrandas Laís Graziela Melo Silva e em especial a doutoranda Crisleine Zottis dos Reis pelas sugestões e ajuda durante a realização desse trabalho.

A graduanda Julie Sabine Holetz Brandes pela ajuda e apoio em parte da realização deste trabalho.

A todos os colegas do LABSIN/LABMASSA pelos bons momentos em especial a doutoranda Munique Dias pela amizade e paciência.

Ao Sr Cassiano Minatti e a empresa Malwee pelos testes de determinação de cor e solidez à lavagem.

Ao Sr Marcus Müller e a empresa Toyobo pela doação da enzima.

A Sra Janaína Pandini e a empresa Karsten pela doação dos corantes.

A colega Anna Paula Tarnovski e a empresa Benex Beneficiamento Têxtil pela doação do Tensoativo Não-iônico.

A colega Janaína Baumer Duarte pelas medidas de condutividade.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

Ao LABMASSA/EQA/UFSC pela infraestrutura e suporte para a realização desse trabalho.

A todos que embora não citados de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

“Penso noventa e nove vezes e nada descubro;
deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio e
eis que a verdade se revela”.

Albert Einstein

RESUMO

O consumo de água nas indústrias têxteis é predominantemente do processo de lavagem, onde os corantes que não reagiram com a fibra necessitam ser removidos. Este trabalho apresenta uma avaliação do potencial da enzima *Horseradish* peroxidase (HRP) em remover corantes reativos não fixados às fibras de algodão e corantes remanescentes do efluente do processo de lavagem. Nos ensaios de degradação enzimática foram utilizados os corantes reativos Azul 21 e Vermelho 195. As concentrações de enzima 29,85 U/mL e de peróxido de hidrogênio 100 μ M foram mantidas constantes com base em trabalhos reportados na literatura. Foram variados parâmetros como pH, concentração de corante e temperatura. A maior descoloração foi obtida em pH 4, 1 h de reação, 79% para o corante Azul 21 com concentração de corante de 30 mg/L a 20 °C e de 7% para o corante Vermelho 195 nas concentrações de corante de 30 e 50 mg/L a 30 °C. Algumas das condições obtidas nos estudos de degradação foram aplicadas para a mistura Azul 21 e Vermelho 195, sendo obtida uma remoção de 23% para o corante Vermelho 195 e de 45% para o corante Azul 21 na concentração de corante de 30 mg/L, pH 4 a 30 °C. Nos estudos de lavagem pós-tingimento para remover corante não fixado às fibras de algodão, com a lavagem enzimática foram obtidos os menores valores de ΔE_{cmc} 1,86 e 2,22 respectivamente para o corante Azul 21 e para a mistura dos corantes, para o corante Vermelho 195 o menor valor de ΔE_{cmc} foi 4,0 obtido quando foi realizada a lavagem com água destilada. Nos ensaios de solidez à lavagem ambos os corantes e a mistura dos corantes apresentaram solidez à lavagem Grau 4-5, que indica fraca perda de intensidade ou boa solidez. Os estudos de remoção da cor do efluente de lavagem foram realizados simultaneamente com a remoção do corante da fibra, utilizando concentração de enzima de 29,85 U/mL, peróxido de hidrogênio 2 mM, tampão citrato-fosfato (0,05 M, pH 4) em 45 min a 30 °C. Nestas condições foi obtida uma remoção de 79 % para o Azul 21, 31% para o Vermelho 195 e para a mistura dos corantes de 60% para o vermelho 195 e 81% para o Azul 21.

O uso da enzima *Horseradish* peroxidase como biocatalisador se mostrou viável na remoção de corante não fixado às fibras de algodão e na remoção do efluente do processo de lavagem, principalmente para remover corantes de ftalocianina como Azul 21 e misturas de corantes.

Palavras-chave: Corante reativo, remoção de corantes, corante reativo não fixado, *Horseradish* Peroxidase.

ABSTRACT

The water consumption in the textile is predominantly of the washing process, where unfixed dye in the fiber need to be removed. This work presents an evaluation of the potential of the enzyme *Horseradish* peroxidase (HRP) to remove reactive dyes unfixed in the cotton fibers and the remaining effluent of the washing process. In degradation tests were used reactive dyes Reactive Blue 21 and Reactive Red 195. The enzyme concentrations 29.85 U /mL and 100 μ M hydrogen peroxide were kept constant based on work reported in the literature. Were varied parameters such as pH, dye concentration and temperature. The biggest decolorization was obtained at pH 4, 1 h of reaction, 79% for Reactive Blue 21 with dye concentration of 30 mg / L at 20 ° C and 7% for the Reactive Red 195 in the dye concentration of 30 and 50 mg / L at 30 ° C. Some of the conditions obtained in degradation studies were applied to the mixture Reactive Blue 21 and Reactive Red 195, being obtained a removal of 23% for Red 195 dye and from 45% to 21 Reactive Blue 21 in the dye concentration of 30 mg / L pH 4 to 30. In studies of post dyeing washing to remove unfixed dyestuff to fibers of cotton, enzymatic washing were obtained ΔE_{cmc} the lowest values of 1.86 and 2.22 respectively for Reactive Blue 21 and for mixing dyes, for the Reactive Red 195 ΔE_{cmc} the lowest value was obtained when 4.0 was performed by washing with distilled water. In tests of the fastness to washing both dyes and mixing of the dyes showed wash fastness grade 4-5, indicating loss of weak intensity or good fastness. Studies of color removal from the effluent washings were performed simultaneously with the removal of dye from the fiber using enzyme concentration of 29.85 U / ml, hydrogen peroxide 2 mM citrate-phosphate buffer (0.05 M, pH4) 45 min at 30 ° C. Under these conditions there was obtained a 79% removal to Reactive Blue 21, 31% to Reactive Red 195 and the mixture of dyes 60% for Reactive Red 195 and 81% for Reactive Blue 21.

The use of the enzyme *Horseradish* peroxidase as a biocatalyst proved feasible to remove unfixed dye cotton fibers and removing the effluent from the washing process, primarily to remove phthalocyanine dyes such and Reactive Blue 21 mixtures dye.

Keywords: Reactive dye, dye remove, unfixed reactive dyes, *horseradish* Peroxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da Cadeia Celulósica.....	35
Figura 2- Estrutura celular do corte da fibra de algodão.....	37
Figura 3- Estrutura química do corante direto C.I. Preto direto 19.....	38
Figura 4- Representação das equações de corantes contendo grupo tiosulfato com íon sulfeto e subsequente formação dos corantes com pontes de dissulfeto.....	39
Figura 5- Estrutura química do corante disperso C.I. Vermelho disperso 343.....	39
Figura 6- Estrutura química do corante ácido C.I. Vermelho ácido 88.....	40
Figura 7- Estrutura química do corante azóico Laranja de metila.....	40
Figura 8- Processo de redução do corante á cuba com ditionito de sódio.....	41
Figura 9- Representação esquemática da tintura da lã com o corante pré- metalizado.....	42
Figura 10- Estrutura química da forma neutra do corante natural de cúrcuma.....	42
Figura 11- Representação esquemática da interação do corante reativo do tipo vinil sulfonato com a fibra celulósica.....	44
Figura 12- Curvas de esgotamento e fixação.....	45
Figura 13- Fluxograma representando etapas do processamento têxtil do algodão.....	47
Figura 14- Mecanismo geral de catálise enzimática.....	51
Figura 15- Representação forma esquemática do mecanismo de catálise enzimática.....	52
Figura 16- Grupo prostético das enzimas peroxidase denominado grupo <i>heme</i>	57
Figura 17- Ciclo catalítico da peroxidase.....	57
Figura 18- Estrutura química do corante Turqueza Remazol G 133%, classificado no Colour Index como C.I. Azul Reativo 21.....	61
Figura 19- Estrutura química do corante Vermelho CQ4BL, classificado no Colour Index como C.I. Vermelho Reativo 195.....	62
Figura 20- Reação de conversão do ABTS no cátion ABTS ⁺ catalisado pela HRP.....	64
Figura 21- Esquema de coordenadas retangulares do sistema CIELab.....	70
Figura 22- Influência do pH na remoção do corante Azul 21 [Condições reacionais: 50 mg/L de corante, 100 µL de extrato enzimático (29,85	

U/mL), 400 µL de H ₂ O ₂ 100 µM, 30 °C, 1 h de reação].....	73
Figura 23- Influência do pH na degradação do corante Azul 21[Condições reacionais: Descritas na Figura 22].....	74
Figura 24- Influência da concentração do corante na remoção do corante Azul 21 [Condições reacionais: 100µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H ₂ O ₂ 100 µM, pH 4, 30 °C, 1 h de reação].....	76
Figura 25- Influência da concentração de corante na degradação do corante Azul 21[Condições reacionais: Descritas na Figura 24].....	77
Figura 26- Influência da temperatura na remoção do corante Azul 21 [Condições reacionais: 30 mg/L de corante, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H ₂ O ₂ 100 µM, pH 4, 1h de reação].....	77
Figura 27- Influência da temperatura na degradação do corante Azul 21 [Condições reacionais: Descrita na Figura 26].....	78
Figura 28- Influência do pH na remoção do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: 50 mg/L de corante, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H ₂ O ₂ 100 µM , 30 °C, 1h de reação].....	80
Figura 29- Influência do pH na degradação do corante Vermelho 195 [Condição reacional: Descrita na Figura 28].....	81
Figura 30- Influência da concentração do corante na remoção do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H ₂ O ₂ 100 µM, pH 4, 30 °C, 1h de reação].....	82
Figura 31- Influência da concentração de corante na degradação do corante Vermelho 195 [Condição reacional: Descrita na Figura 30].....	83
Figura 32- Influência da temperatura na remoção do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: 30 mg/L de corante, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H ₂ O ₂ 100 µM, pH 4 em 1h de reação].....	84
Figura 33- Influência da temperatura na degradação do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: Descrita na Figura 32].....	85
Figura 34- Espectro de varredura para a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 antes e depois do tratamento enzimático [Condições reacionais: 30 mg/L mistura de corantes, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H ₂ O ₂ 100 µM, pH 4, 30 °C, 1h de reação].....	86

Figura 35- Comparação entre as amostras tingidas com Azul 21 que passaram por enxágues com água destilada.....	89
Figura 36- Comparação entre as amostras tingidas com Vermelho 195 que passaram por enxágue com água destilada.....	91
Figura 37- Amostras tingidas com corantes Azul 21, Vermelho 195 e mistura de corantes enxaguadas com água destilada a 10 min e 30 °C.....	93
Figura 38- Amostras tingidas com corantes Azul 21, Vermelho 195 e mistura de corantes e lavadas com vários aditivos químicos e enzimas peroxidase.....	101
Figura 39- Espectro de absorção do corante Azul 21 antes e depois do tratamento com a enzima <i>Horseradish</i> peroxidase [condições reacionais: 0,5 mL de enzima 29,85U/mL, 0,1mL de peróxido de hidrogênio 2mM, tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 4, 30°C e 45 minutos de reação].....	108
Figura 40- Espectro de absorção do corante Vermelho 195 antes e depois do tratamento com a enzima <i>Horseradish</i> peroxidase [condições reacionais: Descritas na Figura 39].....	109
Figura 41- Espectro de absorção da mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 antes e depois do tratamento com a enzima <i>Horseradish</i> peroxidase [condições reacionais: Descritas na Figura 39].....	110
Figura A.1- Curva de Calibração da Proteína em 595 nm descrita na seção 4.2.2.1.....	123
Figura A.2- Curva de calibração da solução do corante Azul 21 em 624 nm descrita no item 4.2.3.1.....	124
Figura A.3- Curva de calibração da solução do corante Vermelho 195 em 541 nm descrita no item 4.2.3.1.....	125
Figura A.4- Curva de calibração da solução da mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 em 624 nm, descrita no item 4.2.3.1.....	126
Figura A.5- Curva de calibração da solução do corante Azul 21 em 667 nm, contendo Sulfato de sódio e Carbonato de sódio (barrilha) descrita no item 4.2.3.....	127
Figura A.6- Curva de calibração da solução do corante Vermelho 195 em 541 nm, contendo Sulfato de sódio e Carbonato de sódio (barrilha) descrita no item 4.2.3.....	128
Figura A.7- Curva de calibração da solução da mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 em 667 nm, contendo Sulfato de sódio e Carbonato de sódio (barrilha) descrita no item 4.2.3.1.....	129
Figura A.1.1- Grau de solidez à lavagem.....	130
Figura A.1.2- Ficha técnica da enzima <i>Horseradish</i> peroxidase.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores Máximos permissíveis de substâncias em água potável	31
Tabela 2- Limites de tolerância para utilização de água em processos têxteis.....	34
Tabela 3- Concentração de corante não fixado, descarregado e volume de água requerida em função da classe de corante.....	34
Tabela 4- Composição química da fibra de algodão.....	36
Tabela 5- Principais auxiliares usados nos processos têxteis.....	50
Tabela 6- Propriedade da enzima <i>Horseradish</i> peroxidase.....	62
Tabela 7- Picos máximos de absorvância dos corantes utilizados.....	67
Tabela 8- Valores dos parâmetros dos enxágues com água destilada para o corante Azul 21.....	88
Tabela 9- Valores dos parâmetros dos enxágues com água para o corante Vermelho 195.....	90
Tabela 10- Valores dos parâmetros dos enxágues com água para a mistura dos corantes Azul 21 e vermelho 195.....	92
Tabela 11- Valores dos parâmetros de medida de cor para o corante Azul.....	94
Tabela 12- Valores dos parâmetros de medida de cor para o corante Vermelho 195.....	96
Tabela 13- Valores dos parâmetros de medida de cor para a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195.....	98
Tabela 14- Número de enxágues pós-lavagens químicas e enzimática paras os corantes Azul 21, Vermelho 195 e mistura.....	100
Tabela 15- Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Azul 21 e enxaguados com água destilada.....	102
Tabela 16- Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e enxaguados com água destilada.....	103
Tabela 17- Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 e enxaguados com água destilada.....	104
Tabela 18- Solidez à lavagem de tecidos tingidos com corante Azul 21 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase.....	105
Tabela 19- Solidez à lavagem de tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase.....	106

Tabela 20- Solidez à lavagem de tecidos tingidos com a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase.....	107
--	-----

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Equação para o cálculo da atividade enzimática.....	64
Equação 2- Equação para a quantificação de corante adsorvido na fibra.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- a*- Alteração de cor no eixo vermelho/verde
A- Atividade enzimática
Abs_{inicial}- Absorvância inicial
Abs_{final}- Absorvância final
ABTS- ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
b*- Alteração de cor eixo Amarelo/Azul
BSA- Albumina do soro bovino
CIELab- Sistema de coordenadas retangulares de medida de cor
CO- Cotton (Algodão)
C.I- Colour index (Catálogo da society of dyers and colourist)
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente
D- Corante degradado
DBO- Demanda bioquímica de oxigênio
DDT- Diclorodifenilcloroetano
delta E_{cmc}- diferença de cor em relação a um padrão
ΔE_{cmc}- diferença de cor em relação a um padrão
DQO- Demanda química de oxigênio
ε- Coeficiente de extinção molar [M⁻¹ cm⁻¹]
E- Enzima
E- Esgotamento total
EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético
ES- Complexo enzima-substrato
ETA- Estação de tratamento de água
ETE- Estação de tratamento de esgoto
F- Fixação
HBT- N-hidroxibenzotriazole
HRP- *Horseradish* peroxidase
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUBMB- União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
L*- Luminosidade
M- molar [mol/L]
P- Produto
PA- Poliamida
PET- Politereftalato de etileno
pH- Potencial hidrogeniônico
PVA- Álcool polivinílico
S- Substrato
S- Substantividade na fase do sal
-Sn- Pontes de dissulfeto

t- Tempo	[min]
T- Temperatura	[°C]
TG- Temperatura de transição vítrea	[°C]
U- Unidade de atividade enzimática	
Unid.- Unidade	
uH- Unidade de Hazen	
uT- Unidade de Turbidez	
V- Volume	[L]
V _{total} - Volume total de solução na cubeta	[mL]
V _{extrato} - Volume de extrato enzimático	
VMP- Valor máximo permitido	
λ- Comprimento de onda	[nm]
ΔE _{cmc} - Variação da diferença de cor	

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
2.	OBJETIVOS.....	29
2.1.	<i>Objetivo Geral.....</i>	29
2.2.	<i>Objetivos Específicos.....</i>	29
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	30
3.1.	Água.....	30
3.2.	Indústria têxtil.....	32
3.2.1.	Consumo de água na indústria têxtil.....	33
3.2.2.	Fibras Têxteis.....	35
3.2.2.1.	Algodão.....	36
3.2.3.	Corantes.....	37
3.2.3.1.	Classificação dos corantes.....	37
3.2.3.1.1.	Corantes diretos.....	37
3.2.3.1.2.	Corantes sulfurosos.....	38
3.2.3.1.3.	Corantes dispersos.....	39
3.2.3.1.4.	Corantes ácidos.....	39
3.2.3.1.5.	Corantes azóicos.....	40
3.2.3.1.6.	Corantes à cuba.....	41
3.2.3.1.7.	Corantes pré-metalizados.....	41
3.2.3.1.8.	Corantes Naturais.....	42
3.2.3.1.9.	Corantes Reativos.....	43
3.2.4.	Processos têxteis.....	46
3.2.4.1.	Beneficiamento têxtil.....	46
3.2.4.1.1.	Engomagem.....	47
3.2.4.1.2.	Desengomagem.....	48
3.2.4.1.3.	Purga.....	48
3.2.4.1.4.	Pré-alveamento.....	48
3.2.4.1.5.	Alveamento.....	48
3.2.4.1.6.	Mercerização.....	49
3.2.4.1.7.	Estamparia.....	49
3.2.4.1.8.	Tingimento.....	49
3.2.4.2.	Aditivos químicos utilizados na indústria têxtil.....	50
3.3.	Enzimas.....	51
3.3.1.	Fatores que influenciam na atividade enzimática.....	52
3.3.1.1.	Temperatura.....	53
3.3.1.2.	pH.....	53
3.3.1.3.	Surfactante.....	53
3.3.1.4.	Agente redutor.....	54
3.3.1.5.	Agente Oxidante.....	54
3.3.1.6.	Precipitação.....	54
3.3.2.	Classificação das enzimas.....	55
3.4.	Enzimas Peroxidases.....	56

3.4.1. Aplicação de enzimas na descoloração de efluentes têxteis industriais.....	58
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
4.1. Materiais.....	61
4.1.1. Corantes.....	61
4.1.2. Tecido.....	62
4.1.3. Enzima.....	62
4.1.4. Equipamentos.....	63
4.1.5. Reagentes.....	63
4.2. Métodos.....	63
4.2.1. Determinação da atividade enzimática da <i>Horseradish Peroxidase (HRP)</i>	63
4.2.2. Determinação da quantidade de proteína.....	65
4.2.2.1. Determinação da quantidade de proteína no extrato enzimático.....	65
4.2.3. Estudos de degradação enzimática.....	65
4.2.3.1. Medidas de cor das soluções.....	66
4.2.4. Tingimentos.....	67
4.2.5. Enxáguas pós-tingimento.....	68
4.2.6. Lavagens pós-tingimento.....	68
4.2.6.1. Lavagens químicas pós-tingimento.....	68
4.2.6.2. Lavagem enzimática.....	69
4.2.7. Descoloração Enzimática do efluente do processo de lavagem.....	69
4.2.8. Análises dos tecidos.....	70
4.2.8.1. Determinação da alteração da cor.....	70
4.2.8.2. Testes de solidez a lavagem.....	71
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	72
5.1. Determinação da proteína no extrato enzimático.....	72
5.2. Degradação Enzimática de corantes.....	72
5.2.1. Degradação Enzimática do corante Azul 21.....	72
5.2.1.1. Influência do pH na degradação do corante Azul 21.....	73
5.2.1.2. Influência da concentração do corante na degradação do corante Azul 21.....	75
5.2.1.3. Influência da temperatura na degradação do corante Azul 21.....	77
5.2.2. Degradação Enzimática do corante Vermelho 195.....	79
5.2.2.1. Influência do pH na degradação do corante Vermelho 195.....	79
5.2.2.2. Influência da concentração do corante na degradação do corante Vermelho 195.....	81
5.2.2.3. Influência da temperatura na degradação do corante Vermelho 195.....	83
5.2.3. Degradação Enzimática da mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195.....	85

5.3. Tingimento com Azul 21, Vermelho 195 e mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195.....	87
5.4. Enxágues pós-tingimento.....	87
5.4.1. Enxágue com água destilada para o corante Azul 21.....	87
5.4.2. Enxágue com água destilada para o corante Vermelho 195.....	90
5.4.3. Enxágue com água destilada para mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195.....	91
5.5. Análise dos parâmetros de cor dos tecidos após remoção de corantes não fixados à fibra de algodão.....	93
5.5.1. Análise dos parâmetros de cor do tecido para o corante Azul 21.....	94
5.5.1.1. Análise do parâmetro L* para tecido tingido com Azul 21.....	94
5.5.1.2. Análise do parâmetro a* para tecido tingido com Azul 21.....	95
5.5.1.3. Análise do parâmetro b* para tecido tingido com Azul 21.....	95
5.5.1.4. Análise da Intensidade da cor para tecido tingido com Azul 21.....	95
5.5.1.5. Análise do ΔE_{cmc} para tecido tingido com Azul 21.....	95
5.5.2. Análise dos parâmetros de cor do tecido para o corante Vermelho 195.....	96
5.5.2.1. Análise do parâmetro L* para tecido tingido com Vermelho 195.....	96
5.5.2.2. Análise do parâmetro a* para tecido tingido com Vermelho 195.....	96
5.5.2.3. Análise do parâmetro b* para tecido tingido com Vermelho 195.....	97
5.5.2.4. Análise da Intensidade da cor para tecido tingido com Vermelho 195.....	97
5.5.2.5. Análise do ΔE_{cmc} para tecido tingido com Vermelho 195.....	97
5.5.3. Análise dos parâmetros de cor do tecido para mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195.....	98
5.5.3.1. Análise do parâmetro L* para tecido tingido com mistura de corantes.....	98
5.5.3.2. Análise do parâmetro a* para tecido tingido com mistura de corantes.....	98
5.5.3.3. Análise do parâmetro b* o tecido tingido com mistura de corantes.....	99
5.5.3.4. Análise da Intensidade da cor para tecido tingido com mistura de corantes.....	99

5.5.3.5. Análise do ΔE_{cmc} para tecido tingido com mistura de corantes.....	99
5.6. Enxágues pós-lavagens químicas e enzimática.....	100
5.7. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corantes reativos.....	102
5.7.1. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos enxaguados com água destilada.....	102
5.7.1.1. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Azul 21 e enxaguados com água destilada.....	102
5.7.1.2. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e enxaguados com água destilada.....	103
5.7.1.3. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 e enxaguados com água destilada.....	104
5.7.2. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corantes e lavados com agentes químicos e enzimas.....	104
5.7.2.1. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Azul 21 e lavados com agentes químicos e enzimas.....	104
5.7.2.2. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e lavados aditivos químicos e enzimas.....	105
5.7.2.3 Testes de Solidez a lavagem dos tecidos tingidos com mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195.....	106
5.8. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem.....	107
5.8.1. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem para o corante Azul 21.....	108
5.8.2. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem para o corante Vermelho 195.....	109
5.8.3. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem para a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195.....	110
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	112
6.1. Conclusões.....	112
6.2. Sugestões.....	113
REFERÊNCIAS.....	115
APÊNDICE.....	123
APÊNDICE A.....	123
ANEXOS.....	130
ANEXO A.....	130
ANEXO B.....	131

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas verifica-se grande modernização da indústria têxtil e com isso o aumento do consumo de água. Os maiores consumidores de água potável são as indústrias e a agricultura, sendo o setor têxtil responsável por cerca de 15% da água consumida pelas indústrias (FERREIRA; KELLER; SILVA, 2009; TWARDOKUS, 2004).

O setor de beneficiamento têxtil é um dos setores que mais geram resíduos, suas várias etapas como preparação, tingimento, estamparia e acabamento são geradoras de grandes volumes de efluentes líquidos com alta carga orgânica, baixa demanda química de oxigênio (DQO), pouca biodegradabilidade e altas concentrações de corantes não fixados às fibras (NGUYEN; JUANG, 2013).

Os corantes reativos extensivamente usados nas indústrias têxteis, principalmente por apresentarem características como solidez à lavagem e estabilidade química estão presentes em altas concentrações nos efluentes têxteis, principalmente pela parcela dos mesmos hidrolisados durante o processo de tingimento. Corantes reativos são corantes sintéticos que se ligam à fibra celulósica através de ligações covalentes. Estes corantes são atualmente os mais utilizados em indústrias de todo mundo para o tingimento de fibras de algodão (BURLINSHAW et al., 2011; KUNZ et al., 2002).

Os efluentes com altas concentrações de corantes possuem capacidade para alterar ciclos biológicos quando despejados em ambientes aquáticos por afetarem o processo de fotossíntese, a oxigenação da água e por sua elevada toxicidade e potencialidades carcinogênicas e mutagênicas (NGUYEN; JUANG, 2013).

Devido à cobrança mais rigorosa por parte dos órgãos ambientais, muitas indústrias têm buscado alternativas para minimizar o volume de efluentes produzidos e o gasto de recursos como água e energia. Entre essas alternativas estão: o reuso de água, o reaproveitamento de resíduos e a substituição de máquinas antigas por novas, entre outros.

Entre as alternativas de tratamentos de efluentes já existentes e utilizadas nas indústrias para tratar efluente têxtil estão: pré-tratamento por sistemas físico-químicos como adsorção, coagulação e/ou precipitação seguido de tratamento biológico, principalmente pelo sistema de lodos ativados (LENNA; SELVA, 2008). Estes métodos muitas vezes demandam tempo e dinheiro, não sendo muito eficazes (ZENG et al., 2011)

Atualmente destaca-se o uso de enzimas da classe das oxirredutases como lacase ou peroxidase para degradação de efluente têxtil colorido. O uso de enzimas é atraente porque fornece a possibilidade de descolorir efluentes têxteis em temperaturas próximas da ambiente e em alguns casos em pH neutro.

A redução de efluentes líquidos no processo têxtil é a melhor forma de reduzir os impactos ambientais, assim como os custos dos insumos e aditivos químicos, que são necessários serem adicionados ao processo para o tratamento do efluente final, visando alcançar os padrões preconizados pela legislação ambiental para o descarte nos cursos de água.

A partir destas considerações, neste trabalho será utilizada a enzima *Horseradish* peroxidase (HRP) para lavagens pós-tingimento de tecidos de algodão visando remover o corante não fixado à fibra e a diminuição do consumo de água neste processo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial da enzima *Horseradish* peroxidase (HRP) em lavagens pós-tingimento de tecidos de algodão visando remover o corante reativo não fixado à fibra e reduzir o consumo de água no processo.

2.2. Objetivos Específico

- Estudar as condições reacionais através da degradação enzimática de corantes, variando pH, concentração de corante e temperatura.
- Avaliar a quantidade de corante adsorvido no tingimento por medidas espectroscópicas.
- Utilizar as condições obtidas nas reações de degradação para realizar lavagens enzimáticas pós-tingimentos e descoloração do efluente do processo de lavagem.
- Comparar a lavagem enzimática com lavagens químicas, sem enzimas.
- Avaliar os tecidos por medidas colorimétricas e testes de solidez à lavagem.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão dos principais tópicos abordados neste trabalho. Primeiramente serão analisadas as principais fontes geradoras de resíduos na indústria têxtil. Em seguida será avaliado o potencial da aplicação de enzimas para remover corante reativo não fixado à fibra de algodão e de efluentes têxteis.

3.1. Água

A água é um dos recursos naturais mais importantes para vida e manutenção de todas as espécies. Aproximadamente 70% da superfície da terra encontram-se coberta de água, no entanto, somente 2,7% deste volume são de água doce, sendo que a maior parte dessa água está congelada nas geleiras ou em depósitos subterrâneos. Os lagos, riachos, córregos e rios, que são as principais fontes de água potável, representam apenas 0,01% do suprimento total de água (FREIRE; PEREIRA, 2005).

O Brasil é um país privilegiado com relação à disponibilidade de água, detém a maior parte do manancial de água doce disponível na América do Sul. Porém, segundo Andreu (2010), a grande mobilidade populacional, e o crescimento das atividades urbanas, agrícolas e industriais, verificada no Brasil nos últimos 50 anos geraram enorme pressão sobre os serviços públicos, comprometendo a preservação dos mananciais.

A adequada destinação de resíduos é um dos grandes desafios para o Brasil, pois são poucos os casos de destinação final correta dos resíduos sólidos industriais. A maioria das legislações e regulamentações é caracterizada por uma definição geral de “resíduos sólidos” ou “resíduos perigosos” onde se usa critérios como a origem e a presença de substâncias ou compostos tóxicos. A legislação invoca o princípio da responsabilidade do gerador, desde a geração, estocagem, armazenamento, transporte, tratamento até sua disposição final (LIMA; FERREIRA, 2007).

Conforme a Resolução 313 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2002), resíduo sólido industrial é todo resíduo que resulte de atividades industriais e que se encontre nos estados sólido, semi-sólido, gasoso, quando contido, e líquido, cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgoto ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnicas ou economicamente inviáveis em face de melhor tecnologia disponível. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistemas de

tratamento de água e aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição. A Tabela 1 apresenta os valores permissivos de substâncias em água potável segundo a Portaria nº 36 de 19/01/90 do Ministério da Saúde.

Tabela 1 - Valores máximos permissíveis de substâncias em água potável.

Características	UNID.	VMP	Características	UNID.	VMP
I Físicas e organolépticas			Heptaclorato	µg/L	0,1
Cor aparente	uH ⁽¹⁾	5 ⁽³⁾	Hexaclorobenzeno	µg/L	0,001
Odor		não obj.	Lindano	µg/L	3
Sabor		não obj.	Metoxicloro	µg/L	30
Turbidez	uT ⁽²⁾	1 ⁽⁴⁾	Pentaclorofenol	µg/L	10
			Tetracloroeto de carbono	µg/L	3
II Químicas			Tetracloroetoetano	µg/L	10
IIa.					
Componentes					
Inorgânicos					
			Toxafeno	µg/L	5
Arsênio	mg/L	0,05	Tricloroetoetano	µg/L	30
Bário	mg/L	1	Tribalometanos	µg/L	100 ⁽⁶⁾
Cádmio	mg/L	0,005	1.1 Dicloroetoetano	µg/L	0,3
Chumbo	mg/L	0,05	1.2 Dicloroetoetano	µg/L	10
Cianetos	mg/L	0,1	2,4,6 Triclorofenol	µg/L	10 ⁽⁷⁾
Cromo total	mg/L	0,05			
Fluoretos	mg/L	-5	IIb. Componentes que afetam a qualidade organoléptica		
Mercúrio	mg/L	0,001			
Nitrato	mg/L	10			
Prata	mg/L	0,05	Alumínio	mg/L	0,2 ⁽⁸⁾
Selênio	mg/L	0,01	Agentes tensoativos	mg/L	0,2
			Cloretos	mg/L	250
			Cobre	mg/L	1
IIb.					
Componentes					
Aldrin e Dieldrin	µg/L	0,03	Dureza total (CaCO ₃)	mg/L	500
Benzeno	µg/L	10	Ferro total	mg/L	0,3
Benzeno a pireno	µg/L	0,01	Manganês	mg/L	0,1
Clordano	µg/L	0,3	Sólidos totais dissolvidos	mg/L	1000
DDT	µg/L	1	Sulfatos	mg/L	400
Endrin	µg/L	0,2	Zinco	mg/L	5

Fonte: Portaria nº 36 do Ministério da Saúde, 1990.

De acordo com Toledo (2004), até 2025, as indústrias serão responsáveis por 24% do consumo mundial de água. Diariamente as indústrias despejam dois bilhões de toneladas de lixo em rios, lagos e riachos, assim como, 300 a 500 milhões de toneladas de metais pesados e outros dejetos. Estima-se que em 2025, haverá um aumento de 50% no consumo de água nos países em desenvolvimento e de 18% nos países desenvolvidos.

Visando reduzir o impacto ambiental, medidas urgentes precisam ser tomadas em relação ao consumo de água através de adoção de tecnologias que permitem a redução do consumo ou a reutilização da água. Em algumas empresas européias por meio de tratamento é possível reciclar 100% do efluente, trabalhando com a moderna concepção de “geração zero” ou “o princípio zero de descarga” (ULSON et al., 2007).

Diante dos desafios encontrados pelas indústrias, é preciso desenvolver novas tecnologias de tratamentos de resíduos não agressivos ao meio ambiente, para que estes resíduos sejam descartados de maneira adequada e não causem danos para os seres vivos. A água é um bem precioso, mas é um bem finito, por isso deve ser preservada e racionada, para que não venha faltar em um futuro próximo.

3.2. Indústria têxtil

O Brasil é um dos maiores parques industriais do planeta e está na lista dos 10 principais mercados mundiais da indústria. Atualmente, é o terceiro principal produtor de malha, está entre os cinco principais países produtores de confecção, tem a sexta maior indústria têxtil e de confecção do mundo, e é um dos oito grandes mercados de fios, filamentos e tecidos.

Há alguns anos, o Brasil investe na renovação do seu parque industrial, aumentando a sua capacidade competitiva em relação aos mercados externos e a sua produtividade. Atualmente, o país participa do comércio mundial de têxteis com uma fatia de 1% - US\$ 1,3 bilhões. Além disso, o Brasil tem uma imagem positiva no que se refere à produção e ao beneficiamento de algodão, tendo iniciado pesquisas para beneficiamento de algodão orgânico, o que tem favorecido a indústria têxtil nacional frente a seus concorrentes (POLTEX, 2012).

Em Santa Catarina o complexo têxtil está localizado em sua maior parte no vale do Itajaí compreendendo os municípios de Blumenau, Brusque e nos municípios mais ao norte e noroeste do estado Joinville e Jaraguá do Sul. Segundo dados do Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatísticas (IBGE, 2010), o setor têxtil é o terceiro em participação na economia industrial de Santa Catarina correspondendo a 11,65% ficando atrás apenas do setor de alimentos (24,22%) e do setor de máquinas e equipamentos (13,56%).

Em virtude do grande volume de produção, a indústria têxtil gera grandes quantidades de efluentes. A forte coloração é o mais sério problema do efluente têxtil. Em geral, esses efluentes são caracterizados por altos valores de Demanda química de oxigênio (DQO) e de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), cor e pH. Quando descarregados em corpos d'água esses efluentes podem causar sérios danos ambientais (BALAMURUGAN; THRUMARIMURUGAN; KANNADASSAN, 2011).

Atualmente, muitas indústrias produzem alternativas sustentáveis, através da reutilização de materiais, ou alguma inovação que agregue valor ao produto e diminua a geração de resíduos como, tecidos de fibra de bambu com funções bactericidas e desodorantes, fibras de PET reciclado, tecido biodegradável. Outra alternativa muito utilizada em algumas indústrias é a reutilização de água como uma forma de reduzir custos e evitar a geração de grandes quantidades de efluentes.

3.2.1. Consumo de água na indústria têxtil

A indústria têxtil é um dos setores industriais que mais consome água limpa, em especial o setor de beneficiamento têxtil que é composto de várias etapas como: tingimento, estamparia e acabamento. Segundo Costa e Martins (1997) em algumas indústrias ainda se utiliza grandes relações de banho como é o caso das “barcas” com relação 1:20 ou 1 kg de malha para 20 litros de água, enquanto indústrias mais modernas utilizam relação de banho de 1:7. A água tratada também é utilizada para a preparação de soluções, para lavagens pós-tingimento, para lavações de tela de estamparia, para processos de resfriamento e para lavagem de máquina entre uma reação e outra.

Para utilizar água nos processos têxteis existem limites de tolerâncias para compostos presentes na água que as indústrias precisam seguir, porém, de acordo com (FIESP/CIESP, 2012) os valores variam conforme o processo. A Tabela 2 mostra os limites de tolerância para utilização de água nos processos têxteis. A Tabela 3 mostra os valores de corantes não fixados à fibra e a quantidade de água necessária para remover estes corantes.

Tabela 2 - Limites de tolerância para utilização de água em processos têxteis.

Processo	Cor (uH)	CaCO ₃ (mg/L)	Ferro (mg/L)	Manganês (mg/L)	pH	Sólidos suspensos (mg/L)
Engomagem	5	25	0,3	0,05	6,5-10	5
Lavagem	5	25	0,1	0,01	3,0-10,5	5
Branqueamento	5	25	0,1	0,01	2,0-10,5	5
Tingimento	5	25	0,1	0,01	3,5-10	5

Fonte: FIESP/CIESP, 2012.

Tabela 3 - Concentração de corante não fixado, descarregado e volume de água requerido em função da classe de corante.

Corantes	Corante não-fixado (%)	Descarga após tratamento (g kg ⁻¹) ^a	Volume de água requerida ^b (m ³ kg ⁻¹ corante)
Dispersos	5	10	7
Ácidos	5	5	3,5
Catiônicos	2	5	0,7
Reativos	30	300	200

a: g de corante descarregado por kg de corante usado

b: calculado para atingir nível aceitável no efluente

Fonte: SOARES, 2000.

A diminuição no consumo de água em seus vários processamentos tem sido uma das metas da indústria têxtil, nos últimos anos. Na área de beneficiamento e/ou tinturaria, os esforços têm sido mais intensos, haja vista que representam cerca de 90% do consumo geral da indústria. Através de modificações nos processos de beneficiamento e da substituição de equipamentos antigos, é possível obter-se uma redução significativa no consumo de água. Há empresas que produzem tecidos de algodão, cujos processos de mercerização, tingimento e estamparia são realizados com um consumo médio de 60 m³ de água/t e uma economia significativa na utilização de aditivos têxteis, no consumo de energia elétrica, no tratamento de água e efluentes (COMPANHIA PERNANBUCANA DO MEIO AMBIENTE, 2001).

Segundo Peters (2009), várias empresas ao redor do mundo estão desenvolvendo novas tecnologias para evitar o consumo exagerado de água, economizar dinheiro, energia e obedecer às leis ambientais que se tornam cada vez mais rigorosas. Uma das empresas que trabalha para reduzir seu consumo é a Colorep situada na Califórnia. Sua tecnologia

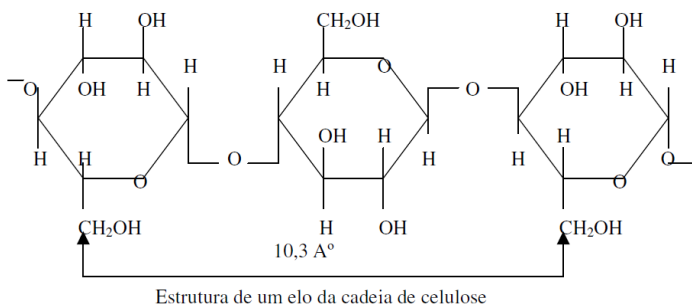
Airdry emprega ar em vez de água para ajudar o corante a penetrar a fibra, um processo que não usa água e que requer menos energia. A tecnologia só funciona em materiais sintéticos e vem sendo desenvolvida nos Estados Unidos.

3.2.2. Fibras Têxteis

Segundo Guaratinini e Zanoni (2000) as fibras têxteis podem ser divididas em dois grandes grupos: fibras naturais e fibras sintéticas. As fibras naturais mais utilizadas são baseadas em celulose (cadeias poliméricas lineares de glucose) e proteína (polímero complexo composto de diferentes aminoácidos) presentes na lã, seda, algodão e linho. As fibras sintéticas são comercializadas como viscose, acetato de celulose, poliéster e acrílico.

As fibras naturais são compostas essencialmente de celulose, um polímero de alta massa molecular em que as partes cristalinas são fortemente ligadas por ligação de hidrogênio e na parte amorfa existe uma orientação progressivamente desorientada na molécula (TIMOFEI et al., 2000). A Figura 1 apresenta a estrutura da molécula de celulose.

Figura 1 - Estrutura da cadeia celulósica.



Fonte: TWARDOKUS, 2004.

A composição química da fibra determina qual corante deve ser aplicado. A orientação da molécula e a cristalinidade também influenciam a adsorção do corante na fibra, porém, esta não pode ser prevista (TIMOFEI et al., 2000).

3.2.2.1. Algodão

O algodão é uma das fibras mais utilizadas na indústria têxtil, principalmente por sua versatilidade, por suas propriedades químicas e tintoriais. Apesar de macias, as fibras de algodão apresentam resistência à tração, e a uma variedade de produtos químicos, podendo ser tingidos com uma gama de corantes (PICCOLI, 2008).

O algodão é composto quase que inteiramente por celulose, porém contém outras substâncias em menor quantidade que podem influenciar nos processos de beneficiamento têxtil. Na Tabela 4 é apresentada a composição da fibra de algodão.

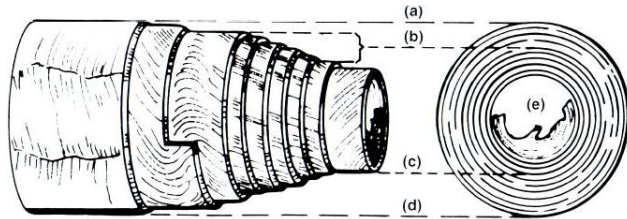
Tabela 4 - Composição química da fibra de algodão.

Constituição	Proporção (%)
Celulose	88-96
Proteína	1-1,9
Cinzas	0,7-1,6
Pectina	0,4-1,2
Cera	0,4-1,2
Outras substâncias	0,5-0,8

Fonte: HEBEISH et al., 2009.

A estrutura molecular do algodão é do tipo fibrilar. Este possui um alto grau de polimerização. O grupo hidroxila da cadeia é responsável por muitas das propriedades associadas ao algodão. Eles atraem água e corantes, fazendo com que o algodão seja reconhecidamente fácil de ser tinto e de alta absorção. O algodão possui em torno de 70% de cadeias cristalinas e 30% de regiões amorfas. Apesar do seu alto grau de cristalinidade, a orientação é baixa e forma ângulo com a fibra. A Figura 2 apresenta uma representação esquemática do corte da estrutura celular da fibra de algodão, onde: (a) São camadas de celulose externa conhecida como cutícula; (b) São as camadas centrais de celulose; (c) São as camadas internas conhecidas como lúmen; (d) São as camadas de cera; (e) São resíduos protoplasmáticos (PICCOLI, 2008).

Figura 2 - Estrutura celular do corte da fibra de algodão



Fonte: COLLIER; TORTORA, 2001.

3.2.3. Corantes

Corantes têxteis são largamente utilizados nas indústrias principalmente devido sua variedade de cor, solidez à lavagem, facilidade de aplicação e consumo mínimo de energia (CHEN et al., 2011).

O Colour Index (catálogo da Society of Dyers and Colourists) registra atualmente mais de 8 mil corantes orgânicos sintéticos associados à indústria têxtil. Tal diversidade se justifica pelo sucesso comercial dos produtos têxteis que passam por um processo de tintura. Para atender a um mercado cada vez mais exigente, a indústria tem investido no desenvolvimento de corantes econômicos, com propriedades específicas, para obter boa fixação da coloração nos tecidos, oferecendo alta resistência aos agentes desencadeadores do desbotamento (ZANONI; CARNEIRO, 2001).

A molécula do corante utilizada para tingimento da fibra têxtil pode ser dividida em duas partes principais, o grupo cromóforo e a estrutura responsável pela fixação à fibra. Existem atualmente várias classes de corantes classificados segundo sua estrutura química e fixação, como por exemplo, corante ácido, direto, básico, de enxofre e reativos, sendo este último o mais utilizado em nível mundial (KUNZ et al.; 2002).

3.2.3.1. Classificação dos corantes

Os corantes são classificados por sua estrutura química ou pelo modo que se ligam a fibra. Os principais grupos de corantes são: corantes à cuba, reativos, diretos, azóicos, ácidos, dispersos, pré-

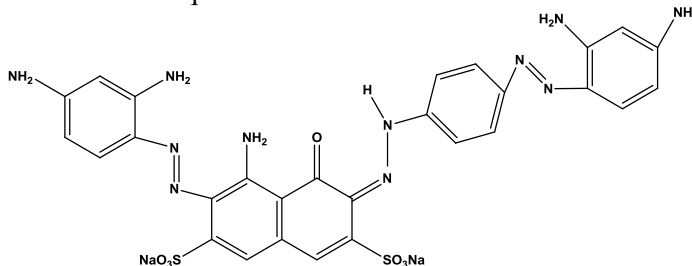
metalizados, sulfurosos e branqueadores (GUARANTINI; ZANONI, 2000).

Para tingir fibras celulósicas, os corantes mais utilizados são: corantes à cuba, diretos, sulfurosos, azóicos, reativos e naturais. Entretanto, segundo Piccoli (2008) os mais relevantes em termos de volume de aplicação, atualmente, são os corantes diretos, de enxofre e reativos.

3.2.3.1.1. Corantes diretos

Corantes diretos têm alta massa molecular, são solúveis em água, são corantes aniônicos com substantividade para o algodão e outras fibras celulósicas. O tingimento com corante direto é um processo de exaustão a partir de uma solução neutra à temperatura de ebulição com a adição de um sal inorgânico (CAVACO; GUBITS, 2003). Na Figura 3 é apresentada a estrutura química do corante direto C.I. Preto direto 19.

Figura 3 - Estrutura química do corante direto C.I. Preto direto 19.

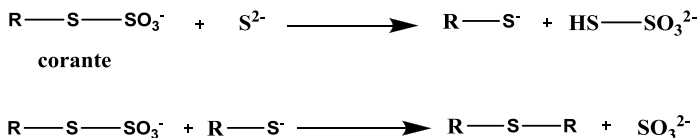


Fonte: BURKINSHAW; KUMAR, 2010.

3.2.3.1.2. Corantes Sulfurosos

São corantes que após a aplicação se caracterizam por compostos macromoleculares com pontes de polissulfetos (-Sn-) os quais são altamente solúveis em água. Estes compostos têm sido utilizados no tingimento de fibras celulósicas, conferindo as cores: preto, verde oliva e azul marinho (ALMEIDA, 2006). A Figura 4 mostra o exemplo genérico de uma reação de corantes contendo grupo tiosulfato com íon sulfeto e subsequente formação dos corantes com pontes de dissulfeto.

Figura 4- Representação das equações de corantes contendo grupo tiosulfato com íon sulfeto e subsequente formação dos corantes com pontes de dissulfeto.

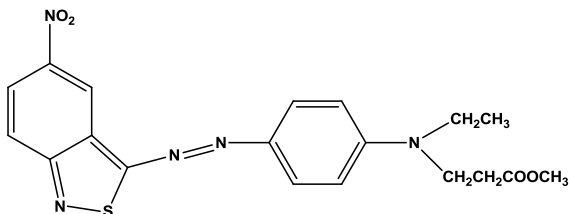


Fonte: GUARATININI; ZANONI, 2000.

3.2.3.1.3. Corantes dispersos

Os corantes dispersos constituem uma classe de corantes de baixa solubilidade ou insolúveis em água e são aplicados em fibras hidrofóbicas como as fibras sintéticas através de dispersões dos mesmos em banho aquoso. Durante o processo de tingimento o corante adsorve sobre o substrato têxtil e difunde para o interior do mesmo na temperatura acima da TG (temperatura de transição vítrea). Para sua aplicação são necessários agentes dispersantes (SCHMITT, 2010). A Figura 5 apresenta a estrutura química do corante disperso Vermelho disperso 343.

Figura 5 - Estrutura química do corante disperso C.I. Vermelho disperso 343.



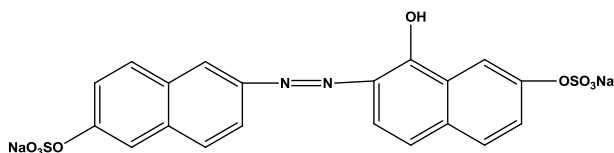
Fonte: SCHMITT, 2010.

3.2.3.1.4. Corantes ácidos

São um grande grupo de corantes aniônicos portadores de um a três grupos sulfônicos. Estes grupos substituintes ionizáveis tornam o corante solúvel em água, e têm vital importância no método de aplicação do corante em fibras protéicas (lã, seda) e em fibras de poliamida

sintética. No processo de tintura, o corante previamente neutralizado (solução contendo cloreto, acetato, hidrogenossulfato, etc.) se liga à fibra através de uma troca iônica envolvendo o par de elétrons livres dos grupos amino e carboxilato das fibras protéicas, na forma não-protonada. Estes corantes caracterizam-se por substâncias com estrutura química baseada em compostos azo, antraquinona, triarilmetano, azina, xanteno, ketonimina, nitro e nitroso, que fornecem uma ampla faixa de coloração e grau de fixação (GUARATINI; ZANONI, 2000). A Figura 6 apresenta a estrutura química do corante ácido C.I. vermelho ácido 88.

Figura 6 - Estrutura química do corante ácido C.I. vermelho ácido 88.

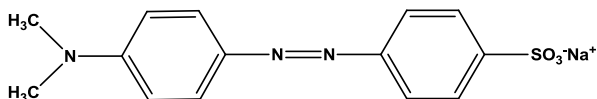


Fonte: KHEHRA et al., 2006.

3.2.3.1.5. Corantes azoicos

São compostos coloridos, insolúveis em água, que são realmente sintetizados sobre a fibra durante o processo de tingimento. Nesse processo a fibra é impregnada com um composto solúvel em água, conhecido como agente de acoplamento (e.g. naftol) que apresenta alta afinidade por celulose. A adição de um sal de diazônio (RN_2^+) provoca uma reação com o agente de acoplamento já fixado na fibra e produz um corante insolúvel em água (GUARATINI; ZANONI, 2000). A Figura 7 apresenta a estrutura química do corante laranja de metila.

Figura 7 - Estrutura química do corante azoico laranja de metila.



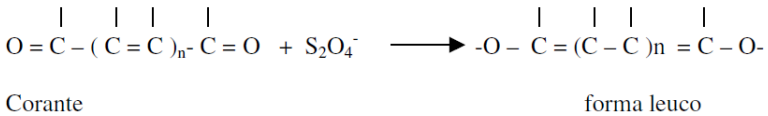
Fonte: LEVIN et al., 2012.

3.2.3.1.6. Corantes à cuba

É uma grande e importante classe de corantes baseada nos índigos, tioindigóides e antraquinóides. Eles são aplicados praticamente insolúveis em água, porém durante o processo de tintura eles são reduzidos com ditionito de sódio, em solução alcalina, transformando-se em um composto solúvel (forma leuco).

Posteriormente, a subsequente oxidação pelo ar, peróxido de hidrogênio, etc., regenera a forma original do corante sobre a fibra (GUARATINI; ZANONI, 2000). A Figura 8 apresenta exemplo do processo de redução do corante à cuba com ditionito de sódio.

Figura 8 - Processo de redução do corante à cuba com ditionito de sódio.



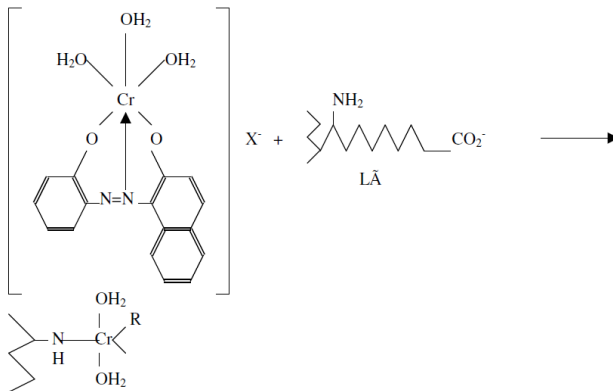
Fonte: GUARATININI; ZANONI, 2000.

3.2.3.1.7. Corantes pré-metalizados

São úteis principalmente para tintura de fibras protéicas e poliamida. Os corantes são caracterizados pela presença de um grupo hidroxila ou carboxila na posição orto em relação ao cromóforo azo, permitindo a formação de complexos com íons metálicos.

Neste tipo de tintura explora-se a capacidade de interação entre o metal e os agrupamentos funcionais portadores de pares de elétrons livres, como aqueles presentes nas fibras protéicas (GUARATINI; ZANONI, 2000). A Figura 9 apresenta o exemplo de tintura da lã com o corante pré-metalizado (VII) cromo/corante 1:1 através do grupo amino como ligante e o centro metálico do corante.

Figura 9 - Representação esquemática da tintura da lã com o corante pré-metalizado.

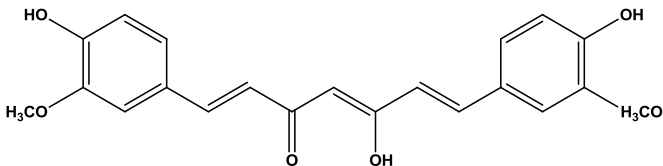


Fonte: GUARATINI; ZANONI, 2000.

3.2.3.1.8. Corantes naturais

São corantes extraídos de plantas, sementes, frutas, cascas, entre outros. A maior parte dos corantes naturais tem pouca ou moderada solidez à luz. Praticamente a metade de todos os corantes naturais são compostos flavonoídicos que conferem menor solidez à luz. Essa classe de corantes são biodegradáveis e produzidos por processos limpos, porém não são tão utilizados quanto os corantes sintéticos principalmente por possuir baixa estabilidade (DIAS, 2010). A Figura 10 apresenta a estrutura do corante natural cúrcuma.

Figura 10 - Estrutura química da forma neutra do corante natural de cúrcuma.



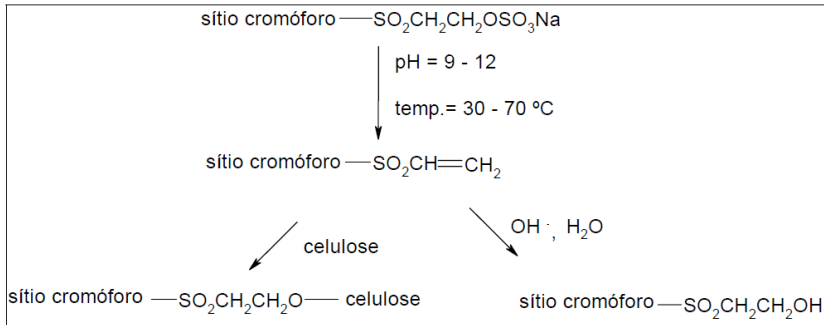
Fonte: PATRA; BARAKAT, 2011.

3.2.3.1.9. Corantes reativos

Neste trabalho será utilizado o grupo de corante sintético mais utilizado nas indústrias têxteis atualmente, os corantes reativos. Corantes reativos sempre ocuparam um lugar de destaque na indústria têxtil, principalmente por sua alta solidez e amplo espectro de cores. Nos últimos anos o consumo desse grupo de corante tem aumentado 4 a 5 vezes mais do que outros grupos de corante. Contudo, a hidrólise que ocorre durante o tingimento decresce a eficiência da adsorção do corante à fibra (AKCAKOCA; OZGUNEY; ATAV, 2007).

Segundo Guaratinini e Zanoni (2000) corantes reativos são corantes que contêm um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas como, grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas. Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais contêm a função azo e antraquinona como grupos cromóforos e os grupos clorotriazinila e sulfatoetilsulfonila como grupos reativos. Neste tipo de corante, a reação química se processa diretamente através da substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose. Estes grupos de corantes apresentam como característica uma alta solubilidade em água e o estabelecimento de ligação covalente entre o corante e a fibra, cuja ligação confere maior estabilidade na cor do tecido tingido quando comparado a outros tipos de corantes, em que o processo de coloração acontece através de ligações de maior intensidade. Um exemplo é aquele do tingimento usando compostos contendo sulfatoetilsulfona, cuja adição do corante à fibra requer apenas a prévia eliminação do grupo sulfato em meio alcalino gerando o composto vinilsulfona. A Figura 11 apresenta uma representação esquemática da interação de corante reativo do tipo vinil sulfonato com a fibra celulósica.

Figura 11 - Representação esquemática da interação do corante reativo do tipo vinil sulfonato com a fibra celulósica.



Fonte: KUNZ et al., 2002.

Segundo Piccoli (2008), nos tingimentos com corantes reativos, devem-se estabelecer condições que maximizem o rendimento da reação com a fibra e minimizem a reação com a água. O corante que reage com a água é chamado corante hidrolisado e deverá ser removido por lavagem e ensaboamento posterior. A velocidade destas reações é função da concentração de álcali (pH) e da temperatura do tingimento. Variando estes parâmetros, altera-se a velocidade de reação e o rendimento do corante (grau de fixação). Para cada gama de corantes devem-se estabelecer as condições ideais de pH e temperatura com objetivo de alcançar maiores graus de fixação.

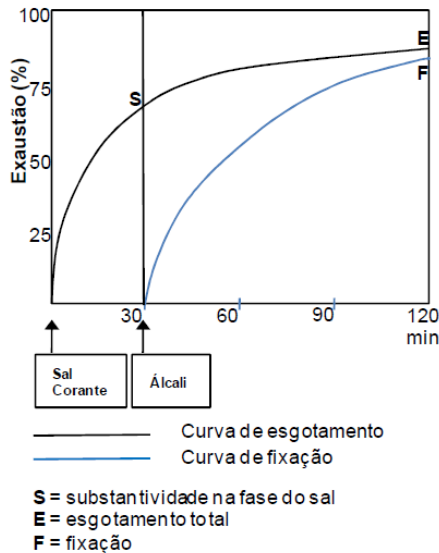
O processo de tingimento com corantes reativos pode ser dividido em duas fases:

- fase do sal (eletrólito);
- fase do álcali.

Mediante a adição do eletrólito, o corante se desloca para a fibra na qual ocorrerão dois fenômenos: a adsorção e a difusão. Na Figura 12, o segmento da curva superior até **S** representa a substantividade na fase do sal, ou seja, a montagem do corante devido à presença de sal. Após a montagem do corante na fase do sal, se for prolongado o processo na temperatura de tingimento antes da adição do álcali, ocorrerá o fenômeno de migração. Esta depende, essencialmente, da temperatura do tingimento e da estrutura molecular do corante. Ao adicionar-se o álcali, ocorrerão dois novos fenômenos: o esgotamento inicial e a fixação. No início, o álcali funciona como um eletrólito, provocando um

esgotamento adicional do corante. Este esgotamento varia em função do corante. Os corantes monoclorotriazina e os tricloropirimidina têm baixo esgotamento adicional, enquanto que os vinilsulfônicos têm em geral alto esgotamento adicional. Na curva de montagem da Figura 12, o segmento S até E corresponde ao esgotamento adicional e a curva completa corresponde ao esgotamento total. A fixação é a fase na qual ocorre a reação corante + fibra. A curva inferior da Figura 12 é a curva de fixação (PICCOLI, 2008).

Figura 12 - Curvas de esgotamento e fixação.



Fonte: PICCOLI, 2008.

Corantes não fixados à fibra são grande parte do efluente produzido pelas indústrias têxteis. Quando descartados no meio ambiente esses efluentes podem causar sérios danos ambientais, visto que prejudicam a fotossíntese de plantas aquáticas, através da redução da penetração de luz. Segundo Khlifi et al. (2010) altas concentrações dos mesmos corantes pode resultar em doenças transmitidas pela água e aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) das águas receptoras. No mundo todo cerca 10 a 15% do total de corantes utilizados em vários processos têxteis e em outras indústrias são descarregados em águas residuais causando poluição.

3.2.4. Processos têxteis

Segundo Urban et al. (1995) o processo produtivo de têxteis de algodão no caso brasileiro está dividido basicamente em quatro grandes setores: fiação, tecelagem, beneficiamento e confecção.

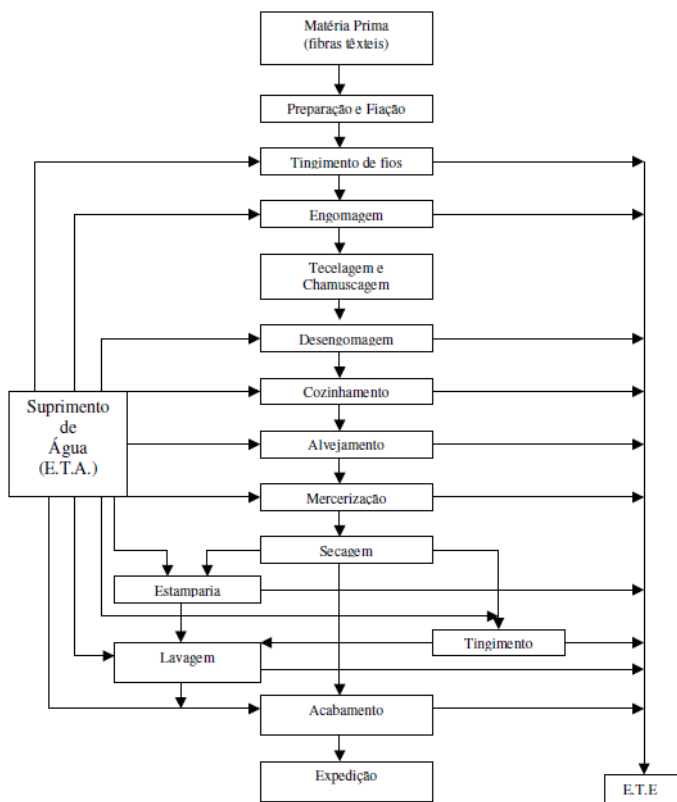
A fiação pode ser caracterizada por dois processos, os filatórios convencionais a anel e os *open-end* com rotores. Nos convencionais, as maçaroqueiras estiram as mechas e realizam uma pequena torção para em seguida realizar nova torção, formando o fio, que é enrolado em cones. Nos sistemas *open-end* eliminam-se várias etapas com máquinas, que numa só operação promovem a limpeza, estiramento, torção e monitoramento, fornecendo o fio enrolado em cones para a etapa seguinte.

A etapa seguinte corresponde à tecelagem para a produção de tecidos diversos em função das distintas aplicações finais. Trata-se do processo em que os fios são entrelaçados para formarem os tecidos, que podem ser feitos somente com fibras de algodão, com outras fibras ou com a mistura de fibras. Cada tipo de tecido determina um processo de tecelagem orientado para essa especificidade. A produção de tecido para malharia se mostra mais simples que a de tecidos planos, uma vez que o tear circular realiza quase todo o processo.

3.2.4.1. Beneficiamento têxtil

O beneficiamento têxtil consiste em um conjunto de processos aplicados aos materiais têxteis objetivando transformá-los, a partir dos estados crus, em artigos brancos, tingidos, estampados e acabados (FORGIARINI, 2006). A Figura 13 apresenta um fluxograma representando as etapas de beneficiamento têxtil.

Figura 13 - Fluxograma representando etapas do processamento têxtil do algodão.



Fonte: FREITAS, 2002.

3.2.4.1.1. Engomagem

Este processo tem como característica a aplicação de uma goma sobre os fios de urdume com o objetivo de aumentar a sua resistência mecânica, de forma a resistirem os esforços nos teares durante o processo de tecelagem. Em sua maioria são utilizados dois tipos de goma: goma de fécula de mandioca e gomas sintéticas, a base de poli-acrilato, carboximetilcelulose e álcool polivinílico (PVA). As gomas naturais produzem um efluente biodegradável e são por este motivo preferidas às sintéticas (TWARDOKUS, 2004).

3.2.4.1.2. Desengomagem

Segundo Karmakar (1999) desengomagem é um processo pelo qual a goma da etapa de engomagem dos fios de urdume é removida para facilitar a penetração de corantes e produtos químicos. Cerca de 75% dos agentes de colagem utilizados no fio consistem em amido e seus derivados.

Atualmente, um dos métodos mais utilizados industrialmente para remover a goma é a impregnação do tecido com uma solução de enzima amilase, cuja principal vantagem é não danificar a celulose.

3.2.4.1.3. Purga

A purga tem como objetivo remover impurezas não-celulósicas, tais como, cera, gorduras, pectina, entre outros. Industrialmente, a purga pode ser realizada de forma convencional com agentes alcalinos como soda cáustica, em presença de agentes tensoativos e agentes sequestrantes e de forma enzimática denominada purga enzimática, que tem como principal vantagem deixar o tecido mais branco e diminuir a perda de massa do mesmo.

3.2.4.1.4. Pré-alveamento

É um processo em meio aquoso alcalino que consiste em um tratamento oxidativo, no qual a cor natural da fibra é eliminada pela ação oxidante de agentes específicos. Este processo também confere ao material têxtil o melhoramento da hidrofiliabilidade, que é muito importante para as etapas subsequentes na cadeia têxtil (TWARDOKUS, 2004).

3.2.4.1.5. Alveamento

O alveamento tem como principal objetivo remover a cor parda do tecido e torná-lo mais branco. Esta etapa é o que garante tingimentos mais uniformes e cores mais vivas e brilhantes. Entre os agentes de alveamento convencionais mais utilizados estão o peróxido de hidrogênio e o hipoclorito de sódio. Atualmente, muitas indústrias utilizam alveamento enzimático, com enzimas como lacase e catalase.

3.2.4.1.6. Mercerização

Na etapa de mercerização o tecido é submetido a uma solução de soda cáustica a frio, com objetivo de adquirir brilho, toque mais macio e torná-lo mais encorpado e resistente. O processo pode ser feito utilizando hidróxido de sódio ou potássio, porém é mais efetivo quando utiliza-se hidróxido de sódio.

3.2.4.1.7. Estamparia

A estamparia é a etapa do beneficiamento têxtil que tem por finalidade imprimir desenhos coloridos nos tecidos. Os tecidos são muitas vezes estampados com cores e estampas usando uma variedade de técnicas e tipos de equipamentos. O processo de estamparia pode ser o toque final para os produtos já confeccionados, que receberão estampas por quadros, ou seja, a estampagem é feita em algum ponto de sua extensão física (TWARDOKUS, 2004).

3.2.4.1.8. Tingimento

Segundo Silva (2006) existem dois processos de tingimento: processos descontínuos ou por esgotamento; processos contínuos por fulardagem.

Nos processos descontínuos, o movimento do corante em direção ao interior das fibras é provocado pela substantividade do corante. Podem-se distinguir as seguintes etapas: desagregação dos agregados do corante no banho; difusão no banho; absorção superficial na fibra; difusão na fibra; fixação. Para que se processem estas etapas é necessária a agitação mecânica, temperatura adequada e produtos auxiliares adequados ao sistema corante/fibra.

Nos processos contínuos (e semi-contínuos) utiliza-se uma máquina designada por “foulard”. O corante, neste processo, não poderá ser muito substantivo (ter afinidade) para com a fibra, devido ao risco da sua diminuição de concentração no banho, pois à medida que o tecido é espremido, e progressivamente menos corante é transferido para a fibra, como consequência da tonalidade do material se tornar cada vez mais clara. Nesta operação ocorrem as seguintes etapas: impregnação das fibras com o banho de tingimento; uniformização do banho nas fibras; tratamentos posteriores adequados que envolvem a difusão do corante no interior da fibra; e a sua posterior fixação.

3.2.4.2. Aditivos químicos utilizados na indústria têxtil

Segundo Menezes (2005) a produção de tensoativos sintéticos cresceu até se tornar um dos maiores setores de atividade na indústria química. Uma gama imensa de produtos encontram-se disponíveis à venda por um grande número de fabricantes e distribuidores. Por isso, a maioria dos tensoativos sintéticos alcança a condição de "commodities" e poucos deles podem ser classificados como especialidades.

Os tensoativos se concentram nas superfícies e interfaces de líquidos ou sólidos, onde influenciam em propriedades tais como detergência e umectação. Todos exibem uma combinação de limpeza, emulsificação, solubilização e propriedades dispersantes. As propriedades funcionais explicam a razão dos tensoativos serem de tanto interesse nos processos têxteis.

A umectação permite abrir as estruturas compactas dos substratos têxteis para permitir a remoção dos contaminantes ou a penetração dos corantes e agentes de acabamento. A detergência remove, suspende e emulsiona os contaminantes, porém, esta funcionalidade pode ser usada para manter os corantes em suspensão, retardar sua exaustão ou assistir na obtenção de tingimentos igualizados. A Tabela 5 apresenta os principais aditivos utilizados na indústria têxtil e a função de cada um destes nos processos têxteis.

Tabela 5 - Principais aditivos usados nos processos têxteis.

Descrição	Composição	Função
Sais	Cloreto de sódio Sulfato de sódio	Retardantes
Ácidos	Acético e sulfúrico	Controle de pH
Bases	Hidróxido de sódio Carbonato de sódio*	Controle de pH
Sequestrantes	EDTA	Sequestrantes
Dispersantes e Surfactantes	Aniônico, catiônicos e não-iônicos	Amaciantes, dispersantes de corantes
Agentes oxidantes	Peróxido de hidrogênio Nitrito de sódio	Insolubilizante de corantes
Agentes redutores	Hidrossulfito de sódio Sulfeto de sódio	Remoção de corantes não fixados, solubilizante
“Carries”	Organoclorados	Aumenta a absorção

*O Carbonato de sódio (barrilha) é um sal básico, possui características de bases, mas é classificado pela função inorgânica sal.

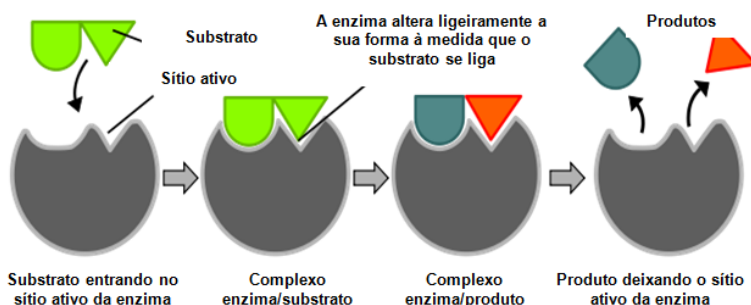
Fonte: FREITAS, 2002.

3.3. Enzimas

Enzimas são conjuntos de proteínas que catalisam a química da vida. As transformações químicas que ocorrem nos sistemas vivos são promovidas por centenas de milhares de enzimas que atuam catalisando a conversão de um conjunto de substratos em produtos específicos. Utilizando um sistema altamente eficiente para conversão de energia, os sistemas biológicos são ricos em catalisadores que atuam como agentes químicos ambientalmente amigáveis, com um máximo de economia de carbonos e gerando poucos resíduos (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).

A efetividade de uma enzima como catalisador é denominado de atividade enzimática. A atividade está relacionada com o formato tridimensional da proteína, particularmente do seu sítio ativo o qual é responsável pela catálise. Em geral, o sítio ativo é a parte da proteína onde o substrato se liga inicialmente para posterior formação do produto. A especificidade da enzima depende em grande parte da estrutura da região do sítio ativo. Uma explicação do papel do sítio ativo é o modelo “chave e fechadura”. Nesse modelo, o encaixe estereoquímico preciso do substrato no sítio ativo é responsável pela especificidade da catálise. A Figura 14 mostra de forma esquemática o mecanismo geral de catálise enzimática (NELSON; COX, 2000; WHITE; PHILIP; EMIL, 1976).

Figura 14 - Mecanismo geral de catálise enzimática.



Fonte: <http://serbioefundamental.wordpress.com/>

O mecanismo de atividade enzimática pode ser explicado pelo modelo de Michaelis-Menten. Em 1913, Leonor Michaelis e Maud

Menten propuseram que a enzima (**E**) inicialmente combina-se reversivelmente com substrato (**S**), para formar o complexo enzima-substrato (**ES**), em uma etapa reversível relativamente rápida. A seguir em uma etapa lenta, o complexo (**ES**) se rompe com a regeneração da enzima livre e formação do produto (**P**). A segunda etapa é a determinante da velocidade da reação. A Figura 15 representa de forma esquemática a reação de catálise enzimática mostrando a combinação da enzima e do substrato, o intermediário da reação, à formação do produto, e a enzima sendo regenerada após a catálise (NELSON; COX, 2000).

Figura 15- Representação de forma esquemática do mecanismo de catálise enzimática.



Todas as enzimas conhecidas são proteínas, elas são constituídas de uma ou mais cadeias polipeptídicas e são influenciadas por propriedades como concentração de sal, temperatura e pH. A velocidade de catálise das enzimas pode ser explicada pela influência da estrutura da proteína (CAVACO; GUBITS, 2003).

As enzimas diferem dos catalisadores químicos em vários aspectos importantes:

- Aumentam a velocidade das reações em 10^{10} a 10^{23} vezes em relação a não catalisada (OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009).
- Catalisam reações sob condições relativamente suaves, temperaturas, tais como inferiores a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, à pressão atmosférica e pH próximo de neutro. Inversamente, as altas temperaturas e pressões e extremos de pH são frequentemente necessárias na catálise química (CAVACO; GUBITS, 2003).
- Tem especificidade de reação muito maior do que as catalisadas quimicamente, e raramente formam subprodutos (CAVACO; GUBITS, 2003).

3.3.1. Fatores que influenciam na atividade enzimática

De acordo com Cavaco e Gubits (2003) existem muitos fatores pelo qual as enzimas podem ser irreversivelmente inativadas. A seguir são enumerados os fatores que mais influenciam na atividade enzimática.

3.3.1.1. Temperatura

Na maioria das reações catalisadas por enzimas a velocidade de reação aumenta com o aumento da temperatura dentro de uma faixa de temperatura em que a enzima é estável e mantém sua atividade. A velocidade da reação enzimática praticamente dobra a cada aumento de 10 °C na temperatura, porém isso varia conforme a reação e é dependente da energia de ativação. Cada enzima tem uma temperatura ótima de reação, acima dessa temperatura a enzima sofre desnaturação e perde atividade. A temperatura ótima também depende das condições de reação como tempo de incubação e o tipo de substrato.

3.3.1.2. pH

Toda enzima tem um pH característico no qual sua atividade é máxima. Com a mudança do pH as interações eletrostáticas dentro da enzima se alteram com a possibilidade de alterar a conformação tridimensional e assim sua atividade. Quando o substrato se liga a enzima, esse também é influenciado pelas interações eletrostáticas. A maioria das enzimas tem um intervalo de tolerância determinado de pH, muitas vezes maior do que uma unidade de pH, em que sua atividade é de 80 a 100% do seu máximo. Dentro desse intervalo, o pH pode mudar sem consequências importantes para sua atividade.

3.3.1.3. Surfactante

Quando se trata de substratos insolúveis em água, como é frequentemente o caso da indústria têxtil, surfactantes são utilizados para melhorar a interação enzima-substrato. Existem quatro classes principais de agentes tensoativos: aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos e não-iônicos, todos contendo uma cauda apolar ou uma parte no meio apolar. Todos os tensoativos carregados podem interagir com as cadeias laterais de aminoácidos carregados na superfície da proteína.

Na interação eletrostática entre surfactante e enzima, um processo pode ser iniciado, em que a parte apolar do surfactante penetra no interior da proteína, a fim de realizar interações hidrofóbicas e tais interações pode alterar a conformação da proteína irreversivelmente. A compatibilidade da enzima com o surfactante deve ser verificada antes da reação, em geral, os tensoativos não-iônicos são muito compatíveis com enzimas, enquanto tensoativos aniônicos possuem pouca compatibilidade.

3.3.1.4. Agente redutor

Ao realizar um processo com uma enzima que contém ligações dissulfeto, a presença de um agente redutor deve ser evitada. Agentes redutores são muito utilizados nos processos têxteis, porém quando um agente redutor está presente, os grupos SH de resíduos de cisteína são regenerados, quebrando a ligação dissulfeto. Após a quebra desta ligação dissulfeto, a estrutura tridimensional não é mais mantida pela ligação covalente. Com o desdobração da proteína, pode ocorrer a inativação da enzima. Em tal situação, uma alternativa é usar enzima sem ligação dissulfeto.

3.3.1.5. Agente oxidante

Vários resíduos de aminoácidos são sensíveis à oxidação na presença de um agente de branqueamento. Em primeiro lugar, há enxofre contendo resíduos de cisteína e de metionina. Em segundo lugar, os resíduos aromáticos triptofano, tirosina e histidina também são sensíveis à oxidação, embora a um nível muito menor.

Numa proteína, esses resíduos são oxidados, quando eles são acessíveis ao agente de branqueamento: na superfície ou no sítio ativo. A oxidação de um destes resíduos no sítio ativo pode impedir a ligação do substrato específico e reduzir a atividade enzimática a zero, embora o sítio ativo e a estrutura tridimensional da enzima esteja ainda intacta. A oxidação de um resíduo na superfície do aminoácido podem conduzir a alteração conformacional, com a inativação da enzima, como o resultado final.

3.3.1.6. Precipitação

A solubilidade da enzima em água depende do pH do tampão utilizado. A carga elétrica global da proteína a um pH determinado depende da composição dos aminoácidos na sua superfície. O pH no qual uma proteína é menos solúvel, e irá precipitar mais facilmente, é o seu ponto isoeletrico, definido como o pH ao qual a molécula não tem carga elétrica. Neste pH, e no intervalo aproximado, a solubilidade da proteína é mínima. Fora desta gama, a solubilidade aumenta drasticamente.

Numa situação onde a enzima não é completamente solúvel, sua precipitação irá ocorrer como a consequência da perda de atividade em

solução. Para evitar tal situação, uma mudança de pH é recomendada. Uma alternativa para o problema de precipitação da enzima é a adição de um sal, uma vez que o sal irá aumentar a solubilidade da proteína. Este fenômeno é chamado de *salting-in* e também é válido em torno do ponto isoelétrico de uma enzima.

Diferentes tipos de sais podem ser usados. Em geral, os sais de íons divalentes, tais como cloreto de magnésio e sulfato de amônio, são muito mais eficazes do que os sais de íons monovalente, tais como cloreto de sódio, cloreto de potássio e cloreto de amônio.

3.3.2. Classificação das enzimas

Segundo Cavaco e Gubits (2003) a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica as enzimas em seis grandes classes, e cada uma dessas em subclasses de acordo com o tipo de reação catalisada.

As enzimas são classificadas em seis grupos, sendo:

- ✓ **Oxidoreduases:** catalisam reações de oxi-redução;
- ✓ **Transferases:** catalisam reações de transferência de grupos como acila, açúcares, fosforiza e aldeído ou cetona de uma molécula para outra;
- ✓ **Hidrolases:** catalisam hidrólises de ligações C-O, C-N, C-C.
- ✓ **Liases:** catalisam reações de adição, geralmente com HX a ligação dupla ou formação de ligações duplas por remoção de grupos (HX, H₂O), onde X é um haleto.
- ✓ **Isomerases:** catalisam a transferência de grupos dentro da molécula produzindo um isômero.
- ✓ **Ligases:** catalisam a formação de ligações C-O, C-S, C-C e de ésteres de fosfatos.

Neste trabalho será utilizada uma enzima da classe das oxidoreduases, mais especificamente a peroxidase, que é uma das enzimas mais utilizadas atualmente, juntamente com a lacase, para realizar degradação de efluentes têxteis contendo compostos aromáticos.

3.4. Enzimas peroxidases

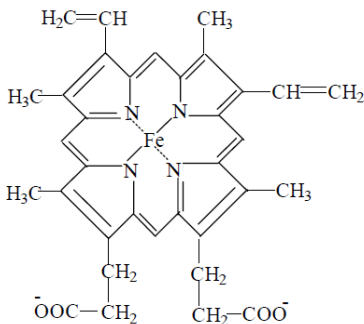
Peroxidases são oxidoredutases produzidas por um número considerável de microorganismos e plantas. Elas catalisam uma variedade de reações, mas todas requerem a presença de peróxidos como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio oxida primeiro a enzima que por sua vez, oxida o substrato.

Segundo Silva et al. (2012) as peroxidases podem ser classificadas em três superfamílias: planta peroxidase, animal peroxidase e catalase peroxidase. A superfamília planta peroxidase está subdividida em três classes: a classe I, que inclui as peroxidases intracelulares; a classe II, que consiste em peroxidases fúngicas extracelulares e a classe III, que compreende as classes vegetais, sendo a isoenzima C da *Horsehadish* peroxidase o exemplo mais estudado

A *Horseradish* peroxidase ou também denominada peroxidase da raiz forte (HRP, EC 1.11.1.7) têm sido usada na remoção de contaminantes aromáticos aquosos, principalmente porque ela mantém sua atividade sobre uma ampla gama de pH e temperatura. Uma vez ativada por peróxido de hidrogênio, HRP pode catalisar a oxidação de $2O_2$, e de uma variedade de compostos tóxicos incluindo compostos aromáticos, fenóis, bifenóis, anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos (KARAM; NICELL, 1997; BUCHANAN; NICELL, 1998).

De acordo com Forgiarini (2006) a HRP é estruturalmente o arquétipo das proteínas heme. A peroxidase é uma glicoproteína com massa molecular de 42000 gmoL^{-1} que possui uma parte protéica (apoenzima) de aproximadamente 34000 gmoL^{-1} e o restante é composto pelo grupo prostético (tipo heme) que contém o cofator ligado fortemente ao sítio ativo da enzima. Nos vegetais superiores, o cofator ferro no seu estado de oxidação +3 encontra-se ligado a uma molécula de porfirina, compondo o grupo *heme* (Figura 16), que promove a doação de elétrons na reação de oxidação dos seus substratos aromáticos.

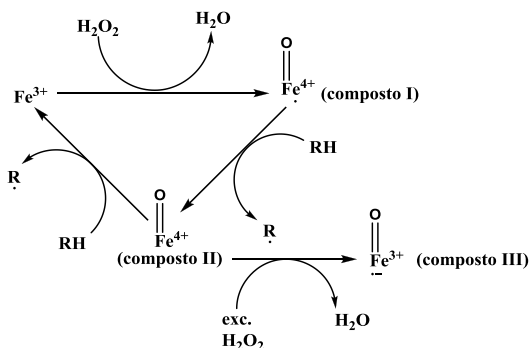
Figura 16 - Grupo prostético das enzimas peroxidase denominado grupo *heme*.



Fonte: FORGLARINI, 2006.

Segundo Nicell e Wright (1997); Schmitt (2010); Forgiarini (2006), o ciclo catalítico da HRP ocorre em três etapas, conforme apresentado na Figura 17. Na primeira etapa, a enzima nativa na forma férrica é oxidada por H_2O_2 formando um composto oxidado intermediário (Composto-I) na forma oxi-ferril. Na segunda etapa a forma oxidada da enzima (Composto-I) é então reduzida à sua forma nativa (Composto-II) pela transferência de um elétron do substrato (ex: lignina) formando um radical livre. Na terceira etapa a transferência de elétron de uma molécula de substrato para enzima faz com que esta retorne a sua forma inicial. O (composto III) refere-se à forma inativa da enzima.

Figura 17 - Ciclo catalítico da peroxidase.



Fonte: FORGLARINI, 2006.

Segundo Correa et al. (2012) embora vários autores da literatura reportem o uso da peroxidase para remoção de uma série de corantes, o mecanismo de degradação e os possíveis subprodutos formados a partir da oxidação enzimática desses compostos nem sempre são conhecidos.

Correa et al. (2012) avaliaram os produtos de degradação do corante Turqueza remazol G 133% por peroxidase do nabo usando um sistema de cromatografia líquida acoplada com espectrofotômetro de massa, a partir dessas análises foi proposto um mecanismo de oxidação envolvendo a clivagem das ligações de nitrogênio no interior do anel e a liberação de íons Cu^{2+} do complexo metálico.

Segundo Silva et al. (2012) as principais oxirredutases, lacases e peroxidases apresentam potencial no tratamento de uma variedade de compostos orgânicos, incluindo corantes. Estas enzimas podem catalisar a transformação/degradação de corantes aromáticos, tanto por precipitação como pela ruptura do anel aromático.

3.4.1. Aplicação de enzimas na descoloração de efluentes têxteis industriais

Corantes sintéticos são extensivamente utilizados nas indústrias têxteis. Segundo Silva et al. (2012) estima-se que aproximadamente 20% da carga de corantes seja liberada nos resíduos de tingimento durante o processamento têxtil. Além de corantes residuais, os efluentes têxteis contêm também aditivos químicos, como surfactantes, sais, óleos e graxas. Estes aditivos utilizados no processo de tingimento contribuem para a complexidade do tratamento destes efluentes.

Azo, antroquinona e índigo são os maiores cromóforos encontrados em corantes comerciais. A descoloração desses corantes por métodos físicos ou químicos (métodos de adsorção e precipitação, degradação química ou fotodegradação) são financeira e metodologicamente mais trabalhosos, consumindo muito tempo e sem muita efetividade. A degradação de corantes sintéticos no meio-ambiente por microorganismos é geralmente muito lenta devido a uma variedade de estruturas químicas e propriedades. Sabe-se que 90% dos corantes têxteis reativos que entram nos tratamentos de esgoto convencionais e bio-tratamentos como lodo ativado serão descarregados nos rios sem modificações (TILLI et al., 2011).

Segundo Murugesan et al. (2007) dentre os processos biotecnológicos de tratamento de efluentes têxteis atualmente utilizados, pode-se citar o uso de enzimas lignolíticas provenientes de fungos da decomposição branca que tem demonstrando potencial para

descoloração de efluentes sintéticos mediados por enzima como lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase. Geralmente, o fungo da decomposição branca pode conter uma das enzimas lignolíticas ou os três tipos juntos.

Murugesan et al. (2007) analisaram o potencial de descoloração dos corantes reativos Preto remazol 5 e Azul brilhante remazol R utilizando fungo da decomposição branca *Ganoderma lucidum* que produz lacase como a enzima lignolítica dominante. A enzima bruta mostrou alta atividade de descoloração em pH 4 a 60 °C, para o corante de antroquinona Azul brilhante remazol R foi obtida uma descoloração de 90% em 20 h de reação, no entanto, essa descoloração foi mais eficaz na presença do mediador N-hidroxibenzotriazole (HBT) onde foi obtida uma descoloração de 92% em apenas 2 h de reação. Já com o corante Preto remazol 5 foi obtida uma descoloração de 62% e 77,4% respectivamente, em 1 e 2 h de reação, utilizando como mediador N-hidroxibenzotriazole (HBT) em tampão acetato 0,1 M e pH 5.

Hamedaani, Sakurai e Sakakibara (2007) realizaram a descoloração de 12 diferentes corantes azo, diazo e antroquinona mediado por manganês peroxidase produzida por um fungo de decomposição branca, a percentagem de descoloração obtida em um período de 14 dias de cultura utilizando concentrações de corante de 40 mg/L foi de 84,9 a 99,6%. Também foi realizada a descoloração desses mesmos corantes em reação enzimática in vitro em um período de 3 min, a percentagem de descoloração obtida utilizando a concentração de corante de 10 mg/L variou entre 16,9 a 98,0%.

Segundo Correa et al. (2012) corantes reativos de ftalocianina são complexos metálicos utilizados para produzir tons de azul e verde. A maioria destes corantes são de cobre ftalocianinas. Eles são potencialmente mutagênicos e de especial preocupação por sua toxicidade e devido ao seu teor do metal cobre.

Correa et al. (2012) avaliaram o potencial da peroxidase do nabo em descolorir o corante reativo de ftalocianina Azul Reativo 21, a descoloração obtida foi de 57,7% utilizando uma atividade enzimática de 20,3 U/mL em 50 min de reação.

Jamal, Pandey e Qidwai (2010) investigaram o efeito da peroxidase *Trichosanthes diocia* na descoloração de corantes dispersos insolúveis em água. Os corantes Vermelho disperso 19 e preto disperso 9 obtiveram uma percentagem de descoloração de 79% e 60% respectivamente, utilizando como mediador 1-hidroxibenzotriazole a 42 °C, pH 4 e 0,45 U/mL de atividade enzimática em 60 min de reação.

Yousefiv e Hamid-Reza (2010) realizaram a descoloração do corante ácido monoazo Laranja 7 pela peroxidase do fungo *Coprinus cinereus*, a descoloração foi realizada a 25 °C, pH 9,0 e concentração de corante de 50 mg a descoloração obtida foi de 100%, a partir de tais condições em apenas 1 min.

Este trabalho tem como objetivo remover corantes reativos, de difícil degradação, não fixado às fibras de algodão e do efluente do processo de lavagem em uma única etapa utilizando a enzima *Horseradish* peroxidase, um biocatalisador biodegradável que atua em condições brandas de temperatura e pH levemente ácido. Com isso pretende-se agregar valor ao produto têxtil com cores mais vivas e mais brilhantes e ao mesmo tempo diminuir a geração de efluente colorido que é um dos grandes problemas dos efluentes industriais têxteis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os reagentes, equipamentos e metodologias utilizados neste trabalho para avaliar o potencial da enzima *Horseradish* peroxidase em remover corante reativo não fixado às fibras de algodão, assim como a descoloração do efluente do processo de lavagem.

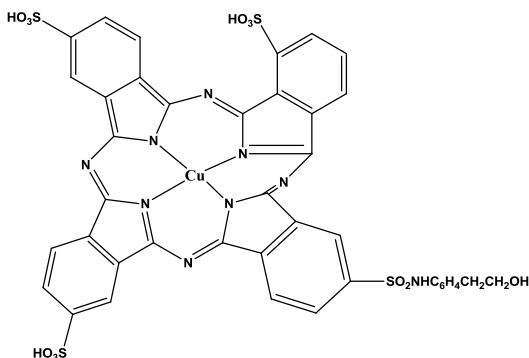
4.1. Materiais

4.1.1. Corantes

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os corantes reativos Turqueza Remazol G 133%, também denominado como Azul Reativo 21 e Vermelho CQ4BL, também denominado como Vermelho Reativo 195. Estes foram utilizados individualmente e misturados. Os corantes foram gentilmente cedidos pela empresa Karsten e neste trabalho serão denominados como Azul 21, Vermelho 195 e mistura Azul 21 e Vermelho 195.

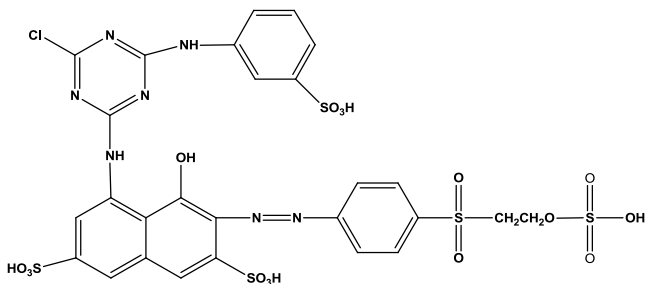
Nas Figuras 18 e 19 estão apresentadas as estruturas químicas dos corantes utilizados:

Figura 18 - Estrutura química do corante Turqueza Remazol G 133%, classificado no Colour Index como C.I. Azul Reativo 21.



Fonte: SILVA et al., 2012.

Figura 19 - Estrutura química do corante Vermelho CQ4BL, classificado no Colour Index como C.I. Vermelho Reativo 195.



Fonte: SONG et al., 2010.

4.1.2. Tecido

O tecido utilizado foi de malha de algodão adquirido na empresa Cedro Têxtil. O tecido apresenta uma gramatura de $0,0188 \pm 0,0002 \text{ g/cm}^2$ e foi pré-alvejado.

4.1.3. Enzima

A enzima utilizada foi a *Horseradish* peroxidase (HRP) gentilmente doada pela Toyobo do Brasil (2012). A ficha técnica da enzima está apresentado no Anexo B. As principais características dessa enzima são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Propriedades da enzima *Horseradish* peroxidase.

Estabilidade	Estável em - 20 °C (por pelo menos 1 ano)
Massa molecular	Aproximadamente 40.000
pH ótimo	6-7
Temperatura ótima	45 °C
Estabilidade em pH	5-10 (25 °C, 20 h)
Estabilidade térmica	Abaixo 50 °C (pH 6, 10 min)

Fonte: TOYOBO DO BRASIL, 2012.

4.1.4. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nesse trabalho foram:

- ✓ Agitadores magnéticos: Dist;
- ✓ Banho termostatizado: Dist;
- ✓ Balança analítica: Micronal AB204-S;
- ✓ Espectrofotômetro: Shimadzu UV mini-1240;
- ✓ Fourlard: Mathis FVH;
- ✓ pHmetro: Quimis;
- ✓ Rama: Mathis, LTE-S-B;
- ✓ Tingimento em canecos: Mathis, ALT - I - B até 135 °C.

4.1.5. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Ácido cítrico (Nuclear);
- ✓ Ácido *o*-fosfórico 85% (Nuclear);
- ✓ 2,2'- Ácido *Azino-bis* [3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico 9] (ABTS) (Sigma Aldrich);
- ✓ Carbonato de sódio (Vetec);
- ✓ Coomassie brilliant blue G-250 (Vetec);
- ✓ Etanol absoluto (Nuclear);
- ✓ Fosfato de potássio monobásico (Lafan);
- ✓ Fosfato de sódio (Sigma Aldrich);
- ✓ Hidrossulfito de sódio (ditionito de sódio) (Vetec);
- ✓ Hidróxido de sódio (CRQ);
- ✓ Peróxido de hidrogênio 65% (Lafan);
- ✓ Sulfato de sódio (Quemis);
- ✓ Tensoativo não-iônico TDI 5420 NI (Hanier);

4.2. Métodos

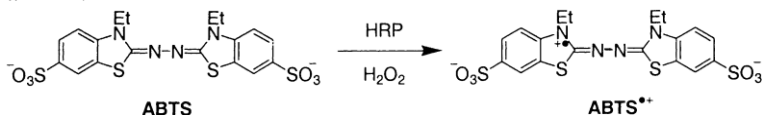
4.2.1. Determinação da atividade enzimática da *Horseradish* Peroxidase (HRP)

A atividade enzimática da enzima *Horseradish* peroxidase que foi utilizada nos ensaios realizados neste trabalho foi definida a partir dos estudos de Forgiarini (2006) que realizou a descoloração do corante

Turqueza Remazol G 133% utilizando a HRP. Forgiarini (2006) estudou atividades enzimáticas entre 2,985 a 29,85 U/mL, e obteve como máxima remoção 62%, quando utilizou concentração enzimática de 29,85 U/mL. Neste mesmo trabalho foi estudada a influência do H₂O₂ na descoloração do corante Turqueza Remazol G 133%, Forgiarini (2006) utilizou várias concentrações de peróxido de hidrogênio e a maior remoção obtida, foi de 59% quando se utilizou 2 mM de H₂O₂.

A atividade inicial do extrato enzimático da peroxidase foi determinada segundo a metodologia modificada de Wu et al. (1997); Montibeller, (2012), utilizando como substrato ABTS, que é oxidado pela enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio, formando o cátion (ABTS^{o+}) conforme apresentado na Figura 20. A taxa de formação deste cátion é proporcional à atividade enzimática, sendo monitorada em 420 nm.

Figura 20 - Reação de conversão do ABTS no cátion ABTS⁺ catalisado pela HRP.



Fonte: KADNIKOVA; KOSTIC, 2002.

Para a determinação da atividade foram utilizados 0,255 mL de solução de ABTS 20 mM; 0,255 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10 mM; 0,300 mL de extrato enzimático 1 mM; 2,19 mL de tampão fosfato pH 6 (0,05 molL⁻¹). Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato pH 6. A reação foi mantida a 30 °C em banho termostático por 10 min e em seguida acompanhada durante 5 min, em um espectrofotômetro a 420 nm ($\epsilon_{420\text{nm}} = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (SCHMITT, 2010). A atividade enzimática (A) foi calculada conforme a Equação 1.

$$A(\text{U/mL}) = \frac{\Delta_{\text{Abs}} \cdot V_{\text{total}} \cdot 10^6}{\epsilon_{\text{ABTS}} \cdot V_{\text{Extrato}} \cdot t} \quad (1)$$

Onde:

A= Atividade Enzimática

Δ_{Abs} = Absorvância final – Absorvância inicial;

ϵ = coeficiente de extinção molar para o ABTS (= $3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

V_{total} = Volume total de solução na cubeta em mL;

V_{Extrato} = Volume de extrato enzimático utilizado na reação em mL.

t = tempo de reação em minutos.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 μmol de ABTS em seu radical cátion por minuto.

4.2.2. Determinação da quantidade de proteína

A quantidade de proteína presente na solução do extrato enzimático foi determinada pelo método de Bradford (1976). Este método consiste na mudança de cor da solução do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 quando este se complexa à proteína. Esta ligação corante-proteína desloca o máximo de absorção do corante de 465 nm (Vermelho) para 595 nm (Azul), desta forma a ligação corante-proteína pode ser medida espectrofotometricamente a 595 nm. Para a preparação do reagente de Bradford foram dissolvidos 50 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 25 mL de etanol absoluto, adicionou-se 50 mL de ácido *o*-fosfórico 85%, a solução foi diluída para 500 mL de água destilada e deixada por 30 min em ultrassom. Após esse tempo a solução foi filtrada em funil de buchner e armazenada em frasco âmbar.

4.2.2.1. Determinação da quantidade de proteína no extrato enzimático

A quantidade total de proteína no extrato enzimático foi determinada através de uma curva de calibração padrão, usando soluções de 0 a 1 g/L de albumina do soro bovino (BSA) como proteína padrão. A curva de calibração da proteína está apresentada no Apêndice A. Para a análise foram utilizados 100 μL de extrato enzimático e adicionados a 5 mL da solução do corante sob agitação. Após 10 min foi medida a absorvância em 595 nm. As medidas foram realizadas em triplicata de experimentos.

4.2.3. Estudos de degradação enzimática

Foram realizados estudos preliminares para otimizar as condições reacionais de lavagem enzimática. Estes estudos foram realizados com corantes reativos individualmente e posteriormente as melhores condições foram aplicadas para mistura dos dois corantes. As reações foram conduzidas segundo a metodologia modificada de Silva et

al. (2012), em banho termostático a 130 rpm, contendo 0,4 mL de solução de H_2O_2 na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, 0,1 mL de extrato enzimático com concentração de 29,85 U/mL, os corantes individualmente e a mistura deles (1,5 mL) nas diferentes concentrações estudadas e tampão citrato ou fosfato $0,05 \text{ mol/L}$ (1,2 mL) nos diferentes pH estudados. Nos controles reacionais foram empregados todos os reagentes com exceção do H_2O_2 que foi substituído por água destilada. Nas reações fixaram-se parâmetros como peróxido de hidrogênio ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e concentração de enzima 29,85 U/mL. Os estudos foram conduzidos sempre variando apenas um dos parâmetros e fixando os demais. A faixa de concentração de corante foi definida com base em trabalhos como Forgiarini (2006), que aumentou a faixa de corante para obter a máxima degradação. Os parâmetros pH e temperatura foram definidos utilizando como base a ficha técnica da enzima, porém também foram utilizados valores próximos da faixa de estabilidade para verificar se haveria atividade. Os corantes Azul 21 e Vermelho 195 foram escolhidos por serem de difícil degradação como demonstram vários trabalhos na literatura como Silva et al. (2012); Pereira et al. (2010). Os parâmetros foram variados dentro das seguintes faixas:

- **Concentração de corante:** 20, 30, 40, 50 e 60 mgL^{-1} ;
- **pH da solução:** 3, 4, 5, 6 e 7;
- **Temperatura:** 20, 30, 40 e $50 \text{ }^\circ\text{C}$;
- **Tipo de corante:** Azul 21 e Vermelho 195, mistura dos corantes.

A reação de degradação do corante foi acompanhada espectrofotometricamente durante 1 h, retirando-se alíquotas a cada 10 min e medindo-se os valores de absorvância. Os estudos foram realizados em triplicata de experimentos.

4.2.3.1. Medidas de cor das soluções

Para a quantificação dos estudos de degradação enzimática e remoção de corante não fixado no tecido foram construídas curvas de calibração padrão de Absorvância x Concentração para os corantes utilizados nos estudos de degradação enzimática. Também foram construídas curvas de calibração contendo corante, barrilha e sal para os estudos de remoção de corante não fixado no tecido. A quantidade de sais no efluente do processo de lavagem posteriormente foram

determinadas por medidas de condutividade. As curvas de calibração estão apresentadas no Apêndice A. Foram feitas varreduras espectrais na região do visível, na faixa de comprimento de onda de 400 a 800 nm, com objetivo de obter os picos máximos de absorção dos corantes (Tabela 7). As reações de tingimento e lavagem foram acompanhadas através de medidas espectrofotométricas da absorvância de alíquotas antes e depois das reações. E as reações de degradação enzimática foram acompanhadas através de medidas de alíquotas ao longo da reação. A quantidade de corante degradado (D) foi calculado pela Equação 2. As medidas foram realizadas em triplicata de experimentos.

Tabela 7- Picos máximos de absorvância dos corantes utilizados.

Corante	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) corante	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) corante + sal+barrilha
Azul 21	624	667
Vermelho 195	541	541
Mistura	624	667

Em todas as medidas realizadas por espectroscopia, a remoção de corante foi calculada pela equação 2.

$$D (\%) = \frac{\text{Abs}_{\text{inicial}} - \text{Abs}_{\text{final}}}{\text{Abs}_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

$\text{Abs}_{\text{inicial}}$ = Absorvância inicial

$\text{Abs}_{\text{final}}$ = Absorvância final

4.2.4. Tingimentos

Os tingimentos foram realizados em máquina para tingimento em canecos utilizando cada corante individualmente e a mistura dos dois corantes. Inicialmente foram utilizados 2% em massa de corante (e no caso da mistura 1% em massa de cada corante, totalizando 2% em massa) e 50 g/L de sulfato de sódio. Esta solução foi colocada nos canecos e adicionada à amostra de tecido, previamente pesada. Os cilindros lacrados foram posicionados na máquina de tingimento em canecos com um patamar de 20 min a 60 °C. Após este tempo a reação foi parada e foram adicionados 5 g/L de barrilha (carbonato de sódio) e

deixado com um patamar de 40 min a 60 °C. Os estudos de tingimento foram realizados com relação de banho 1:20 (m,v). Os ensaios foram realizados em triplicata de experimentos.

4.2.5. Enxágues pós-tingimento

Para os corantes Azul 21, Vermelho 195 e a mistura Azul 21 e Vermelho 195 foram realizados enxágues com água destilada a 30 °C durante 10 min, com relação de banho 1:10 (m,v), após o tingimento para verificar o número máximo de enxágues que seriam necessários para remover todo corante não fixado à fibra de algodão. Esses enxágues foram realizados principalmente para verificar se haveria uma grande perda de cor ao longo do processo. Se houvesse, outros estudos não seriam possíveis de serem realizados, já que posteriormente seriam realizadas lavagens com fortes agentes redutores e enzimas.

4.2.6. Lavagens pós-tingimento

Após os tingimentos, os tecidos foram submetidos à lavagens enzimáticas e químicas com o objetivo de remover o corante não fixado à fibra de algodão. Após as lavagens, foram realizados enxágues de 30 °C e 10 min com água destilada para remover o corante não removido durante a etapa de lavagem, esses enxágues foram realizados até a obtenção da absorvância igual a zero. Para todos os estudos de lavagens foram utilizadas relações de banho 1:10 (m,v). Após o tingimento, entre cada lavagem e enxágues os tecidos foram passados no fourlard, com um pick up de 100%, para que todos tivessem a mesma quantidade de solução no tecido. No final de todo processo de lavagem, enxágue e fourlardagem, os tecidos foram secos na Rama a uma temperatura de 100 °C durante 5 min e posteriormente enviados para teste de determinação de cor e solidez à lavagem. Os ensaios foram realizados em triplicata de experimentos.

4.2.6.1. Lavagens químicas pós-tingimento

As lavagens químicas foram realizadas como parâmetro de comparação para as lavagens enzimáticas. Foram realizadas as seguintes lavagens químicas:

- Água;
- Ditionito de sódio (Hidrossulfito de sódio) 3 g/L;
- Hidróxido de sódio 3 g/L;
- Redutiva (Ditionito de sódio 3 g/L + Hidróxido de sódio 3 g/L);
- Tensoativo não-iônico TDI 5420 NI 0,5 g/L.

As lavagens químicas foram realizadas a 85 °C e 30 min para os corantes Azul 21 e Vermelho 195 individualmente e para a mistura dos dois corantes. Após as lavagens, foram feitos enxágues, quando necessários, a 30 °C e 10 min, até que a água do banho ficasse completamente incolor. As lavagens redutiva e com ditionito não foram realizadas para a mistura de corantes, pois testes preliminares mostraram que o ditionito de sódio, mancha uma grande extensão do tecido.

4.2.6.2. Lavagem enzimática

Os ensaios de lavagem enzimática foram realizados na máquina de tingimento em canecos Mathis. Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático (29,85 U/mL) e 0, 100 mL de H₂O₂ 2 mM, que era preparado minutos antes de começar a reação, o volume foi completado com tampão citrato-fosfato pH 4 e a solução adicionada ao caneco.

Após o tingimento o tecido foi passado no fourlard e antes de cada lavagem enzimática foi realizado 1 enxágue a 30 °C e 10 min, para remover os resíduos de sal e barrilha. Testes preliminares mostraram que sem esse enxágue não era possível fazer a remoção do corante não fixado à fibra por inativação da enzima pelos eletrólitos.

Na lavagem enzimática o tempo reacional foi de 45 min a 30 °C. Após as lavagens, foram realizados mais enxágues a 30 °C e 10 min. Para os estudos de lavagem enzimática, a solução de extrato enzimático foi preparada em tampão citrato-fosfato (0,05 M, pH 4) sendo armazenada na geladeira e agitada manualmente antes de cada reação. Toda semana era preparada uma nova solução.

4.2.7. Descoloração enzimática do efluente do processo de lavagem

A descoloração do efluente do processo de lavagem foi realizada conjuntamente com a remoção do corante não fixado à fibra de algodão. Para quantificar o corante removido da solução foram feitas varreduras espectrais na faixa do visível de 400 a 800 nm, onde a

quantificação foi feita através da diminuição da concentração identificada no pico cromóforo antes e depois da reação.

4.2.8. Análises dos tecidos

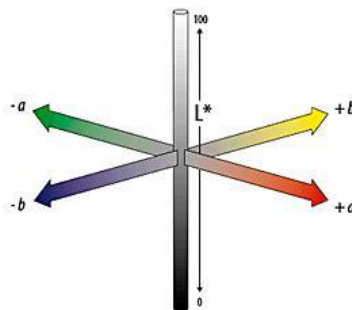
A avaliação dos tecidos que passaram por lavagens pós-tingimentos foram realizados pelas seguintes análises: Determinação da alteração da cor (determinação do ΔE_{cmc}) e solidez à lavagem Norma NBR ISO 105-C10.

4.2.8.1. Determinação da alteração da cor

As amostras foram avaliadas pela leitura direta de reflectância do sistema de coordenadas retangulares empregando a escala de cor CIELAB (1976), como mostra a Figura 21.

O espaço de cor CIELAB está organizado em formato cúbico onde o eixo L^* é executado de cima para baixo. O máximo para L^* é 100 que representa um perfeito difusor refletindo (Branco). O mínimo de L^* é zero, o qual representa (Preto). Os eixos a^* e b^* não tem limite numérico, porém usa-se como referência o valor de 60 unidades de cor, onde a^* positivo há uma tendência para o vermelho e a^* negativo uma para o verde, b^* positivo há uma tendência para o amarelo e b^* negativo, para o azul. (HUNTERLAB, 2008).

Figura 21- Esquema de coordenadas retangulares do sistema CIELAB.



Fonte: <http://sellerink.com.br>

Os testes de determinação de alteração de cor foram realizados pelo laboratório de Tinturaria da empresa Malwee localizada em Jaraguá

do Sul, SC. A determinação de cor foi feita em Espectrofotômetro modelo Spectraflash SF 600 X da marca Datacolor.

4.2.8.2. Testes de solidez à lavagem

Os testes de solidez à lavagem foram realizados conforme a Norma NBR ISO 105-C10. Segundo Valente e Oliveira (2011) quando uma amostra de tecido é unida aos tecidos-testemunha, ou seja, tecidos de composição 100%, apenas alvejados e sem branqueamento óptico, esses formarão um corpo-de-prova. Um dos tecidos-testemunha deverá ter composição igual àquele que está sendo analisado, enquanto que o outro deverá seguir os padrões da norma conforme determinado ensaio. Neste trabalho foi utilizado um tecido natural de algodão e um sintético de poliamida. Os corpos-de-prova dos tecidos foram lavados com 5 g/L de dispersante para lavação e 2 g/L de barrilha leve (Carbonato de sódio). A solução foi adicionada em um caneco inox sob condições estabelecidas de temperatura, tempo, agentes químicos e agitação mecânica de modo a se obter uma possível alteração da cor. A partir dessa alteração de cor é atribuída uma nota de 1-5 de acordo com a escala de cinzas Anexo A, onde 1 é a nota mínima, significa grande alteração da cor ou baixa solidez e 5 é a nota máxima, que significa cor inalterada ou ótima solidez.

Os testes de solidez à lavagem foram realizados pelo laboratório de Tinturaria da empresa Malwee localizada em Jaraguá do Sul, SC, em aparelho modelo TUBOTEST ATW-3 da marca KIMAK.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho realizou-se a avaliação dos corantes reativos Azul 21, Vermelho 195 e a mistura Azul 21 e Vermelho 195, não fixados às fibras de algodão, utilizando a enzima *Horseradish* peroxidase (HRP), assim como, estudos de degradação enzimática e remoção de corante do efluente do processo de lavagem. Inicialmente serão abordados os resultados relacionados à degradação enzimática. Em uma segunda etapa serão abordados os resultados de remoção de corante não fixado à fibra de algodão e do efluente do processo de lavagem.

5.1. Determinação da proteína no extrato enzimático

A quantidade de proteína contida no extrato enzimático foi determinada pelo método Bradford, seção 4.2.2 e 4.2.2.1. Para a *Horseradish* peroxidase utilizada nesse trabalho, foi declarado pelo fabricante, um valor de enzima por quilograma de amostra de 8,8 MU/kg, a quantidade de proteína encontrada para esse valor foi de 3,85 mg/mL. Montibeller (2012) utilizou a mesma enzima com um valor de enzima por quilograma de amostra, declarado pelo fabricante, de 5,5 MU/kg e obteve uma quantidade de proteína de 2,12 mg/mL.

5.2. Degradação enzimática de corantes

Primeiramente foram realizados estudos de degradação enzimática para obter as condições para reações de lavagem enzimática e para descoloração do efluente do processo de lavagem. Foram analisados parâmetros como pH, temperatura, concentração de corante e o tipo de corante. Os ensaios foram realizados para os corantes Azul 21 e Vermelho 195 individualmente e em seguida algumas das melhores condições foram aplicadas para a mistura dos dois corantes. Em todos os ensaios o controle reacional permaneceu constante ao longo do tempo. Todos os estudos foram realizados em triplicata de experimentos.

5.2.1. Degradação enzimática do corante Azul 21

O corante Azul 21 é um corante de ftalocianina muito utilizado nas indústrias têxteis. O grupo ftalocianina é muito estável, são complexos metálicos na maioria das vezes de cobre que são utilizados

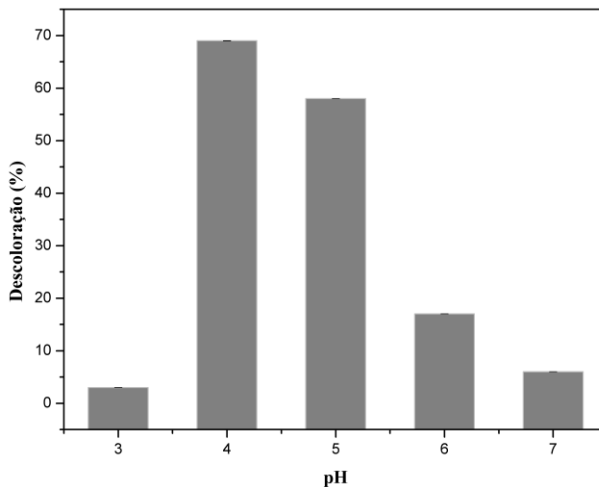
para produzir tons como azul e verde, principalmente por apresentarem boas propriedades de cor e resistência.

Segundo Correa et al. (2012) corantes de ftalocianina são altamente solúveis em água, resistentes à degradação biológica sob condições aeróbias e não são efetivamente removidos por adsorção em biomassa em planta de tratamento de efluente, resultando em efluente colorido.

5.2.1.1. Influência do pH na degradação do corante Azul 21

Um fator muito importante que deve ser avaliado nas reações biocatalisadas é a influência do pH no meio reacional. Toda enzima tem uma faixa de pH ótimo no qual a atividade é máxima, porém essa faixa depende do substrato utilizado e das condições de reação. Para verificar a influência do pH foram realizados estudos, variando o pH entre 3,0 a 7,0; concentração de corante de 50 mg/L, 100 μ L de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μ L de peróxido de hidrogênio 100 μ M, em 1h de reação a 30 °C. A quantidade de corante removido em diferentes valores de pH, pode ser observada na Figura 22.

Figura 22 - Influência do pH na remoção do corante Azul 21 [Condições reacionais: 50 mg/L de corante, 100 μ L de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μ L de H₂O₂ 100 μ M, 30 °C, 1 h de reação].



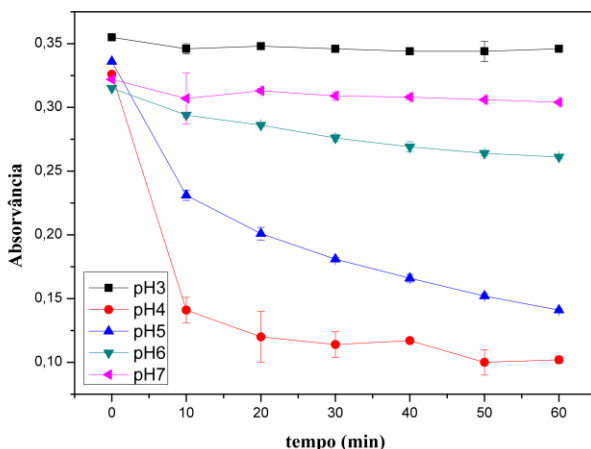
Observa-se que a melhor atuação da HRP foi obtida quando utilizou-se pH 4, 69% de descoloração. No entanto em pH 5,0 foi obtida uma descoloração de 58%. Para os valores de pH 3,0; 6,0; 7,0 foram encontrados valores menores de descoloração, 3%, 17% e 6% respectivamente.

Resultados similares foram descritos por Forgiarini (2006) que realizou a degradação do corante Azul 21 utilizando a enzima *Horseradish* peroxidase e obteve a máxima remoção em pH 4, 59% de descoloração.

Jamal, Pandey e Qidwai (2010) observaram a descoloração dos corantes Vermelho disperso 19 e Preto disperso 9, na presença da peroxidase de *Trichosanthes diocia*, utilizando mediadores redox. A descoloração máxima foi obtida em pH 4, em 1 h de reação, aproximadamente 60% para o Preto disperso 9 e 80% para o Vermelho disperso 19.

Na Figura 23 é apresentada a influência do pH na degradação do corante Azul 21, a descoloração foi calculada pela Equação 2, em função da diminuição da absorvância ao longo do tempo de reação.

Figura 23- Influência do pH na degradação do corante Azul 21 [Condições reacionais: Descritas na Figura 22].



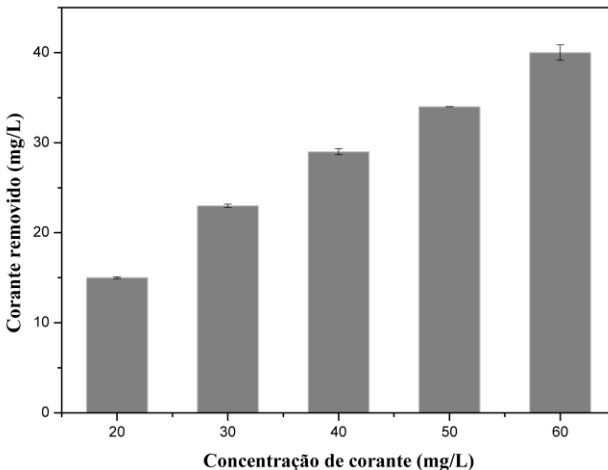
Em pH 4 observa-se a máxima descoloração em 10 min de reação, após esse tempo ainda é possível observar remoção, porém em menor proporção. Pode-se observar que para valores de pH 3 e 7, onde foram obtidas as menores descolorações, a maior remoção ocorreu em

10 min de reação, após esse tempo foram observados baixos índices de descoloração. Em pH 6 a maior descoloração também ocorreu nos primeiros 10 min, porém após esse tempo ainda é possível observar descoloração ao longo da reação, comportamento semelhante pode ser observado em pH 5, porém nesse caso a descoloração obtida após os 10 min foi maior e para analisar a descoloração total, o tempo de reação precisaria ser aumentado e retida alíquotas a cada 10 min até a reação se tornar constante, possivelmente seria obtida uma faixa ótima de pH 4-5, em diferentes tempos de reação como descrito por Forgiarini (2006).

5.2.1.2. Influência da concentração do corante na degradação do corante Azul 21

A concentração de corante é um fator chave que afeta a velocidade da catálise enzimática e por isso deve ser investigado. Os ensaios foram realizados variando-se a concentração de corante em uma faixa de 20 a 60 mg/L, 100 μ L de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μ L de H_2O_2 100 μ M e pH 4, em 1 h de reação a 30 °C. A quantidade de corante removido em diferentes valores de concentração de corante é apresentada na Figura 24.

Figura 24 - Influência da concentração do corante na remoção do corante Azul 21 [Condições reacionais: 100 μ L de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μ L de H_2O_2 100 μ M, pH 4, 30 °C, 1 h de reação].



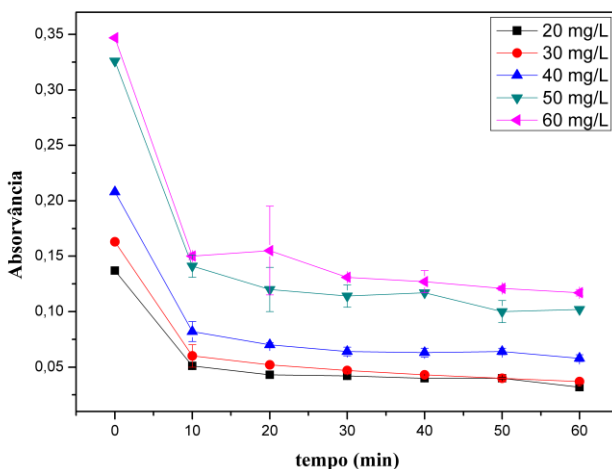
Pode-se observar que a máxima descoloração na presença da enzima HRP foi obtida quando utilizou-se 60 mg/L de corante, nesta concentração obteve-se uma remoção de 40 mg/L. Quando foi utilizada a concentração de 50 mg/L foi obtida um remoção de 34 mg/L. Nas concentrações de 20, 30 e 40 mg/L foram removidos 15, 23 e 29 mg/L de corante, respectivamente.

Moham et al. (2005) avaliaram a influência da concentração de corante na reação mediada por enzima. Se a concentração de enzima é mantida constante e a de substrato for aumentada gradualmente, a velocidade da reação aumentará até um máximo e após esse valor permanecerá constante,

Forgiarini (2006) também avaliou a influência da concentração de corante na reação do corante Turqueza Remazol G 133%, utilizando HRP, a concentração de corante foi variada entre 10 a 100 mg/L. A máxima descoloração obtida foi de 59% quando utilizou-se 100 mg/L de corante. Porém nas concentrações de 10, 25, 50 e 75 mg/L foram obtidas descolorações de 43, 49, 50 e 55% respectivamente.

Na Figura 25 é apresentada a influência da concentração de corante na degradação do corante Azul 21, a descoloração foi calculada pela Equação 2, em função da diminuição da absorvância ao longo do tempo de reação.

Figura 25- Influência da concentração de corante na degradação do corante Azul 21 [Condições reacionais: Descritas na Figura 24].

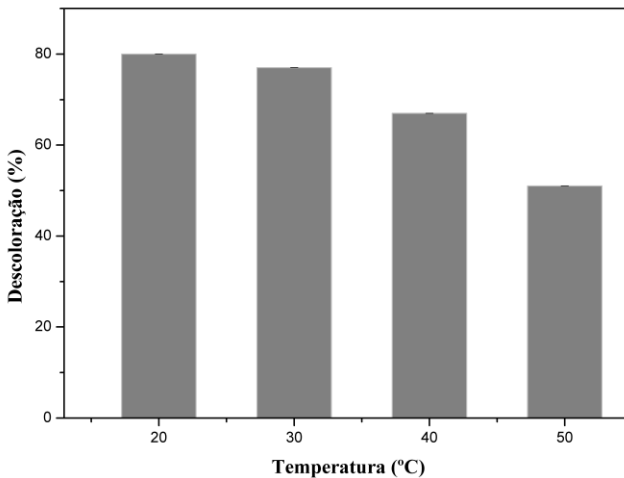


Observa-se que em todas as concentrações de corante a remoção de corante pela enzima HRP foi obtida em apenas 10 min de reação, porém após esse tempo praticamente não foi observada descoloração, somente uma pequena descoloração em 20, 40 e 60 mg/L, para todas as concentrações de corantes analisadas.

5.2.1.3. Influência da temperatura na degradação do corante Azul 21

Segundo Cavaco e Gubits (2003), o aumento da temperatura aumenta a velocidade de reação enzimática, porém cada enzima tem uma temperatura ótima de reação, acima dessa temperatura a enzima sofre desnaturação e perde atividade. Os ensaios foram realizados variando-se a temperatura reacional entre 20 a 50 °C, concentração de corante de 30 mg/L, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H₂O₂ 100 µM, pH 4 em 1 h de reação. Na Figura 26 é apresentada a influência da temperatura sobre a descoloração do corante Azul 21.

Figura 26 - Influência da temperatura na remoção do corante Azul 21 [Condições reacionais: 30 mg/L de corante, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H₂O₂ 100 µM, pH 4, 1h de reação].



Na temperatura de 20 °C foi obtida a maior remoção de corante pela HRP, 79%, seguida pela de 30 °C, com 77%. Para a temperatura de 40 °C houve 67% de descoloração, enquanto que na temperatura de 50

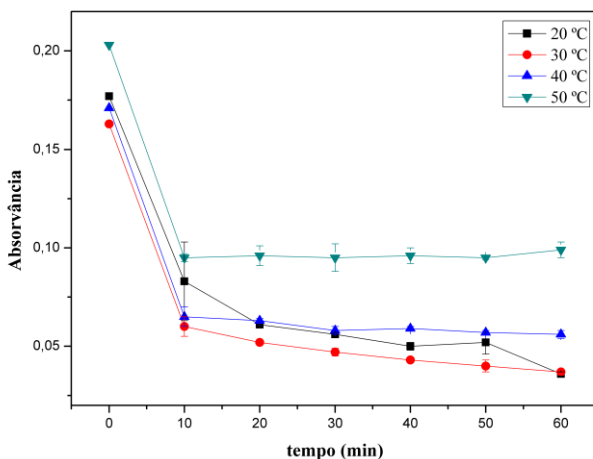
°C foi obtida uma descoloração de 51%, confirmando que para altas temperaturas ocorre uma diminuição de sua atividade e eficiência enzimática. Apesar de a maior descoloração ter sido obtida a 20 °C, como a diferença foi pequena, nos estudos de remoção de efluente do processo de lavagem será utilizada a temperatura de 30 °C, pela dificuldade de conseguir temperaturas abaixo de 30 °C na máquina de tingimento em canecos da Mathis.

Resultados similares foram obtidos por Forgiarini (2006) que avaliou a descoloração do corante Turqueza Remazol G 133% por *Horseradish* peroxidase nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C. A maior descoloração foi obtida na temperatura de 30 °C, 59 %, seguida pela de 20 °C, 52%. Quando foi utilizada a temperatura de 40 °C foi obtida uma descoloração de apenas 28%.

Liu, Wang e Ji (2006) também estudaram a variação da temperatura entre 30 a 80 °C, na descoloração do Azul de bromofenol e do laranja de metila em presença de peroxidase modificada. A temperatura ótima para ambos os corantes foi de 30 °C e decresceu após esse valor.

Na Figura 27 é apresentada a influência da temperatura na degradação do corante Azul 21, a descoloração foi calculada pela Equação 2, em função da diminuição da absorvância ao longo do tempo de reação.

Figura 27- Influência da temperatura na degradação do corante Azul 21 [Condições reacionais: Descrita na Figura 26].



Pode-se observar que para as temperaturas de 20 e 30 °C a máxima remoção de corante pela enzima HRP foi obtida em apenas 10 min, porém após esse tempo ainda pode ser observado descoloração.

Nas temperaturas de 40 e 50 °C também foi obtida uma máxima remoção de corante em 10 min, porém após esse tempo a descoloração permaneceu praticamente constante.

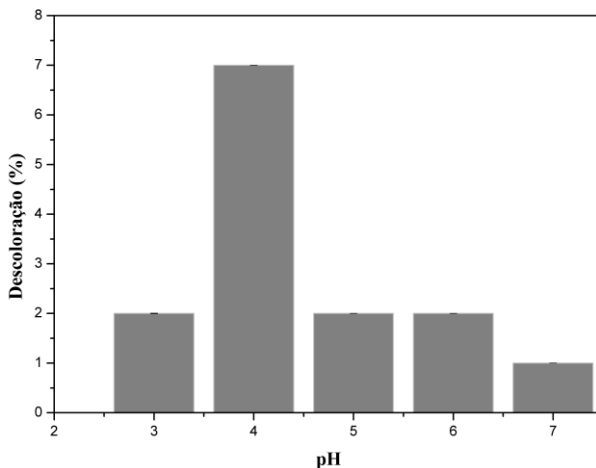
5.2.2. Degradação enzimática do corante Vermelho 195

O corante Vermelho 195 é um corante monoazo, extensivamente utilizado nas indústrias têxteis. Como vários corantes é persistente e difícil de ser removido de efluentes por processos convencionais. Por isso é essencial estudar novas técnicas de degradação desses tipos de corantes.

5.2.2.1. Influência do pH na degradação do corante Vermelho 195

Foi estudada a influência do pH na reação enzimática de degradação do corante Vermelho 195. Primeiramente foram realizados estudos variando o pH entre 3,0 a 7,0; concentração de corante de 50 mg/L, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H₂O₂ 100 µM, em 1 h de reação a 30 °C. A quantidade de corante removido em diferentes valores de pH pode ser observada na Figura 28.

Figura 28 - Influência do pH na remoção do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: 50 mg/L de corante, 100 μ L de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μ L de H_2O_2 100 μ M , 30 °C, 1h de reação].



Observa-se que a descoloração do corante Vermelho 195 por HRP não é tão eficiente quanto para o corante Azul 21, a melhor atuação da HRP foi obtida quando foi utilizado pH 4, somente, 7,0% de descoloração. Para os valores de pH 3,0; 5,0; 6,0; 7,0 foram encontrados valores muito pequenos de descoloração entre 1-2%. Possivelmente a baixa conversão pode ter ocorrido devido à impossibilidade da enzima em degradar esse tipo de corante.

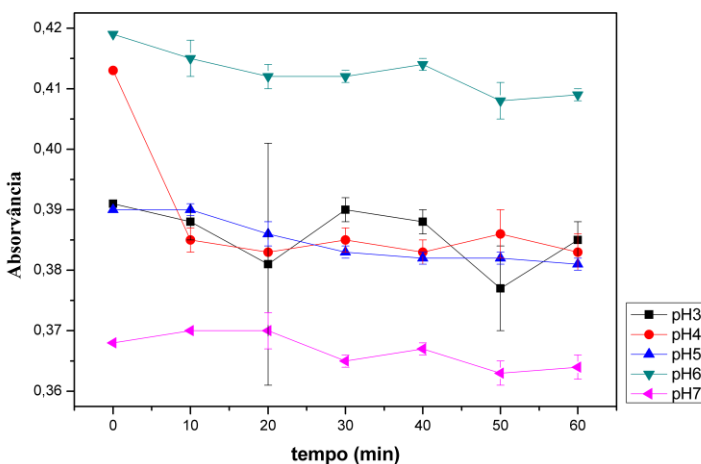
Schmitt (2010) estudou uma faixa de pH de 3,0 a 6,0 para analisar a eficiência de descoloração do corante Vermelho disperso 343 em 24 h de reação, utilizando as enzimas *Horseradish* peroxidase, peroxidase microbiana e lacase. Quando foi utilizado a HRP em pH 4 a taxa de descoloração foi de aproximadamente 8%, já quando utilizou-se a mesma enzima em pH 5 a descoloração foi de aproximadamente 20%.

Matto e Husein (2007) também avaliaram a descoloração dos corantes Vermelho direto 23, Vermelho direto 239, Azul direto 80 e Amarelo direto 4 utilizando peroxidase do nabo, na presença de vários mediadores redox. Os valores de pH foram variados numa escala de 3,0 a 10,0. Todos os corantes tiveram descoloração máxima em uma escala de valores entre 5,0 e 5,5 em 1 h de reação, os valores de descoloração variaram de 6 a 93% dependendo do mediador utilizado. Para valores de pH entre 7,0 a 10,0 a maioria dos corantes não obteve descoloração.

Segundo Jamal, Pandey e Qidwai (2010) vários trabalhos reportados na literatura utilizam enzimas como peroxidase do nabo, polifenol oxidase e lacase, para descoloração de corantes, o pH máximo de descoloração é quase sempre obtido em pH ácido.

Na Figura 29 é apresentada a influência do pH na degradação do corante Vermelho 195, a descoloração foi calculada pela Equação 2, em função da diminuição da absorvância ao longo do tempo de reação.

Figura 29 - Influência do pH na degradação do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: Descrita na Figura 28].

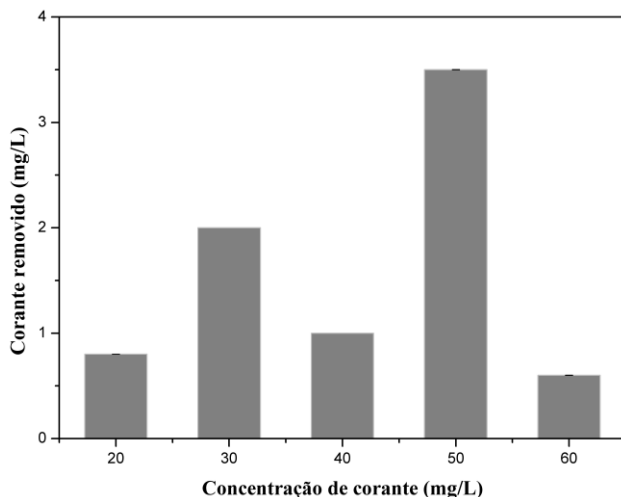


Pode-se observar que em pH 4 houve a maior descoloração entre todos os pHs avaliados. Essa descoloração ocorreu nos primeiros 10 min de reação, após esse tempo permaneceu praticamente constante. Para todos os outros pHs foram obtidos baixos índices de descoloração que não se alteram significativamente ao longo do tempo.

5.2.2.2. Influência da concentração do corante na degradação do corante Vermelho 195

Os ensaios foram realizados variando a concentração de corante em uma faixa de 20 a 60 mg/L, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H₂O₂ 100 µM e pH 4, em 1h de reação a 30 °C. A quantidade de corante removido em diferentes valores de concentração de corante é apresentada na Figura 30.

Figura 30- Influência da concentração do corante na remoção do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: 100 μL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μL de H_2O_2 100 μM , pH 4, 30 $^\circ\text{C}$, 1h de reação].

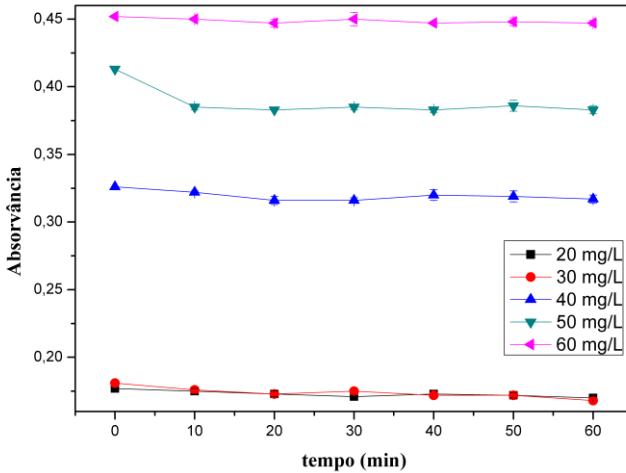


É possível observar que na degradação do corante Vermelho 195 por HRP a máxima descoloração foi obtida na concentração de 50 mg/L, 3,5 mg/L de remoção. Na concentração de 30 mg/L foi obtida uma remoção de 2 mg/L. Quando foi utilizada as concentrações de 20, 30 e 60 mg/L foram obtidos baixos valores de remoção entre 0,6-1,0 mg/L.

Tinoco, Verdin e Duhalt (2007) realizaram a descoloração de 41 corantes ácidos, diretos, dispersos, reativos e a cuba em presença do mediador triptofan 172, utilizando peroxidase do *Bjerkandera adusta* em pH 4. Quando foram utilizados os corantes reativos Vermelho 4, Vermelho 141 e Vermelho 180 foram obtidas baixas velocidades de descoloração 1,35; 1,02 e 0,52 $\text{min}^{-1} \text{mol}^{-1}$ respectivamente.

Na Figura 31 é apresentada a influência da concentração de corante na degradação do corante Vermelho 195, a descoloração foi calculada pela Equação 2, em função da diminuição da absorvância ao longo do tempo de reação.

Figura 31 - Influência da concentração de corante na degradação do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: Descrita na Figura 30].

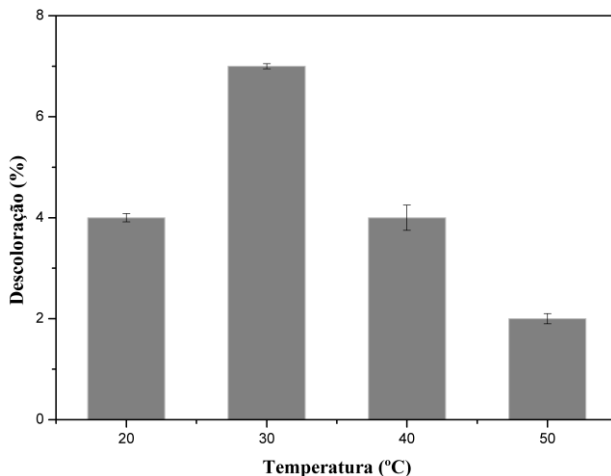


Observa-se que quando foi estudada as concentrações de corante para o Vermelho 195, as concentrações foram praticamente constante longo do tempo para todos os valores estudados. Só é possível observar uma pequena variação nas concentrações de 30 mg/L e mais perceptível em 50 mg/L, nos primeiros 10 min de reação e uma pequena variação em 30 mg/L entre 50 e 60 min.

5.2.2.3. Influência da temperatura na degradação do corante Vermelho 195

Os ensaios foram realizados variando a temperatura reacional entre 20 a 50 °C, concentração de corante de 30 mg/L, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H₂O₂ 100 µM, pH 4 em 1h de reação. Na Figura 32 é apresentada a influência da temperatura sobre a descoloração do corante Vermelho 195.

Figura 32 - Influência da temperatura na remoção do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: 30 mg/L de corante, 100 µL de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 µL de H₂O₂ 100 µM, pH 4 em 1 h de reação].



Observa-se que para o corante Vermelho 195 a maior descoloração de corante pela HRP foi obtida na temperatura de 30 °C, 7,0%. Para as temperaturas de 20 e 40 °C foi obtida uma descoloração de 4,0% e na temperatura de 50 °C foi obtido apenas 2,0% de descoloração.

Garcia, Santiago e Ulhoa (2006) obtiveram atividade enzimática ótima para as lacases I e II do fungo *P. sanguineus* de 30 e 50 °C, respectivamente.

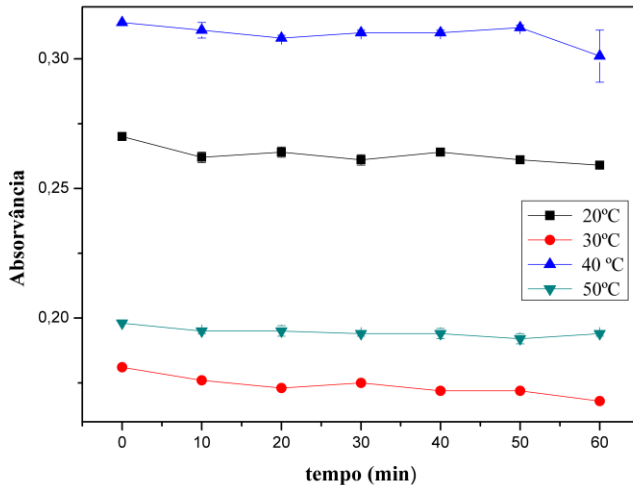
Soares (2000) avaliou a degradação do corante Azul brilhante remazol R, também denominado Azul Reativo 19, utilizando uma preparação comercial contendo a enzima lacase. Foram estudadas temperaturas de 30, 50 e 60 °C, os resultados mostraram que a temperatura onde a enzima foi mais estável sem perder sua atividade foi 30 °C. Porém, a maior descoloração de 100% foi obtida quando utilizou-se temperaturas de 60 °C.

Apesar de a lacase ser uma oxidoreductase como a peroxidase, quando se usa esse tipo de enzima, segundo vários trabalhos da literatura a temperatura ótima varia entre 50 e 60 °C.

Schmitt (2010) estudou a descoloração do corante Vermelho disperso 343 por lacase e peroxidase e obteve 50 °C como temperatura ótima de reação.

Na Figura 33 é apresentada a influência da temperatura na degradação do corante Vermelho 195, a descoloração foi calculada pela Equação 2, em função da diminuição da absorvância ao longo do tempo de reação.

Figura 33 - Influência da temperatura na degradação do corante Vermelho 195 [Condições reacionais: Descrita na Figura 32].



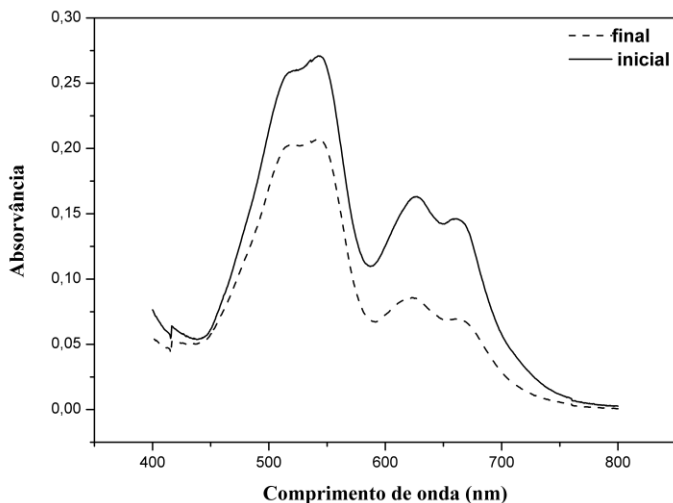
Observa-se que para a maioria das temperaturas, houve uma pequena remoção nos primeiros 10 min de reação, após esse tempo a temperatura permaneceu praticamente constante, porém nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C ainda é possível observar descoloração após esse tempo.

5.2.3. Degradação enzimática da mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195

Após a realização dos estudos utilizando os corantes individualmente, foi estudada a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195. Os ensaios foram conduzidos utilizando algumas das condições obtidas na descoloração dos corantes individualmente e estas

foram aplicadas para a mistura dos dois corantes. Os estudos foram realizados utilizando concentração de corante de 30 mg/L de cada corante, totalizando 60 mg/L, 100 μ L de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μ L de H₂O₂ 100 μ M, pH 4 em 1h de reação a 30 °C. Na Figura 34 é apresentado o espectro de varredura, na região do visível de 400 a 800 nm, para a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 antes e depois do tratamento enzimático.

Figura 34 - Espectro de varredura para a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 antes e depois do tratamento enzimático [Condições reacionais: 60 mg/L mistura de corantes, 100 μ L de extrato enzimático (29,85 U/mL), 400 μ L de H₂O₂ 100 μ M, pH 4, 30 °C, 1 h de reação].



O espectro de absorção da mistura de corantes mostra a diminuição dos picos cromóforos de cada corante, antes e depois da reação enzimática. Pode-se observar os picos máximos de absorvância do corante Vermelho 195 em aproximadamente 541 nm e do Azul 21 em aproximadamente 624 nm. O corante Vermelho 195 obteve individualmente uma remoção de 23%, enquanto que o corante Azul 21 obteve uma remoção de 45%. Neste caso é importante destacar o efeito sinérgico da enzima quando os dois corantes estavam presentes a descoloração do corante Vermelho 195 foi aumentada de 7% para 23% e a do Azul 21 diminuída de 79% para 45%.

Silva et al. (2012) realizaram degradação enzimática da tricomia dos corantes Preto Reativo 5, Amarelo reativo 15 e Vermelho reativo 239, utilizando peroxidase do nabo. A remoção da cor total foi de 49%.

Segundo Silva et al. (2012) a mistura dos corantes reativos estudados não teve efeito sobre a ação da enzima, no que diz respeito à remoção de cada corante separadamente, o que é favorável para a aplicação da enzima, visto que um efluente real geralmente contém vários corantes.

5.3. Tingimento com Azul 21, Vermelho 195 e mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195

Os tingimentos foram realizados conforme seção 4.2.4. A fixação do corante à fibra do tecido de algodão foi quantificada por medidas espectroscópicas da solução inicial de tingimento nas mesmas concentrações, contendo todos os reagentes e da solução final de tingimento, calculadas pela Equação 2. Para todos os tingimentos feitos anteriormente às lavagens químicas, enzimáticas e enxágues foi obtida uma absorção de corante no tecido de $(86,41 \pm 2,27)\%$ quando foi utilizado o corante Azul 21, de $(97,20 \pm 1,47)\%$, quando foi utilizado o corante Vermelho 195 e uma fixação de $(88,60 \pm 1,71)\%$, quando foi utilizada a mistura dos dois corantes.

5.4. Enxágues pós-tingimento

Primeiramente foram realizados enxágues com água destilada conforme seção 4.2.5. Para todos os enxágues foram definidos como padrão a amostra com apenas um enxágue.

5.4.1. Enxágue com água destilada para o corante Azul 21

Inicialmente foram realizados enxágues pós-tingimento para o corante Azul 21. Para a análise da quantidade de corante, foram analisados parâmetros como ΔE_{cmc} , que é a diferença de cor em relação a um padrão previamente cadastrado calculada pelo uso dos parâmetros L^* , a^* e b^* . Valores maiores de ΔE_{cmc} indicam um maior desbotamento (perda de cor) do tecido com relação ao padrão.

Na Tabela 8 é apresentada à variação da cor do tecido ao longo dos enxágues.

Tabela 8- Valores dos parâmetros dos enxágues com água destilada para o corante Azul 21.

Tipo de lavagem	L*	a*	b*	Intensidade de cor (%)	ΔE_{cmc}
1 enxágue (padrão)	76,31	-26,11	-17,29	–	–
2 enxágues	79,03±0,06	-22,31±0,28	-17,01±0,17	102,19±4,03	1,55±0,19
3 enxágues	78,96±0,44	-22,43±0,19	-17,54±0,32	102,40±4,15	2,07±0,48
4 enxágues	79,40±0,18	-21,95±0,41	-17,22±0,18	96,22±5,54	1,61±0,20
5 enxágues	80,24±0,14	-21,31±0,45	-17,34±0,21	82,86±4,49	1,90±0,07
6 enxágues	80,43±0,22	-21,00±0,25	-17,23±0,18	77,20±1,97	1,98±0,12

A luminosidade do tecido é representada pelo parâmetro L*, que pode variar de 0 a 100. Valores próximos de zero representam a tendência para a cor preto e valores mais próximos de 100 representam a tendência para a cor branco. Neste caso pode-se observar que houve um aumento da luminosidade de cor do padrão para o segundo enxágue de 76,31 para 79,03±0,06, porém após o segundo enxágue se for considerado o desvio padrão, a luminosidade se manteve praticamente constante.

O parâmetro a* representa a alteração de cor no eixo vermelho/verde, valores de a* > 0 indicam uma tendência para o vermelho, enquanto que valores de a* < 0 indicam tendência para o verde, pode-se observar que o parâmetro a* também teve um aumento do padrão para o segundo enxágue de -26,11 para -22,31±0,28, porém, após isso praticamente não variou.

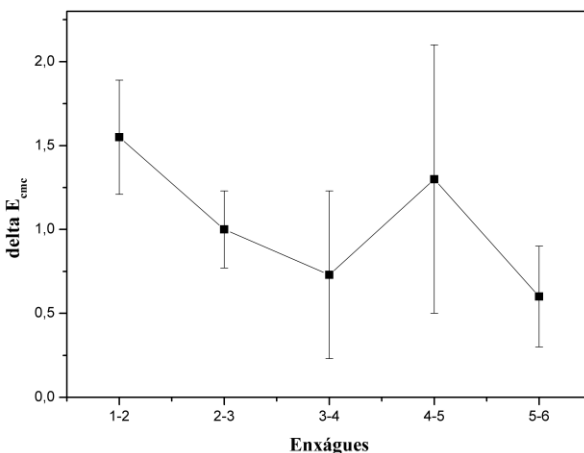
O parâmetro b*, que também foi analisado neste trabalho, representa o eixo amarelo/azul, valores de b* > 0 indicam que as amostras tendem para o amarelo e valores de b* < 0, indicam que as amostras tendem para o azul. Os valores apresentados mostram, em relação ao padrão, que a tendência ao azul foi mantida e permaneceu praticamente constante ao longo dos enxágues.

A intensidade de cor é o parâmetro que indica o quanto da cor a amostra manteve em relação ao padrão. Quanto mais próximo de 100%, mais a cor se aproxima do padrão. Os resultados mostram que a intensidade de cor se perdeu bastante ao longo dos enxágues, no final dos enxágues essa intensidade foi de 77,20±1,97.

Pode-se observar que ΔE_{cmc} que era de $1,55 \pm 0,19$ no segundo enxágue, se for considerado o desvio padrão, a variação foi praticamente à mesma e só foi obtida uma maior variação após o quarto enxágue. Após seis enxágues o ΔE_{cmc} foi de $1,98 \pm 0,12$, evidenciando que houve uma perda de cor, já que houve um aumento do ΔE_{cmc} , porém essa perda pode ser considerada pequena, pois foram realizados seis enxágues.

Na Figura 35 é apresentado a comparação das amostras que passaram por enxágues, considerando sempre dois enxágues, sendo o primeiro o padrão.

Figura 35- Comparação entre as amostras tingidas com Azul 21 que passaram por enxágues com água destilada.



Foram realizadas comparações entre as amostras que passaram pelos enxágues, sempre considerando o anterior como referência. Pode-se perceber que houve um desvio padrão muito grande no ponto 4-5 de $1,30 \pm 0,80$, porém observa-se que houve uma diminuição do ΔE_{cmc} até o enxágue 3-4 e após isso o ΔE_{cmc} obteve uma menor variação. A diminuição do ΔE_{cmc} passou de $1,55 \pm 0,34$ no enxágue 1-2 para $0,60 \pm 0,30$ no enxágue 5-6, evidenciando que não houve uma grande perda de cor ao longo dos enxágues.

5.4.2. Enxágue com água destilada para o corante Vermelho 195

Para o corante Vermelho 195 também foram realizados enxágues com água destilada, após o tingimento, a 30 °C e 10 min. Na Tabela 9 é apresentada a variação da cor do tecido ao longo dos enxágues.

Tabela 9 - Valores dos parâmetros dos enxágues com água para o corante Vermelho 195.

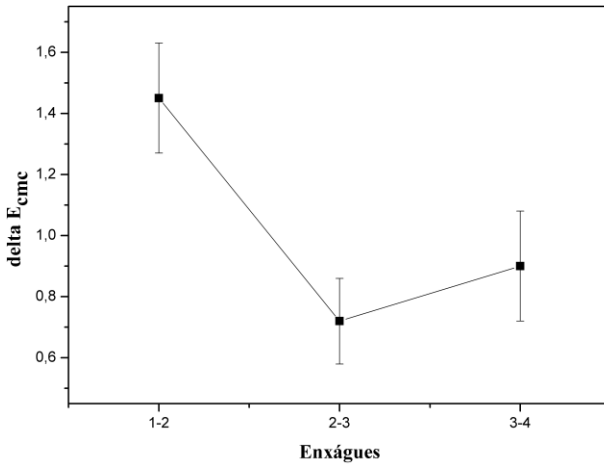
Tipo de Lavagem	L*	a*	b*	Intensidade de cor (%)	ΔE_{cmc}
1 enxágue (padrão)	61,65	41,63	-10,23	-	-
2 enxágues	62,30±0,42	42,57±0,68	-9,64±0,19	98,64±4,64	1,43±0,27
3 enxágues	62,51±0,33	42,85±0,45	-9,56±0,17	98,33±2,07	1,95±0,11
4 enxágues	62,61±0,29	43,22±0,24	-9,78±0,26	97,77±2,85	1,95±0,10

Como pode ser observado, quando utilizou-se o corante Vermelho 195 foram necessários menos enxágues pós-tingimento, a diferença de cor foi pequena ao longo dos enxágues. Pode-se observar que os parâmetros L*, a*, b* não passaram por grandes alterações da cor original do padrão.

A luminosidade L* teve um pequeno aumento do padrão para o segundo enxágue, após isso permaneceu praticamente constante, indicando que o tecido quase não perdeu cor ao longo da lavagem. No parâmetro a* pode-se observar valores de $a^* > 0$ indicando uma tendência para o vermelho que praticamente não se alterou após ao segundo enxágue. No parâmetro b* pode-se observar valores $b^* < 0$ indicando uma tendência para o azul, que passou por uma pequena alteração do padrão para o segundo enxágue e após isso permaneceu praticamente constante. A intensidade de cor também se manteve constante, após quatro enxágues quatro enxágues, 97,77±2,85. O ΔE_{cmc} que inicialmente era de 1,43±0,27 permaneceu constante entre o terceiro e o quarto enxágue em 1,95.

Na Figura 36 é apresentado o comportamento dos enxágues um em relação ao outro, sendo utilizado como referência sempre o enxágue anterior.

Figura 36- Comparação entre as amostras tingidas com Vermelho 195 que passaram por enxágue com água destilada.



Pode-se observar que as amostras tingidas com corante Vermelho 195 e que passaram por enxágues que inicialmente o valor do ΔE_{cmc} diminuiu pela metade de $1,45 \pm 0,18$ para $0,72 \pm 0,14$ e entre os pontos 3-4 esse valor passou para $0,90 \pm 0,18$, obtendo uma pequena variação ou sendo considerado praticamente constante se for considerado o desvio padrão.

5.4.3. Enxágue com água destilada para mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195

Para a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 foram realizados enxágues com água destilada, após o tingimento, a 30 °C e 10 min. Na Tabela 10 é apresentada a variação da cor do tecido ao longo dos enxágues.

Tabela 10- Valores dos parâmetros dos enxágues com água para a mistura dos corantes Azul 21 e vermelho 195.

Tipo de lavagem	L*	a*	b*	Intensidade de cor (%)	ΔE_{cmc}
1 enxágue (padrão)	62,08	14,03	-19,25	-	-
2 enxágues	61,26±0,37	14,30±0,19	-20,30±0,36	108,30±5,29	1,35±0,55
3 enxágues	63,19±0,29	16,10±0,29	-19,24±0,27	78,00±1,88	2,38±0,19

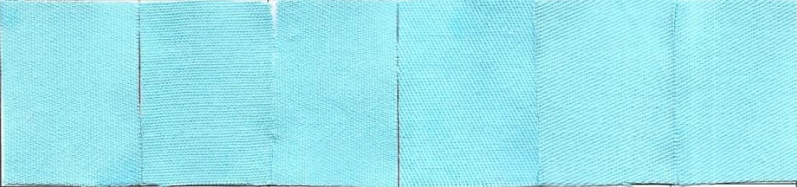


Pode ser observado que quando utilizou-se a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 foram necessários menos enxágues pós-tingimento, a diferença de cor dos parâmetros L*, a*, b* não passaram por grandes alterações da cor original do padrão, porém no caso da mistura a intensidade de cor e o ΔE_{cmc} passaram por alterações significativas.

A luminosidade L* não passou por muita alteração ao longo dos enxágues, somente um pequeno aumento do padrão para o terceiro enxágue. No parâmetro a* pode-se observar valores de $a^* > 0$ indicando uma tendência para o vermelho que aumentou um pouco do segundo para o terceiro enxágue. No parâmetro b* pode-se observar valores $b^* < 0$ indicando uma tendência para o azul, que passou por uma pequena alteração do segundo para o terceiro enxágue. A intensidade de cor diminuiu do segundo para o terceiro enxágue de 108,30±5,29 para 78,00±1,88. O ΔE_{cmc} passou por um grande aumento do segundo para o terceiro enxágue, indicando que no caso da mistura, o tecido passou por uma grande perda de cor, após somente três enxágues.

Quando realizou-se a comparação entre os enxágues, pode-se perceber que entre o enxágue 1-2 o valor de ΔE_{cmc} que era de 1,30±0,48 passou para 3,20± 0,46 no 2-3 enxágue. A maior diferença entre os enxágues foi observada na mistura de corantes, pode-se perceber o mesmo comportamento de quando se utilizou o primeiro enxágue como padrão, uma grande perda de cor, que pode ter ocorrido por uma mistura de corantes não ser tão estável quanto um corante usado individualmente.

A Figura 37 é apresentado a diferença de cor ao longo dos enxágues para os dois corantes e a mistura utilizada.

Figura 37 - Amostras tingidas com corantes Azul 21, Vermelho 195 e mistura de corantes enxaguadas com água destilada a 30 °C e 10 min.

Amostras	Tipos de Lavagens					
Azul 21						
						
1 enxágue (Padrão)	2 enxágues	3 enxágues	4 enxágues	5 enxágues	6 enxágues	
Vermelho 195						
						
1 enxágue (Padrão)	2 enxágues	3 enxágues	4 enxágues			
Azul 21 + Vermelho 195						
						
1 enxágue (Padrão)	2 enxágues		3 enxágues			

Observa-se que para os tecidos tingidos com corantes Azul 21 e Vermelho 195, visualmente não é possível observar uma perda de cor ao longo dos enxágues, na análise dos parâmetros desses tecidos pode-se observar que essa perda foi pequena ao longo dos enxágues. No tecido tingido com a mistura de corantes é possível analisar uma maior perda de cor evidenciada no terceiro enxágue, mesmo comportamento observado na análise dos parâmetros.

5.5. Análise dos parâmetros de cor dos tecidos após remoção de corantes não fixados à fibra de algodão

Foram realizadas lavagens enzimáticas e químicas pós-tingimento para remover os corantes Azul 21, Vermelho 195 e a mistura desses corantes não fixados à fibra de algodão, conforme as seções 4.2.6, 4.2.6.1 e 4.2.6.2. Os resultados serão apresentados

individualmente para cada tipo de corante e para a mistura. Primeiramente serão apresentados os dados relativos à análise da cor dos tecidos após remoção do corante não fixado à fibra de algodão, em seguida os dados de solidez à lavagem do tecido e por último os dados referentes à remoção de corante do efluente do processo de lavagem.

5.5.1. Análise dos parâmetros de cor do tecido para o corante Azul 21

O padrão definido para análise das amostras foi o tecido só tingido e sem lavagem segundo procedimento descrito na seção 4.2.5. Os resultados referentes às lavagens químicas e enzimática são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11- Valores dos parâmetros de medida de cor para o corante Azul 21.

Tipo de Lavagem	L*	a*	b*	Intensidade de cor (%)	ΔE_{cmc}
Padrão (sem lavagem)	76,31	-26,11	-17,29	-	-
Água destilada	80,45±0,14	-21,58±0,15	-16,82±0,10	56,05±1,51	6,14±0,20
Ditionito de sódio	80,30±0,45	-23,57±0,84	-13,00±0,51	39,85±4,33	6,41±0,94
Redutiva	82,05±0,09	-21,39±0,19	-14,91±0,17	52,29±2,42	7,80±0,19
NaOH	81,20±0,02	-20,53±0,23	-15,60±0,07	53,25±2,50	7,60±0,19
Tensoativo não-iônico	80,82±0,38	-21,32±0,71	-16,57±0,34	50,92±4,67	6,62±0,81
Enzimática	77,05±0,06	-24,93±0,40	-18,30±0,14	63,70±1,86	1,86±0,19

5.5.1.1. Análise do parâmetro L* para tecido tingido com Azul 21

Como pode ser observado, em todas as lavagens químicas houve um aumento de L* em relação ao padrão, os valores de L* se aproximaram mais do branco. Quando realizou-se a lavagem enzimática pode-se observar que houve uma menor perda de cor em relação ao padrão de 77,05±0,06, já com a lavagem redutiva foi obtida a maior perda de luminosidade cor do tecido de 82,05±0,09.

5.5.1.2. Análise do parâmetro a^* para tecido tingido com Azul 21

Os valores medidos indicam que as amostras tendem para o verde, pois o $a^* < 0$ em todos os valores. Pode-se observar que com a lavagem com NaOH foi obtida a maior perda de cor em relação ao padrão, o valor de a^* foi de $-20,53 \pm 0,23$ e com a lavagem enzimática foi obtido o valor mais próximo do padrão sem lavagem de $-24,93 \pm 0,40$. Este comportamento demonstra que a lavagem com enzimas resultou em uma tendência maior para o verde, pois o valor apresentado é mais negativo entre todas as lavagens apresentadas.

5.5.1.3. Análise do parâmetro b^* para tecido tingido com Azul 21

Os valores de $b^* < 0$, portanto apresentaram uma maior tendência para o azul.

A amostra onde foi utilizada a lavagem enzimática foi a que apresentou maior tendência para a cor azul - $18,30 \pm 0,14$, enquanto quando foi utilizado ditionito de sódio pode-se observar uma tendência menor ao azul de $-13,00 \pm 0,51$.

5.5.1.4. Análise da intensidade da cor para tecido tingido com Azul 21

Pode-se observar que quando utilizou-se ditionito de sódio, há uma perda muito grande da cor do tecido, onde a intensidade da cor foi de apenas, $39,85 \pm 4,33$ %. Com a lavagem enzimática obteve-se a maior intensidade da cor, o tecido manteve $63,70 \pm 1,86$ % da cor original.

5.5.1.5. Análise do ΔE_{cmc} para tecido tingido com Azul 21

Pode-se observar que em todas as lavagens químicas houve uma perda de cor muito grande da amostra, os valores de ΔE_{cmc} medidos foram grandes e variaram entre (6,14-7,80), apenas quando realizou-se a lavagem enzimática, o tecido apresentou uma menor variação de cor, o ΔE_{cmc} medido foi de $1,86 \pm 0,19$.

Esses resultados evidenciam que quando utiliza-se um corante de ftalocianina, como o Azul 21, a lavagem enzimática é o tipo de lavagem mais indicada, além de remover o corante não fixado à fibra de algodão ainda mantém grande parte da cor do tecido, se comparada com a perda de cor causada por agentes químicos usualmente utilizados na indústria têxtil para remover o corante não fixado.

5.5.2. Análise dos parâmetros de cor do tecido para o corante Vermelho 195

Os mesmos parâmetros analisados para o corante Azul 21 foram avaliados para o corante Vermelho 195, Os resultados referentes às lavagens químicas e enzimática estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Valores dos parâmetros de medida de cor para o corante Vermelho 195.

Tipo de lavagem	L*	a*	b*	Intensidade de cor (%)	ΔE_{cmc}
Padrão (sem lavagem)	61,46	39,12	-11,18	-	-
Água destilada	62,96±0,18	42,26±0,47	-9,24±0,10	97,62±2,11	4,00±0,26
Ditionito de sódio	69,43±0,14	33,38±1,24	-6,19±0,75	54,50±3,68	10,82±1,34
Redutiva	74,26±0,57	26,87±0,67	-4,96±0,23	31,40±1,82	18,77±0,90
NaOH	66,10±0,11	38,53±0,40	-10,35±0,19	72,17±1,12	4,72±0,19
Tensoativo não-iônico	63,00±0,10	42,75±0,60	-9,47±0,20	98,38±3,08	4,37±0,30
Enzimática	63,72±0,54	42,10±0,73	-9,35±0,10	93,76±5,04	4,21±0,19

5.5.2.1. Análise do parâmetro L* para tecido tingido com Vermelho 195

Como pode ser observado, quando se utilizou o corante Vermelho 195 houve um desbotamento menor do que quando foi utilizado o corante Azul 21, os valores de L*, não foram tão próximos de 100, ou seja, se aproximaram menos do branco e mantiveram mais a cor em relação ao padrão. A maior alteração de cor foi observada quando se utilizou a lavagem redutiva com um valor de 74,26±0,57 e a menor alteração foi obtida quando se utilizou água destilada 62,96±0,18.

5.5.2.2. Análise do parâmetro a* para tecido tingido com Vermelho 195

Os valores medidos indicam que as amostras tendem para o vermelho, pois o a* > 0 em todos os valores. Pode-se observar que com a lavagem com NaOH foi obtido um valor de a* de 38,53±0,40 em relação ao padrão, que indica um vermelho mais próximo do padrão. Com a lavagem redutiva foi obtida a menor tendência ao vermelho 26,87±0,67.

5.5.2.3. Análise do parâmetro b^* para tecido tingido com Vermelho 195

Os valores de b^* medidos apresentaram uma tendência maior para o azul, pois $b^* < 0$. A amostra onde foi utilizada a lavagem com NaOH foi a que apresentou maior tendência para a cor azul $-10,35 \pm 0,19$, enquanto quando foi utilizado a lavagem reductiva pode-se observar uma tendência menor ao azul de $-4,96 \pm 0,23$.

5.5.2.4. Análise da intensidade da cor para tecido tingido com Vermelho 195

Pode-se observar que quando se utilizou a lavagem reductiva, houve uma perda muito grande da cor do tecido sendo o valor da intensidade de apenas $31,40 \pm 1,82$ %, com a lavagem reductiva o tecido mantém muito pouco da cor original, e esse comportamento também foi observado com a lavagem com ditionito de sódio, apesar de a perda de cor ter sido um pouco menor. Quando foi utilizada a lavagem com agente tensoativo não-iônico a intensidade da cor foi de $98,38 \pm 3,08$ %, apresentando o maior valor entre todas as lavagens, porém quando utilizou-se água destilada a intensidade da cor foi de $97,62 \pm 2,11$ %, seguido pela lavagem enzimática com uma intensidade de cor de $93,76 \pm 5,04$ %.

5.5.2.5. Análise do ΔE_{cmc} para tecido tingido com Vermelho 195

Pode-se observar que as lavagens com água destilada, NaOH, tensoativo não-iônico e enzimática obtiveram valores próximos ΔE_{cmc} , variando de (4,00-4,72), mostrando que todas essas lavagens tem eficiência parecida quando se trata do corante Vermelho 195, quando comparada com o corante Azul 21, a lavagem enzimática das amostras tingidas com esse corante apresentaram um valor de ΔE_{cmc} de $1,86 \pm 0,19$, tendo uma menor perda de cor em relação a mesma lavagem realizada com corante Vermelho 195. Enquanto quando se utilizou somente ditionito de sódio e a lavagem reductiva, os valores de ΔE_{cmc} foram muito altos, indicando uma grande alteração na cor do tecido, na lavagem reductiva o valor de ΔE_{cmc} foi de $18,77 \pm 0,90$.

5.5.3. Análise dos parâmetros de cor do tecido para a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195

Os mesmos parâmetros analisados para os corantes Azul 21 e Vermelho 195 individualmente foram avaliados para a mistura dos corantes. Para os tecidos tingidos com a mistura de corantes não foram realizadas lavagens redutivas e lavagens com ditionito, conforme descrito no item 4.2.5.1. Os resultados referentes às lavagens químicas e enzimática estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13- Valores dos parâmetros de medida de cor para a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195.

Tipo de Lavagem	L*	a*	b*	Intensidade de cor (%)	ΔE_{cmc}
Padrão (sem lavagem)	61,42	11,40	-19,52	-	-
Água destilada	63,76±0,35	15,84±0,10	-18,73±0,31	71,25±3,50	5,10±0,11
NaOH	66,21±0,57	13,72±0,46	-18,10±0,29	68,94±3,44	5,55±0,36
Tensoativo não-iônico	63,24±0,27	16,66±0,04	-18,55±0,32	70,13±3,00	5,67±0,10
Enzimática	61,81±0,30	13,54±0,24	-19,75±0,30	73,10±0,70	2,22±0,12

5.5.3.1. Análise do parâmetro L* para tecido tingido com mistura de corantes

Como pode ser observado, quando utilizou-se a mistura dos corantes foi obtido um comportamento semelhante ao corante Vermelho 195, um menor desbotamento em relação ao padrão, os valores de L* não se aproximaram tanto de 100. Quando foi realizada a lavagem enzimática foi obtida uma luminosidade de 61,81±0,30 e uma cor que mais se aproximou do padrão sem lavagem. Com a lavagem com NaOH foi obtida uma luminosidade de 66,21±0,57, um pouco mais clara que a amostra sem lavagem.

5.5.3.2. Análise do parâmetro a* para tecido tingido com mistura de corantes

Os valores medidos indicam que as amostras tendem para o vermelho, pois o a* > 0 em todos os valores. Pode-se observar com a lavagem enzimática 13,54±0,24 o valor de a* foi o mais próximo do padrão, indicando que essa foi à amostra que mais manteve a tendência

original a cor do padrão. A amostra lavada com tensoativo não-iônico foi a que manteve menos a cor original do padrão e obteve um valor de $16,66 \pm 0,04$.

5.5.3.3. Análise do parâmetro b^* para tecido tingido com mistura de corantes

Os valores de $b^* < 0$, portanto apresentaram uma maior tendência para o azul. A maior tendência para o azul foi apresentada pelo tecido onde foi realizada a lavagem enzimática com um valor de $-19,75 \pm 0,30$, o mais próximo do padrão. Com as lavagens químicas foram obtidos valores entre $(-18,10$ a $-18,73)$. Mostrando que todos os tecidos tingidos com a mistura dos corantes apresentaram uma tendência maior para o azul, independente da lavagem realizada pós-tingimento.

5.5.3.4. Análise da intensidade da cor para tecido tingido com mistura de corantes

Pode-se observar que a intensidade de cor obtida foi intermediária entre os valores individuais para o Azul 21 e o Vermelho 195. A menor intensidade foi obtida quando utilizou-se a lavagem com NaOH um valor de $68,94 \pm 3,44$ %, com a mesma lavagem foram obtidos $53,25 \pm 2,50$ % com a utilização do corante Azul 21 e $72,17 \pm 1,12$ % com a utilização do corante Vermelho 195 individualmente. Quando realizou-se a lavagem enzimática a maior intensidade de cor foi obtida para mistura dos corantes de $73,10 \pm 0,70$ % utilizando os corantes individualmente foi obtido um valor de $63,70 \pm 1,86$ % para o corante Azul 21 e $93,76 \pm 5,04$ % para o corante Vermelho 195, demonstrando que nesse caso a intensidade da cor também foi um valor intermediário entre as lavagens realizadas em tecidos tingidos monocromicamente.

5.5.3.5. Análise do ΔE_{cmc} para tecido tingido com mistura de corantes

Pode-se observar que em todas as lavagens químicas houve um desbotamento da amostra, os valores de ΔE_{cmc} variaram entre $(5,10-5,67)$, apenas com a lavagem enzimática, o tecido apresentou uma menor variação de cor sendo ΔE_{cmc} medido de $2,22 \pm 0,12$. A lavagem enzimática se apresentou como a mais recomendada quando foi realizada a lavagem dos tecidos tingidos com a mistura de corantes. O valor de ΔE_{cmc} $2,22 \pm 0,12$ foi o menor entre todas as lavagens realizadas.

5.6. Enxágues pós-lavagens químicas e enzimática

Após a realização das lavagens químicas e enzimática foram realizados enxágues para remover o corante que não foi removido durante a lavagem, esses enxágues foram realizados até a absorvância próxima de zero. Somente quando foi realizada a lavagem enzimática foi necessário um enxágue anterior para remover eletrólitos. Na Tabela 14 são apresentadas as lavagens e o número de enxágues necessários para os tecidos tingidos com os corantes Azul 21, Vermelho 195 e a mistura dos corantes.

Tabela 14- Número de enxágues pós-lavagens químicas e enzimática para os corantes Azul 21, Vermelho 195 e mistura.

Tipo de lavagem	Azul 21		Vermelho 195		Mistura	
	Nº de Lavagens	Nº de Enxágues	Nº de Lavagens	Nº de Enxágues	Nº de Lavagens	Nº de Enxágues
Sem lavagem (padrão)	0	0	0	0	0	0
Água destilada	1	1	1	3	1	2
Ditionito	1	1	1	2	1	na
Ditionito+ NaOH	1	3	1	2	1	na
NaOH	1	3	1	3	1	2
Tensoativo não-iônico	1	2	1	3	1	2
Enzimática	1	5	1	5	1	3


















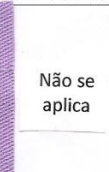
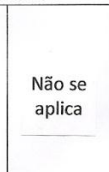


na: não se aplica

Pode-se observar que para o corante Azul 21 foi necessário somente um enxágue após a lavagem com água destilada, com a lavagem enzimática foram necessários cinco enxágues, porém quando analisa-se os parâmetros de cor pode-se perceber que a lavagem enzimática foi a que apresentou menor valor de ΔE_{cmc} $1,86 \pm 0,19$. Quando foi realizada a lavagem com ditionito de sódio também foi necessário somente um enxágue, porém houve uma grande perda de cor demonstrada pelos altos valores ΔE_{cmc} . Quando foi realizado enxágues após a lavagem para os tecidos tingidos com corante Vermelho 195 observa-se que com a lavagem enzimática foram necessários cinco enxágues, porém uma vantagem desse tipo de lavagem é a possibilidade de descolorir o efluente do processo de lavagem juntamente com a

remoção do corante não fixado à fibra. Para a mistura de corantes observa-se que foram necessários três enxágues, porém no primeiro enxágue a água de lavagem poderia ser reutilizada.

Na Figura 38 é apresentada a diferença de cor das lavagens realizadas com agentes químicos e enzima peroxidase em relação ao padrão sem lavagem, para os corantes Azul 21, Vermelho 195 e mistura Azul 21 e Vermelho 195.

Figura 38 - Amostras tingidas com corantes Azul 21, Vermelho 195 e mistura de corantes e lavadas com vários aditivos químicos e enzimas peroxidase.

Amostras	Tipos de Lavagens					
Azul 21						
						
Padrão (sem lavagem)	Enzimática	Água destilada	Ditionito de sódio	Ditionito + NaOH	NaOH	Tensoativo não-iônico
Vermelho 195						
						
Padrão (sem lavagem)	Enzimática	Água destilada	Ditionito de sódio	Ditionito + NaOH	NaOH	Tensoativo não-iônico
Azul 21 + Vermelho 195						
						
Padrão (sem lavagem)	Enzimática	Água destilada	Ditionito de sódio	Ditionito + NaOH	NaOH	Tensoativo não-iônico

Pode-se observar que as lavagens com ditionito, ditionito + NaOH e NaOH, apresentaram visualmente uma grande perda de cor em

relação ao padrão sem lavagem. Esta perda de cor também pode ser percebida na lavagem com água destilada e tensoativo não-iônico, porém em menor intensidade. Observa-se que o tecido lavado enzimaticamente foi o que apresentou a cor mais próxima do padrão sem lavagem.

5.7. Testes de solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corantes reativos

Para todos os tecidos que passaram por enxágues e lavagens enzimáticas e químicas foram realizados testes de solidez à lavagem conforme a Norma NBR ISO 105-C10, descrita no seção 4.2.8.2.

5.7.1. Testes de solidez à lavagem dos tecidos enxaguados com água destilada

Primeiramente serão apresentados os resultados dos testes de solidez à lavagem nos tecidos enxaguados com água destilada. Posteriormente serão apresentados os resultados referentes aos estudos de lavagem enzimática e química.

5.7.1.1. Testes de solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Azul 21 e enxaguados com água destilada

Inicialmente foram realizados testes de solidez à lavagem nos tecidos tingidos com Azul 21 e enxaguados com água destilada. Os resultados destes testes são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Azul 21 e enxaguados com água destilada.

Tipo de lavagem	Nota 100% CO	Nota 100% PA
1 enxágue (padrão)	4,24±0,07	4,78±0,10
2 enxágues	4,36±0,04	4,76±0,02
3 enxágues	4,36±0,03	4,71±0,02
4 enxágues	4,35±0,03	4,73± 0,01
5 enxágues	4,35±0,01	4,77±0,05
6 enxágues	4,36±0,06	4,77±0,01

Em análise verificou-se que os tecidos tingidos com Azul 21 e enxaguados com água destilada, apresentaram solidez à lavagem Grau 4-5, que é considerada boa solidez, conforme apresentado na escala de

cinzas descrita no Anexo A. Pode-se observar que para o tecido-testemunha de algodão a solidez à lavagem apresentou uma alteração de cor do padrão para o segundo enxágue. Essa variação foi de $4,24 \pm 0,07$ no padrão e passou para $4,36 \pm 0,04$ no segundo enxágue, porém após essa variação permaneceu constante até o sexto enxágue. Quando foi utilizado o tecido-testemunha de poliamida essa variação foi bem menor, as notas de solidez à lavagem permaneceram praticamente constante.

5.7.1.2. Testes de solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e enxaguados com água destilada

Posteriormente os mesmos ensaios de solidez à lavagem foram realizados nos tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e enxaguados com água destilada. Os resultados destes testes são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e enxaguados com água destilada.

Tipo de lavagem	Nota 100% CO	Nota 100% PA
1 enxágue (padrão)	4,43	4,90
2 enxágues	$4,38 \pm 0,03$	$4,86 \pm 0,07$
3 enxágues	$4,37 \pm 0,02$	$4,77 \pm 0,04$
4 enxágues	$4,39 \pm 0,01$	$4,70 \pm 0,03$

Os tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e enxaguados com água destilada apresentaram alteração de cor Grau 4-5. Pode-se perceber que houve uma alteração de cor muito pequena ao longo dos enxágues, para o tecido-testemunha de algodão essa alteração pode ser notada principalmente do primeiro para o segundo enxágue, depois disso a nota de solidez à lavagem se manteve constante. Para os tecido-testemunha de poliamida observa-se que a transferência de cor foi um pouco maior de 4,90 para $4,70 \pm 0,03$, após quatro enxágues. Segundo Valente e Oliveira (2011) os corantes são mais rapidamente absorvido em fibras de poliamida, com isso pode-se observar uma maior perda de cor.

5.7.1.3. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 e enxaguados com água destilada

Testes de solidez à lavagem também foram realizados nos tecidos tingidos com a mistura dos corantes e que passaram por enxágues com água destilada, posterior ao tingimento. Os resultados deste teste são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 e enxaguados com água destilada.

Tipo de lavagem	Nota 100% CO	Nota 100% PA
1 enxágue (padrão)	4,38±0,04	4,63±0,03
2 enxágues	4,33±0,01	4,61±0,05
3 enxágues	4,37±0,02	4,61±0,06

Os tecidos tingidos com a mistura de corantes e enxaguados com água destilada apresentaram alteração de cor grau 4-5. Analisando os resultados verificou-se que a amostra quase não sofreu alterações de cor ao longo dos enxágues, pode-se observar que tanto para o tecido-testemunha de algodão quanto para o tecido-testemunha de poliamida, a transferência de cor pode ser considerada praticamente constante.

5.7.2. Testes de solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corantes e lavados com aditivos químicos e enzimas

Os tecidos tingidos com corantes e lavados com vários aditivos químicos e enzima também passaram por testes de solidez à lavagem.

5.7.2.1. Testes de Solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Azul 21 e lavados com aditivos químicos e enzimas

Primeiramente foram realizados testes de solidez à lavagem nos tecidos anteriormente tingidos com corante Azul 21 e lavados com aditivos químicos e com enzima peroxidase. Os resultados destes testes são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 - Solidez à lavagem de tecidos tingidos com corante Azul 21 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase.

Tipo de lavagem	Nota 100% CO	Nota 100% PA
Padrão (sem lavagem)	4,16	4,74
Água destilada	4,36±0,03	4,80±0,05
Redutiva	4,32±0,08	4,61±0,00
Ditionito	4,30±0,02	4,59±0,06
NaOH	4,34±0,02	4,70±0,03
Agente Tensoativo	4,34±0,03	4,72±0,02
Enzimática	4,06±0,08	4,67±0,04

Os resultados mostraram que todos os tecidos apresentaram alteração de cor do substrato Grau 4-5. Para os tecidos tingidos com corante Azul 21 e lavado com vários aditivos químicos e enzima peroxidase, pode-se observar que quando foi utilizado como tecido-testemunha algodão a amostra que sofreu menor alteração na cor, em relação ao padrão sem lavagem, foi à amostra que passou anteriormente pela lavagem enzimática 4,06±0,08. Nas amostras que passaram por lavagens químicas foi observado um aumento da nota de solidez à lavagem que pode evidenciar uma mudança na intensidade da cor, provavelmente ocorrida durante alguma etapa do teste de solidez à lavagem, porém seriam necessários mais testes para uma melhor verificação. Quando utilizou-se como tecido-testemunha poliamida pode-se observar uma pequena variação de cor, que foi maior nos tecidos anteriormente lavados com ditionito de sódio e lavagem redutiva, a lavagem com tensoativo não-iônico foi a que apresentou nota de solidez a lavagem mais próxima do padrão 4,72±0,02.

5.7.2.2. Testes de solidez à lavagem dos tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e lavados com aditivos químicos e enzimas

Foram realizados testes de solidez à lavagem nos tecidos anteriormente tingidos com corante Vermelho 195 e lavados com aditivos químicos e com enzima peroxidase. Os resultados destes testes são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Solidez à lavagem de tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase.

Tipo de lavagem	Nota 100% CO	Nota 100% PA
Padrão (sem lavagem)	4,36	4,89
Água destilada	4,35±0,08	4,84±0,02
Redutiva	4,32±0,10	4,90±0,03
Ditionito	4,38±0,04	4,79±0,10
NaOH	4,34±0,03	4,70±0,03
Agente Tensoativo	4,32±0,13	4,83±0,11
Enzimática	4,38±0,07	4,78±0,08

Os resultados mostraram que todos os tecidos tingidos com corante Vermelho 195 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase, apresentaram alteração de cor do substrato Grau 4-5. Em análise verificou-se que as amostras com tecido-testemunha de algodão não sofreram grandes alterações de cor em relação ao padrão sem lavagem, no entanto, para as amostras com tecido-testemunha de poliamida pode-se observar uma maior alteração no tecido que passou por lavagem com ditionito de sódio $4,70\pm 0,03$, a lavagem redutiva foi a que mais se aproximou da nota de solidez à lavagem do padrão $4,90\pm 0,03$.

5.7.2.3 Testes de solidez a lavagem dos tecidos tingidos com mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 e lavados com aditivos químicos e enzimas

Os ensaios de solidez à lavagem que foram realizados para os corantes individualmente foram aplicados para a mistura dos corantes. Os resultados dos testes solidez à lavagem de tecidos tingidos com a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Solidez à lavagem de tecidos tingidos com a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 e lavados com vários aditivos químicos e enzima peroxidase.

Tipo de lavagem	Nota 100% CO	Nota 100% PA
Padrão (sem lavagem)	4,5	4,78
Água destilada	4,40±0,02	4,87±0,04
NaOH	4,41±0,02	4,80±0,13
Agente Tensoativo	4,38±0,04	4,63±0,03
Enzimática	4,24±0,01	4,78±0,03

Quando utilizou-se o tecido-testemunha de algodão, pode-se observar uma maior transferência de cor se comparado ao padrão sem lavagem. Essa transferência foi mais pronunciada no tecido que passou pela lavagem enzimática $4,24 \pm 0,01$. Quando foi utilizado o tecido-testemunha de poliamida praticamente não houve diferença de cor entre o padrão sem lavagem e o tecido onde foi utilizada a lavagem enzimática. Neste caso a amostra que obteve maior transferência de cor foi à amostra lavada com agente tensoativo não-iônico $4,63 \pm 0,03$.

5.8. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem

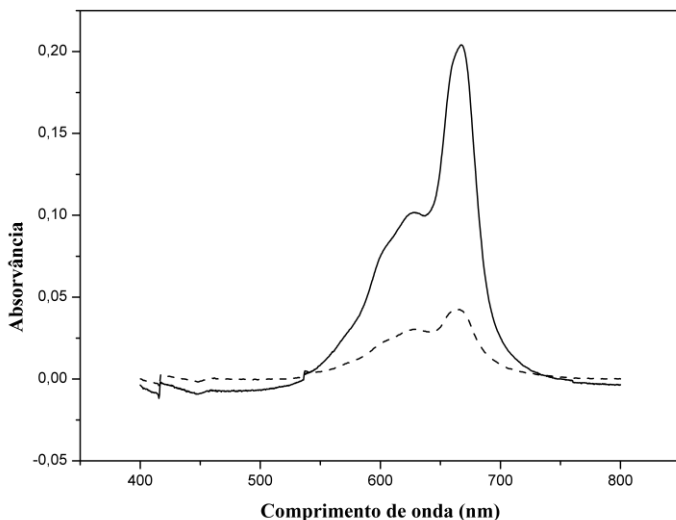
A remoção do efluente do processo de lavagem é um dos grandes problemas do setor têxtil. Estima-se que cerca de 15% da produção mundial de corantes é perdida para o meio-ambiente durante a síntese, processamento ou aplicação desses corantes. Isso representa um lançamento de cerca de 1,20 t por dia desta classe de compostos para o meio-ambiente. A principal fonte desta perda corresponde à incompleta fixação dos corantes (10-20%), durante a etapa de tingimento das fibras têxteis (GUARATININI; ZANONI, 2000). A lavagem enzimática utilizada para remover corante não fixado à fibra de algodão também foi utilizada para remover os corantes Azul 21, Vermelho 195 e a mistura dos corantes, conforme citada na seção 4.2.7, presente no efluente de lavagem. Optou-se por descolorir a água do efluente de lavagem ao invés da água do efluente de tingimento, porque na água do efluente de tingimento grandes quantidades de sais como sulfato de sódio e carbonato de sódio estão presentes. Mesmo com um enxágue anterior feito para todas as lavagens a eliminação dos eletrólitos contidos na superfície do tecido não é completa, interferindo na atividade enzimática. Segundo Silva et al. (2012) a eficiência do tratamento enzimático é menor neste caso porque pode ocorrer a formação de

ligações químicas fortes com as espécies envolvidas no meio reacional (enzima, aditivos químicos e sais) como, por exemplo, a hidrólise do corante, podendo influenciar de forma direta à especificidade enzima-substrato, à formação de produtos ou à desativação da enzima. O tempo reacional para todas as lavagens foi fixado em 45 min, após esse tempo a remoção de corante torna-se negligenciável.

5.8.1. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem para o corante Azul 21

Neste estudo foi avaliada a remoção do efluente do processo de lavagem para o corante Azul 21 utilizando a enzima *Horseradish* peroxidase. Essa remoção foi realizada na mesma etapa de remoção do corante não fixado à fibra de algodão. Os espectros de absorção foram obtidos utilizando 0,5 mL de enzima 29,85 U/mL, 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM, Tampão citrato-fosfato 0,05 M, pH 4 e 30 °C. Na Figura 39 é apresentado o espectro de absorção do corante Azul 21 antes e depois do tratamento enzimático.

Figura 39 - Espectro de absorção do corante Azul 21 antes e depois do tratamento com a enzima *Horseradish* peroxidase [condições reacionais: 0,5 mL de enzima 29,85 U/mL, 0,1 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM, tampão citrato-fosfato 0,05M, pH 4, 30 °C e 45 minutos de reação].



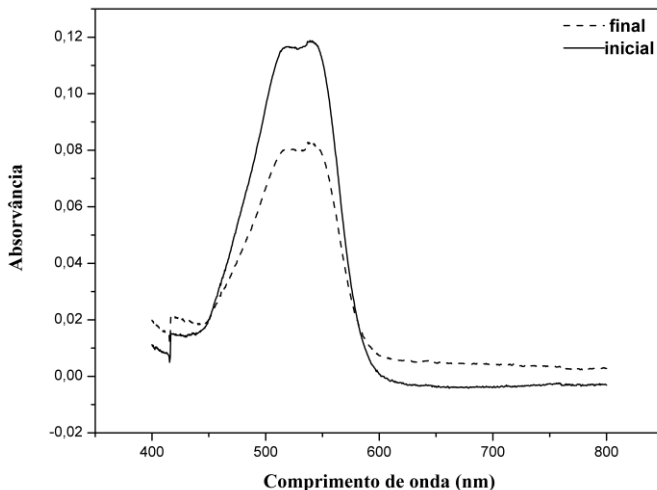
No intervalo de comprimento de onda estudado, os resultados mostraram que quando realizou-se a remoção do efluente do processo de lavagem para o corante Azul 21, pela enzima *Horseradish* peroxidase foi obtida uma descoloração de 79%. Observa-se que a água do efluente de lavagem enzimática apresentava resíduos de sulfato de sódio e carbonato de sódio da etapa de tingimento, verificados através da medida da condutividade final da solução 3,76 mS. Através desse valor é possível perceber que sem um enxágue anterior a lavagem enzimática, seria difícil remover o corante presente, pela alta concentração de eletrólitos. Entretanto, neste estudo, como foi realizado um enxágue anterior à lavagem enzimática pode-se observar que os eletrólitos não influenciaram de forma direta na atividade da enzima.

Silva et al. (2012) realizaram a descoloração de efluente sintético simulado contendo corante Azul 21 na presença de aditivos químicos como agentes dispersantes, sequestrantes e sais, utilizando a peroxidase do nabo, a descoloração obtida foi de 37% após 95 min de contato.

5.8.2. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem para o corante Vermelho 195

A remoção enzimática do efluente do processo de lavagem também foi avaliada para o corante Vermelho 195. As condições reacionais utilizadas estão descritas na Figura 39. Na Figura 40 é apresentado o espectro de absorção do corante Vermelho 195 antes e depois do tratamento com enzima *Horseradish* peroxidase.

Figura 40- Espectro de absorção do corante Vermelho 195 antes e depois do tratamento com a enzima *Horseradish* peroxidase [condições reacionais: Descritas na Figura 39].



Observa-se que quando foi utilizada a enzima *Horseradish* peroxidase para descolorir o corante Vermelho 195 sob condições de lavagem enzimática, foi obtida uma descoloração de 31%. Esse resultado foi superior à degradação enzimática de corante sem aditivos químicos, onde a descoloração máxima foi de 7,0%. Para o corante Vermelho 195 também foi medida a condutividade final do efluente de lavagem enzimática que era de 3,97 mS.

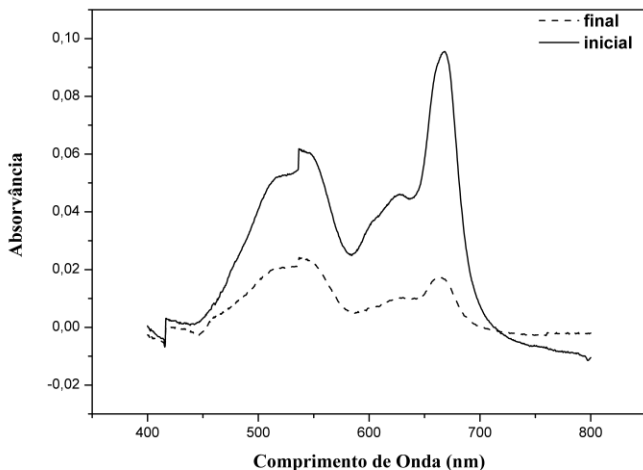
Pereira et al. (2010) realizaram a descoloração do corante Vermelho 195 utilizando o fungo *Lentinula edodes* em pH 5 e obtiveram 91% de descoloração em 15 dias de incubação. Sugere-se pesquisas adicionais para o aumento do rendimento de descoloração do efluente do processo de lavagem, utilização de um mediador redox ou a utilização de outra enzima como lacase.

5.8.3. Remoção enzimática do efluente do processo de lavagem para a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195

A remoção enzimática do efluente do processo de lavagem também foi avaliada para a mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195. As condições reacionais utilizadas estão descritas na Figura 39. Na

Figura 41 é apresentado o espectro de absorção da mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 antes e depois do tratamento com enzima *Horseradish* peroxidase.

Figura 41- Espectro de absorção da mistura de corantes Azul 21 e Vermelho 195 antes e depois do tratamento com a enzima *Horseradish* peroxidase [condições reacionais: Descritas na Figura 39].



Como pode ser observado para mistura de corantes a descoloração obtida foi maior do que quando utilizou-se os corantes individualmente. Quando foi realizada a descoloração do efluente de lavagem foi obtida uma descoloração na mistura de 60% para o corante Vermelho 195 e 81% para o corante Azul 21, verificados pelos picos cromóforos antes e depois da reação de lavagem enzimática.

Um efeito importante observado no presente trabalho foi o efeito sinérgico da ação enzimática quanto os dois corantes estavam presentes no tingimento. A remoção do corante Vermelho 195 foi aumentada de 31% para 60%.

Silva et al. (2012) realizaram a descoloração dos corantes Azul brilhante remazol, Vermelho ultra remazol e Laranja brilhante remazol 3R utilizando a peroxidase do nabo (64,28 U/mL). A remoção obtida foi de 69% para o corante Azul brilhante remazol em 30 min, 18,7% para o corante Vermelho ultra remazol em 40 min e 26% para o corante Laranja brilhante remazol 3R em 90 min de reação.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

- Nos ensaios de degradação enzimática máxima descoloração do corante Azul 21 foi de 77% utilizando uma concentração de corante de 30 mg/L e temperatura de 20 °C, para o corante Vermelho 195 a máxima descoloração foi de 7,0% obtida para uma concentração de corante de 30 e 50 mg/L na temperatura de 30 °C, para a mistura dos dois corantes foi aplicada as mesmas condições porém a concentração de corante foi de 60 mg/L a 30 °C, nestas condições foram obtidas 23% de descoloração para o Vermelho 195 e 45% para o Azul 21. Todos resultados obtidos em pH 4 e 1 h de reação.
- Nos tingimentos foram obtidos fixações na fibra de algodão de $(86,41 \pm 2,27)\%$ para o corante Azul 21, $(97,20 \pm 1,47)\%$ para o corante Vermelho 195 e $(88,60 \pm 1,71)\%$ para a mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195.
- Nos ensaios de enxágues de tecidos de algodão pós-tingimento com água destilada o tecido tingido com corante Azul 21 precisou de 6 enxágues, o com Vermelho 195 de 4 enxágues e o com a mistura de corantes de 3 enxágues, os corantes Azul 21 e Vermelho 195 não apresentaram grande perda de cor durante os enxágues, porém a mistura de corantes apresentou uma perda maior perda de cor ao longo dos 3 enxágues.
- Nos estudos de remoção de corante não fixado à fibra de algodão, com a lavagem enzimática foram obtidos os menores valores de ΔE_{cmc} entre todas as lavagens, para o corante Azul 21 e para a mistura dos corantes foram obtidos valores de 1,86 e 2,22 respectivamente. Para o corante vermelho 195 o menor valor de ΔE_{cmc} 4,0 foi obtido quando foi realizada a lavagem com água destilada.
- Nos ensaios de solidez à lavagem os dois corantes e a mistura dos corantes apresentaram solidez à lavagem Grau 4-5, que indica uma boa solidez ou fraca perda de intensidade de cor.
- Nos ensaios de remoção da cor do efluente do processo de lavagem foi obtida uma remoção de 79% para o Azul 21, 31% para o Vermelho 195 e para a mistura dos corantes foi obtida

uma remoção de 60% para o vermelho 195 e 81% para o Azul 21 podendo ser verificado pela diminuição dos picos cromóforo apresentado nos espectros de absorção antes e depois da reação enzimática. Evidenciando que para o corante Azul 21 e para a mistura o efluente do processo de lavagem poderia ser reaproveitado.

- Um efeito importante observado no presente trabalho foi o efeito sinérgico da ação enzimática quanto os dois corantes estavam presentes no tingimento. A remoção do corante Vermelho 195 foi de aumentada de 31% para 60 %.

Avaliando-se os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

A utilização da enzima *Horseradish* peroxidase como biocatalisador se mostrou viável na remoção de corantes reativos de difícil degradação, não fixado às fibras de algodão. Além de conferir brilho e manter a intensidade de cor, a enzima atua em condições brandas de reação como temperaturas próxima da ambiente e pH levemente ácido. Em uma mesma etapa foi possível remover o corante da fibra de algodão e de grande parte do efluente do processo de lavagem, principalmente corantes de ftalocianina como Azul 21 e misturas de corantes, podendo ser aplicada para diminuir a geração de efluentes coloridos que são o grande problema de indústrias têxteis e agregar valor ao produto final.

6.2. Sugestões

A partir dos resultados obtidos, têm-se como sugestões para trabalhos futuros:

- Utilizar outras classes de corantes reativos para verificar o efeito da lavagem enzimática com peroxidase;
- Estudar a descoloração de corantes utilizando a enzima peroxidase através da determinação das melhores condições reacionais como quantidade de enzima, concentração de corante, quantidade de peróxido de hidrogênio, pH e temperatura, para outros grupos de corantes;
- Estudar a descoloração de corantes utilizando a enzima lacase através da determinação das melhores condições reacionais como quantidade de enzima, concentração de corante, pH e temperatura;

- Realizar lavagens enzimáticas utilizando as enzimas peroxidase e lacase;
- Comparar as lavagens enzimáticas com peroxidase e lacase com lavagens químicas;
- Analisar os produtos de degradação enzimática

REFERÊNCIAS

- AKCAKOCA, E. P.; OZGUNEY, A.T.; ATAV, R. **The efficiency of washing agents in the post-dyeing removal of hydrolyzed reactive dye.** *Dyes and Pigments* v.72, p.23-27, 2007.
- ALMEIDA, V.S. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação e extração de corantes têxteis em efluentes industriais.** Tese (Programa de Pós-Graduação em Química)- Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- ANDREU, V. **Água limpa é condição para bem-estar nas cidades.** Revista Capital Público, 2010. Disponível em: ANA-Agência Nacional de Águas. www.2.ana.gov.br. Acesso em novembro 2012.
- BALAMURUGAN, B.; THRUMARIMURUGAN, M.; KANNADASSAN, T. **Anaerobic degradation of textile dye bath effluent using *Halomonas sp.*** *Bioresource Technology* v.102 p. 6365-6369, 2011.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,** *Analytical Biochemistry* v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUCHANAN, I, D.; NICELL, J.A. **Kinetics of Peroxidase Interactions in the Presence of a Protective Additive.** *J. Chem. Technol. Biotechnol.* v.72, p.23-32, 1998.
- BURLINSHAW, S.M; HOWROYD, J; KABAMBE, O; KUMAR, N; **The wash-off of dyeings using interstitial water part 2: Bis(aminochlorotriazine) reactive dyes on cotton.** *Dye and Pigments* v.91, p. 134-144, 2011.
- BURKINSHAW, S.M.; KUMAR, N. **Polyvinyl alcohol as an after treatment: Part 3 direct dyes on cotton.** *Dyes and Pigments* v.85, p.124-132, 2010.
- CAVACO, P. A.; GUBITS, G.M. **Textile processing with enzymes,** 2003.

CHEN, G.; HUANG, M. H.; CHEN, L.; CHEN, D. H. **A batch decolorization and kinetic study of reactive black 5 by a bacterial strain *Enterobacter* sp. GY-1.** *International Biodeterioration & Biodegradation* v. 65 p. 790-796, 2011.

COLLIER, B. J.; TORTORA, P.G. **Understanding Textile.** v.11, Ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, 2001.

COMPANHIA PERNAMBUCANA DO MEIO AMBIENTE.
Roteiro complementar de licenciamento e fiscalização para tipologia têxtil. Recife: CPRH/GTZ, p.1-125, 2001.

CONAMA-Conselho Nacional do meio ambiente. Resolução nº 313, de 29 de outubro de 2002.

CORREA, A.D.; SILVA, M.C.; AMORIM, T.S.P.; PARPOT, P.; TORRES, J.A.; CHAGAS, P.M.B. **Decolorization of the phthalocyanine reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.77, p. 9– 14, 2012

COSTA, R. H. R.; MARTINS, G. B. H. **Práticas limpas aplicadas as indústrias têxteis do estado de Santa Catarina.** *19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, p.804-813, 1997.

DIAS, M. **Estabilidade à radiação UV em estamparia do corante urucum adsorvido em argila caulim.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FERREIRA, D. D. M; KELLER, J; SILVA, L. E. **A UTILIZAÇÃO DA ÁGUA PELA INDÚSTRIA TÊXTIL: UMA PESQUISA NO MUNICÍPIO DE BRUSQUE, SC.** *Inter science place* n. 8, 2009.

FIESP/CIESP-(FIESP-Federação das Indústrias do Estado de São Paulo/CIESP-Centro das Indústrias do Estado de São Paulo) (<http://www.fiesp.com.br/> www.ciesp.com.br/). Acesso março de 2013.

FORGIARINI, E. **Degradação de Corantes e Efluentes Têxteis Pela Enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP),** Dissertação (Programa de

Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

FREIRE, R. S.; PEREIRA, W. S. **Ferro zero: Uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes.** *Quím. Nova.* v.28, n.1, p. 130-136, 2005.

FREITAS, K. R. **Caracterização e reuso de fluentes do processo de beneficiamento da indústria têxtil.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

GARCIA T.A., SANTIAGO M.F., ULHOA C.J. **Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylydine.** *Biotechnol* v.28. p.633–636, 2006.

GUARANTINI, C.I.; ZANONI, V.B. **Corantes Têxteis.** *Quím. Nova.* V. 23, p. 71- 78, 2000.

HAMEDAANI, H. R. K.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. **Descolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus.** *Dyes and Pigments* v.72 p.157-162, 2007.

HEBEISH, A.; HASHEM, M.; SHAKER, N.; RAMADAN, M.; SADEK, B. E. **New development for combined bioscuring and bleaching of cotton-based fabrics.** *Carbohydrate Polymers.* v.78 p.961-972, 2009.

HUNTERLAB. **CIEL*A*B* Color Scale.** Aplications Note. n.7, v.8, p1-4, 2008.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em novembro de 2012.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; QIDWAI, T. **Potential of peroxidase enzyme from *Trichosanthes dioica* to mediate disperse dye decolorization in conjunction with redox mediators.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v.66, p.177–181, 2010.

KADNIKOVA, E. N.; KOSTIC, N. M. **Oxidation of ABTS by Hydrogen Peroxide Catalyzed by Horseradish Peroxidase**

Encapsulated into Sol-Gel Glass. Effects of Glass Matrix on Reactivity, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* v. 18, p. 39-48, 2002.

KARAM, J.; NICELL, J. **Potencial applications of enzymes in waste treatment**. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* V. 69, p.141-153, 1997.

KARMAKAR, S.R. **Desizing**. *Textile Science and Technology* v. 12, p. 69-85, 1999.

KHEHRA, M.S.; SAINI, H.S.; SHARMA, D, K.; CHADHA, B. S.; CHMNI, S. S. **Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by na anoxiceaerobic sequential bioreactor**. *Dyes and Pigments* v.70, p1-7, 2006.

KHLIFI, R.; BELBAHRI, L.; WOODWARD, S.; ELLOUZ, M.; DHOUIB, A.; SAYADI, S.; MECHICHI, T. **Decolourization and detoxification of textile industry wasterwater by the laccase-mediator system**. *Journal of Hazardous Materials* v. 175, p. 802-808, 2010.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G., DURAN, N. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis**. *Quím. Nova*. v.25, n.1, p. 78-82, 2002.

LEENA, R.; SELVA, R. D. **Bio-descolourization of textile effluent containing reactive Black-B by effluent-adapted and non-adapted bacteria**. *African Journal of Biotechnology* v.7, p. 3309-3313, 2008.

LEVIN, L.; GRASSI, E.; CARBALLO, R. **Efficient azoic dye degradation by *Trametes trogii* and a novel strategy to evaluate products released**. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 75, p.214-222, 2012.

LIMA, R. G.C.; FERREIRA, O. M. **Resíduos industriais-Métodos de tratamento e análise de custos**, 2007.

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

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

MENEZES, A. P. V. **Tensoativos na indústria têxtil.** *Química têxtil.* n. 80, p. 54-74, 2005.

MINISTÉRIOS DA SAÚDE-PORTARIA nº36 de 19/01/90. Disponível em:http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/portaria36_19_01_90.pdf. Acesso em novembro de 2012.

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

MONTIBELLER, M. M. **Remoção de fenol de águas residuárias método de polimerização e precipitação com enzima *Horseradish* peroxidase (HRP),** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MURUGESAN, K.; NAM, I.H.; KIM, Y. M.; CHANG, Y. S. **Descolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.40 p.1662–1672, 2007.

NELSON, D L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3^a Ed ,Worth Publishers, Cap 8, 2000.

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

NGUYEN, T. A; JUANG, R-S. **Treatment of waters and wastewaters containing sulfur dyes: A review.** *Chemical Engineering Journal* v. 219, p.109–117, 2013.

OLIVEIRA, G L; MANTOVANI, M S. *Quim. Nova*, v.32, n. 3, p. 742-756, 2009.

PATRA, D.; BARAKAT, C. **Synchronous fluorescence spectroscopic study of solvatochromic curcumin dye**. *Spectrochimica Acta*. v. 79, p.1034-1041, 2011.

PEREIRA, A. R. B; BUENO, F.L; SANTOS, S.C; LIMA, C. A. A; DIAS, A. L. T. **Biodegradação de corantes e efluentes têxteis por fungos**. *Holos environment* v.10, n.2, p. 165-179, 2010.

PETERS, S. **Cutting Water Use in the Textile Industry**. The New York Times, 2009. Disponível em: <http://www.nytimes.com>. Acesso em novembro de 2012.

PICCOLI, H.H. **Determinação do Comportamento Tintorial de Corantes Naturais em Substrato de Algodão**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

POLTEX- Polido Têxtil S.A. **Indústria Têxtil no Brasil e no Mundo**, Disponível em www.poltex.com.br. Acesso em novembro de 2012.

SCHMITT, S. **Remoção de corante disperso não-fixado de fibras de poliéster através de uso de enzimas oxidoreduzases para redução de águas de lavagem**, Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2010.

<http://sellerink.com.br>. Acesso em dezembro de 2012.

<http://serbiofundamental.wordpress.com>. Acesso em novembro de 2012.

SILVA, M. C.; CORREA, A. D.; TORRES, J. A.; AMORIM, M. T. S. **P. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*)**. *Quím. Nova*. v.35, n.5, p. 889-894, 2012.

SILVA, R. **Tratamento de fibras têxteis com ultra-sons e enzimas**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química Têxtil)- Universidade do Minho, Portugal, 2006.

SOARES, G. M. B. **Aplicação de sistemas enzimáticos a degradação de corantes têxteis**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química Têxtil)- Universidade do Milho, Portugal, 2000.

SONG, S.; FAN, J.; HE, Z.; ZHAN, L.; LIU, Z.; CHEN, J.; XU, X. **Electrochemical degradation of azo dye C.I.Reactive Red 195 by anodic oxidation on Ti/SnO₂-Sb/PbO₂ electrodes**. *Electrochimica Acta*. v. 55, p. 3606-3613, 2010.

TILLI, S.; CIULLINI, I.; SCOZZAFAVA, A.; BRIGANTI, FABRIZIO, B. **Differential decolorization of textile dyes in mixtures and the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase activities present in extracellular extracts from *Funalia trogii***. *Enzyme and Microbial Technology*. v.49, p.465– 471, 2011.

TIMOFEI, S.; SCHMIDT, W; KURUNCZI, L; SIMON, Z. **A review of QSAR for dye affinity for cellulose fibres**. *Dyes and pigments*. v. 47, p 5-16, 2000.

TINOCO, R; VERDIN, J; DUHALT-VAZQUEZ, R. Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adust*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.v.46, p.1–7, 2007.

TOLEDO, R. A. S. **Tecnologia da Reciclagem**. *Química Têxtil*, p.8-14, 2004.

TWARDOKUS, R. G. **Reuso de água no processo de tingimento da indústria têxtil**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

URBAN, M. L. P.; BESEN, G. M. V.; GONÇALVES, J. S.; SOUZA, S. A. M. **Desenvolvimento da produção de têxteis de algodão no Brasil**. *Informações Econômicas*. v.25, n.12, 1995.

ULSON de Souza A.A.; GUELI, U. Souza. S.M.A.; VALLE, J.A.B.; VASQUES, A.R.; Patent: ECO-COLOR REMOVE. **Composto Adsorvente, Processo para sua Preparação e Processo para Tratamento de Efluentes Adsorbent compound, process for its**

preparation and process for the treatment of effluents. Brazilian Patent INPI – RJ PI 0703182-3; 2007.

VALENTE, A.C.; OLIVEIRA, R. **Poliamida: Solidez da cor para o desenvolvimento da indústria.** Revista da Unifebe, p 1-17, 2011.

WHITE, A.; PHILIP, H; EMIL, L S. **Princípios de Bioquímica.** 5ª Ed, Rio de Janeiro, p.211, 1976.

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*, v. 31, p. 2699-2704, 1997.

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

ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P.A. **O descarte dos corantes têxteis.** *Ciência hoje.* v.29, nº 174, p. 61-64, 2001.

Zeng, X.; Cai, Y.; Liao, X.; Zeng, X.; Li, W.; Zhang, D. **Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated Trametes trogii strain cultivated on solid agro-industrial residue.** *Journal of Hazardous Materials*, v.187, p.517-525, 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Curvas de Calibração

No Apêndice A são apresentadas a curva de calibração para determinação da quantidade de proteína e as curvas de calibração de solução de corantes puros referentes aos ensaios de degradação enzimática, assim como, as curvas de calibração de solução de corantes contendo sal e barrilha referentes aos ensaios de lavagens químicas e enzimáticas. Quando necessário foi efetuada a diluição das amostras.

Figura A.1- Curva de Calibração da Proteína em 595 nm descrita na seção 4.2.2.1.

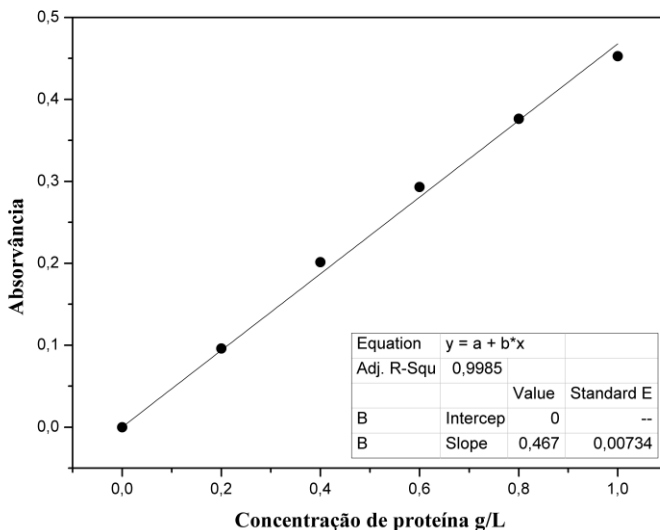


Figura A.2- Curva de calibração da solução do corante Azul 21 em 624 nm descrita na seção 4.2.3.1.

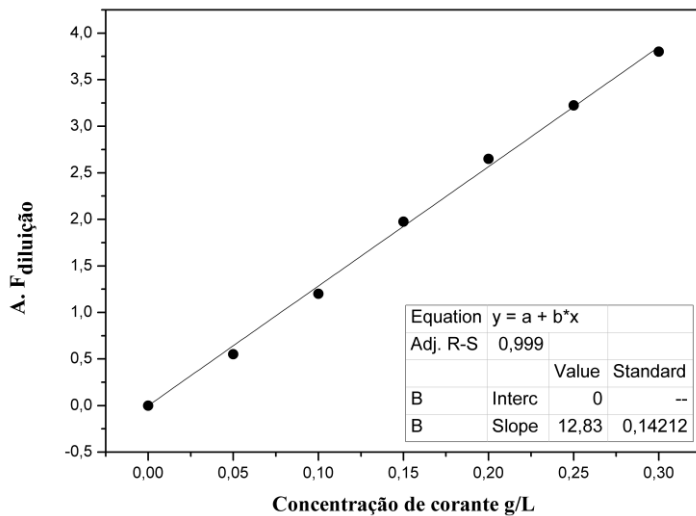


Figura A.3- Curva de calibração da solução do corante Vermelho 195 em 541 nm descrita na seção 4.2.3.1.

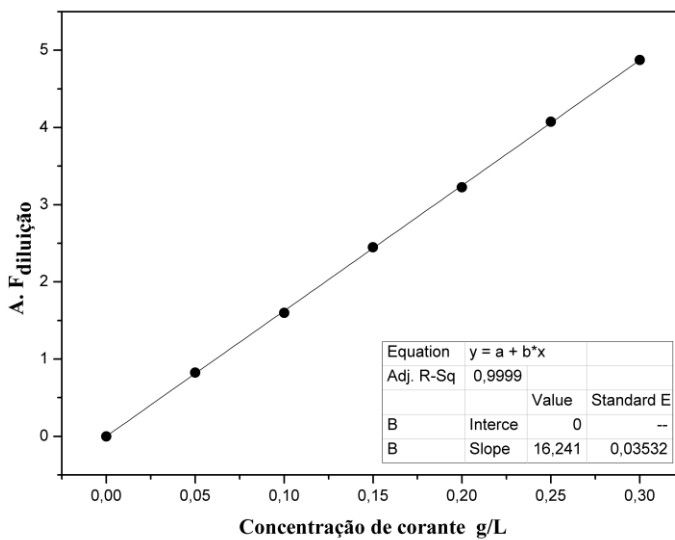


Figura A.4- Curva de calibração da solução da mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 em 624 nm, descrita na seção 4.2.3.1

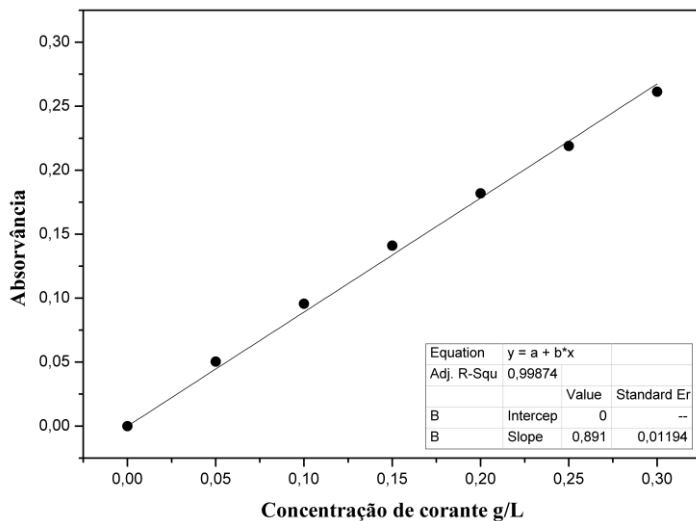


Figura A.5- Curva de calibração da solução do corante Azul 21 em 667 nm, contendo Sulfato de sódio e Carbonato de sódio (barrilha) descrita na seção 4.2.3.1.

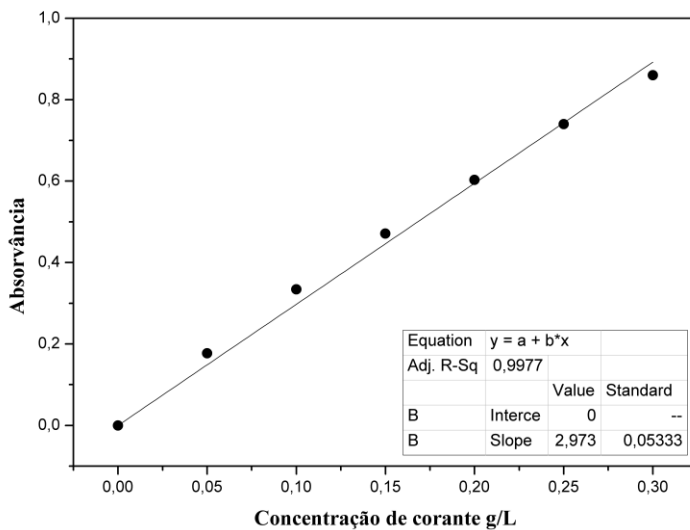


Figura A.6- Curva de calibração da solução do corante Vermelho 195 em 541 nm, contendo Sulfato de sódio e Carbonato de sódio (barrilha) descrita na seção 4.2.3.1.

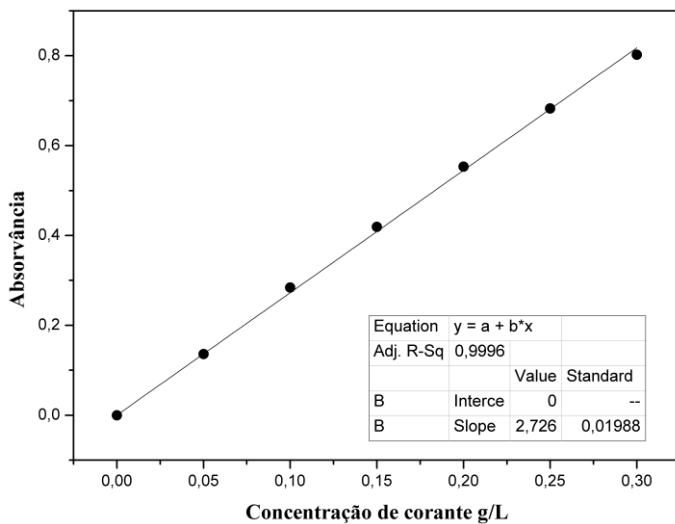
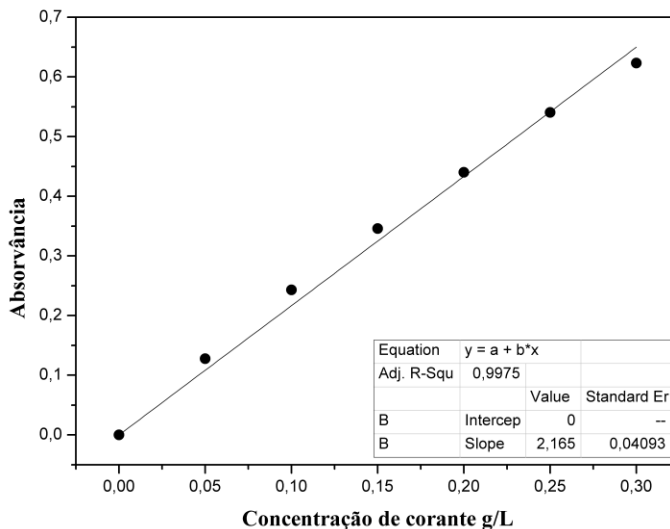


Figura A.7- Curva de calibração da solução da mistura dos corantes Azul 21 e Vermelho 195 em 667 nm, contendo Sulfato de sódio e Carbonato de sódio (barrilha) descrita na seção 4.2.3.1.



ANEXOS**ANEXO A- Notas escala de cinzas**

Neste anexo é apresentada a classificação da escala de cinzas, usada nos testes de solidez à lavagem para analisar a transferência de cor secção 4.2.7.2.

Figura A.1.1- Grau de solidez à lavagem.

Grau de solidez	Índice
5	Ótima Solidez
4-5	Boa Solidez
4	Média Solidez
3-4	Solidez Regular
3	Solidez Regular
2-3	Pouca Solidez
2	Pouca Solidez
1-2	Baixa Solidez
1	Baixa Solidez

Fonte: Valente e Oliveira (2011)

ANEXO B- Ficha técnica da enzima *Horseradish* peroxidase

Neste anexo é apresentada a ficha técnica da enzima *Horseradish* peroxidase conforme descrito na seção 4.1.3.

Figura A.1.2- Ficha técnica da enzima *Horseradish* peroxidase.

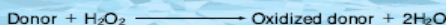
PEO-131- 301- 302

● TOYOBO ENZYMES ●
(Diagnostic Reagent Grade)

PEROXIDASE

from Horseradish

Donor:hydrogen-peroxidase oxidoreductase (EC 1. 11. 1. 7)



PREPARATION and SPECIFICATION

PEO-301/302 are isolated from horseradish root in our own method. PEO-131 is chromatographically separated from the other isoenzymes using SP Sephadex C-50 by the modified method of Paul et al.¹⁾ The peroxidase fractions having equal RZ values (ca.3.3) are combined to generate the preparation. This preparation has an RZ value of ca.3.3 and is electrophoretically homogeneous. On the other hand, Grade III is partially purified preparation.

Appearance	: Reddish-brown amorphous powder, lyophilized
Activity	Grade I 250 Purpurogallin U/mg-solid or more (-131) (RZ ≥ 3.0, salt free) Grade II 110 Purpurogallin U/mg-solid or more (-301) (RZ ≥ 2.0, containing approx. 30% of stabilizers) Grade III 180 Purpurogallin U/mg-solid or more (-302) (RZ ≥ 2.0, salt free)
Contaminant	: Phosphatase ≤1.0 × 10 ⁻³ % (Grade III)

PROPERTIES

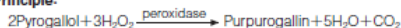
Stability	: Stable at -20°C for at least one year	(Fig.1,2)
Molecular weight	: approx. 40,000	
Structure	: Glycoprotein with one mole of protohaemin IX ²⁾	
Inhibitors	: Cyanide, sulfide, fluoride, azide ³⁾	
Optimum pH	: 6.0 - 7.0	(Fig.3)
Optimum temperature	: 45°C	(Fig.4)
pH Stability	: pH 5.0 - 10.0 (25°C, 20hr)	(Fig.5)
Thermal stability	: below 50°C (pH 6.0, 10min)	(Fig.6)
Effect of various chemicals	: (Table 1)	

APPLICATIONS⁴⁻¹¹⁾

This enzyme is useful for enzymatic determination of H₂O₂ in clinical analysis. Especially, the highly purified preparation (Grade I) is useful as a protein tracer in histo- and cyto-chemistry and as a valuable experimental tool in hodological neurography. Also, the enzyme preparation has been used as an enzyme label in enzyme immunoassay. Grade III (-302) is suitable for dry chemistry. On the other hand, the enzymes contribute for the reduction of phehol in waste water.

ASSAY

Principle:



The appearance of Purpurogallin is measured at 420nm by spectrophotometry.

Unit definition:

One purpurogallin unit causes the formation of one milligram of purpurogallin in 20 seconds under the conditions described below.

Method:

Reagents

- A. Pyrogallol solution : 5% (W/V)(Should be prepared fresh).
 B. H₂O₂ solution : 0.147M [Dilute 1.67ml of 30% (W/V) H₂O₂ to 100ml with H₂O] (Should be prepared fresh)
 C. Phosphate buffer, pH6.0 : 0.1M
 D. H₂SO₄ solution : 2.0N

Procedure

1. Prepare the following reaction mixture in a test tube (32 μ × 200mm) and equilibrate at 20°C for about 5 minutes.

14.0ml	H ₂ O	
2.0ml	Pyrogallol solution	(A)
1.0ml	H ₂ O ₂ solution	(B)
2.0ml	Phosphate buffer, pH6.0	(C)

Concentration in assay mixture	
Phosphate buffer	15 mM
Pyrogallol	40 mM
H ₂ O ₂	7.4mM

2. Add 1.0ml of the enzyme solution* and mix.
3. After exactly 20 seconds at 20°C, add 1.0ml of 2.0 N H₂SO₄ solution (D) to stop the reaction.
4. Extract the produced purpurogallin from the above stopped reaction mixture in five times with 15ml portions of ether and fill up the combined ether extracts to 100ml with fresh ether.
5. Measure the optical density at 420nm against water (OD test).

At the same time, prepare the blank by first mixing the reaction mixture with 1.0ml of 2.0 N H₂SO₄ solution (D) after 20 a sec-incubation at 20°C, followed by the addition of the enzyme solution and extracting with ether by the same procedure as the test (OD blank).

- * Dissolve the enzyme preparation in ice-cold 0.1M phosphate buffer, pH 6.0 (C), dilute to 3.0–6.0 purpurogallin U/ml with the same buffer and store on ice.

Calculation

Activity** can be calculated by using the following formula.

$$\text{Volume activity (U/ml)} = \frac{\Delta \text{OD}(\text{OD test} - \text{OD blank}) \times \text{df}}{0.117 \times \text{Vs}} = \Delta \text{OD} \times 8.547 \times \text{df}$$

$$\text{Weight activity (U/mg)} = (\text{U/ml}) \times 1/C$$

Vs : Sample volume (1.0ml)

0.117 : Optical density at 420 nm corresponding to 1mg% of Purpurogallin in ether.

df : Dilution factor

C : Enzyme concentration in dissolution (c mg/ml)

**One purpurogallin unit is equivalent to 13.5 international units determined with o-dianisidine at 25°C.

REFERENCES

- 1) K.G.Paul and T.Stigbrand; *Acta Chem.Scand.*, **24**, 3607 (1970).
- 2) L.M.Shannon et al.; *J.Biol.Chem.*, **241**, 2166 (1966).
- 3) E.Kay et al.; *J.Biol.Chem.*, **242**, 2470 (1967).
- 4) R.Lasek et al.; *Brain Res.*, **8**, 319 (1968).
- 5) W.M.Cowan et al.; *Brain Res.*, **37**, 21 (1972).
- 6) J.H.La Vail et al.; *Brain Res.*, **58**, 470 (1973).
- 7) A.M.Graybiel and M.Devor; *Brain Res.*, **68**, 167 (1974).
- 8) A.H.Bunt et al.; *Brain Res.*, **102**, 152 (1976).
- 9) D.R.Colman et al.; *Brain Res.*, **102**, 156 (1976).
- 10) M.Dubois-Dalcq et al.; *J.Histochem.Cytochem.*, **25**, 1201 (1977).
- 11) M.Sato et al.; *Brain Res.*, **140**, 149 (1978).

Table 1. Effect of Various Chemicals on Peroxidase

[The enzyme dissolved in 0.1M phosphate buffer, pH 6.0 (50U/ml) was incubated with each chemical at 25°C for 1hr.]

Chemical	Concn.(mM)	*Residual activity	Chemical	Concn. (mM)	*Residual activity
None	—	100%	MIA	2.0	99
Metal salt	2.0		NEM	2.0	97
MgCl ₂		102	IAA	2.0	99
CaCl ₂		102	Hydroxylamine	2.0	98
Ba(OAc) ₂		105	EDTA	5.0	95
FeCl ₃		98	c-Phenanthroline	2.0	98
CoCl ₂		97	α,α'-Dipyridyl	1.0	96
MnCl ₂		97	Borate	50	98
ZnCl ₂		99	NaF	2.0	98
CdCl ₂		99	NaN ₃	2.0	75
NiCl ₂		96	Triton X-100	0.10%	98
CuSO ₄		98	Brij 35	0.10%	80
Pb(OAc) ₂		96	Tween 20	0.10%	89
AgNO ₃		91	Span 20	0.10%	98
HgCl ₂		92	Na-cholate	0.10%	97
2-Mercaptoethanol	2.0	94	SDS	0.05%	98
PCMB	1.0	98	DAC	0.05%	102

*Residual activity was measured by 4AA-DEA method

4AA, 4-Aminoantipyrine; DEA, Diethylaniline

Ac₂CH₃CO; PCMB, p-Chloromercuribenzoate; MIA, Monoiodoacetate; NEM, N-Ethylmaleimide; IAA, Iodoacetamide;

EDTA, Ethylenediaminetetraacetate; SDS, Sodium dodecyl sulfate; DAC, Dimethyl-benzyl-alkyl-ammonium chloride.

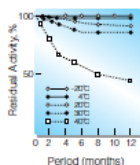


Fig. 1. Stability (Powder form)
(kept under dry conditions)

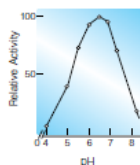


Fig.3. pH-Activity
[20°C, 20sec-reaction in 0.1M
buffer solution: pH4.0-6.0, acetate;
pH6.0-8.0, phosphate]

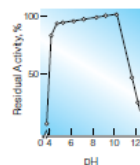


Fig.5. pH-Stability
[25°C, 20hr-treatment with 50mM
buffer solution: pH3.5-6.0, acetate;
pH6.0-8.0, phosphate; pH8.0-11.0,
borate]

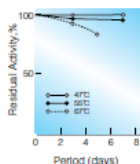


Fig.2. Stability (Powder form)
(kept under dry conditions)

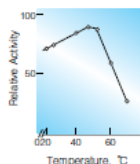


Fig.4. Temperature activity
[20sec-reaction in 0.1M phosphate
buffer, pH6.0]

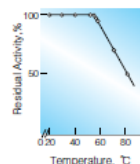


Fig.6. Thermal stability
[10min-treatment with 50mM
phosphate buffer, pH6.0]

