



ESTUDO ENZIMÁTICO DA DEGRADAÇÃO DA COR DE CORANTE EM EFLUENTES COM O USO DA CASCA DA ABOBRINHA (*Curcubita Pepo*)

A.P.N.FERNANDES¹, J.R.D.FINZER², M.L.BEGNINI³,

¹Universidade de Uberaba

^{2,3} Departamento de Engenharia Química da Universidade de Uberaba

anaprisilanunes@hotmail.com

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial da enzima peroxidase, extraída da casca da abobrinha, no tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. O processo simulou um efluente colorido e permitiu obter maiores informações sobre a enzima além de verificar sua real eficiência no tratamento do efluente colorido. A porcentagem de remoção de cor, com o extrato enzimático simples (sem processo de purificação) foi de 86% em uma das soluções preparadas.

Logo após, a enzima passou por um processo de purificação e sua eficiência foi analisada por meio de sua atividade enzimática.

1-INTRODUÇÃO

Os processos industriais que envolvem reações químicas estão presentes na maioria das manufaturas de produtos ou bens consumidos pelo homem. Tais processos tem acarretado uma grande carga de poluição mundial. No caso de uso de corantes para tecidos é essencial o uso da água e exige uma grande quantidade. Sendo assim, é necessário que os profissionais tenham uma visão ampla do que pode acontecer antes, durante e após o processamento de uma indústria de grande escala. O despejo da água contaminada deve ser submetido a um tratamento antes de ser descartada (VIANA, 2012).

Muitas dessas reações são catalisadas por catalisadores químicos que podem ser substituídos por enzimas. As enzimas são moléculas capazes de acelerar os processos químicos com grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, principalmente por serem ecologicamente mais viáveis. A cada dia presenciam-se mais processos industriais que utilizam enzimas como catalisadores, dentre as quais se destacam enzimas na área de alimentos, saúde humana e animal e bens como papel e indústria têxtil (MONTEIRO; SILVA, 2009).

As enzimas provenientes de plantas vêm se caracterizando como uma promissora fonte de tratamento com foco no ecologicamente correto além de apresentar resultados na remoção de compostos orgânicos. Elas atuam no corante presente na água mesmo em moléculas grandes que os microrganismos não conseguem degradar, por isso a peroxidase foi escolhida para esta pesquisa (KUNZ; ZAMORA; MORAE e DURÁN, 2001).



A peroxidase da abobrinha mostrou-se eficiente na remoção de um tipo de corante têxtil que é comercializado por uma indústria de fabricação que atende grande e pequenos consumidores. Este corante 16 MARINHO Vivacor-Guarany é de grande uso popular e de fácil acesso o que levou o interesse de ser utilizado neste estudo, pois há despejo deste em esgotos domésticos.

A pesquisa realizada vem com intuito de contribuir com a preservação do meio ambiente com produtos que são de uso diário e doméstico com partes não utilizadas (como as cascas de verduras muitas vezes jogadas nos lixos). A ideia de se tratar efluentes coloridos com corantes provenientes dos tingimentos têxteis é muito interessante, já que isto poderia ser feito antes de tal fase aquosa fosse disposta diretamente em esgotos, rios, lagos.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia desenvolvida foi efetuada em dois anos. Toda a metodologia utilizada no presente estudo e suas adaptações segundo Silva (2011).

O corante usado no projeto é da marca vivacor- Guarany e o nome comercial é 16 MARINHO, abaixo algumas informações fornecidas pelo fabricante:

Mistura sólida de cloreto de sódio, corante ácido, sulfato de amônia, ácido cítrico e agente dispersante. Peso molecular médio: não disponível. Estado Físico: Sólido (Pó). pH : Não determinado. Ponto de fulgor: Não aplicável. Densidade aparente: Não determinado. Viscosidade à 25°C: Não determinado. Solubilidade em água (20°C): Solúvel. Não foram determinadas as proporções. A estrutura molecular não foi fornecida pelo fabricante.

2.1- Testes efetuados no primeiro ano de pesquisa

2.1.1 Comprimento de onda

Antes de se iniciar os testes foi realizada uma pesquisa para quantificar qual comprimento de onda mais próximo do corante 16 MARINHO. Quantificou-se que o comprimento de onda 420 nm mede as absorbâncias. No laboratório realizou-se o preparo de cinco misturas com concentrações diferentes de corante em balões volumétricos de 1000 mL, como observado no Quadro 1.



Quadro 1: Soluções de corantes em diferentes concentrações

Balão	Concentração do corante	Absorbância à 420 nm
1	250 mg/1000 mL	0,100
2	500 mg/1000 mL	0,277
3	1000 mg/1000 mL	0,441
4	1500 mg/1000 mL	0,754
5	2000 mg/1000 mL	0,943

Fonte: Autores, 2016.

Após esse preparo, no espectrofotômetro FEMTO 600 Plus, calibrado à 420 nm realizou-se a leitura das soluções do Quadro 1 e obtiveram-se os valores de absorbâncias descritos no Quadro 1. Os dados obtidos foram plotados em um gráfico para se avaliar a curva, caso fosse uma reta com coeficiente de correlação próximo a um, ter-se-ia um ajuste adequado e o comprimento de onda de 420 nm estaria correto. Este comportamento pode ser observado na Figura 1.

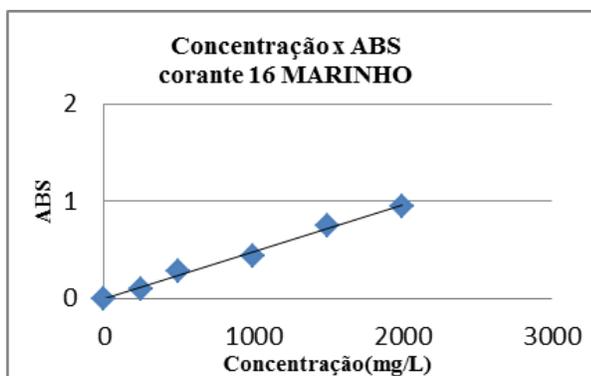


Figura 1: Avaliação do comportamento da reta em 420nm. Os valores são a média de duas repetições. **Fonte:** Autores, 2016.

Os dados obtidos pelo programa Excel forneceram o valor do coeficiente de correlação de 0,9931, próximo a 1, ou seja, validando o comprimento de onda, selecionado em 420 nm, dentro de uma faixa em que se encaixa o corante 16 MARINHO.

2.1.2 Testes de remoção de cor com o extrato enzimático



Para haver uma estabilidade de reação nas soluções foi preparado um tampão com o fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$). Pesou-se 1,5 g do sólido em um béquer de vidro de 250 mL e completou-se com água até a marca. O pH da solução foi ajustado com NaOH para 6,5.

100 mL da solução foi utilizada para homogeneizar 25g da casca abobrinha em um liquidificador, para obtenção do extrato enzimático.

Para avaliar a remoção de cor, uma solução padrão foi elaborada: Meio reacional contendo tampão fosfato de sódio 0,05 mol/L - pH 7,0 (1,6mL); 1,5mL do corante (2000 mg/l) 16 Marinho (Guarany-Vivacor) e 20 mL do extrato enzimático. Conduziu-se a reação em banho termostatizado a 30 °C por três horas. Acompanhou-se a remoção da cor a 420 nm.

Foi realizado o preparo do branco assim como o preparo de solução inicial sem a enzima, que forneceu uma absorbância inicial de 1. Os dados obtidos estão indicados no Quadro 2:

Quadro 2: Dados coletados no período de três horas, de remoção da cor:

BRANCO (Absorbância)	TEMPO (min)	ABSORBÂNCIA (Solução)
0,000	60	1
0,000	90	0,898
0,000	120	0,781
0,000	150	0,385
0,000	180	0,166

Fonte: Autores, 2016.

A partir da equação 1, obteve-se a porcentagem de remoção de cor de 83,14%

$$\% \text{ remoção: } ((\text{absorbância}_i - \text{absorbância}_f) / (\text{absorbância}_i)) \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ remoção } ((1 - 0,166) / 1) \times 100 = 83,4\%$$

Logo após foi realizado o preparo de mais 5 soluções, além da preparada anteriormente, dessa vez variando as concentrações e volumes dos reagentes. Realizou-se o mesmo cálculo anterior (equação 1), com os valores abaixo e novamente obteve-se a remoção de cor em diferentes soluções:

Quadro 3: Soluções para avaliar remoção da cor

Solução (500 mL)	Tampão pH 7,0 mL	Concentração de Corante (1,5mL)	Concentração de Peroxido (0,4 mL)	Solução enzimática (mesma concentração)	Abs. Inicial nm	Abs. Final nm	% Remoção da cor
1	1,2	250 mg/l	100 $\mu\text{mol/l}$	0,2 mL	0,011	0,0015	86
2	1,2	500 mg/l	200 $\mu\text{mol/l}$	2,0 mL	0,030	0,018	40
3	1,2	1000 mg/l	300 $\mu\text{mol/l}$	20 mL	0,055	0,033	40
4	1,2	1500 mg/l	400 $\mu\text{mol/l}$	25 mL	0,135	0,071	47
5	1,2	2000 mg/l	500 $\mu\text{mol/l}$	30 mL	0,225	0,051	77

Fonte: Autores, 2016.

3 – Testes realizados no segundo ano da pesquisa

3.1 -Preparação do extrato enzimático bruto

Segundo o método de SILVA, 2011; FATIBELLO; VIEIRA, 2002, a obtenção do extrato bruto (purificado) ocorre nas seguinte sequência: lavagem da abobrinha (*Curcubita Pepo*) em água corrente, extração da casca, após o processo de higienização, foram pesados 25 g e homogeneizados com 100 mL de tampão fosfato em um liquidificador, a solução foi filtrada com gaze. Após essa etapa foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. 10 mL da solução (Figura 2) foram armazenadas em sistema refrigerado à temperatura de -18°C durante 14 horas.



Figura 2: Solução enzimática pura. **Fonte:** Autores, 2017.

3.2- Avaliação da atividade enzimática

Para se avaliar a atividade da enzima foi realizado um meio de reação, segundo SILVA,2011 e KHAN; ROBINSON, 1994: 1,5 mL de guaiacol (97% v/v); 0,4 mL de H₂O₂ PA 0,3 % (v/v); 0,1 mL da solução de enzima mantida em banho de gelo; 1,2 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 6,5, Figura 3.



Figura 3: Solução com enzima e substrato. **Fonte:** Autores, 2017.

A solução foi mantida em um béquer de vidro no banho termostático a 30°C. Com espectrofotômetro foi medido a sua absorvância a 470 nm (SILVA, 2011 e KHAN; ROBINSON, 1994) durante 5 minutos, a cada minuto. Os dados de absorvância coletados estão dispostos no Quadro 3.



Quadro 3: Dados coletados durante 5 minutos, na avaliação da atividade enzimática depois de submetido à precipitação por acetona.

TEMPO (min)	ABSORBÂNCIA
0	0,4690
1	0,5713
2	0,3896
3	0,2470
4	0,1493
5	0,1143

Fonte: Dados experimentais.

3.3- Teste das proteínas

Para testar as proteínas na enzima foi selecionado um agente de teste, a acetona, o método foi baseado segundo SILVA, 2011. Foi adicionada acetona gelada (aproximadamente a 8°C) ao extrato bruto enzimático, aos 10 mL até atingir 65% de acetona (v/v). A mistura foi deixada em repouso por 14 horas a temperatura de -18°C, em um congelador. Depois de retirada do congelador foi mantida a temperatura ambiente até chegar a 4 °C.

Após essa etapa foi homogeneizado e colocado em uma centrífuga Excelsa Baby a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C (Figura 4). O sobrenadante foi recolhido e a acetona descartada. Para que toda acetona fosse retirada o precipitado foi submetido à remoção da acetona em banho de gelo por 3 horas (SILVA, 2011).

Após a remoção da acetona foi realizado a seguinte etapa com o sólido obtido: resuspensão em 10 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 6,5) , a suspensão obtida foi utilizada para determinação da atividade enzimática.



Figura 4: Solução para teste das proteínas. **Fonte:** Autores, 2017.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Remoção da cor

Foi possível notar por dados do espectrofotômetro que no período de tempo em que a enzima atuava sobre o corante (três horas), a porcentagem de remoção da cor aumenta com o tempo



(Figura 5), porém a partir de 180 minutos não houve mais um aumento e sim uma estagnação, esta chegou a atuar com uma remoção de até aproximadamente 83,4% no período avaliado.

Segundo Luíz (2009), a capacidade de adsorção e a eficiência de remoção de um adsorvato por um adsorvente aumentam quando o tempo de contato é prolongado. Em geral, a capacidade de adsorção aumenta com o tempo até atingir um valor constante, não havendo mais remoção de adsorvato da solução a partir desse momento.

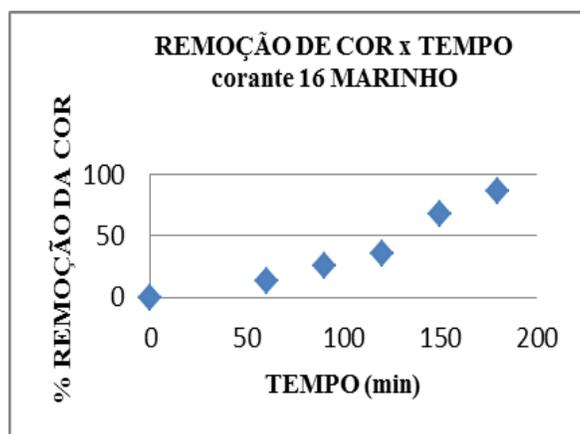


Figura 5: Remoção da cor em um período de três horas. Os valores são a média de duas repetições. **Fonte:** Autores, 2016.

Os dados obtidos pelo programa Excel forneceram um valor do coeficiente de correlação de 0,910312, no ajuste de uma equação.

4.2 - Efeitos da concentração de H_2O_2

A concentração de H_2O_2 é um dos parâmetros que devem ser otimizados para garantir a eficiência da técnica, uma vez que, em excesso, inibe a atividade da peroxidase e, quando em pequena quantidade, limita a taxa de reação (SILVA, 2011). As variações escolhidas neste estudo foram de 100 μmol a 500 μmol . A concentração em que se observou uma maior eficiência foi em 100 μmol como se observa na Figura 6.

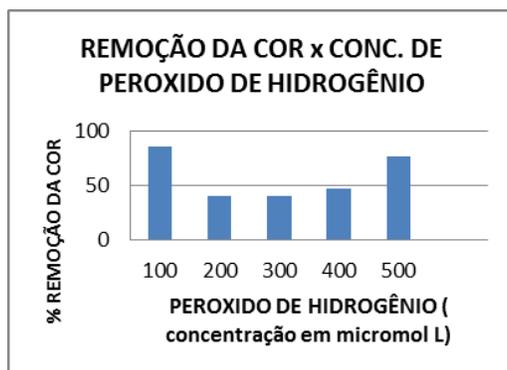


Figura 6: Efeito da concentração do H_2O_2 na descoloração do corante 16 MARINHO. Valores são a média de duas repetições. **Fonte:** Autores, 2016.

Pode se observar que com o aumento do peróxido 100 a 200 μmol a uma diminuição na eficiência da remoção da cor, porém quando analisado no intervalo de 300 a 500 μmol a um aumento na eficiência da remoção da cor.

4.3 - Avaliações da Remoção de Cor com Enzima e Peroxido nas Soluções 1, 2, 3,4 e 5

Nas soluções que foram preparadas para testes nesse experimento foi possível notar que no balão 1 observou-se uma boa remoção da cor com um aproveitamento de 86% e no balão 5 se obteve uma remoção da cor de 77 % ou seja, mais de setenta por cento de eficiência. No balão 1 a solução preparada foi a de menor concentração em relação ao corante 16 MARINHO e com o menor valor de volume do extrato enzimático. Segundo Souza, Forgiarini e Souza (2007), a concentração de corante removido é dependente da concentração de enzima utilizada.

Com a variação em volume e concentração dos demais reagentes foi possível observar valores distintos, e que não formaram uma linearidade, ou seja, em cada balão obteve-se um resultado. Porém nos balões 2 e 3 foi possível notar que a eficiência da remoção da cor foi igual com um resultado de 40%. Já no balão 4 obteve-se uma eficiência de 47%.

4.4- Avaliação do extrato bruto

A atividade da peroxidase pode ser determinada através do teste de guaiacol. Neste, a peroxidase reage com o peróxido de hidrogênio, libertando O_2 que, por sua vez oxida o guaiacol. A solução adquire uma cor marrom escuro (Figura 7) acusando a presença de enzimas ativas. Os valores de absorbância em função do tempo coletados foram plotados em um gráfico, como se pode observar.

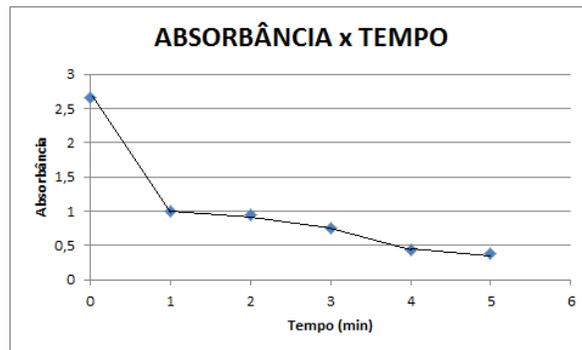


Figura 7: Gráfico da absorbância em função do tempo durante 5 minutos. **Fonte:** Autores, 2017.

A partir da observação gráfica é possível notar que ocorre uma diferença de absorbâncias do primeiro valor ao último valor. Isto faz com que se perceba a atividade enzimática juntamente com seu substrato, o guaiacol.

A identificação dos produtos da reação mostrando se houve ou não degradação do corante é muito relevante para verificar, a toxicidade após o tratamento. Segundo SILVA, 2011, o processo enzimático pode acarretar em aumento da toxicidade sendo assim deve ser combinado com métodos biológicos, para promover a degradação microbiana dos metabolitos formados. Portanto a pesquisa não se finaliza nesse estudo e outras quantificações são requeridas para identificar a qualidade do efluente tratado.

4.5 - Precipitação das proteínas

O agente precipitante mais eficiente em relação à peroxidase segundo SILVA, 2011 é a acetona, pois está consegue uma separação de até 94,48+/-0,62%. Sendo assim esta foi usada nesta parte da pesquisa.

A precipitação por acetona não necessita de dialise, o que reduz tempo e os custos do processo, contribui para obtenção da enzima, por meio de um processo simples e viável economicamente. É possível recuperar a acetona utilizada na precipitação por meio de uma destilação simples. A acetona auxilia na recuperação da atividade da enzima devido à purificação.

4.6- Avaliação da atividade enzimática

A avaliação da atividade enzimática foi realizada usando a solução citada na Secção 3.2, após o período de incubação, da solução enzimática por 14 horas a -18 °C e da precipitação por acetona. Nessa etapa a solução enzimática passou por todas as etapas citadas na Secção 3.3. A solução foi deixada em banho-maria e sua coloração mudou ao fim dos 5 minutos, como pode se observar na Figura 8.



Figura 8: Mudança de cor, após o tempo de avaliação. **Fonte:** Autores, 2017.

A atividade da peroxidase pode ser determinada através do teste de guaiacol, como já citado na Seção 3.2. Desta forma é possível observar pelos dados obtidos em espectrofotômetro que a enzima está ativa. Os dados coletados mostraram uma atividade enzimática no período de tempo avaliado, como se pode observar na Figura 9.

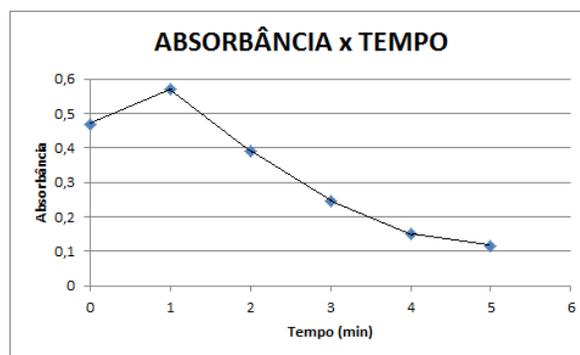


Figura 9: Gráfico da absorbância em função do tempo durante 5 minutos. **Fonte:** Autores, 2017.

A Figura 9 se compara a Figura 7, mostra uma semelhança diante o comportamento da curva, porém como se pode observar na Figura 9, a atividade enzimática se comporta diferentemente já que passou por todo o processo de tratamento e não contém resíduos que possam alterar sua eficiência. Segundo Hussain (2009), peroxidases podem catalisar a transformação de corantes aromáticos, tanto por precipitação como pela ruptura do anel aromático.

5-CONSIDERAÇÕES FINAIS

A peroxidase da abobrinha mostrou-se eficiente na remoção de um tipo de corante têxtil que é comercializado por uma indústria de fabricação que atende grande e pequenos consumidores. Este corante 16 MARINHO Vivacor-Guarany é de grande uso popular e de fácil acesso o que levou o interesse de ser utilizado neste estudo, pois há despejo deste em esgotos domésticos.

A pesquisa realizada vem com intuito de contribuir com a preservação do meio ambiente com produtos que são de uso diário e doméstico com partes não utilizadas (como as cascas de verduras muitas vezes jogadas nos lixos). A ideia de se tratar efluentes coloridos com corantes provenientes dos tingimentos têxteis é muito interessante, já que isto poderia ser feito antes de tal fase aquosa fosse disposta diretamente em esgotos, rios, lagos.



Na avaliação da atividade da enzima peroxidase, não foi possível obter a velocidade de reação e nem calcular sua atividade, já que os dados obtidos na pesquisa não foram suficientes para se obterem resultados mais abrangentes. Porém com o teste realizado em espectrofotômetro, foi possível observar a atuação da enzima, no consumo do substrato e no comportamento dos valores coletados. O consumo do substrato no tempo de cinco minutos foi suficiente para se observar a atividade da peroxidase. Esta se mostrou eficiente para ser utilizada na descoloração do corante utilizado neste trabalho.

A peroxidase mostrou-se muito eficiente na remoção da cor. Com uma solução colorida de concentração 250 mg/L (1,5 mL), e um volume do concentrado enzimático de 0,2 mL, obteve-se uma remoção de 86 %. Em relação ao comportamento da Figura 10, isso se explica, pois a eficiência enzimática medida desta forma, deve ocorrer de uma forma máxima mediante a variação da concentração enzimática. Se durante a cada intervalo de tempo a concentração do extrato enzimático for aumentado à remoção seria melhor. O uso de um cromatógrafo poderia identificar os produtos gerados na atuação da enzima o que se constitui em possibilidade de trabalho futuro.

O uso de enzimas no mundo tecnológico é cada vez mais estudado. Processos biotecnológicos têm ajudado à engenharia química a inovar de forma a proteger o meio ambiente. A temática desta pesquisa abre diversas linhas de pesquisa, que podem ser exploradas para que despejos de pequeno porte possam ser pré-tratados de forma socialmente e economicamente eficientes, contribuindo assim, com o desenvolvimento sustentável do processo industrial como um todo.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FATIBELLO FILHO, O.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.3, p.455-464, 2002.

HUSSAIN, Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Dordrecht, v.9, n.2, p. 117-140, 2009.

KHAN, A.A.; ROBINSON, D.S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, Oxford, v.49, n.4, p. 407-410, 1994.

KUNZ, A. ZAMORA, P.P. MORAES, S.G. e DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v.25, n.1, p.78-82, jun.2001.

LUÍZ, P. M. S. S. Remoção de cor em efluentes têxteis por adsorção em materiais inorgânicos de origem natural. Universidade do Porto- Faculdade de Engenharia. **Repositório aberto**.



Dissertação de Mestrado em Engenharia do ambiente. p.33.Porto , 2009. Disponível em : <
<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/59667/1/000130703.pdf>> . Acesso 23 nov 2017.

MONTEIRO, V.N; SILVA, R.N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Processos químicos. **Aplicações industriais da biotecnologia enzimática**. SENAI, Goiânia, v.3, n.5, ano 3, jan/jun 2009.

SILVA, C.M. Tese Degradação De Corantes E Remediação De Efluentes Têxteis Por Extrato Bruto De Peroxidase De Nabo. 2011.136 f. **Tese (Doutorado em Agroquímica e Agro bioquímica)**- Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2011.

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

VIANA, T.C. Corantes naturais na indústria têxtil como combinar experiências do passado com as demandas do futuro? 2012. **Dissertação de Mestrado-Universidade do Estado de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2012.