

# REMOÇÃO DE COR UTILIZANDO ENZIMA HORSERADISH PEROXIDASE E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A. R. PEREIRA<sup>1</sup>, L. YOKOYAMA<sup>2</sup>, E. M. ALHADEFF<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, doutorando.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ/Departamento de Processos Inorgânicos

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ/Departamento de Engenharia Bioquímica

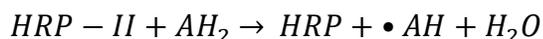
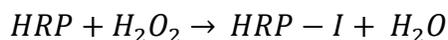
E-mail para contato: [andrerpereir@yahoo.com.br](mailto:andrerpereir@yahoo.com.br)

**RESUMO** – Este trabalho consiste em avaliar as melhores condições do processo enzimático de descoloração do azul de metileno, utilizando a ferramenta estatística, no estudo da reação entre a enzima *Horseradish peroxidase* (HRP) e o peróxido de hidrogênio. Foram realizados três delineamentos de dois níveis para a obtenção das condições ótimas da reação. A análise dos resultados possibilitou observar uma correlação inversa entre o percentual de remoção de cor e a concentração de peróxido de hidrogênio utilizada, isto é, um melhor desempenho na descoloração do azul de metileno ao se reduzir a concentração de peróxido até 5,0 mg/L. Foi verificado um percentual de descoloração de 23 % com uma concentração de peróxido de hidrogênio igual a 5 mg/L, atividade inicial da enzima igual a 20 U/mL no tratamento de 15 mg de corante/L em meio aquoso. O modelo matemático prevê, nestas condições, uma remoção máxima de 21,3%. Para nível de significância de 95% todos os efeitos e o modelo foram relevantes estatisticamente.

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos industriais têxteis possuem uma necessidade ímpar de tratamento de seus efluentes, pois cerca de 20 % da matéria-prima processada no tingimento de tecidos é perdida na forma de efluente (Barreto *et al.* 2011). Diversos processos oxidativos surgem para solucionar esta característica da indústria têxtil, dentre os processos estão os processos oxidativos utilizando enzimas.

A enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP) é capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio formando um composto intermediário (HRP-I) que ataca compostos aromáticos produzindo radicais e outro composto intermediário (HRP-II), também capaz de gerar radical, conforme modelo citado por Wu *et al.* (1997) e apresentado pelas três reações abaixo:



As principais variáveis que influenciam nas reações com a enzima HRP em qualquer processo enzimático são o pH do meio e a temperatura. O pH apresenta maior influência no grau de ionização dos grupamentos existentes na enzima ou até mesmo no seu centro catalítico; esta influência não se dá somente na enzima, mas o próprio substrato pode ser afetado pela concentração de íons  $H^+$ . Elliott (2005) afirma que em uma reação bioquímica, a temperatura pode atuar de duas formas distintas: favorecendo a cinética da reação (comprovado pela equação de Arrhenius) e, no caso particular de reações enzimáticas, existe um limite no qual a temperatura começa a ser prejudicial à reação, levando a desnaturação da enzima e, portanto, acarretando perda no poder catalítico da enzima Conn (1976).

O objetivo deste trabalho é avaliar as melhores condições do processo enzimático de descoloração do azul de metileno (AM), utilizando ferramenta estatística, no estudo da reação entre a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) e o peróxido de hidrogênio.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. A ENZIMA

A *Horseradish peroxidase* (HRP) utilizada neste trabalho foi cedida pela Toyobo do Brasil. A HRP é classificada como uma enzima oxirredutase, que na presença de peróxido de hidrogênio é capaz de gerar compostos reativos de oxigênio, classificados como oxidantes fortes apresentando potencial de oxidação de até 2,42 V, são capazes de oxidar várias substâncias orgânicas recalcitrantes (Gardingo, 2010).

### 2.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A partir dos melhores resultados de pH e temperatura na descoloração do corante azul de metileno (VETEC), obtidos pelos autores em trabalhos anteriores, foram realizados experimentos utilizando metodologia estatística aplicando planejamento experimental de dois níveis. A sequência de experimentos realizados visa identificar os efeitos da concentração do corante azul de metileno (AM), da concentração de peróxido de hidrogênio ( $[H_2O_2]$ ) e da atividade inicial da enzima (HRP) na remoção de cor do azul de metileno.

Foi realizado um total de três delineamentos de dois níveis para a obtenção das condições ótimas da reação. No primeiro e no segundo delineamento do planejamento experimental foram investigados somente os efeitos das variáveis independentes e suas respectivas importâncias estatísticas na faixa de estudo. No segundo e terceiro delineamentos, o planejamento foi realizado com apenas duas variáveis independentes, já que no primeiro delineamento a variável concentração de azul de metileno não foi significativa na faixa em estudo. No terceiro delineamento foi possível chegar à otimização do processo obtendo assim, superfície de resposta e respectivos efeitos utilizando o programa *Statística*®.

### 2.3. REAÇÕES ENZIMÁTICAS

As reações foram feitas em tubos de polipropileno com volume reacional de 20,0 mL em tampão de fosfato pH 5,0 e na temperatura de 30,0°C. O sistema reacional foi agitado a uma velocidade de 200 rpm em shaker “Nova Ética” modelo 430/RDBP e a reação tinha duração de 60 minutos. A remoção de cor foi determinada pela diminuição do pico da absorvância no comprimento de onda de 660nm, onde ocorre a maior absorção do azul de metileno. A leitura de absorvância foi realizada antes e após o término da reação, e a resposta da descoloração determinada em porcentagem de cor removida, calculada pela equação 1:

$$\text{Remoção de cor (\%)} = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Abs<sub>i</sub> = Absorvância a 660 nm medida no tempo t = 0 minutos.

Abs<sub>f</sub> = Absorvância a 660 nm medida no tempo t = 60 minutos.

Ensaio preliminares realizados pelos autores mostraram que: a partir de 40 mg/L de peróxido de hidrogênio, a enzima HRP é inibida conforme previsto pela literatura (Wu *et al.*, 1997; Bhunia *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006); a partir de 20 mg/L de corante o pico de 660nm não é mais proporcional a cor do corante azul de metileno. A Tabela 1 mostra as concentrações de cada delineamento

Tabela 1 – Níveis e concentrações dos delineamentos realizados na degradação do corante azul de metileno utilizando HRP e peróxido de hidrogênio

| Delineamentos         | Parâmetros                           | Níveis |      |      |      |       |
|-----------------------|--------------------------------------|--------|------|------|------|-------|
|                       |                                      | -1,44  | -1   | 0    | +1   | +1,44 |
| Primeiro delineamento | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) | -      | 10,0 | 25,0 | 40,0 | -     |
|                       | HRP (U/mL)                           | -      | 5,0  | 12,5 | 20,0 | -     |
|                       | AM (mg/L)                            | -      | 5,0  | 10,0 | 15,0 | -     |
| Segundo delineamento  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) | -      | 5,0  | 15,0 | 25,0 | -     |
|                       | HRP (U/mL)                           | -      | 20,0 | 35,0 | 50,0 | -     |
|                       | AM (mg/L)                            | -      | 15,0 | 15,0 | 15,0 | -     |
| Terceiro delineamento | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg/L) | 0,9    | 5,0  | 15,0 | 25,0 | 29,1  |
|                       | HRP (U/mL)                           | 1,9    | 5,0  | 12,5 | 20,0 | 23,1  |
|                       | AM (mg/L)                            | -      | 15,0 | 15,0 | 15,0 | -     |

Os cálculos das faixas de concentração foram realizados de forma que os pontos axiais do planejamento não fossem impossíveis, ou seja, que as concentrações e/ou atividade enzimática não fossem valores negativos. Para o primeiro delineamento, a concentração de corante igual a 20,0 mg/L foi escolhida como ponto axial do nível superior (+1,68) e para os demais

delineamentos, as faixas de estudo foram escolhidas a partir dos resultados gerados no primeiro delineamento.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PRIMEIRO DELINEAMENTO

A Figura 1 mostra a superfície gerada no primeiro delineamento para concentração de azul de metileno fixa em 15,0 mg/L. É possível observar que o peróxido de hidrogênio não tem influência na remoção de cor do azul de metileno na faixa estudada, já à atividade inicial da enzima fornece elevados valores de remoção de cor a partir de 17 U/mL, evidenciando a necessidade do aumento da atividade inicial da enzima. Na Tabela 2 onde se encontra os valores dos efeitos de cada variável e sua significância estatística para o intervalo de confiança de 95%, nota-se que o aumento da concentração de azul de metileno provoca uma queda de cerca de 1% na descoloração.

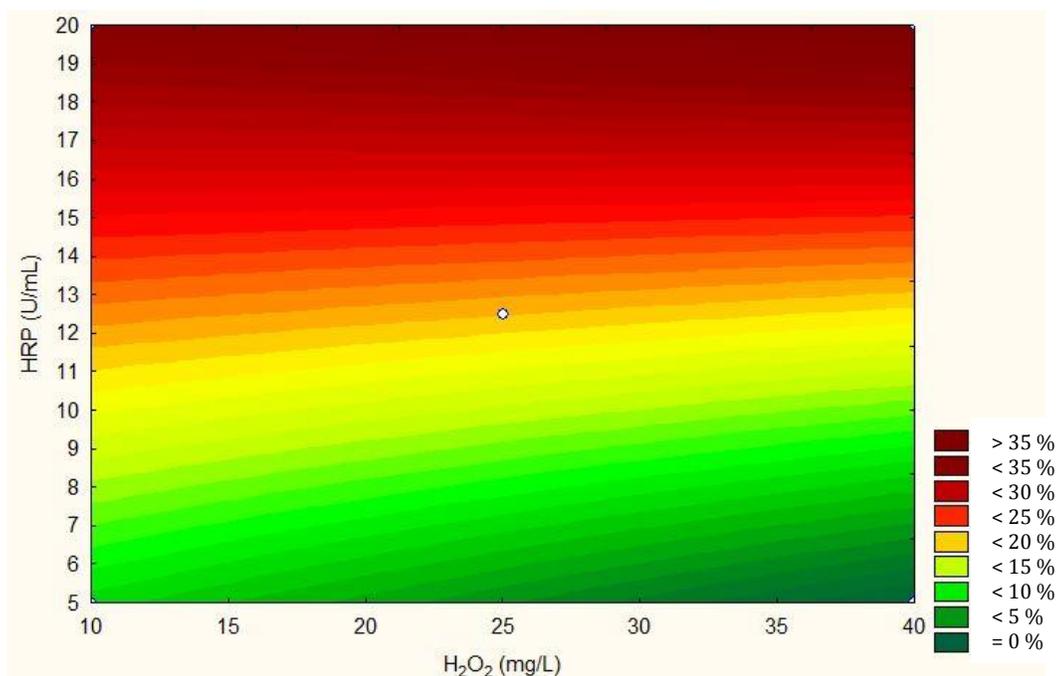


Figura 1 – Superfície gerada no primeiro delineamento com  $[H_2O_2] = 10,0$  mg/L a  $40,0$  mg/L;  $HRP = 5,0$  U/mL a  $20,0$  U/mL;  $[AM] = 15,0$  mg/L em  $pH = 5,0$  e temperatura igual a  $30,0^\circ C$ .

Tabela 2 – Efeitos das variáveis e significâncias estatísticas observados para o intervalo de confiança de 95%.

| Variável                      | Primeiro Delineamento |                           | Segundo Delineamento |                           | Terceiro Delineamento |                           |
|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
|                               | Efeito                | Significância Estatística | Efeito               | Significância Estatística | Efeito                | Significância Estatística |
| AM <sup>1</sup>               | -0,87%                | NSG                       | -                    | -                         | -                     | -                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | -4,2%                 | NSG                       | 4,7%                 | NSG                       | -2,4%                 | SG                        |
| HRP <sup>2</sup>              | 27,5%                 | SG                        | -8,7%                | SG                        | 8,0%                  | SG                        |

1 – Azul de Metileno

2 – Atividade inicial da enzima HRP

SG – Significativo

NSG – Não significativo

Na faixa de concentração estudada no primeiro delineamento é possível observar que tanto a variável azul de metileno quanto a variável peróxido de hidrogênio não são significativas, porém foi decidido pelos autores que a concentração do corante azul de metileno não seria variada para o segundo delineamento, já o peróxido de hidrogênio seria necessário variar sua concentração, pois constitui um substrato essencial para o efeito oxidativo da HRP (Nicell *et al.* 1997). A concentração de azul de metileno foi fixada em 15,0 mg/L para o segundo delineamento e a faixa de concentração de peróxido de hidrogênio foi alterada para concentrações que fornece melhores remoções de cor, que segundo o resultado numérico do efeito está numa faixa abaixo da estudada.

### 3.2. SEGUNDO DELINEAMENTO

A Figura 2 gerada no segundo delineamento mostra que a região de maior remoção de cor é a região de menores concentrações tanto de peróxido de hidrogênio como de atividade inicial de enzima HRP. Pode-se afirmar que a descoloração do azul de metileno passa por um ótimo, pois ao aumentar a concentração de peróxido de hidrogênio há um aumento na descoloração de azul de metileno, e ao aumentar à atividade inicial da enzima, a descoloração do azul de metileno diminui. Resultados opostos ao encontrado no primeiro delineamento, reforçando a afirmativa da passagem pelo ótimo da reação.

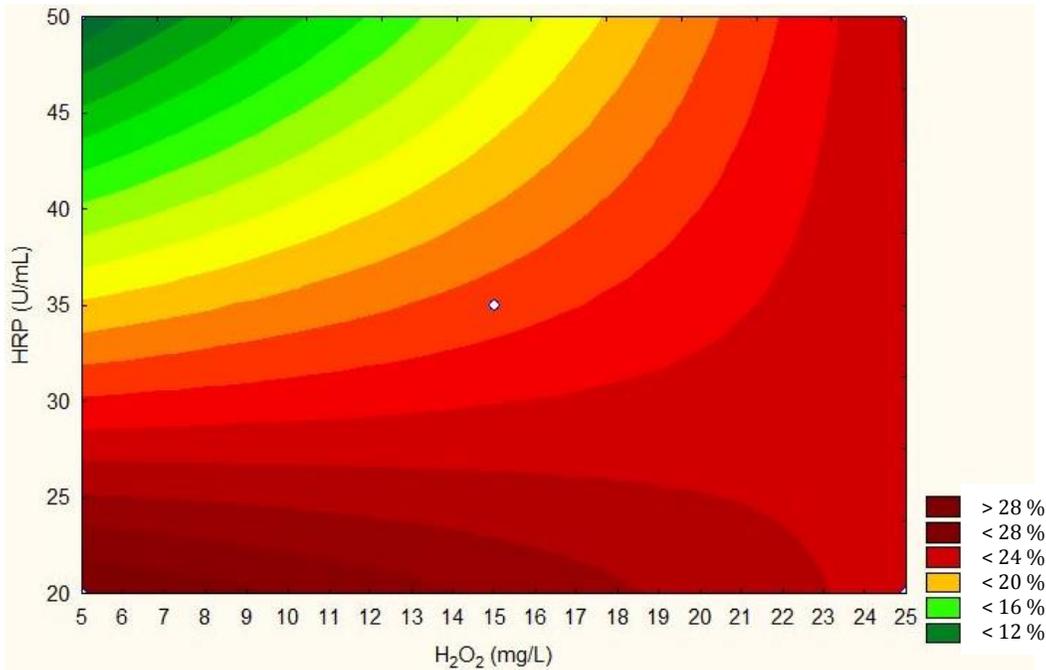


Figura 2 – Superfície gerada no segundo delineamento com  $[H_2O_2] = 5,0$  mg/L a  $25,0$  mg/L;  $HRP = 20,0$  U/mL a  $50,0$  U/mL;  $[AM] = 15,0$  mg/L em  $pH = 5,0$  e temperatura igual a  $30,0^\circ C$ .

O ponto ótimo da reação de descoloração do azul de metileno utilizando a enzima HRP e peróxido de hidrogênio está na faixa de concentração de peróxido de hidrogênio utilizada no segundo delineamento (5,0 a 25,0 mg/L) e na faixa de atividade inicial de enzima utilizada no primeiro delineamento (5,0 a 20,0 U/mL), formando assim a faixa a ser estudada no terceiro delineamento. Na Tabela 2 é possível observar que a concentração de peróxido de hidrogênio não é significativa para a faixa estudada neste segundo delineamento.

### 3.3. TERCEIRO DELINEAMENTO

O terceiro delineamento foi realizado com as faixas de concentração de peróxido de hidrogênio e atividade inicial de enzima definidas no primeiro e segundo delineamento. Os pontos axiais considerados neste terceiro delineamento possibilitaram avaliar os efeitos de interações entre as variáveis investigadas. A Figura 3 mostra a superfície gerada neste delineamento, com a curvatura sendo significativa para este intervalo. A Tabela 2 mostra que todas as interações são estatisticamente significativas, com isso é possível escrever a Equação 2, em termos codificados, gerada para a descoloração do azul de metileno. Para nível de significância de 95,0% foram significativos os efeitos das concentrações de peróxido de hidrogênio (- 2,4%), de enzima (8%), e as interações entre peróxido de hidrogênio e enzima (- 2,0%), e o efeito quadrático da enzima (2,1%). O  $R^2$  do modelo foi de 95,92% que se ajusta ao modelo quadrático.

$$\begin{aligned}
 &(\%) \text{ Remoção de cor} = \\
 &(0,07 - 0,024[H_2O_2] + 0,08[HRP] + 0,021[HRP]^2 - 0,017[H_2O_2][HRP]) * 100
 \end{aligned}$$

(Equação 2)

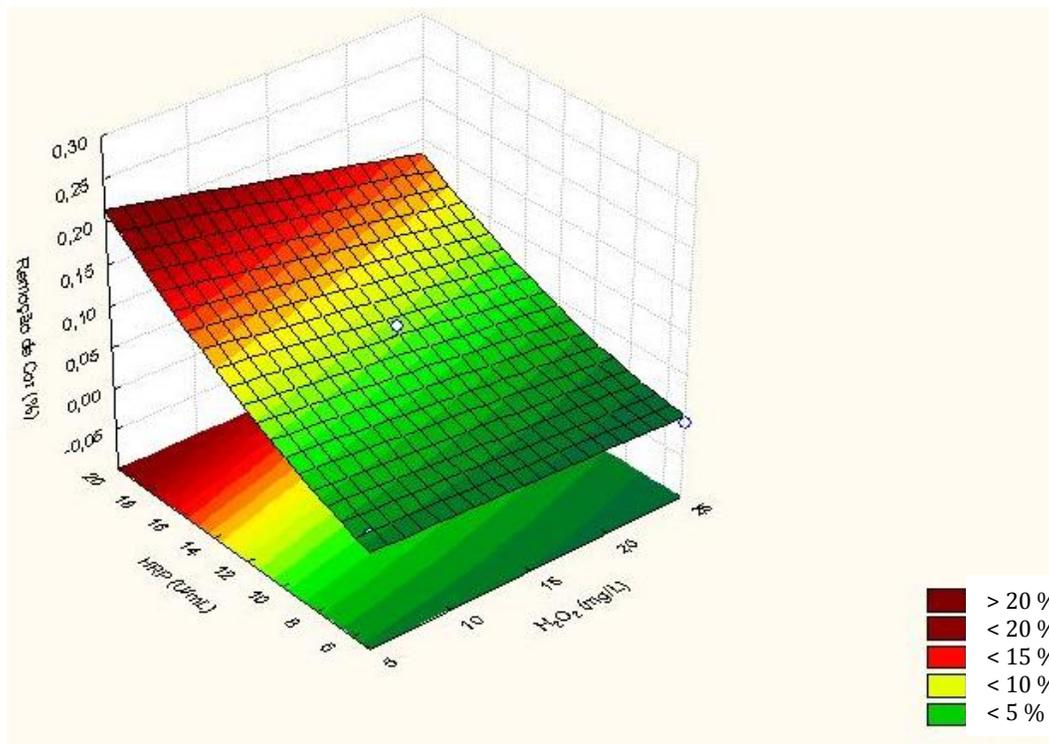


Figura 3 – Superfície gerada no terceiro delineamento com  $[H_2O_2] = 5,0 \text{ mg/L}$  a  $25,0 \text{ mg/L}$ ;  $HRP = 5,0 \text{ U/mL}$  a  $20,0 \text{ U/mL}$ ;  $[AM] = 15,0 \text{ mg/L}$  em  $\text{pH} = 5,0$  e temperatura igual a  $30,0^\circ\text{C}$ .

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

## 7. CONCLUSÃO

A remoção de cor do azul de metileno utilizando a enzima HRP e peróxido de hidrogênio foi de até 23,0 % com uma concentração de peróxido de hidrogênio igual a 5,0 mg/L e atividade inicial da enzima igual a 20,0 U/mL com a concentração de corante igual a 15,0 mg/L. O modelo matemático prevê uma remoção de 21,3% de cor com as mesmas proporções. Esta remoção de cor é a máxima prevista pelo modelo na faixa estudada.

## 6. REFERÊNCIAS

- BARRETO, W. J.; BERNARDINO, N. D.; AFONSO, R.; Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *ganoderma* sp: um estudo cinético - Química Nova, Vol. 34, No. 4, 568-572, 2011.
- BHUNIA A.; DURANI S.; WANGIKAR P.P.; Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Biotechnology Bioengineer 72 pag. 562 – 567, 2000.
- CONN, E. E.; STUMPF, P. K.; Introdução à Bioquímica. Editora Edgard Blücher LTDA, 1976
- ELLIOTT W. H.; ELLIOTT D. C.; Biochemisty and Molecular Biology. 3ª ed. OXFORD University Press, 2005.
- GARDINGO, M. F.; Tratamento de águas e efluentes contendo surfactantes através do sistema peróxido de hidrogênio. Dissertação de Mestrado, PUC-RJ 2010.
- KARIMINIA H.; YOUSEFI V.; Statistical analysis for enzymatic decolorization of acid orange 7 by *Coprinus cinereus* peroxidase. International Biodeterioration & Biodegradation 64, pag. 245-252, 2010
- LIU J.; WANG T.; JI L.; Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41 pag. 81–86, 2006
- NICELL J.A.; WRIGHT H.; A model of peroxidases activity with inhibition by hydrogen peroxide. Enzyme and Microbial Technology 21 pag. 302-310, 1997.
- PALVANNAN T.; KALAIARASAN E.; Removal of phenols from acidic environment by horseradish peroxidase (HRP): Aqueous thermostabilization of HRP by polysaccharide additives. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers 45, pag. 625–634, 2014
- WU, Y.; TAYLOR K. E.; BISWAS N.; BEWTRA J.K.; Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization. Water Research. Vol. 31 Issue 11, Pages 2699–2704, 1997.