

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
ENGENHARIA TÊXTIL

MARIANNA CHINI DE REZENDE

Lacase imobilizada na biodegradação de efluente e corante
têxtil

APUCARANA

2018

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
ENGENHARIA TÊXTIL

MARIANNA CHINI DE REZENDE

Lacase immobilizada na biodegradação de efluente e corante
têxtil

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia Têxtil.

Orientadora: Prof. Dr.^a Milena Martins
Andrade

APUCARANA

2018

Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Apucarana
COENT – Coordenação do curso superior em Engenharia Têxtil

TERMO DE APROVAÇÃO

Título do Trabalho de Conclusão de Curso:

Lacase imobilizada na biodegradação de efluente e corante têxtil

Por

MARIANNA CHINI DE REZENDE

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado aos onze dias do mês de junho do ano de dois mil e dezoito, às quatorze horas, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Engenharia Têxtil do curso de Engenharia Têxtil da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinado. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

PROFESSOR(A) MILENA MARTINS ANDRADE– ORIENTADOR

PROFESSOR (A) TAIS LARISSA DA SILVA – EXAMINADOR(A)

PROFESSOR(A) SILVANA FERNANDES MONTANHER – EXAMINADOR(A)

*A Folha de aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Milena Andrade pela paciência, ensinamentos e por acreditar na proposta deste TCC.

À Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker da Universidade Estadual de Londrina, por ter concedido gentilmente a lacase de *Botryospheria rhodina* MAMB-05 e o ABTS.

À banca examinadora Profa. Dra. Tais Larissa Silva e Profa. Dra. Silvana Fernandes Montanher pelos apontamentos.

Aos amigos feitos ao longo do curso por terem feito desta experiência mais alegre.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão desde o início do curso até o final.

À minha mãe e ao meu pai por acreditarem e confiarem em mim.

“Não somos apenas a soma das nossas escolhas, mas também das nossas renúncias. Crescer é tomar decisões e depois conviver em paz com a dúvida. ”

Martha Medeiros

REZENDE, Marianna Chini. **Lacase imobilizada na biodegradação de efluente e corante têxtil**. 2018. 55f. Bacharelado em Engenharia Têxtil. Universidade Tecnológica federal do Paraná, Apucarana. 2018.

RESUMO

As lacases são enzimas utilizadas nas indústrias, podendo ser utilizadas na biodegradação de efluentes têxteis, devido a sua capacidade de biotransformar diversos compostos fenólicos e amino aromáticos em compostos não tóxicos. Atualmente, os processos usados nos tratamentos de efluentes, utilizam-se de diversos reagentes e etapas, que muitas vezes são ineficientes, não degradando totalmente esses compostos e necessitando de descarte adequado. Foram feitos teste com efluentes gerados nos Laboratórios de Lavanderia e Tingimento da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana, e lacase de *Botryospheria rhodina* MAMB-05, imobilizada em Celite. Pelo planejamento fatorial 2^2 (7 experimentos) verificou-se que a melhor imobilização foi pelo experimento 1 (9°C e 43 min). O estudo obteve uma atividade enzimática de 2,5 U/g_{suporte}. Com a enzima imobilizada foi possível tratar o efluente têxtil em shaker a 150 rpm por 48 h. Após as 48 h, além da análise visual também foi feito espectroscopia UV-Vis. Conclui-se com este estudo que a degradação do corante pela lacase de *Botryospheria rhodina* MAMB-05 foi favorável em todos os experimentos, sendo o corante C.I. Disperse Red 60 com 50 % de descoloração em 5 h e o efluente escuro com 78 % de descoloração em 24 h.

Palavra-chave: Lacase, efluente têxtil, biodegradação, *Botryospheria rhodina* MAMB-05, celite, imobilização, C.I. Disperse Yellow 211, C.I. Disperse Red 60, C.I. Disperse Blue 60.

REZENDE, Marianna Chini. **Laccase immobilized in biodegradation of textile effluent and dye**. 2018. 55f. Graduated in Textile Engineering. Federal Technological University of Paraná, Apucarana. 2018.

ABSTRACT

Laccases are enzymes used in industries, can be used in the biodegradation of textile effluents due to their ability to biotransform several phenolic and amino aromatic compounds into non-toxic compounds. Presently, the processes used in effluent treatment use a variety of reagents and steps, which are often inefficient, do not completely degrade these compounds and require proper disposal. Tests were carried out with effluents generated in the Laundry and Dyeing Laboratories of the Federal Technological University of Paraná - Campus Apucarana, and laccase of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, immobilized in Celite. By factorial design 2^2 (7 experiments) it was checked that the best immobilization was by experiment 1 (9°C and 43 min), this obtained an enzymatic activity of 2.5 U/g_{support}. With the immobilized enzyme, it was possible to treat the textile effluent in shaker at 150 rpm for 48 h. After 48 hours beyond visual analysis, UV-Vis spectroscopy was also performed. It is concluded from this study that the degradation of the dye by the laccase of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was favorable in all experiments, with the CI Disperse Red 60 dye having 50 % discoloration in 5h and the dark effluent with 78 % discoloration in 24 h.

Key words: Laccase, textile effluent, biodegradation, *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, celite, immobilization, C.I. Disperse Yellow 211, C.I. Disperse Red 60, C.I. Disperse Blue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromóforo e auxocromo do corante vermelho GRLX-220.	15
Figura 2 - Grupo azo. Corante vermelho congo.	16
Figura 3 - Grupo antraquinona. Corante RB4.	17
Figura 4 - Estrutura da coordenação do cobre na molécula de Lacase.	20
Figura 5 - Tipos de imobilização.	22
Figura 6 - Clivagem assimétrica do corante Azo.	24
Figura 7 - Mecanismo de degradação do corante Congo Vermelho.	25
Figura 8 - Mecanismo de degradação do corante Remazol Brilhante Azul R.	26
Figura 9 - Gráfico de contorno do planejamento fatorial 2 ² na imobilização da lacase em Celite.	32
Figura 10 - Corante C.I. Disperse Yellow 211 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, sem tratamento.	33
Figura 11 - Corante C.I. Disperse Yellow 211 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05.	33
Figura 12 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Yellow 211 25 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	34
Figura 13 - Espectro de absorção UV-vis obtido para o corante C.I. Disperse Yellow 211 50 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	34
Figura 14 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Yellow 211 100 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	35
Figura 15 - Estrutura molecular do corante C.I. Disperse Yellow 211.	37
Figura 16 - Corante C.I. Disperse Red 60 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, sem tratamento.	37
Figura 17 - Corante C.I. Disperse Red 60 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05.	38
Figura 18 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Red 60 25 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	38
Figura 19 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Red 60 50 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	39
Figura 20 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Red 60 100 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	39
Figura 21 - Estrutura molecular do corante C.I. Disperse Red 60.	40
Figura 22 - Efluente azul nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, sem tratamento.	42
Figura 23 - Efluente azul nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05.	42

Figura 24 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente com corante C.I. Disperse Blue 60 25 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	43
Figura 25 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente com corante C.I. Disperse Blue 60 50 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	44
Figura 26 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente com corante C.I. Disperse Blue 60 100 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	44
Figura 27 - Estrutura molecular do corante C.I. Disperse Blue 60.	45
Figura 28 - Efluente escuro nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, sem tratamento.	46
Figura 29 - Efluente escuro nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 %, respectivamente, após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05.	46
Figura 30 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente escuro na concentração de 25 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	47
Figura 31 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente escuro na concentração de 50 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	47
Figura 32 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente escuro na concentração de 100 % antes e após tratamento com a lacase de Botryosphaeria rhodina MAMB-05 imobilizada em Celite.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^2 para avaliação da imobilização de lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 em Celite.	27
Tabela 2 - Respostas obtidas no planejamento fatorial para avaliação da imobilização da lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 em Celite.....	30
Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para imobilização da lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 em Celite.....	31
Tabela 4 - Porcentagem de descoloração do corante C.I. Disperse Yellow 211 após tratamento com lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 imobilizada em Celite...	36
Tabela 5 - Porcentagem de descoloração do corante C.I. Disperse Red 60 após tratamento com lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 imobilizada em Celite...	41
Tabela 6 - Porcentagem de descoloração do corante C.I. Disperse Blue 60 após tratamento com lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 imobilizada em Celite...	45
Tabela 7 - Porcentagem de descoloração do efluente escuro após tratamento com lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 imobilizada em Celite.	49

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Efluentes têxteis	14
3.2 Corantes	15
3.2.1 Corante azoico	16
3.2.2 Corante antraquinona	17
3.3 Tratamento de efluentes com enzimas	18
3.4 Lacases	18
3.4.1 Propriedades e Mecanismo	19
3.4.2 <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05.....	21
3.4.3 Imobilização de enzimas	21
3.5 Celite 545[®]	23
3.6 Mecanismo de degradação dos corantes	23
3.6.1 Mecanismo de degradação corante azo.....	24
3.6.2 Mecanismo de degradação corante antraquinona.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Materiais	27
4.2 Métodos	27
4.2.1 Imobilização da lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 em Celite.....	27
4.2.2 Determinação da atividade de lacase livre e imobilizada	28
4.2.3 Preparo das soluções de corantes e efluentes.....	29
4.2.4 Aplicação da lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 no tratamento de efluente têxtil	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
5.1 Imobilização da lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 em Celite	30
5.2 Tratamento do efluente e corante com a lacase de <i>Botryosphaeria rhodina</i> MAMB-05 imobilizada em Celite.....	32
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A indústria têxtil apresenta elevado volume de descarte de efluentes, provenientes, principalmente, dos processos de lavadeira e tingimento. Em ambos os processos há presença de corantes, sendo os mais utilizados do grupo azo e antraquinona (BURKINSHAW, 2016), que contaminam o meio ambiente, causando principalmente a mudança de coloração dos rios. Sendo assim faz-se necessário o tratamento correto para esses efluentes. Alguns dos tratamentos praticados são caros ou utilizam produtos químicos que podem gerar outros tipos de resíduos industriais, como os polieletrólitos, que são polímeros de cadeias longas que quando adicionado água apresentam elevado número de cargas positivas ou negativas, amônia e outros (GUARATINI, 2000).

Desta forma, se faz necessário um processo em que todas as partes constituintes do efluente sejam degradadas ao final do processo de tratamento. Estudos estão sendo realizados para que processos de biodegradação sejam mais utilizados e mais acessíveis às indústrias (GUARATINI, 2000).

Alguns destes processos podem ser feitos com enzimas que são catalisadores naturais. A lacase, por exemplo, consegue fazer a degradação de algumas classes de corantes.

As lacases são enzimas com 4 átomos de cobre do grupo azuis oxidases (DESAI; NITYANAND, 2011) oriundas de fungos ou plantas, que catalisam a oxidação de compostos fenólicos e aminas aromáticas. A oxidação ocorre pela retirada do elétron do composto fenólico que gera um radical fenoxila (MENEZES; BARRETO, 2015).

A biotransformação destes compostos corantes pode ser feita por ruptura do anel aromático e precipitação, deixando-os inofensivos ou com maior biodegradabilidade para o meio (HUSAIN, 2010).

A lacase pode ser produzida por fungos, como o *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, um fungo ascomiceto lignolítico, responsável pela degradação da lignina (DEKKER *et al.*, 2007).

A lacase do *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, imobilizada em Celite, um pó cerâmico muito utilizado para análises químicas, como agente absorvente e clarificante (LABSYNTH, 2017), pode ser utilizada no tratamento de efluentes têxteis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Imobilizar a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Celite e aplicar na biodegradação de efluente e corante têxtil.

2.2 Objetivos Específicos

- Imobilizar a enzima em Celite com auxílio de planejamento fatorial;
- Aplicar a enzima imobilizada na biodegradação de efluente e corante têxtil das classes azo e antraquinona;
- Monitorar a biodegradação do efluente e do corante por espectroscopia UV-Vis no visível.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Efluentes têxteis

Os efluentes têxteis são em sua grande maioria gerados pelos setores de beneficiamento, em especial a lavanderia e o tingimento. Nestes processos os têxteis, sejam peças prontas, tecidos, malhas ou fios, recebem algum tipo de acabamento e embelezamento, como a cor. Para a obtenção de uma cor uniforme, com boa solidez e brilho são utilizados corantes (GUARATINI, 2000).

Os corantes e outros agentes químicos utilizados nesses processos são prejudiciais ao meio ambiente, pois além de alterar a cor dos receptores de água, podem afetar a saúde dos meios ao seu redor, como a fauna, a flora e os seres humanos. Os riscos toxicológicos podem ser brandos ou mais graves de acordo com o tempo de exposição, ingestão, sensibilidade a pele e as vias respiratórias (GUARATINI, 2000).

Os corantes mais utilizados são os do grupo azo (-N=N-), antraquinona (contém quinonas, substâncias orgânicas coloridas e semivoláteis, onipresentes na natureza, apresentam grupamentos carbonilas em um anel insaturados) e ftalocianinas (contém metais). Muitos desses corantes e dos produtos utilizados para a sua degradação são tóxicos e mutagênicos (SANTOS *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2016).

Muitas técnicas estão sendo utilizadas para o tratamento destes efluentes, como por exemplo, técnicas de adsorção com carvão ativado, coagulação, ultrafiltração e osmose reversa, porém, essas técnicas podem ser mais dispendiosas do que os processos biológicos, além de necessitarem de um tratamento para os sólidos gerado. (AMORIM *et al.*, 2009).

Os corantes sintéticos são em sua maioria xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo humano), e os sistemas naturais não contém as enzimas necessárias para a degradação destes corantes em condições aeróbicas (presença de ar). E em condições anaeróbicas (ausência de ar) são degradadas muito lentamente (GUARATINI, 2000).

A utilização de enzimas na biodegradação dos efluentes é uma alternativa de elevado potencial, já que estas atuam em ampla faixa de concentração, pH, temperatura, ausência de aclimatação e fácil controle

(SILVA *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Kunz (2002), apresenta a utilização de enzimas em tratamentos de efluentes para a degradação de azo corantes.

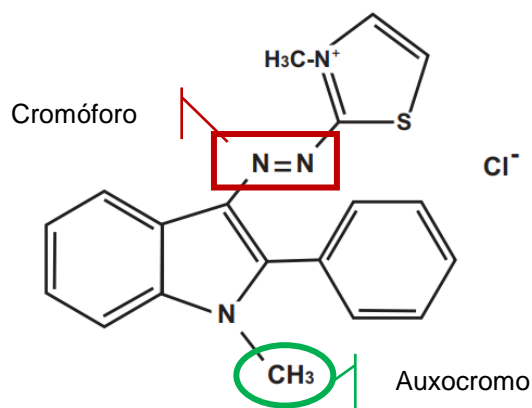
A biodegração também pode ser feita por meio de precipitação ou transformação em outros produtos inofensivos ao meio, podendo mudar as características do substrato tornando-o mais degradável (SILVA *et al.*, 2012). As enzimas podem fazer a biodegradação por meio de processo oxidativo, hidrólise, conjugação e redução (GUARATINI, 2000).

3.2 Corantes

Para cada tipo de fibra e aplicação há praticamente uma classe de corante a ser empregado, por essa razão existem diversos tipos de corantes no mercado. Os corantes podem ser classificados, pelo modo de fixação (direto, reativo, ácidos, básico, cuba, enxofre, dispersos, pré-metalizados) ou pela sua estrutura química (antraquinona, azo, etc) (GUARATINI, 2000).

Nos corantes a parte responsável pela cor é o grupo cromóforo, que pode ser azo ou antraquinona (anéis de benzeno). Já o grupo auxocromo, grupos funcionais, presentes na molécula são responsáveis pela intensidade da cor. A Figura 1 apresenta o auxocromo e o cromóforo de um corante (BURKINSHAW, 2016).

Figura 1 - Cromóforo e auxocromo do corante vermelho GRLX-220.



Fonte: Adaptado. SANTOS *et al.* (2011).

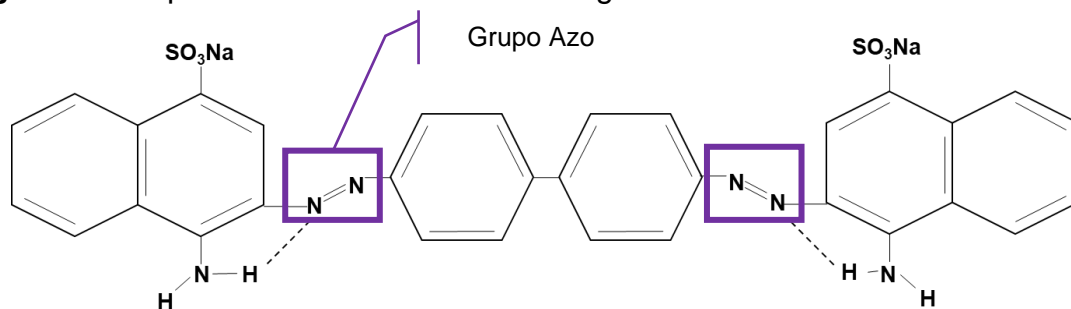
Além dos grupos cromóforos presentes nos corantes, há também grupos funcionais como $-SO_3$, $-Na$, $-Cl$, $-NH_2$, $-CH_3$. Estes são responsáveis por

auxiliar na fixação do corante no têxtil, por exemplo. Os grupos funcionais também ajudam na interação com as enzimas que serão utilizadas em sua degradação (KUNZ *et al.*, 2002).

3.2.1 Corante azoico

Os corantes azoicos são amplamente utilizados na indústria têxtil, alimentícia, de curtume, de papel e de cosméticos. Este grupo apresenta ligação tipo azo (-N=N-) (AMORIM *et al.*, 2009). A Figura 2 mostra o grupo azo de um corante.

Figura 2 - Grupo azo. Corante vermelho congo.



Fonte: Adaptado, GUARATINI (2000).

Muitos dos corantes diretos, reativos e ácidos apresentam grupos azo em suas moléculas. Os corantes reativos são empregados no tingimento de fibras naturais, como algodão, lã e seda e em fibras químicas como poliamidas. Os corantes ácidos também são utilizados para tingimento em fibras de lã (CHEQUER, 2008). Os corantes diretos são muito empregados no tingimento de fibras celulósicas como o algodão (GUARATINI, 2000).

Esse grupo funcional, assim como, as aminas aromáticas, que são metabólicos da clivagem redutiva das ligações azo, são cancerígenos (AMORIM *et al.*, 2009). Os efeitos carcinogênicos, tóxicos e mutagênicos podem ser gerados na biotransformação redutiva da ligação azo. Algumas destas biotransformações podem ser feitas por enzimas presentes no intestino e fígados humanos, por exemplo, como as azoredutases (CHEQUER, 2008).

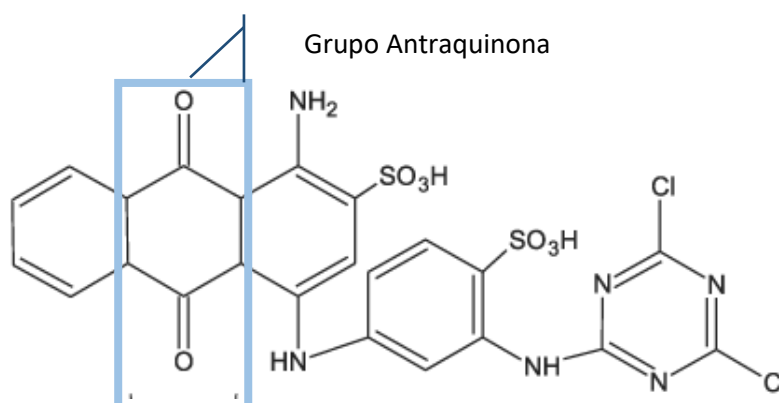
Os corantes do tipo azo possuem elevada resistência a processos de biodegradação aeróbios, devido ao elétron retirado da ligação azo (CHEQUER,

2008) porém apresentam menor resistência à processos de degradação físico-químicos (SOUZA; PERALTA-ZAMORA, 2006), como adsorção com carvão ativado, coagulação/floculação e POAs (processos oxidativos avançados). (ARAUJO *et al.*, 2006).

3.2.2 Corante antraquinona

O grupo antraquinona é formado por seis carbonos e dois oxigênios. O composto icônico é a alizarina (1,2-di-hidroxi-antraquinona). O grupo antraquinona pode ser reduzido a hidroquinona, que leva a descoloração de algumas soluções. A Figura 3 mostra o grupo antraquinona de um corante (BERGAMINI *et al.*, 2005; ZUCCA, 2015).

Figura 3 - Grupo antraquinona. Corante RB4.



Fonte: Adaptado, BERGAMINI *et al.* (2005).

A hidroquinona, redução do grupo antraquinona, é um dos principais agentes no tratamento de despigmentação da pele, porém quando oxidada se transforma em quinona, não possuindo a mesma propriedade (SILVA; LIMA, 2005).

Corantes do tipo reativo, ácido, à cuba, possuem grupos antraquinona. Os corantes reativos são empregados no tingimento de fibras de algodão, fibras de lã, seda, fibras de poliamida. O corante ácido é muito utilizado em tingimento de fibras de lã. Os corantes à cuba são muito utilizados em tingimentos de fibras celulósicas, principalmente para fabricação do jeans (GUARATINI, 2000).

Os corantes com grupos antraquinona além de serem utilizados na indústria têxtil também são utilizados em combustíveis como em processos de marcação e/ou como aditivos a biocombustíveis (ROVEDA, 2015).

3.3 Tratamento de efluentes com enzimas

O uso de enzimas em tratamentos de poluentes específicos está cada vez mais se difundindo, seja para modificar as características dos rejeitos afim de torna-los mais biodegradáveis, seja para remover ou transformar os compostos em produtos inócuos (SILVA *et al.*, 2012).

Enzimas como peroxidases, oxirredutases, polifenoloxidasas e lacases conseguem tratar diversos efluentes com alta variedade de compostos orgânicos, como corantes. Estas enzimas podem romper os anéis aromáticos presentes nos corantes ou podem precipita-los (SILVA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012). Enzimas que degradam a lignina têm elevado potencial para degradação de compostos químicos e corantes, além de conseguirem recuperar ambientes contaminados (SOUZA; ROSADO, 2009).

As vantagens de se trabalhar com enzimas no tratamento de efluentes são a capacidade de trabalhar em ampla faixa de concentração de pH, de contaminantes, de salinidade, de temperatura, não há necessidade de aclimação, o que facilita o controle do processo. Outra vantagem é a abundância de enzimas e de produtores encontradas no meio ambiente (SILVA *et al.*, 2010).

Um dos empecilhos de fazer os tratamentos de efluente com enzimas é o alto custo com a produção destas enzimas, que são biocatalisadores, e o baixo rendimento. Mas muitos estudos estão sendo realizados para produção das enzimas serem mais baratas e produtivas (SILVA *et al.*, 2012).

3.4 Lacases

As lacases são enzimas (benzenodiol oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) produzidas por fungos, plantas e bactérias e classificadas como oxidoredutores pela *Enzyme Commission* (EC) (CHRISTOPHER *et al.*, 2014) que catalisam a oxidação de compostos fenólicos e aminas aromáticas

(MENEZES; BARRETO, 2015), ou seja, aceleram a remoção de prótons e/ou aquisição elétrons desses grupos (GEISE *et al.*, 2004), a utilização de mediadores como o ABTS pode ampliar sua especificidade (DESAI; NITYANAND, 2011).

A produção de lacase pode ser induzida, em alguns fungos, por choque térmico, anilinas e ácidos metoxifenolucos. A lacase também pode ser encontrada em bactérias como *S. lavendilce*, *Marinomonas mediterrânea*, em fungos como *Botryosphaeria sp.*, *Phlebia radiate*, *Trametes versicolou*, e em plantas, por exemplo (SHRADDAHA *et al.*, 2011).

As lacases possuem um potencial de redução entre 450 e 800 mV. Elas atuam em uma grande variedade de substâncias como difenóis, polifenóis, benzenos, aminas aromáticas e em alguns componentes inorgânicos, como o iodo (DESAI; NITYANAND, 2011).

Na indústria, as lacases são aplicadas em diversos segmentos, como na degradação de corantes têxteis, no branqueamento e bioremediação de polpas celulósicas, na produção de etanol, como estabilizantes no processo de mosto e vinho, como agente de descoloração e na remoção de compostos fenólicos e aromáticos dos resíduos líquidos (LEONOWICZ *et al.*, 2001; DESAI; NITYANAND, 2011; MENEZES; BARRETO, 2015).

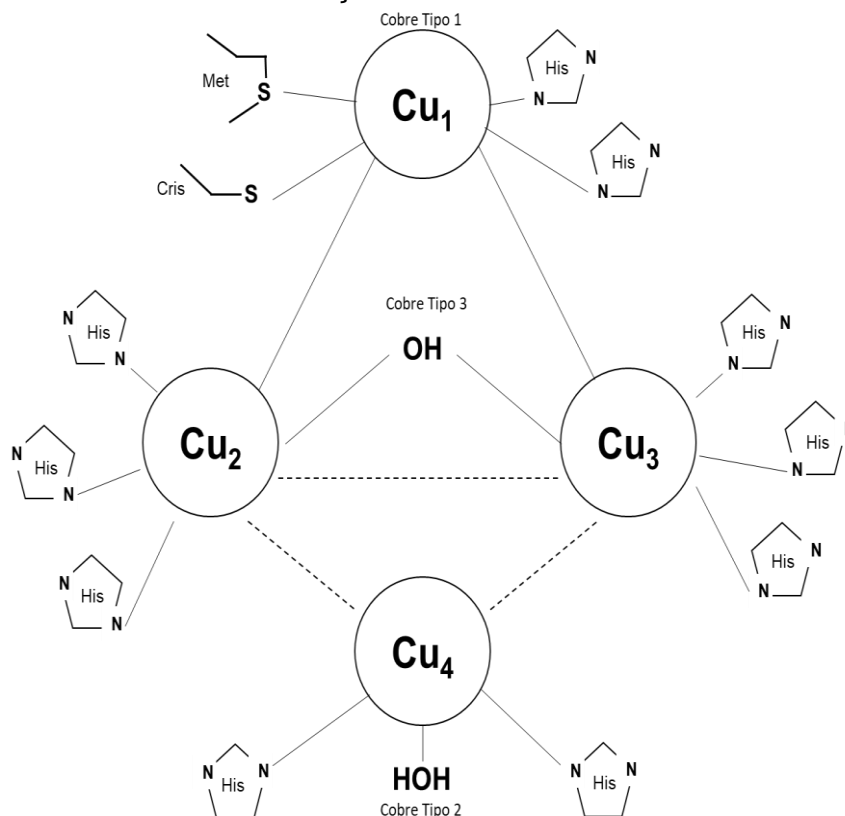
3.4.1 Propriedades e Mecanismo

A lacase possui quatro átomos de cobre (Cu), em estado de oxidação 2^+ (LEONOWICZ *et al.*, 2001), que são classificados em tipo 1, tipo 2 e tipo 3, de acordo com suas propriedades magnéticas e espectroscópicas, estes cobres são coordenados com aminoácidos, unidade fundamental na formação de proteínas (CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

O tipo 1, está coordenado com uma metionina, uma cisteína e duas histidinas, a intensa absorção eletrônica entre o cobre e a cisteína dá a coloração azul, neste cobre ocorre a oxidação do substrato e redução da lacase. O tipo 2, está coordenado com duas histidinas e uma molécula de água (H_2O), não confere cor e é responsável por receber elétrons. O tipo 3, está coordenado com três histidinas, acopladas por meio de uma ponte de ligação hidroxila, este tipo é responsável por receber dois elétrons. Todos os tipos são

detectáveis por RPE (Ressonância Paramagnética Eletrônica). A Figura 4 representa a coordenação dos cobres na lacase (DESAI; NITYANAND, 2011; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

Figura 4 - Estrutura da coordenação do cobre na molécula de Lacase.



Fonte: Adaptada, CHRISTOPHER *et al.* (2014).

O mecanismo de catálise acontece quando o substrato perde elétrons através do tipo 1, este elétron é depois transferido para o centro trinuclear formado pelos cobres tipo 2 e 3, gerando um sítio ativo atraindo os elétrons ocasionando a redução do oxigênio (O₂) em água (H₂O). A redução ocorrida nos cobres tipo 2 e 3 ajudam na estabilização enzimática (CHRISTOPHER *et al.*, 2014; DESAI; NITYANAND, 2011).

O oxigênio (O₂) se liga ao centro tri-nuclear por ativação assimétrica, que restringe a ação de outros agentes oxidantes, deixando somente o oxigênio (O₂) nesse papel (DESAI; NITYANAND, 2011). Sharaddha (2011), afirma que a lacase armazena elétrons das reações de oxidação individuais para reduzir o oxigênio molecular.

Íons de metal como Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} inibem a ação da lacase pois, modificam a estrutura da enzima (CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

3.4.2 *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05

Fungos da família *Botryosphaeriaceae* são estudados desde 1995 por Barbosa e colaboradores que isolaram o ascomiceto *Botryosphaeria* sp. (MAMB-05) de cancro de eucalipto (BARBOSA *et al.*, 1996). Nove isolados do gênero *Botryosphaeria* foram cultivados separadamente em óleos vegetais (soja, oliva, girassol, milho, canola, babaçu, gergelim e algodão), e em glicerol, em condição de fermentação submersa, para selecionar o melhor produtor de enzimas como lacases e lipases. *B. rhodina* MAMB-05 teve destaque como produtor de lacase em todos os óleos avaliados (MESSIAS, 2008).

O *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 é um fungo ascomiceto lignolítico, que degrada a lignina e produz lacase (DEKKER *et al.*, 2007). A produção de lacase aumenta na presença do álcool veratrílico e também auxilia na regulação das enzimas que degradam a lignina. Além do álcool, a produção de lacase pode aumentar com a adição de surfactantes não iônicos, como o Tween-20 e o Tween-80 (GIESE *et al.*, 2004).

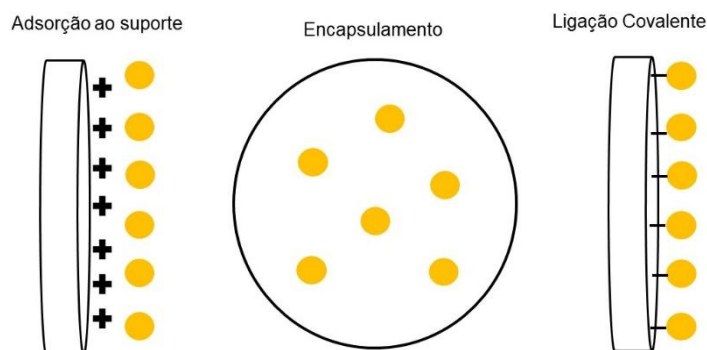
O *Botryosphaeria* produz dimetoxifenol, que é uma enzima oxidativa, sendo a verdadeira lacase (SHRADDHA *et al.*, 2011).

3.4.3 Imobilização de enzimas

A realização da imobilização da enzima, faz com que está se torne mais resistente às mudanças do meio, tornando possível sua reutilização e facilitando sua recuperação (DESAI; NITYANAND, 2011). Castro *et al.* (2008) afirmam que as vantagens de se ter uma enzima imobilizada é operar de forma contínua, e assim, possuir melhor controle da reação, reduzir o volume de reação (alta atividade por unidade de volume), aproveitar a atividade catalítica por mais tempo, facilitar a separação do produto e do catalisador da reação e também interromper facilmente a reação.

A imobilização pode ser feita de várias formas, dentre elas pode-se citar: adsorção ao suporte, reticulação, encapsulamento e ligação covalente a uma matriz ativada, como ilustrado na Figura 5 (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Figura 5 - Tipos de imobilização.



Fonte: Adaptado, SOUZA *et al.* (2017).

No processo de adsorção, o mais comum, a imobilização ocorre pelo simples contato da enzima ao suporte por um tempo, pH e temperatura determinados. A enzima é imobilizada no suporte por ligações fracas, como as interações de *Van der Waals*. A escolha do suporte depende da aplicação industrial, das propriedades químicas e físicas necessárias para a aplicação. A eficiência da adsorção está relacionada ao tamanho da proteína a ser adsorvida, da natureza e porosidade do suporte e da concentração de enzima no processo (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

No método de encapsulamento, a enzima é micro encapsulada ou inserida em um polímero insolúvel. As matrizes mais utilizadas no encapsulamento são géis e polímeros sendo, o inconveniente deste método a não dispersão total das moléculas de enzimas pelas membranas das cápsulas (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

O método de ligação covalente a uma matriz ativada é um processo químico, que acontece pela interação com aminoácidos específicos, que evidencia as estruturas proteicas como sítios ativos, alterando e melhorando as propriedades nativas da enzima, além de acrescentar novas funções a elas. Esse método pode ser feito de algumas maneiras, como fixação da enzima a uma matriz por ligações covalentes ou modificação de resíduos de aminoácidos, acoplamento covalente da enzima a materiais insolúveis em

água, ou formação de matriz enzimática reticulada usando reagentes bifuncionais (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Assim como há diversas formas de imobilização também é possível imobilizar a enzima em diversos suportes que de acordo com a aplicação e características destes oferecem maior eficácia na imobilização e utilização da enzima, como a quitosana (PACHECO; SOARES, 2013), a polianilina (PANI) (GARCIA, 2006), fibras naturais lignocelulósicas (LACERDA, 2015), grafeno (BROILO *et al.*, 2014), agarose é um polissacarídeo extraído de algumas algas, fibra de coco verde (BEZERRA; BASSAN; MONTI, 2017), argila, celite, pedras pomes, metais, vidros, celulose, amido, colágeno, seda, poliamidas (TREVISAN, 1993).

3.5 Celite 545[®]

O celite é composto por dois átomos de oxigênio e um de silício (SiO_2 – dióxido de silício), encontrada em abundância na natureza em forma de rochas e minerais, como o quartzo (QUIMICA NET, 2010). É um pó branco e inodoro, com pH 10 e quase insolúvel em água (QUEEL, 2010), sendo muito utilizado em análises químicas, como agente adsorvente e clarificante (LABSYNTH, 2017).

Na imobilização com Celite 545[®] o processo é feito por adsorção física, que consiste na atração da lacase pela superfície do Celite 545[®], devido a ligações de baixa intensidade como as de *Van der Waals* (CASTRO *et al.*, 2008). No processo de adsorção a imobilização ocorre pelo simples contato da enzima ao suporte por um tempo, pH e temperatura determinados (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

O celite pode ser utilizado para imobilização de diversas enzimas. Silva, Bruno e Castro (2009) utilizaram celite como suporte para imobilização de lipase. Contesini (2009) realizou um estudo imobilizando glicosiltransferase, enzima que catalisa a conversão da sacarose em isomaltulose, em celite.

3.6 Mecanismo de degradação dos corantes pela lacase

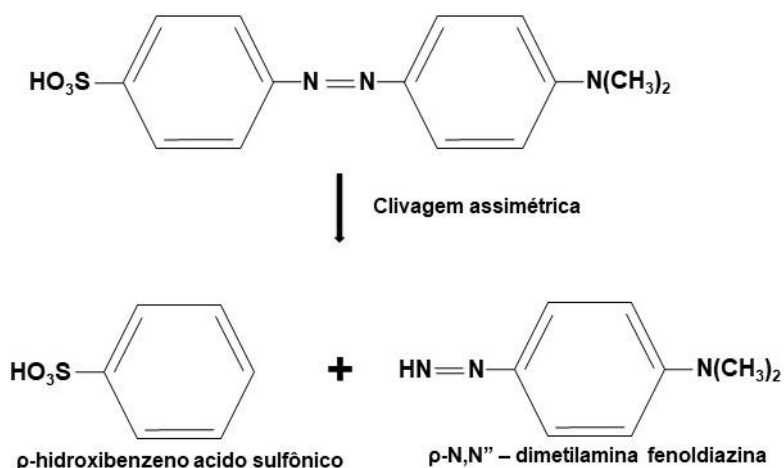
Nesta seção serão apresentados os mecanismos de degradação do corante azo e antraquinona pela lacase.

3.6.1 Mecanismo de degradação corante azo

Os corantes azo são formados por sal de diazônio com aminas ou fenóis ou naftol. Os grupamentos azo são substituídos por benzeno ou naftaleno que contem diferentes grupos funcionais (LEGERSKA *et al.*, 2016).

A degradação começa com clivagem assimétrica (Figura 6) do grupo azo seguido da clivagem oxidativa, desulfonação, desaminação, desmetilação e hidroxilação (LEGERSKA *et al.*, 2016).

Figura 6 - Clivagem assimétrica do corante Azo.



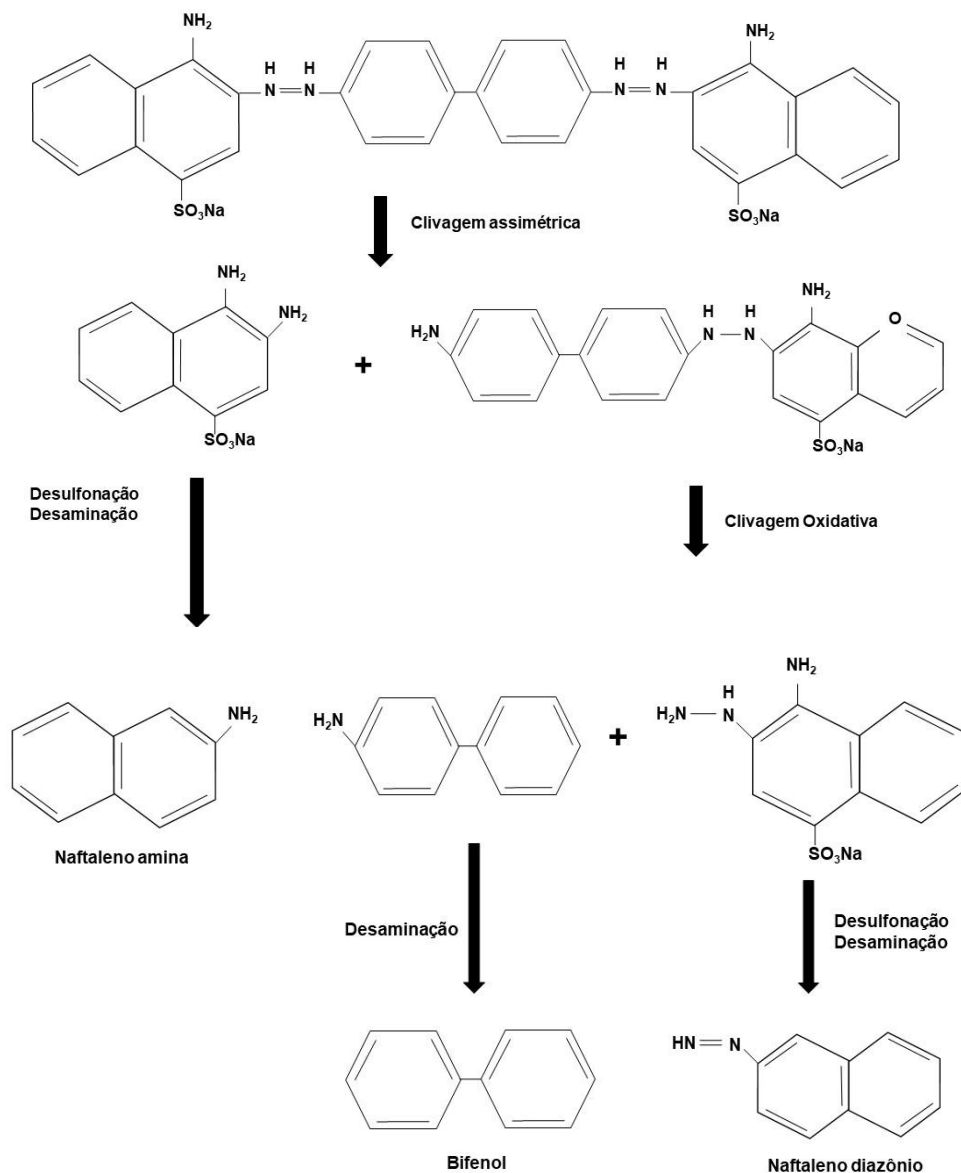
Fonte: Adaptado, LEGERSKA *et al.* (2016).

Na degradação dos corantes mono azo primeiro ocorre a carbonação, ou seja, forma-se um centro deficiente em elétrons, que são altamente receptivos. Esse centro está sujeito a interações nucleofílicas por $-\text{SO}_3$, $-\text{OH}$ ou nucleófilos halogêneos que resultam na clivagem assimétrica (LEGERSKA *et al.*, 2016).

Para os corantes diazo além da clivagem assimétrica, também são necessários elétrons para que ocorra uma redução. Então a lacase transfere elétrons da histidina para o corante azo. Dependendo do corante o processo

pode acabar na etapa de clivagem ou pode continuar até não haver subprodutos tóxicos, conforme ilustra a Figura 7 (LEGERSKA *et al.*, 2016).

Figura 7 - Mecanismo de degradação do corante Congo Vermelho.



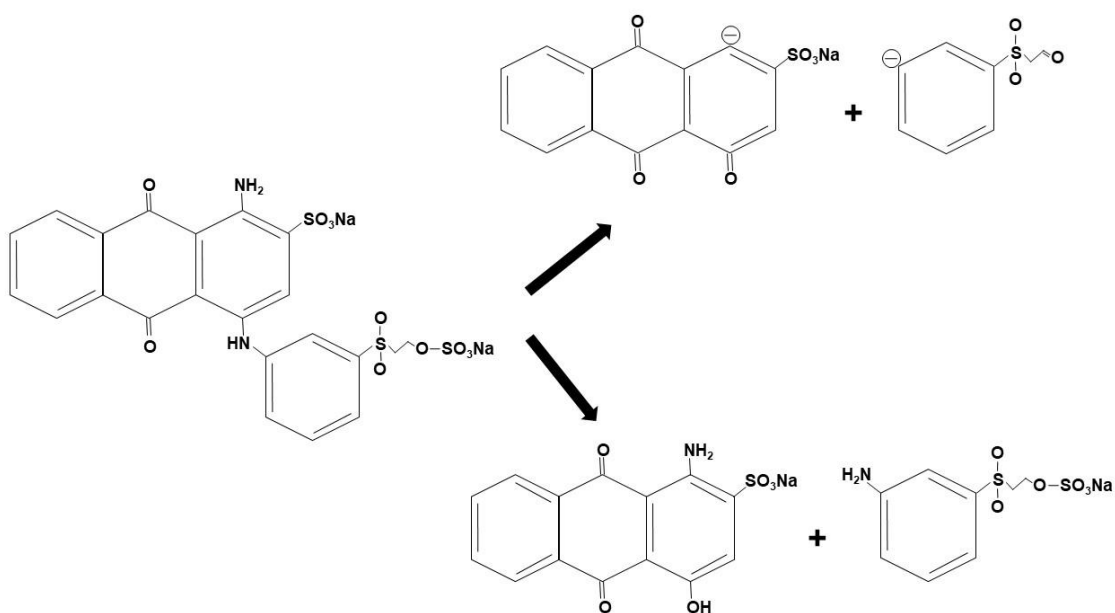
Fonte: Adaptado, LEGERSKA *et al.* (2016).

3.6.2 Mecanismo de degradação corante antraquinona

Estudos apontam que a lacase é mais eficiente na degradação de corantes antraquinona, os mesmos também são utilizados juntos com a lacase para degradação de alguns corantes azo (LAGERSKA *et al.*, 2016).

Na degradação do corante antraquinona o cromóforo é quebrado, formando moléculas menores e com menor toxicidade, como mostra a Figura 8. Algumas das reações que podem ocorrer redução, hidroxilação, desaminação e oxidação dependendo dos grupos funcionais e estrutura do corante (LAGERSKA *et al.*, 2016).

Figura 8 - Mecanismo de degradação do corante Azul Brilhante Remazol R.



Fonte: Adaptado, LAGERSKA *et al.* (2016).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A enzima lacase foi gentilmente cedida pela Prof. Dr^a. Aneli de Melo Barbosa Dekker da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

O suporte utilizado neste trabalho foi o Celite 545® (Sigma Aldrich, EUA).

O substrato utilizado para a atividade de lacase foi o ABTS da Sigma Aldrich (EUA).

Efluentes colhidos dos laboratórios de Lavanderia e Tingimento da UTFPR – Câmpus Apucarana.

Corantes C.I. Disperse Yellow 211 (azo), C.I. Disperse Red 60 (antraquinona) e C.I. Disperse Blue 60 (antraquinona) presente no efluente do laboratório de Tingimento.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Imobilização da lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Celite

O suporte (0,150 g) foi deixado em contato com 5 mL de solução enzimática (5,5 U/mL) em água destilada a 150 rpm de acordo com planejamento fatorial 2^2 (7 experimentos), avaliando-se temperatura (9°C – 31°C) e tempo de contato (43 – 107 min) com os níveis inferiores (-1) (2 pontos), centrais (0) (3 pontos), superiores (+1) (2 pontos). Os níveis de variação estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis de variação para os fatores do planejamento fatorial 2^2 para avaliação da imobilização de lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Celite.

Fatores	Níveis reais e codificados		
	-1	0	1

X_1 (temperatura, °C)	9	20	31
X_2 (tempo, min)	43	75	107

Fonte: Próprio autor.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla, foram realizadas ao nível de 5 % de significância, utilizando o programa STATISTICA Version 8.0®.

A atividade enzimática foi determinada no derivado, no sobrenadante e na solução inicial de enzima.

4.2.2 Determinação da atividade de lacase livre e imobilizada

A atividade de foi determinada conforme descrito por Barbosa; Dekker; Hardy (1996), utilizando-se como substrato o ABTS (2,2 azino-bis ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) a 50 mM. O sistema de incubação consistiu de 50 µL de ABTS, 150 µL de tampão McIlvaine (pH 3,0), 100 µL de solução enzimática (diluída quando necessário) e 700 µL de água deionizada para completar o volume final da reação (1,0 mL). Depois de cinco minutos de incubação a 50°C, a leitura foi determinada a 420 nm pelo espectrômetro PerkinElmer – Lambda 750 UV/VIS/NIR *Spectrometer*. Uma unidade de atividade de lacase é expressa como o número de µ mols de substrato oxidado por minuto, por mL da solução de enzima.

Para a enzima imobilizada foi utilizado aproximadamente 1 mg da mesma, utilizando os mesmos reagentes para determinação da lacase livre, incubada com agitação, a 50°C.

Para o cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada foi utilizada a fórmula geral, Equação 1.

$$U/mL \text{ ou } U/g = \left[\frac{Abs}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e \text{ ou } m_e/V_{sol}} \times \frac{1}{t_r} \times DF \times 10^3 \right] \quad (1)$$

Sendo:

U/mL: unidade de atividade enzimática da solução da enzima, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

U/g: unidade de atividade enzimática da enzima imobilizada por grama de suporte, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;

Abs: absorvância a λ (nm);

ϵ : coeficiente de extinção molar ($M^{-1}.cm^{-1}$);

V_e : volume de enzima utilizado no ensaio (mL);

4.2.3 Preparo das soluções de corantes e efluentes

Para a solução de corante foi feita uma solução estoque com concentração de 50 mg/L, a partir desta foram feitas soluções de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.). Os corantes utilizados foram C.I. Disperse Yellow 211 (azo) e C.I. Disperse Red 60 (antraquinona).

O efluente utilizado foi colhido ao final das aulas do Laboratório de Lavanderia e Tingimento da UTFPR – Campus Apucarana. A partir do efluente foram feitas soluções de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.). No efluente de cor azulada continha o corante C.I. Disperse Blue 60 (antraquinona), pois foi informado pelo técnico do laboratório e no efluente escuro não foi possível identificar o corante utilizado.

4.2.4 Aplicação da lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 no tratamento de efluente têxtil e corante

As condições dos experimentos foram em frascos de 50 mL contendo 10 mL do efluente coletado misturados a 0,100 g da enzima imobilizada e 100 μ L de ABTS, utilizado como mediador. Os frascos foram incubados em shaker (200 rpm) por até 48 horas a 25°C. Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos de tempo determinados (5 h – 48 h). Em cada temperatura foi feito um controle sem adição de enzima.

A cada intervalo de tempo, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm/10 min) a temperatura ambiente e a porcentagem de descoloração foi determinada espectroscopicamente, utilizando a Equação 2:

$$\% \text{ Descoloração} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2)$$

Sendo:

$A_{inicial}$: absorvância inicial, antes da incubação.

A_{final} : absorvância final, após a incubação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Imobilização da lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Celite

Com o planejamento fatorial 2^2 (7 experimentos), sendo 4 pontos, 2 inferiores e 2 superiores, e 3 centrais, foi possível avaliar a influência das variáveis temperatura e tempo na imobilização da lacase em Celite. Os resultados estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Respostas obtidas no planejamento fatorial para avaliação da imobilização da lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Celite.

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas
	X_1	X_2	U/g suporte
1	-1	-1	2,57
2	1	-1	0,31
3	-1	1	0,85
4	1	1	1,10
5 (C)	0	0	0,73
6 (C)	0	0	1,05
7 (C)	0	0	0,75
Fatores	Níveis reais		
	-1	0	1
X_1 (temperatura, °C)	9	20	31
X_2 (tempo, min)	43	75	107

Fonte: Próprio autor.

A imobilização da lacase em Celite variou de 0,31 a 2,57 U/g suporte, sendo o maior valor encontrado no experimento 1, temperatura de 9°C e tempo de 43 minutos (condição utilizada para realizar a imobilização e depois efetuar o tratamento). Com o aumento da temperatura (experimento 2) é possível

observar que o valor de atividade enzimática imobilizado diminuiu oito vezes. Este efeito é mostrado na equação preditiva ($R^2=0,91$), Equação 3. Os termos em negrito são significativos ($p \leq 0,05$), para o experimento, portando o X_1 que representa a temperatura é significativo, o sinal negativo presente neste termo mostra que este influenciou negativamente na imobilização desta enzima. Outro termo significativo é a interação entre X_1 e X_2 (temperatura e tempo, respectivamente), que influenciaram positivamente na imobilização.

$$U/g_{suporte} = \mathbf{1,05} - \mathbf{0,5 X1} - 0,23 X2 + 0,63 \mathbf{X1 X2} \quad (3)$$

A Tabela 3 apresenta o modelo linear e que $F_{calc} > F_{list}$ nos graus de liberdade correspondentes à imobilização da lacase em $U/g_{suporte}$. O valor F e o valor do coeficiente de regressão (R^2) mostram que o modelo teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para imobilização da lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Celite.

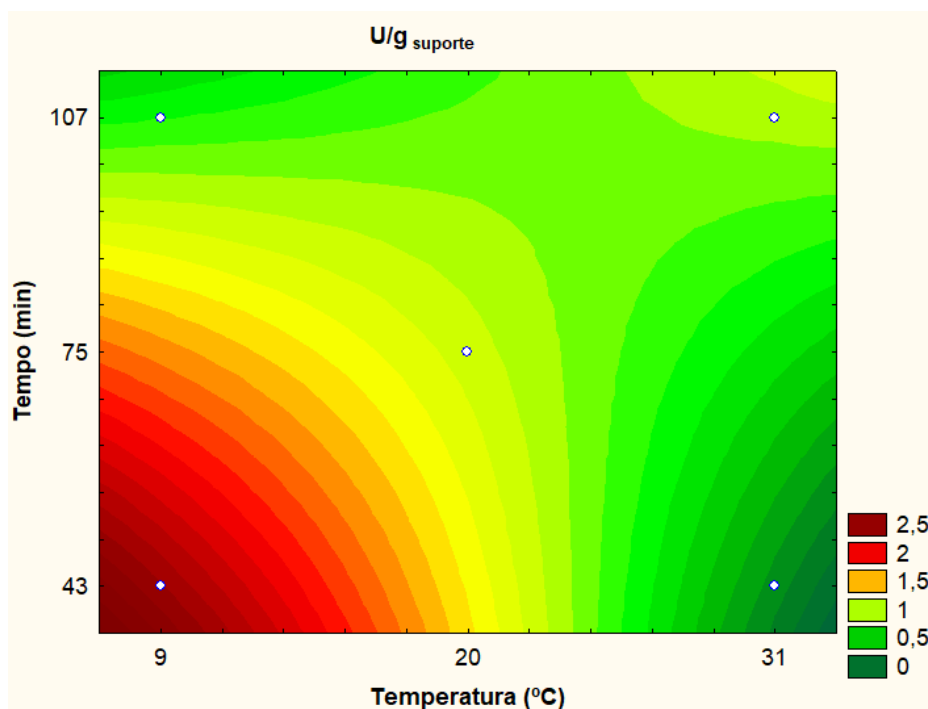
Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste F_{calc} F_{list}
U/g _{suporte}	Modelo	1,292669	2	0,646334	8,87 6,94
	Resíduo	0,291611	4	0,072902	
	Total	3,092886	6		

$R^2=0,91$; F 95%.2,4

Fonte: Próprio autor.

O gráfico de contorno gerado a partir do ajuste do modelo (Figura 9) indica a influência da temperatura e tempo na imobilização da lacase em Celite ($U/g_{suporte}$) e a resposta obtida pelo modelo preditivo foi maior que 2,5 $U/g_{suporte}$. Pelo gráfico é possível observar que a região em vermelho (mais favorável a imobilização) está na mesma região que ocorreu o experimento 1, porém este modelo não é conclusivo, apenas indicativo para novos experimentos.

Figura 9 - Gráfico de contorno do planejamento fatorial 2^2 na imobilização da lacase em Celite.



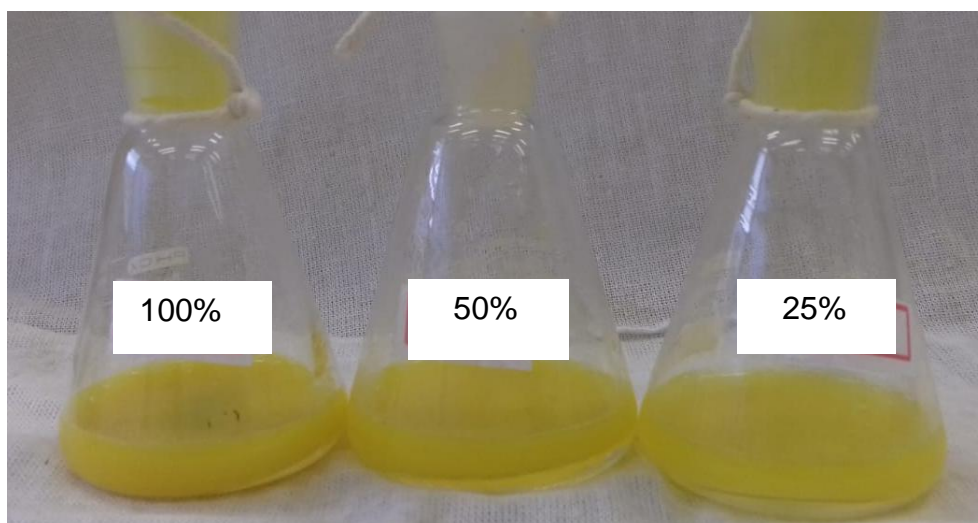
Fonte: Próprio autor.

5.2 Tratamento do efluente e corante com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

O efluente tratado com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite apresentou certo grau de descoloração após 48 horas do tratamento.

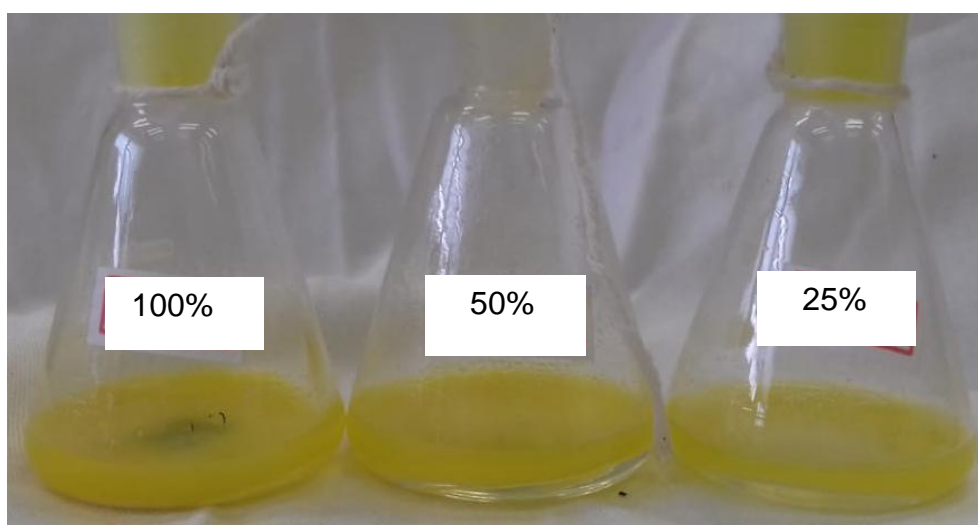
As Figuras 10 e 11 mostram o corante C.I. Disperse Yellow 211 antes e após o tratamento com a lacase. Como pode ser verificado visualmente ocorreu pouca alteração da coloração, entretanto analisando os espectros na região do visível, pode-se verificar que houve diminuição na absorvância, indicando a biodegradação.

Figura 10 - Corante C.I. Disperse Yellow 211 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, sem tratamento.



Fonte: Próprio autor.

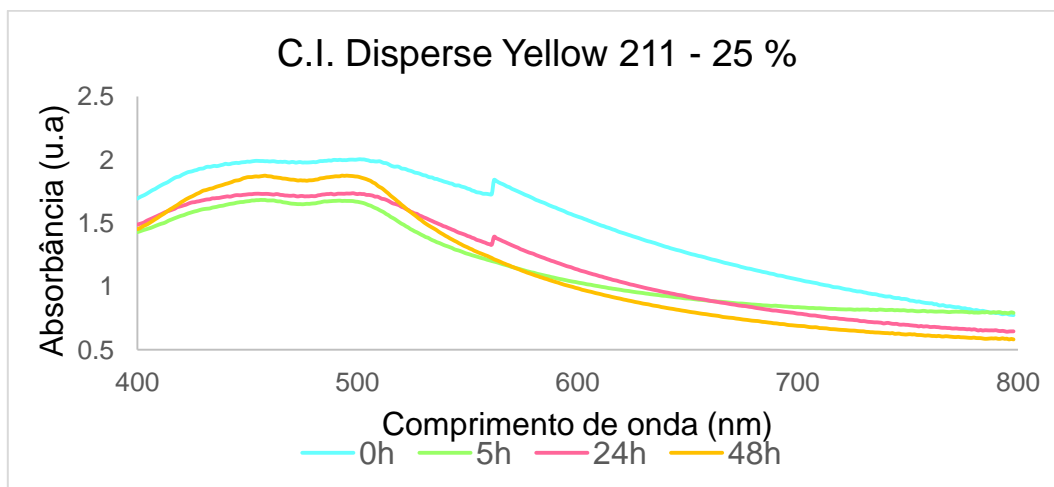
Figura 11 - Corante C.I. Disperse Yellow 211 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, após 48 h de tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.



Fonte: Próprio autor.

O gráfico apresentado na Figura 12 mostra a concentração de 25 % (v.v.) do C.I Disperse Yellow 211 antes e após o tratamento. Pode-se verificar que houve diminuição da absorbância ao longo de todo o tempo do tratamento. Dois picos de absorbância foram analisados (564 e 468 nm). Para ambos os picos o tempo de 5 h obteve a maior porcentagem de degradação 35 e 15 %, respectivamente (Tabela 4).

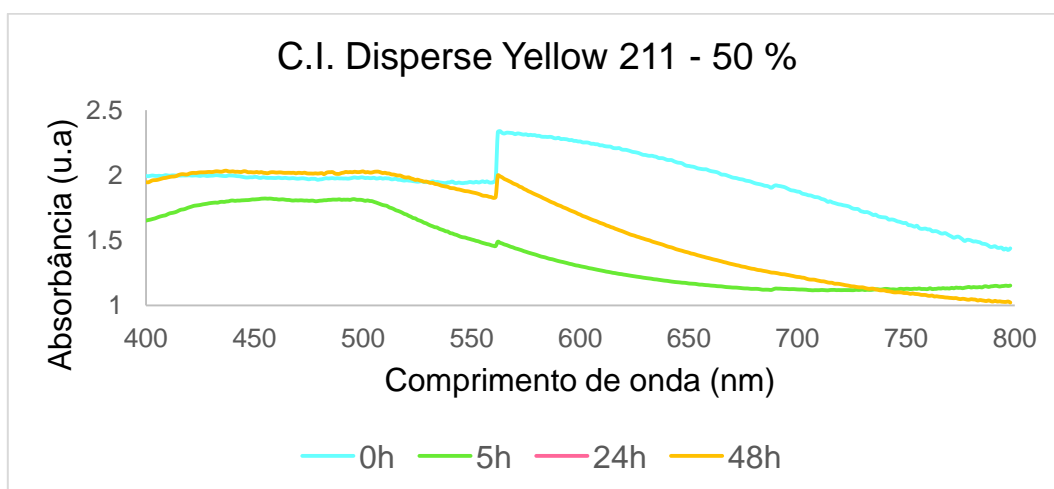
Figura 12 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Yellow 211 25 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 13 mostra os espectros obtidos pela amostra na concentração de 50 % (v.v.) do C.I. Disperse Yellow 211 antes e após o tratamento. Percebe-se que o corante teve sua absorbância reduzida ao longo do tratamento, sendo em 5 h com maior descoloração (37 %) observado no pico de 564 nm (Tabela 4). Nesta concentração, a amostra obtida com 24 h de tratamento apresentou erro na medição do espectro.

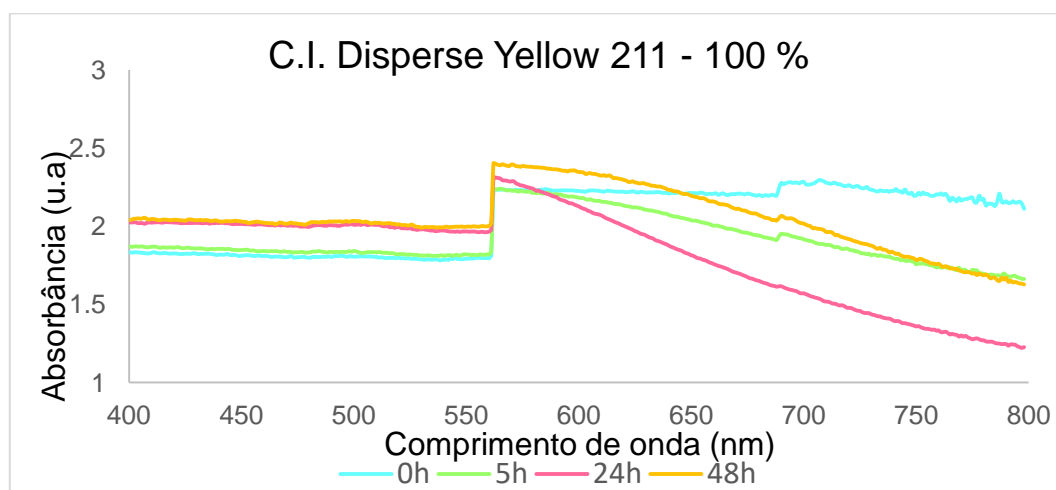
Figura 13 - Espectro de absorção UV-vis obtido para o corante C.I. Disperse Yellow 211 50 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 14 apresenta a concentração de 100 % (v.v.) do corante C.I. Disperse Yellow 211 e pelo gráfico é possível verificar que após o tratamento com a lacase imobilizada houve incremento da absorbância nos dois picos analisados. Isto pode ser devido à alta concentração do corante que desfavoreceu a biodegradação.

Figura 14 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Yellow 211 100 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.



Fonte: Próprio autor.

Sharma, Singh e Dilbaghi (2009) fizeram um estudo da descoloração do corante Disperse Yellow 211 com a cepa da *Bacillus Subtilis*, neste, apontou que o melhor tratamento ocorreu a 32,35°C, com pH 7 e concentração inicial de corante igual a 119 mg/L, num período de 120 h removeu quase 80 % da cor.

A Tabela 4 apresenta o percentual de descoloração do corante C.I. Disperse Yellow 211 em todas as concentrações avaliadas nos comprimentos de onda de 564 e 458 nm, após o tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite. Observa-se que na concentração de 25 % (v.v.) o percentual de descoloração foi mais expressivo.

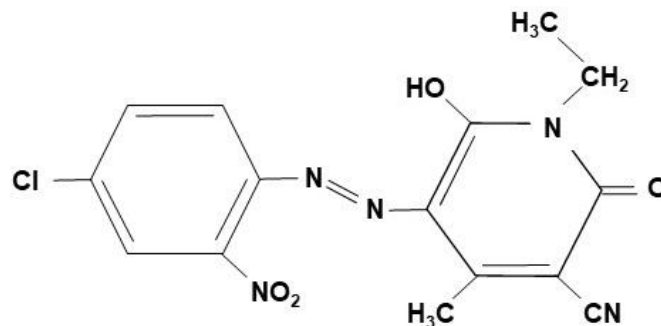
Tabela 4 - Porcentagem de descoloração do corante C.I. Disperse Yellow 211 após tratamento com lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

Comprimento de onda (nm)	Concentração (v.v.)	Tempo	Absorbância (u.a)	% descoloração
564	25 %	0h	1,82	
		5h	1,18	35
		24h	1,37	24
		48h	1,19	34
	50 %	0h	2,32	
		5h	1,47	37
		24h	0	-
		48h	1,98	15
	100 %	0h	2,23	
		5h	2,23	0
		24h	2,30	0
		48h	2,39	-
458	25 %	0h	1,98	
		5h	1,68	15
		24h	1,73	13
		48h	1,87	6
	50 %	0h	1,97	
		5h	1,81	8
		24h	0	-
		48h	2,02	-
	100 %	0h	1,81	
		5h	1,84	-
		24h	2,01	-
		48h	2,02	-

Fonte: Próprio autor.

O corante C.I. Disperse Yellow 211 é um corante azo (Figura 15) e conforme citado por Lagerska (2016), corantes azos possuem maior dificuldade em sofrer clivagens pela lacase. Este pode ser o motivo de haver pouca descoloração tanto visivelmente quanto pelo espectro no visível na concentração de 100 % (v.v.).

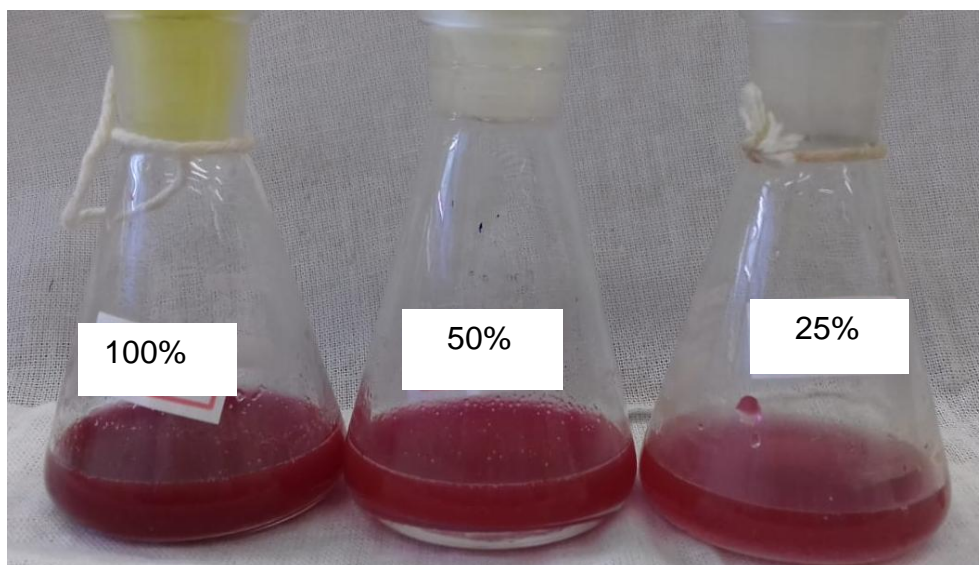
Figura 15 - Estrutura molecular do corante C.I Disperse Yellow 211.



Fonte: Adaptado, WORLD DYE VARIETY (2013).

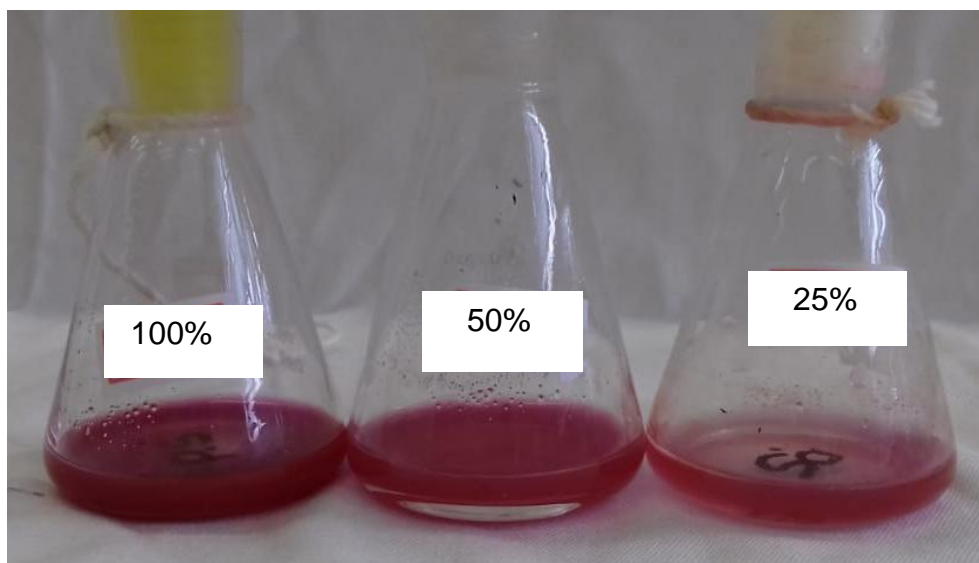
As Figuras 16 e 17 mostram as amostras do corante C.I. Disperse Red 60 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), observa-se visivelmente que houve descoloração do corante.

Figura 16 - Corante C.I. Disperse Red 60 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, sem tratamento.



Fonte: Próprio autor.

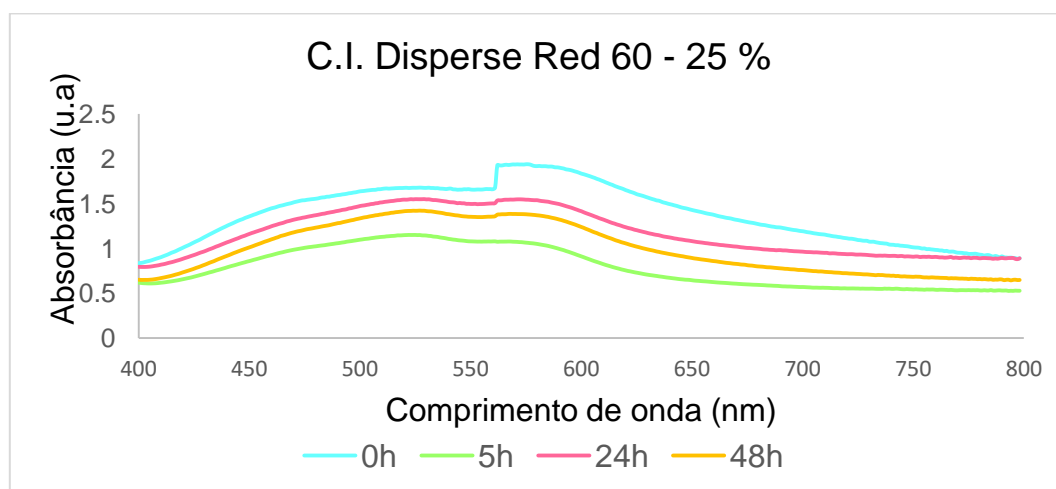
Figura 17 - Corante C.I. Disperse Red 60 nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, após 48 h de tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 18 apresenta o gráfico de absorbância do corante C.I. Disperse Red 60 com concentração de 25 % (v.v.), antes e após o tratamento. Pelo gráfico observa-se que o tratamento com a lacase foi eficaz, sendo que a maior porcentagem de descoloração (50 %) foi obtida em 5h (Tabela 5).

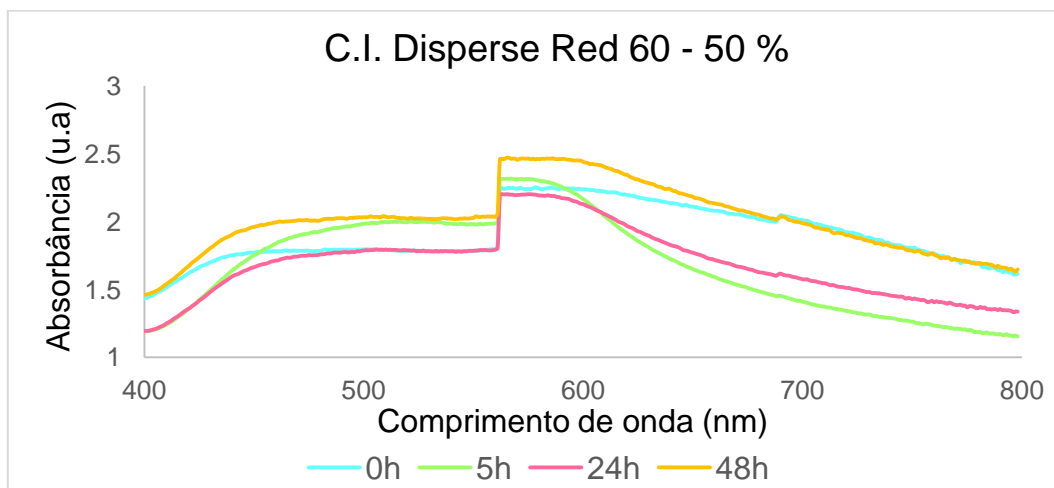
Figura 18 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Red 60 25 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.



Fonte: Próprio autor.

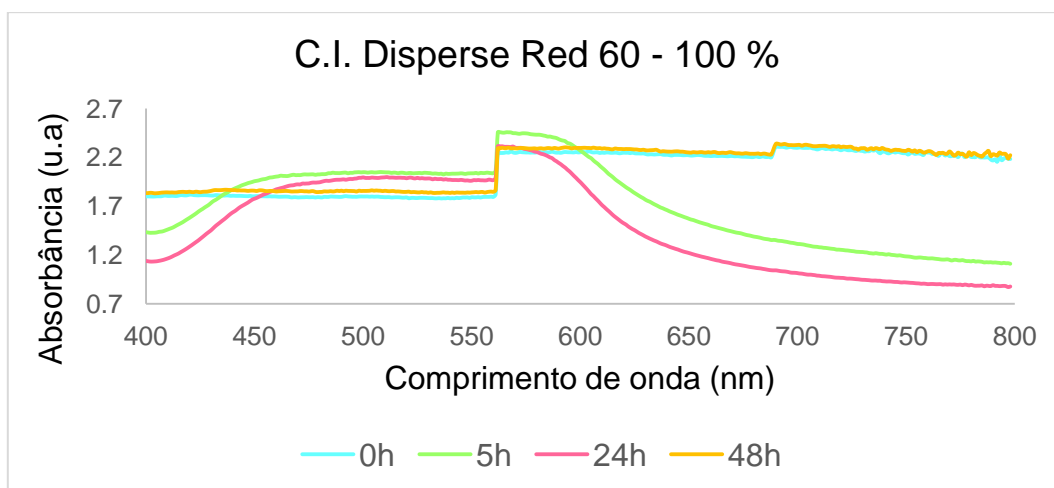
A Figura 19 apresenta o espectro de absorção do corante C.I. Disperse Red 60 na concentração de 50 % (v.v.). Apenas houve diminuição de absorbância no tempo de 24 h (5 %) a 600 nm (Tabela 5).

Figura 19- Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Red 60 50 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina*_MAMB-05 imobilizada em Celite.



Fonte: Próprio autor.

Figura 20 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o corante C.I. Disperse Red 60 100 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

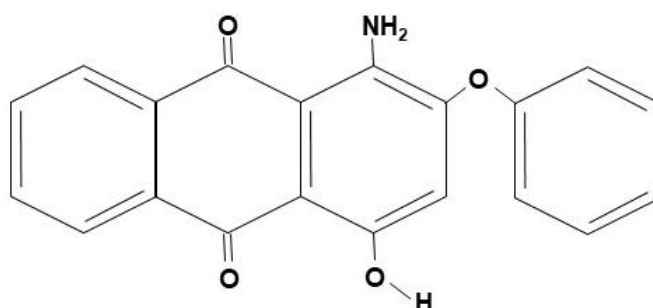


Fonte: Próprio autor.

Na Figura 20 é possível observar que somente após 24 h de tratamento com a lacase imobilizada houve diminuição na absorvância (14 %) do C.I. Disperse Red 60 na concentração de 100 % (v.v.).

O corante C.I. Disperse Red 60 (Figura 21) se trata de um corante antraquinona que segundo Lagerska (2016) possui melhor biodegradação pela lacase. Pela análise dos espectros de absorvância nota-se que o tratamento de 48 h só obteve êxito na concentração de 25 % (v.v.), porém a melhor tempo de tratamento foi em 5 h para as concentrações de 25 % e 50 % (v.v.).

Figura 21 - Estrutura molecular do corante C.I. Disperse Red 60.



Fonte: Adaptado, WORLD DYE VARIETY (2013).

O estudo feito por Bankole et. al. (2018) utilizando enzima de *Peyronellaea prosopidis* (fungo), produtor de lacase, Lip e MnP, para biodegradação de corante Scarlat RR e efluente têxtil, mostra que 88% da cor foi removida. O estudo foi feito na concentração de 10 mg/L de corante, a 29°C e pH 7,2.

A Tabela 5 apresenta o percentual de descoloração nos comprimentos de onda de 600 nm do corante C.I Disperse Red 60 após o tratamento com lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite. Observa-se que o tempo de tratamento de 24 h já foi suficiente para biodegradar este corante em todas as concentrações realizadas.

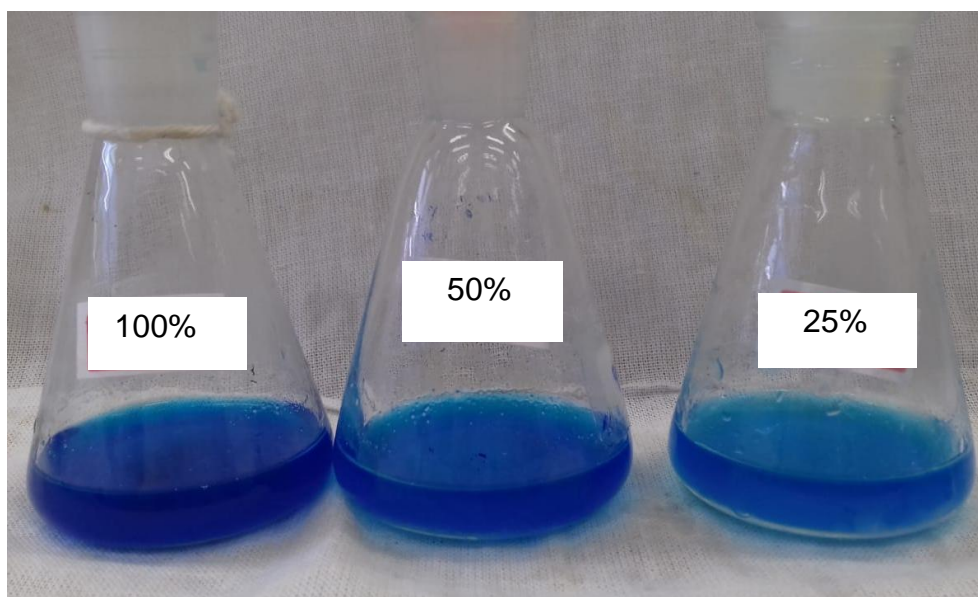
Tabela 5 - Porcentagem de descoloração do corante C.I. Disperse Red 60 após tratamento com lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

Comprimento de onda (nm)	Concentração	Tempo	Absorbância (u.a)	% descoloração
600	25 %	0h	1,83	
		5h	0,91	50
		24h	1,41	23
		48h	1,23	32
	50 %	0h	2,23	
		5h	2,16	3
		24h	2,12	5
		48h	2,44	-
	100 %	0h	2,25	
		5h	2,26	-
		24h	1,94	14
		48h	2,29	-

Fonte: Próprio autor.

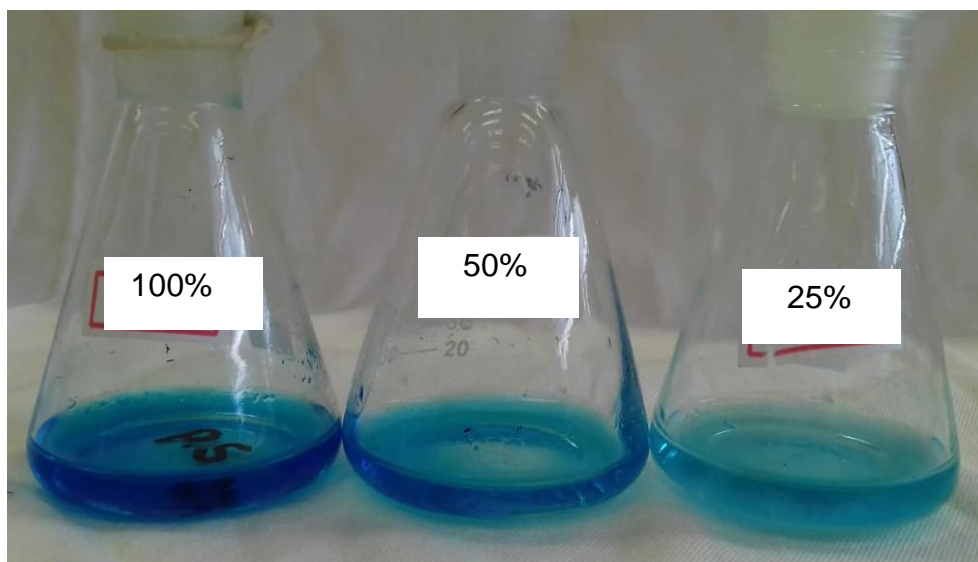
Pelas Figuras 22 e 23 é possível observar visivelmente o tratamento realizado pela lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite no efluente do laboratório de tingimento que continha o corante C.I. Disperse Blue 60 (antraquinona), nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.). As figuras mostram que visualmente houve uma diminuição da intensidade de cor do corante em todas as concentrações tratadas.

Figura 22 - Efluente azul nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, sem tratamento.



Fonte: Próprio autor.

Figura 23 - Efluente azul nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, após 48 h de tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.

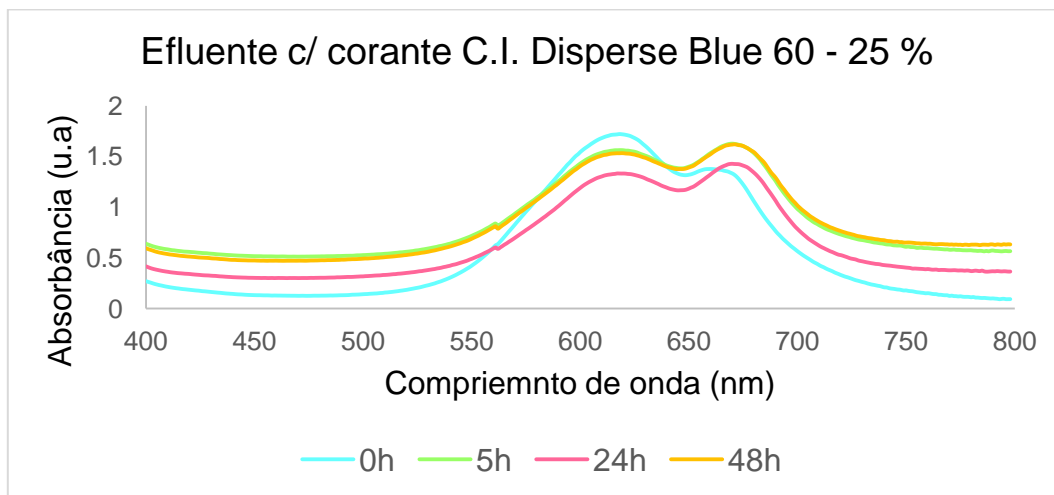


Fonte: Próprio autor.

A Figura 24 apresenta o gráfico obtido através do espectro de absorção UV-Vis do efluente têxtil com corante C.I. Disperse Blue 60 na concentração de 25 % (v.v.). Nota-se que o ponto onde houve relevância na diminuição da

absorbância foi no comprimento de onda 620 nm, sendo o tempo de 24 h com maior descoloração (22 %) (Tabela 6).

Figura 24 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente com corante C.I. Disperse Blue 60 25 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

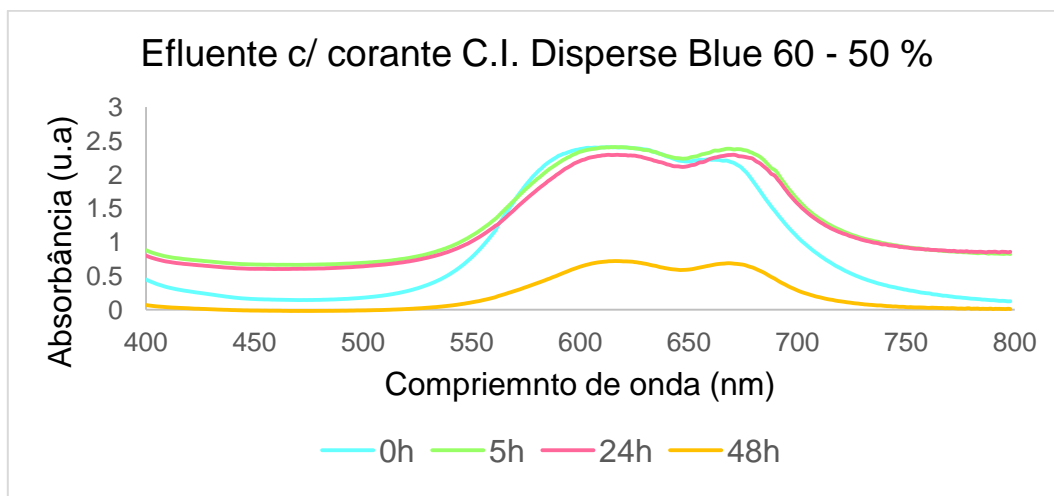


Fonte: Próprio autor.

Na Figura 25, observa-se o gráfico obtido pelo efluente com o corante C.I. Disperse Blue 60 na concentração de 50 % (v.v.) antes e após tratar com a lacase. O tratamento com melhor eficácia foi com o tempo de 48 h (70 %). Uma possível explicação para o melhor desempenho da lacase neste tipo de efluente é que o corante C.I. Disperse Blue 60 (Figura 27) é do grupo antraquinona, o qual a lacase tem maior capacidade de biodegradação. Além disso, nele estava contido umectante (surfactante) e sal que pode ter auxiliado no aumento da atividade enzimática da lacase. Essa descoloração ficou bem visível comparando-se as Figuras 22 e 23.

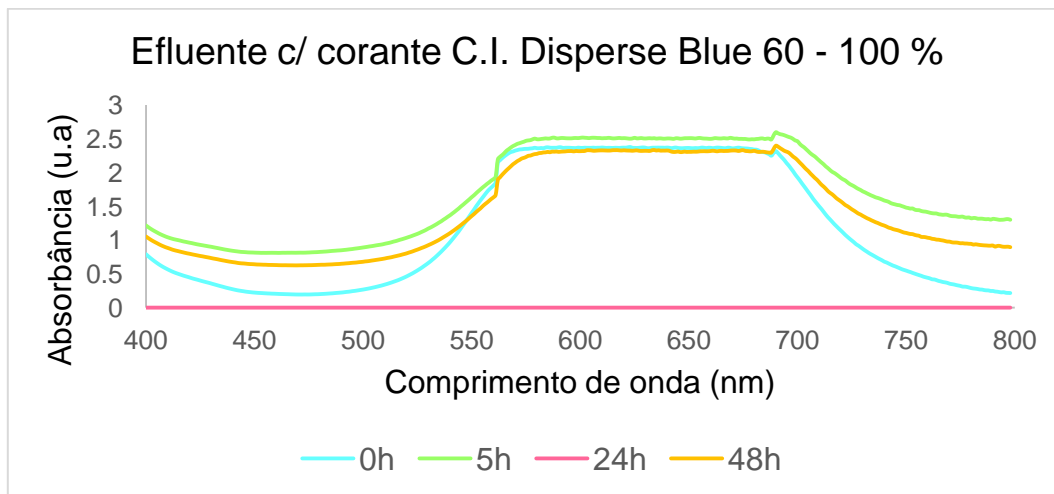
A Figura 26 mostra o tratamento do efluente com corante C.I. Disperse Blue 60 na concentração de 100 % (v.v.) e após 48 h somente 2 % do corante foi degradado.

Figura 25 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente com corante C.I. Disperse Blue 60 50 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

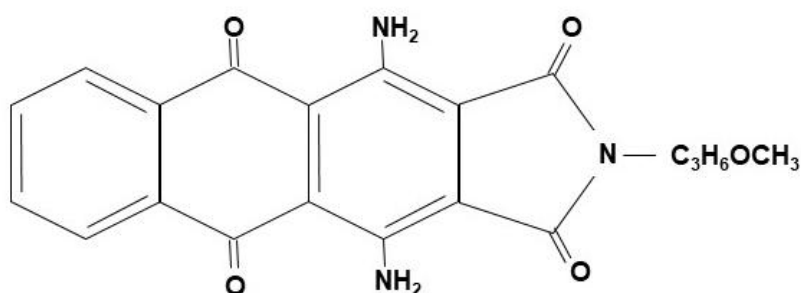


Fonte: Próprio autor.

Figura 26 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente com corante C.I. Disperse Blue 60 100 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.



Fonte: Próprio autor.

Figura 27 - Estrutura molecular do corante C.I. Disperse Blue 60.

Fonte: Adaptado, WORLD DYE VARIETY (2013).

A Tabela 6 apresenta o percentual de descoloração no comprimento de onda de 620 nm do corante C.I. Disperse Blue 60 após o tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite. Observa-se que o tempo de tratamento superior a 24 h foi mais efetivo em todas as concentrações realizadas.

Sugimori et.al. (1999), fizeram um estudo para remoção do corante Disperse Blue 60 pela *Cunninghamella polymorpha* (fungo), em pH 5 a 37°C durante 120 h. Ao longo do tratamento foram coletadas alíquotas, em 24 h de tratamento a descoloração foi de 59 % e em 94 h foi de 85 %.

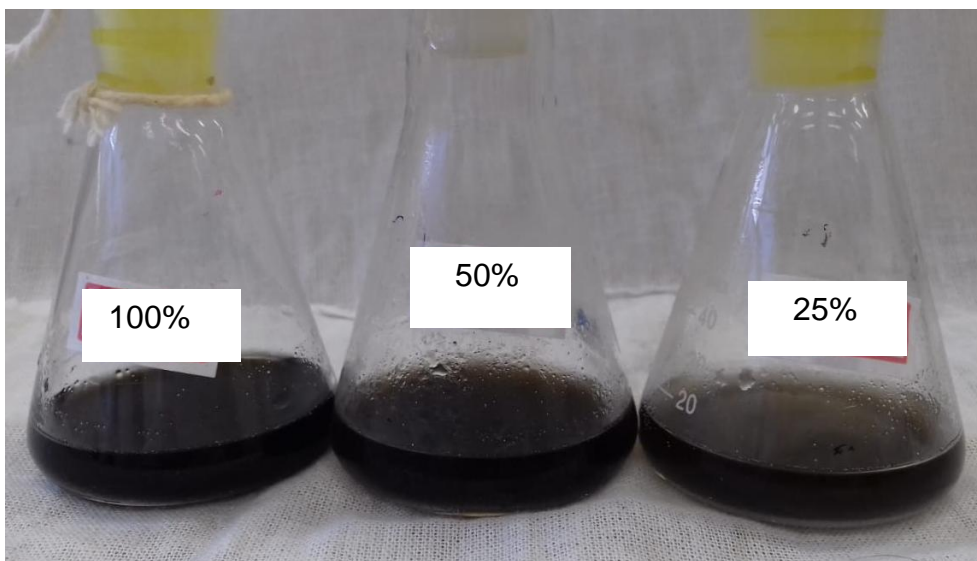
Tabela 6 - Porcentagem de descoloração do corante C.I. Disperse Blue 60 após tratamento com lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

Comprimento de onda (nm)	Concentração	Tempo	Absorbância (u.a)	% descoloração
620	25 %	0h	1,71	
		5h	1,56	9
		24h	1,33	22
		48h	1,53	11
	50 %	0h	2,40	
		5h	2,40	0
		24h	2,28	5
		48h	0,71	70
	100 %	0h	2,37	
		5h	2,50	-
		24h	0	-
		48h	2,32	2

Fonte: Próprio autor.

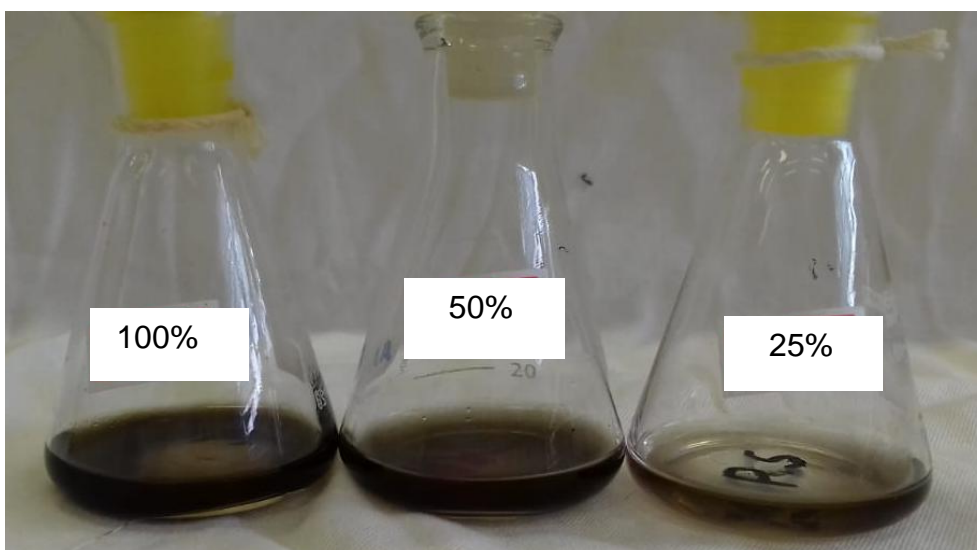
As Figuras 28 e 29 mostram o efluente escuro da lavanderia não tratado e tratado pela lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite, nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.). Observa-se que houve uma descoloração do efluente em todas as concentrações.

Figura 28 - Efluente escuro nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, sem tratamento.



Fonte: Próprio autor.

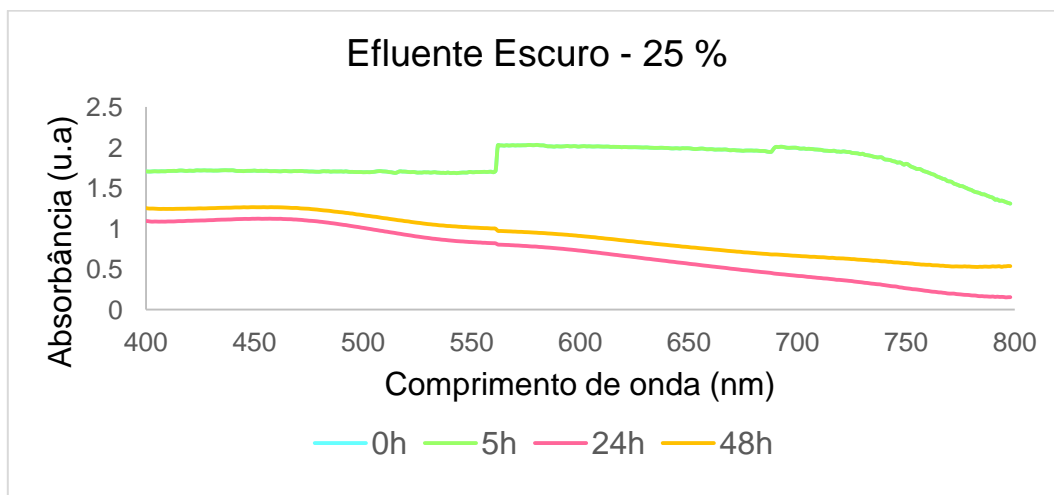
Figura 29 - Efluente escuro nas concentrações de 100 %, 50 % e 25 % (v.v.), respectivamente, após 48 h de tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.



Fonte: Próprio autor.

Pelo gráfico da Figura 30 adquirido com o efluente escuro antes e após tratamento, observa-se que para a concentração de 25 % (v.v.) a maior descoloração foi obtida com o tempo de 24 h (78 %) (Tabela 6).

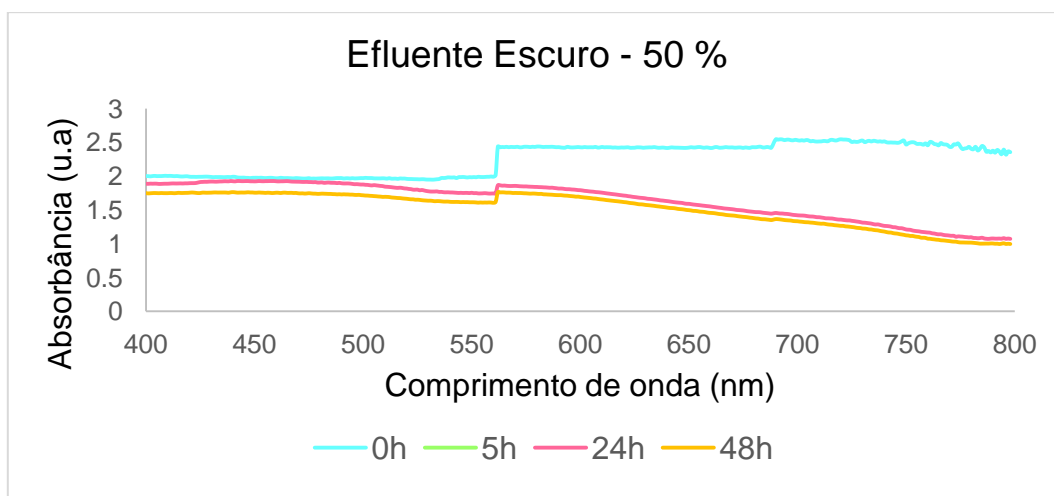
Figura 30 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente escuro na concentração de 25 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.



*A curva de 0h e 5h são as mesmas.

Fonte: Próprio autor.

Figura 31 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente escuro na concentração de 50 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

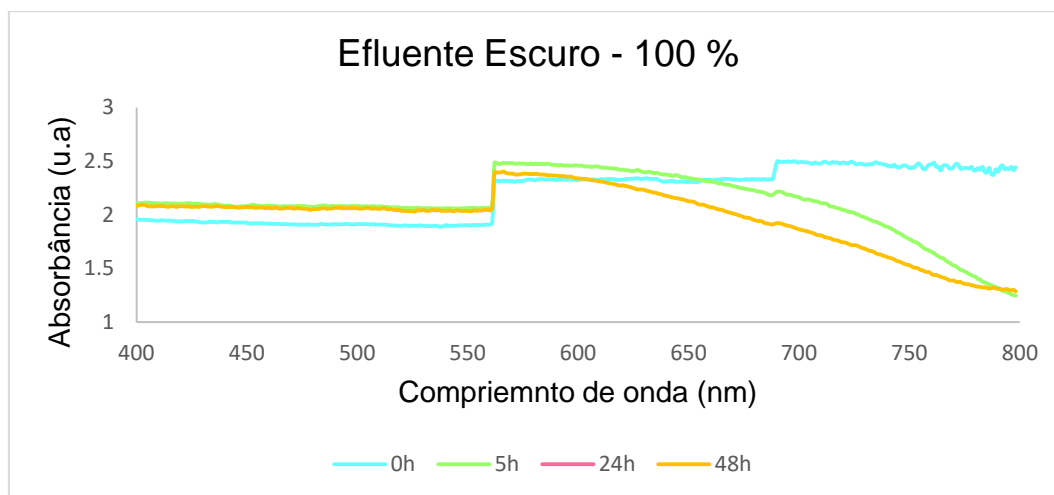


Fonte: Próprio autor.

O gráfico da Figura 31 mostra o espectro obtido no tratamento do efluente escuro na concentração de 50 % (v.v.), neste observa-se que o tempo com melhor descoloração foi 48 h (46 %) (Tabela 6). O espectro do tempo de 5 h sofreu erro de leitura.

A Figura 32 mostra o gráfico obtido pelo efluente escuro na concentração de 100 % (v.v.). Observa-se que em 690 nm a maior descoloração alcançada foi no tempo de 48 h (23 %). A amostra no tempo de 24 h sofreu erro de leitura.

Figura 32 - Espectro de absorção UV-Vis obtido para o efluente escuro na concentração de 100 % (v.v.) antes e após tratamento com a lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.



Fonte: Próprio autor.

Como as amostras analisadas eram de efluente este apresenta além do corante sal e umectante. O umectante pode auxiliar na atividade enzimática na lacase, fazendo com que seja mais perceptível a degradação da cor.

A Tabela 7 apresenta o percentual de descoloração nos comprimentos de onda de 690 nm com o tratamento da lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite. Observa-se que o tempo de tratamento superior a 24 h foi mais efetivo em todas as concentrações analisadas.

Tabela 7 - Porcentagem de descoloração do efluente escuro após tratamento com lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 imobilizada em Celite.

Comprimento de onda (nm)	Concentração	Tempo	Absorbância (u.a)	% descoloração
690	25 %	0h	2,00	
		5h	2,00	0
		24h	0,44	78
		48h	0,68	66
	50 %	0h	2,54	
		5h	-0,17	-
		24h	1,45	43
		48h	1,36	46
	100 %	0h	2,49	
		5h	2,21	11
		24h	0	-
		48h	1,92	23

Fonte: Próprio autor.

Um estudo de biodegradação dos corantes Acid Red 357, Acid Blue 161 e Acid Black 210 pela lacase de *T. villosa* SCS-10 feito por Ortiz-Monsalve *et.al.* (2017), apontou que o ABTS, dentre os mediadores utilizados, foi o que menos auxiliou na remoção da cor dos corantes. O mesmo estudo utilizou uma atividade enzimática de 1500 U/L.

6. CONCLUSÃO

Com o planejamento fatorial pode-se concluir que a temperatura e o tempo influenciam na efetividade da imobilização da lacase *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Celite. O gráfico de contorno do planejamento apontou que as melhores faixas de temperatura são entre 5 e 15°C e para o tempo entre 40 a 60 min. Para que se encontre os pontos ótimos de temperatura e tempo para a imobilização devem ser feitos mais testes.

Dentre os corantes utilizados a máxima degradação foi obtida no tratamento do corante C.I. Disperse Red 60 (antraquinona) na concentração de 25 % (v.v.), a 5 h onde houve 50 % de descoloração.

Para os efluentes a máxima degradação foi obtida no tratamento do efluente escuro na concentração de 25 % (v.v.), para o tempo de 24 h, onde 78 % de descoloração foi obtida.

O tratamento das soluções de corantes e efluentes foi satisfatório. A quantidade de enzima e a concentração das soluções, podem ser alguns dos fatores para que a descoloração não fosse tão perceptível. A atividade encontrada neste estudo foi de 2,5 U/g_{suporte}. Porém, mesmo com a atividade enzimática abaixo do esperado, os resultados encontrados, principalmente no tratamento dos efluentes, foram satisfatórios. A maior degradação no tratamento do efluente ocorreu devido a composição do efluente, já que este contém também surfactante, que auxilia na atividade enzimática.

Conclui-se que os experimentos foram favoráveis e atingiram seus objetivos, já que houve degradação parcial dos corantes e efluentes. Vale ressaltar a utilização de maior atividade enzimática, superior de 1000 U/L pode ser mais favorável e apresentar melhor degradação.

REFERÊNCIAS

AMORIM, C.C.; LEÃO, M.M.D.; MOREIRA, R.F.P.M.. **Comparação entre diferentes processos oxidativos avançados para degradação de corante azo**. Eng Sanit Ambient. v. 14, n. 14, p. 543-550. 2009.

ARAUJO, F.V.F.; YOKOYAMA, L.; TEIXEIRA, L.A.C. **Remoção de cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H₂O₂/UV**. Química Nova, v.29, n.1, p.11-14. 2006.

BANKOLE, P.O.; ADEKUNLE, A.A.; OBIDI, O.F.; CHANDANSHIVE, V.V.; GOCINDWAR, S.P. **Biodegradation and detoxification of Scarlet RR dye by a newly isolated filamentous fungus, *Peyronellaea prosopidis***. Sustainable Environment Research. p. 1-9. 2018.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. **Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478**. Letters in Applied Microbiology, v. 23, p. 93-96. 1996.

BERGAMINI, M.F.; OLIVEIRA, F.C.M.; ZANONI, M.V.B.. **Análise voltamétrica do corante têxtil do tipo antraquinona empregando eletrodos de carbono impresso**. Eclética Química. São Paulo. v. 30, n. 2, p.53-59. 2005.

BEZERRA, T.M.S.; BASSAN, J.C.; MONTI, R. **Processo de obtenção de um suporte sólido para imobilização de enzimas, suporte sólido de fibra de coco verde, processo de imobilização de enzimas e derivado obtido**. Republica Federativa do Brasil. Ministério da indústria, comércio exterior e serviços. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. 2017.

BROILO, F.; ELY, C.; GHISLANDI, M.G.; SKORONSKI, E. **Imobilização da lacase de *Aspergillus Sp.* em nanofolhas de grafeno e sua aplicação na bioconversão de fenol**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, 2014.

BURKINSHAW, S. **Physico-chemical aspects of textile coloration**. Ed. Society of Dyers and Colorists. Reino Unido. 2016.

CASTRO, H.F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F.; SÁ-PEREIRA, P. **Imobilização de enzima e sua estabilização**. Enzima em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência. 2008. p. 134– 43.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do teste de micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes Disperse Red1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. 2008. 124 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CHRISTOPHER, L.P.; YAO, B.; JI, Y. **Lignin biodegradation with laccase mediators systems**. *Frontiers in Energy Research*. v. 2, p. 1-12. 2014.

CONTESINI, F.J. **Caracterização e imobilização da glicosiltransferase de *Erwinia sp. D12* que converte sacarose em isomaltulose**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

DESAI, S.S.; NITYANAND, C. **Microbial laccases and their applications: A review**. *Asian Journal of Biotechnology*. v. 3, n. 2, p. 98-124. 2011.

GIESE, E.G.; COVIZZI, L.G.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.. **Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria sp.*** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. Maringá. v. 26, n. 4, p. 463–470. 2004.

GUARATINI, C. Z. M.. **Corantes Têxteis**. *Química Nova*. v. 23, p. 71-78. 2000.

HUSAIN, Q. **Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review**. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. v. 9, n. 2, p. 117-140. 2010.

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

LABSYNTH. **Ficha de informação de segurança de produtos químicos**. 2017. Disponível em: < <http://downloads.labsynth.com.br/FISPQ/rv2012/FISPQ-%20Celite.pdf>>. Acesso em: 23 de setembro 2017.

LACERDA, M.F.A.R. **Degradação de hormônio sintético por meio de lacases fúngica imobilizadas em fibras de *Luffa cylindrica***. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia do Meio Ambiente). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

LEGERSKA, B.; CHMELOVA, D.; ONDREJOVIC, M. **Degradation of synthetic dyes by laccases – A mini-review**. *Nova Biotechnologica et Chimica*. Republica Eslocava. p. 90-106. 2016.

LEONOWICZ, A; CHO, N.S; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WASILEWSKA, M.W.; MATUSZEWSKA, A. HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. **Fungal laccase: properties and activity on lignina**. *Journal of Basic Microbiology*. Berlim. p. 185-227. 2001.

MENEZES, C.R; BARRETO, A.R. **Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico**. Revista eletrônica em gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. v. 19, n.2, p.1365-1391. 2015

MESSIAS, J. **Produção de lipases por Botryosphaeria ribis EC-01 em diferentes fontes de carbono**. 2008. 229 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

ORTIZ-MONSALVE, S.; DORNELLES, J.; POLL, E.; RAMIREZ-CASTRILLÓN, M.; VALENTE, P.; GUTTERRES, M.. **Biodecolourisation and biodegradation of leather dyes by a native isolate of *Trametes villosa***. Process Safety and Environmental Protection, p. 437-451. 2017.

PACHECO, S.M.V; SOARES, C.H.L. **Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras**. Química Nova. v. 37, n.2, p. 209-214, 2014.

QUEEL. **Ficha de informação de segurança de produtos químicos**. 2010. Disponível em: < <http://www.queelquimica.com.br/fispqs/FISPQ-%20Celite%20545.pdf>>. Acesso em: 23 de setembro 2017.

QUIMICA NET. **SiO₂: O óxido mais abundante na crosta terrestre**. Disponível em: < <http://www.quimica.net/emiliano/ensinomedio/2010/trabalhos/03-oxidos-joana-31c.pdf>>. Acesso em: 23 de setembro 2017.

ROVEDA, A.C.. **Avaliação do efeito sinérgico entre antioxidantes convencionais e aditivos contendo grupo antraquinona na estabilização de biodiesel de soja**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2015.

SANTOS, A.B.; CERVANTES, F.J.; LIER, J.B.V.. **Impacto dos mediadores redox na remoção de cor de corantes azo e antraquinônico por lodo granular anaeróbio sob condições mesofílicas e termofílicas**. In: 23º Congresso brasileiro de Engenharia Sanitária e ambiental – ABES. 2005. p. 1-9.

SANTOS, P.K.; FERNANDES, K.C.; FARIA, L.A.; FREITAS, A.C.; SILVA, L.M.. **Descoloração e degradação do azo corante vermelho GRLX-220 por ozonização**. Química Nova. São Paulo. v. 34, n. 8, p. 1315-1322. 2011.

SHARMA, P.; SINGH, L.; DILBAGHI, N. **Optimization of process variables for decolorization of Disperse Yellow 211 by *Bacillus subtilis* using Box-Behnken design**. Journal of Hazardous Materials. v. 162, n. 2-3, p. 1024-1029. 2009.

SHRADDHA; SHEKHER.R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A.. **Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications**. Enzyme Research. US National Library of Medicine National Institutes of Health. v.11, p.1-11. 2011.

SILVA, G.S.; BRUNO, L.M.; CASTRO, H.F. **Seleção e imobilização de fungos filamentosos produtores de lipase intracelular**. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Natal. 2009.

SILVA, J.A.; LIMA, I.P.B.. **Avaliação da influência do etanol e propilenoglicol como solventes sobre as características químicas e físico-químicas de uma formulação de creme de hidroquinona**. Informa. v.16, b. 13-14, p. 66-69. 2005.

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

SILVA, R.L.L.; COELHO, M.A.Z.; CAMMAROTA, M.C.. **Remoção de cor de efluentes têxteis com cogumelos *Agaricus bispora***. Acta Scientiarum Technology. Maringá. v.32, n.3, p. 219-225. 2010.

SOUSA, E.T.; LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. **Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera**. Química Nova. v. 39, n.4, p. 486-495. 2016.

SOUZA, A.F.; ROSADO, F.R.. **Utilização de fungos Basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis**. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente. V. 2, n. 1, p. 121-139. 2009.

SOUZA, C.L.; PERALTA-ZAMORA, P.. **Degradação redutiva de azo-corantes utilizando-se ferro metálico**. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental. v.11, n. 1. p. 16-20. 2006

SOUZA, L.T.A.; VERÍSSIMO, L.A.A.; JOÃO, B.C.P.; SANTORO, M.M.. RESENDE, R.R.. MENDES, A.A. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte**. Biotecnologia aplicada à Agro&industria. Ed. Blucher. cap. 15. vol.4. 2017.

SUGIMORI, D.; BANZAWA, R.; KUROSUMI, M.; OKURA, I. **Removal of Disperse Dyes by the Fungus *Cunninghamella polymorpha***. Journal of Bioscience and Bioengineering. v.87, n. 2, p. 252-254. 1999.

TREVISAN, H.C. **Desenvolvimento de um método de produção de sílica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de proteínas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1993.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M; GRAILLE, J.; HAAS, M.J.. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 9, p. 113 – 148. 2000.

WORLD DYE VARIETY. **Disperse Yellow 211.** Disponível em: <<http://www.worlddyevariety.com/disperse-dyes/disperse-yellow-211.html>>. Acesso 01 junho 2018.

WORLD DYE VARIETY. **Disperse Red 60.** Disponível em: <<http://www.worlddyevariety.com/disperse-dyes/disperse-red-60.html>>. Acesso 01 junho 2018.

WORLD DYE VARIETY. **Disperse Blue 60.** Disponível em: <<http://www.worlddyevariety.com/disperse-dyes/disperse-blue-60.html>>. Acesso 01 junho 2018.

ZUCCA, P.; COCCO, G.; SOLLAI, F.; SANJUST,E. **Fungal laccases as tools for biodegradation of industrial dyes.** Biocatalysis. p. 82-108. 2015.