

**CYNTIA ELY**

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS HORSE RADISH PEROXIDASE NO TRATAMENTO DE  
EFLUENTE DE BIOREFINARIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Everton Skoronski

**LAGES, SC**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Ely, Cyntia

Aplicação de enzimas Horseradish Peroxidase em  
tratamento de efluente de biorefinaria / Cyntia  
Ely. - Lages , 2017.  
93 p.

Orientador: Everton Skoronski

Co-orientadora: Maria de Lourdes Borba Magalhães  
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado  
de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Ambientais, Lages, 2017.

1. Horseradish peroxidase. 2. Fenol. 3.  
Biorefinaria. 4. Fenton. 5. Processo biológico. I.  
Skoronski, Everton. II. Magalhães, Maria de Lourdes  
Borba. , .III. Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. IV.  
Título.

À minha família, que sempre acreditaram na minha capacidade e que não mediram esforços para que eu pudesse conquistar esta etapa importante para minha formação. Sem vocês nada disso teria sido possível.



**CYNTIA ELY**

**APLICAÇÃO DE ENZIMAS HORSERADISH PEROXIDASE NO TRATAMENTO DE  
EFLUENTE DE BIOREFINARIA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais.

**Banca Examinadora**

Orientador:

---

Prof. Dr. Everton Skoronski  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Coorientadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Borba Magalhães  
Universidade do Estado de Santa Catarina

**Membros:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rosana Oliveira Henriques  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Viviane Trevisan  
Universidade do Estado de Santa Catarina

**Lages, SC, 20 de julho de 2017**



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Everton Skoronski pela orientação, apoio, confiança e dedicação, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À professora Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Borba Magalhães, pela coorientação e ajuda prestada ao longo deste trabalho. Estendo meu agradecimento também ao Laboratório de Tecnologia Enzimática (CAV/UDESC), pelas análises realizadas.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, pelo investimento na minha formação, com especial agradecimento ao Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-Graduação (Promop), pela bolsa de estudos concedida durante todo o período de mestrado. Estendo os agradecimentos também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e aos docentes do programa, pela dedicação ao ensino de qualidade.

Às professoras Dr.<sup>a</sup> Viviane Trevisan e Dr.<sup>a</sup> Rosana Oliveira Henriques por aceitarem o convite para esta banca.

A todos os amigos e companheiros do LabTrat (CAV/UDESC), que foram essenciais durante a realização dos experimentos e durante os questionamentos que iam surgindo ao longo da jornada, meu muito obrigada. Um ambiente agradável e amigável, que desejo muitos frutos e sucesso.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Lemos Soares e à equipe do Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica (UFSC) pelos testes e análises realizadas, que contribuíram muito para a melhoria dos resultados.

À empresa de biorefinaria que cedeu o efluente e à companhia de tratamento de esgoto, que cedeu o lodo para a realização dos experimentos. Ainda, aos senhores Marcos Muller e Minoru Takahashi da Toyobo pelo fornecimento da enzima e pela vinda a Lages para discussão do trabalho.

Muito obrigado aos amigos queridos e parceiros, que estão comigo desde a graduação ou que se juntaram ao longo do mestrado, muito obrigada pelas horas de lazer e descontração. Levarei cada um de vocês em meu coração.

Por fim, um agradecimento muito especial para aqueles que estão comigo desde sempre. Um muito obrigado a toda minha família pelos anos de apoio, investimento e incentivo na minha educação, por acreditarem em mim e na minha capacidade. Sem vocês isso tudo dificilmente seria possível.

O meu muito obrigada a todos que de alguma forma tornaram esta realização possível.



## RESUMO

As biorefinarias são processos industriais para a produção de combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa. Uma vez que existe um número emergente desses processos, os aspectos ambientais devem ser estudados. Nesse contexto, o presente trabalho buscou estudar a bioconversão de fenol, contaminante presente em altas concentrações em efluentes gerados a partir de uma biorefinaria, por meio de tratamento enzimático, empregando a enzima Horseradish peroxidase (HRP). A enzima comercial foi caracterizada e as condições ideais para sua aplicação na remoção de fenol foram avaliadas de acordo com planejamentos experimentais. Para a primeira campanha de amostragem, os resultados atingiram uma bioconversão de fenol de 99% em pH 6,32, atividade enzimática de 1,13 U/mL, concentração de peróxido de 1,24 g/L, temperatura de 28 °C e tempo de contato de 35 min. Da mesma forma, para a segunda campanha de amostragem foi realizado um novo planejamento, no entanto, fixando as condições ótimas de temperatura e o tempo de reação encontradas anteriormente. Neste planejamento, obteve-se remoção de fenol de até 97,5%, nas condições ótimas de pH 7,0, atividade de 0,8 U/mL e concentração de peróxido de 1,61 g/L. Embora houve uma eficiência de redução considerável, o efluente não atingiu os limites estabelecidos pelas legislações, de 0,5 mg/L (Conama) e 0,2 mg/L (Fatma), para lançamento em corpos receptores. Dessa forma, fez-se necessário avaliar processos complementares que seriam capazes de remover o fenol remanescente. As alternativas selecionadas foram a oxidação química, por meio dos reagentes Fenton, e a degradação biológica. Para o processo Fenton, avaliaram-se a concentração de peróxido e a relação  $[H_2O_2]:[Fe]$ , sendo que a concentração de 3,90 g/L e a relação de 74, foram necessários para que o efluente atingisse uma concentração de fenol de 0,11 mg/L. Para o tratamento biológico, o sistema apresentou carga orgânica volumétrica e específica de 0,019 kgDQO/m<sup>3</sup> dia e 0,0013 gDQO/gSSV dia, respectivamente, atingindo uma concentração de fenol menor que 0,1 mg/L, após 14 dias. A análise de cromatografia mostrou que, entre os fenóis totais, o 2-metoxifenol era o composto majoritário no efluente bruto, que foram precipitados pelo tratamento enzimático, juntamente com outros fenóis, porém, formaram-se outros intermediários fenólicos. Não se detectou nenhum composto após a aplicação do tratamento biológico. Além disso, outros parâmetros físico-químicos apresentaram redução após os processos aplicados, como demanda química de oxigênio e carbono orgânico total, com eficiências de remoção em torno de 29, 48 e 95%, nos processos enzimático, Fenton e biológico, respectivamente. A HRP pode ser considerada como uma etapa alternativa para o tratamento de efluentes de biorefinaria para remoção de fenóis.

**Palavras-chave:** Horseradish peroxidase. Fenol. Biorefinaria. Fenton. Processo biológico.



## ABSTRACT

Biorefineries are industrial processes for the production of fuel as well as and chemicals from biomass. Since there is a growing number of biorefineries worldwide, the environmental aspects associated with it must have to be studied. In this context, the present work sought to study the bioconversion of phenol, a contaminant present in high concentrations in wastewater from a biorefinery, by enzymatic treatment using the enzyme Horseradish Peroxidase (HRP). The commercial enzyme was characterized and its optimal conditions for phenol removal were evaluated according to experimental designs. For the first sampling campaign, the results showed a bioconversion yield of 99% at pH 6.32, the enzyme activity of 1.13 U/mL, the temperature of 28 °C, 1.24 g/L of hydrogen peroxide, and 35 minutes contact time. Likewise, for the second sampling campaign, a new planning was realized, however, setting a good temperature and reaction time found previous. In this planning, phenol removal of up to 97.5% was obtained, under the conditions at pH 7.0, the enzyme activity of 0.8 U/mL and peroxide concentration of 1.61 g/L. Although there was a considerable reduction, the wastewater didn't achieve the terms of Conama (0.5 mg/L) and Fatma (0.2 mg/L), for release at body receptors. In this way, it was necessary to evaluate complementary processes that are capable of removing the remaining phenol. The selected alternatives were chemical oxidation, through Fenton reagents, and biological degradation. For the Fenton process, the peroxide concentration and  $[H_2O_2]:[Fe]$  ratio were evaluated, with a concentration of 3.90 g/L and a ratio of 74, were required for the wastewater at a phenol concentration of 0.11 mg/L. For the biological treatment, the system presented a volumetric and specific organic load of 0.019 kgCOD/ m<sup>3</sup> day and 0.0013 gCOD/gVSS day, respectively, generating a phenol concentration of less than 0.1 mg/L, after about 14 days. Chromatography analysis shown, among total phenols, 2-methoxyphenol was the majority compound in the crude wastewater, which were precipitated by the enzymatic treatment together with other phenols, but other phenolic intermediates were formed. No compound was detected after application of biological treatment. Furthermore, other physicochemical parameters were reduced, such as chemical oxygen demand and total organic carbon, with removal efficiencies around 29, 48 and 95%, in the enzymatic, Fenton and biological processes, respectively. HRP can be considered as an alternative step for the biorefinery wastewater treatment to the phenols removal.

**Keywords:** Horseradish peroxidase. Phenol. Biorefinery. Fenton. Biologic process.



## LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Raiz forte, planta utilizada para extração da enzima peroxidase.....	27
Figura 2 - Representação da estrutura física tridimensional cristalina da HRP .....	28
Figura 3 - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases .....	29
Figura 4 - Imagem do gel obtido pela SDS-PAGE da HRP.....	55
Figura 5 - Efeito das variáveis: (a) pH e (b) temperatura na atividade enzimática da HRP ....	56
Figura 6 - Efeito da concentração do substrato pirogalol sobre a atividade enzimática da HRP .....	58
Figura 7 - Influência da concentração de peróxido na atividade enzimática da HRP .....	60
Figura 8 - Gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk na ação da peroxidase para (a) concentração de pirogalol em diferentes concentrações fixas de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e (b) concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para diferentes concentrações fixas do pirogalol.....	61
Figura 9 - Superfícies de resposta apresentando a influência das variáveis: (a) temperatura x pH, (b) [HRP] x pH e (c) [HRP] x [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] na remoção de fenol.....	65
Figura 10 - Cinética de degradação do fenol durante reação enzimática.....	66
Figura 11 - Superfícies de resposta apresentando a influência das variáveis: (a) [HRP] x pH (b) [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] x pH e (c) [HRP] x [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] na remoção de fenol.....	69
Figura 12 - Superfície de resposta com a influência das variáveis no processo Fenton para a remoção de fenol .....	72
Figura 13 - Remoção de fenol após tratamento biológico variando-se a adição de nutrientes	74
Figura 14 - Efluente após cada processo: (a) bruto, (b) enzimático, (c) enzimático pós centrifugação, (d) Fenton e (e) biológico.....	77
Figura 15 - Eficiência de remoção de alguns parâmetros após os processos aplicados .....	78



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do fenol .....	25
Tabela 2 - Aplicação da enzima HRP em diferentes contaminantes .....	32
Tabela 3 - Análise de alguns parâmetros físico-químicos do efluente bruto .....	48
Tabela 4 - Fatores e níveis usados no planejamento fatorial $2^{5-1}$ .....	49
Tabela 5 - Fatores e níveis usados no planejamento fatorial $2^3$ .....	50
Tabela 6 - Fatores e níveis usados no planejamento Fenton .....	51
Tabela 7 - Métodos de determinação para os parâmetros físico-químicos analisados .....	53
Tabela 8 - Constante de Michaelis-Menten para diferentes fontes de peroxidase .....	59
Tabela 9 - Eficiência de remoção de fenol para primeira campanha de amostragem.....	63
Tabela 10 - Análise de variância para o modelo do tratamento enzimático (primeira campanha) .....	64
Tabela 11 - Eficiência na remoção de fenol para o segundo planejamento .....	67
Tabela 12 - Análise de variância para o modelo do tratamento enzimático (segunda campanha) .....	68
Tabela 13 - Resultados do planejamento na remoção de fenol e consumo de peróxido no processo Fenton após tratamento enzimático .....	71
Tabela 14 - Análise de variância para o modelo do processo Fenton.....	72
Tabela 15 - Testes no tratamento biológico com variação na concentração de lodo e respectiva eficiência de biodegradação do fenol.....	73
Tabela 16 - Caracterização do teor de sólidos para o lodo antes e após o tratamento biológico .....	75
Tabela 17 - Análises físico-químicas do efluente bruto e após o tratamento enzimático (primeira campanha) .....	76
Tabela 18 - Análises físico-químicas nas amostras obtidas após cada tratamento.....	77
Tabela 19 - Estrutura química dos principais compostos encontrados nas amostras .....	82



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/M	Relação alimento/microrganismo
Anova	Análise de variância
BSA	Albumina de Soro Bovino
BSTFA	N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CDE	Compostos de Desregulação Endócrina
CMP	4-cloro-3-metil fenol
Conama	Conselho Nacional de Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DBO <sub>5</sub>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DCP	2,4-diclorofenol
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DRCC	Design Rotacional de Composto Central
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental)
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
EUA	Estados Unidos da América
Fatma	Fundação do Meio Ambiente de Santa Catarina
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrômetro de Massa
GL	Graus de liberdade
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HRP	Horseradish peroxidase
LabTrat	Laboratório de Tratamento de Água e Efluentes
MQ	Média quadrática
MTBE	Éter metil terc-butílico
Page	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
POA	Processos Oxidativos Avançados
Promop	Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-Graduação
RSB	Reator Sequencial de Batelada
SC	Santa Catarina
SDS	Sulfato de dodecilo de sódio
SFT	Sólidos Fixos Totais
SQ	Soma dos quadrados
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
ST	Sólidos Totais
SVT	Sólidos Voláteis Totais
TDH	Tempo de Detenção Hidráulico
TMS	Trimetilsililo
Udesc	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>25</b>
3.1	EFLUENTES CONTENDO ESPÉCIES FENÓLICAS .....	25
3.2	PROCESSOS APLICADOS PARA REMOÇÃO DE FENOL .....	26
<b>3.2.1</b>	<b>Tratamento enzimático .....</b>	<b>26</b>
3.2.1.1	<i>Enzimas peroxidases .....</i>	<i>27</i>
3.2.1.1.1	Mecanismo de ação .....	28
3.2.1.1.2	Estudo cinético .....	30
3.2.1.2	<i>Uso de enzimas peroxidases no tratamento de efluentes .....</i>	<i>31</i>
3.2.1.3	<i>Tratamento enzimático combinado com outros processos .....</i>	<i>34</i>
<b>3.2.2</b>	<b>Processo Oxidativo Avançado (POA).....</b>	<b>36</b>
3.2.2.1	<i>Processo Fenton .....</i>	<i>36</i>
3.2.2.2	<i>Estudos realizados para oxidação de compostos fenólicos por reagentes Fenton... ..</i>	<i>38</i>
<b>3.2.3</b>	<b>Tratamento biológico .....</b>	<b>39</b>
3.2.3.1	<i>Estudos realizados para remoção de compostos fenólicos por tratamento biológico .....</i>	<i>40</i>
3.3	CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA UTILIZADA .....	45
<b>4.1.1</b>	<b>Determinação do peso molecular da enzima .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Determinação do teor de proteínas da enzima .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Determinação da atividade enzimática .....</b>	<b>46</b>
4.1.3.1	<i>Determinação das condições ótimas de pH e temperatura.....</i>	<i>47</i>
4.1.3.2	<i>Estudo cinético.....</i>	<i>47</i>
4.2	DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE GERAÇÃO DO EFLUENTE UTILIZADO .	47
4.3	ENSAIOS DE TRATABILIDADE .....	49
<b>4.3.1</b>	<b>Tratamento enzimático .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Processo Fenton.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Tratamento biológico .....</b>	<b>51</b>
4.4	CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE .....	52
<b>4.4.1</b>	<b>Métodos analíticos utilizados .....</b>	<b>52</b>
4.4.1.1	<i>Determinação da concentração de fenol .....</i>	<i>53</i>

4.4.1.2	<i>Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio</i> .....	53
4.4.2	<b>Identificação dos compostos orgânicos</b> .....	54
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	55
5.1	<b>CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA</b> .....	55
5.1.1	<b>Determinação do teor de proteínas e estimativa da massa molecular</b> .....	55
5.1.2	<b>Estudo da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática</b> .....	56
5.1.3	<b>Estudo sobre a influência dos substratos na atividade da HRP</b> .....	57
5.1.4	<b>Cinética de dois substratos</b> .....	60
5.2	<b>ESTUDO NA REMOÇÃO DE FENOL</b> .....	62
5.2.1	<b>Tratamento enzimático</b> .....	62
5.2.1.1	<i>Primeira campanha de amostragem</i> .....	62
5.2.1.2	<i>Segunda campanha de amostragem</i> .....	66
5.2.2	<b>Reator Fenton</b> .....	70
5.2.3	<b>Tratamento biológico</b> .....	73
5.3	<b>CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE</b> .....	76
5.3.1	<b>Análises físico-químicas</b> .....	76
5.3.1.1	<i>Primeira campanha de amostragem</i> .....	76
5.3.1.2	<i>Segunda campanha de amostragem</i> .....	76
5.3.2	<b>Identificação dos compostos fenólicos</b> .....	80
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	85

## 1 INTRODUÇÃO

Efluentes líquidos com alto teor de fenol são amplamente gerados em processos industriais tradicionais, como na produção de papel e celulose, petroquímica, têxteis, entre outros (PEYTON, 1984). Esses compostos são altamente tóxicos e perigosos para os organismos vivos. Mesmo em baixas concentrações, os fenóis podem ser prejudiciais para a saúde humana (MICHAŁOWICZ e DUDA, 2007; RAO et al., 2014). Nas últimas décadas, muitos métodos convencionais para o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos foram propostos, tais como processos de extração, adsorção, oxidação química e bioquímica (MOHAMMADI et al., 2014). No entanto, esses processos apresentam desvantagens significativas em relação aos custos, remoção incompleta e formação de subprodutos (LIU et al., 2002; REGALADO, GARCÍA-ALMENDÁREZ e DUARTE-VÁZQUEZ, 2004).

Alternativamente, as enzimas oxidativas se mostram como um processo que pode ser aplicado na remoção de fenol em efluentes industriais. O processo catalítico que utiliza peroxidase, enzima oxidativa encontrada em uma série de recursos naturais, tais como soja (MURCIA et al., 2009; STEEVENSZ et al., 2009), tomate (PAISIO et al., 2010), batata (KURNIK et al., 2015), fungo (IKEHATA, BUCHANAN e SMITH, 2003), dentre outros, tem sido proposto com sucesso na bioconversão desse contaminante.

Peroxidases (E.C.1.11.1.7 – hidrogênio-peróxido oxidoreduases) são predominantemente proteínas heme, que utilizam peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), comoceptor de elétrons, para oxidar uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (DEMARCHE et al., 2012). Os produtos de oxidação são radicais altamente reativos que desempenham um papel importante nas reações poliméricas. Tais produtos de alto peso molecular, apresentam baixa solubilidade em água e, conseqüentemente, podem ser facilmente removidos da solução, por meio de processos físico-químicos, como sedimentação ou filtração (DURÁN e ESPOSITO, 2000).

Dentre o grupo das peroxidases, a enzima Horseradish peroxidase (HRP) foi eficientemente utilizada na biotransformação de fenóis em vários efluentes industriais, como na indústria de celulose e papel (WAGNER e NICELL, 2001a), indústria petroquímica (WAGNER e NICELL, 2001b), e em processos têxteis (De SOUZA, FORGIARINI e De SOUZA, 2007).

Entretanto, o tratamento enzimático aplicado de forma separada pode ser insuficiente na obtenção de um efluente que atinja os padrões de lançamento em corpos receptores, exigidos

pelas legislações ambientais. Portanto, a combinação desse processo com outras alternativas de tratamento se mostra promissora (ELY, KEMPKA e SKORONSKI, 2016).

Dentro desse contexto, Processos Oxidativos Avançados (POAs) e processos biológicos podem ser considerados para o tratamento complementar de efluentes. A reação de Fenton se apresenta como uma opção que poderia ser combinada com o tratamento enzimático, devido ao seu alto poder oxidante que, gerando radicais hidroxila, é capaz de oxidar os compostos remanescentes (BAUTISTA et al., 2008). Comparativamente, processos biológicos podem se apresentar como uma alternativa para a aplicação em escala industrial, visto que são considerados os métodos mais econômicos e apresentam eficiência em concentrações de fenol abaixo de 100 mg/L (WHITELEY e LEE, 2006).

Neste trabalho, estudou-se a remoção de fenol em efluentes gerados a partir de uma biorefinaria de valorização do *Tall Oil*, subproduto significativo da indústria de papel e celulose. Uma vez que o número de biorefinarias tem aumentado nos últimos anos, os aspectos ambientais devem ser considerados para fornecer a sustentabilidade dessas plantas industriais (BUDZIANOWSKI e POSTAWA, 2016; CHERUBINI, 2010). Embora a HRP seja uma enzima amplamente estudada na remoção de fenol, nenhum trabalho foi relatado sobre seu uso no tratamento de efluentes de biorefinaria. Dessa forma, os resultados obtidos poderão contribuir para a discussão a respeito da viabilidade de utilização dessa tecnologia no tratamento do efluente em questão.

A dissertação está estruturada da seguinte forma: na segunda seção são apresentados os objetivos do trabalho. O capítulo 3 expõe a revisão bibliográfica acerca do tema da dissertação, demonstrando o mecanismo de ação das enzimas peroxidases, além de explorar artigos que aplicaram a enzima HRP na remoção de compostos orgânicos. Complementarmente, averigou-se outros processos que são utilizados para a remoção de compostos fenólicos, como oxidação química e biológica. O quarto capítulo apresenta os materiais e a metodologia utilizada para a obtenção dos dados experimentais da caracterização da enzima, dos ensaios de tratabilidade do efluente e de sua caracterização. Na seção seguinte, são exibidos os resultados das análises e as discussões acerca do tema. Sempre que possível comparou-se os resultados obtidos com valores reportados na literatura. Por fim, são apresentadas as principais conclusões, bem como sugestões para trabalhos futuros.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a capacidade de remoção de fenol em efluente gerado por uma biorefinaria, por meio de processo enzimático, aplicando a enzima HRP.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Caracterizar a enzima HRP obtida comercialmente para fins de comparação com proteínas usadas em outros trabalhos;
- b) obter as melhores condições de tratamento enzimático, examinando as principais variáveis do processo, como pH, temperatura, tempo de reação, concentração de enzima e de peróxido de hidrogênio;
- c) avaliar os processos Fenton e biológico como alternativas para etapas complementares ao tratamento enzimático, a fim de realizar a remoção do fenol remanescente;
- d) verificar o desempenho dos processos por meio da caracterização dos principais parâmetros físico-químicos, da identificação das espécies fenólicas do efluente bruto e dos efluentes gerados após cada processo.



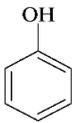
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 EFLUENTES CONTENDO ESPÉCIES FENÓLICAS

Os compostos fenólicos podem derivar de fontes naturais (ocorrência natural em plantas e solo) e de atividades antropogênicas, como resíduos de atividades industriais e agrícolas (RAO et al., 2014). Os fenóis são gerados nas mais diferentes concentrações, em diversos tipos de efluentes industriais, como em indústrias de petroquímica, papel e celulose, têxteis e tingimento, farmacêutica, dentre outras (PEYTON, 1984).

Algumas propriedades físico-químicas do fenol estão reportadas na Tabela 1. Observa-se que em temperatura ambiente, o fenol é um sólido que apresenta solubilidade em água próxima a 10%, dificultando sua remoção de efluentes por métodos tradicionais baseados em coagulação e floculação (BAYER et al., 2010).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do fenol

Fórmula	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH
Estrutura química	
Peso molar (g/mol)	94,11
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,07
Temperatura de fusão (°C)	40,9
Temperatura de ebulição (°C)	181,75
Solubilidade em água	9,3 g <sub>fenol</sub> /100 mL
pK <sub>a</sub>	9,89
Limites de inflamabilidade no ar (V%)	1,7 (baixo) 8,6 (alto)
Temperatura de autoignição (°C)	715

Fonte: Adaptado de Busca et al., 2008.

Dentre os substituintes do fenol, os clorofenóis são os mais difundidos e se apresentam em maior quantidade, formados no ambiente pela cloração de compostos aromáticos presentes no solo e na água. Outros compostos fenólicos comumente encontrados são dos grupos de catecol e clorocatecol, nitrofenol, metilfenol, alquilfenol, bisfenol e aminofenol. A maioria desses compostos são caracterizados por atividade tóxica (MICHAŁOWICZ e DUDA, 2007).

Devido à grande toxicidade, os fenóis causam graves problemas ao meio ambiente e à saúde humana, mesmo em baixas concentrações. Os compostos fenólicos podem ser altamente

tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (MICHAŁOWICZ e DUDA, 2007). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA - EUA) considerou o fenol como um dos contaminantes prioritários e também o mais importante dos poluentes potencialmente cancerígenos, ocupando o décimo primeiro lugar numa lista de 126 substâncias nocivas (MING et al., 2006).

No Brasil, o limite de concentração de fenol permitido para descarte de efluentes é de 0,5 mg/L, definido pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (Conama), por meio da Resolução 430 de 2011 (BRASIL, 2011). Já em nível estadual, a Fundação de Meio Ambiente de Santa Catarina (Fatma) determina, pela Lei 14.675 de 2009, que a concentração de fenol em efluentes industriais não deve exceder 0,2 mg/L (SANTA CATARINA, 2009). Nas águas naturais e potáveis, os padrões para os compostos fenólicos são bastante restritivos, tanto na Legislação Federal quanto na Legislação do Estado de Santa Catarina. A legislação estadual impõe os limites máximos de compostos fenólicos presentes em águas naturais, classes I e II, destinadas ao abastecimento doméstico, em 1,0 µg/L (SANTA CATARINA, 2009).

Atualmente existem diversos processos aplicados na indústria para a remoção de fenol em efluentes, tais como a biodegradação, oxidação química, eletroquímica e fotocatalítica, extração por solvente, adsorção e incineração (MOHAMMADI et al., 2014). Entretanto, esses métodos apresentam algumas desvantagens, como a remoção incompleta, alto custo, formação de produtos mais tóxicos que o fenol e a aplicabilidade somente numa faixa de concentração restrita (LIU et al., 2002; REGALADO, GARCÍA-ALMENDÁREZ e DUARTE-VÁZQUEZ, 2004). Dessa forma, se faz necessário buscar por um processo alternativo que possibilite minimizar e/ou eliminar essas desvantagens. O tratamento via reação enzimática tem aparecido como uma das alternativas com grande potencial de uso que atende a essas necessidades (MONTIBELLER, 2012).

## 3.2 PROCESSOS APLICADOS PARA REMOÇÃO DE FENOL

### 3.2.1 Tratamento enzimático

Os processos enzimáticos possuem vantagens sobre os métodos tradicionais, pois as enzimas atuam com grande especificidade e seletividade, permitindo que somente grupos desejáveis sofram reação no tratamento, são menos suscetíveis às inibições causadas por substâncias tóxicas e o custo poderia ser reduzido caso a enzima fosse produzida e disponível comercialmente em maiores quantidades (KARAM e NICELL, 1997). Além disso, a utilização das enzimas pode se dar em materiais recalcitrantes, com baixo tempo de retenção e atuação

num amplo espectro de pH, temperatura, salinidade e concentração de contaminantes (DURÁN e ESPOSITO, 2000; NICELL, SAADI e BUCHANAN, 1995).

### 3.2.1.1 Enzimas peroxidases

Dentre as diversas aplicações de processos enzimáticos na degradação de poluentes, destaca-se o uso de enzimas oxidativas. Essas enzimas catalisam, com seletividade e eficiência elevada, a conversão dos compostos fenólicos em produtos com reduzida toxicidade ambiental. Dentre essas enzimas, as peroxidases têm sido aplicadas com eficiência para o tratamento de efluentes contendo compostos fenólicos (MELO, 2010).

O uso de peroxidases para remover compostos fenólicos de soluções aquosas foi proposto pela primeira vez por Klivanov e Morris (1981) e, desde então, o método tem sido melhorado para maximizar fatores técnicos e econômicos.

Dentre as peroxidases, a enzima HRP, é extraída da raiz forte (*Armoracia rusticana*), erva perene e robusta cultivada em regiões temperadas do mundo (Figura 1), ocorre numa escala relativamente grande devido às utilizações comerciais da enzima, como um componente de kits de diagnóstico clínico e para imunoenaios (VEITCH, 2004). A HRP possui características particulares que a tornam mais aplicável no meio industrial, pois não possui especificidade em termos de substratos orgânicos, podendo oxidar mais de 40 diferentes compostos aromáticos incluindo fenóis, anilinas, benzidinas e compostos heteroaromáticos (KLIVANOV, TU e SCOTT, 1983; NICELL, SAADI e BUCHANAN, 1995).

Figura 1 - Raiz forte, planta utilizada para extração da enzima peroxidase

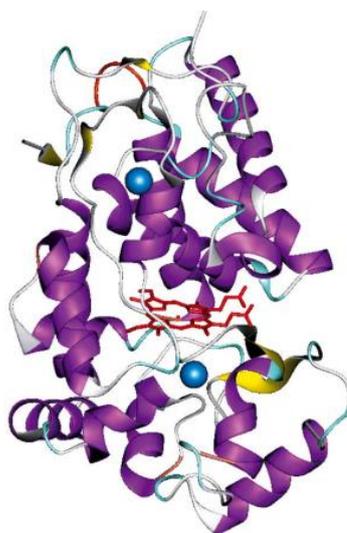


Fonte: Veitch, 2004.

### 3.2.1.1.1 Mecanismo de ação

Peroxidases (E.C.1.11.1.7 – hidrogênio-peróxido oxidoreduases) são predominantemente proteínas heme, que utilizam peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos como co-substrato para oxidar uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos (DEMARCHE et al., 2012). O grupo prostético ferriprotoporfirina IX é uma característica comum de todas as peroxidases heme. Ferriprotoporfirina consiste de quatro anéis pirrole ligados por pontes de metileno com ferro (III) como átomo central (DUNFORD e STILLMAN, 1976), ilustrada na Figura 2. O grupo heme (indicado em vermelho na Figura 2) está localizado entre os domínios próximos e distantes no qual cada um dos átomos de cálcio está contido (esferas azuis),  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha são representadas em amarelo e roxo, respectivamente.

Figura 2 - Representação da estrutura física tridimensional cristalina da HRP



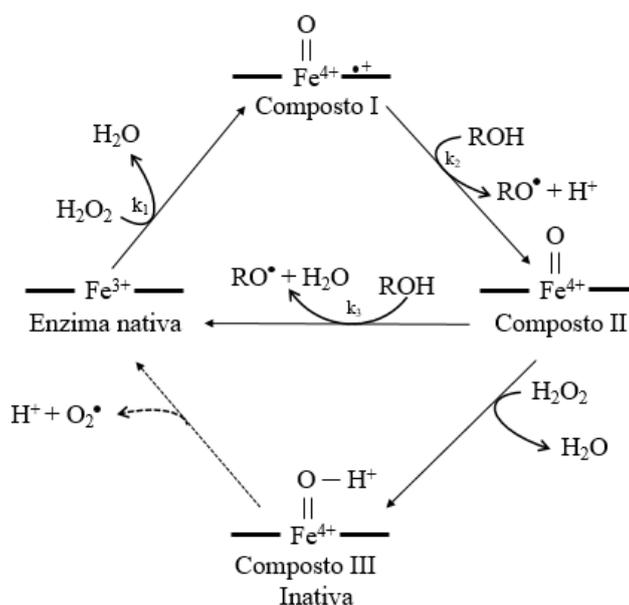
Fonte: Veitch, 2004.

O ciclo catalítico da peroxidase pode ser expresso pelas reações 1 a 4, em que ROH e RO $\cdot$  representam um substrato reduzido e um produto radical, respectivamente. Os substratos reduzidos incluem fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, aminas, entre outros compostos aromáticos (VEITCH, 2004).



A enzima férrica nativa (E) é oxidada pelo peróxido de hidrogênio a uma forma intermediária chamada de composto I (E<sub>i</sub>), deficiente em dois elétrons, sendo um elétron abstraído do íon Fe<sup>3+</sup> e outro do anel porfirínico, gerando, respectivamente, Fe<sup>4+</sup> e radical cátion porfirínico (Figura 3). Em seguida, E<sub>i</sub> aceita um composto aromático (ROH) no seu sítio ativo e realiza a sua oxidação, formando o composto II (E<sub>ii</sub>), um intermediário deficiente em um elétron. Um radical livre (RO•) é produzido e lançado em solução. E<sub>ii</sub> oxida uma segunda molécula aromática, liberando um segundo radical livre, que conduz à formação de um produto polimérico, retornando a peroxidase ao seu estado nativo (estado reduzido Fe<sup>3+</sup>), completando assim o ciclo. Na presença de excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a reação (4) se torna importante, porque o composto III (E<sub>iii</sub>) é uma forma reversivelmente inativa da enzima, ou seja, a enzima é inibida por excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, a ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a reação limita a velocidade da reação (BANCI, 1997; VEITCH, 2004).

Figura 3 - Ciclo catalítico das enzimas peroxidases



As constantes  $k_1$ ,  $k_2$  e  $k_3$  representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente.

Fonte: adaptado de Veitch, 2004.

No processo de redução da enzima, o fenol e seus derivados são transformados em radicais fenóxi. Esses radicais então reagem entre si formando dímeros, trímeros, etc., eventualmente resultando em maiores oligômeros e polímeros, os quais possuem baixa solubilidade e podem ser facilmente removidos da solução (ERHAN et al., 2002). A eliminação de fenóis reduz a toxicidade dos efluentes, contudo, alguns produtos gerados podem apresentar

uma toxicidade maior do que dos compostos parentais, por isso, é muito importante investigar se os produtos obtidos são tóxicos sob condições reais, onde muitos compostos diferentes estão presentes (TORRES, BUSTOS-JAIMES e BORGNE, 2003).

### 3.2.1.1.2 Estudo cinético

A cinética das reações catalisadas por enzimas foi primeiramente caracterizada em 1912 por dois bioquímicos, Michaelis e Menten, que obtiveram a equação (1).

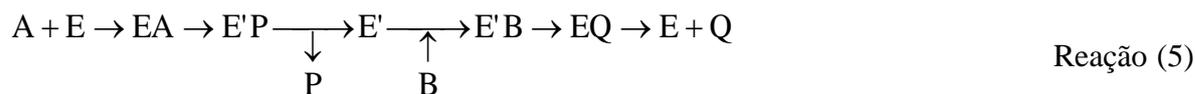
$$v_1 = \frac{v_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde,  $v_1$  é a taxa da reação catalisada por enzima,  $[S]$  é a concentração de substrato,  $K_m$  é a constante de Michaelis-Menten e  $v_{\text{máx}}$  é a taxa de reação máxima. O valor de  $K_m$  é uma medida da afinidade da enzima para o substrato e corresponde à metade de  $v_{\text{máx}}$  (WHITELEY e LEE, 2006).

Em um sistema enzimático de dois substratos, os mecanismos gerais possíveis nas interações de substrato-enzima são o mecanismo sequencial ou o mecanismo "ping-pong". No mecanismo sequencial, ambos substratos são combinados com a enzima antes da formação do produto. Os substratos podem combinar com a enzima de forma aleatória (random bi-bi) ou em uma ordem obrigatória (order bi-bi) para formar o complexo ternário. No mecanismo de ping-pong um ou mais produtos são liberados durante a adição de substrato, quebrando a sequência de adição de substrato em dois ou mais segmentos. O primeiro substrato, num mecanismo bi-bi ping-pong, combina-se com a enzima para formar um intermediário enzimático, com a libertação concomitante do primeiro produto. O segundo substrato interage com a enzima intermediária para formar o segundo produto e regenerar a enzima nativa (MARANGONI, 2003; TSAI, 2002).

Diversos autores têm reportado que a reação de oxidação catalisada por enzimas HRP na presença de compostos orgânicos, tais como corantes (ŠEKULJICA et al., 2015) e compostos fenólicos (DEYHIMI e NAMI, 2011; MURCIA et al., 2009), segue o mecanismo cinético bi-bi ping-pong.

Nesse mecanismo, um substrato, A, liga-se com a enzima para produzir uma forma quimicamente modificada da enzima (E') e o produto P. O segundo substrato, B, reage com E', regenerando E e formando um outro produto, Q. O esquema é ilustrado pela reação (5) (MARANGONI, 2003).



Esse mecanismo pode ser descrito, sob a condição de estado estacionário, pela equação (2).

$$v = \frac{v_{\text{máx}}[A][B]}{K_m^A[B] + K_m^B[A] + [A][B]} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde  $v$  é a taxa de reação,  $v_{\text{máx}}$  é a velocidade máxima,  $K_m^A$  e  $K_m^B$  são as constantes de Michaelis-Menten correspondentes aos substratos A e B, respectivamente.

### 3.2.1.2 *Uso de enzimas peroxidases no tratamento de efluentes*

Embora muitos estudos com compostos aromáticos em soluções sintéticas têm se mostrado promissores na oxidação catalisada pela HRP, poucas matrizes de efluentes reais têm sido investigadas. Muitas vezes, os efluentes apresentam parâmetros flutuantes, como pH, temperatura e concentrações de poluentes, que podem interferir ou prejudicar a reação (ELY, KEMPKA e SKORONSKI, 2016). A Tabela 2 apresenta os principais tipos de efluentes e compostos estudados na aplicação da HRP. Todos os estudos se limitaram a escala laboratorial, carecendo de aplicações industriais.

Tabela 2 - Aplicação da enzima HRP em diferentes contaminantes

Efluente	Amostra	Composto	Ativ. (U/mL)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	pH	Temp. (°C)	Remoção (%)	Referência
Fundição	Real	Fenol	13	4,9	7,5	25	97	Cooper e Nicell (1996)
Papel e celulose			0,1	0,7	7,0	25	<1,0 mg/L	Wagner e Nicell (2001a)
Refinaria de petróleo			2,2	0,6	8,6	20	<1,27 mg/L	Wagner e Nicell (2001b)
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)	Sintético	o-xileno-d10	8.000		-	-	54	Fang e Barcelona (2003)
		naftaleno-d8	4.000	29,4	-	23	51	
		Antraceno	1,25	10	8,0	40	64,5	Chen et al. (2014)
Têxtil/corante	Real	Corantes	29,85	2,0 x 10 <sup>-3</sup>	4,0	25	52	De Souza, Forgiarini e De Souza (2005)
	Sintético	Corantes azo	0,59	-	2,0	24	84	Mohan et al. (2005)
		Corantes	3,5	0,55	6,0	35	77 - 99	Da Silva (2011)
		Violeta 109	0,15	0,4	4,0	24	94,7	Sekuljic et al. (2015)
		Azul 225	0,15	0,4	5,0	24	89,4	
		Metilo alaranjado	-	-	4,0	30	72,95	Ambatkar e Mukunda (2015)
		Bismarck castanho	-	-	3,0	30	79,24	
Municipal	Real	Estrogênio	8,0-10,0	0,2 x 10 <sup>-6</sup>	8,0	25	100	Auriol et al. (2007)
	Sintético		0,032	200 x 10 <sup>-6</sup>	7,0	25	100	
Micropoluentes	Real	Fenol	0,012	20 x 10 <sup>-6</sup>	7,0	-	95	Na e Lee (2017)

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

A enzima HRP possui aplicação conhecida em diversas áreas ligadas à remoção de poluentes. Efluentes originados da indústria de fundição contêm compostos fenólicos, gerados por alguns ligantes de areia e pela combustão de coque (COOPER e NICELL, 1996). Os mesmos autores verificaram que a enzima HRP, purificada (dissolução da enzima sólida obtida comercialmente, numa solução aquosa em pH 7,4) ou extrato bruto (enzima obtida através da maceração de raízes da planta), com atividade específica de 13,0 e 6,0 U/mL, respectivamente, foi capaz de catalisar 97 a 99% da remoção de fenóis totais, em uma concentração inicial de 3,5 mM (330 mg/L). A presença de contaminantes, como resíduos de ferro, matéria orgânica e sólidos em suspensão, não interferiu no processo enzimático, sendo semelhante a uma solução aquosa de fenol puro.

Em processos de refino de petróleo, adicionalmente aos compostos fenólicos, os efluentes gerados contêm Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), que apresentam resistência à biodegradação, potencial de bioacumulação e atividade carcinogênica (CHEN et al., 2014). Estudos sobre a oxidação de HPA utilizando HRP ainda são bastante limitadas, embora a enzima possa oxidar partes do composto. Na oxidação de o-xileno-d<sub>10</sub> e naftaleno-d<sub>8</sub> por HRP, até 54% de o-xileno-d<sub>10</sub> e 51% de naftaleno-d<sub>8</sub> foram oxidados, a uma atividade enzimática de 8.000 e 4.000 U/mL, respectivamente (FANG e BARCELONA, 2003). Já na oxidação de HPA (antraceno, fenantreno, pireno e fluoranteno), houve oxidação preferencial de antraceno sobre outros HPA, independente do tempo de reação, enquanto que a concentração de enzima e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram fundamentais. Esse composto foi oxidado preferencialmente em pH 8,0 e temperatura de 40 °C, sendo que o principal produto detectado a partir de sua oxidação foi a 9,10-antraquinona (CHEN et al., 2014). Em geral, as quinonas são menos mutagênicas e cancerígenas do que o composto parental (TORRES, BUSTOS-JAIMES e BORGNE, 2003). Portanto, a oxidação enzimática do antraceno por HRP pode ser uma estratégia útil na desintoxicação e em processos de biorremediação.

Para a redução dos compostos fenólicos presentes em efluentes de uma refinaria de petróleo, o tratamento com HRP gerou um efluente abaixo do limite de descarga para o Canadá (1,27 mg/L de fenol), além de reduzir cerca de 58% a Demanda Química de Oxigênio (DQO), 78% a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>5</sub>) e 95% a toxicidade, sugerindo que outros compostos também foram removidos após o tratamento. No estudo se utilizou 0,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1,6 a 2,2 U/mL de HRP para o tratamento de amostras com concentração inicial de fenol de 0,353 a 0,474 mM (WAGNER e NICELL, 2001b).

Para efluentes de uma indústria de papel e celulose, os experimentos com HRP alcançaram uma concentração total de fenóis inferior a 1,0 mg/L, em pH ótimo de 7,0, bem como uma queda substancial de toxicidade indicando, assim, que o tratamento removeu uma fração considerável de compostos tóxicos dos efluentes (WAGNER e NICELL, 2001a).

Para um efluente têxtil, a enzima mostrou uma boa remoção da cor, sendo obtida em torno de 52% de descoloração (De SOUZA, FORGIARINI e De SOUZA, 2007). Para alguns corantes, obteve-se uma eficiência de 77 a 99% na remoção da cor, com a atividade de HRP mantida em 3,5 U/mL (Da SILVA et al., 2011). Para remoção de alguns corantes azo, a enzima HRP se mostrou eficiente, com uma atividade ótima de 2,2 U/mL, em pH próximo de 2,0, atingiu-se uma eficiência de remoção de 84% (MOHAN et al., 2005). Ademais, houve uma redução na toxicidade dos produtos formados (BHUNIA, DURANI e WANGIKAR, 2001; Da SILVA et al., 2011; De SOUZA, FORGIARINI e De SOUZA, 2007).

A HRP também se mostrou promissora na descoloração de corantes antraquinonas, sendo capaz de degradar 94,7% de Violeta Ácido 109 e 89,4% de Azul Ácido 225, com concentração de enzima de 0,15 U/mL, tempo de reação de 15 e 32 min., pH 4,0 e 5,0, respectivamente (ŠEKULJICA et al., 2015). Do mesmo modo, a peroxidase bruta, extraída da raiz forte, degradou 72,95% de metilo alaranjado e 79,24% de Bismarck castanho, em pH ótimo de 4,0 e 3,0, respectivamente (AMBATKAR e MUKUNDAN, 2015).

Um problema recorrente nos efluentes municipais é a presença de Compostos de Desregulação Endócrina (CDE). A oxidação enzimática de estrogênios em efluentes municipais mostrou que estrogênios sintéticos requerem menos atividade de HRP do que estrogênios naturais. Além disso, os efluentes municipais demandaram uma maior atividade enzimática do que o efluente sintético, 8,0 a 10,0 U/mL comparado a 0,032 U/mL. Essa constatação evidencia o impacto das matrizes constituintes do efluente doméstico sobre a remoção de estrogênios (AURIOL et al., 2007). Experiências conduzidas usando efluentes reais mostraram que a eliminação significativa de micropoluentes fenólicos, cerca de 95%, foi alcançada sob a concentração de 12 U/L de HRP, 20  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em pH 7,0 e com 1 h de tempo de reação (NA e LEE, 2017).

### *3.2.1.3 Tratamento enzimático combinado com outros processos*

Apenas a aplicação de tratamentos enzimáticos pode ser insuficiente para realizar o enquadramento dos efluentes líquidos nos corpos receptores, conforme as legislações ambientais. No entanto, utilizar a oxidação catalisada por enzimas como pré-tratamento pode ser importante para melhorar a biodegradabilidade e produzir um efluente que possa ser tratado

biologicamente (ELY, KEMPKA e SKORONSKI, 2016). Há evidências de que o tratamento enzimático é viável como uma etapa de pré-tratamento na remoção de fenol de efluentes de refinaria antes de entrar em contato com um biorreator (STEEVENSZ et al., 2009). Entretanto, ainda há poucos estudos que avaliam a combinação do tratamento enzimático com algum outro processo.

Um pré-tratamento enzimático pode ser uma ferramenta útil para reduzir o tempo de residência nos reatores biológicos e prevenir o stress causado pelo aumento do teor poluente. Em contrapartida, a cor gerada pela reação enzimática e o aumento no conteúdo de DQO nos biorreatores podem tornar essa tecnologia menos interessante para o tratamento de efluentes (BEVILAQUA et al., 2002).

Também, avaliou-se o tratamento enzimático, com peroxidase de soja num reator de tanque contínuo, seguido em um módulo de membrana de ultrafiltração em série, para a remoção de 4-clorofenol (MURCIA et al., 2009). Para a remoção de 2-clorofenol o tratamento enzimático foi combinado com ultrassons (ENTEZARI, MOSTAFAI e SARAFRAZ-YAZDI, 2006).

Em outro estudo, investigou-se a eficiência da combinação de tratamento enzimático, aplicando-se a enzima Lacase de *Terametes versicolor* e Versatile Peroxidase de *Bjerkandera adusta*, com o processo foto-Fenton, sobre a remediação da cor de efluentes da indústria de papel e celulose (KARIMI et al., 2009). Além disso, foi avaliado a capacidade de tratamento de efluentes têxteis usando um tratamento biológico (Fungo *Phanerochaete chrysosporium*, por meio da atividade enzimática de peroxidase), seguido de método químico de ozônio (KUNZ, REGINATTO e DURÁN, 2001).

Kotsou et al. (2004) estudaram a combinação de um tratamento biológico utilizando fungos *Aspergillus niger* seguido de oxidação química, o processo Fenton, em um efluente originado do processamento de azeitonas. Nesse estudo, a etapa de tratamento biológico proporcionou redução de 70, 41 e 85% para DQO, fenol total e fenol simples, respectivamente, com Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) de 2 dias. A adição da etapa subsequente (Fenton) permitiu o controle efetivo da carga orgânica e do teor de fenóis do efluente final necessários para atingir os níveis requeridos pelas legislações.

### 3.2.2 Processo Oxidativo Avançado (POA)

Tratamentos baseados na oxidação química de poluentes podem ser a solução para efluentes com características bem particulares, pois esses processos permitem a mineralização de poluentes em CO<sub>2</sub>, água e íons inorgânicos ou sua transformação em produtos menos complexos (GOMES, 2009).

Os POAs envolvem a geração de radicais hidroxilas (<sup>•</sup>OH), um forte oxidante, com potencial de oxidação em torno de 2,80 V, sendo apenas menor que o flúor. Esses processos possuem baixa seletividade, possibilitando a transformação de um grande número de contaminantes tóxicos (OLLER, MALATO e SÁNCHEZ-PÉREZ, 2011).

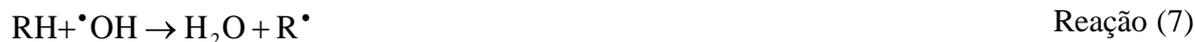
Os POAs têm sido usados para remover altas e baixas concentrações de compostos orgânicos de diferentes fontes, que geralmente são tóxicos e não biodegradáveis. Esses processos podem ser usados em combinação com os tratamentos convencionais, como uma etapa de pré-tratamento, com o objetivo de converter os compostos orgânicos inicialmente persistentes em intermediários mais biodegradáveis ou como um polimento final para o efluente atingir os limites ambientais (OLLER, MALATO e SÁNCHEZ-PÉREZ, 2011).

#### 3.2.2.1 Processo Fenton

O reagente de Fenton possui a vantagem de ser um processo muito simples, realizado a partir da mistura de sais ferrosos e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio ácido, no qual o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como agente oxidante, que gera o radical hidroxila, e os íons Fe<sup>2+</sup> atuam como catalisadores da reação, conforme reação (6) (NEYENS e BAEYENS, 2003).



A formação desses radicais envolve uma sequência de reações complexas. As substâncias orgânicas são inicialmente transformadas em alguns produtos intermediários que podem ou não ser resistentes às reações de oxidação posteriores. Os radicais hidroxila podem oxidar compostos orgânicos por abstração de próton, como mostra a reação (7), produzindo radicais orgânicos (R<sup>•</sup>), que podem novamente ser oxidados, com o início de uma reação em cadeia, conforme as reações 8 e 9 (NEYENS e BAEYENS, 2003).



A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é fundamental no processo, já que seu excesso pode atuar como sequestrador de  $\cdot\text{OH}$ , formando o radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2\cdot$ ) (reação 10), que possui menor potencial de oxidação (1,42 V), e assim, dificulta o processo de degradação (NEYENS e BAEYENS, 2003).

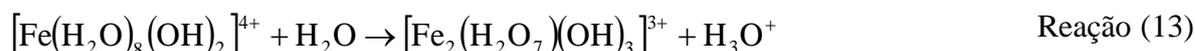


A relação  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$  é muito importante na reação de Fenton. Quando a quantidade de  $\text{Fe}^{2+}$  empregado excede àquela de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o tratamento tende a ter o efeito de coagulação química. Quando a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é maior, o tratamento tende a ter o efeito da oxidação química (NEYENS e BAEYENS, 2003).

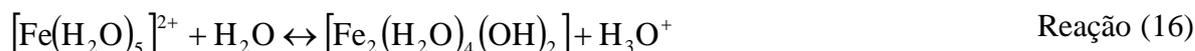
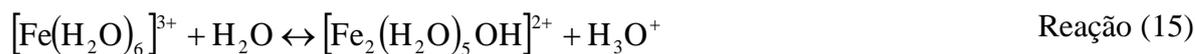
No processo Fenton, é importante manter o pH próximo a 3,0, pois o valor favorece a alta eficiência do tratamento. Quando o meio se encontra muito ácido ( $\text{pH} < 2,5$ ), a velocidade de degradação diminui, pois altas concentrações de  $\text{H}^+$  podem sequestrar os radicais hidroxila, formando  $\text{H}_2\text{O}$ , de acordo com a reação (11) (NEYENS e BAEYENS, 2003).



Nos casos que o pH do meio se encontra entre a faixa de valores de 3,5 a 7,0, forma-se complexos, os quais são apresentados nas reações (12), (13) e (14).



Quando o meio se encontra alcalino ( $\text{pH} > 7,0$ ) é atribuída à transição de ferro de um íon ferroso hidratado a uma espécie coloidal, formando complexos hidróxido-férricos, segundo as reações apresentadas nas reações (15) e (16).



O pH do meio pode ser considerado uma limitação, devido a necessidade de adição de ácido para obtenção de efluente com pH próximo a 3,0 e posterior adição de base, que visa neutralizar o efluente. No entanto, o aumento do pH, favorece a transformação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em óxidos de ferro que são insolúveis em água e como consequência, há geração de lodo residual (MARCELINO, 2014).

### 3.2.2.2 Estudos realizados para oxidação de compostos fenólicos por reagentes Fenton

O processo Fenton surge como uma alternativa ao tratamento de diversos tipos de efluentes. Diversos autores relataram na literatura sobre a aplicação do processo para a remoção de fenol.

O pós-tratamento com reação de Fenton, a partir de um efluente real de refinaria de petróleo, com altas concentrações de fenóis (200 mg/L), foi avaliado para reduzir a DQO, fenóis e outros poluentes. Houve uma maior remoção de DQO e fenol com concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$  de 300 e 20 mg/L, respectivamente, a um pH 4,0 e com um tempo de reação de 120 min. Obteve-se como subprodutos intermediários, os compostos de hidroquinona e benzoquinona, que são ainda mais tóxicos do que o próprio fenol. No entanto, esses foram removidos durante a reação (ESTRADA-ARRIAGA, ZEPEDA-AVILES e GARCÍA-SÁNCHEZ, 2016).

No trabalho realizado por Trapido et al. (2017), o processo Fenton foi incluído com sucesso como uma etapa intermediária para a remoção de poluentes específicos, como lignina, taninos e fenóis totais de efluentes industriais, reduzindo em mais de 90% a concentração desses contaminantes. O ajuste do pH para 3,0 não foi necessário, uma vez que a formação de subprodutos de oxidação ácida baixou o valor do pH para menos de 4,0 durante o tratamento. Observou-se visualmente que não ocorreu a precipitação de ferro.

Lopez et al. (2005) avaliaram o efeito da temperatura na degradação de 4-cloro-3-metil fenol (CMP) por Fenton. Investigaram-se as temperaturas de 25 e 70 °C nas concentrações iniciais de 10 mM de CMP e 0,5 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ , razão  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{CMP}$  de 80 e pH igual 3,0. Em ambas as temperaturas, o composto CMP foi degradado em 1 h de tratamento. A máxima remoção de Carbono Orgânico Total (COT) foi maior em 70 °C (85%), quando comparado com a temperatura de 25 °C (36%).

A remoção de fenol em meio salino pelo reagente de Fenton também foi investigada. Quando se utilizaram concentrações apreciáveis de reagentes (200 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 55 mg/L de FeSO<sub>4</sub>), o fenol foi removido após 40 min de reação num meio muito salino (50.000 mg/L de cloreto de sódio - NaCl). Contudo, na utilização de condições mais leves, o efeito da concentração de NaCl na remoção de fenol se intensificou e o composto não foi removido adequadamente (MACIEL, SANTA'ANNA JR. e DEZOTTI, 2004).

Com base nos aspectos econômicos e financeiros, a otimização do processo Fenton para a remoção de fenol, relatada por Pontes e Pinto (2010), os autores encontraram como valores ótimos a concentração de peróxido de hidrogênio de 215,56 mg/L e a relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Fe de 41:1, para uma concentração de fenol de 94 mg/L. Para concentração de 250 mg/L, a máxima remoção de fenol e DQO foram de 83 e 60%, respectivamente, com o aumento da concentração de Fe<sup>2+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (GÜMÜS e AKBAL, 2016). Em concentração de 200 mg/L, as concentrações ótimas de Fe<sup>2+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram de 45 e 800 mg/L, respectivamente, em pH 3,0, apresentando uma eficiência de remoção de 50,4% (BABUPONNUSAMI e MUTHUKUMAR, 2011). No estudo realizado por Kavitha e Palanivelu (2004), para a mesma concentração de 200 mg/L, os autores também encontraram como condições ótimas o pH 3,0 e concentração de Fe<sup>2+</sup> de 45 mg/L, porém, com concentração de peróxido de 1.020 mg/L, a remoção de fenol foi de 82%. Além disto, os autores verificaram que o processo de foto-Fenton em comparação ao convencional aumentou a degradação e eficiência de mineralização em 96%.

### **3.2.3 Tratamento biológico**

Os processos biológicos para tratamento de efluentes são os mais frequentemente aplicados nas indústrias a fim de garantir que os limites dos parâmetros físico-químicos sejam enquadrados segundo as legislações vigentes, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente, com custos relativamente baixos (CORDI et al., 2008). Entretanto, para muitos efluentes industriais esse processo não é satisfatório, devido à presença de poluentes altamente recalcitrantes e tóxicos. Ademais, esses efluentes podem ser desprovidos de importantes nutrientes, como nitrogênio (N), fósforo (P) e micronutrientes, necessários para o crescimento dos microrganismos.

Em um processo biológico, há a necessidade de uma biomassa (lodo) diversificada que garanta a degradação dos poluentes de interesse. Várias populações de microrganismos, após o processo de adaptação, são capazes de degradar compostos orgânicos e consequentemente

conseguem realizar a depuração do efluente (PICKBRENNER, 2002). A proporção de lodo dependerá principalmente da concentração específica do substrato e da potencialidade de crescimento dos microrganismos, pois esses consomem os substratos para seu desenvolvimento (MARROT et al., 2006).

A biodegradação de fenol, que resulta em sua mineralização completa, é geralmente preferida no tratamento de efluentes. No entanto, o fenol é reconhecido como um substrato inibitório para o crescimento microbiano, em concentrações relativamente baixas (100 mg/L) (PRADEEP et al., 2015). Os limites do processo biológico estão relacionados à aclimatação da biomassa e à variabilidade da composição dos efluentes (MARROT et al., 2006).

O sistema mais comumente utilizado para realizar o tratamento biológico de efluentes é lodos ativados. Nesse processo, o efluente é metabolizado pelos microrganismos presentes nos flocos de lodo que se mantêm em suspensão no reator, por meio de aeração mecânica ou difusa, que fornece o oxigênio necessário para o metabolismo e assegura o contato entre a biomassa e o efluente. No decantador há a separação das fases sólida e líquida através da sedimentação. Parte do lodo sedimentado retorna para o reator e o restante é descartado como lodo excedente (PICKBRENNER, 2002).

Uma variante dos lodos ativados é o Reator Sequencial em Batelada (RSB), em que o princípio do processo consiste na incorporação de todas as etapas em um único tanque. Dessa forma, as etapas do tratamento são determinadas através do estabelecimento de ciclos com durações definidas (PICKBRENNER, 2002).

Uma vez que o crescimento microbiano é inibido por maiores concentrações de fenol, vários estudos têm sido feitos a fim de superar essa limitação. Entretanto, poucos estudos têm sido relatados na biodegradação do fenol usando efluentes reais.

### *3.2.3.1 Estudos realizados para remoção de compostos fenólicos por tratamento biológico*

Para um efluente de Kraft, o tratamento biológico com lodos ativados resultou em remoção de 90 e 58% para os parâmetros de DBO<sub>5</sub> e DQO, respectivamente, quando o TDH variou de 16 a 6 h. Ao contrário do que foi observado para o fenol total, que obteve a maior eficiência de remoção em TDH de 48 h (33,5%) e uma degradação mínima em 4,5 h (3,6%). A adição de N e P para manter uma proporção de 100:5:0,3 forneceu a remoção ideal de DBO<sub>5</sub>, DQO e sólidos suspensos, não sendo detectada toxicidade no efluente tratado (DIEZ et al., 2002).

Em efluente sintético, avaliou-se os efeitos da concentração de fenol em sistemas de lodos ativados. O TDH ótimo foi de 23 h. O sistema atingiu o estado estacionário dentro de 7 a

8 dias de aclimação. O sistema biológico foi operado com concentração de lodo de cerca de 4 g/L. Os resultados mostraram que para concentrações crescentes de fenol de 0 a 100 mg/L, a eficiência da DQO aumentou de 49,5 para 61,5%, mas com a concentração de fenol de 200 mg/L, observou-se uma redução de 14% da DQO, devido aos efeitos tóxicos que o fenol apresenta para os microrganismos (PASDAR e MARANDI, 2013). Em outro estudo, o fenol foi utilizado como substrato limitante. Os resultados experimentais mostraram que foi possível tratar efluentes com alta concentração de fenol (até 1,0 g/L) por lodos ativados nas concentrações típicas de biomassa de um biorreator de membranas (cerca de 10 g/L). Até concentração de 2,5 g/L, os resultados experimentais mostraram que o lodo ativado tem potencial para a remoção de fenol (MARROT et al., 2006).

Efluentes sintéticos contendo 2,4-diclorofenol (DCP) foram tratados em uma unidade de lodos ativados em diferentes idades de lodo variando entre 5 e 30 dias, enquanto que a alimentação de DQO, DCP e o TDH permaneceram constantes em  $2.500 \pm 200$  mg/L, 200 mg/L e 25 h, respectivamente. Aumentos na idade de lodo causaram aumentos significativos na concentração de biomassa no tanque de aeração, o que resultou em aumentos na remoção de DQO, DCP e toxicidade. A remoção de DQO aumentou de 58 para 90%, enquanto as remoções de DCP e toxicidade aumentaram de 15 para 100% e de 38 para 100%, respectivamente, quando a idade do lodo foi aumentada de 5 a 30 dias (KARGI e EKER, 2006).

Um efluente hipersalino do processamento de azeitonas, com alta condutividade, concentração de DQO e compostos fenólicos foi tratado em um RSB aeróbio. Verificou-se que cerca de 80% de remoção para DQO e fenol pode ser alcançada. A redução do tempo de aeração foi possível sem a redução da eficiência do processo (FERRER-POLONIO et al., 2016).

Em outro RSB, lodo ativado foi aclimatado com solução sintética de 400 mg/L de fenol. Nesse estudo, confirmou-se que o desempenho do sistema melhorou com maior disponibilidade de oxigênio. Alternativamente, com o aumento da velocidade de agitação, houve o aumento no coeficiente de transferência de massa de oxigênio, o que também resultou em uma melhor degradação do fenol. No entanto, não houve oxigênio dissolvido na presença de fenol (MELO et al., 2005).

Movahedian, Assadi e Amin (2008) avaliaram o desempenho de um RSB com água sintética contendo 4-clorofenol, a diferentes taxas de carga de 0,0075 a 1,2 g/L dia. O reator foi operado durante um tempo de ciclo de 8 h a uma idade de lodo e TDH de 10 dias e 16 h, respectivamente. Observou-se altas eficiências de remoção DQO ( $95 \pm 3,5\%$ ) e  $> 99\%$  para a

remoção de 4-clorofenol, mesmo na ausência de substrato de crescimento. Em outro estudo, os experimentos demonstraram que o 4-clorofenol inibiu a oxidação do substrato glicose. Contudo, com a diminuição da concentração de glicose e a taxa de alimentação para 2.000 a 3.000 mg/L e 450 mL/h, respectivamente, a remoção completa de 300 mg/L de 4-clorofenol foi alcançado. Dessa forma, os resultados sugerem que 4-clorofenol pode ser degradado por células cultivadas em glicose como o único substrato de crescimento (BALI e ŞENGÜL, 2002).

No trabalho realizado por Yu, Gu e Song (1996) foi investigada a performance do RSB com preenchimento aerada e com preenchimento não aerada para efluente fenólico sintético. Os autores verificaram que em baixas concentrações de fenol, os dois testes produziram semelhante eficiência de remoção de substrato e qualidade do efluente, mas com uma tendência para o desenvolvimento de bactérias filamentosas. Para altas concentrações de fenol, no RSB com preenchimento não aerada, o fenol tornou-se um inibidor de microrganismos, resultando na redução da eficiência de remoção de substrato. Esse resultado comprova a importância de um pré-tratamento no efluente com altas concentrações de fenol.

### 3.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Como visto na revisão, diversos estudos que aplicam enzimas peroxidases vêm sendo feitos com o objetivo de remover compostos fenólicos em soluções sintéticas ou efluentes reais de diversas indústrias. No entanto, ainda não foi relatado nenhum trabalho que tenha utilizado tratamento enzimático para a remoção de compostos fenólicos em efluentes de biorefinarias.

Com o surgimento de uma crescente pressão para a redução da demanda global por recursos de combustíveis fósseis, devido a questões climáticas, as indústrias estão cada vez mais em busca de oportunidades para investir na valorização de resíduos no contexto de biorefinarias. Consequentemente, com o aumento considerável do número de biorefinarias, é necessário avaliar os aspectos e impactos ambientais gerados por essas empresas. Nesse sentido, é fundamental avaliar os efluentes produzidos e propor métodos de tratamento que visem seu enquadramento nas legislações vigentes.

No presente trabalho, utilizou-se efluente produzido por uma unidade industrial que se destina a extração de compostos químicos de interesse, a partir de um resíduo da indústria de papel e celulose. Esse efluente se caracteriza por apresentar elevada concentração de fenol, além de uma matriz complexa de outros contaminantes. Embora a HRP seja amplamente estudada para realizar a bioconversão de fenol, nenhum trabalho foi relatado sobre seu uso no tratamento de efluentes de biorefinaria.

Devido à complexidade do efluente, é necessário complementar o tratamento enzimático com alguma etapa posterior, que objetiva realizar a degradação dos compostos remanescentes. Poucos estudos têm sido feitos avaliando a aplicação de enzimas combinada com processos adicionais. Dessa forma, é importante analisar possíveis combinações, a fim de obter resultados mais promissores, contribuindo assim, para a discussão acerca de questões de viabilidade na utilização das alternativas sugeridas.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA UTILIZADA

A enzima HRP, obtida comercialmente, pela Toyobo do Brasil, foi caracterizada em termos de peso molecular, teor de proteínas e atividade enzimática, em que fatores como pH e temperatura foram avaliados, utilizando o pirogalol como substrato enzimático. As determinações de peso molecular e teor de proteínas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia Enzimática do Departamento de Produção Animal e de Alimentos, localizado no *campus* CAV – UDESC.

#### 4.1.1 Determinação do peso molecular da enzima

Empregou-se o método de eletroforese em gel de poliacrilamida (Page), a fim de estimar o peso molecular da enzima HRP. A metodologia foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), mediante aplicações das amostras em géis de poliacrilamida com concentração de 4% em 0,5 M de tampão Tris-HCl pH 6,8 e com géis de separação com 10% de poliacrilamida em 1,5 M de tampão Tris-HCl pH 8,8, contendo 10% de Sulfato de Dodecilo de Sódio (SDS).

Para a obtenção de uma maior concentração de proteína, realizou-se a precipitação em acetona em uma amostra com 10 mg/mL de extrato enzimático, na proporção de 1:3. Para isso, diluiu-se as amostras em solução tampão Tris-HCl pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de b-mercaptoetanol. O peso molecular padrão usado foi *PageRuler Plus Prestained Protein Ladders*, de 10 a 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, procedeu-se a desnaturação em temperatura de 95 °C por 5 min, e volumes de 20 µL foram depositados nos géis.

Após a corrida, evidenciou-se as bandas com azul de Coomassie R250, durante 120 min. A descoloração ocorreu durante uma noite em solução 30% de etanol e 10% de ácido acético.

#### 4.1.2 Determinação do teor de proteínas da enzima

O teor de proteína do extrato enzimático foi determinado pelo método de Bradford (1976). O método consiste basicamente na interação entre o corante azul brilhante de Coomassie com grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas. Uma alíquota de 10 µL de extrato enzimático de 1 mg/mL foi misturada com 790 µL de água mili-Q e 200 µL de solução de corante (reagente Bradford). Após a incubação de 5 min em temperatura ambiente,

mediu-se a absorbância em 595 nm. A concentração de proteína no extrato enzimático foi determinada através da interpolação em uma curva de calibração formada por padrões de Albumina de Soro Bovino (BSA) com concentrações variando de 0,125 a 1,0 mg/mL. O teor de proteínas no preparado enzimático foi determinado de acordo com a equação (3).

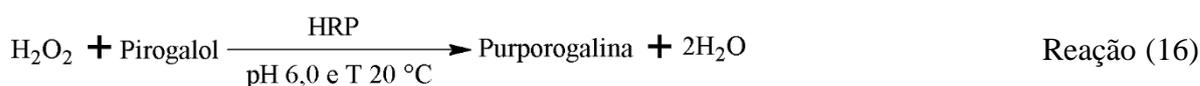
$$TP = \left( \frac{C_{\text{pro}}}{C_{\text{ee}}} \times 100 \right) \quad \text{Equação (3)}$$

Onde, TP é o teor de proteínas do extrato enzimático (%),  $C_{\text{pro}}$  é a concentração de proteínas (g/L), determinada pelo método de Bradford e  $C_{\text{ee}}$  é a concentração do extrato enzimático (g/L).

### 4.1.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da peroxidase foi monitorada espectrofotometricamente (Spectroquant® Pharo 300, Merck) pela oxidação do substrato pirogalol até a formação do produto purporogalina em 420 nm ( $\epsilon = 2.47 \text{ l/mM cm}$ ). A mistura da reação foi composta de 2,10 mL de água destilada, 0,32 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6), 0,16 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5%, 0,32 mL de pirogalol 50 g/L e 0,1 mL de extrato enzimático 0,36 g/L (concentração de enzima suficiente para obter uma alteração apreciável na absorbância de 420 nm entre 0 e 2 min). A mistura reacional sem enzima serviu como controle.

Definiu-se como uma unidade de atividade da peroxidase (U) a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de pirogalol por minuto sob as condições experimentais usadas, conforme a reação (16).



O cálculo da atividade enzimática segue a equação (4).

$$\text{Atividade (U/mL)} = \left( \frac{\left( \frac{\Delta\text{Abs}_{420} \text{ amostra}}{\approx 20\text{s}} - \frac{\Delta\text{Abs}_{420} \text{ branco}}{\approx 20\text{s}} \right) \times V_{\text{ensaio}}}{12 \times V_{\text{enzima}}} \right) \quad \text{Equação (4)}$$

Onde,  $V_{\text{ensaio}}$  e  $V_{\text{enzima}}$  são os volumes total e de enzima (mL) utilizados para o ensaio, respectivamente,  $\Delta\text{Abs}_{420}$  é a variação da absorbância em comprimento de onda em 420 nm e a

constante 12 é o coeficiente de extinção com base em mg/mL de purpurogalina à 420 nm (determinado pela Sigma-Aldrich).

#### 4.1.3.1 Determinação das condições ótimas de pH e temperatura

Avaliou-se a atividade da enzima em diferentes condições de pH (2, 3, 4, 5, 6, 7 e 7,9 – não foram testados pH maiores devido a auto-oxidação do pirogalol em meios alcalinos – pH maior que 8,0) e temperatura (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 °C). Para a determinação das condições ótimas, foram mantidas as concentrações de 0,36 g/L de enzima, 50 g/L de substrato pirogalol, temperatura ambiente para a determinação do pH e, pH 6,0 no estudo da variação de temperatura.

#### 4.1.3.2 Estudo cinético

Para a determinação da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima da reação ( $v_{máx}$ ) para o substrato pirogalol, a enzima foi incubada em diferentes concentrações de pirogalol (3,96, 7,93, 19,82, 39,65, 79,30, 198,24, 396,48, 594,72 e 792,96 mM) e uma concentração fixa de 0,3 M de  $H_2O_2$ . Todos os outros parâmetros permaneceram constantes (pH 6,0, concentração de enzima 0,36 g/L e temperatura de ambiente). Determinou-se os valores  $K_m$  e  $v_{máx}$  a partir do método de inspeção visual de Lehninger (NELSON e COX, 2014).

Nesse trabalho, investigou-se ainda a validade do mecanismo cinético ping-pong para a reação de oxidação catalisada por enzima HRP, usando pirogalol como um composto doador de H, a partir do gráfico de duplas recíprocas da taxa de reação e concentração de substrato, construído por meio do software *SigmaPlot*, versão 10.0. O teste realizou-se pela incubação da peroxidase em diferentes concentrações de pirogalol (3,96, 7,93, 19,82, 39,65 mM), com diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (0,074, 0,15, 0,22, 0,29 e 0,37 M).

Para os estudos cinéticos, prepararam-se as soluções em termos de massa/volume (g/L) e posteriormente transformadas em molaridade (mol/L = M), a critério de comparação dos resultados obtidos com os valores relatados na literatura.

## 4.2 DESCRIÇÃO DO PROCESSO DE GERAÇÃO DO EFLUENTE UTILIZADO

O efluente utilizado no estudo é gerado por uma planta industrial que se destina a extração de compostos químicos de interesse a partir de um resíduo da indústria de papel e celulose, conhecido como *Tall Oil* bruto. O resíduo é um subproduto do processo de fabricação

de celulose de fibra longa, composto de ácidos graxos e ácidos resinosos, resultantes da extração de lignina e hemicelulose da madeira durante a digestão da mesma com vapor em meio alcalino (JOHANSSON, 1982).

Na unidade industrial em questão, o *Tall Oil* primeiramente passa por um processo de acidificação com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) para em seguida ser fracionado em colunas de destilação, onde são obtidos compostos químicos de interesse comercial para os mercados de borracha, lubrificante, adesivo e alimentício. Antes de alimentar as colunas de destilação ocorre um pré-aquecimento do *Tall Oil* que objetiva a remoção de umidade. Durante o aquecimento, são carreados pelo sistema de vácuo ácidos graxos leves e compostos fenólicos onde, juntamente com o condensado da caldeira, formam a principal fonte geradora de efluente (SKORONSKI et al., 2015).

A composição do efluente gerado apresenta majoritariamente água e óleo, constituído de ácidos graxos leves de origem vegetal, que contêm compostos fenólicos. A Tabela 3 apresenta os resultados dos principais parâmetros físico-químicos do efluente bruto, medidos ao longo de um ano de monitoramento, com frequência mensal de coleta, obtidos por um laboratório externo (SKORONSKI et al., 2015).

Tabela 3 - Análise de alguns parâmetros físico-químicos do efluente bruto

<b>Parâmetro</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Média</b>	<b>Máximo</b>
pH	2,1	2,8	3,6
DBO <sub>5</sub> (mg/L)	148,0	7.998,9	17.923,0
DQO (mg/L)	392,0	19.467,0	65.950,0
Fenol (mg/L)	4,9	269,0	480,0
Óleos e gorduras (mg/L)	30,0	904,73	3.009,0

Fonte: Adaptado de Skoronski et al., 2015.

A Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da indústria aplica o processo Fenton como complemento ao processo biológico. Primeiramente, o efluente gerado é recebido em tanques de equalização para ser destinado às próximas etapas. Na sequência, o efluente recebe poli(cloreto de alumínio) e hidróxido de sódio (NaOH) para ajustar o pH para 4,5. Em seguida, passa por um tanque de separação de água e óleo, que permite a remoção do material graxo suspenso. Após, o efluente é encaminhado para o reator Fenton. Inicialmente, o efluente é ajustado com  $H_2SO_4$  para a faixa de pH 3,0 a 3,5. O TDH é de 7,5 h e o volume do reator é de 30 m<sup>3</sup>. O efluente de saída recebe NaOH com o objetivo de corrigir seu pH para valores acima de 6,0. Em seguida, o mesmo é encaminhado para uma lagoa de aeração (reator biológico) que possui como principal característica um TDH alto e uma carga orgânica específica mais baixa,

que favorece o tratamento biológico de compostos com baixa biodegradabilidade (SKORONSKI et al., 2015).

### 4.3 ENSAIOS DE TRATABILIDADE

Para este trabalho, realizaram-se duas campanhas de amostragem. As amostras de efluentes foram coletadas antes do reator Fenton por colaboradores da empresa em questão e mantidas em laboratório a temperatura ambiente.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tratamento de Água e Efluentes (LabTrat) do departamento de Engenharia Ambiental, localizado no *campus* CAV-UDESC. Para a primeira campanha de amostragem se estudou os efeitos do tratamento enzimático, empregando a enzima HRP na bioconversão do contaminante fenol, avaliando os parâmetros pH, temperatura, tempo de reação, concentração de enzima e peróxido. Para a segunda campanha, além de verificar as condições ótimas do tratamento enzimático, analisou-se a biodegradação do fenol em processos subsequentes, com o emprego de reator Fenton e biológico como etapas de pós-tratamento do efluente.

#### 4.3.1 Tratamento enzimático

O extrato enzimático foi preparado por dissolução da enzima na forma sólida numa solução aquosa com água destilada, a uma concentração de 3,6 g/L.

Para a primeira campanha de amostragem, determinou-se a condição otimizada na remoção de fenol por meio do planejamento fatorial – Design Rotacional Composto Central (DRCC) – do tipo  $2^{5-1}$ , com adição de pontos axiais e triplicata do ponto central, totalizando 30 experimentos. As variáveis estudadas pH, temperatura, tempo de reação, concentração de enzima e de  $H_2O_2$ , os níveis e os respectivos valores aplicados estão especificados na Tabela 4.

Tabela 4 - Fatores e níveis usados no planejamento fatorial  $2^{5-1}$

Abreviação	Fatores	Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
A <sub>1</sub>	pH	1,9	3,62	5,35	7,07	8,8
B <sub>1</sub>	Temperatura (°C)	17	23	30	36	43
C <sub>1</sub>	Tempo (min)	15	26	37	48	60
D <sub>1</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/L)	0,21	0,7	1,18	1,66	2,14
E <sub>1</sub>	Enzima (U/mL)	0,036	0,48	0,92	1,36	1,80

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Para a segunda campanha de amostragem, apenas as variáveis pH, concentração de enzima e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 5) foram avaliadas na remoção de fenol catalisada pela HRP, baseado nos resultados obtidos do primeiro planejamento.

Tabela 5 - Fatores e níveis usados no planejamento fatorial 2<sup>3</sup>

Abreviação	Fatores	Níveis				
		-2	-1	0	+1	+2
A <sub>2</sub>	pH	3,77	5,03	6,29	7,54	8,80
B <sub>2</sub>	Enzima (U/mL)	0,33	1,07	1,81	2,55	3,29
C <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/L)	0,03	0,33	0,63	0,94	1,24

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

As análises das superfícies de respostas permitem identificar as condições ótimas da reação. O modelo para descrever a bioconversão do fenol pode ser aproximado pela equação polinomial de segunda ordem, conforme equação (5).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1} \beta_i X_i + \sum_{i=1} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \beta_{ij} X_i X_j \quad \text{Equação (5)}$$

Onde, Y é a variável dependente (resposta), X<sub>i</sub> e X<sub>j</sub> são variáveis independentes (fatores), β<sub>0</sub> é uma constante, β<sub>i</sub> é o coeficiente linear, β<sub>ii</sub> é o coeficiente quadrático e β<sub>ij</sub> é o coeficiente para a interação linear entre os fatores.

Os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyer, com 50 mL de efluente, sob agitação orbital em Shaker SL 222 (Solab) a 110 rpm. Ajustou-se o pH do efluente com solução de hidróxido de potássio (KOH) 1,0 M. Ao atingir a temperatura desejada, a solução de enzima e, na sequência, o peróxido foram adicionados conforme as quantidades estabelecidas no planejamento. Depois da reação, a amostra foi centrifugada em Centrífuga 90-1 (Oleman), em rotação de 5.000 rpm, durante 5 min, sendo o sobrenadante avaliado, em termos da concentração de fenol total.

Após a obtenção das melhores condições de operação para a segunda campanha de amostragem, utilizou-se os valores para tratar o efluente que passaria para as etapas seguintes de pós-tratamento.

#### 4.3.2 Processo Fenton

Posteriormente à reação enzimática, o efluente centrifugado em Centrífuga 5.804R (7.500 rpm, durante 10 min) seguiu para o reator Fenton, simulado em Erlenmeyers de 125 mL.

Amostras de efluente ajustadas a pH 3 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  96 – 98% PA) foram colocadas sob agitação orbitalar em Shaker a 110 rpm, durante 24 h. Adicionaram-se as quantidades necessárias de  $\text{Fe}^{2+}$  (provenientes na forma de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  conforme as razões pré-estabelecidas pelo planejamento. Para encerrar a oxidação, ajustou-se o pH para valores entre 7,0 a 8,0 ( $\text{NaOH}$  1,5 M), que possibilita a precipitação do  $\text{Fe}^{3+}$  oxidado como  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ .

A fim de inferir os efeitos dos parâmetros – concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  - exercidos na oxidação dos compostos químicos presentes no efluente, um planejamento fatorial DRCC do tipo  $2^2$ , com adição de ponto rotacional e de triplicata do ponto central, foi considerado. Dessa forma, as variáveis estudadas e os níveis estão especificados na Tabela 6. Os valores utilizados para os níveis se basearam em testes preliminares.

Tabela 6 - Fatores e níveis usados no planejamento Fenton

Abreviação	Fatores	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
A <sub>3</sub>	$[\text{H}_2\text{O}_2]:[\text{Fe}]$	29,41	37,00	55,50	74,00	81,86
B <sub>3</sub>	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (g/L)	0,81	1,34	2,62	3,90	4,43

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

### 4.3.3 Tratamento biológico

Estudou-se também a remoção de fenol remanescente do tratamento enzimático por meio da aplicação de processo biológico. Para dar partida ao reator, amostras de efluente foram inoculadas com lodo ativado proveniente da ETE municipal de Lages – SC. Caracterizou-se o lodo em termos da série de sólidos.

Os experimentos foram simulados em Erlenmeyers de 250 mL, colocados em Shaker, em temperatura ambiente, sob agitação de 200 rpm, que garantiu a mistura completa do sistema. Inicialmente, foram avaliadas as concentrações de lodo que promoviam a maior bioconversão de fenol em um menor período de tempo. Assim, foram adicionadas quantidades de lodo e efluente que atingissem a proporção de 1:1, 2:1 e 4:1.

Após essa determinação, foi avaliada a influência dos nutrientes, N, na forma de ureia e P, em termos de fosfato dipotássico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), ao longo de três ciclos. Manteve-se as proporções de DQO:N:P igual a 100:5:1 e 100:10:2 em dois reatores, sendo que em um terceiro não houve adição de nutrientes. A concentração de fenol foi o fator determinante que encerrava

o tratamento, ou seja, quando a concentração atingia o limite da legislação, o efluente era retirado do reator, e mais efluente enzimático era adicionado, a fim de se iniciar um novo ciclo.

A base do teste se deu pela relação Alimento/Microrganismo (A/M) e pela carga orgânica volumétrica (COV), utilizadas como parâmetros para projeto e operação de processos de lodos ativados. A relação A/M é definida como a taxa de DQO aplicada por unidade de volume de liquor misto, dada pela equação (6) (METCALF e EDDY, 2016).

$$\frac{A}{M} = \frac{Q \times S_0}{V \times X} \quad \text{Equação (6)}$$

Onde, A/M é a relação alimento para microrganismo (gDQO/gSSV dia), Q é a vazão de efluente (m<sup>3</sup>/dia), S<sub>0</sub> se refere à concentração de DQO influente (g/m<sup>3</sup>), V é o volume do tanque de aeração (m<sup>3</sup>) e X é a concentração do liquor misto de biomassa no tanque (g/m<sup>3</sup>), medido pelos Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).

A taxa volumétrica de carga orgânica (kgDQO/m<sup>3</sup> dia), definida como a quantidade de DQO aplicada ao volume do tanque de aeração por dia, é expressa pela equação (7) (METCALF e EDDY, 2016).

$$\text{COV} = \frac{Q \times S_0}{V \times 10^3 \text{ g/1kg}} \quad \text{Equação (7)}$$

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

Ao final de cada processo, além da concentração de fenol total no efluente, analisaram-se os principais parâmetros físico-químicos, com o objetivo de verificar as eficiências de remoção. Ademais, realizou-se a identificação dos compostos orgânicos, por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/MS).

##### 4.4.1 Métodos analíticos utilizados

As determinações analíticas das grandezas físico-químicas e bioquímicas foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos no “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” 21ª edição (APHA, 2005). Os métodos utilizados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Métodos de determinação para os parâmetros físico-químicos analisados

Parâmetro	Unidade	Método
Cor	uH	2120 – Método espectrométrico
Carbono Orgânico Total (COT)	mg/L	5310 B – Método de combustão a altas temperaturas
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO <sub>5</sub> )	mg/L	5210 B – Incubação 20 °C em 5 dias
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	mg/L	5220 D – Método espectrométrico - refluxo fechado
Fenol Total	mg/L	5530 D - Método espectrométrico
Ferro Total	mg/L	3500-Fe - Método espectrométrico
pH	-	4500-H <sup>+</sup> B – Método eletrométrico
Sólidos Totais (ST)	mg/L	2540 B – Sólidos totais secos em 103–105 °C
Sólidos Suspensos Totais (SST)	mg/L	2540 D – Sólidos suspensos totais secos em 103 – 105°C
Sólidos Voláteis e Fixos (SV e SF)	mg/L	2540 E – Sólidos voláteis e fixos inflamado em 550 °C

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

#### 4.4.1.1 Determinação da concentração de fenol

Para a determinação da concentração de fenol presente nas amostras se utilizou o método colorimétrico baseado na reação do fenol com 4-aminoantipirina (4-AAP) 20 g/L, persulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 50 g/L e solução tampão amônio pH 10. A concentração de fenol total foi medida em espectrofotômetro UV-Visível (Spectroquant® Pharo 300, Merck), em comprimento de onda de 504 nm. Determinou-se a concentração de fenol por meio da interpolação em uma curva de calibração formada a partir de soluções padrões de fenol.

#### 4.4.1.2 Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

O método titulométrico foi aplicado para a determinação de peróxido nas amostras, em que reagente tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) agiu como titulante, conforme metodologia descrita por Baccan et al. (2001). O cálculo para a concentração decorreu conforme equação (8).

$$[\text{H}_2\text{O}_2](\text{g/L}) = \left( \frac{1}{2} \frac{M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \times V_{\text{gasto}} \times 34 \times f_d}{V_{\text{amostra}}} \right) \quad \text{Equação (8)}$$

Onde,  $M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  é a massa molar do titulante (M),  $V_{\text{gasto}}$  e  $V_{\text{amostra}}$  é o volume gasto de titulante e o volume de amostra utilizado (mL), respectivamente,  $f_d$  é o fator de diluição e as constantes 34 e  $\frac{1}{2}$  são referentes à massa molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (g/mol) e à relação estequiométrica de  $[\text{H}_2\text{O}_2]: 2[\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3]$ , respectivamente.

#### 4.4.2 Identificação dos compostos orgânicos

As análises de CG/MS foram realizadas pelo Laboratório de Avaliação Ecotoxicológica do departamento de Bioquímica – UFSC. O método objetiva separar, identificar e quantificar componentes muito semelhantes de misturas complexas.

Para essas determinações, as amostras foram preparadas pela utilização de procedimento otimizado e validado. Resumidamente, 30 mL da amostra foram extraídos com 30 mL de éter metil terc-butílico (MTBE). Evaporou-se o extrato obtido até o volume de 1 mL, sendo transferidos para um cartucho de limpeza de sílica gel/sulfato de sódio anidro. Antes da limpeza, o cartucho foi pré-condicionado com 5 mL de metanol. Os analitos foram eluídos utilizando MTBE (10 mL), o eluato foi evaporado sob a corrente de  $\text{N}_2$  suave e reconstituído com um volume de 0,5 mL. A secagem do extrato obtido ocorreu sob  $\text{N}_2$  e a derivatização utilizou N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) em acetonitrilo para formar éteres-TMS (trimetilsililo) a 70 °C durante 1 h.

Colunas de Zebron ZB-5MSi (GC - Phenomenex (EUA)) foram empregadas nessas análises. Injetaram-se alíquotas de 1,5  $\mu\text{L}$  de amostra em um equipamento Dani Master TOF-MS (Itália). O gás Hélio operou como gás transportador e as condições de análise foram temperatura inicial do forno de 50 °C, tempo de equilíbrio de 1,0 min; temperatura de 15 °C/min até 295 °C, com um período isotérmico final de 3,0 min. A biblioteca espectral padrão (NIST02L) e a literatura relatada permitiram a identificação dos compostos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

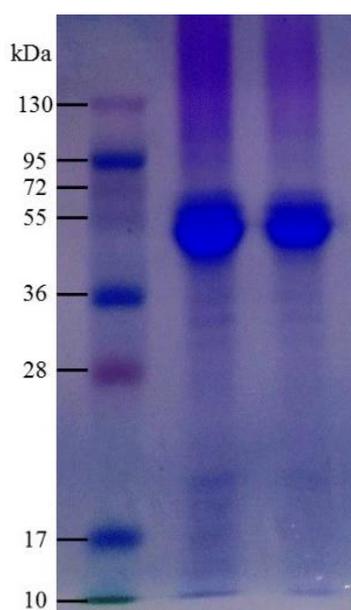
### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

#### 5.1.1 Determinação do teor de proteínas e estimativa da massa molecular

O teor de proteínas determinado para o extrato enzimático de HRP foi de  $9,1 \pm 0,26\%$ , ou seja, em 1 mg do extrato enzimático seco apenas 0,091 mg é formado por proteínas, o que sugere a presença de agentes estabilizantes e conservantes, que podem interferir na atividade enzimática.

Para a análise da massa molecular da HRP, por meio de uma solução do extrato enzimático com concentração de 10 mg/mL e, conseqüentemente, com concentração de proteína, em torno de 1 mg/mL, obteve-se duas amostras mais concentradas, cerca de três vezes, pela precipitação da proteína em acetona. Conforme Figura 4, pode-se notar que as amostras apresentaram uma banda bem marcada na faixa entre 55 e 36 kDa, próxima a massa molecular de 44 kDa, determinada por Regalado, Asenjo e Pyle (1996) e 40 kDa, obtida por Lavery et al. (2010). Isoperoxidasases não diferem significativamente em tamanho, com massa molecular na faixa de 40 a 60 kDa (MACIEL et al., 2007). Entretanto, ficou evidente outras bandas, que apresentaram pesos moleculares diversos, que confirma a presença de contaminantes.

Figura 4 - Imagem do gel obtido pela SDS-PAGE da HRP

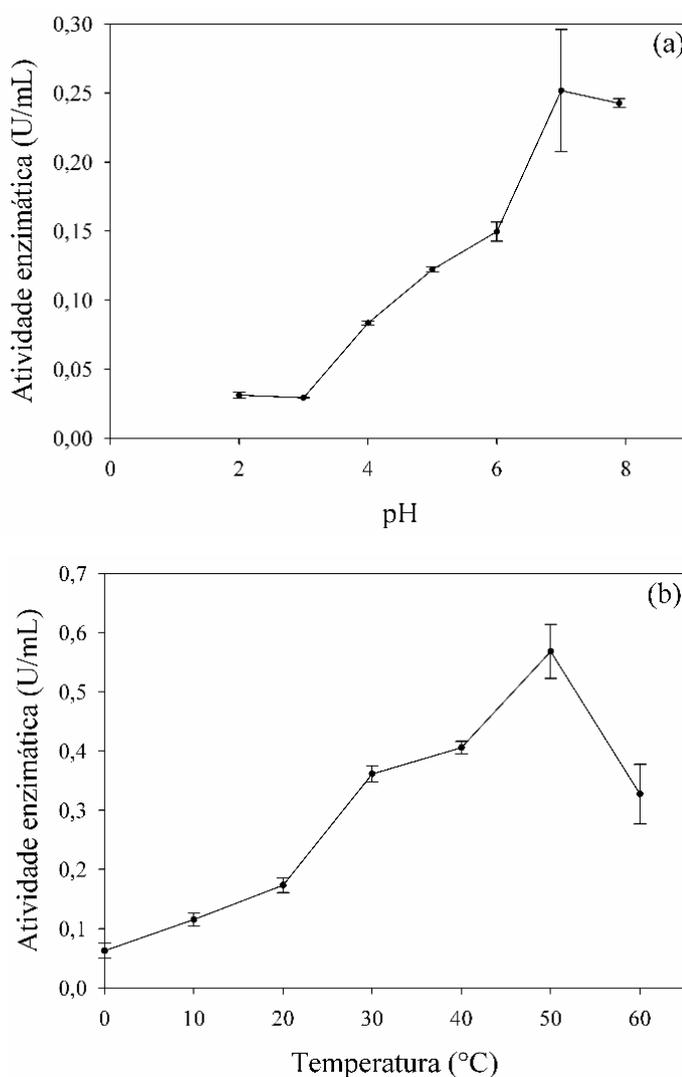


Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

### 5.1.2 Estudo da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática

Os resultados do estudo da influência do pH e da temperatura na atividade enzimática da HRP estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Efeito das variáveis: (a) pH e (b) temperatura na atividade enzimática da HRP



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Para avaliar a influência do pH na atividade enzimática, foram usados tampão tartarato 0,1 M (pH 2-5) e tampão fosfato 0,1 M (pH 6-7,9). A Figura 5 (a) mostra a influência do pH na atividade enzimática, quando empregado o pirogalol como substrato. Entretanto, não foi possível analisar pH mais alcalinos devido à diminuição na taxa de auto-oxidação, que pode ser atribuída ao aumento da taxa de decaimento dos produtos intermediários correspondentes (GAO et al., 1998). Nas condições estudadas, a enzima HRP apresentou atividade máxima na

faixa de pH entre 7,0 e 8,0, e diminuiu consideravelmente em pH ácido, fato que pode ter ocorrido por alterações químicas no grupo heme da enzima ou devido à desnaturação proteica.

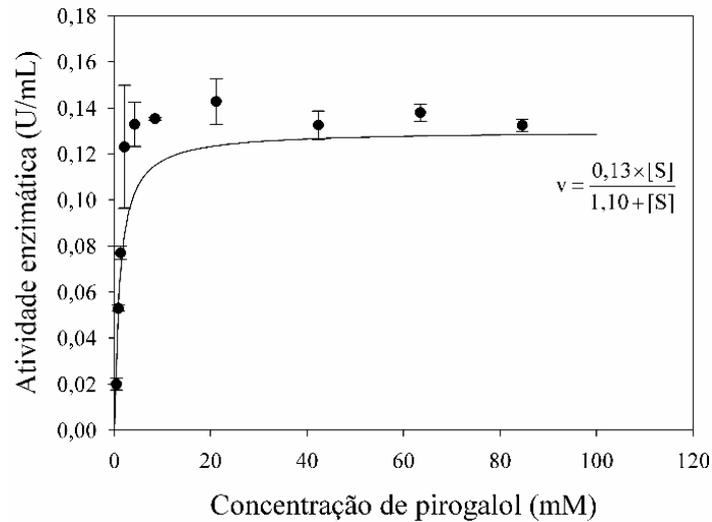
A fim de determinar a melhor condição de temperatura, a mistura reacional enzimática foi incubada a diferentes temperaturas, com variação de 0 a 60 °C. O estudo indicou que a atividade da enzima aumenta com o aumento da temperatura, até o valor de 50 °C, e diminui consideravelmente após atingir esse limite.

Alguns autores têm apresentado em seus trabalhos os valores ótimos para as variáveis pH e temperatura. A atividade máxima da enzima HRP purificada (772 U/mg de proteína), utilizando guaiacol como substrato enzimático, foi obtida em pH 7,0 e temperatura de 30 °C (LAVERY et al., 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Bódalo et al. (2006), em que a máxima remoção de fenol ocorreu em pH neutro, sendo capaz de trabalhar em meio básico e em meio ligeiramente ácido. Não foram encontradas diferenças significativas no comportamento da reação na faixa de temperatura estudada (25-40 °C).

### **5.1.3 Estudo sobre a influência dos substratos na atividade da HRP**

Os resultados do estudo da influência da concentração de pirogalol na atividade enzimática são apresentados na Figura 6. Avaliaram-se as concentrações de pirogalol nas condições de pH 6,0 e temperatura ambiente, utilizando 0,36 g/L de enzima e 0,3 M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Figura 6 - Efeito da concentração do substrato pirogalol sobre a atividade enzimática da HRP



Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Observa-se que, a partir de concentrações de 5,0 mM de pirogalol, a atividade enzimática permanece praticamente constante, correspondendo à velocidade máxima de reação, em torno de 0,13 mM/s. A constante de Michaelis-Menten é dada pela concentração de substrato que corresponde à metade da  $v_{m\acute{a}x}$ , ou seja, o valor aproximado é de 1,10 mM.

A Tabela 8 apresenta alguns valores das constantes para diferentes peroxidases e substratos reportados na literatura. Este trabalho utilizou como substrato o pirogalol, pois é recomendado por empresas que comercializam a enzima HRP, como a Sigma-Aldrich e a Toyobo.

Tabela 8 - Constante de Michaelis-Menten para diferentes fontes de peroxidase

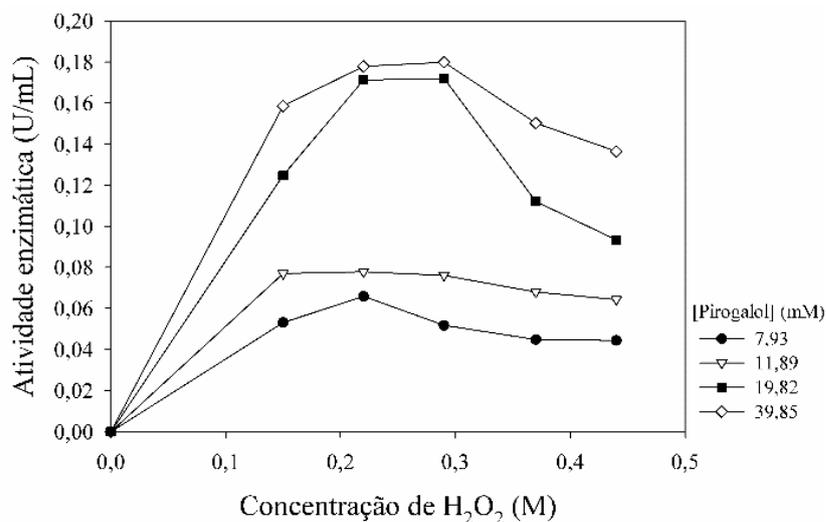
Fonte de peroxidase	Substrato	Constante		Referência
		$v_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{M/s}$ )	$K_m$ (mM)	
HRP	Triclosan	0,037	0,020	Melo (2010)
Cenoura	Pirogalol	4,5	0,34	Soysal e Söylemez (2005)
Folhas de espinafre	Fenol	382,53	2,87	Rusdi, Mulyanti e Rodiyah (2014)
Repolho	Guaiacol	87,27	5,64	Kharatmol e Pandit (2013)
Folhas de copaíba	Guaiacol	-	0,04	Maciel et al. (2007)
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	0,39	
Fungo <i>Coprinopsis cinerea</i>	1-naftol	0,53	0,075	Bratkovskaja, Vidziunaite e Kulys (2004)
	2-naftol	2,0	0,175	
	4-hidroxibifenilo	0,42	0,030	

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Quanto maior for o  $K_m$ , menor é a afinidade da enzima pelo substrato. Por essa razão, a enzima HRP apresentou maior afinidade pelo substrato triclosan (MELO, 2010) e a peroxidase de repolho apresentou menor afinidade pelo substrato guaiacol (KHARATMOL e PANDIT, 2013).

A fim de verificar a influência da concentração de peróxido na atividade da HRP em diferentes concentrações de substrato pirogalol, elaborou-se a Figura 7.

Figura 7 - Influência da concentração de peróxido na atividade enzimática da HRP



Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Como reportado anteriormente, o excesso de peróxido prejudica a ação de enzimas peroxidases. Esse fato pode ser confirmado pela Figura 7, em que concentrações de peróxido a partir de 0,25 M, ocorre a diminuição na atividade enzimática para as concentrações de pirogalol testadas. Por isso, é importante realizar a otimização da concentração de peróxido na remoção de fenol.

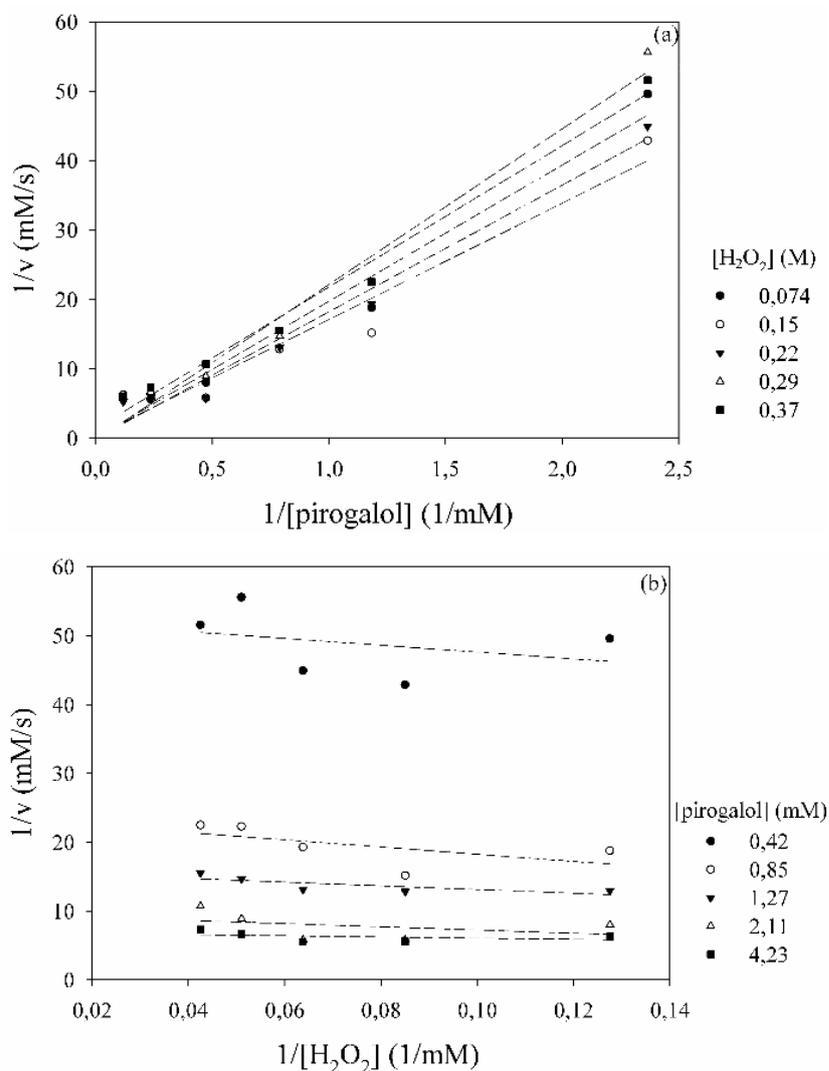
#### 5.1.4 Cinética de dois substratos

As taxas iniciais,  $v$ , como função da concentração de peróxido ou pirogalol, são derivadas de acordo com a hipótese do estado estacionário (equação 2), em que a forma linearizada, como a proposta por Lineweaver-Burk (equação 9), foi usada para análise da cinética de dois substratos.

$$\frac{1}{v} = \left( \frac{1}{v_{\text{máx}}} + \left( \frac{K_m^A}{v_{\text{máx}}} \frac{1}{[A]} \right) + \left( \frac{K_m^B}{v_{\text{máx}}} \frac{1}{[B]} \right) \right) \quad \text{Equação (9)}$$

Os gráficos dos duplos recíprocos das taxas iniciais contra o coeficiente de concentração dos substratos estão ilustrados na Figura 8. As taxas iniciais contra o recíproco das concentrações de pirogalol para diferentes concentrações fixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e contra o recíproco das concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para diferentes concentrações fixas de pirogalol estão representadas na Figura 8 (a) e (b), respectivamente.

Figura 8 - Gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver-Burk na ação da peroxidase para (a) concentração de pirogalol em diferentes concentrações fixas de  $H_2O_2$  e (b) concentração de  $H_2O_2$  para diferentes concentrações fixas do pirogalol



Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Conforme mostrado na Figura 8 (b), as parcelas recíprocas de Lineweaver-Burk proporcionaram um conjunto de linhas aproximadamente paralelas. Esse padrão distintivo é característico de um mecanismo cinético de ping-pong, envolvendo duas formas enzimáticas independentes, ou seja, formas enzimáticas separadas por um passo irreversível (GALENDE et al., 2015).

O gráfico da Figura 8 (a) mostra linhas lineares que devem cruzar no eixo y. O comportamento gráfico indica inibição competitiva do substrato, ou seja, mecanismo bi-bi ping-pong com competição entre os substratos e inibição pelo peróxido, revelando a inativação permanente da enzima na presença de  $H_2O_2$  em excesso, confirmando os valores ilustrados na Figura 7. Mecanismo encontrado para peroxidase de vassoura espanhola, na oxidação de guaiacol, ABTS, o-dianisidina, o-fenilenodiamina, ácido ferúlico e catecol (GALENDE et al., 2015). Observou-se a cinética de reação ping-pong para a HRP utilizando como substrato 4-fluorofenol (DEYHIMI e NAMI, 2011) e corantes antraquinonas (ŠEKULJICA et al., 2015), para peroxidase de soja na oxidação de 4-clorofenol (MURCIA et al., 2009).

## 5.2 ESTUDO NA REMOÇÃO DE FENOL

### 5.2.1 Tratamento enzimático

#### 5.2.1.1 Primeira campanha de amostragem

Para a primeira campanha de amostragem, o efluente apresentava concentração de fenol média de 228,95 mg/L. Os resultados da eficiência na bioconversão de fenol obtidos após cada experimento são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Eficiência de remoção de fenol para primeira campanha de amostragem

Teste	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	Remoção (%)	Valor predito (%)	Resíduo
1	-1	-1	-1	-1	1	94,59	94,79	-0,20
2	-1	-1	-1	1	-1	45,52	39,16	6,36
3	-1	-1	1	-1	-1	71,38	62,48	8,90
4	-1	-1	1	1	1	87,33	89,18	-1,85
5	-1	1	-1	-1	-1	67,65	58,52	9,12
6	-1	1	-1	1	1	89,98	91,61	-1,63
7	-1	1	1	-1	1	97,84	96,93	0,91
8	-1	1	1	1	-1	54,02	46,55	7,47
9	1	-1	-1	-1	-1	93,06	89,45	3,61
10	1	-1	-1	1	1	93,45	100,6	-7,15
11	1	-1	1	-1	1	93,96	98,57	-4,61
12	1	-1	1	1	-1	88,25	86,30	1,95
13	1	1	-1	-1	1	93,40	97,78	-4,38
14	1	1	-1	1	-1	90,52	88,35	2,17
15	1	1	1	-1	-1	93,80	89,08	4,71
16	1	1	1	1	1	96,00	102,04	-6,04
17	-2	0	0	0	0	35,11	47,23	-12,12
18	2	0	0	0	0	97,76	70,47	7,3
19	0	-2	0	0	0	98,36	99,45	-1,09
20	0	2	0	0	0	98,29	102,04	-3,75
21	0	0	-2	0	0	97,89	99,42	-1,53
22	0	0	2	0	0	98,83	102,14	-3,31
23	0	0	0	-2	0	99,44	106,06	-6,62
24	0	0	0	2	0	96,89	95,11	1,78
25	0	0	0	0	-2	11,95	31,68	-19,73
26	0	0	0	0	2	99,48	84,58	14,89
27	0	0	0	0	0	97,46	96,24	1,22
28	0	0	0	0	0	97,94	96,24	1,70
29	0	0	0	0	0	96,95	96,24	0,71
30	0	0	0	0	0	97,44	96,24	1,20

Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Para a análise dos resultados, o modelo quadrático com o efeito linear individual e as combinações lineares entre as variáveis foi selecionado como o mais adequado. Determinou-se a significância estatística do modelo pela análise de variância (Anova), mostrada na Tabela 10. A resposta e os fatores foram correlacionados pelo modelo apenas com as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ) (equação 10).

$$\text{Remoção (\%)} = -59,13 + 37,81A - 1,27B + 0,052C - 36,84D + 163,72E - 2,30A^2 + 0,027B^2 + 0,009C^2 + 2,14D^2 - 49,03E^2 - 0,032AB - 0,036AC + 2,47AD - 9,85AE + 0,012BC + 0,22BD - 0,088CE + 6,91DE$$

Equação (10)

Tabela 10 - Análise de variância para o modelo do tratamento enzimático (primeira campanha)

Modelo	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	MQ <sup>c</sup>	Coefficiente	Valor-F	Valor-p <sup>d</sup>
		20		-59,13		<0,0001
A <sub>1</sub>	2.810,01	1	2.810,01	37,81	17.137,52	<0,0001
A <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1.244,31	1	1.244,31	-2,30	7.588,71	<0,0001
B <sub>1</sub>	10,07	1	10,07	-1,27	61,40	0,0043
B <sub>1</sub> <sup>2</sup>	34,31	1	34,31	0,027	209,24	0,0007
C <sub>1</sub>	11,08	1	11,07	0,052	67,55	0,0038
C <sub>1</sub> <sup>2</sup>	34,91	1	34,91	0,009	212,89	0,0007
D <sub>1</sub>	180,26	1	180,26	-36,84	1.099,38	<0,0001
D <sub>1</sub> <sup>2</sup>	31,88	1	31,88	2,14	194,41	0,0008
E <sub>1</sub>	4.202,23	1	4.202,23	163,72	25.628,30	<0,0001
E <sub>1</sub> <sup>2</sup>	2.416,15	1	2.416,15	-49,03	14.735,44	<0,0001
A <sub>1</sub> x B <sub>1</sub>	2,04	1	2,03	-0,032	12,41	0,0388
A <sub>1</sub> x C <sub>1</sub>	7,92	1	7,92	-0,036	48,30	0,0061
A <sub>1</sub> x D <sub>1</sub>	147,92	1	147,92	2,47	902,12	<0,0001
A <sub>1</sub> x E <sub>1</sub>	896,79	1	896,79	-9,85	5.469,30	<0,0001
B <sub>1</sub> x C <sub>1</sub>	12,60	1	12,60	-0,012	76,86	0,0031
B <sub>1</sub> x D <sub>1</sub>	16,60	1	16,60	0,22	101,23	0,0021
B <sub>1</sub> x E <sub>1</sub>	0,00	1	0,001	0,002	0,00	0,9504
C <sub>1</sub> x D <sub>1</sub>	0,29	1	0,28	-0,017	1,74	0,2789
C <sub>1</sub> x E <sub>1</sub>	3,05	1	3,05	-0,088	18,59	0,0229
D <sub>1</sub> x E <sub>1</sub>	74,62	1	74,62	6,91	455,09	0,0002
Falta de ajuste	1.337,02	6	222,84		1.359,02	<0,0001
Erro puro	0,49	3	0,16			
Total SS	13.678,63	29	2.810,01			

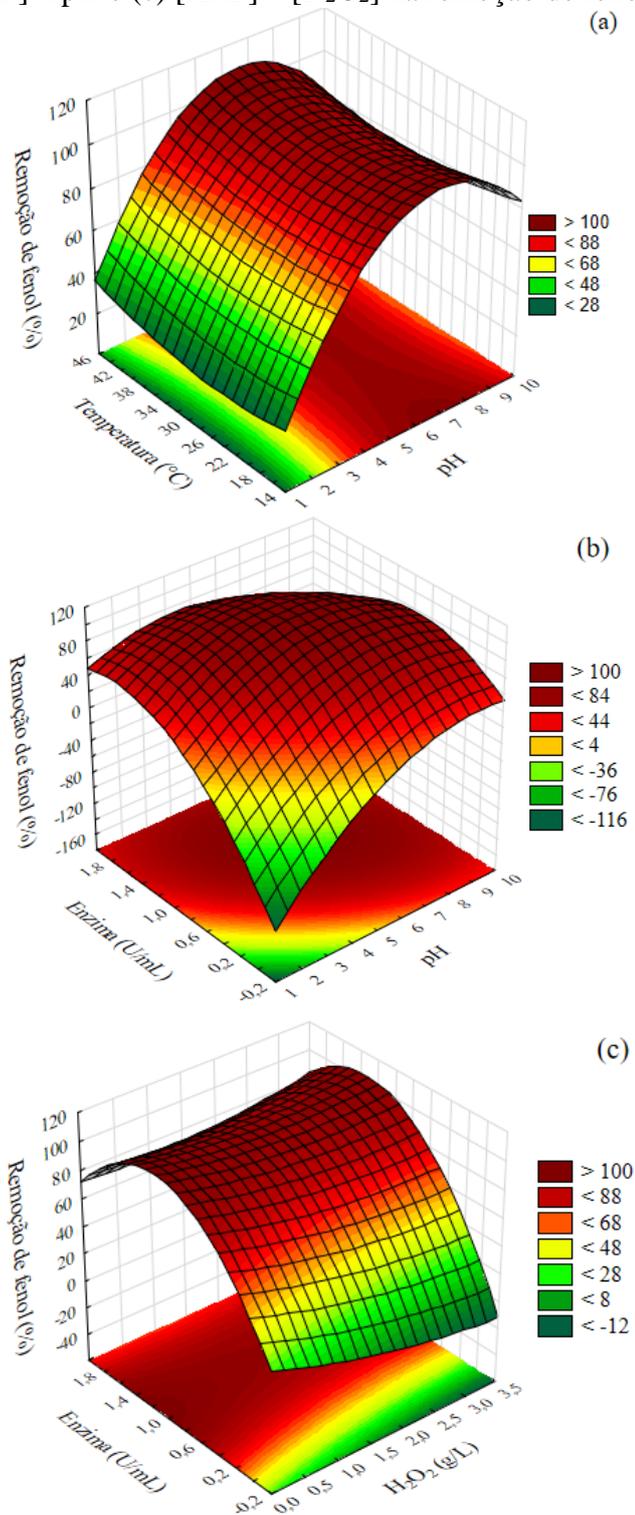
R<sup>2</sup> = 0,903; R<sub>adj</sub> = 0,686; <sup>a</sup> Soma dos quadrados; <sup>b</sup> Graus de liberdade; <sup>c</sup> Média quadrática; <sup>d</sup> valor-p <0,05 indica diferença significativa.

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Os dados obtidos pela Anova demonstram que os efeitos lineares de pH e concentração de enzima apresentaram as maiores influências na bioconversão do fenol, ou seja, essas variáveis são fundamentais na remoção de fenol no efluente estudado. As interações lineares entre temperatura e concentração de enzima, e tempo de reação e concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não foram estatisticamente significativas, ao nível de significância de 5% (p<0,05). O modelo apresentou validade estatística, confirmada pelo coeficiente de determinação (R<sup>2</sup> = 0,903), implicando que apenas 9,78% da variabilidade na resposta não foi explicada pelo modelo. Por outro lado, o valor-p <0,0001 para a falta de ajuste implica que outros modelos devem ser considerados para melhorar a descrição matemática do processo estudado.

Os resultados foram transformados em superfícies de respostas, de forma a possibilitar a visualização da influência das variáveis na remoção de fenol, ilustradas na Figura 9.

Figura 9 - Superfícies de resposta apresentando a influência das variáveis: (a) temperatura x pH, (b) [HRP] x pH e (c) [HRP] x [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] na remoção de fenol

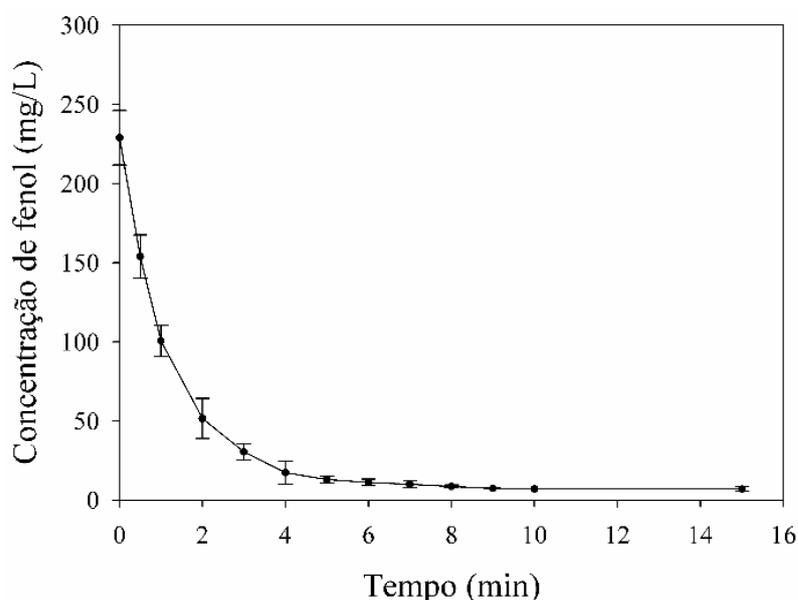


Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Os resultados apontam que o pH próximo a 6,32 e a concentração de enzima de 1,13 U/mL favoreceram o desempenho da enzima HRP na bioconversão do fenol. Embora a atividade enzimática seja normalmente dependente da temperatura, os resultados desse estudo mostraram que a temperatura não foi um parâmetro significativo na remoção de fenol dentro da faixa de valores testados. Em relação ao tempo e a concentração de peróxido, observou-se que, dentro da faixa estudada, o aumento ou a diminuição dessas variáveis também não interferiram no desempenho da enzima. De qualquer maneira, o modelo calculou as melhores condições para esses parâmetros, sendo a temperatura ótima de 28 °C, tempo de 35 min e concentração de peróxido de 1,24 g/L.

A cinética de degradação do fenol está apresentada na Figura 10. Observou-se que a concentração de fenol diminuiu consideravelmente nos 2 min iniciais de reação, sendo que após 5 min, a concentração do contaminante permaneceu praticamente constante. Os resultados indicaram que tempos maiores não interferem significativamente na eficiência da enzima.

Figura 10 - Cinética de degradação do fenol durante reação enzimática



Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

#### 5.2.1.2 Segunda campanha de amostragem

Para a segunda campanha de amostragem, o efluente apresentou uma concentração de fenol de 303,68 mg/L, maior que da primeira amostragem (228,95 mg/L). Realizou-se um novo planejamento, a fim de verificar a influência da concentração de fenol na ação da HRP. Manteve-se as condições ótimas encontradas anteriormente de temperatura (28 °C) e tempo de

reação (35 min), pois não apresentaram influência significativa na atividade da HRP para a bioconversão do fenol. Dessa forma, avaliaram-se apenas os parâmetros pH (A<sub>2</sub>), concentração de peróxido (B<sub>2</sub>) e atividade enzimática (C<sub>2</sub>). A Tabela 11 apresenta as eficiências de remoção de fenol para o segundo planejamento.

Tabela 11 - Eficiência na remoção de fenol para o segundo planejamento

Teste	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	Remoção (%)	Valor predito (%)	Resíduo
1	-1	-1	-1	96,93	78,00	18,93
2	-1	-1	+1	95,25	77,52	17,73
3	-1	+1	-1	98,85	98,82	0,036
4	-1	+1	+1	98,58	98,73	-0,15
5	+1	-1	-1	97,72	84,87	12,84
6	+1	-1	+1	97,82	85,59	12,23
7	+1	+1	-1	97,82	103,63	-5,81
8	+1	+1	+1	98,56	104,75	-6,19
9	-2	0	0	73,60	85,67	-12,07
10	+2	0	0	98,29	98,57	-0,28
11	0	-2	0	21,99	46,67	-24,67
12	0	+2	0	98,76	86,53	12,23
13	0	0	-2	98,03	104,73	-6,70
14	0	0	+2	99,02	105,12	-6,09
15	0	0	0	98,33	102,15	-3,83
16	0	0	0	98,12	102,15	-4,03
17	0	0	0	98,00	102,15	-4,15

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Igualmente ao encontrado para o primeiro planejamento, o modelo quadrático com o efeito linear individual e as combinações lineares entre os efeitos foi selecionado como o mais adequado. A significância estatística do modelo, determinada pela Anova, é mostrada na Tabela 12. A resposta e os fatores foram correlacionados pelo modelo apenas com as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ) (equação 11).

$$\text{Remoção (\%)} = -33,08 + 22,74A + 162,44B - 1,58A^2 - 96,38B^2 + 1,32C^2 - 1,35AB + 0,32AC \quad \text{Equação (11)}$$

Tabela 12 - Análise de variância para o modelo do tratamento enzimático (segunda campanha)

Modelo	SQ	GL	MQ	Coefficiente	Valor-F	Valor-p
		9		-33,08		
A <sub>2</sub>	166,47	1	166,47	22,74	6.113,99	<0,001
A <sub>2</sub> <sup>2</sup>	121,60	1	121,60	-1,58	4.466,04	<0,001
B <sub>2</sub>	1.599,49	1	1.599,49	162,44	58.745,38	<0,001
B <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1.533,37	1	1.533,37	-96,38	56.316,95	<0,001
C <sub>2</sub>	0,40	1	0,405	-6,89	14,86	0,061
C <sub>2</sub> <sup>2</sup>	9,37	1	9,37	1,32	344,16	0,003
A <sub>2</sub> x B <sub>2</sub>	2,12	1	2,12	-1,35	77,99	0,013
A <sub>2</sub> x C <sub>2</sub>	0,72	1	0,72	0,32	26,57	0,036
B <sub>2</sub> x C <sub>2</sub>	0,078	1	0,078	0,44	2,88	0,23
Falta de ajuste	2.093,57	5	418,71		15.378,33	<0,001
Erro puro	0,054	2	0,027			
Total SS	5.792,13	16				

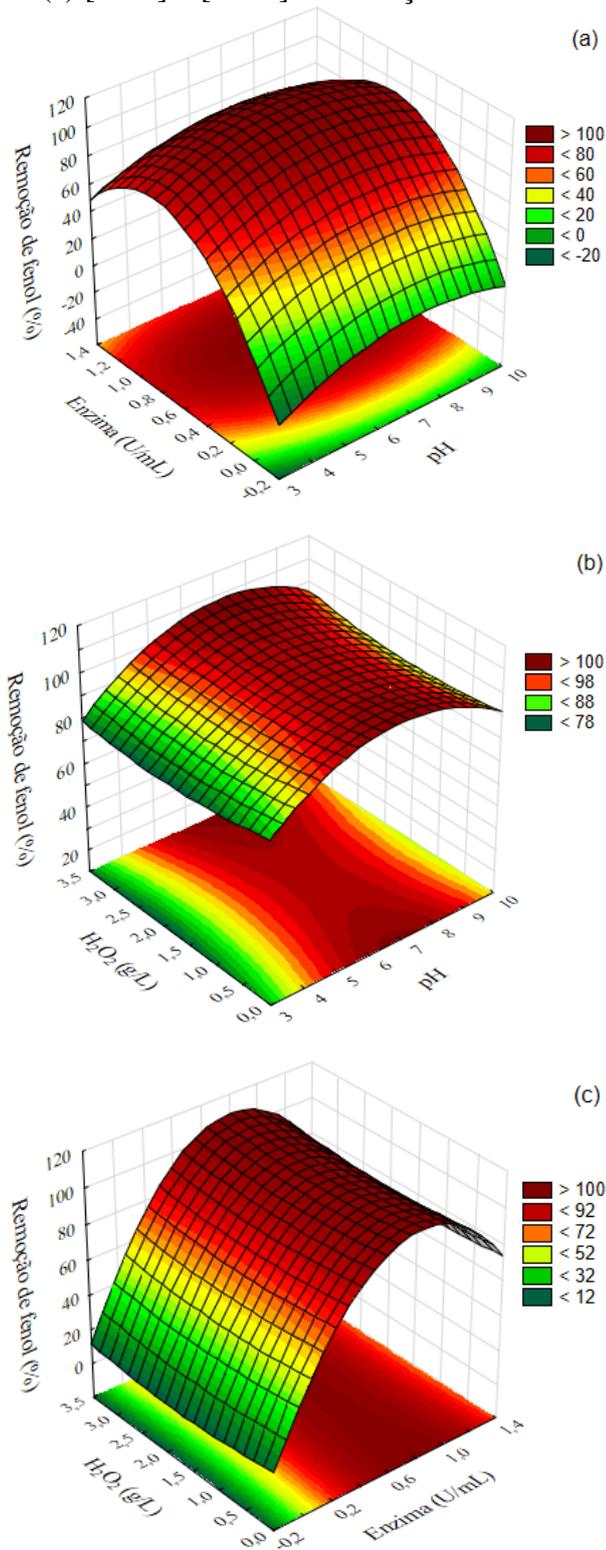
$R^2 = 0,64$ ;  $R_{adj} = 0,17$ ; valor-p <0,05 indica diferença significativa.

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Da mesma maneira, os parâmetros pH e concentração de enzima apresentaram as maiores influências na bioconversão do fenol, embora a concentração de enzima se sobressaiu aos demais. Em contrapartida, a concentração de peróxido e sua interação com a enzima não interferiu na reação, não sendo estatisticamente significativa, ao nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). O modelo gerado não pode ser considerado válido dentro do intervalo de confiança de 95%, pois não apresentou bom ajuste aos dados experimentais, devido a variação explicada ( $R^2 = 0,64$ ) estar distante da máxima variação explicável ( $R_{adj} = 0,17$ ). O valor-p <0,001 para a falta de ajuste confirma essa afirmação.

Ainda assim, os resultados foram transformados em superfície de resposta (Figura 11), de forma a possibilitar a visualização da influência das variáveis na remoção de fenol.

Figura 11 - Superfícies de resposta apresentando a influência das variáveis: (a) [HRP] x pH (b)  $[H_2O_2]$  x pH e (c) [HRP] x  $[H_2O_2]$  na remoção de fenol



Fonte: Elaborado pela autora, 2017.

Verificou-se que as melhores condições diferenciaram das apresentadas no primeiro planejamento, com pH 7,0, concentração de enzima e  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0,8 U/mL e 1,61 g/L, respectivamente. Essas diferenças são esperadas devido à grande variedade e concentração de compostos químicos presentes no efluente industrial. Com a aplicação dessas condições, realizou-se o tratamento enzimático do efluente para os processos complementares.

No estudo realizado por Ghasempur et al. (2007), o aumento da concentração de peróxido, em uma alta concentração de enzima, aumenta intensamente a remoção de fenol, enquanto o aumento da concentração de peróxido, em baixa concentração de enzima afeta ligeiramente a eficiência de remoção. Para Vasudevan e Li (1996), a razão ótima de  $\text{H}_2\text{O}_2$  para fenol é de 1:1. O excesso de peróxido resulta na inibição da enzima, o que diminui a eficiência de remoção do fenol. Em atividade de enzima HRP de 4,0 U/mL e concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 34 mg/L, os autores removeram quase que completamente o fenol da solução (maior que 99% para 100 mg/L), em temperatura de 20 °C e pH 8,0.

A remoção incompleta pode estar associada à complexa composição de fenóis presentes no efluente, sendo que algumas espécies podem configurar-se com substratos que a enzima HRP não possui afinidade e, portanto, prejudicar a bioconversão. Contudo, as concentrações encontradas, podem viabilizar a combinação do processo enzimático com uma etapa que proporcionaria o polimento final do efluente.

### 5.2.2 Reator Fenton

Dentre os parâmetros operacionais do processo Fenton, fixou-se o pH da reação em 3,0, valor consolidado na literatura, como discutido na revisão. Os parâmetros investigados no planejamento DRCC, do tipo  $2^2$ , com adição de quatro pontos axiais e três repetições no ponto central, foram a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $A_3$ ) e a razão entre as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$  ( $B_3$ ).

As amostras apresentaram uma concentração de fenol de 5,33 mg/L. Os resultados obtidos após a adição dos reagentes Fenton na concentração de fenol e na concentração remanescente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resultados do planejamento na remoção de fenol e consumo de peróxido no processo Fenton após tratamento enzimático

Teste	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	Fenol (mg/L)	Remoção (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/L)	Remoção (%)
1	-1	-1	0,37	93,06	0,95	29,32
2	-1	+1	0,43	91,93	0,18	95,46
3	+1	-1	0,59	88,93	1,38	0
4	+1	+1	0,11	97,94	1,58	59,58
5	0	-1,41	0,95	82,18	1,48	0
6	0	+1,41	0,17	96,81	0,64	85,47
7	-1,41	0	0,63	88,18	0,13	95,09
8	+1,41	0	0,23	95,68	2,37	9,80
9	0	0	0,27	94,93	1,26	52,14
10	0	0	0,18	96,62	1,21	53,98
11	0	0	0,3	94,37	1,11	57,66

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Conforme resultados apresentados acima, observa-se que todos os testes apresentaram concentração de fenol abaixo de 1,0 mg/L, oito testes apresentaram concentração menor que 0,5 mg/L (Conama 430/2011), e apenas três testes apresentaram concentração inferior a 0,2 mg/L (Lei Estadual 14.675/2009). Para o consumo de peróxido, nota-se que houve uma grande variação entre os experimentos, com consumo de 95 a 0%. No trabalho realizado por Marcelino (2014), o consumo de peróxido foi baixo, com cerca de 12% degradado após 180 min para efluente da produção de antibiótico.

O modelo quadrático se apresentou como o mais adequado. Os resultados da Anova estão ilustrados na Tabela 14. A resposta e os fatores correlacionados pelo modelo apenas com as variáveis significativas ( $p < 0,05$ ) é dado pela equação (12).

$$\text{Remoção (\%)} = 71,84 + 1,17A - 0,001B + 0,0004AB$$

Equação (12)

Tabela 14 - Análise de variância para o modelo do processo Fenton

Modelo	SQ	GL	MQ	Coefficiente	Valor-F	Valor-p
		5		71,84		
A <sub>3</sub>	63,69	1	63,69	1,17	46,39	0,02
A <sub>3</sub> <sup>2</sup>	31,06	1	31,06	-0,023	22,62	0,04
B <sub>3</sub>	42,75	1	42,75	-0,001	31,14	0,03
B <sub>3</sub> <sup>2</sup>	7,16	1	7,16	-0,000002	5,21	0,15
A <sub>3</sub> x B <sub>3</sub>	25,66	1	25,66	0,0004	18,69	0,049
Falta de ajuste	55,34	3	18,45		13,44	0,07
Erro puro	2,74	2	1,37			
Total SS	222,42	10				

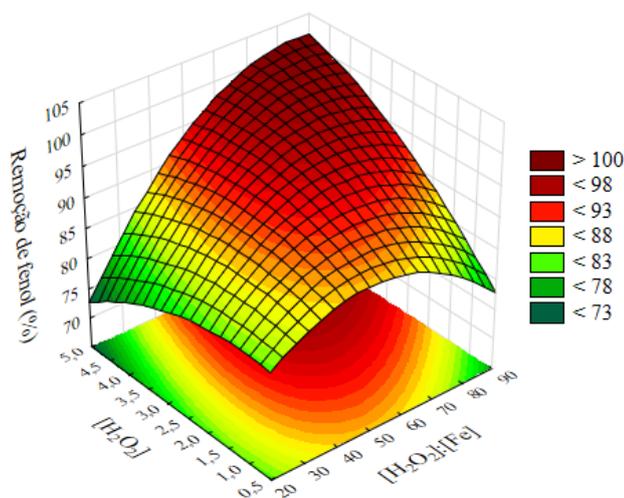
$R^2 = 0,74$ ;  $R_{adj} = 0,48$ ; valor-p < 0,05 indica diferença significativa.

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Em análise a tabela acima, observa-se que apenas o efeito quadrático da concentração de peróxido não apresentou influência significativa na bioconversão do fenol. O modelo gerado pode ser considerado válido dentro do intervalo de confiança de 95%. Uma verificação que comprova é a comparação da razão de  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  em relação ao  $F_{crítico}$ , que deve ser menor. Como o valor encontrado de  $MQ_{faj}/MQ_{ep}$  é 13,47 e  $F_{(3,2)}$  é 19,16, ou seja, o modelo matemático apresentou bom ajuste aos dados experimentais. A estatística do modelo pode ser confirmada pelo coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,75$ ) e pelo valor-p > 0,05.

Os resultados foram transformados em superfície de resposta (Figura 12), de forma a possibilitar a visualização da influência das variáveis na remoção de fenol.

Figura 12 - Superfície de resposta com a influência das variáveis no processo Fenton para a remoção de fenol



Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Os resultados apontam que as concentrações de  $H_2O_2$  e a razão  $H_2O_2:Fe$  ótimas estão acima dos valores estudados nesse planejamento. No entanto, como em alguns experimentos

foram obtidas concentrações de fenol abaixo de 0,2 mg/L, optou-se por trabalhar com as menores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3,9 g/L) e Fe<sup>2+</sup> (52,5 mg/L), que atenderam a esse limite (Teste 4).

Diversos estudos têm mostrado as melhores relações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Fe para a remoção de fenol em soluções aquosas sintéticas. Para concentrações entre 95 e 100 mg/L, o processo Fenton apresentou maior eficiência na remoção de fenol quando comparado a outros POAs, empregando a concentração ótima de 363,8 mg/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma relação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Fe igual a 120:1 (ESPLUGAS et al., 2002). Kavitha e Palanivelu (2004), encontraram como concentração ótima de peróxido de 1.020 mg/L e relação H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Fe de aproximadamente 23:1, para remoção de fenol de 82% em solução aquosa com concentração de 200 mg/L.

### 5.2.3 Tratamento biológico

Para o tratamento biológico, primeiramente se estudou a quantidade de lodo necessária para realizar a bioconversão de fenol remanescente do efluente tratado enzimaticamente, em um menor período de tempo. Para esse experimento, com volume de trabalho de 250 mL, as quantidades de efluente e lodo foram adicionadas para atingir as proporções avaliadas de 1:1, 1:2 e 1:4. No início do teste, o efluente apresentava concentração de fenol de 5,37 mg/L e DQO de 4.518,57 mg/L, enquanto que no sobrenadante do centrifugado do lodo as concentrações atingiram 0,26 e 52,12 mg/L, respectivamente. Esses valores foram utilizados para calcular as concentrações aproximadas dos parâmetros fenol e DQO, após o processo de mistura. O lodo apresentava uma concentração de SSV de 14,44 g/L. A Tabela 15 apresenta os valores de COV e a relação A/M para cada teste, com a respectiva remoção de fenol obtida ao final de 14 dias de aclimação do lodo.

Tabela 15 - Testes no tratamento biológico com variação na concentração de lodo e respectiva eficiência de biodegradação do fenol

Teste	Efluente:Lodo	COV (kgDQO/m <sup>3</sup> dia)	A/M (gDQO/gSSV dia)	Remoção de fenol (%)
1	1:1	0,082	0,0056	60,92
2	1:2	0,037	0,0025	52,63
3	1:4	0,017	0,0011	86,74

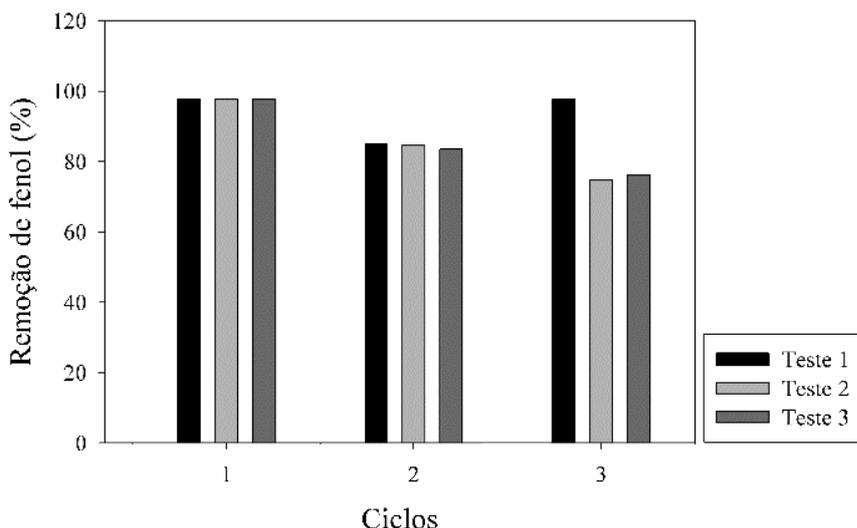
Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Ao final de 14 dias, apenas o teste 3, referente a 75% de lodo, apresentou concentração de fenol de 0,17, menor que o limite permitido pela legislação estadual (0,2 mg/L). Os testes 1

e 2 atingiram a concentração de 1,1 e 0,93 mg/L, respectivamente. Desse modo, a condição 3 foi utilizada para os experimentos posteriores, mesmo que tenha apresentado a menor carga orgânica. Na ETE da empresa, após o processo Fenton, o efluente é encaminhado para um reator biológico, que opera com alto TDH e com A/M baixa, em torno 0,04 gDBO<sub>5</sub>/gSSV dia (SKORONSKI et al., 2015). A baixa razão A/M é usual em ETEs de indústrias de papel e celulose, por exemplo, pois devido à alta concentração de lodo no reator biológico, é possível tolerar choques súbitos de compostos orgânicos, resultando em remoções mais efetivas (KUMAR et al., 2014).

Para a segunda parte do experimento, avaliou-se a influência da adição de nutrientes (N e P) na bioconversão do fenol, ao longo de três ciclos. No Teste 1 não foi acrescentado nutrientes, no Teste 2 a proporção equivaleu a 100:5:1 e no Teste 3 a 100:10:2 (DQO:N:P). A mistura do lodo com o efluente ocorreu na proporção de 4:1 (melhor resultado obtido nos testes anteriores), com adição de 200 mL de lodo e 50 mL de efluente tratado enzimaticamente. A DQO e a concentração de fenol obtida após a mistura corresponderam a  $1.170,75 \pm 142,87$  e  $4,19 \pm 0,21$  mg/L, respectivamente. A Figura 13 ilustra as remoções de fenol obtidas ao final de cada ciclo, para cada condição avaliada.

Figura 13 - Remoção de fenol após tratamento biológico variando-se a adição de nutrientes



Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Para o primeiro ciclo, os valores de COV e A/M atingiram os valores de 0,019 kgDQO/m<sup>3</sup> dia e 0,0013 gDQO/gSSV dia. Ao final do primeiro ciclo, que teve duração de 12 dias, todos os experimentos alcançaram uma concentração de fenol menor que o limite de detecção (0,1 mg/L). Assim, ao final do décimo segundo dia, interrompeu-se a agitação para

que o lodo decantasse e fosse possível realizar a retirada do efluente tratado, a fim de iniciar um novo ciclo, com a adição de mais efluente tratado enzimaticamente.

No segundo ciclo (após 13 dias), todos os experimentos apresentaram uma concentração de fenol em torno de 0,65 mg/L, concentração acima dos limites permitidos pela legislação. No entanto, da mesma forma, o efluente foi retirado para que o terceiro ciclo se iniciasse. Ao final de 11 dias, apenas o Teste 1 (sem adição de nutrientes) obedeceu a concentração de fenol imposta pela legislação. O resultado sugere a não necessidade de adição de nutrientes para realizar a bioconversão de fenol, diferentemente dos resultados encontrados em efluentes de papel e celulose, por Diez et al. (2002) e Kumar et al. (2014) em que a proporção de 100:5:0,3 e 100:6:1,5 forneceram as melhores remoções de DBO<sub>5</sub>, DQO e cor, respectivamente.

Verificou-se a concentração de sólidos do lodo, antes do início do tratamento biológico, ou seja, após sua retirada da ETE, e comparada com a concentração após o final do terceiro ciclo (Tabela 16).

Tabela 16 - Caracterização do teor de sólidos para o lodo antes e após o tratamento biológico

<b>Sólidos (g/L)</b>	<b>Após coleta da ETE</b>	<b>Ao final do terceiro ciclo</b>
Sólidos Totais (ST)	22,76	35,81
Sólidos Voláteis Totais (SVT)	13,09	19,98
Sólidos Fixos Totais (SFT)	9,66	15,83
Sólidos Suspensos Totais (SST)	21,77	35,00
Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)	12,44	18,39
Sólidos Suspensos Fixos (SSF)	9,33	16,61

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

No lodo coletado na ETE da cidade de Lages – SC, dos sólidos totais, 57,51% são representados pelos sólidos voláteis e 95,45% do lodo é constituído pelos sólidos em suspensão. Ao final do processo biológico, o lodo apresenta um aumento de 34,47% na concentração média de sólidos totais, sendo que desse total, 55,79% representam a parte volátil e 97,74% os sólidos totais em suspensão. Dos sólidos suspensos, apenas a fração volátil representa o inócuo de um sistema biológico, ou seja, a concentração de microrganismos presentes no lodo. Ao observar o aumento da concentração de SSV após o tratamento biológico, pode-se afirmar que houve o crescimento de biomassa na presença de fenol.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE

#### 5.3.1 Análises físico-químicas

##### 5.3.1.1 Primeira campanha de amostragem

Averiguou-se o desempenho dos principais parâmetros físico-químicos, na melhor condição encontrada do tratamento enzimático, para a primeira campanha de amostragem. Os valores médios, juntamente com os desvios padrão, tanto para o efluente bruto como para o efluente tratado estão apresentados na Tabela 17. O pH do efluente bruto é extremamente ácido, devido ao processo de acidificação com  $H_2SO_4$ , utilizado na planta industrial. Para o tratamento enzimático, o pH do efluente foi ajustado para a condição ótima (6,32), e observou-se que, após o processo, o pH diminuiu até o valor de 5,2. Para os parâmetros de  $DBO_5$  e DQO houve uma eficiência de remoção de 98,13 e 49,39%, respectivamente. Em contrapartida, os teores de sólidos aumentaram no efluente tratado quando comparado ao bruto, devido à formação de polímeros insolúveis, que compõe o precipitado da solução e podem ser retirados da solução.

Tabela 17 - Análises físico-químicas do efluente bruto e após o tratamento enzimático (primeira campanha)

Parâmetros	Unidade	Efluente bruto	Efluente tratado
pH		2,1	5,2 ± 0,1
$DBO_5$	mg/L	533,33 ± 115,47	10,0
DQO	mg/L	8919,5 ± 770,7	4513,67 ± 455,81
ST	g/L	1,17 ± 0,08	2,86 ± 0,07
SVT	g/L	0,71 ± 0,07	1,05 ± 0,14
SFT	g/L	0,46 ± 0,11	1,74 ± 0,09

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

##### 5.3.1.2 Segunda campanha de amostragem

Para a segunda campanha de amostragem, verificaram-se o desempenho dos parâmetros físico-químicos citados acima, além das análises de COT, cor e para algumas amostras, os que poderiam apresentar os contaminantes devido ao processo aplicado,  $H_2O_2$  e ferro total. Para o processo Fenton, adicionaram-se as concentrações otimizadas de  $H_2O_2$  e  $Fe^{2+}$  de 3,9 g/L e 52,5 mg/L, respectivamente. Após o processo se acrescentou 1,5 mL de enzima catalase (Sigma-Aldrich) para 1,5 mL de efluente, a fim de ocorrer a degradação de peróxido remanescente, que pode interferir na análise de DQO (POOLE, 2004). Para as análises do

processo biológico foram utilizadas amostras homogeneizadas dos três ciclos, sem adição de nutrientes. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Análises físico-químicas nas amostras obtidas após cada tratamento

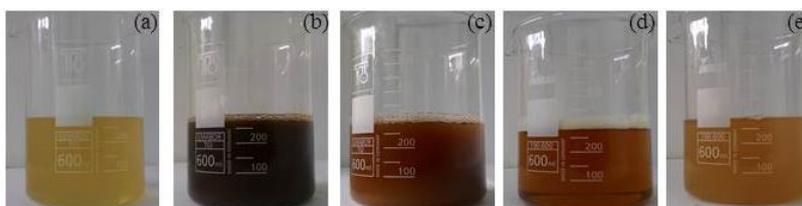
Parâmetro	Unidade	Bruto	Enzimático	Enzimático + Fenton	Enzimático + Biológico
pH		3,76	5,32	6,86	5,9
Fenol	mg/L	284,03	3,76	0,2	0,29
DBO <sub>5</sub>	mg/L	500,0	7,0	15,0	-
DQO	mg/L	5.198,25	3.657,67	2.605,38	309,28
COT	mg/L	833,33	596,6	447,8	41,59
Cor	uH	583	1664	918	349
ST	g/L	0,82	2,26	4,51	-
SFT	g/L	0,12	0,58	2,3	-
SVT	g/L	0,63	1,64	2,28	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	g/L	-	0,82	0,02	-
Ferro	mg/L	2,6	-	26,5	-

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Nota-se que o pH do efluente bruto se caracterizou como ácido, no entanto, menos ácido quando comparado a primeira campanha (pH 2,1). Após o processo enzimático, o pH permaneceu próximo ao valor de 5,2. Valor que pouco alterou após o tratamento biológico. Após o processo Fenton, o pH foi reajustado para valores entre 6,0 e 7,0.

Os sólidos não foram analisados após o processo biológico devido à pouca quantidade de amostra disponível. Para os efluentes analisados, o teor de sólidos aumentou em comparação ao efluente bruto, mesmo após o processo de centrifugação, devido à formação de polímeros insolúveis. Conseqüentemente, a cor também apresentou aumento em todos os efluentes, exceto após o tratamento biológico, que proporcionou uma diminuição de 40,14%. Os resultados podem ser comprovados visualmente, conforme as imagens apresentadas na Figura 14.

Figura 14 - Efluente após cada processo: (a) bruto, (b) enzimático, (c) enzimático pós centrifugação, (d) Fenton e (e) biológico

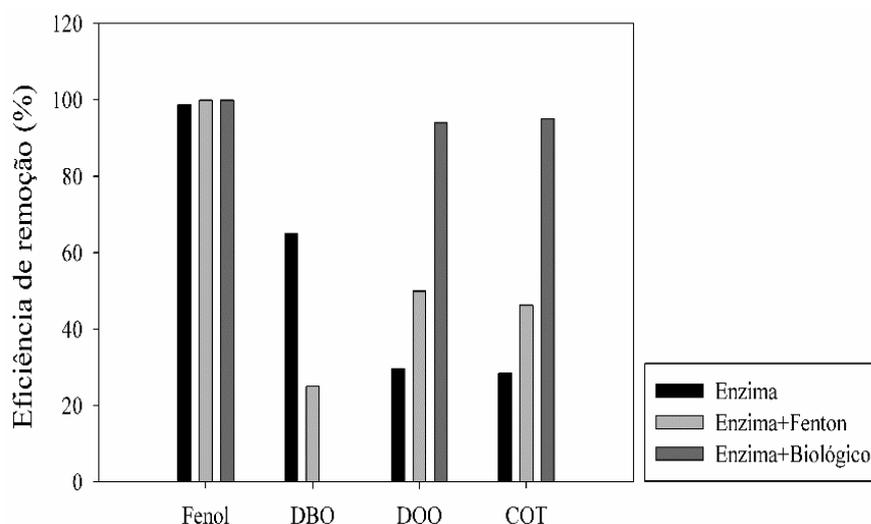


Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Mesmo após a adição da catalase, o efluente pós-Fenton apresentou uma concentração de peróxido de 20 mg/L, porém menor que a concentração de 1,45 g/L obtida antes da adição da enzima. Em relação ao ferro total, houve o consumo de 49,52%, com concentração remanescente (26,5 mg/L), acima do limite permitido pela Resolução Conama 430/2011 (15 mg/L). Essa limitação pode estar associada a complexação do metal com matéria orgânica. A fim de evitar a necessidade de remoção de ferro, o que aumentaria o custo, deve-se estudar o uso de catalisadores heterogêneos, que são utilizados como meios suportes para o ferro (BAUTISTA et al., 2008).

A Figura 15 ilustra as eficiências de remoção após os tratamentos aplicados para os parâmetros fenol total, DBO<sub>5</sub>, DQO e COT. Devido à falta de amostra não se realizou a análise de DBO<sub>5</sub> após o processo biológico.

Figura 15 - Eficiência de remoção de alguns parâmetros após os processos aplicados



Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

Para se avaliar a biodegradabilidade de um efluente, utiliza-se as relações de DQO/DBO<sub>5</sub>. Se a relação  $DQO/DBO_5 < 2,5$  o mesmo é facilmente biodegradável, se a relação permanece entre  $5,0 < DQO/DBO_5 \leq 2,5$ , o efluente irá exigir cuidados na escolha do processo biológico para que se tenha uma remoção desejável de carga orgânica, e se  $DQO/DBO_5 > 5$ , o processo biológico tem pouca chance de sucesso, e a oxidação química aparece como um processo alternativo (JARDIM e CANELA, 2004). Tanto o efluente bruto, como o efluente enzimático não apresentaram bons índices de biodegradabilidade, indicando pouco sucesso na implantação de um sistema biológico. Contrariamente, o tratamento biológico apresentou bons resultados na remoção dos principais parâmetros físico-químicos avaliados.

Na remoção de fenol, houve uma eficiência de remoção global de 99,93 e 99,90% para o tratamento enzimático seguido do reator Fenton e do biológico, respectivamente.

Para o parâmetro DBO<sub>5</sub>, observou-se uma redução na eficiência de remoção após o processo Fenton quando comparado a aplicação exclusiva do tratamento enzimático. Para os parâmetros de DQO e COT, notou-se reduções semelhantes dos parâmetros após cada etapa, com eficiências de remoção em torno de 29, 48 e 95%, nos processos enzimático, Fenton e biológico, respectivamente.

Após a aplicação de HRP no tratamento de efluente de papel e celulose, houve uma redução da concentração total de fenóis abaixo de 1 mg/L, em contrapartida, a remoção de DQO alcançada foi insignificante (WAGNER e NICELL, 2001a). Para o tratamento de efluentes de refinaria de petróleo, aproximadamente 58% de DQO e 78% de DBO<sub>5</sub> foram removidos (WAGNER e NICELL, 2001b). Em corantes antraquinonas, a enzima HRP removeu de 22 a 26% de DQO e de 14 a 38% de COT (ŠEKULJICA et al., 2015). Ao contrário dos resultados obtidos por Ambatkar e Mukundan (2015), em que HRP reduziu significativamente a DQO, em águas sintéticas na presença de corantes.

Após o processo Fenton, em efluente real de fabricação de resina, com valor de DQO e fenol de 2.904 e 1.215 mg/L, respectivamente, houve a remoção efetiva do fenol dentro de 5 min e eficiência de remoção de DQO de 82% (KAVITHA e PALANIVELU, 2004). Em efluentes gerados a partir de indústrias têxteis, químicas, de metais e de alimentos, que continham 1.750 a 3.323 mg/L de DQO, além de metais pesados e poluentes orgânicos, não biodegradáveis e tóxicos, como os corantes, a oxidação por Fenton atingiu até 100% de remoção de cor e mais de 90% de redução de DQO (BADAWY e ALI, 2006). Em outro efluente têxtil, com 1.200 mg/L de DBO<sub>5</sub>, 8.100 mg/L de DQO e 3.010 mg/L de COT, o processo Fenton reduziu em cerca de 45, 60, 40 e 71,5% os valores de DQO, DBO<sub>5</sub>, COT e cor, respectivamente (PAPADOPOULOS, FATTA e LOIZIDOU, 2007).

Para efluentes de papel e celulose, as melhores remoções para o tratamento biológico com lodo ativado foram de 90, 58 e 33,5% para os parâmetros de DBO<sub>5</sub>, DQO e fenol, respectivamente (DIEZ et al., 2002). Sendo similares aos encontrados utilizando RSB para o tratamento desse tipo de efluente, com reduções de DBO<sub>5</sub>, DQO e cor de 91, 72,3 e 55%, respectivamente (KUMAR et al., 2014). Em efluente hipersalino do processamento de azeitonas, tratado em um RSB aeróbio, verificou-se que pode ser alcançada eficiência de remoção de cerca de 80% para DQO e fenol (FERRER-POLONIO et al., 2016).

Em efluente sintético, utilizando lodos ativados, para concentrações de fenol 100 mg/L, houve remoção de DQO (61,5%) e COT (37%) (PASDAR e MARANDI, 2013), para bioconversão de 2,4-diclorofenol (DCP), houve remoção DQO (90%) e DCP (100%) (KARGI e EKER, 2006). Para água sintética contendo 4-clorofenol, aplicando um RSB, foram observadas altas eficiências de remoção DQO ( $95 \pm 3,5\%$ ) e  $> 99\%$  para a remoção de 4-clorofenol (MOVAHEDYAN, ASSADI e AMIN, 2008).

### 5.3.2 Identificação dos compostos fenólicos

A análise GC-MS confirma a complexidade da composição química do efluente estudado. No efluente bruto, para a primeira campanha de amostragem, foram encontrados 107 compostos diferentes incluindo fenóis, ácidos voláteis e seus ésteres. Entre os fenóis, a substância mais abundante foi o 2-metoxifenol. Outras moléculas como fenol e 2-etil-2-fenil-1,3-benzodioxole mostraram concentrações insignificantes e outros fenóis estavam presentes em níveis traço. No efluente tratado, o 2-metoxifenol diminuiu cinco vezes e os outros compostos citados estavam em concentrações sob o limite de detecção. Alguns outros fenóis foram formados durante o processo enzimático e podem ser detectados no efluente tratado. O principal composto encontrado foi o o-cresol (2-metil fenol) e o 2,3-di-hidro-2-metil-1-fenil-4(1H)-quinazolinona.

Para a segunda amostragem, no efluente bruto, o composto 2-metoxifenol também estava presente em maior quantidade, enquanto que compostos fenólicos como, 2,6-dimetoxifenol e 2-etil-2-fenil-1,3-benzodioxole, foram detectados em menores quantidades. Ainda, ácidos graxos como o ácido heptanoico, propanoico, octanoico, benzoico e butanoico, estavam presentes na amostra. A quantidade significativa de ácidos graxos encontrada na amostra é explicada devido a constituição do efluente, formado principalmente por compostos fenólicos e ácidos graxos (SKORONSKI et al., 2015).

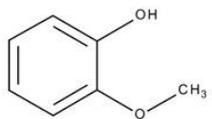
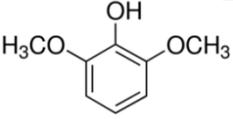
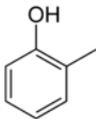
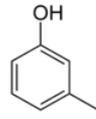
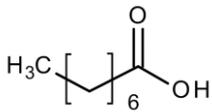
Após o tratamento com HRP, os ácidos graxos permaneceram no efluente e outros fenóis se formaram, como o composto m-cresol (3-metil fenol) e 2,4-bis(1-metil-1-fenil etil) fenol. Os compostos fenólicos encontrados no efluente bruto (citados acima) precipitaram, pois não foram detectados na amostra. No entanto, fenóis de maior peso molecular permaneceram no efluente. Diferentemente do que se encontrou em solução sintética de fenol, em que nenhum produto solúvel estava presente após o tratamento de 3 h com HRP (VASUDEVAN e LI, 1996). Essa comparação confirma a limitação de bioconversão encontrada pela HRP em efluentes reais, devido a não afinidade da enzima por todos substratos presentes.

Na amostra tratada com os reagentes Fenton, observou-se a presença majoritária de ácidos graxos de alto peso molecular, como o ácido hexadecanoico, tetradecanoico e octadecanoico, além de ácidos como o pentanoico e propanoico. Um composto fenólico intermediário formado foi 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4 metil fenol. Na degradação de um corante ácido-H, os autores encontraram que ácidos graxos de cadeia curta foram produzidos à medida que a oxidação de Fenton prosseguia (LIU et al., 2013). A degradação de fenol por Fenton heterogêneo, por meio de óxidos de ferro imobilizados, levou à geração de ácidos carboxílicos como subprodutos. Esses ácidos, principalmente oxalícos, melhoraram a dissolução dos óxidos de ferro e, conseqüentemente, catalisaram efetivamente a degradação de fenol (HUANG, HUANG, 2008). A oxidação por Fenton eliminou quase completamente os compostos fenólicos presentes em efluente de processamento de azeitonas (KALLEL et al., 2009). Kang, Lee e Yoon (2002) indicaram que a disponibilidade de  $Fe^{2+}$  e sua interação com o intermediário orgânico é fator importante para melhorar o desempenho de decomposição de compostos fenólicos.

A análise para o tratamento biológico indicou que os compostos químicos estavam presentes na amostra em concentrações abaixo do limite de detecção do método (0,1 mg/L). A fim de identificá-los seria necessário realizar algum procedimento de concentração das substâncias. De qualquer modo, os resultados indicaram a eficiência do processo biológico na bioconversão dos diferentes compostos químicos encontrados após o tratamento enzimático.

A Tabela 19 apresenta a estrutura química dos principais compostos detectados nas amostras analisadas.

Tabela 19 - Estrutura química dos principais compostos encontrados nas amostras

Composto químico	Fórmula molecular	Estrutura química
2-metoxi fenol	$\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4\text{OH}$	
2,6-dimetoxi fenol	$(\text{CH}_3\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$	
cresol	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$	 2-metil fenol
		 3-metil fenol
Ácido octanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	

Fonte: Elaborada pela autora, 2017.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de oxidação catalisado por enzima HRP demonstrou ser um método promissor na bioconversão de fenol em efluentes de uma biorefinaria. O efluente industrial utilizado apresentou grande variabilidade em sua composição, com altas concentrações de fenol, além de uma matriz complexa de compostos químicos. A variabilidade nas características do efluente é esperada quando se trabalha com efluente gerado em condições reais, implicando em diferenças nos processos de tratamento. Mesmo assim, a enzima HRP foi capaz de alcançar altos índices de remoção de fenol, sendo maiores que 98%. Os experimentos realizados também comprovaram que o tratamento enzimático torna o efluente menos tóxico e complexo, possibilitando uma etapa de polimento final, em que podem ser aplicados processos convencionais, como reator Fenton e biológico, que atualmente são empregados na ETE da empresa.

Por meio dos planejamentos experimentais, foi possível otimizar as condições das principais variáveis que influenciam a bioconversão do fenol, com a utilização da menor quantidade de reagentes possível, a fim de reduzir os custos no processo de tratamento. Embora os resultados foram diferentes para as duas campanhas de amostragem, os valores médios obtidos para a atividade enzimática (0,96 U/mL) e para a concentração de peróxido (1,42 g/L) em pH neutro, temperatura de 28 °C e tempo de contato de 35 min, são capazes de atingir a concentração de fenol necessária para que o efluente possa ser encaminhado para etapas posteriores.

Os processos convencionais avaliados como etapas de pós tratamento, garantiram a redução da carga orgânica, além de enquadrar o efluente para lançamento em corpos receptores, em termos da concentração de fenol.

A seguir são apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros com base nos dados experimentais obtidos:

- a) Devido a variação das características do efluente coletado nas duas campanhas de amostragem, observa-se a necessidade de realizar estudos com mais números de amostras, antes de definir as condições operacionais a serem utilizadas em escala industrial;
- b) explorar outras fontes de peroxidase, que estão disponíveis em quantidades suficientes e conseqüentemente, são mais baratas;

- c) avaliar técnicas de imobilização e uso de aditivos, que aumentam a vida catalítica da enzima, por meio da sua reutilização e redução da quantidade, buscando reduzir os custos de tratamento;
- d) estudar e destinar os produtos poliméricos (lodo) formado no processo enzimático;
- e) buscar uma alternativa, como o uso de catalisadores heterogêneos, que evitam a necessidade de remoção de ferro, ou a aplicação de processos de adsorção por carvão ativado, por exemplo, que objetivam a retirada do ferro remanescente, após o tratamento;
- f) avaliar o tratamento biológico por um maior período de tempo, considerando fatores como pH, agitação do sistema, concentração de oxigênio e fenol;
- g) recomenda-se realizar a avaliação dos custos de investimento e operacional.

## REFERÊNCIAS

- AMBATKAR, M.; MUKUNDAN, U. Enzymatic decolourisation of Methyl Orange and Bismarck Brown using crude peroxidase from *Armoracia rusticana*. **Applied Water Science**, 2015. p. 397–406.
- APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 21. ed. Washington: American Public Health Association, 2005.
- AURIOL, M. et al. Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in wastewater. **Chemosphere**, 2007. v. 68, n. 10, p. 1830–1837.
- BABUPONNUSAMI, A.; MUTHUKUMAR, K. Degradation of Phenol in Aqueous Solution by Fenton, Sono-Fenton and Sono-photo-Fenton Methods. **Clean - Soil, Air, Water**, 2011. v. 39, n. 2, p. 142–147.
- BACCAN, N. et al. **Química analítica quantitativa elementar**. 3. ed. São Paulo: E. Blucher, 2001.
- BADAWY, M. I.; ALI, M. E. M. Fenton's peroxidation and coagulation processes for the treatment of combined industrial and domestic wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, 2006. v. 136, p. 961–966.
- BALI, U.; ŞENGÜL, F. Performance of a fed-batch reactor treating a wastewater containing 4-chlorophenol. **Process Biochemistry**, 2002. v. 37, n. 11, p. 1317–1323.
- BANCI, L. Structural properties of peroxidases. 1997. v. 53, n. April 1996, p. 253–263.
- BAUTISTA, P. et al. An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2008. v. 83, p. 1323–1338.
- BAYER, C. et al. The ecological impact of membrane-based extraction of phenolic compounds – a life cycle assessment study. **Water Science and Technology**, 2010. v. 62, n. 4, p. 915–919.
- BEVILAQUA, J. V. et al. Phenol removal through combined biological and enzymatic and treatments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2002. v. 19, n. 2, p. 151–158.
- BHUNIA, A.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. **Biotechnology and Bioengineering**, 2001. v. 72, n. 5, p. 562–567.

BÓDALO, A. et al. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. **Chemosphere**, 2006. v. 63, p. 626–632.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976. v. 254, p. 248–254.

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 430/2011**. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 mai. 2011.

BRATKOVSKAJA, I.; VIDZIUNAITE, R.; KULYS, J. Oxidation of Phenolic Compounds by Peroxidase in the Presence of Soluble Polymers. **Biochemistry**, 2004. v. 69, n. 9.

BUDZIANOWSKI, W. M.; POSTAWA, K. Total chain integration of sustainable biorefinery systems. **Applied Energy**, 2016. v. 184, p. 1432–1446.

BUSCA, G. et al. Technologies for the removal of phenol from fluid streams : A short review of recent developments. **Journal of Hazardous Materials**, 2008. v. 160, p. 265–288.

CHEN, Z. et al. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase in water containing an organic cosolvent. **Environmental science and pollution research international**, 2014. v. 1, p. 10696–10705.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept : Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, 2010. v. 51, n. 7, p. 1412–1421.

COOPER, V. A.; NICELL, J. A. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. **Water Research**, 1996. v. 30, n. 4, p. 954–964.

CORDI, L. et al. Montagem, partida e operação de um sistema de lodos ativados para o tratamento de efluentes: parâmetros físico-químicos e biológicos. **Engenharia Ambiental**, 2008. v. 5, p. 97–115.

DEMARCHE, P. et al. Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. **Biotechnology Advances**, 2012. v. 30, n. 5, p. 933–953.

DEYHIMI, F.; NAMI, F. Electrochemical assay of hydrogen peroxide: a Ping – Pong mechanism. **International Journal of Chemical Kinetics**, 2011. v. 44, n. 10, p. 699–704.

DIEZ, M. C. et al. Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus radiata* kraft mill wastewater. **Bioresource Technology**, 2002. v. 83, n. 2, p. 131–138.

DUNFORD, H. B.; STILLMAN, J. S. On the function and mechanism of action of peroxidases. **Coordination Chemistry Reviews**, 1976. v. 19, p. 187–251.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. **Applied Catalysis B: Environmental**, 2000. v. 28, n. 2, p. 83–99.

ELY, C.; KEMPKA, A. P.; SKORONSKI, E. Peroxidases application in the wastewater treatment. **Revista Virtual de Química**, 2016. v. 8, n. 5, p. 1537-1549.

ENTEZARI, M. H.; MOSTAFAI, M.; SARAFRAZ-YAZDI, A. A combination of ultrasound and a bio-catalyst : removal of 2-chlorophenol from aqueous solution q. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2006. v. 13, p. 37–41.

ERHAN, E. et al. Removal of phenol from water by membrane-immobilized enzymes: Part I . Dead-end filtration. **Journal of Membrane Science**, 2002. v. 206, p. 361–373.

ESPLUGAS, S. et al. Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation. **Water Research**, 2002. v. 36, p. 1034–1042.

ESTRADA-ARRIAGA, E. B.; ZEPEDA-AVILES, J. A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, L. Post-treatment of real oil refinery effluent with high concentrations of phenols using photo-ferrioxalate and Fenton's reactions with membrane process step. **Chemical Engineering Journal**, 2016. v. 285, p. 508–516.

FANG, J.; BARCELONA, M. J. Coupled oxidation of aromatic hydrocarbons by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Chemosphere**, 2003. v. 50, p. 105–109.

FERRER-POLONIO, E. et al. Effect of alternating anaerobic and aerobic phases on the performance of a SBR treating effluents with high salinity and phenols concentration. **Biochemical Engineering Journal**, 2016. v. 113, p. 57–65.

GALENDE, P. P. et al. International Journal of Biological Macromolecules Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a Ping-Pong Bi – Bi mechanism with competitive inhibition by substrates. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015. v. 81, p. 1005–1011.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 1998. v. 45, p. 41–45.

GHASEMPUR, S. et al. Optimization of Peroxidase-Catalyzed Oxidative Coupling Process for Phenol Removal from Wastewater Using Response Surface Methodology. **Environmental Science and Technology**, 2007. v. 41, n. 20, p. 7073–7079.

GOMES, L. M. **Estudo da Otimização do Processo Fenton**. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2009.

GONZÁLEZ, P. S.; AGOSTINI, E.; MILRAD, S. R. Comparison of the removal of 2,4-dichlorophenol and phenol from polluted water, by peroxidases from tomato hairy roots, and protective effect of polyethylene glycol. **Chemosphere**, 2008. v. 70, n. 6, p. 982–989.

GÜMÜS, D.; AKBAL, F. Comparison of Fenton and electro-Fenton processes for oxidation of phenol. **Process Safety and Environmental Protection**, 2016. v. 103, p. 252–258.

HUANG, C.; HUANG, Y. Comparison of catalytic decomposition of hydrogen peroxide and catalytic degradation of phenol by immobilized iron oxides. **Applied Catalysis A: General**, 2008. v. 346, p. 140–148.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. Treatment of oil refinery wastewater using crude *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. **Journal of Environmental Engineering and Science**, 2003. v. 6, n. 2, p. 463.

JARDIM, W. F.; CANELA, M. C. **Fundamentos da oxidação química no tratamento de efluentes e remediação de solos**. Caderno Temático. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

JOHANSSON, A. By-product recovery and valorisation in the Kraft industry: a review of current trends in the recovery and use of turpentine and Tall Oil derivatives. **Biomass**, 1982. v. 2, p. 103–113.

KALLEL, M. et al. Removal of organic load and phenolic compounds from olive mill wastewater by Fenton oxidation with zero-valent iron. **Chemical Engineering Journal**, 2009. v. 150, n. 2–3, p. 391–395.

KANG, N.; LEE, D. S.; YOON, J. Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols. **Chemosphere**, 2002. v. 47, p. 915–924.

KARAM, J.; NICELL, J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 1997. v. 69, n. 2, p. 141–153.

KARGI, F.; EKER, S. Effect of sludge age on performance of an activated sludge unit treating 2,4 dichlorophenol-containing synthetic wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006. v. 38, n. 1–2, p. 60–64.

KARIMI, S. et al. Color remediation of chemimechanical pulping effluent using combination of enzymatic treatment and Fenton reaction. **Desalination**, 2009. v. 249, n. 2, p. 870–877.

KAVITHA, V.; PALANIVELU, K. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol. **Chemosphere**, 2004. v. 55, p. 1235–1243.

KHARATMOL, P. P.; PANDIT, A. B. Extraction, partial purification and characterization of acidic peroxidase from cabbage leaves (*Brassica oleracea* var. capitata). **Journal of Biochemical Technology**, 2013. v. 4, n. 2012, p. 531–540.

- KLIBANOV, A. M.; MORRIS, E. D. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. **Enzyme and Microbial Technology**, 1981. v. 3, n. 2, p. 119–122.
- KLIBANOV, A. M.; TU, T.-M.; SCOTT, K. P. Peroxidase-Catalyzed Removal of Phenols from Coal-Conversion Waste Waters. **Science**, 1983. v. 221, p. 259–261.
- KOTSOU, M. et al. Integrated aerobic biological treatment and chemical oxidation with Fenton's reagent for the processing of green table olive wastewater. **Process Biochemistry**, 2004. v. 39, p. 1653–1660.
- KUMAR, V. et al. Biological approach for the treatment of pulp and paper industry effluent in sequence batch reactor. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, 2014. v. 5, n. 3, p. 1–10.
- KUNZ, A.; REGINATTO, V.; DURÁN, N. Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium* - ozone. **Chemosphere**, 2001. v. 44, p. 281–287.
- KURNIK, K. et al. Removal of Phenol from Synthetic and Industrial Wastewater by Potato Pulp Peroxidases. **Water, Air, and Soil Pollution**, 2015. v. 226, n. 8.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970. v. 227, p. 1970.
- LAVERY, C. B. et al. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010. v. 58, n. 15, p. 8471–8476.
- LIU, H. et al. Influence of Fenton's reagent doses on the degradation and mineralization of H-acid. **Journal of Hazardous Materials**, 2013. v. 263, p. 593–599.
- LIU, J. et al. Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2002. v. 18, p. 225–232.
- LOPEZ, A. et al. Temperature activated degradation (mineralization) of 4-chloro-3-methyl phenol by Fenton's reagent. **Chemosphere**, 2005. v. 59, p. 397–403.
- MACIEL, H. P. F. et al. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. **Química Nova**, 2007. v. 30, n. 5, p. 1067–1071.
- MACIEL, R.; SANTA'ANNA JR., G. L.; DEZOTTI, M. Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photo-Fenton reactions. **Chemosphere**, 2004. v. 57, p. 711–719.

MARANGONI, A. G. **Enzyme Kinetics: A Modern Approach**. New Jersey: A John Wiley and Sons, INC., 2003.

MARCELINO, R. B. P. **Aplicação de processos oxidativos avançados para o tratamento de efluente da produção de antibióticos**. Dissertação (Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

MARROT, B. et al. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 2006. v. 30, n. 2, p. 174–183.

MELO, C. F. De. **Conversão do biocida triclosan catalisada por enzimas oxidativas e avaliação da remoção da atividade antibacteriana**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

MELO, J. S. et al. Effect of oxygen transfer limitations in phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, 2005. v. 40, p. 625–628.

METCALF e EDDY. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5. ed. McGraw Hill: Bookman, 2016.

MICHAŁOWICZ, J.; DUDA, W. Phenols - Sources and toxicity. **Polish Journal of Environmental Studies**, 2007. v. 16, n. 3, p. 347–362.

MING, Z. W. et al. Synergistic adsorption of phenol from aqueous solution onto polymeric adsorbents. **Journal of Hazardous Materials**, 2006. v. 128, n. 2–3, p. 123–129.

MOHAMMADI, S. et al. Treatment Phenol removal from industrial wastewaters: a short review. **Desalination and Water Treatment**, 2014. p. 37–41.

MOHAN, S. V. et al. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. **Chemosphere**, 2005. v. 58, p. 1097–1105.

MONTIBELLER, M. M. **Remoção de fenol de águas residuárias utilizando método de polimerização e precipitação com enzimas Horseradish peroxidase (HRP)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Estado de Santa Catarina, 2012.

MOVAHEDYAN, H.; ASSADI, A.; AMIN, M. M. Effects of 4-chlorophenol loadings on acclimation of biomass with optimized fixed time sequencing batch reactor. **Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering**, 2008. v. 5, n. 4, p. 225–234.

MURCIA, M. D. et al. Assessing combination treatment, enzymatic oxidation and ultrafiltration in a membrane bioreactor, for 4-chlorophenol removal: Experimental and modeling. **Journal of Membrane Science**, 2009. v. 342, p. 198–207.

NA, S. Y.; LEE, Y. Elimination of trace organic contaminants during enhanced wastewater

treatment with horseradish peroxidase/hydrogen peroxide (HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) catalytic process. **Catalysis Today**, 2017. v. 282, p. 86–94.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, 2003. v. 98, p. 33–50.

NICELL, J. A.; SAADI, K. W.; BUCHANAN, I. D. Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive. **Bioresource Technology**, 1995. v. 54, n. 1, p. 5–16.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. Science of the Total Environment Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination — A review. **Science of the Total Environment**, 2011. v. 409, n. 20, p. 4141–4166.

PAISIO, C. E. et al. Toxicity of phenol solutions treated with rapeseed and tomato hairy roots. **Desalination**, nov. 2010. v. 263, n. 1–3, p. 23–28.

PAPADOPOULOS, A. E.; FATTA, D.; LOIZIDOU, M. Development and optimization of dark Fenton oxidation for the treatment of textile wastewaters with high organic load. **Journal of Hazardous Materials**, 2007. v. 146, p. 558–563.

PASDAR, H.; MARANDI, R. Effect of phenol loading on wastewater treatment by activated sludge process. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, 2013. v. 3, n. 11, p. 121–126.

PEYTON, T. O. Biological disposal of hazardous waste. **Enzyme and Microbial Technology**, 1984. v. 6, p. 146–154.

PICKBRENNER, K. **Uso De Reator Sequencial Em Batelada (Rsb) Para Pós-Tratamento De Efluente De Reator Anaeróbio**. Dissertação (Mestrado em Engenharia em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

PONTES, R. F. F.; PINTO, J. M. Chemical Engineering Research and Design Optimal synthesis of Fenton reactor networks for phenol degradation. **Chemical Engineering Research and Design**, 2010. v. 9, p. 706–721.

POOLE, A. J. Treatment of biorefractory organic compounds in wool scour effluent by hydroxyl radical oxidation. **Water Research**, 2004. v. 38, p. 3458–3464.

PRADEEP, N. V. et al. Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. **Applied Water Science**, 2015. v. 5, n. 2, p. 105–112.

RAO, M. A. et al. Enzymes as useful tools for environmental purposes. **Chemosphere**, 2014. v. 107, p. 145–162.

REGALADO, C.; ASENJO, J. A.; PYLE, D. L. Studies on the purification of peroxidase from horseradish roots using reverse micelles. **Enzyme and Microbial Technology**, 1996. v. 18, p. 332–339.

REGALADO, C.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, 2004. v. 3, n. 1–2, p. 243–256.

RUSDI, B.; MULYANTI, D.; RODIYAH, M. Characterization of Peroxidase Enzyme from Water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.) Fraction. **Procedia Chemistry**, 2014. v. 13, p. 170–176.

SANTA CATARINA. **Lei nº 14.675/2009**. Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 13 de abril de 2009.

ŠEKULJICA, N. C. et al. Decolorization of anthraquinonic dyes from textile effluent using Horseradish peroxidase : optimization and kinetic study. **The Scientific World Journal**, 2015. v. 2015, p. 12.

SILVA, M. R. Da et al. The Use of HRP in Decolorization of Reactive Dyes and Toxicological Evaluation of Their Products. **Enzyme research**, 2011. v. 2010, p. 703824.

SKORONSKI, E. et al. Desempenho de um reator Fenton em escala industrial aplicado à remoção de fenóis em uma planta de recuperação de resíduos da indústria de papel e celulose. **Revista Ambiente e Água**, 2015. v. 10, p. 863–873.

STEEVENSZ, A. et al. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2009. v. 84, n. 5, p. 761–769.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIMES, I.; BORGNE, S. LE. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**, 2003. v. 46, n. 1, p. 1–15.

TRAPIDO, M. et al. Bio-recalcitrant pollutants removal from wastewater with combination of the Fenton treatment and biological oxidation. **Journal of Water Process Engineering**, 2017. v. 16, p. 277–282.

TSAI, C. S. Dynamic biochemistry: enzyme kinetics. **An Introduction to Computational Biochemistry**. Wiley-Liss, Inc., 2002, p. 123–146.

ULSON De SOUZA, S. M. A. G.; FORGIARINI, E.; ULSON De SOUZA, A. A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). **Journal of Hazardous Materials**, 2007. v. 147, n. 3, p. 1073–1078.

VASUDEVAN, P. T.; LI, L. O. Peroxidase catalyzed polymerization of phenol. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, 1996. v. 60, p. 73–82.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, 2004. v. 65, n. 3, p. 249–259.

WAGNER, M.; NICELL, J. A. Treatment of a foul condensate from kraft pulping with Horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. **Water Research**, 2001a. v. 35, n. 2, p. 485–495.

WAGNER, M.; NICELL, J. A. Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. **Water Science and Technology**, 2001b. v. 43, n. 2, p. 253–260.

WHITELEY, C. G.; LEE, D. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006. v. 38, p. 291–316.

YU, H. Q.; GU, G. W.; SONG, L. P. The effect of fill mode on the performance of sequencing batch reactors treating various wastewaters. **Bioresource Technology**, 1996. v. 58, p. 49–55.