



UDESC

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE
VERMELHO CONGO POR HORSERADISH
PEROXIDASE E LACASE DE *ASPERGILLUS*
SP. E AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE**

PAULA ANDRESSA WUNDERLICH DE ANDRADE

Lages, SC

2020

PAULA ANDRESSA WUNDERLICH DE ANDRADE

**DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE VERMELHO CONGO POR HORSERADISH
PEROXIDASE E LACASE DE *ASPERGILLUS SP.* E AVALIAÇÃO DA
FITOTOXICIDADE**

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

Orientador: Anielia Pinto Kempka, Dra.

Co-Orientador: Indianara Fernanda Barcaroli, Dra.

Lages, SC

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Andrade, Paula Andressa Wunderlich de
DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE VERMELHO CONGO
POR HORSERADISH PEROXIDASE E LACASE DE
ASPERGILLUS SP. E AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE /
Paula Andressa Wunderlich de Andrade. -- 2020.
51 p.

Orientadora: Anieli Pinto kempka
Coorientadora: Indianara Fernanda Barcaroli
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Lages, 2020.

1. Corantes azo. 2. Oxirredutases. 3. Toxicidade. I. Pinto
kempka, Anieli. II. Barcaroli, Indianara Fernanda . III. Universidade
do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. IV. Título.

PAULA ANDRESSA WUNDERLICH DE ANDRADE

**DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE VERMELHO CONGO POR HORSERADISH
PEROXIDASE E LACASE DE *ASPERGILLUS SP.* E AVALIAÇÃO DA
FITOTOXICIDADE**

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

Banca examinadora:

Orientador:

(Prof. Dr. Aniela Pinto Kempka)
UDESC/Pinhalzinho

Co-orientador:

(Prof. Dr. Indianara F. Barcaroli)
UDESC/Lages

Membros:

(Prof. Dr. Everton Skoronski)
UDESC/Lages

Membros:

(Dra. Rosana Henriques)
UFSC/Florianópolis

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por abençoar a minha caminhada e por me oferecer saúde e alegrias.

Agradeço aos meus pais Paulo Roberto Vieira de Andrade, minha mãe Edeltraut Wunderlich de Andrade e meu irmão Marcos Vinicius Wunderlich de Andrade por me apoiar em todos os momentos e serem os meus maiores exemplos de honestidade e de humildade.

Agradeço a minha cunhada Suyan Cordova por ser essa pessoa incrível que me dá forças e me faz rir quando eu mais preciso.

Agradeço ao Tiago K. Andrade, por ser o meu companheiro de vida e por toda paciência durante esse período.

Agradeço à professora Aniela Pinto Kempka, por me orientar nesta etapa tão importante da minha vida, pelos ensinamentos e paciência.

Agradeço ao professor Everton Skoronski, pela oportunidade de trabalhar no laboratório e por todos os ensinamentos compartilhados e ajuda oferecida.

Agradeço especialmente à Mylena Fernandes, por todo o conhecimento compartilhado e paciência neste período.

Agradeço equipe do LABTRAT, Suziana, Julia Göde, Mariana Gomes, Karoliny Libardo, Diego Machado, que são presentes que Deus me deu neste mestrado e fizeram meus dias dentro do laboratório mais felizes, em especial, gostaria de agradecer a minha amiga Thaís Agda, pela apoio, ajuda, vivência e amizade.

Agradeço ao meu amigo Thiago Ramos Freitas pela amizade desde à graduação e companheirismo no mestrado.

Agradeço às minhas amigas Maria Eduarda, Mayara Rafaeli, Erica Comicholi e Ana Ogliari por serem as minhas amigas de vida e por todo o carinho e amizade.

Agradeço à todos os amigos, por estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins, vocês foram essenciais nesta jornada.

RESUMO

O setor industrial concentra as atividades que mais contribuem para a contaminação ambiental, principalmente por utilizar grandes volumes de água, e muitas vezes, sendo responsável pela geração de efluentes com elevados níveis de coloração e demanda química de oxigênio. Estas águas residuárias possuem uma enorme variedade de compostos químicos orgânicos e inorgânicos, que podem causar uma série de problemas se depositados indevidamente no meio ambiente. Dentre as formas de tratamento, os processos oxidativos vêm sendo vistos como uma tecnologia promissora para o tratamento de efluentes coloridos, podendo destacar os processos com as enzimas oxi-redutoras como peroxidases e lacases, responsáveis pela redução e oxidação de vários substratos, dentre eles os corantes, apresentando altos percentuais de descoloração. Neste sentido, este estudo teve como objetivo descolorir o efluente sintético do corante Vermelho Congo com as enzimas HRP e lacase de *Aspergillus sp.* e avaliar a toxicidade após o tratamento para verificar se houve bioativação de subprodutos. Para atingir esses objetivos, inicialmente foi feito um embasamento teórico sobre corantes, enzimas oxidativas no tratamento de efluentes coloridos e toxicidade. Posteriormente foi realizado a parte experimental com o corante na concentração de $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, nesta etapa foram otimizadas as condições de pH (1 a 8) e temperatura (20 a 70 °C) para a HRP e pH (2,4 a 6,6) e temperatura (30 a 60 °C) para a Lacase, com tempo de reação de 30min e 60min. Posteriormente foi realizado teste de toxicidade com *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Allium cepa* e *Cucumis sativus L.* comparando o efluente bruto com os tratados. Ambos os tratamentos foram efetivos no processo de descoloração, alcançando 98% de remoção de cor com a lacase e 83,53% para a HRP. Para os testes de toxicidade, somente o fitoindicador *Cucumis sativus L.* apresentou toxicidade quando comparado o aspecto da folha dos tratamentos como controle, para os fitoindicadores *Phaseolus vulgaris*, *Lactuca sativa* e *Allium cepa* indicam que não houve aumento da toxicidade após o tratamento enzimático.

Palavras chave: Corantes Azo. Oxirredutases. Otimização. Toxicidade

ABSTRACT

The industrial sector concentrates the activities that most contribute to environmental contamination, mainly by using large water volumes, being responsible for the generation of effluents with high levels of colour and chemical oxygen demand. These wastewaters have a huge variety of organic and inorganic chemical compounds, which can cause several problems if improperly deposited in the environment. Among the forms of treatment, oxidative processes have been seen as a promising technology for the treatment of effluents in the sector, highlighting the processes with oxy-reducing enzymes such as peroxidases and laccases, responsible for the reduction and oxidation of various substrates, including dyes, with high percentages of discoloration. In this sense, this study aimed to decolorize the synthetic effluent of the Congo Red dye with the enzymes HRP and laccase of *Aspergillus* sp. and assess toxicity after treatment to check for bioactivation of by-products. To achieve these aims, initially a theoretical basis was made on dyes, oxidative enzymes in the treatment of coloured effluents and toxicity. Subsequently, the experimental part was carried out with the dye at a concentration of 50mg.L⁻¹, in this step the conditions of pH (1 to 8) and temperature (20 to 70 °C) were optimized for HRP and pH (2.4 to 6,6) and temperature (30 to 60 °C) for Lacase, with reaction time of 30min and 60min. Subsequently, a toxicity test was performed with *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Allium cepa* and *Cucumis sativus* L. comparing the raw effluent with the treated ones. Both treatments were effective in the discoloration process, reaching 98% of color removal with the laccase and 83.53% for HRP. For the toxicity tests, only the phytoindicator *Cucumis sativus* L. showed toxicity when comparing the leaf aspect of the treatments with control, for the phytoindicators *Phaseolus vulgaris*, *Lactuca sativa* and *Allium cepa* indicate that there was no increase in toxicity after the enzymatic treatment.

Keywords: Azo dyes. Oxidoreductases. Optimization. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1- Estrutura química do corante vermelho Congo.	17
Figure 2- Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e a possível forma de inativação da Horseradish peroxidase (HRP). As constantes k1, k2 e k3 representam a taxa de formação do composto I, taxa de redução do composto I e taxa de redução do composto II, respectivamente.....	21
Figure 3- Ciclo catalítico da lacase, exibindo o mecanismo de redução e oxidação dos locais do cobre	22

CAPÍTULO 2 – DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE VERMELHO CONGO POR HORSERADISH PEROXIDASE E LACASE DE *Aspergillus sp.* E AVALIAÇÃO DA FITOXICIDADE

Figura 1-Diagrama de Pareto obtido a partir da análise estatística dos resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela HRP para 30 minutos de reação.	39
Figura 2- Curvas de contornos referentes a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela HRP para 30 minutos de reação	40
Figura 3-Diagrama de Pareto obtido a partir da análise estatística dos resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase para 60 minutos de reação	42
Figura 4- Curva de contorno referente a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase para 60 minutos de reação.	43
Figura 5- Comprimento protusão radicular das sementes de alface (a) e feijão (b) quando aplicadas água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC.	45
Figura 6- Comprimento radicular dos bulbos de cebola quando aplicadas água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC.	45
Figura 7- Teste de fitotoxicidade em bulbos de <i>Allium cepa</i> L. submetidos ao crescimento das raízes na presença de água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC	46
Figura 8- Aspecto visual das folhas de pepino submetidos a aplicação de água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC.	47

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1- Classificação dos corantes de acordo com o método de fixação. 16

CAPÍTULO 2 – DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE VERMELHO CONGO POR HORSE RADISH PEROXIDASE E LACASE DE *Aspergillus sp.* E AVALIAÇÃO DA FITOXICIDADE

Tabela 1- Níveis e variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional utilizado para obtenção da condição ótima para a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela peroxidase..... 35

Tabela 2- Níveis e variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional utilizado para obtenção da condição ótima para a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase.35

Tabela 3- Resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela HRP para 30 minutos e 60 minutos de reação.38

Tabela 4- Resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase para 30 minutos e 60 minutos de reação.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EWRC	EUROPEAN WEED RESEARCH COUNCIL
HRP	Horseradish Peroxidase
pH	Potencial hidrogeniônico
POAs	Processo Oxidativo Avançado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	OBJETIVOS DA PESQUISA.....	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivo Específico.....	14
3	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	14
 CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA		15
1.1.	CORANTES INDUSTRIAIS.....	15
1.2.	TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTENDO CORANTES.....	17
1.3.	ENZIMAS OXIDATIVAS E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CORANTES.....	19
1.4.	PEROXIDASE.....	20
1.5.	LACASE.....	22
1.6.	POTENCIAL TÓXICO DE EFLUENTES DESCOLORIDOS ENZIMATICAMENTE.....	23
	REFERÊNCIAS.....	25
 CAPÍTULO 2 – DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE VERMELHO CONGO POR HORSERADISH PEROXIDASE E LACASE DE <i>Aspergillus</i> sp. E AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE		30
	RESUMO	30
	ABSTRACT	31
1	INTRODUÇÃO.....	32
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1	ENZIMAS E REAGENTES.....	33
2.2	METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	34
2.3	EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO.....	35
2.4	FITOTOXICIDADE.....	36
2.4.1	<i>Fitotoxicidade em sementes de Lactuca sativa L. e Phaseolus vulgaris</i>	36
2.4.2	<i>Fitotoxicidade em Allium cepa L.</i>	36

2.4.3 Fitotoxicidade em <i>Cucumis sativus</i> L.	36
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DE SOLUÇÃO VERMELHO CONGO PELA HRP.....	37
3.2 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DE SOLUÇÃO VERMELHO CONGO PELA LACASE.....	41
3.3 FITOTOXICIDADE DO VERMELHO CONGO ANTES E APÓS OS TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS.....	44
3.3.1 Fitotoxicidade em semente de alface e feijão	44
3.3.2 Fitotoxicidade em cebola	45
3.3.3 Fitotoxicidade em pepino	46
4 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

O setor industrial concentra as atividades que podem contribuir para a contaminação ambiental, principalmente por utilizar grandes volumes de água e insumos químicos. Consequentemente, esta associação leva à produção de rejeitos líquidos, que podem conter inúmeras substâncias tóxicas recalcitrantes. O tratamento inadequado ou mesmo a falta de tratamento, culmina no despejo destes em corpos de água (SALLES; PELEGRINI; PELEGRINI, 2006).

O nível de compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Neste contexto, a indústria têxtil, farmacêutica e de papel merecem destaque por ser responsável pela geração de efluentes com elevadas demanda química de oxigênio e cor (CARDOSO et al., 2016; GUARATINI; ZANONI, 2000; VASCONCELOS; XIMENES, 2015).

Alguns dos corantes sintéticos utilizados são considerados recalcitrantes e tóxicos, apresentando resistência a microrganismos e, por isso, são dificilmente degradados no tratamento biológico convencional de efluentes. No esforço para encontrar alternativas eficientes, processos de biorremediação catalisados por enzimas têm sido cada vez mais explorados ao longo dos anos (LIU; WANG; JI, 2006; STRONG; CLAUS, 2011).

Segundo Mendes et al. (2011), as enzimas atuam em condições específicas de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação bastante superiores àquelas obtidas em presença de catalisadores químicos convencionais. Além disso, devido à sua elevada especificidade, um maior rendimento do processo pode ser atingido, permitindo a obtenção de produtos biodegradáveis e/ou redução da quantidade de resíduos gerados.

Devido ao seu potencial redox e sua capacidade de atuação em meios aquosos e orgânicos, muitas peroxidases como a lignina peroxidase, manganês peroxidase, Horseradish peroxidase (HRP), lacase, entre outras, são aplicadas para descolorir e degradar corantes presentes em efluentes têxteis (BILAL et al., 2016; CHAGAS et al., 2015; LIU; WANG; JI, 2006; MOTA et al., 2015; SILVA et al., 2012). Durante o processo de bioconversão dos corantes pelas enzimas oxidativas, haverá a formação de subprodutos e é possível que estes últimos sejam tóxicos, podendo a toxicidade determinada através do uso de bioindicadores (NIMKAR, 2018; VARGA et al., 2019), como microrganismos, plantas e animais. Comumente é realizado o estudo da toxicidade de corantes com organismos aquáticos, porém o uso de plantas como bioindicadores de toxicidade é uma ferramenta interessante pois os bioensaios com sementes apresentam baixo custo e são relativamente de fácil realização, sendo verificados, principalmente, o crescimento radicular, danos nas folhas e planta e etapas de divisão celular (CHAPMAN; DAVE; MURIMBOH, 2010; SOBRERO; RONCO, 2004).

Assim, a presente pesquisa busca contribuir com dados para o melhoramento da tratabilidade do corante vermelho Congo, um corante azo reconhecidamente tóxico, o qual ainda é utilizado na indústria têxtil no tingimento da seda, na indústria médica para diagnóstico em pacientes com suspeita de amiloidose e como indicador de pH, utilizando duas enzimas oxidativas, a peroxidase e a lacase. Posteriormente obter informações referentes a toxicidade, utilizando quatro fitoindicadores, das soluções contendo o corante e que foram tratadas, comparadas a solução não tratada.

2 OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 Objetivo Geral

Descolorir uma solução de corante azo vermelho Congo utilizando a peroxidase HRP e a lacase de *Aspergillus* sp., em separado, e determinar a fitotoxicidade da solução tratada.

2.2 Objetivos específicos

- i. Fazer a revisão de literatura acerca do estado da arte sobre corantes industriais e tratamento enzimático;
- ii. Otimizar as condições de descoloração da solução de vermelho Congo na concentração de 50 mg L⁻¹ utilizando a HRP e a lacase, em separado;
- iii. Determinar o tempo reacional necessário para a descoloração da solução de vermelho Congo na concentração de 50 mg L⁻¹;
- iv. Determinar a fitotoxicidade das soluções descoloridas pela HRP e lacase utilizando como bioindicadores as espécies *Lactuca sativa* L., o *Phaseolus vulgaris*, o *Allium Cepa* L. e o *Cucumis sativus* L.

3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em dois capítulos. No Capítulo 1 está a revisão de literatura acerca dos temas que norteiam o desenvolvimento e entendimento da pesquisa, através do levantamento de informações sobre corantes sintéticos, uso de enzimas oxidativas como alternativa de tratamento de efluentes coloridos e toxicidade antes e após o tratamento. No Capítulo 2 está o estudo experimental, estruturado na forma de artigo científico, sendo apresentados uma introdução, metodologia, resultados e discussão e conclusões, de acordo com os objetivos ii, iii e iv, acima descritos. Por fim são apresentadas as considerações finais gerais do estudo.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CORANTES INDUSTRIAIS

Os corantes utilizados na indústria são substâncias orgânicas complexas, com alta absorvidade e atualmente, mais de 90% são sintéticos. São compostos extensivamente usados em diversas áreas, dentre as quais podemos destacar a indústria têxtil, farmacêutica, de cosméticos, de plásticos, de couros, fotográfica, automobilística, de papel e alimentícia (CARDOSO et al., 2016; PIZATO et al., 2017; SANTOS et al., 2013).

O emprego predominante de corantes sintéticos em detrimento de corantes naturais tem sido justificado pelo menor custo de produção, pela infinita possibilidade de síntese com grupos cromóforos e auxocromos diferenciados que ampliam a diversidade de cores e tonalidades, pelo maior grau de pureza, pelo alto controle da fidelidade da cor e pela maior fixação, além de resistir à exposição, à transpiração, à luz, à água, a produtos químicos, como agentes oxidantes, e a ataques microbianos. Desta forma eles se mantêm de forma recalcitrante no meio ambiente (CARDOSO et al., 2016; SOUZA; ROSADO, 2009).

O problema da cor no efluente está associado ao uso de corantes sintéticos no processo fabril, especialmente aos corantes solúveis em água, cuja fração não adsorvidos, segue para as estações de tratamento de efluentes. Caso o tratamento de efluentes utilizado não for adequado pode-se ter uma interferência no ecossistema, diminuindo a transparência da água e a penetração da radiação solar, a atividade fotossintética e a solubilidade dos gases (CLAUSEN; TAKASHIMA, 2007; HASSEMER; SENS, 2002).

A classificação dos corantes pode ser feita pela método de fixação à fibra têxtil ou pela sua estrutura química. Quanto a sua estrutura química, os corantes podem ser azo, antraquinona, ftalocianina, nitrofenol, nitrosofenol, trifenilmetano, pirimidina, triazina e vinilsulfônico (SILVA et al., 2010). Quanto ao método de fixação, a classificação segue como descrito na Tabela 1 (GUARATINI; ZANONI, 2000).

No setor industrial, além dos problemas associados ao elevado volume de resíduos e à sua elevada carga orgânica, há liberação de corantes não fixados e não degradados nos processos de tratamentos convencionais para os corpos hídricos. Estes apresentam um elevado potencial de impacto ambiental, em função da sua toxicidade e interferência em processos fotossintéticos (CARDOSO et al., 2016; SILVA et al., 2010).

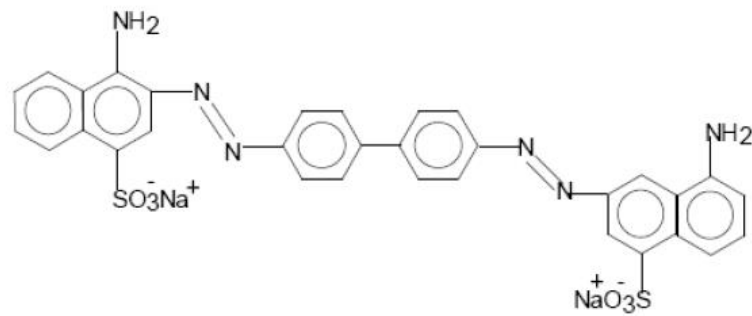
Tabela 1- Classificação dos corantes de acordo com o método de fixação.

Grupo	Característica
Ácidos	São corantes solúveis, possuem pelo menos um grupo sulfônico ($-\text{SO}_3^-$) em sua estrutura química.
Azoicos	São corantes insolúveis em água, eles possuem no mínimo um grupo azo em sua constituição ($-\text{N}=\text{N}-$) ligados a estruturas aromáticas
Branqueadores	Apresentam grupos carboxílicos azometino ($-\text{N}=\text{CH}-$) ou etilênicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) ligados à anéis aromáticos em suas estruturas químicas
Cuba	São insolúveis em água, apresentam mais de um anel aromático em sua estrutura química.
Diretos	São corantes solúveis em água que possuem mais de uma cadeia química azo.
Dispersivos	São insolúveis em água, e aplicados através de suspensão. Não apresentam grupos azos em suas cadeias químicas
Enxofre	São insolúveis em água e apresentam em sua estrutura química polissulfetos ($-\text{Sn}-$).
Pré-Metalizados	Apresentam íons metálicos ligados em suas estruturas químicas.
Reativos	Possuem grupos químicos eletrofílicos reativos, que formam ligações covalentes com os principais sítios de ligação da fibra do tecido.

Fonte: Adaptado de Guaratini e Zanoni (2000).

O vermelho Congo ($\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_2$, $696,66 \text{ g mol}^{-1}$), cuja estrutura química está mostrada na Figura 1, está classificado nos corantes azo, classe em que os produtos intermediários de degradação são geralmente carcinogênicos e mutagênicos (GOPINATH et al., 2011). O sal de sódio do ácido benzidinediazobis-1-naftilamina-4-sulfônico (vermelho Congo), é metabolizado em benzidina, um carcinogênio humano conhecido e a exposição a esse corante pode causar algumas respostas alérgicas (MOTA et al., 2015; SADIGHI; FARAMARZI, 2013; WANG et al., 2011).

Figura 1- Estrutura química do corante vermelho Congo.



Fonte: Reis (2009).

Segundo Melo et al. (2014), a molécula deste corante constitui-se de agrupamento diazo secundário (- N = N -) que favorece a deslocalização dos elétrons na molécula e anéis aromáticos com os substituintes amino e sulfonato sódico. O uso do corante vermelho Congo nas indústrias de celulose e têxteis, para o tingimento de fibra de algodão, está cada vez mais em desuso devido a sua característica tóxica, porém ainda é utilizado largamente no tingimento de fibras de seda (REIS, 2009). O corante também é utilizado como um indicador de pH, este aparece na cor azul em pH abaixo de 5 e vermelho em pH acima de 5 (SADIGHI; FARAMARZI, 2013).

Atualmente, além de sua aplicação como indicador de pH o vermelho congo é utilizado na determinação da atividade enzimática, onde sua descoloração em meios de cultura para microorganismos indica a atividade. O vermelho congo também é comumente destinado para a coloração de produtos de papel e na indústria médica sua aplicação é no auxílio diagnóstico em pacientes com suspeita de amiloidose, na detecção histológica de placas amilóides associadas com diversos tipos de doenças (VASCONCELOS; XIMENES, 2015).

Devido a sua estrutura molecular bastante complexa contendo anéis aromáticos e sua alta solubilidade em água, o que lhe proporciona estabilidade físico-química e térmica, o tratamento de águas residuais contaminadas por vermelho Congo apresenta uma alta complexidade (MELO et al., 2014; WANG et al., 2011). Entre as técnicas desenvolvidas para o tratamento de efluentes contendo corantes, como adsorção, floculação, ozonização, nanofiltração, oxidação química e biodegradação, pode-se destacar o tratamento enzimático apresentar alta eficiência (LING et al., 2015; SADIGHI; FARAMARZI, 2013; TAN et al., 2016; WANG et al., 2011).

1.2 TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTENDO CORANTES

Tradicionalmente, os processos de tratamento de efluentes coloridos estão fundamentados na operação de sistemas físico-químicos de precipitação-coagulação, seguidos de tratamento biológico via processo de lodos ativados. As técnicas fundamentadas por coagulação/flotação são altamente

eficientes na remoção de materiais particulados, porém são deficientes na remoção de compostos dissolvidos. Para aumentar essa eficiência, utiliza-se excesso de polieletrólito (sulfato de alumínio, por exemplo), os quais irão acarretar um resíduo com potencial tóxico, o lodo. Outra desvantagem desta tecnologia, é que somente transferem o corante de fase, ou seja, da fase aquosa para a sólida, não resolvendo essencialmente o problema (ARAUJO; YOKOYAMA; TEIXEIRA, 2006; GUARATINI; ZANONI, 2000; SOUZA; FORGIARINI; SOUZA, 2007). O tratamento com lodos ativados é bastante efetivo para redução da carga orgânica, com redução de aproximadamente 80% da carga orgânica, porém não é capaz de remover alguns poluentes tóxicos e/ou coloridos. Devido ao baixo conteúdo de nutrientes nestes efluentes, e à toxicidade causada pela presença de compostos fenólicos, ocorre decaimento na efetividade do processo, sendo assim, insuficiente para atingir os padrões de descarte. Outro ponto negativo deste método se dá pelo tempo demandado no processo biológico e necessidade de grandes áreas físicas (AITKEN, 1993; SILVA et al., 2010).

Uma alternativa utilizada para a remoção de cor de efluentes são os processos oxidativos avançados (POAs), os quais estão relacionados a presença de substâncias persistentes. O reagente Fenton é um POA comumente utilizado na descoloração de efluentes, sendo realizado em meio ácido, na presença de peróxido de hidrogênio e excesso de íons de ferro. Neste processo, íons férricos são formados durante a reação e são coagulados, os materiais em suspensão e as moléculas de corantes são precipitados (AGUIAR; FERRAZ, 2011; ARAUJO; YOKOYAMA; TEIXEIRA, 2006; MERIC et al., 2005; SALVADOR; MARCOLINO; PERALTA-ZAMORA, 2012). A principal desvantagem desta tecnologia é a formação de lodo com a presença de ferro, gerando um passivo ambiental e mais um custo ao processo, devido a necessidade de uma disposição final adequada (DUTTA et al., 2001).

O uso de eletrocoagulação como método de tratamento de efluentes coloridos também é uma alternativa, pois apresenta alta eficiência, facilidade de manuseio e versatilidade. Neste sistema a degradação da molécula é realizada eletroquimicamente através de potencial ou corrente controlada, ou através de reagentes secundários gerados eletroliticamente. Entretanto, este método apresenta como deficiência a resistência do material do ânodo à degradação (corrosão), seu alto custo devido alto consumo de energia empregada, a baixa eficiência da corrente, além da produção de reações paralelas, tais como cloro e radicais hidroxila (GUARATINI; ZANONI, 2000; HAMOUS et al., 2019).

Como alternativa para o tratamento de uma gama de poluentes, incluindo os corantes, pode-se citar o uso de enzimas como um tratamento ambientalmente e ecologicamente amigável, pois necessita de baixa energia e causa mínimos impactos ao ecossistema (ASHRAFI et al., 2013). Neste contexto, o uso de enzimas se mostra promissor pois além de serem catalizadores versáteis, têm aplicações em vários segmentos e seu uso industrial inclui a hidrólise enzimática, tratamento de

resíduos, remoção de cor, produção de álcool etílico, etanol combustível, laticínios e ácidos orgânicos, dentre outros (SOUZA; ROSADO, 2009).

1.3 ENZIMAS OXIDATIVAS E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE CORANTES

As enzimas são proteínas encontradas na natureza em todos os seres vivos e que possuem atividade catalítica. Sua função é viabilizar a atividade das células, hidrolisando moléculas ou juntando-as para formar novos compostos. A singularidade desses compostos decorre do elevado grau de especificidade ao substrato em condições moderadas, sob as quais as enzimas atuam (SOUZA; FORGIARINI; SOUZA, 2007). Atuam em condições específicas de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidades de reação bastante superiores às aquelas obtidas em presença de catalisadores químicos convencionais (MENDES et al., 2011).

As enzimas oxidativas degradam compostos orgânicos através de reações que catalisam a transferência de elétrons. Dentre as enzimas oxidativas que mais tem destaque no tratamento de águas residuárias tem-se a lignina peroxidase (LIP, EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP, E.C. 1.11.1.13) e a lacase (E.C. 1.10.3.2) (ASGHER et al., 2014; RAMALHO; SCALIZE; CARAMORI, 2015).

Segundo Rebah e Miled (2013), as enzimas oxirredutases apresentam uma forte capacidade oxidativa, baixa especificidade por substrato e se destacam por apresentarem um enorme potencial de aplicação em síntese orgânica e biocatálise ambiental, sendo as condições de reação oferecidas determinantes para sua forma de atuação. As enzimas oxidativas são capazes de remover inúmeras substâncias geradas através de atividades industriais, como fenóis, hidrocarbonetos, corantes azo, pesticidas, entre outros. Sendo assim, apresentam alto potencial de aplicação no tratamento de águas residuárias (REBAH; MILED, 2013; SUN et al., 2014).

Estudos com enzimas óxido-redutases, como peroxidases e lacases, vêm provando a eficiência de tratamentos enzimático para uma variedade de corantes sintéticos e efluentes coloridos. O processo de descoloração enzimática é um processo complicado portanto, é importante analisá-lo como um todo e entender as interações (LI et al., 2009).

Pacheco e Soares (2014) ao utilizarem lacase de *Aspergillus sp.*, obtiveram remoção de 60% da cor de efluente da indústria de papel e celulose. Bilal et al. (2016), obtiveram remoções de 72,39%, 87,23% e 79,57% dos corantes reativos vermelho, azul e laranja, respectivamente, utilizando a HRP imobilizada em alginato de cálcio. Farias et al. (2017) obtiveram remoções de até 93% para o azul reativo 221 e de até 75% para o azul reativo 198, utilizando a HRP em pH 5,5 e 30 °C. Silva et al. (2012) obtiveram 60% de remoção para o corante turquesa remazol G e 66% de remoção para o corante Remazol Azul brilhante R utilizando a peroxidase de nabo. Fritzke et al. (2020) obtiveram

82,65% de remoção do corante têxtil azul céu brilhante G quando utilizada uma peroxidase parcialmente purificada extraída das folhas de *Cedrela fissilis*, nas condições ótimas de reação.

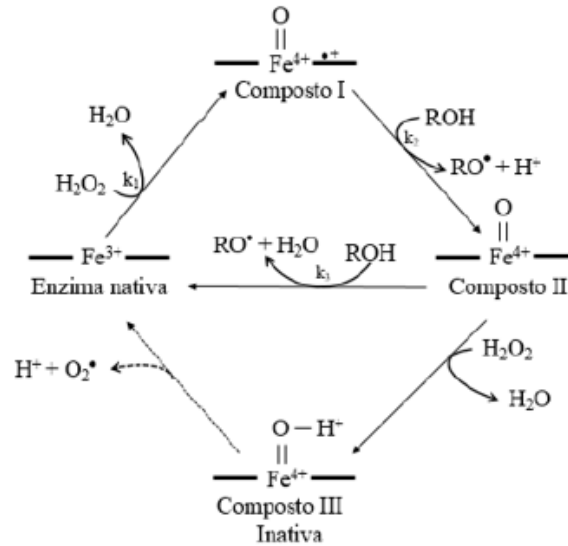
A abordagem biológica que utiliza enzimas oxidoreduzases para degradação de poluentes é uma área de pesquisa relativamente nova e promissora. Numerosos sistemas enzimáticos foram empregados para a degradação eficiente de diversos poluentes orgânicos e mostraram oxidar e degradar os poluentes em intermediários menores. O uso de tratamentos baseados em enzimas oferece muitas vantagens, como a capacidade de operar em altas e baixas concentrações de poluentes, quantidade reduzida de geração de lodo, aplicação para uma ampla gama de poluentes, baixo consumo de energia, dentre outros (MORSI et al., 2020)

1.4 PEROXIDASE

As peroxidases são hemoproteínas que estão envolvidas em diversas reações, ligações de polissacarídeos, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, oxidação de corantes, defesa de patógenos, regulação da elongação de células. Essas enzimas catalisam a oxidação do substrato na presença de peróxidos (CAMPOS et al., 2004; CHAGAS et al., 2015). Atualmente a peroxidase mais importante comercialmente é a enzima isolada da raiz forte (*A Armoracia rusticana*), na forma purificada (Horseradish peroxidase - HRP).

A HRP (EC 1.11.1.7) é uma glicoproteína heme de origem vegetal, na qual o ciclo catalítico ocorre por meio de um mecanismo complexo em três etapas, como demonstrado na Figura 1. Na primeira etapa, a enzima nativa na forma férrica é oxidada por H_2O_2 formando um composto oxidado intermediário (Composto-I) na forma oxi-ferril. Na segunda etapa, a forma oxidada da enzima (Composto-I) é então reduzida à sua forma nativa (Composto-II) pela transferência de um elétron do substrato (ex: lignina) formando um radical livre. Na terceira etapa, a transferência de elétron de uma molécula de substrato para enzima faz com que esta retorne a sua forma inicial. O (composto III) refere-se à forma inativa da enzima (FARIAS et al., 2017b; SCHMITT et al., 2012; SOUZA; FORGIARINI; SOUZA, 2007). Os radicais orgânicos livres, que são formados durante o processo, são responsáveis pela degradação dos poluentes. É importante adicionar a quantidade correta de H_2O_2 , pois a adição de quantidades excessivas pode inativar a enzima (MORSI et al., 2020).

Figura 2- Ciclo catalítico das enzimas peroxidases mostrando as mudanças no grupo prostético heme e a possível forma de inativação da Horseradish peroxidase (HRP). 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: ELY; KEMPKA; SKORONSKI (2016)

As peroxidases mais comumente usadas para tratamentos de águas residuais são a peroxidase de soja (SBP), peroxidase de rábano silvestre (HRP), lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e cloroperoxidase (CPO) (MORSI et al., 2020). O estudo de Souza et al. (2007), avaliou o potencial da enzima HRP, para a descoloração dos corantes Turqueza Remazol G 133%, Azul Lanaset 2R e Preto Remazol B e de um efluente têxtil, com descolorações de 59%, 94%, 10% e 52%, respectivamente. Silva et al. (2012b), realizaram a descoloração dos corantes têxteis Azul Drimaren X-3LR (DMBLR), Azul Drimaren X-BLN (DMBBLN), Rubinol Drimaren X-3LR (DMR) e Azul Drimaren CL-R (RBBR) utilizando a enzima HRP, 99%, 77%, 94% e 97% de descoloração, respectivamente.

Gholami-Borujeni et al. (2011), realizaram a remoção de corantes ácido laranja 7 e azul 25, utilizando HRP imobilizada em alginato de cálcio. Foi obtida uma remoção de 75% para o laranja 7 e 84% para o azul 25. A imobilização da HRP em alginato de cálcio também foi feita por Preethi et al. (2013), que avaliaram a remoção de corante o azul 113, com degradação de 76% em 240 min de reação.

Preethi et al., (2013) avaliaram a degradação do corante azo azul ácido CI 113na concentração de 30mg/L com a enzima HRP, obtendo 80% de descoloração nas condições ótimas de pH 6,6 e temperatura 60°C. No estudo de Achar et al. (2017) foi realizado um comparativo com as enzimas HRP e peroxidase extraída de *Caralluma umbellata* para a descoloração dos corantes Anilina Azul,

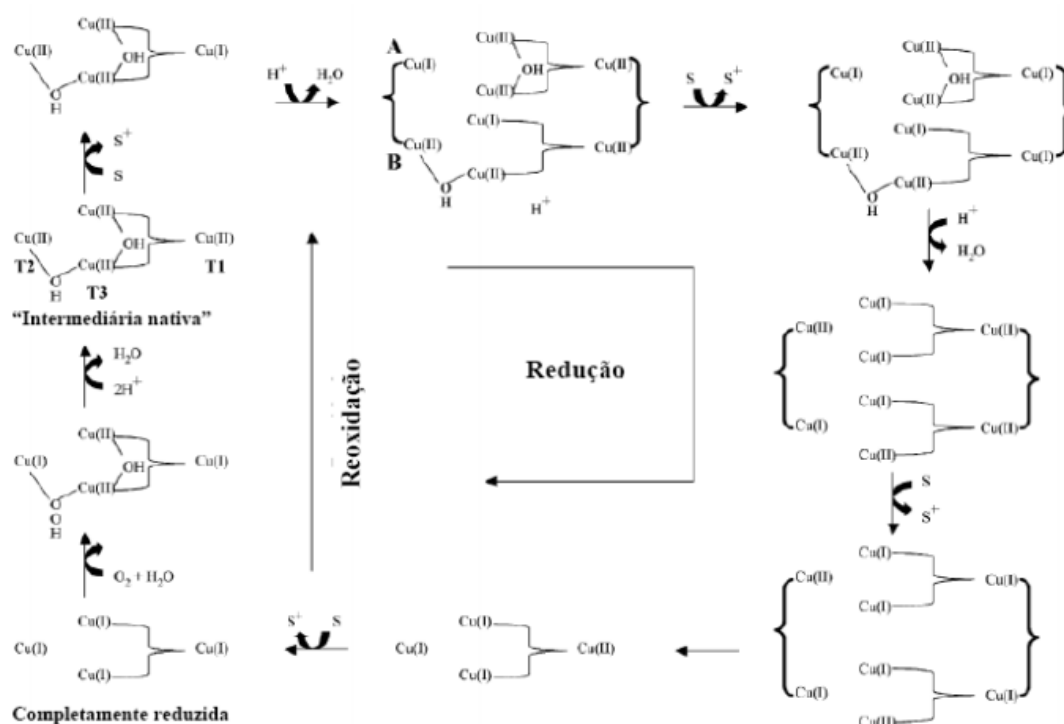
Preto Reativo 5, Azul Reativo 19 e o Vermelho Congo. Para ambas as enzimas, as condições ótimas de reação adotadas foram pH 6,2 e 45°C, alcançando 75% a 85% de remoção de cor para os corantes Anilina Azul, Preto Reativo 5, Azul Reativo 19. Para o corante vermelho Congo a peroxidase de *Caralluma umbellata* obteve uma remoção inferior a 10% e a HRP obteve 80% de descoloração.

1.5 LACASE

As lacases (EC 1.10.3.2), são enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca. É um membro enzimático de *multicopro* da família oxidase de cor azul, que catalisa a redução de quatro elétrons do oxigênio molecular na água. Oxida uma variedade de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos, tendo assim inúmeras aplicações no tratamento de efluentes gerados pelas indústrias têxteis (CHHABRA; MISHRA; SREEKRISHNAN, 2015; JADHAV; SINGHAL, 2013).

As lacases atuam pela abstração de 1 elétron de fenóis, em função da redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} que, por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (AGUIAR; FERRAZ, 2011; PACHECO; SOARES, 2014). O ciclo catalítico das lacases pode ser observado na Figura 2. A reação catalítica típica da lacase envolve todos os íons cobre que formam os núcleos catalíticos da enzima, e resulta na redução de uma molécula de oxigênio a duas moléculas de água, sem necessidade de produção de peróxido, e acompanhada da oxidação simultânea de 4 moléculas de substrato para produzir quatro radicais (STRONG; CLAUS, 2011).

Figure 3- Ciclo catalítico da lacase, exibindo o mecanismo de redução e oxidação dos locais do cobre



Fonte: TORRES; BUSTOS-JAIMES; BORGNE (2003).

Pacheco e Soares (2014), avaliaram o desempenho da lacase de *Aspergillus sp* na aplicação em efluentes oriundos da indústria de papel e celulose. Obtiveram uma remoção de 60% de cor para um tempo de 180 min de reação. Jadhav e Singhal (2013), utilizaram a lacase de *Trametes versicolor* livre e conjugada com polissacarídeos de goma arábica para avaliar a degradação do corante azul de remazol, alcançando 72% de descoloração com a enzima livre e 53% com ela imobilizada.

Iark et al. (2019), estudaram o potencial de descoloração de uma solução do corante vermelho Congo, na concentração de 50 mg L⁻¹, utilizando a lacase purificada de *Oudemansiella canarii*. Nas condições otimizadas (pH 5,5 e 30°C), obtiveram uma remoção de 43% em 12 h de incubação e 80% em 24 h de incubação. Legerská, Chmelová e Ondrejovič (2018) avaliaram o potencial da lacase fúngica de *Trametes versicolor* na descoloração dos corantes Laranja 2 e Laranja ácido 6, com remoções de 72,8% e 45,3%, respectivamente, em pH 3, 22°C e 120 h de incubação. Champagne e Ramsay (2010), avaliaram a eficiência da lacase comercial de *Trametes versicolor* para a descoloração diversos dos corantes da indústria têxtil, em pH 5 e 23°C, obtendo uma remoção de 73,7% para azul reativo 19, 74,6% para azul disperso 3, 34,6% para o azul ácido 74, 50,5% para o corante vermelho ácido 27 e 16,5% para o corante preto reativo.

Das et al. (2016), estudaram a descoloração do corante vermelho congo através da Lacase produzida por *Pleurotus ostreatus* MTCC 142, e obtiveram uma descoloração de 36,84% com 20h de incubação a pH 3 e temperatura 35°C. Mota et al. (2015) avaliaram o potencial da Lacase de *Ganoderma lucidum* para a descoloração do corante vermelho congo na concentração de 50 mg. L⁻¹ alcançando nas condições de pH 4 e 40°C uma descoloração de 80%.

Embora a remediação enzimática tenha muitas vantagens, é importante mencionar que existem alguns desafios, como o alto custo dos catalisadores, a incapacidade de reutilizar a enzima, a possibilidade de alterar a conformação da enzima sob condições ambientais adversas (por exemplo, enzimas podem perder sua estabilidade sob condições ambientais adversas) e a possibilidade de formar subprodutos solúveis perigosos (MORSI et al., 2020).

1.6 POTENCIAL TÓXICO DE EFLUENTES DESCOLORIDOS ENZIMATICAMENTE

A toxicologia envolve o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos de substâncias químicas ou outros materiais sintéticos sobre organismos expostos. Os testes de toxicidade consistem em se expor organismos representativos durante um período determinado a várias concentrações de uma ou mais substâncias para avaliação dos efeitos causados. Os efeitos vão desde a mortalidade até efeitos como mudanças no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução, no comportamento, dentre outros (DELLAMATRICE; ROSIM MONTEIRO, 2006). Os riscos toxicológicos de corantes sintéticos ao meio ambiente e à saúde humana estão relacionados ao modo, tempo de exposição e geração de subprodutos, pois a biotransformação destes corantes pode ser responsável pela formação

de aminas, benzidinas e outros intermediários com potencialidade carcinogênica (GUARATINI; ZANONI, 2000). Sendo assim, a determinação toxicológica dos produtos gerados na degradação do corante é de suma importância na avaliação da viabilidade do tratamento (DELLAMATRICE; ROSIM MONTEIRO, 2006; FRITZKE et al., 2020; NIMKAR, 2018; SILVA et al., 2010; TAN et al., 2016; VARGA et al., 2019).

Entre os bioindicadores utilizados nos testes de toxicidade, os organismos como *Chlorella vulgaris*, *Microcystis aeruginosa*, *Scenedesmus subspicatu*, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus* são comumente utilizados como fitoindicadores de toxicidade (COSTA et al., 2008; FRITZKE et al., 2020; LEGERSKÁ; CHMELOVÁ; ONDREJOVIČ, 2018; MOTA et al., 2015; SCHITTLER et al., 2018; SOBRERO; RONCO, 2004).

Os ensaios de toxicidade aguda utilizando organismos vegetais são ensaios realizados sob condições laboratoriais controladas afim de avaliar o potencial tóxico que uma substancia ou material tem sobre o organismo teste. Estes devem ser realizados nos primeiros dias de seu desenvolvimento, pois é neles que ocorrem uma série de processos fisiológicos essenciais para o organismo, e a presença de uma substância tóxica pode causar efeitos negativos, resultando em uma série de anomalias e até morte da planta (COSTA et al., 2008; SOBRERO; RONCO, 2004).

Segundo Chapman, Dave e Murimboh (2010), os bioensaios com sementes são amplamente utilizados por apresentarem baixo custo e serem relativamente de fácil realização. A utilização de plantas superiores como bioindicador apresenta como vantagem, quando comparada a plantas aquáticas e algas, que é o fato de não haver necessidade de filtrar as amostras e de fazer ajustes de dureza e pH (SOBRERO; RONCO, 2004). É importante salientar que a resposta biológica reflete como cada organismo teste responde a substância exposta, podendo ele apresentar maior ou menor sensibilidade a mesma.

Segundo Sobrero e Ronco (2004), os testes de germinação e crescimento radicular são realizados de maneira estática, normalmente por um período de 120 horas, onde é adicionado o poluente puro ou misturas no fitoindicador. Esses ensaios podem ser feitos com os compostos em uma ampla faixa de concentração, e mesmo em concentrações baixas, onde não há inibição de germinação, pode-se inibir ou atrasar o alongamento radicular e do caule (ROONEY; ZHAO; MCGRATH, 2007; SOBRERO; RONCO, 2004).

No estudo de Souza et al. (2007), os autores observaram que a toxicidade do efluente após o tratamento com HRP foi mais elevada que antes do tratamento dos corantes Azul Lanaset 2R, Turqueza Remazol e Preto Remazol B, usando como bioindicador a *Artemia salina*. Ainda no mesmo estudo foi avaliado se houve inibição do crescimento da raiz de *Allium cepa*, com inibição após o tratamento enzimático. Silva et al.(2010), avaliaram a toxicidade das soluções de corante antes e após o tratamento enzimático com HRP e *Artemia salina* como bioindicador. Foi possível observar uma

redução da toxicidade dos corantes Azul Drimaren X-3LR, Rubinol Drimaren X-3LR e Azul Drimaren CL-R após tratamento enzimático, e um aumento da toxicidade, não significativo, para o corante Azul Drimaren X-BLN. Baumer et al. (2018), estudaram a toxicidade de soluções dos corantes Azul reativo 21, Azul reativo 19, Preto reativo e o Vermelho reativo tratadas enzimaticamente com HRP. Através de testes de toxicidade aguda para os bioindicadores *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri* e obtiveram como resultado um aumento da toxicidade, comparada as soluções corantes não tratadas.

No estudo de Mota et al. (2015), foi utilizado como bioindicador sementes de *Lactuca sativa* para o teste de toxicidade do vermelho congo e os resultados demonstraram uma redução na toxicidade após o tratamento com a lacase. Ainda estudo de Mota, foi avaliado a estrutura do corante vermelho congo antes e após o tratamento através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia fotoacústica e espectrometria de massa, e foi possível observar uma possível clivagem assimétrica das ligações azo presentes em sua estrutura, e uma redução da cor por meio da modificação dos grupos cromóforos. Iark et al. (2019), em seu estudo também observaram uma clivagem assimétrica da ligação azo paralelo com a oxidação do terceiro grupo NH_2 e a oxigenação.

Tais estudos salientam a importância do estudo da toxicidade para cada corante tratado enzimaticamente, com o objetivo de avaliar viabilidade do tratamento caso efluente final seja nocivo quando comparado com o efluente bruto, bem como a necessidade de associação de processos visando a remoção dos compostos oriundos da(s) reação(ões) enzimática(s).

REFERÊNCIAS

- ACHAR, R. R. et al. Caralluma umbellata Peroxidase: Biochemical Characterization and Its Detoxification Potentials in Comparison with Horseradish Peroxidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 801–812, 2017.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.
- AITKEN, M. D. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. **The Chemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2, p. 49–58, 1993.
- ARAUJO, F. V. D. F.; YOKOYAMA, L.; TEIXEIRA, L. A. C. Remoção de cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H_2O_2 UV. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 11–14, 2006.
- ASGHER, M. et al. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, 2014.
- ASHRAFI, S. D. et al. The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiomyces variabile*. **International**

Biodeterioration and Biodegradation, v. 85, p. 173–181, 2013.

BAUMER, D. J. et al. Toxicity of enzymatically decolored textile dyes solution by horseradish peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, n. August, p. 82–88, 2018.

BILAL, M. et al. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 183, p. 836–842, 2016.

CAMPOS, Â. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637–643, 2004.

CARDOSO, J. C. et al. **Análise crítica dos processos empregados no tratamento de efluentes têxteis**. [s.l.: s.n.].

CHAGAS, P. M. B. et al. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 568–575, 2015.

CHAMPAGNE, P. P.; RAMSAY, J. A. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 7, p. 2230–2235, 2010.

CHAPMAN, E. E. V.; DAVE, G.; MURIMBOH, J. D. Ecotoxicological risk assessment of undisturbed metal contaminated soil at two remote lighthouse sites. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 961–969, 2010.

CHHABRA, M.; MISHRA, S.; SREEKRISHNAN, T. R. Immobilized laccase mediated dye decolorization and transformation pathway of azo dye acid red 27. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2015.

CLAUSEN, D. N.; TAKASHIMA, K. Efeitos dos parâmetros operacionais na fotodegradação do azo corante direct red 23 na interface dióxido de titânio/ água. **Quimica Nova**, v. 30, n. 8, p. 1896–1899, 2007.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

DAS, A. et al. Production, characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 281–288, 2016.

DELLAMATRICE, P. M.; ROSIM MONTEIRO, R. T. Decolorization and toxicity of municipal waste by horseradish (*Cochlearia armoracia*). **Quimica Nova**, v. 29, n. 3, p. 419–421, 2006.

DUTTA, K. et al. Chemical oxidation of methylene blue using a Fenton-like reaction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 84, n. 1, p. 57–71, 2001.

ELY; KEMPKA, A. P. ;; SKORONSKI, E. Aplicação de Peroxidasas no Tratamento de Efluentes Peroxidasas Application in the Wastewater Treatment. **Rev. Virtual Quim**, v. 8, n. 5, p. 1537–1549, 2016.

FARIAS, S. et al. Free and Ca-Alginate Beads Immobilized Horseradish Peroxidase for the Removal of Reactive Dyes: an Experimental and Modeling Study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 4, p. 1290–1306, 2017a.

FARIAS, S. et al. Removal of Reactive Blue 21 and Reactive Red 195 dyes using horseradish peroxidase as catalyst. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 701–707, 2017b.

FRITZKE, W. et al. Peroxidase of *Cedrela fissilis* leaves: Biochemical characterization and toxicity of enzymatically decolorized solution of textile dye Brilliant Sky-Blue G. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, n. February, p. 101553, 2020.

GHOLAMI-BORUJENI, F. et al. Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 15, p. 217–222, 1 jun. 2011.

GOPINATH, K. P. et al. Evaluation and elimination of inhibitory effects of salts and heavy metal ions on biodegradation of Congo red by *Pseudomonas* sp. mutant. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3687–3693, 2011.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Revisão: corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.

HAMOUS, H. et al. Electrochemical degradation of Orange G in K_2SO_4 and KCl medium. **Environmental Engineering Research**, v. 25, n. 4, p. 571–578, 2019.

HASSEMER, M. E. N.; SENS, M. L. Tratamento do efluente de uma indústria têxtil. Processo físico-químico com ozônio e coagulação/floculação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 7, n. 1/2, p. 30–36, 2002.

IARK, D. et al. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v. 289, n. June, p. 121655, 2019.

JADHAV, S. B.; SINGHAL, R. S. Polysaccharide conjugated laccase for the dye decolorization and reusability of effluent in textile industry. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 271–277, 2013.

LEGERSKÁ, B.; CHMELOVÁ, D.; ONDREJOVIČ, M. Decolourization and detoxification of monoazo dyes by laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 285, n. August, p. 84–90, 2018.

LI, X. et al. Response surface analysis for enzymatic decolorization of Congo red by manganese peroxidase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 1–6, 2009.

LING, Z. R. et al. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 785–793, 2015.

MELO, G. G. DE et al. ESTUDOS PRELIMINARES SOBRE ATIVIDADE ADSORTIVA DO CORANTE VERMELHO CONGO PELO FUNGO *Lentinus crinitus* ADPSORTIVE ACTIVITY OF DYE RED CONGO BY FUNGUS *Lentinus*. v. 3, n. 3, p. 312–320, 2014.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MERIÇ, S. et al. Decolourisation and detoxifying of Remazol Red dye and its mixture using Fenton's reagent. **Desalination**, v. 173, n. 3, p. 239–248, 2005.

MORSI, R. et al. Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. **Science of the Total Environment**, v. 714, 2020.

MOTA, T. R. et al. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: Evaluation of Degradation Products and Toxicity. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 10, 2015.

NIMKAR, U. Sustainable chemistry: A solution to the textile industry in a developing world.

Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, v. 9, p. 13–17, 2018.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. **Quimica Nova**, v. 37, n. 2, p. 209–214, 2014.

PIZATO, E. et al. Caracterização de efluente têxtil e avaliação da capacidade de remoção de cor utilizando o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 5, p. 1027–1035, 2017.

PREETHI, S. et al. Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2013.

RAMALHO, R. P. R. S.; SCALIZE, P. S.; CARAMORI, S. S. Peroxidase de gramínea de Cerrado como alternativa no tratamento de efluentes agroindustriais. **Revista Ambiente e Agua**, v. 9, n. 3, p. 445–458, 2015.

REBAH, F. BEN; MILED, N. Fish processing wastes for microbial enzyme production: a review. **3 Biotech**, v. 3, n. 4, p. 255–265, 2013.

REIS, L. G. T. DOS. **DEGRADAÇÃO DO CORANTE VERMELHO CONGO EM SOLUÇÃO AQUOSA ATRAVÉS DE PLASMA OBTIDO POR ELETRÓLISE DE ALTA TENSÃO**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 2009.

ROONEY, C. P.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. Phytotoxicity of nickel in a range of European soils: Influence of soil properties, Ni solubility and speciation. **Environmental Pollution**, v. 145, n. 2, p. 596–605, 2007.

SADIGHI, A.; FARAMARZI, M. A. Congo red decolorization by immobilized laccase through chitosan nanoparticles on the glass beads. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 2, p. 156–162, 2013.

SALVADOR, T.; MARCOLINO, L. H.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de corantes têxteis e remediação de resíduos de tingimento por processos fenton, foto-fenton e eletro-fenton. **Quimica Nova**, v. 35, n. 5, p. 932–938, 2012.

SANTOS, L. B. et al. Determinação simultânea de corantes têxteis por Voltametria Adsorviva de Redissolução Catódica. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 35, n. 2, p. 387–392, 2013.

SCHITTLER, L. et al. Extracts of Leaves of *Ficus auriculata* Lour.: Antioxidant, Antimicrobial and Phytotoxic Activity. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 83, n. 4, p. 321–328, 2018.

SCHMITT, S. et al. Decolorization of aqueous solutions of disperse textile dyes by oxidoreductases. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 30, n. 1, p. 48–56, 2012.

SILVA, M. R. DA et al. The use of HRP in decolorization of reactive dyes and toxicological evaluation of their products. **Enzyme Research**, v. 2010, n. January, 2010.

SILVA, M. C. S. et al. Descoloration of industrial dyes and simulated textile effluents dyes by turnip peroxidase. v. 35, n. 5, p. 889–894, 2012.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L.** [s.l: s.n.].

SOUZA, A. F.; ROSADO, F. R. Utilização De Fungos Basidiomicetes Em Biodegradação De Efluentes Têxteis Use of Fungi in Biodegradation of Basi- Diomycetes Textile Effluents. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 2, p. 121–139, 2009.

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

STRONG, P. J.; CLAUS, H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 373–434, 2011.

SUN, S. et al. A novel breeding strategy for new strains of *Hypsizygus marmoreus* and *Grifola frondosa* based on ligninolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 2005–2013, 2014.

TAN, L. et al. Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 287–294, 2016.

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

VARGA, B. et al. Enzymatic treatment and subsequent toxicity of organic micropollutants using oxidoreductases - A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 221, p. 306–322, 2019.

VASCONCELOS, D. N. DE; XIMENES, V. F. Albumin-induced circular dichroism in Congo red: Applications for studies of amyloid-like fibril aggregates and binding sites. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, n. 1, p. 321–330, 2015.

WANG, L. et al. Preparation of nanocrystalline $\text{Fe}_{3-x}\text{La}_x\text{O}_4$ ferrite and their adsorption capability for Congo red. **Journal of Hazardous Materials**, v. 196, p. 342–349, 2011.

CAPÍTULO 2 – DESCOLORAÇÃO ENZIMÁTICA DE VERMELHO CONGO POR HORSERADISH PEROXIDASE E LACASE DE *Aspergillus* sp. E AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE

RESUMO

Os corantes são compostos orgânicos reconhecidamente recalcitrantes, tóxicos ao meio ambiente e visíveis em baixas concentrações. O tratamento de corantes com enzimas óxido-redutases se mostra promissor para aqueles presentes em águas residuárias industriais. As enzimas possuem especificidade e eficácia na degradação de compostos recalcitrantes, sendo de extrema importância a avaliação da toxicidade após o tratamento, pois os compostos intermediários gerados podem ser mais tóxicos que os compostos originais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de descoloração do corante azo vermelho Congo através do uso das enzimas Horseradish peroxidase (HRP) e lacase de *Aspergillus* sp. e subsequente avaliação da toxicidade. Foram realizados testes para a otimização das condições do processo enzimático através de Delineamento de Composto Central Rotacional e avaliação de toxicidade para *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Allium cepa* e *Cucumis sativus* L. Com o uso da HRP, obteve-se uma descoloração de 83,53% em pH 4,5, 70°C e 40 mg.L⁻¹ de H₂O₂. Com o uso da lacase, houve 98% de descoloração, em 55°C e pH 3. Os resultados da toxicidade para a *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* e *Allium cepa* indicam que não houve aumento da toxicidade após o tratamento enzimático. Para o *Cucumis sativus* L. o crescimento do caule para as soluções tratadas com HRP e lacase foram superiores ao controle, porém o aspecto da folha indica um aumento da toxicidade após o tratamento enzimático. O tratamento com as enzimas do presente estudo se mostra promissor para a descoloração de águas contendo vermelho Congo.

Palavras chave: Corantes Azo. Oxidoreductases. Otimização. Fitotoxicidade

CHAPTER 2 – ENZYMATIC DECOLORATION OF RED CONGO BY HORSERADISH PEROXIDASE AND LACCASE OF *Aspergillus sp.* AND EVALUATION OF PHYTOXICITY

ABSTRACT

Dyes are recognized organic recalcitrant compounds, toxic to the environment and visible in low concentrations. The treatment of dye with enzymes oxidoreductases is promising for those present in industrial wastewater. Enzymes have specificity and effectiveness in the degradation of recalcitrant compounds. Being the evaluation of toxicity after treatment extremely important, since the generated intermediate compounds can be more toxic than the original compounds. The present study aimed to evaluate the discoloration of the red azo dye Congo efficiency through the use of the enzyme horseradish peroxidase (HRP) and laccase *Aspergillus sp.* and subsequent toxicity evaluation. Tests were performed to optimize the conditions of the enzymatic process using Design of Central composite rotational design and evaluation of toxicity *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Cucumis sativus* and *Allium cepa L.* With the use of HRP, a discoloration of 83.53% was obtained at pH 4.5, 70°C and 40 mg.L⁻¹ of H₂O₂. With the use of laccase, there was 98% discoloration, at 55°C and pH 3. The results of toxicity in *Lactuca sativa*, *Phaseolus vulgaris* and *Allium cepa* indicate that there was no increase in toxicity after enzymatic treatment. For *Cucumis sativus L.*, the growth of the stem for solutions treated with HRP and laccase was superior to the control, however the leaf aspect indicates an increase in toxicity after enzymatic treatment. The treatment with the enzymes of the present study is promising for the discoloration of waters containing Congo red dye.

Keywords: Azo dyes. Oxidoreductases. Optimization. Phytotoxicity

1 INTRODUÇÃO

O setor industrial concentra as atividades que podem contribuir para a contaminação ambiental, principalmente por utilizar grandes volumes de água e insumos químicos. Conseqüentemente, esta associação leva à produção de rejeitos líquidos, que podem conter inúmeras substâncias tóxicas recalcitrantes. Dentre esses rejeitos, pode-se destacar os efluentes coloridos, os quais apresentam complexidade química e alta demanda química de oxigênio. Nas indústrias, mais de 90% dos corantes utilizados são sintéticos, caracterizados por ser substâncias orgânicas complexas com alta absorvidade, que contêm centros cromóforos baseados em grupos funcionais diversificados (Burkinshaw e Salihu 2013; Cardoso et al. 2016; Pizato et al. 2017; Salles e Pelegrini 2006; Santos et al. 2013).

Os corantes que possuem, no mínimo, um grupo azo ($-N=N-$) ligados a estruturas aromáticas, são chamados corantes Azo. Nesta classe de corantes, tem-se o vermelho Congo ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$, com massa molecular de $696,66 \text{ g mol}^{-1}$), carcinogênico para aos animais e para os seres humanos. Os corantes Azo são compostos recalcitrantes, que quando lançados no meio ambiente sem o devido tratamento, podem dar origem à aminas aromáticas, por meio da clivagem das ligações azo por bactérias, que são subprodutos altamente tóxicos aos seres vivos (Guaratini e Zanoni 2000; Chagas e Durrant 2001; Mota et al. 2015). Ainda, podem dificultar a penetração de luz e, conseqüentemente, influenciar no ciclo de vida existente no corpo receptor (Albuquerque et al. 2013; Saggiaro et al. 2015).

Em geral, os métodos de tratamento de águas residuárias contendo corantes consistem em sistemas físico-químicos, seguidos de tratamentos biológicos, sendo, para este último, comumente utilizado o sistema de lodos ativados, que apresenta eficiência na remoção de cor mas gera grande volume de lodo (Anjaneyulu et al. 2005; Dos Santos et al. 2011; Helena et al. 2010).

Como alternativa ao tratamento com bactérias, pode-se utilizar o tratamento com enzimas, que também é classificado como biológico. As enzimas catalisam reações envolvendo os compostos recalcitrantes, clivando ou transformando em outras moléculas ou compostos (Chagas et al. 2015; Tan et al. 2016). As óxido-redutases, como a peroxidase e a lacase, são enzimas promissoras para o tratamento destas águas residuárias, devido à sua especificidade e sua eficácia na degradação de compostos recalcitrantes (Demarche et al. 2012). As peroxidases são hemoproteínas, produzidas por microrganismos e por plantas, que catalisam reações de oxidação, inclusive substratos fenólicos, como os corantes, e requerem a presença de peróxidos, como o peróxido de hidrogênio. Neste grupo está a Horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.7), uma glicoproteína heme de origem vegetal (Campos et al. 2004; Baptista et al. 2012; De Oliveira et al. 2017). As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem ao grupo de enzimas chamadas de oxidases de cobre azul e catalisam uma grande variedade de

substratos orgânicos e inorgânicos incluindo mono, di e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas (Aguilar e Ferraz 2011; Pacheco e Soares 2014).

Neste contexto, as enzimas óxido-redutases se mostram promissoras no tratamento de águas residuárias, devido à sua baixa especificidade e sua eficácia na degradação de compostos recalcitrantes (Demarche et al. 2012). Pacheco e Soares (2014) ao utilizarem lacase de *Aspergillus* sp., obtiveram remoção de 60% da cor de efluente da indústria de papel e celulose. Bilal et al. (2016), obtiveram remoções de 72,39%, 87,23% e 79,57% dos corantes reativos vermelho, azul e laranja, respectivamente, utilizando a HRP imobilizada em alginato de cálcio. Farias et al. (2017) obtiveram remoções de até 93% para o azul reativo 221 e de até 75% para o azul reativo 198, utilizando a HRP em pH 5,5 e 30°C. Silva et al. (2012) obtiveram 60% de remoção para o corante turqueza remazol G e 66% de remoção para o corante azul brilhante remazol R utilizando a peroxidase de nabo. Fritzke et al. (2020) obtiveram 82,65% de remoção do corante têxtil azul céu brilhante G quando utilizada uma peroxidase parcialmente purificada extraída das folhas de *Cedrela fissilis*, nas condições ótimas de reação.

Estudos com HRP e lacases afirmam que tais enzimas são eficientes na descoloração de uma gama de corantes. Porém, é importante salientar, que estes processos podem gerar compostos intermediários, muitas vezes desconhecidos e que podem ser potencialmente mais tóxicos que os compostos originais. Assim, é são necessários testes de toxicidade para determinar se houve bioativação dos produtos da reação enzimática.

O estudo toxicológico envolve avaliações qualitativas e quantitativas dos efeitos das substâncias químicas e seus subprodutos ou materiais sobre os indicadores biológicos expostos. Os testes de toxicidade podem ser agudos ou crônicos. Os efeitos tóxicos vão desde a mortalidade até efeitos chamados sub-letais, tais como mudanças no crescimento, no desenvolvimento, na reprodução e no comportamento (Dellamatricea e Rosim Monteiro 2006; Guaratini e Zanoni 2000). No estudo de Fritzke et al. (2019), as soluções de corante azul céu brilhante G tratadas com peroxidase extraídas das folhas de *Cedrela fissilis* não mostraram fitotoxicidade nas sementes de *Lactuca sativa* e houve uma diminuição na citotoxicidade em células sanguíneas humanas. Mota et al. (2015) verificaram diminuição da toxicidade da solução aquosa de corante vermelho Congo descolorida com lacase de *Ganoderma lucidum*, comparada a solução inicial, sem tratamento enzimático, em sementes de *L. sativa*.

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo descolorir soluções de vermelho Congo utilizando as enzimas HRP e lacase e, posteriormente, avaliar a fitotoxicidade das soluções antes e após o tratamento, utilizando quatro indicadores biológicos de origem vegetal.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ENZIMAS E REAGENTES

As enzimas utilizadas para a descoloração do corante foram a Horseradish peroxidase - HRP (398,30 U mL⁻¹, 2,39 mg mL⁻¹ de proteína, Toyobo, Brasil) e lacase de *Aspergillus* sp. (>1000 LAMU g⁻¹ – uma unidade LAMU é definida como a quantidade de enzima que transforma 1 μmol de siringaldazina por min a pH 7,5 e 30°C, Novozymes). O vermelho do Congo (sal de sódio do ácido benzidinediazo-bis-1-naftil-amina-4-sulfônico, C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂, massa molecular, 696,66 g mol⁻¹, Sigma-Aldrich Co).

2.2 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma abordagem experimental utilizada para identificar as condições ótimas para um sistema multivariável, podendo prever o efeito individual e combinado das variáveis (Li et al. 2009). No presente trabalho, a MSR foi empregada para investigar e descrever quantitativamente as interações entre as variáveis, cujos coeficientes de regressão dão origem a um modelo matemático. O planejamento fatorial foi desenvolvido por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com cinco níveis para cada variável, conforme as Tabelas 1 e 2 para a peroxidase e para a lacase, respectivamente. Foram realizadas três repetições no ponto central e a resposta foi a porcentagem de descoloração (%) da solução de vermelho Congo. Os valores das variáveis do DCCR foram calculados a partir do ponto central de cada variável e, estes pontos centrais, foram definidos com base em condições otimizadas de estudos anteriores com HRP e lacase (Baumer et al. 2018; Bilal e Iqbal 2019; Ling et al. 2015; Mota et al. 2015; Silva et al. 2010). Foram realizados 17 experimentos para a descoloração com a HRP e 11 experimentos para a descoloração com a lacase. Os delineamentos com três variáveis e duas variáveis, para a HRP e a lacase, respectivamente, foram utilizados para ajustar às superfícies de resposta, com modelo de segunda ordem, obtendo-se as curvas de contorno. As funções de resposta foram relacionadas às variáveis de entrada por um polinômio de segundo grau, exemplificado na conforme a Equação 1 para três variáveis, onde, x_i , x_j , x_k são as variáveis independentes que afetam a resposta prevista y e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são os coeficientes de intercepto, linear, quadrático e termos de interação. Os coeficientes da função resposta e sua significância estatística foram avaliados pela análise de regressão da superfície de resposta. O teste de Fisher (valor F) foi utilizado para determinar se o modelo de segunda ordem era adequado para descrever os dados obtidos, enquanto a adequação do modelo foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Tabela 1 – Níveis e variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional utilizado para obtenção da condição ótima para a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela peroxidase.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	+1,68
Temperatura (°C)	20	30	45	60	70
H ₂ O ₂ (mg L ⁻¹)	5	19,5	40	60,5	75
pH	1	2,5	4,5	6,5	8

Tabela 2 - Níveis e variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional utilizado para obtenção da condição ótima para a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase.

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
Temperatura (°C)	30	35	45	55	60
pH	2.4	3	4.5	6	6.6

2.3 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO

As reações de oxidação foram conduzidas em tubos de ensaio, adicionando 10 mL da solução de corante vermelho Congo (50 mg L⁻¹), 50 mg mL⁻¹ de solução de Horseradish peroxidase (0,2 mL) ou 10 U ml⁻¹ de solução de lacase (0,3 mL) (sendo as enzimas colocadas nos meios reacionais, de forma separada). As reações foram conduzidas por 30 min e 60 min e, ao final, amostras foram coletadas e as absorbâncias lidas espectrofotômetro UV-VIS (Pharo 300 Merck) à 496 nm e a 569 nm, para a peroxidase e a lacase, respectivamente. As leituras foram realizadas em duplicata e a descoloração foi calculada de acordo com a Equação 1, onde ABS_{antes} e ABS_{depois} , são as absorbâncias antes e após as reações enzimáticas (Chiong et al. 2016).

$$descoloração (\%) = \frac{ABS_{antes} - ABS_{depois}}{ABS_{antes}} \times 100 \quad (1)$$

2.4 FITOTOXICIDADE

A fitotoxicidade foi determinada com as seguintes soluções teste: controle positivo, sendo utilizada apenas água destilada, solução aquosa de vermelho congo (CRS), solução aquosa de vermelho congo descolorida pela HRP (CRS-HRP) e solução aquosa de vermelho congo descolorida pela lacase (CRS-LAC). As soluções aquosas de vermelho congo foram preparadas na concentração de 50 mg L⁻¹.

2.4.1 Fitotoxicidade em sementes de *Lactuca sativa* L. e *Phaseolus vulgaris*

Para avaliar a fitotoxicidade em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) e de feijão (*Phaseolus vulgaris*), foi utilizada a metodologia descrita por Oliveira et al. (2018), Dacoreggio et al. (2019) e Yadav et al. (2019). Sementes de alface e de feijão foram adquiridas em uma agropecuária local do município de Lages - SC. Foram utilizadas dez sementes de alface e de feijão, por replicação, além de três repetições por solução teste. As sementes foram distribuídas em placas de Petry (9 cm de diâmetro) contendo papel filtro (Whatman n° 2) e umedecidas com 3 mL das soluções teste, em separado. As placas foram armazenadas por 5 dias em incubadora a 25 ± 1°C e 40% de umidade. Decorrido o tempo de germinação, foram contados o número de sementes germinadas e medidos o comprimento radicular, com auxílio de paquímetro. A porcentagem de germinação (%G) foi obtida pela relação entre o número de sementes germinadas no final do teste e o número de sementes adicionadas a placa de Petry. Foi considerada como germinada a semente que apresentou, pelo menos, 5 mm de protrusão radicular.

2.4.2 Fitotoxicidade em *Allium cepa* L.

Para o teste de fitotoxicidade em cebola (*Allium cepa* L.), foi utilizada a metodologia descrita por Yadav et al. (2019), que avalia a inibição do crescimento radicular. Os bulbos de cebola, saudáveis e de tamanho uniforme, foram adquiridos em mercado local do município de Lages - SC. Foi retirada a primeira camada de catáfilos secos dos bulbos e estes foram colocados sobre tubos Falcon de 50 mL contendo as soluções teste. Os tubos foram mantidos em uma incubadora a 25°C ± 1°C por 5 dias. As soluções teste, armazenadas a 4°C, foram adicionadas aos tubos conforme necessário, garantindo o contato entre os bulbos da cebola e o líquido. Após 5 dias, os bulbos foram observados em relação ao crescimento e comprimento das raízes, medidas com um paquímetro. A inibição no crescimento

radicular foi mensurada e correlacionada com um índice de grau de toxicidade, de acordo com Fiskesjo (1985).

2.4.3 Fitotoxicidade em *Cucumis sativus* L.

Para estudo da fitotoxicidade em pepino (*Cucumis sativus* L.), utilizou-se a metodologia de Bastos et al. (2017) e Bertoletti et al. (2018). A semeadura de uma semente foi realizada em células individuais, adicionadas de 5g de substrato comercial (substrato a base de casca de pinus triturada e composta com calcário, vermiculita expandida e NPK, pH 6 +/- 0,5, condutividade elétrica de 0,4 +/- 0,3 mS.cm⁻¹, densidade de 310 kg m⁻³, capacidade de retenção de água de 90% e umidade máxima de 50%), simulando uma plantação convencional. Foram utilizadas seis plantas, em duplicata, para cada solução teste, totalizando 48 plantas. Nos seis primeiros dias de semeadura, as plantas foram regadas apenas com água, visando o brotamento e crescimento. A partir do 7º dia, foram aplicados diariamente 2 mL das soluções teste, sempre no mesmo horário (9:00 h). No 7º dia de aplicação, após 6 h da última pulverização, a avaliação das plantas foi realizada medindo a altura (cm) e as características visuais, de acordo com o índice de avaliação e descrição da fitotoxificação das plantas do EWRC (1964): 1 - Nenhum dano; 2 - Pequenas alterações (descoloração, deformação) visíveis em algumas plantas; 3 - Pequenas alterações (clorose e rugas) visíveis em muitas plantas; 4 - forte descoloração ou deformação razoável, sem necrose; 5 - Necrose de algumas folhas, acompanhada de deformação em folhas e brotos; 6 - Redução do tamanho das plantas, rugas e necrose das folhas; 7 - Mais de 80% das folhas danificadas; 8 - Danos extremamente graves, deixando pequenas áreas verdes nas plantas; 9 - Morte da planta

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada com uso do *software* Statistica® 13.3 (StatSoft, Inc., Austin, Texas, Estados Unidos), com nível de 95% de confiabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DA SOLUÇÃO DE VERMELHO CONGO PELA HRP

Os resultados da eficiência da descoloração da solução 50 mg L⁻¹ do corante vermelho Congo quando utilizada a HRP estão mostrados na Tabela 3. Verifica-se que conduzindo a reação por 30 min e por 60 min, há pouco incremento na eficiência de descoloração. O máximo incremento obtido

foi para E8, com aumento de 4,92% na eficiência de descoloração, tornando a condução da reação por 60 min desnecessária.

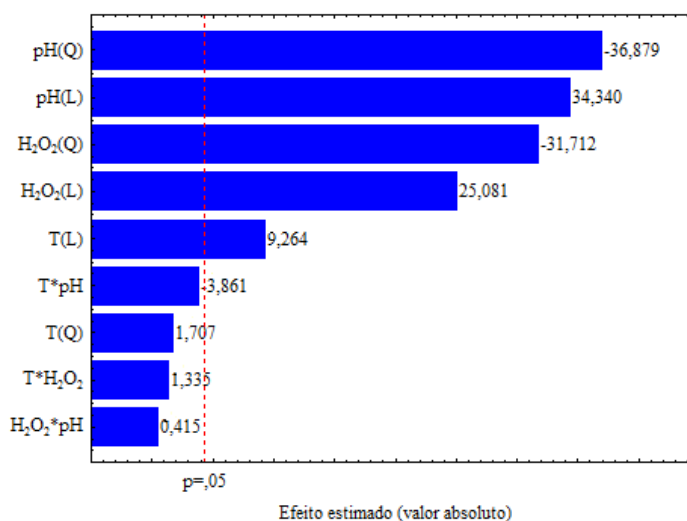
Na Figura 1 estão mostrados os efeitos individuais, quadráticos e de interação entre as variáveis do DCCR na resposta (eficiência de descoloração), quando utilizada a HRP. Verifica-se que a temperatura (L), a concentração de H₂O₂ (L) e o pH (L), tiveram efeitos individuais significativos e positivos. Uma análise simplificada mostra que a passagem do nível -1 para +1 no DCCR, para as três variáveis, aumenta a eficiência de descoloração. Porém, deve-se considerar os efeitos de quadráticos e de interação, que interferem nesta interpretação simplificada. A análise de variância (ANOVA) mostrou que 78,38% da variação total foi explicada pelo modelo matemático gerado na regressão.

Tabela 3 – Resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela HRP para 30 minutos e 60 minutos de reação.

Experimento	Temperatura (°C)	H ₂ O ₂ (mg L ⁻¹)	pH	Eficiência de descoloração (%)	
				30 min	60 min
E1	30 (-1)	19,5 (-1)	2,5 (-1)	46,21	47,33
E2	30 (-1)	19,5 (-1)	6,5 (1)	59,85	59,83
E3	30 (-1)	60,5 (1)	2,5 (-1)	49,57	49,94
E4	30 (-1)	60,5 (1)	6,5 (1)	63,49	66,56
E5	60 (1)	19,5 (-1)	2,5 (-1)	54,49	57,22
E6	60 (1)	19,5 (-1)	6,5 (1)	60,69	61,25
E7	60 (1)	60,5 (1)	2,5 (-1)	59,79	62,59
E8	60 (1)	60,5 (1)	6,5 (1)	67,21	72,13
E9	20 (-1,68)	40 (0)	4,5 (0)	71,26	70,80
E10	70 (1,68)	40 (0)	4,5 (0)	83,53	82,69
E11	45 (0)	5 (-1,68)	4,5 (0)	11,89	15,75
E12	45 (0)	75 (1,68)	4,5 (0)	71,04	71,08
E13	45 (0)	40 (0)	1 (-1,68)	0	0
E14	45 (0)	40 (0)	8 (1,68)	71,82	75,34
E15 (C)	45 (0)	40 (0)	4,5 (0)	79,44	78,91
E16 (C)	45 (0)	40 (0)	4,5 (0)	80,08	82,17
E17 (C)	45 (0)	40 (0)	4,5 (0)	81,90	81,36

(C) é o ponto central. Números em subscripto são os níveis codificados do Delineamento Composto Central Rotacional.

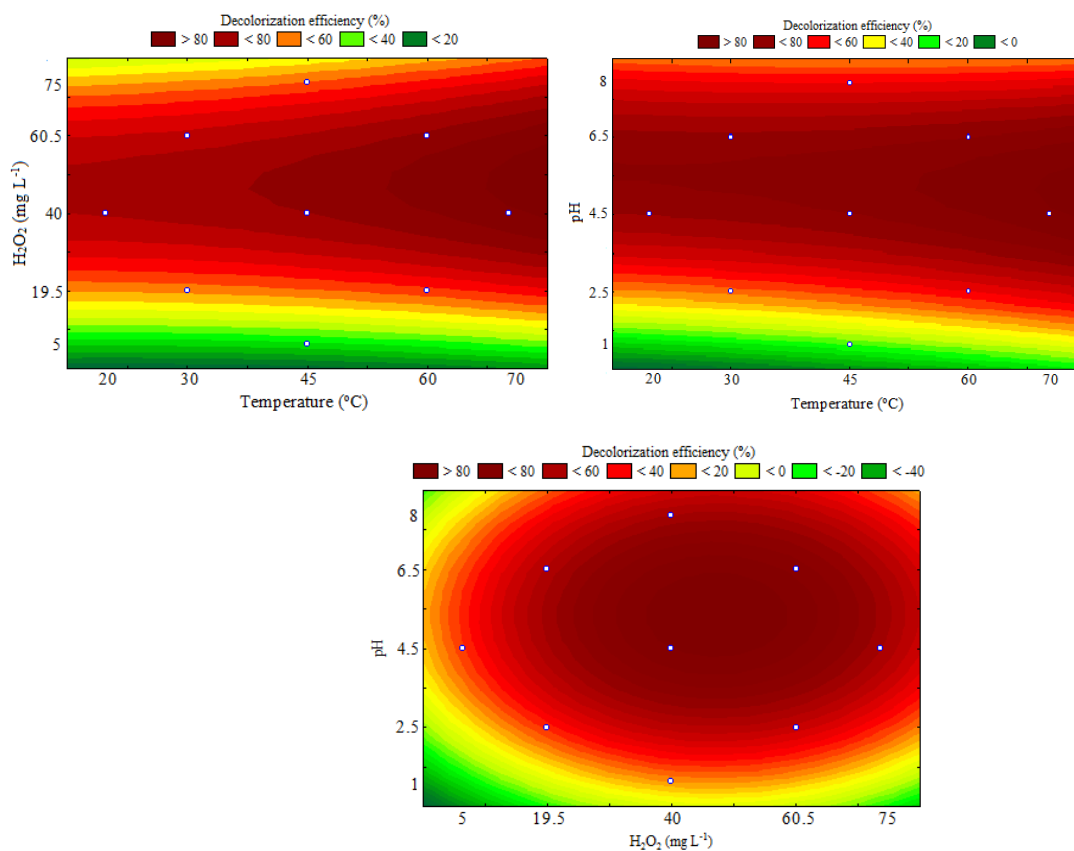
Figura 1 – Diagrama de Pareto obtido a partir da análise estatística dos resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela HRP para 30 minutos de reação.



Fonte: Autor, 2020

A Figura 2 mostra as Curvas de Contorno obtidas a partir da regressão dos dados de eficiência de descoloração para 30 min de reação. A maior eficiência de descoloração foi obtida na região de maior temperatura e de valores intermediários em relação a concentração de H₂O₂ e pH (vermelho mais escuro). Portanto, na reação de descoloração do vermelho Congo pode-se utilizar 45°C a 70°C, 40 a 60,5 mg L⁻¹ de H₂O₂ e pHs de 4,5 a 6,5. Para a etapa da fitotoxicidade, realizou-se a descoloração nas condições de 70°C, 40 mg L⁻¹ de H₂O₂ e pH 4,5, correspondentes ao E10. Jun et al. (2019) destacam que a dosagem de H₂O₂ deve ser um dos parâmetros a ser controlado para a segurar a eficiência da atuação da enzima, pois a peroxidase é dependente da sua presença. O excesso pode inibir a atividade da peroxidase, enquanto uma pequena quantidade pode limitar a taxa de reação. Da faixa de concentração testada no presente estudo, nas concentrações intermediárias de peróxido de hidrogênio que foram obtidos os melhores resultados de eficiência de descoloração.

Figura 2 - Curvas de contornos referentes a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela HRP para 30 minutos de reação.



Fonte: Autor, 2020.

Na pesquisa de Silva et al. (2010), a concentração ótima de peróxido para a remoção dos corantes azul Drimaren X-3LR, azul Drimaren X-BLN, rubinol Drimaren X-3LR e Azul Drimaren CL, utilizando HRP, foi de 17 mg L⁻¹, concentração inferior a do presente estudo. Souza et al. (2007), ao utilizarem a HRP para a descoloração de turqueza remazol G 133%, obtiveram uma faixa de pH de 4 a 5 para a descoloração máxima, e um decaimento da eficiência em pHs abaixo de 2 e acima de 7.

Achar et al. (2017) compararam o potencial de descoloração dos corantes anilina azul, preto reativo 5, azul reativo 19 e o vermelho Congo, utilizando a peroxidase extraída de *Caralluma umbellata* e a HRP. As condições de reação otimizadas e fixadas foram pH 6,2 e 45°C. Para os corantes anilina azul, preto reativo 5 e azul reativo 19, as enzimas alcançaram de 75% a 85% de remoção de cor, porém para o vermelho Congo, a peroxidase de *Caralluma umbellata* não chegou a 10% de remoção, enquanto a HRP levou a 80% da remoção da cor nas mesmas condições de pH e temperatura.

No estudo de Preethi et al. (2013) foi avaliado o potencial da HRP para a degradação do corante azo azul ácido CI 113. Os autores relatam a obtenção de 80% de remoção nas condições de

pH 6,6 e 60°C, porém foi observado que a HRP levava a descoloração elevada na em pHs de 4 a 9 e em temperaturas de 20°C a 60°C, sendo a concentração de H₂O₂ como fator limitante. Os estudos supracitados concordam com os resultados obtidos no atual estudo, onde a HRP foi efetiva na descoloração do corante azo vermelho Congo na faixa de pH de 2,5 a 8, de 30°C a 70°C e apresentando descoloração inferior a 16% na concentração de H₂O₂ de 5 mg.L⁻¹.

3.2 EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO DA SOLUÇÃO DE VERMELHO CONGO PELA LACASE

Os resultados da eficiência da descoloração do corante vermelho Congo para 30 min e 60 min de reação, quando utilizada a lacase, estão mostrados na Tabela 4. Verifica-se que conduzindo a reação por 30 min e por 60 min, há um incremento de 83% na eficiência de descoloração nas condições de E3, seguido de E7, com incremento de 16%, tornando a condução da reação por 60 min necessária, devido a quase totalidade na remoção da cor.

Na Figura 3 estão mostrados os efeitos individuais, quadráticos e de interação entre as variáveis do DCCR, na resposta (eficiência de descoloração), quando utilizada a lacase. A temperatura (L) e o pH (L), tiveram efeitos individuais significativos, negativo e positivos, respectivamente. Uma análise simplificada mostra que a passagem do nível -1 para +1 no DCCR, para as duas variáveis, aumenta a eficiência de descoloração para a temperatura e diminui para o pH. Deve-se considerar os efeitos de quadráticos e de interação que interferem nesta interpretação simplificada. A análise de variância (ANOVA) mostrou que 83,64% da variação total foi explicada pelo modelo matemático gerado na regressão dos dados de eficiência de descoloração, para 60 min de reação, e que deu origem a curva de contorno, mostrada na Figura 4. A maior eficiência de descoloração é obtida para 55°C e pH 3, correspondente a E3, condição utilizada para a descoloração das soluções a serem utilizadas na etapa da fitotoxicidade.

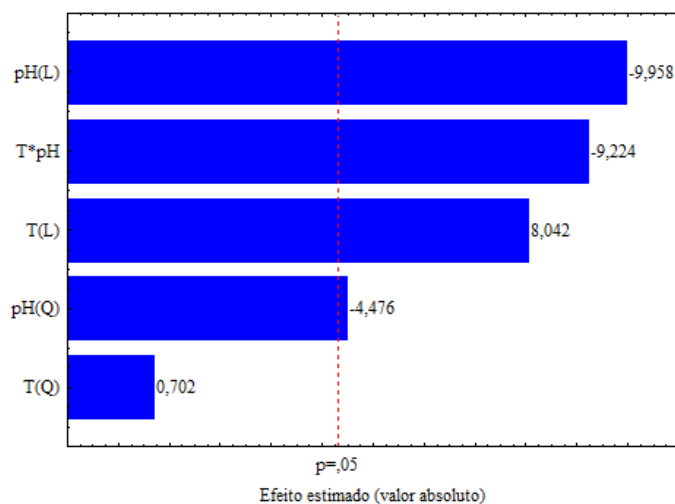
Tabela 4 – Resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase para 30 minutos e 60 minutos de reação.

Experimento	Temperatura (°C)	pH	Eficiência de descoloração (%)	
			30 min	60 min
E1	35 (-1)	3 (-1)	1	7
E2	35 (-1)	6 (1)	0	0
E3	55 (1)	3 (-1)	15	98
E4	55 (1)	6 (1)	0	0

E5	30 (-1,41)	4,5 (0)	31	32
E6	60 (1,41)	4,5 (0)	45	47
E7	45 (0)	2,4 (-1,41)	14	30
E8	45 (0)	6,6 (1,41)	2	6
E9 (C)	45 (0)	4,5 (0)	31	32
E10 (C)	45 (0)	4,5 (0)	36	41
E11(C)	45 (0)	4,5 (0)	31	33

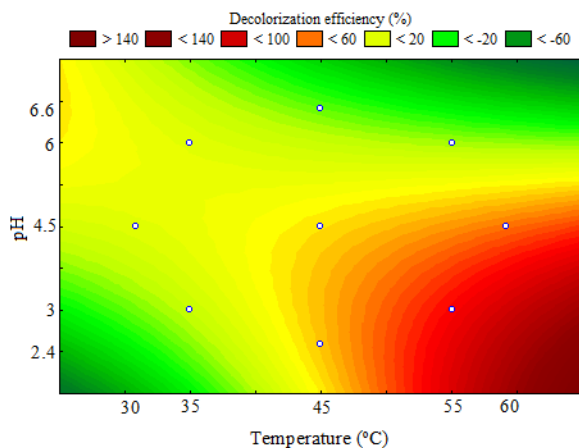
(C) é o ponto central. Números em subscripto são os níveis codificados do Delineamento Composto Central Rotacional.

Figura 3 – Diagrama de Pareto obtido a partir da análise estatística dos resultados de eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase para 60 minutos de reação.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 4 – Curva de contorno referente a eficiência de descoloração da solução de vermelho Congo pela lacase para 60 minutos de reação.



Fonte: Autor, 2020.

Mota et al. (2015) obtiveram 80% de remoção da cor de solução de vermelho Congo, na concentração de 50 mg L⁻¹ em pH 4 e 40°C, utilizando uma lacase de *Ganoderma lucidum*. Ling et al. (2015) utilizaram a lacase de *Trametes* sp. (LAC-01), para a descoloração de azul de bromotimol e verde malaquita. Após 24 h de incubação, em pH de 2,6 e 60°C (condições ótimas), obtiveram 65,4% e 75,8% de descoloração, respectivamente. Iark et al. (2019), ao utilizarem a lacase de *Oudemansiella canarii* para a descoloração de vermelho Congo, obtiveram 80% de descoloração de uma solução a 50 mg L⁻¹, em 24 h a 30 °C e pH 5,5.

Ashrafi et al. (2013), avaliaram o potencial de descolorização de treze corantes têxteis utilizando a Lacase purificada de *P. variable*, e obtiveram em pH 5 a melhor descoloração para todos os corantes estudados, a temperatura ótima foi encontrada na faixa de 40 a 50° C. Das et al. (2016), avaliaram as condições de maior atividade da Lacase produzida por *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 para a descoloração do corante vermelho congo, e obtiveram maior atividade da enzima em pH 3 e um decaimento da atividade a partir de pH 5, para a otimização da temperatura a atividade da Lacase permaneceu inalterada de 35 a 55°C.

Tais pesquisas vão de encontro com o resultado obtido neste estudo, onde em pH 3 obteve-se maior eficiência de descoloração e em pH a partir de 6, as descolorizações foram inferiores a 10%. As lacases fúngicas geralmente apresentam atividade ótima em condições ácidas, e seu pH ótimo é afetado pela procedência da enzima e pelo substrato (SATO et al., 2015). A estabilidade à temperatura varia de acordo com a fonte de onde é isolada a lacase, mas em geral as lacases fúngicas são estáveis entre 30°C e 60°C (Buchert et al. 2010).

Iark et al. (2019) ao estudarem a degradação enzimática do corante azo vermelho Congo por uma nova lacase de *Oudemansiella canarii*, obtiveram diminuição da absorbância em 43% e 80%, após 12h e 24 h de incubação, respectivamente, a 497 nm. Nesta pesquisa, os autores sugerem que houve uma clivagem assimétrica da ligação azo e em paralelo com a oxidação do terceiro grupo NH₂ e a oxigenação. Também é provável que a molécula vermelha do Congo tenha sido oxidada, levando a espécies com nitrificação do grupo NH₂ e perda do grupo SO₃. Por fim, que a clivagem assimétrica das ligações N=N é consistente com a diminuição da absorbância (principalmente na região de 500 nm) e na última etapa da degradação, o anel de benzeno se abriu e um composto totalmente oxigenado foi formado.

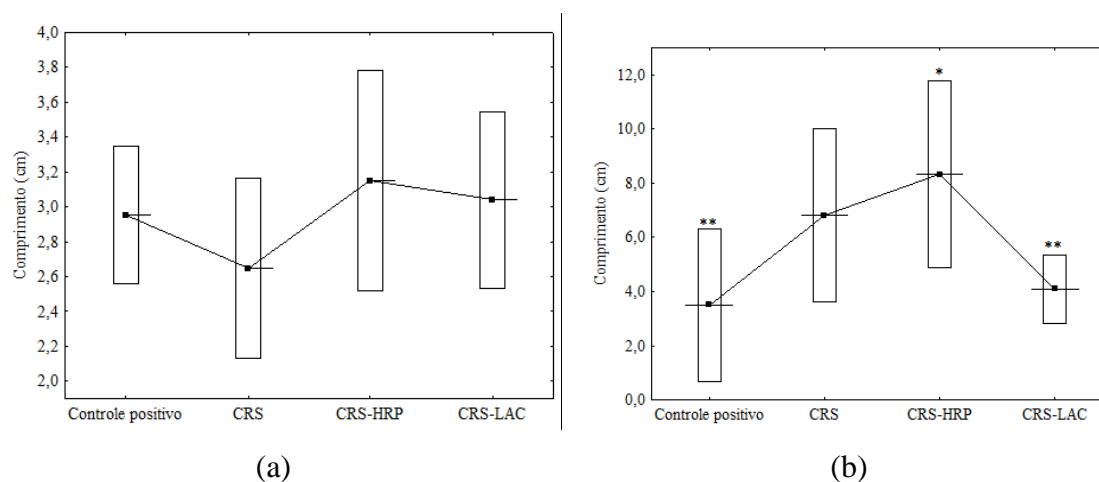
3.3 FITOTOXICIDADE DO VERMELHO CONGO ANTES E APÓS OS TRATAMENTOS ENZIMÁTICOS

3.3.1 Fitotoxicidade em sementes de alface e feijão

A Figura 5 mostra os resultados da fitotoxicidade da CRS, CRS-HRP e CRS-LAC quando aplicadas em sementes de alface (Figura 7a) e de feijão (Figura 7b), comparadas ao controle positivo. Para as sementes de alface, o comprimento médio da protusão radicular foi de $2,95 \pm 0,20$ cm, $2,65 \pm 0,26$ cm, $3,15 \pm 0,32$ cm e $3,04 \pm 0,25$ cm, para o controle positivo, CRS, CRS-HRP e CRS-LAC, respectivamente, não havendo diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os resultados. Com exceção das sementes submetidas ao CRS-LAC, que apresentaram 97% de germinação, para as demais soluções teste houve 100% de germinação. Para as sementes de feijão, foram obtidos para o controle positivo, CRS, CRS-HRP e CRS-LAC, os valores médios de protusão radicular de $3,50 \pm 1,42$ cm, $6,81 \pm 1,59$ cm, $8,33 \pm 1,73$ cm e $4,09 \pm 0,62$ cm, respectivamente. Houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre os resultados da CRS-HRP e CRS-LAC, e do controle positivo e a CRS-HRP, sendo o valor médio de protusão radicular obtido quando aplicado CRS-HRP superior ao valor médio do controle positivo. A germinação foi de 93%, 100%, 90% e 90% para as sementes submetidas ao controle positivo, ao CRS, ao CRS-HRP e ao CRS-LAC, respectivamente. Os resultados dos brotamentos das sementes tratadas com as soluções testem, comparados aos resultados controle positivo, para as duas espécies, indicam que antes e após o tratamento com as enzimas, não houve toxicidade.

Fritzke et al. (2020), ao avaliarem a toxicidade das soluções do corante *Azul céu brilhante G* antes e após o tratamento com uma peroxidase extraída das folhas do Cedro, verificaram que o crescimento radicular nas sementes de *L. sativa* foi maior quando aplicada a solução tratada, comparada a solução não tratada. As espécies em questão são usualmente utilizadas como organismos testes para ensaios de toxicidade pois apresentam germinação rápida e uniforme, crescimento em uma ampla faixa de pH, são sensíveis a diversos tipos de contaminantes podendo indicar toxicidade mesmo em baixas concentrações, apresentam facilidade de manuseio e são facilmente encontradas em comércios locais a baixo custo (Oliveira et al. 2018; Santos 2016; Sobrero e Ronco 2004). Entretanto, há uma deficiência de estudos que avaliem a toxicidade do corante vermelho Congo tratado por lacase de *Aspergillus* sp. e HRP nas espécies avaliadas no presente estudo.

Figura 5 – Comprimento protusão radicular das sementes de alface (a) e feijão (b) quando aplicadas água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC.

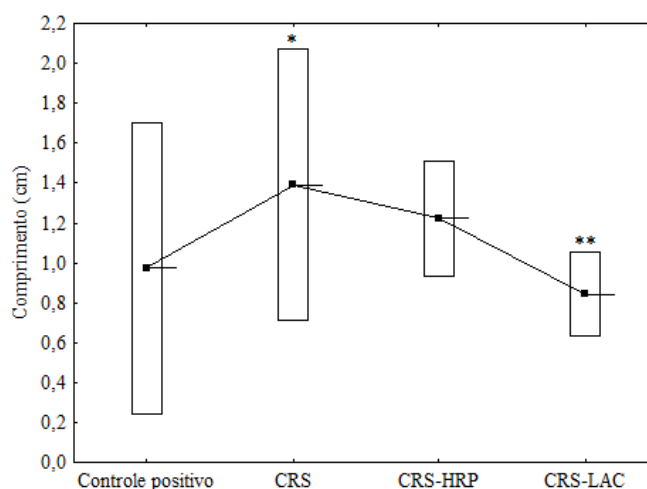


Fonte: Autor 2020.

3.3.2 Fitotoxicidade em cebola

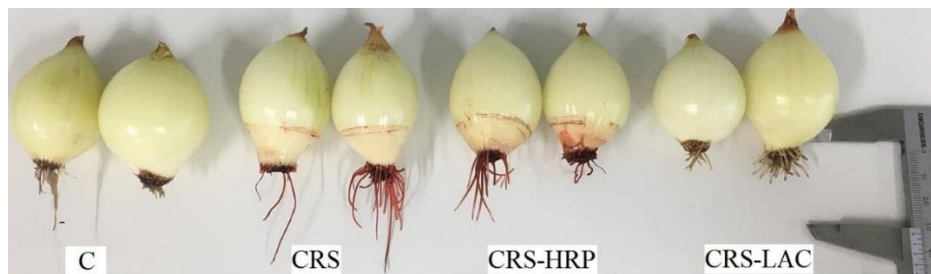
A Figura 6 mostra os resultados da fitotoxicidade da CRS, CRS-HRP e CRS-LAC quando aplicadas em bulbos de cebola, comparadas ao controle positivo e a Figura 7 mostra o aspecto visual dos bulbos de cebola. O comprimento médio radicular foi de $0,97 \pm 0,37$ cm, $1,39 \pm 0,34$ cm, $1,22 \pm 0,15$ cm e $0,84 \pm 0,11$ cm, para o controle positivo, CRS, CRS-HRP e CRS-LAC, respectivamente, não havendo diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as soluções teste e o controle positivo. Houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre o CRS e o CRS-LAC. Os resultados comparados ao controle positivo, indicam que antes e após o tratamento com as enzimas, não houve toxicidade.

Figura 6 – Comprimento radicular dos bulbos de cebola quando aplicadas água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC.



Fonte: Autor, 2020.

Figura 7 – Teste de fitotoxicidade em bulbos de *Allium Cepa L.* submetidos ao crescimento das raízes na presença de água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC.



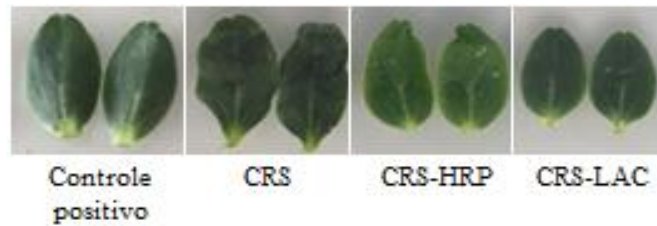
Fonte: Autor, 2020.

Souza et al. (2007) utilizaram o mesmo fitoindicador para testar a toxicidade dos corantes Turqueza Remazol G 133% e Azul Lanaset 2R. A toxicidade do Turqueza Remazol G 133% teve um acréscimo de 12% para a solução após o tratamento com peroxidase de rábano silvestre (HRP) quando comparado a solução inicial. Para o Azul Lanaset 2R, houve um acréscimo de 14%, comparado a solução inicial (sem tratamento). É importante salientar que a estrutura do corante influencia na toxicidade após o tratamento devido aos subprodutos gerados.

3.3.3 Fitotoxicidade em pepino

As plântulas de pepino submetidas a aplicação diária de com água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC apresentaram valores de comprimento médio final iguais estatisticamente ($P > 0,05$), sendo $2,58 \pm 0,73$ cm, $2,16 \pm 0,58$ cm, $3,19 \pm 0,40$ cm e $3,48 \pm 0,40$ cm, para o controle positivo, CRS, CRS-HRP e CRS-LAC. Desta forma, tanto a solução contendo o corante vermelho Congo (CRS) como as soluções do corante que passaram pelo tratamento enzimático, não interferiram no crescimento da planta, como ocorrido com os demais fitoindicadores, quando avaliado o crescimento de radículas. Porém cabe salientar que outros danos podem ser causados a planta. Na Figura 8 está mostrado o aspecto visual das folhas de pepino para cada um dos tratamentos. De acordo com a European Weed Research Council (EWRC, 1964), as folhas da planta onde foi aplicado o Controle positivo estão classificadas com 1 (nenhum dano), as folhas onde foi aplicado a CRS, estão classificadas com 3 (pequenas alterações -clorose e rugas), as folhas da CRS, as folhas onde foi aplicado a CRS-HRP, classificadas com 5 (necrose de algumas folhas, acompanhada de deformação em folhas e brotos) e por fim, as folhas da CRS-LAC classificadas com 6 (redução do tamanho das plantas, rugas e necrose das folhas). Desta forma, comparadas ao controle positivo, embora tenham crescido na mesma proporção, o aspecto das folhas demonstra uma possível toxicidade das soluções CRS, CRS-HRP e CRS-LAC, com características distintas em relação ao dano causado na planta

Figura 8 - Aspecto visual das folhas de pepino submetidos a aplicação de água (controle positivo), CRS, CRS-HRP e CRS-LAC.



Fonte: 2020.

É importante salientar a relevância que os estudos toxicológicos têm no desenvolvimento de mecanismos de prevenção e mitigação dos impactos ambientais associados à presença de agentes perniciosos no meio ambiente. Do ponto de vista biológico, ensaios de avaliação da toxicidade com testes agudos em condições laboratoriais controladas, integram uma importante ferramenta no entendimento da relação dos agentes químicos com os fitoindicadores. Havendo carência de dados para os fitoindicadores utilizados no presente estudo, este pode ser utilizado como referência para estudos posteriores.

4 CONCLUSÃO

A partir da otimização das condições de processo para cada enzima, ambas as enzimas foram eficientes na descoloração do corante vermelho congo. A enzima lacase destacou-se em comparação a enzima HRP, tendo um desempenho em torno de 15% maior na remoção de cor. Na avaliação de toxicidade com os fitoindicadores *Lactuca sativa L.*, *Phaseolus vulgaris* e *Allium cepa*, não apresentaram aumento da toxicidade após o tratamento enzimático quando comparados a solução do corante bruto. Para o teste com *Cucumis sativus L.* apesar do tratamento com HRP e lacase terem um crescimento de caule superior quando comparado ao controle e ao bruto, ambos os tratamentos apresentaram aspecto da qualidade de folha inferior, indicando um aumento da toxicidade para este bioindicador. Estudos posteriores são necessários a fim de uma maior investigação da toxicidade do efluente final, como teste de citotoxicidade e testes agudos e crônicos em organismos aquáticos. Estudos com as enzimas imobilizadas são interessantes para promover o reuso e maior estabilidade enzimática.

REFERÊNCIAS

ACHAR, R. R. et al. Caralluma umbellata Peroxidase: Biochemical Characterization and Its

Detoxification Potentials in Comparison with Horseradish Peroxidase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 801–812, 2017.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.

ALBUQUERQUE, L. F. et al. Coagulation of indigo blue present in dyeing wastewater using a residual bittern. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 246–249, 2013.

ANJANEYULU, Y.; SREEDHARA CHARY, N.; SAMUEL SUMAN RAJ, D. Decolourization of industrial effluents - Available methods and emerging technologies - A review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 245–273, 2005.

ASHRAFI, S. D. et al. The enzymatic decolorization and detoxification of synthetic dyes by the laccase from a soil-isolated ascomycete, *Paraconiothyrium variable*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 173–181, 2013.

BAPTISTA, N. M. Q. et al. Producao das enzimas lignina peroxidase e lacase por fungos filamentosos. **Scientia Plena**, v. 8, n. 1, p. 019904, 7 pp., 2012.

BAUMER, D. J. et al. Toxicity of enzymatically decolored textile dyes solution by horseradish peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, v. 360, n. August, p. 82–88, 2018.

BILAL, M. et al. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. **Journal of Environmental Management**, v. 183, p. 836–842, 2016.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 388, p. 1–23, 2019.

BUCHERT, J. et al. Crosslinking Food Proteins for Improved Functionality. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 113–138, 2010.

BURKINSHAW, S. M.; SALIHU, G. The wash-off of dyeings using interstitial water. Part 4: Disperse and reactive dyes on polyester/cotton fabric. **Dyes and Pigments**, v. 99, n. 3, p. 548–560, 2013.

CAMPOS, Â. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 7, p. 637–643, 2004.

CARDOSO, J. C. et al. **Análise crítica dos processos empregados no tratamento de efluentes têxteis**. [s.l.: s.n.].

CHAGAS, E. P.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 8–9, p. 473–477, 2001.

CHAGAS, P. M. B. et al. Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 568–575, 2015.

CHIONG, T. et al. Enzymatic treatment of methyl orange dye in synthetic wastewater by plant-based peroxidase enzymes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 2500–2509, 2016.

DAS, A. et al. Production, characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 281–288, 2016.

DE OLIVEIRA, J. M.; MORANDIM-GIANETTI, A. DE A.; LUCARINI, A. C. Estudo Do Uso Da Lignina-Peroxidase Para Remoção De 2-Clorofenol Em Efluente Líquido. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 2, p. 144–157, 2017.

DELLAMATRICE, P. M.; ROSIM MONTEIRO, R. T. Decolorization and toxicity of municipal waste by horseradish (*Cochlearia armoracia*). **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 419–421, 2006.

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

DOS SANTOS, P. K. et al. Descoloração e degradação do azo corante vermelho GRLX-220 por ozonização. **Química Nova**, v. 34, n. 8, p. 1315–1322, 2011.

EWRC (EUROPEAN WEED RESEARCH COUNCIL) (1964). Report of the 3rd and 4th meetings of EWRC. Committee of Methods in Weed Research. Weed Res

FARIAS, S. et al. Free and Ca-Alginate Beads Immobilized Horseradish Peroxidase for the Removal of Reactive Dyes: an Experimental and Modeling Study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 4, p. 1290–1306, 2017.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Revisão: corantes têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71–78, 2000.

HELENA, L. et al. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS POR BASIDIOMICETOS TROPICAIS BRASILEIROS INTRODUÇÃO O problema da poluição ambiental pela contaminação dos cursos hídricos , mediante o lançamento dos efluentes industriais , desde o período da Revolução Industrial , te. n. Ccb 204, p. 85–99, 2010.

JUN, L. Y. et al. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 102961, 2019.

LING, Z. R. et al. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes* sp. LAC-01. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 785–793, 2015.

MOTA, T. R. et al. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* Laccase: Evaluation of Degradation Products and Toxicity. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 10, 2015.

OLIVEIRA, G. A. R. DE et al. A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, n. June, p. 171–179, 2018.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Immobilization and characterization of laccase and its use in the biodegradation of paper mill effluent. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209–214, 2014.

PIZATO, E. et al. Caracterização de efluente têxtil e avaliação da capacidade de remoção de cor utilizando o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 5, p. 1027–1035, 2017.

PREETHI, S. et al. Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2013.

SAGGIORO, E. M. et al. Photo-decolorization and ecotoxicological effects of solar compound parabolic collector pilot plant and artificial light photocatalysis of indigo carmine dye. **Dyes and Pigments**, v. 113, p. 571–580, 2015.

SALLES, P.; PELEGRINI, N.; PELEGRINI, R. Tratamento eletroquímico de efluente industrial contendo corantes reativos. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 25–40, 2006.

SANTOS, S. C. DOS. **CARACTERIZAÇÃO E RANQUEAMENTO DE CULTIVARES DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) E *Allium cepa* L. (ALLIACEAE) NA PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS PARA FITOTOXICIDADE.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, 2016.

SANTOS, L. B. et al. Determinação simultânea de corantes têxteis por Voltametria Adsorviva de Redissolução Catódica. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 35, n. 2, p. 387–392, 2013.

SATO, A. C. K. et al. Cross-linking proteins by laccase: Effects on the droplet size and rheology of emulsions stabilized by sodium caseinate. **Food Research International**, v. 75, p. 244–251, 2015.

SILVA, M. R. DA et al. The use of HRP in decolorization of reactive dyes and toxicological evaluation of their products. **Enzyme Research**, v. 2010, n. January, 2010.

SILVA, M. C. S. et al. Descoloration of industrial dyes and simulated textile effluents dyes by turnip peroxidase. v. 35, n. 5, p. 889–894, 2012.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L.** [s.l: s.n.].

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

TAN, L. et al. Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 287–294, 2016.