

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

TATIANI ANDRESSA MODKOVSKI

ADSORÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES DE EFLUENTE TÊXTIL
UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E LACASE

CURITIBA

2020

TATIANI ANDRESSA MODKOVSKI

**ADSORÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES DE EFLUENTE TÊXTIL
UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E LACASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Coorientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2020



Esta licença permite que outros distribuam, remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que lhe atribuam o devido crédito pela criação original.

[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Curitiba**



TATIANI ANDRESSA MODKOVSKI

**ADSORÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES DE EFLUENTE TÊXTIL UTILIZANDO PARTÍCULAS
MAGNÉTICAS E LACASE**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 26 de Outubro de 2020

Prof Charles Windson Isidoro Haminiuk, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Helen Treichel, Doutorado - Universidade Federal da Fronteira Sul (Uffs)

Prof.a Tatiane Brugnari, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 31/10/2020.

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos vão primeiramente aos que nunca duvidaram do meu potencial e que sempre me incentivaram a sempre buscar estudar mais e mais. Obrigada pai (Irineu), mãe (Natalia) e mano (Helinton), eu amo vocês mais do que tudo.

Meus agradecimentos também vão à família que eu formei quando mudei para Curitiba. Obrigada Eduarda e Viviane por cada segundo que vivemos juntas. Obrigada também Ketinny, Helen, Fernando, Pedro e Renata, que foram os melhores colegas e amigos que eu poderia ter no mestrado e agora na vida. Amo todos vocês.

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk e Profa. Dra. Giselle Maria Maciel, por todo conhecimento transferido, por me aceitarem e acreditarem no meu trabalho e por nunca medirem esforços para que eu tivesse todos os recursos necessários para realizar o meu trabalho.

Não posso deixar de agradecer também ao grupo maravilhoso do laboratório de Biotecnologia. Tatiane, Débora, Raquel, Dayane, Matheus, Camila, Bruno, Isabella, Roberta, Marcelo e Profa. Dra. Marlene, vocês fizeram os meus dias muito mais felizes.

Agradeço a todos os meus amigos, que estão na minha vida desde a infância e nunca se fizeram ausentes mesmo a quilômetros de distância. Minha vida é muito melhor tendo o amor e o apoio de vocês. Taís, Paola, Keli, Artur, Alexandre, Anderson, Daiana, Willian, Mariana, Nathalie e Juliandra, obrigada por serem os melhores amigos do mundo.

Agradeço ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CEM-UFPR) e ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pelo auxílio com as análises realizadas.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA), que contribuíram para minha formação. À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pela disponibilidade da estrutura e dos recursos necessários. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa-Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

“Por mais longa que seja a caminhada, o mais importante é dar o primeiro passo”.

(Vinícius de Moraes)

RESUMO

MODKOVSKI, T. A. **Adsorção e biodegradação de corantes de efluente têxtil utilizando partículas magnéticas e lacase.** 2020. 95 f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2020.

Os corantes fazem parte de um grupo importante de contaminantes orgânicos e causam impactos aos ambientes aquáticos e aos humanos, quando descartados em efluentes sem o devido tratamento. A combinação de métodos físico químicos com biológicos para o tratamento de efluentes têxteis, tem surgido como uma alternativa promissora. Dentre os métodos de tratamento biológicos, a biodegradação utilizando enzimas lacase imobilizadas em suportes magnéticos é considerada uma alternativa ambientalmente correta, sem a geração de lodo e que tem demonstrado eficiência. Partículas magnéticas de óxido de ferro apresentam vantagens na imobilização enzimática, como baixos custos de síntese, fácil separação, baixa toxicidade e compatibilidade com biomateriais. Além disso, partículas magnéticas têm sido relatadas como materiais utilizados na adsorção de diferentes poluentes, dentre eles os corantes. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a adsorção de corantes têxteis em partículas magnéticas (PMag) e comparar com o processo simultâneo de adsorção e biodegradação dos corantes após a imobilização das enzimas lacase nas partículas magnéticas (Lac-PMag). Para tanto, as enzimas lacase foram produzidas comparando a produção a partir de fungos da podridão branca e as PMag de óxido de ferro foram sintetizadas pelo método de aquecimento e irradiação em micro-ondas. Inicialmente, as PMag foram testadas quanto a capacidade de adsorção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*. Após, a imobilização das enzimas lacase de *Trametes villosa* foi realizada pela funcionalização das partículas utilizando APTES ((3-aminopropil)triétoxissilano) e glutaraldeído. Os resultados demonstraram capacidade de adsorção das PMag para ambos os corantes, com mais de 95 % de eficiência de remoção quando foram utilizadas as menores concentrações de corantes. Além disso, a capacidade de remoção dos corantes se manteve em 6 ciclos consecutivos de adsorção e dessorção. A imobilização das enzimas lacase apresentou rendimento de imobilização igual a $99,85 \pm 0,18$ % e atividade recuperada de $46,18 \pm 0,2$ %. No processo simultâneo de adsorção e biodegradação dos corantes, as Lac-PMag apresentaram o dobro de eficiência de remoção nas concentrações mais altas dos corantes, quando comparadas com as PMag. A capacidade de remoção dos corantes pelas Lac-PMag foi de $52,72 \pm 1,23$ e $57,47 \pm 2,38$ mg g⁻¹, para o *Acid Blue 277* e o *Acid Black 172*, respectivamente. Dessa forma, os resultados obtidos apresentaram alternativas promissoras para o tratamento de efluentes têxteis. As PMag sintetizadas demonstram eficiência na adsorção dos corantes têxteis *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*. Já as Lac-PMag demonstraram eficiência no processo simultâneo de adsorção e biodegradação em altas concentrações dos corantes, utilizando uma baixa quantidade de enzimas lacase no processo de imobilização, o que torna essa tecnologia ainda mais eficiente e econômica.

PALAVRAS CHAVE: Tratamento de efluentes. Corantes ácidos. Imobilização enzimática. Biorremediação.

ABSTRACT

MODKOVSKI, T. A. **Adsorption and biodegradation of textile effluent dyes using magnetic particles and laccase.** 2020. 95 p. Master Thesis (Master in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2020.

Dyes are part of an important group of organic contaminants and cause impacts on aquatic environments and humans, when disposed of in effluents without proper treatment. The combination of physical chemical and biological methods to treat textile effluents, has emerged as a promising alternative. Among the biological treatment methods, biodegradation using laccase enzymes immobilized on magnetic supports is considered an environmentally friendly alternative, without sludge generation and which has shown efficiency. Magnetic iron oxide particles have advantages in enzymatic immobilization, such as low synthesis costs, easy separation, low toxicity and compatibility with biomaterials. In addition, magnetic particles have been reported as materials used in the adsorption of different pollutants, including dyes. In this context, the present work aimed to evaluate the adsorption of textile dyes on magnetic particles (PMag) and compare with the simultaneous process of adsorption and biodegradation of dyes after the immobilization of laccase enzymes in the magnetic particles (Lac-PMag). For this purpose, the laccase enzymes were produced by comparing the production from white rot fungi and the iron oxide PMag were synthesized by the microwave heating and irradiation method. First, PMag were tested for the adsorption capacity of Acid Blue 277 and Acid Black 172 dyes. Afterwards, the laccase enzymes of *Trametes villosa* were immobilized by the functionalization of particles using APTES ((3-aminopropyl) triethoxysilane) and glutaraldehyde. The results showed PMag adsorption capacity for both dyes, with more than 95% removal efficiency when the lowest dye concentrations were used. In addition, the dye removal capacity was maintained in 6 consecutive adsorption and desorption cycles. The immobilization of laccase enzymes showed immobilization yield equal to $99.85 \pm 0.18\%$ and recovered activity of $46.18 \pm 0.2\%$. In the simultaneous process of adsorption and biodegradation of dyes, the Lac-PMag showed twice of removal efficiency at the highest concentrations of dyes, compared with PMag. The Lac-PMag dyes removal capacity was 52.72 ± 1.23 and $57.47 \pm 2.38 \text{ mg g}^{-1}$, for Acid Blue 277 and Acid Black 172, respectively. Thus, the results obtained presented promising alternatives for textile effluents treatment. The synthesized PMag demonstrate efficiency in the adsorption of the textile dyes Acid Blue 277 and Acid Black 172. The Lac-PMag demonstrated efficiency in the simultaneous process of adsorption and biodegradation in high concentrations of dyes, using a low amount of laccase enzymes in immobilization process, which makes the technology even more efficient and economical.

KEYWORDS: Wastewater treatment. Acid dyes. Enzymatic immobilization. Bioremediation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos corantes Acid Black 172 (A) e Acid Blue 277 (B).	21
Figura 2. Estrutura tridimensional de lacase fúngica (<i>Trametes versicolor</i>). (D1: Domínio1; D2: Domínio 2; D3: Domínio 3 e Cu: Cobre).	30
Figura 3. Principais métodos de imobilização enzimática.	32
Figura 4. Fluxograma representando a metodologia utilizada na pesquisa.	35
Figura 5. PMag expostas a um campo magnético (ímã).	48
Figura 6. Esquema da imobilização das enzimas lacase nas PMag.	50
Figura 7. Efeito do pH na atividade enzimática das enzimas livres e imobilizadas.	52
Figura 8. Estabilidade operacional das enzimas lacase imobilizadas.	53
Figura 9. Estabilidade de armazenamento das enzimas livres e imobilizadas à -4 °C.	54
Figura 10. Gráficos da determinação do ponto de carga zero das PMag (A) e das Lac-PMag (B).	55
Figura 11. Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão das PMag com aumentos de 8.000 (A), 40.000 (B), 3.000 (C) e 20.000 vezes (D).	56
Figura 12. Fotomicrografias de microscópio eletrônico de varredura: PMag com aumento de 500 vezes (A) e 5000 vezes (B); Lac-PMag com aumento de 500 (C) e 5000 vezes (D).	58
Figura 13. Espectros no infravermelho das PMag, PMag-func e Lac-PMag.	60
Figura 14. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na remoção dos corantes Acid Blue 277 e Acid Black172 pelo adsorvente PMag. (10 mL de solução; concentração inicial de corante: 50 mg L ⁻¹ ; dosagem do adsorvente (PMag): 25 mg).	61
Figura 15. Efeito do tempo de contato na adsorção dos corantes Acid Blue 277 e Acid Black 172. (10 mL de solução; pH 3; concentração inicial de 50 mg L ⁻¹ ; dosagem do adsorvente (PMag): 25 mg; temperatura: 30°C).	62
Figura 16. Modelos de cinética Pseudo-primeira ordem, Pseudo-segunda ordem e Elovich para a adsorção dos corantes <i>Acid Blue 277</i> (A) e <i>Acid Black 172</i> (B) nas PMag.	64
Figura 17. Eficiência de remoção em relação ao aumento da concentração inicial para os corantes Acid Blue 277 e do Acid Black 172. (10 mL de solução; pH 3; tempo de reação: 120 minutos; dosagem do adsorvente: 25 mg; temperatura: 30 °C).	65
Figura 18. Modelos de isotermas Freundlich, Langmuir, Sips e Temkin para a adsorção dos corantes Acid Blue 277 (A) e Acid Black 172 (B) nas PMag.	67

Figura 19. Eficiência do reúso das PMag na adsorção do corante Acid Blue 277. (Eficiência de remoção nas condições pH 3; concentração de corante 25 mg L ⁻¹ ; dosagem do adsorvente: 25 mg; temperatura: 30°C).....	68
Figura 20. Efeito do tempo na adsorção e biodegradação dos corantes Acid Blue 277 (A-B) e Acid Black 172 (C-D). (10 mL de solução; pH 3; concentração inicial de corante: 50 mg L ⁻¹ ; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL ⁻¹ ; temperatura: 30°C).....	71
Figura 21. Efeito da concentração inicial na adsorção e biodegradação dos corantes Acid Blue 277 (A-B) e Acid Black 172 (C-D). (10 mL de solução; pH 3; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL ⁻¹ ; temperatura: 30°C; 120 minutos).....	73
Figura 22. Eficiência do reúso das Lac-PMag na adsorção e biodegradação dos corantes Acid Blue 277 e Acid Black 172 (Eficiência de remoção nas condições pH 3; concentração de corante: 50 mg L ⁻¹ ; dosagem das Lac-PMag: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL ⁻¹ ; temperatura: 30°C).	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de aplicações de partículas magnéticas de óxido de ferro no tratamento de águas residuárias.	23
Quadro 2. Modelos e equações para calcular os parâmetros de cinética e isothermas.	27
Quadro 3. Compostos utilizados na funcionalização de suportes magnéticos para imobilização de lacases.	32
Quadro 4. Exemplos de aplicações de lacases imobilizadas na biodegradação de corantes...	33
Quadro 5. Cor dos diferentes tipos de óxido de ferro.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de lacases por fungos da podridão branca em cultivo semissólido estático após 7 dias de incubação.	46
Tabela 2. Rendimento de imobilização e Atividade recuperada das enzimas lacase nas três condições iniciais avaliadas.	51
Tabela 3. Resultados de EDS da composição química das PMag e das Lac-PMag (Dados em % de massa).	59
Tabela 4. Parâmetros cinéticos para a adsorção dos corantes Acid Blue 277 e Acid Black 172 nas PMag.	63
Tabela 5. Parâmetros dos modelos de isotermas para a adsorção dos corantes Acid Blue 277 e Acid Black 172 nas PMag.	66
Tabela 6. Efeito do pH na adsorção e biodegradação dos corantes Acid Blue 277 e Acid Black 172. (10 mL de solução; concentração inicial de corante: 50 mg L ⁻¹ ; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL ⁻¹ ; temperatura: 30°C).	69
Tabela 7. Efeitos da temperatura na adsorção e biodegradação dos corantes Acid Blue 277 e Acid Black 172. (10 mL de solução; pH 3; concentração inicial de corante: 50 mg L ⁻¹ ; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL ⁻¹).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico
APTES	3-aminopropil)trietoxissilano
AR	Atividade recuperada
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
Lac-PMag	Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOfs	<i>Metal-Organic Frameworks</i>
PCZ	Ponto de carga zero
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PMag	Partículas magnéticas
PMag-func	Partículas magnéticas funcionalizadas com APTES e glutaraldeído
RI	Rendimento de imobilização

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 A indústria têxtil e a geração de efluentes	19
3.2 Corantes têxteis	20
3.3 Partículas magnéticas	22
3.4 Adsorção	24
3.4.1 Cinética e isotermas.....	25
3.5 Biodegradação de corantes	28
3.6 Enzimas lacase	29
3.7 Imobilização de enzimas	30
4 METODOLOGIA	35
4.1 Materiais e reagentes	36
4.2 Produção do extrato enzimático	36
4.3 Síntese das partículas magnéticas de óxido de ferro	37
4.4 Imobilização das enzimas lacase nas PMag	37
4.5 Determinação da atividade enzimática da lacase	38
4.6 Ponto de carga zero	38
4.7 Caracterização das partículas	39
4.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão.....	39
4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva	39
4.7.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	39
4.8 Caracterização das enzimas imobilizadas	40

4.8.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática das enzimas lacase	40
4.8.2 Estabilidade operacional das enzimas imobilizadas	40
4.8.3 Estabilidade de armazenamento das enzimas imobilizadas	40
4.9 Preparo das soluções de corantes e análise da remoção dos corantes	41
4.10 Adsorção dos corantes pelas partículas magnéticas (PMag)	41
4.10.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura no processo de remoção de cor	41
4.10.2 Cinética da adsorção	42
4.10.3 Isotermas da adsorção	42
4.10.4 Dessorção e reúso	43
4.11 Processo combinado de adsorção e biodegradação dos corantes pelas lacases imobilizadas nas partículas magnéticas (Lac-PMag)	43
4.11.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura no processo de remoção de cor	43
4.11.2 Estudo dos efeitos do tempo de processo	44
4.11.3 Estudo dos efeitos da concentração inicial dos corantes	44
4.11.4 Reúso	45
4.12 Análises estatísticas	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Produção do extrato enzimático	46
5.2 Síntese das partículas magnéticas (PMag)	48
5.3 Imobilização das enzimas lacase	49
5.4 Ponto de carga zero	54
5.5 Caracterização das partículas magnéticas	56
5.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	56
5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	57
5.5.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier	59
5.6 Adsorção dos corantes pelas partículas magnéticas (PMag)	60

5.6.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura	60
5.6.2 Cinética de adsorção.....	62
5.6.3 Isotermas de adsorção.....	64
5.6.4 Dessorção e reúso	67
5.7 Processo combinado de adsorção e biodegradação dos corantes pelas lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.....	68
5.7.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura	69
5.7.2 Estudo dos efeitos do tempo de processo	70
5.7.3 Estudo dos efeitos da concentração inicial dos corantes	72
5.7.4 Reúso.....	75
6 CONCLUSÕES.....	76
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Efluentes provenientes das indústrias do setor têxtil representam na atualidade um grave problema ambiental. Estas indústrias constituem uma parcela importante na economia mundial e são responsáveis por um alto consumo de água, sendo que 20 % da poluição industrial da água é resultante desse setor (WONG et al., 2019).

A principal característica desses efluentes é a coloração, resultante da adição de corantes no processo de fabricação, os quais não possuem fixação completa na fibra durante o processo de tingimento e são liberados juntamente com o efluente para o ambiente (KHATRI et al., 2015). Além disso, efluentes têxteis possuem outras características, como demanda química de oxigênio (DQO) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) elevadas, presença de sais e metais, toxicidade e, em alguns casos, mutagenicidade, tornando-se prejudiciais não apenas ao ambiente como também aos seres humanos (CHHABRA; MISHRA; SREEKRISHNAN, 2015a; YASEEN; SCHOLZ, 2019).

Os corantes são moléculas orgânicas complexas de difícil degradação. Devido à forte coloração, a presença desses corantes nos corpos hídricos impede a penetração de luz, o que acarreta na redução da atividade fotossintética, inibindo o crescimento da biota aquática (MONTE BLANCO et al., 2017; ZHANG et al., 2019).

Para resolver esse problema, diferentes métodos físico-químicos são comumente empregados no tratamento de efluentes contendo corantes. No entanto, nem sempre essas tecnologias são eficazes para a descoloração completa do efluente devido à estrutura molecular complexa dos corantes, além de possuírem desvantagens importantes, tais como altos custos operacionais e alta demanda de energia (CHOWDHURY et al., 2011).

Nesse contexto, são desejáveis tecnologias alternativas que apresentem eficiência e um maior custo-benefício em relação ao ponto de vista econômico e ambiental. A combinação de métodos físico-químicos e biológicos tem sido sugerida como uma alternativa importante para o desenvolvimento de processos de tratamento sustentáveis (CHHABRA; MISHRA; SREEKRISHNAN, 2015a).

A utilização de processos biológicos, baseados na utilização de microrganismos ou na utilização de enzimas, apresentam-se como alternativas de grande potencial. Dentre esses processos, pode-se citar o emprego das enzimas lacases que são polifenoloxidasas utilizadas em diversas reações oxidativas enzimáticas para a degradação de uma variedade de compostos fenólicos e não fenólicos (BALDRIAN, 2006; YAROLOV et al., 1994). Essas enzimas têm

sido estudadas em várias aplicações biotecnológicas. Na indústria alimentícia é capaz de eliminar compostos fenólicos indesejados no processamento de sucos, vinhos e cervejas, na indústria do papel, branqueia o papel além de degradar poluentes ambientais altamente recalcitrantes e corantes sintéticos (CARDOSO et al., 2018; MOROZOVA et al., 2007).

Para aplicação industrial, o elevado custo das enzimas, a dificuldade de separação destas do produto final e a inativação térmica e por solventes, muitas vezes impossibilitam a sua aplicação. Uma das principais alternativas para tornar o processo atrativo é a imobilização das enzimas em um suporte inerte. Esse processo permite a fácil separação após a reação, confere maior estabilidade operacional ao catalisador enzimático e permite a sua reutilização (CAO, 2005; KOPP et al., 2015).

Dentre os diferentes suportes utilizados, as partículas magnéticas vêm ganhando destaque por apresentarem características ideais para imobilização de enzimas. Esses suportes mostram-se atrativos devido às fortes propriedades magnéticas, facilitando a separação sob a ação de um campo magnético (MOHAMMED et al., 2017).

Por outro lado, as partículas magnéticas são caracterizadas por serem uma classe importante de adsorventes ideais. Essas partículas recebem ampla atenção devido ao seu baixo custo, fácil controle, não toxicidade e, principalmente, devido a capacidade de resposta magnética que facilita sua reciclagem e reuso (ZHANG et al., 2019).

Nesse contexto, desenvolver novos materiais e tecnologias para o tratamento de efluentes torna-se indispensável. O uso do processo simultâneo de adsorção e biodegradação de corantes têxteis utilizando enzimas lacase imobilizadas em suportes magnéticos é pouco relatado. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a adsorção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* utilizando como adsorvente partículas magnéticas de óxido de ferro e comparar com o processo simultâneo de adsorção e biodegradação dos corantes após a imobilização das enzimas lacase nessas partículas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a adsorção de corantes têxteis a partir de partículas magnéticas e comparar com o processo simultâneo de adsorção e biodegradação após a imobilização das enzimas lacase nessas partículas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar pelo método de precipitação e irradiação em micro-ondas as partículas magnéticas de óxido de ferro;
- Imobilizar as enzimas lacase nas partículas magnéticas e realizar um estudo de comparação entre as enzimas livres e imobilizadas;
- Caracterizar as partículas (livres e conjugadas com enzimas) por meio de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV-EDS), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR);
- Avaliar a adsorção dos corantes têxteis *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* nas partículas magnéticas e ajustar os dados experimentais a modelos cinéticos e de isothermas;
- Avaliar o processo simultâneo de adsorção e biodegradação dos corantes têxteis *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* a partir das enzimas lacase imobilizadas nas partículas magnéticas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A indústria têxtil e a geração de efluentes

A indústria têxtil está entre as maiores consumidoras de água em seu processo produtivo e, portanto, entre as maiores geradoras de grandes volumes de efluentes. Estima-se que são gerados entre 200 e 350 L de efluente por kg de tecido produzido (PADHIYAR et al., 2020).

Entre os principais parâmetros indicadores de poluição dos efluentes têxteis, destacam-se as altas concentrações de DQO e DBO, alta coloração, pH, sólidos suspensos, metais, temperatura, sais e resíduos de baixa biodegradabilidade (YASEEN; SCHOLZ, 2019). O pH dos despejos varia entre 6 e 10, a temperatura de 35 a 45 °C, o teor de sólidos em suspensão de 15 a 8.000 mg L⁻¹, a DBO de 80 a 6.000 mg L⁻¹, a DQO de 150 a 12.000 mg L⁻¹ e a cor depende do corante usado com predominância (ANANTHASHANKAR, 2013). No entanto, dentre os inúmeros contaminantes presentes, o maior problema no tratamento de efluentes têxteis origina-se pela presença de corantes.

Anualmente, estima-se que 700 mil toneladas de corantes são fabricadas em todo o mundo e uma quantidade significativa é perdida durante o processo produtivo das indústrias (BURKINSHAW; SALIHU, 2013; GUPTA; SUHAS, 2009). Aproximadamente 20% a 50% dos corantes da indústria têxtil acabam sendo descartados na água de lavagem devido à má fixação durante a etapa de tintura (ZANONI; YANAMAKA, 2016).

No corpo hídrico, pequenas quantidades de corantes, afetam a sua característica estética, sua transparência e a solubilidade de gases. Devido a isso, a transmissão da luz solar é afetada, o que dificulta a atividade fotossintética realizada pelas plantas existentes nesse ecossistema. Além do que, a oxidação biológica dos corantes consome o oxigênio dissolvido presente no meio, afetando a vida dos organismos ali presentes e em consequência, causa o aumento da DBO. De uma forma geral, os efluentes têxteis contendo corantes podem ser tóxicos, cancerígenos e mutagênicos para humanos e outros organismos (LALNUNHLIMI; VEENAGAYATHRI, 2016; ROY et al., 2018).

A restrição nas leis e normas ambientais e o surgimento de mercados mais competitivos, vêm exigindo que as empresas atuem de maneira mais eficiente do ponto de vista produtivo e ambiental (FREIRE; FREITAS, 2010). A Resolução nº. 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), descreve que o efluente de qualquer fonte poluidora só poderá ser lançado direta ou indiretamente nos corpos hídricos se não ocasionar

ou possuir potencial para acarretar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor (CONAMA, 2005).

As técnicas de tratamento para remoção desses corantes utilizadas atualmente baseiam-se em processos de adsorção, coagulação, flotação, sedimentação, floculação, precipitação, troca iônica, separação por membrana e métodos eletroquímicos (KUNZ et al., 2002; RAMÍREZ-MONTOYA et al., 2015). No entanto, os corantes apresentam resistência à algumas dessas técnicas e, além disso, esses processos em geral possuem altos custos e eficiência limitada (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013).

Novas tecnologias, que sejam mais eficientes e de baixo custo, têm sido buscadas para o tratamento ou degradação destes compostos presentes em efluentes têxteis. Dessa forma, tem crescido o interesse por processos biotecnológicos que visem diminuir o alto custo do tratamento dos efluentes e que sejam realmente eficientes (KHELIFI et al., 2009).

3.2 Corantes têxteis

Corantes podem ser definidos como substâncias intensamente coloridas que, quando aplicados a um material, lhe conferem cor e podem ser empregados na coloração de diferentes substratos, tais como: alimentos, cosméticos, plásticos, materiais têxteis, entre outros. Os corantes e pigmentos de acabamento têxtil são numerosos e podem chegar a 100.000 diferentes tipos no mercado sendo produzidas cerca de 700.000 toneladas anualmente (BERRADI et al., 2019).

A solubilidade é o que difere os corantes dos pigmentos, uma vez que os corantes são solúveis no meio em que são aplicados e os pigmentos são insolúveis (CHENGALROYEN; DABBS, 2013). Os corantes têxteis sintéticos, são compostos orgânicos cuja finalidade é conferir cor às fibras, sob condições de processo pré-estabelecidas. Esses compostos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, baseada no grupo cromóforo dos corantes, ou pelo modo com que o mesmo é fixado à fibra têxtil, podendo ser corantes reativos, diretos, azoicos, ácidos, à cuba, de enxofre, catiônicos, dispersos, pré-metalizados, solventes e branqueadores (SINGH; SINGH; SINGH, 2015; ZANONI; YANAMAKA, 2016).

A classe de corantes ácidos é caracterizada por fixar a cor às fibras por interação iônica, forças de *Van der Waals* ou pontes de hidrogênio em meio neutro ou ácido. Essa ligação ocorre pela interação dos sítios negativos do corante com os sítios positivos das fibras. O peso molecular dessa classe de corantes é relativamente baixo com grupos sulfônicos em sua

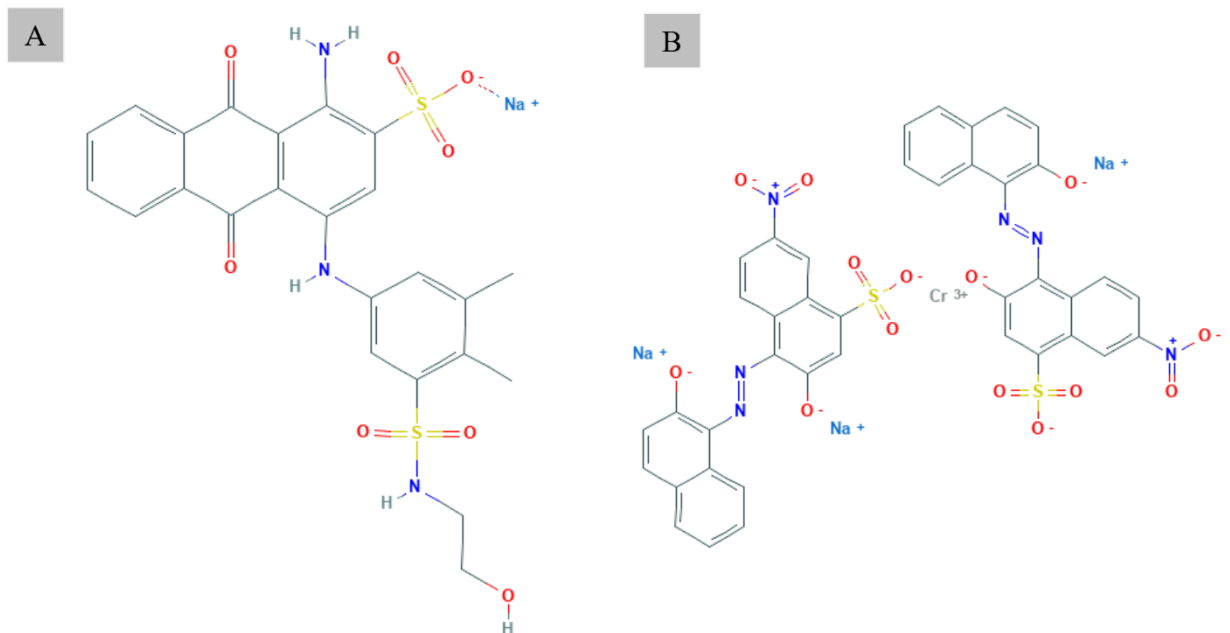
estrutura química e com grupos cromóforos podendo ser azo, antraquinona e trifenilmetano. Esses corantes possuem um baixo grau de fixação, o que acarreta em grande perda do corante durante o processo de lavagem das fibras, levando a um efluente complexo (ZANONI; YANAMAKA, 2016). Dentre os corantes ácidos, encontram-se os corantes *Acid Black 172* e *Acid Blue 277*.

O corante *Acid Black 172* (Figura 1A) possui como grupo cromóforo uma ou mais ligações azo ($N = N-$). Essa estrutura azo não é encontrada de forma natural na natureza, o que a torna difícil de degradar (CHENGALROYEN; DABBS, 2013). Os corantes azo são os mais utilizados na indústria têxtil devido a facilidade de síntese e a estabilidade química desses compostos (SINGH; SINGH; SINGH, 2015).

O *Acid Blue 277* (Figura 1B) possui o composto antraquinona como grupo cromóforo, sendo o segundo grupo de corantes mais utilizados devido ao preço atrativo e bom desempenho de tingimento. Os corantes com o grupo antraquinona são mais tóxicos para os microrganismos e células humanas do que os corantes azo devido sua estrutura complexa e estável (LI et al., 2019a).

Sendo assim, efluentes industriais contendo altos níveis de corantes ácidos devem ser tratados antes do descarte no meio ambiente, o que tem sido o maior desafio para as indústrias têxteis (SATAPATHY; BANERJEE; DAS, 2015).

Figura 1. Estrutura química dos corantes *Acid Black 172* (A) e *Acid Blue 277* (B).



Fonte: Pubchem (2020).

3.3 Partículas magnéticas

As partículas magnéticas, as quais podem ser sintetizadas em uma ampla escala (nm até μm), são caracterizadas por direcionarem sua movimentação na presença de um campo magnético e possuem diferentes características como grande proporção de área superficial e volume, baixo custo de síntese, baixa toxicidade e compatibilidade com biomateriais (IRANIFAM, 2013; SAHOO et al., 2019).

Diferentes métodos são utilizados para a síntese de partículas magnéticas, sendo os mais utilizados a co-precipitação, decomposição térmica e síntese hidrotérmica (APHESTEGUY et al., 2015). Outro método simples e economicamente viável para a produção de micropartículas magnéticas, é o método de precipitação por irradiação em micro-ondas, utilizando sais de ferro em solução com pH elevado (POSPISKOVA; PROCHAZKOVA; SAFARIK, 2013).

Essas partículas, especialmente as de ferro, possuem diferentes aplicações relatadas na literatura, como adsorção de metais pesados e corantes, fotocatalise para degradação de diferentes compostos, magnetização de células, imobilização enzimática, biosensor e em aplicações na biomedicina (ABDULLAH et al., 2019; APHESTEGUY et al., 2015; KOPP et al., 2015; MOHAMMED et al., 2017; PATIL; KHAIRNAR; SHRIVASTAVA, 2016; POSPISKOVA; PROCHAZKOVA; SAFARIK, 2013).

O óxido de ferro, em suas diferentes formas, tem sido estudado para a produção de nanocompósitos magnéticos. A magnetita é a mais utilizada dentre essas formas e é altamente explorada por possuir características como baixa toxicidade, superparamagnetismo e biocompatibilidade. Os nanomateriais de óxido de ferro, produzidos a partir da forma magnetita, apresentam aplicações com forte potencial no tratamento de efluentes devido à excelente capacidade de adsorção, fácil separação, reutilização e maior estabilidade (ABDULLAH et al., 2019). O Quadro 1 apresenta alguns exemplos da utilização de nanopartículas e micropartículas de óxido de ferro, associadas ou não a outro material, no processo de adsorção de poluentes de águas residuárias.

Ainda devido às suas propriedades de magnetização, biocompatibilidade e baixa toxicidade, o óxido de ferro é relatado na utilização em sistemas de catálise enzimática. A modificação de microrganismos e enzimas com nanopartículas magnéticas permite que o material imobilizado seja facilmente manipulado sob um campo magnético aplicado (QIU et al., 2018).

O primeiro estudo a utilizar a separação magnética em biotecnologia foi publicado em 1973, onde os autores utilizaram a sílica e celulose, ambas com óxido de ferro, como matriz para imobilizar duas enzimas: α -quimotripsina e β -galactosidase, visando posteriores aplicações em biorreatores. A partir desse estudo, a separação magnética tem sido investigada como uma ferramenta interessante no processo de separação de moléculas biológicas e células (ROBINSON; DUNNILL; LILLY, 1973).

Quadro 1. Exemplos de aplicações de partículas magnéticas de óxido de ferro no tratamento de águas residuárias.

Produto	Contaminante	Modo de ação	Referência
Carboxilato-pilar [5] areno modificado com nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄	Corantes catiônicos	Adsorção	(ZHANG et al., 2019)
Microesferas magnéticas de quitosana	Corante <i>Acid Blue</i>	Adsorção	(XU et al., 2019)
Nanocompósito de MnFe ₂ O ₄ e quitosana	Cromo hexavalente	Adsorção	(XIAO; LIANG; WANG, 2013)
Micropartículas magnéticas de quitosana funcionalizadas com dendrímeros de poliamidoamina	Corante <i>Reactive Blue 21</i>	Adsorção	(WANG et al., 2015)
Nanopartículas magnéticas de Fe ₃ O ₄	Metais	Adsorção	(SHEN et al., 2009)
Nanopartículas magnéticas de quitosana	Cromo hexavalente	Adsorção	(THINH et al., 2013)
Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro funcionalizadas com amina	Corante <i>Congo Red</i>	Adsorção	(SAHOO et al., 2019)
Levedura inativada modificada por nanopartículas de Fe ₃ O ₄	Patulina	Adsorção	(QIU et al., 2018)
Nanocompósito magnético de polianilina – Fe ₃ O ₄	Corante <i>Acid violet 19</i>	Fotocatálise	(PATIL; KHAIRNAR; SHRIVASTAVA, 2016)
Nanocompósito de zeólito de cinzas volantes e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	Corantes	Adsorção	(FUNGARO et al., 2012)
Nanocompósito magnético de óxido de grafeno	Herbicida	Adsorção	(HAO et al., 2015)
Esteira de nanofibra de poliacrilonitrila com Fe ₃ O ₄	Cloridrato de tetraciclina	Adsorção	(LIU et al., 2015)
Compósito de Fe ₃ O ₄ /estruturas metal-orgânicas (MOFs)	<i>Methylene blue</i> e <i>Methyl violet</i>	Adsorção	(LI et al., 2015)

Fonte: Autoria própria (2020).

3.4 Adsorção

Devido a crescente busca por tecnologias alternativas aos tratamentos convencionais de efluentes contendo diferentes poluentes, a utilização de técnicas que sejam ecologicamente corretas tem crescido, visando substituir ou complementar esses tratamentos. Nesse contexto, a adsorção é relatada como uma alternativa simples para o tratamento de efluentes por ter um baixo custo inicial, possuir simplicidade de configuração e operação e por poder ser utilizada inclusive para substâncias perigosas (SAHOO et al., 2019).

Existem dois termos muito utilizados quando se fala de processos de sorção: a absorção e a adsorção. A absorção ocorre quando uma substância, em um estado físico, é incorporada por outra em estado físico diferente. Já a adsorção consiste na aderência física ou ligação de íons e moléculas na superfície de um material necessariamente sólido (GADD, 2009). Esses íons e moléculas são chamados de adsorvatos e o material a que eles se ligam são chamados de adsorventes. O processo de remoção do adsorvato da superfície do adsorvente é chamado de dessorção (NASCIMENTO et al., 2014).

Quando a matriz adsorvente é um material biológico, o mecanismo de sorção é denominado biossorção. Nesse caso, são utilizados organismos vivos, mortos ou alguns de seus componentes para remover, reter ou recuperar substâncias encontradas em uma determinada solução aquosa (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

A ligação entre o adsorvente e o adsorvato depende das espécies envolvidas e o processo de adsorção pode ser classificado em adsorção física, também conhecida como fisissorção ou adsorção química, também chamada de quimissorção. A quimissorção ocorre por forças de atração químicas, geralmente ligações covalentes, que agem entre a superfície do adsorvente e do adsorvato. Na fisissorção, as forças físicas como forças de *Van der Waals* ou eletrostáticas atuam entre a superfície do adsorvente e do adsorvato. Embora essa distinção seja conceitualmente útil, existem muitos casos intermediários em que nem sempre é possível classificar um determinado sistema de forma evidente (NASCIMENTO et al., 2014).

Diferentes adsorventes de baixo custo tem sido utilizados para a remoção de corantes de soluções aquosas, como por exemplo, minerais argilosos, resíduos agroindustriais, cinzas, lodos, resíduos biodegradáveis, entre outros (SAHOO et al., 2019). Além destes, materiais com características magnéticas têm sido relatados na literatura como adsorventes de corantes (MEHTA; MAZUMDAR; SINGH, 2015).

A adsorção é resultante de uma combinação entre os tipos de forças envolvidas entre o adsorvato e o adsorvente e é influenciada por uma série de fatores. Dentre esses fatores tem-se os relacionados com a natureza do adsorvente, tais como área superficial, tamanho dos poros, grupos funcionais presentes na superfície, densidade, e hidrofobicidade do adsorvente. As características do adsorvato que influenciam o processo de adsorção são o tamanho das partículas, polaridade, solubilidade e acidez ou alcalinidade. Por outro lado, os fatores relacionados às condições operacionais são temperatura em que ocorre o processo, pH, natureza do solvente e o tempo de contato entre as fases (NASCIMENTO et al., 2014). Dessa forma, esses fatores precisam ser avaliados em processos de adsorção de poluentes de águas residuárias.

3.4.1 Cinética e isotermas

Para explicar o processo de adsorção, o estudo cinético através de diferentes modelos matemáticos, fornece informações sobre a taxa de adsorção, os mecanismos de transferência de massa e o desempenho do adsorvente usado (PARK; YUN; PARK, 2010; WANG; GUO, 2020). Entre os vários modelos cinéticos relatados na literatura, os modelos Pseudo-primeira e Pseudo-segunda ordem, baseados na ordem das reações químicas, são os mais empregados. Esses modelos descrevem que a taxa de adsorção é proporcional ao número de locais livres na superfície do adsorvente (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

Além destes, outros modelos cinéticos podem ser empregados, como o modelo de Difusão intrapartículas e de Elovich. O modelo de Difusão intrapartículas fornece informações sobre os mecanismos e as etapas de controle de taxa que afetam a cinética do processo de adsorção. Em conformidade com este modelo, a adsorção acontece em 3 etapas, primeiro ocorre a difusão de massa externa, depois a difusão intrapartículas e por último a adsorção no interior do adsorvente poroso. Os dois primeiros estágios são os passos mais lentos, enquanto o terceiro estágio é muito rápido (RANGABHASHIYAM; BALASUBRAMANIAN, 2019).

A equação de Elovich pressupõem que as superfícies sólidas reais são energeticamente heterogêneas e ela é apropriada para processos que envolvem a adsorção química de gases na superfície sólida. Além disso, o modelo descreve que a dessorção e as interações entre as espécies adsorvidas não afetam substancialmente a cinética de adsorção (RANGABHASHIYAM; BALASUBRAMANIAN, 2019).

Durante o processo de adsorção, a concentração do adsorvato decresce com o tempo até atingir um estado de equilíbrio, ou seja, as moléculas ou íons do adsorvato em meio aquoso fluirão para o adsorvente até que a concentração do mesmo na fase líquida permaneça constante. Quando o sistema atinge esse estado, a quantidade adsorvida neste tempo retrata a capacidade de adsorção do adsorvente no equilíbrio em condições pré-estabelecidas (NASCIMENTO et al., 2014).

As isotermas baseiam-se em relações termodinâmicas que descrevem o equilíbrio do processo de biossorção, sendo que o tempo ótimo de contato e as melhores condições operacionais determinadas na cinética são utilizados para realização do estudo. Elas são a relação de equilíbrio entre a concentração no soluto e a concentração adsorvida a uma dada temperatura. Dessa forma, as isotermas demonstram como ocorre a distribuição do soluto entre as fases líquida e sólida em diferentes concentrações de equilíbrio (MICHALAK; CHOJNACKA; WITEK-KROWIAK, 2013).

Diferentes modelos de isotermas já foram descritos, como a de Langmuir, Freundlich, Brunauer-Emmett-Teller, Redlich-Peterson, Dubinin-Radushkevich, Temkin, Toth, Koble-Corrigan, Sips, Khan, Hill, Flory-Huggins e Radke-Prausnitz (FOO; HAMEED, 2010). Sendo os mais utilizados na adsorção de corantes os modelos de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich, Sips e Temkin.

O Quadro 2 apresenta as equações dos modelos cinéticos Pseudo-primeira ordem, Pseudo-segunda ordem, Difusão intrapartículas e Elovich e dos modelos de isotermas Langmuir, Freundlich, Temkin e Sips.

A isoterma de Langmuir é o modelo mais utilizado e também o mais simples. Este modelo considera vários pressupostos como: todos os sítios de ligação possuem uma afinidade igual para o adsorvato; a adsorção é limitada à formação de uma monocamada no exterior da superfície do adsorvente e o número de espécies adsorvidas não excede o número total de locais de superfície. Dessa forma, o modelo admite que o adsorvente é estruturalmente homogêneo e que os sítios de ligação do adsorvente são idênticos e energeticamente equivalentes (GADD, 2009).

O modelo da isoterma de Freundlich é baseado em uma distribuição não ideal e reversível do adsorvato no material adsorvente, contendo infinitos sítios de ligação do adsorvente e ampliada para a adsorção multicamada. Este modelo retrata que ocorre a interação entre as moléculas adsorvidas e que a energia de adsorção decresce exponencialmente de acordo com a ocorrência da ligação das moléculas de adsorvato nos sítios de ligação. As constantes do

modelo fornecem informações sobre se o processo de adsorção ser favorável ou não (RANGABHASHIYAM; BALASUBRAMANIAN, 2019).

O modelo de isoterma de Temkin leva em consideração os efeitos das interações indiretas que ocorrem entre as moléculas de adsorvato. As isotermas de Temkin consideram que o processo de adsorção é definido por uma distribuição uniforme da energia de ligação, atingindo um máximo de ligações. Além disso, considera que o calor de adsorção de todas as moléculas da camada diminui linearmente com o grau de cobertura, em consequência das interações que ocorrem entre o adsorvente e o adsorvato (NASCIMENTO et al., 2014; FOO; HAMEED, 2010).

O modelo de isoterma de Sips representa um arranjo das isotermas de Langmuir e Freundlich. Dessa forma, nas baixas concentrações de adsorvato este modelo se reduz efetivamente ao modelo de Freundlich. Já, em altas concentrações de adsorvato, o modelo prediz uma capacidade de adsorção em monocamada característica do modelo Langmuir (SIPS, 1948).

Quadro 2. Modelos e equações para calcular os parâmetros de cinética e isotermas.

Modelo	Equação		Referência
Modelos cinéticos			
Pseudo-primeira ordem	$qt = q_1 \times (1 - \exp(-k_1 \times t))$	1	(LAGERGREN, 1898)
Pseudo-segunda ordem	$qt = \frac{k_2 \times q_2^2 \times t}{1 + k_2 \times q_2 \times t}$	2	(HO; MCKAY, 1998)
Difusão intrapartículas	$qt = (k_d \times t^{0.5}) + C$	3	(WEBER; MORRIS, 1962)
Elovich	$qt = \frac{1}{b} \times \ln(1 + a \times b \times t)$	4	(WU; TSENG; JUANG, 2009)
Modelos de isotermas			
Langmuir	$q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e}$, $R_L = \frac{1}{1 + K_L C_e}$	5, 6	(LANGMUIR, 1918)
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n}$	7	(FREUNDLICH, 1906)
Temkin	$q_e = B_t \ln(A_t C_e)$	8	(TEMKIN; PYZHEV, 1940)
Sips	$q_e = \frac{q_{\max} (K_S C_e)^n}{1 + (K_S C_e)^n}$	9	(FERREIRA et al., 2018; SIPS, 1948)

Nota: qt é a capacidade de adsorção (mg g^{-1}) no tempo t (min), q_1 capacidade máxima de adsorção teórica (mg g^{-1}), k_1 constante cinética (min^{-1}), q_2 capacidade máxima de adsorção teórica (mg g^{-1}), k_2 constante cinética ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$), k_d coeficiente de Difusão intrapartículas ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-0.5}$), C constante de difusão na camada limite (mg g^{-1}), a taxa de adsorção inicial de Elovich ($\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$), b taxa de dessorção de Elovich (mg g^{-1}), q_e capacidade de adsorção no equilíbrio (mg g^{-1}), q_{\max} capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1}), C_e concentração da solução no equilíbrio (mg L^{-1}), K_L constante de Langmuir (L mg^{-1}), R_L fator de separação, n constante relacionada à heterogeneidade da superfície, K_F constante de Freundlich (L mg^{-1}), B_t constante relacionada ao calor de adsorção, A_t constante isotérmica de Temkin; k_S é a constante da isoterma de Sips, n representa o grau de heterogeneidade do sistema.

Fonte: Autoria própria (2020).

3.5 Biodegradação de corantes

Biodegradação é o decaimento ou a decomposição de materiais onde alguns microrganismos utilizam uma substância orgânica como fonte de carbono e energia, sendo considerado um dos mecanismos de degradação de contaminantes mais efetivos e menos prejudiciais ao meio ambiente (BILAL et al., 2019; VIJAYALAKSHMIDEVI; MUTHUKUMAR, 2015).

No processo de biodegradação, moléculas complexas de contaminantes são transformadas em moléculas menores e mais simples, de uma forma natural e geralmente catalisada por microrganismos autóctones. Esse processo pode ocorrer de diferentes formas: como uma modificação em uma molécula orgânica, permanecendo a estrutura principal sem nenhuma alteração; como sendo a desintegração de uma molécula orgânica complexa, de tal forma que os fragmentos possam ser reagrupados para se obter a estrutura original; e como sendo a total mineralização da molécula orgânica (AKSU, 2005).

Em relação aos corantes, a biodegradação consiste na degradação do corante por via enzimática, envolvendo consumo de energia. A quebra completa da molécula com a produção de água e dióxido de carbono e outros subprodutos inorgânicos caracteriza a mineralização (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013).

A eficiência dos processos de descoloração de corantes depende de diferentes fatores, tais como pH, sais, temperatura, a presença de poluentes orgânicos, da classificação e dos seus variados grupos substituintes (SOLÍS et al., 2012). Šekuljica e colaboradores (2015) avaliaram a capacidade da enzima Horseradish peroxidase e comprovaram a capacidade desta para remoção de cor dos corantes antraquinônicos *Acid blue 225* e *Acid Violet 109*, obtendo 94,7 e 89,36% de remoção de cor, respectivamente, sob as condições ideais de processo. Além disso, a partir desse estudo os autores verificaram que após o tratamento enzimático, ocorreu a redução da DQO, de carbono orgânico total e da toxicidade das soluções. Outros estudos também relatam a eficiência de enzimas peroxidase na biodegradação de corantes (BILAL et al., 2019; DARWESH; MATTER; EIDA, 2019; DUARTE BAUMER et al., 2018).

Outra enzima muito relatada na biodegradação de corantes é a enzima lacase (CARDOSO et al., 2018; HOU et al., 2004; NADAR; RATHOD, 2019; NADAROGLU et al., 2019; ORZECOWSKI et al., 2018; SONDHI et al., 2018). A lacase tem sido descrita como a principal enzima que promove a oxidação de compostos fenólicos e não fenólicos. Esta enzima é capaz de catalisar reações de desmetilação, onde ocorre a biodegradação de cadeias

poliméricas e decomposição de macromoléculas de lignina através do rompimento de anéis aromáticos em estruturas fenólicas (PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013).

3.6 Enzimas lacase

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores biológicos aumentando a velocidade das reações químicas que ocorrem nas células e organismos, sem se consumirem e sem interferirem no equilíbrio químico dessa reação (NELSON; COX, 2014).

As lacases são enzimas extracelulares pertencentes a um grupo de biocatalisadores, da subclasse das oxidases com um grande potencial em aplicações industriais e ambientais. Essas enzimas possuem a capacidade de oxidar, polimerizar ou transformar compostos fenólicos, não fenólicos e antropogênicos em derivados menos tóxicos (ORZECHOWSKI et al., 2018).

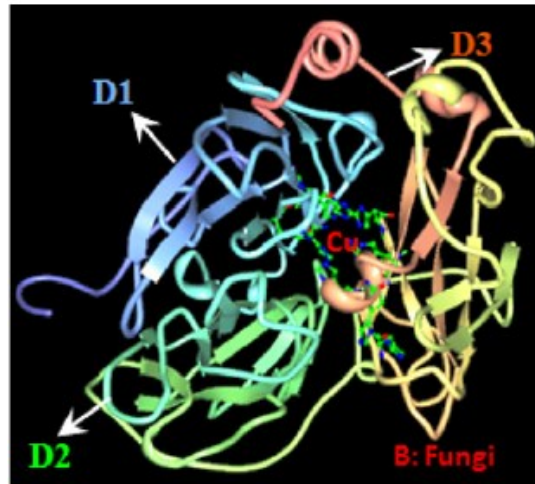
Algumas plantas, procariotos, insetos e fungos são fontes dessas enzimas. De acordo com a literatura, os melhores produtores são os fungos da podridão branca da madeira, que além de produzirem essas enzimas extracelularmente, produzem enzimas com maior potencial de redução em comparação ao potencial visto nas lacases obtidas a partir de outros organismos (ERKURT, 2015).

Oxidoredutases, como lacases, são enzimas que catalisam a redução do oxigênio (O_2) à água (H_2O) com a oxidação concomitante de substratos orgânicos (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013; HOFRICHTER et al., 2010; WONG, 2009). Conforme a estequiometria, são quatro moléculas de um substrato redutor para cada oxigênio molecular, envolvendo um total de quatro transferências de elétrons (WONG, 2009). A estequiometria da reação enzimática pode ser representada pela equação: $4RH + O_2 \rightarrow 4R + 2H_2O$, onde RH simboliza o substrato (DWIVEDI et al., 2011).

Lacases geralmente ocorrem como isoenzimas que se oligomerizam para formar complexos multiméricos. Como glicoproteínas diméricas ou tetraméricas, as lacases possuem quatro átomos de cobre por monômero. Esses locais de cobre são divididos em três grupos, centro de cobre Tipo-1 ou azul, centro de cobre Tipo-2 ou normal e centro de cobre Tipo-3 ou binuclear acoplado (DESKA; KOŃCZAK, 2019). Outra característica importante da estrutura da lacase é a porção de carboidratos ligados covalentemente, que contribui para sua estabilidade conformacional e proteção contra degradação de proteases (CLAUS, 2004). Em relação à estrutura tridimensional, as lacases são caracterizadas por possuírem três domínios semelhantes à cupredoxina arranjados sequencialmente (Figura 2) (DWIVEDI et al., 2011).

A redução do oxigênio à água é seguida da oxidação de substratos caracteristicamente fenólicos e seus derivados como *p*-difenois, *o*-difenois, polifenóis, poliaminas, arildiaminas, aminofenóis, hidroquinonas, assim como alguns íons inorgânicos (BERMEK; ERIKSSON, 2009).

Figura 2. Estrutura tridimensional de lacase fúngica (*Trametes versicolor*). (D1: Domínio1; D2: Domínio 2; D3: Domínio 3 e Cu: Cobre).



Fonte: Dwivedi et al. (2011).

As principais aplicações das lacases são referentes a indústria de polpa e papel, alimentícia, química sintética e biorremediação. Além disso, as lacases têm um grande potencial biotecnológico devido a sua habilidade de oxidar uma ampla gama de substratos que são utilizados em diversos setores industriais (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

3.7 Imobilização de enzimas

Uma das principais tendências na pesquisa envolvendo processos enzimáticos é sua modificação, melhoria de funções e otimização de seu desempenho para uso comercial como biocatalisadores (DESKA; KOŃCZAK, 2019). A imobilização é uma prática comum, definida como o processo pelo qual as enzimas passam a ser fisicamente confinadas, restringindo os graus de liberdade de movimento das mesmas pela união a um suporte. Desse modo, quando imobilizadas as enzimas tornam-se insolúveis facilitando o controle e a remoção do catalisador, possibilitando reutilizar a enzima muitas vezes, o que diminui os custos de aplicação do processo (JUN et al., 2019).

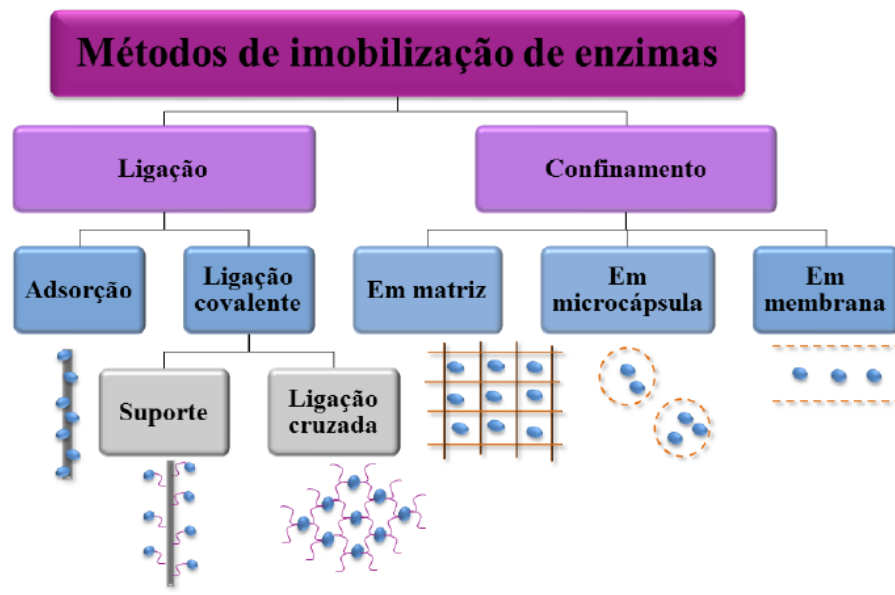
Diferentes parâmetros devem ser avaliados em um processo de imobilização enzimática, como a escolha do suporte, a técnica utilizada para imobilizar e as condições de operação. Os métodos de imobilização de enzimas podem ser classificados em (Figura 3): adsorção e/ou interações iônicas, onde a adesão da enzima no suporte se dá por meio de ligações fracas; confinamento dentro de uma rede polimérica; ligação cruzada (*Cross-linking*) da enzima com um agente bifuncional sem a ligação a um suporte e ligação covalente a um suporte insolúvel reativo (LIMA; ALMEIDA; PAULA, 2016).

Um suporte atraente para a imobilização enzimática pode possuir outras características além de tornar as enzimas insolúveis no meio, como por exemplo, o sistema de adsorção e biodegradação simultânea. Essas propriedades de materiais utilizados pra imobilização enzimática já é relatada, no qual materiais porosos, como carvão ativado (NGUYEN et al., 2016), cinzas (ROY et al., 2018), membranas fibrosas (XU et al., 2013), grafite e carvão de bambu (WANG et al., 2015) foram utilizados para imobilizar células. Nesse caso, o suporte exerce dupla função, onde fornece uma interface para acúmulo de biomassa e para adsorção do poluente alvo na superfície do suporte, promovendo ainda o contato do poluente com as células, o que resulta na aceleração do processo de degradação (LI et al., 2019a).

Suportes enzimáticos possuindo propriedades magnéticas também representam um benefício expressivo. Essas enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas da mistura de reação utilizando um campo magnético, como um ímã (SILVA; PINEDA; BERGAMASCO, 2015). Nesse contexto, a estratégia de biosseparação magnética é uma tecnologia promissora para recuperar enzimas imobilizadas e permitir a sua reutilização. Porém, para utilizar partículas magnéticas como suporte de imobilização enzimática, geralmente a superfície desses materiais precisa ser funcionalizada com grupos reacionais específicos para interagirem com moléculas biológicas (FORTES et al., 2017).

As enzimas possuem grupos reativos (amino, carboxil, sulfidril e grupos aromáticos) que agem na formação de ligações covalentes com o suporte de imobilização. Dessa forma, estudos relatam a adição de grupos funcionais aos suportes de imobilização para agirem como pontes entre as enzimas e a superfície do suporte. Estudos relatam a utilização de diferentes compostos que adicionam grupamentos amino em partículas magnéticas para imobilização enzimática, denominando esse processo de amino-funcionalização. O Quadro 3 apresenta alguns destes compostos utilizados na funcionalização de suportes magnéticos para imobilização de Lacases.

Figura 3. Principais métodos de imobilização enzimática.



Fonte: Lima, Almeida e Paula (2016).

Quadro 3. Compostos utilizados na funcionalização de suportes magnéticos para imobilização de lacases.

Composto	Referência
APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane)	(AMIN et al., 2018; GARCÍA-MORALES et al., 2018; HOU et al., 2014; MORADI et al., 2020; MUTHUVELU et al., 2019; QIU et al., 2019; SHI et al., 2014; WANG et al., 2018)
EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)	(CHANG et al., 2015; IRIARTE-MESA; DÍAZ-CASTAÑÓN; ABRADELO, 2019; KARAMI; TAHER, 2019; KUO et al., 2012)
APMS ((3-aminopropyl) trimethoxysilane (H ₂ N(CH ₂) ₃ Si(OC ₂ H ₅) ₃))	(FORTES et al., 2017; KASHEFI; BORGHEI; MAHMOODI, 2019)
EDAC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride)	(DAS; JASWAL; YOGALAKSHMI, 2020; DAS; SINGH; YOGALAKSHMI, 2017)
Hexametenodiamina	(WU et al., 2019)
EDTA-TMS (ácido triacético de (trimetoxissililpropil) etilenodiaminas)	(FERNANDES et al., 2017)

Fonte: Autoria própria (2020).

Sendo assim, a imobilização de enzimas possui um forte potencial em aplicações comerciais como biocatalizadores, reduzindo os custos operacionais e aprimorando a utilização do processo enzimático. O Quadro 4 apresenta alguns exemplos da utilização de lacases imobilizadas no processo de biodegradação de corantes.

Quadro 4. Exemplos de aplicações de lacases imobilizadas na biodegradação de corantes.**(Continua)**

Suportes	Métodos de imobilização	Corantes	Referências
Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ / SiO ₂	Ligação covalente	<i>Procion Red MX-5B</i>	(DAI et al., 2016)
Nanocompósitos	Adsorção	<i>Reactive Red 3</i>	(GLAM; GLAM, 2016)
Óxido de grafeno magnético	Ligação covalente	<i>Crystal Violet</i>	(CHEN et al., 2017)
Nanocompósito magnético de poli (p-fenilenodiamina)	Ligação covalente	<i>Malachite Green; Brialliant Green; Reactive Blue 19</i>	(LIU et al., 2016)
Fosfato de cobre / Nanotubos de carbono / Nanocompósito de óxido de grafeno	Confinamento	<i>Crystal Violet; Neutral Red; Crystal Violet</i>	(LI et al., 2017)
Superfície de folha de cobre	Confinamento	<i>Neutral Red; Crystal Violet</i>	(RONG et al., 2017)
Esferas de alginato de sódio	Confinamento	<i>Efluente têxtil</i>	(SONDHI et al., 2018)
Nanopartículas magnéticas de ferro	Ligação covalente	<i>Acid fuchsin</i>	(GAO et al., 2018)
Microesferas p(HEMA-co-VC	Ligação covalente	<i>Cibacron Blue 3GA</i>	(BAYRAMOGLU et al., 2019)
Esferas magnéticos de alginato de cobre	Confinamento	<i>Remazol Brilliant Blue R</i>	(LE et al., 2016)
Esferas de quitosana	Ligação covalente	<i>Reactive Brilliant; Blue; X-BR Remazol Brilliant; Blue R; Congo red; Acid black 172; Methylene Blue; Neutral Red; Indigo blue; Naphthol; Green B; Direct Fast Blue; Crystal Violet</i>	(ZHENG et al., 2016)
Esferas de álcool polivinílico	Confinamento	<i>Acid red 27</i>	(CHHABRA; MISHRA; SREEKRISHNAN, 2015b)
Hidrogel	Confinamento	<i>Acid orange 7</i>	(SUN et al., 2015)
Carvão mesoporoso	Adsorção	<i>Acid orange 7; Acid blue 74; Reactive red 2; Reactive black 5</i>	(RAMÍREZ-MONTOYA et al., 2015)
Esferas de quitosana	Ligação covalente	<i>Sulfur blue; Sulfur brown</i>	(NGUYEN et al., 2016)
Esferas de Ca-alginato	Encapsulamento	<i>Remazol Brilliant Blue; Reactive Black 5; Bismark Brown R</i>	(DAÂSSI et al., 2014)

Fonte: Autoria própria (2020).

Quadro 4. Exemplos de aplicações de lacases imobilizadas na biodegradação de corantes.
(Conclusão)

Suportes	Métodos de imobilização	Corantes	Referências
Nanopartículas de ferro e quitosana	Ligação covalente	<i>Acid red 37;</i> <i>Reactive Black 5;</i> <i>Direct blue 15;</i> <i>Evans blue</i>	(NADAROGLU et al., 2019)
Nanocompósito magnético de óxido de grafeno	Ligação covalente	<i>Direct Red 23</i>	(KASHEFI; BORGHEI; MAHMOODI, 2019)
Microesferas de quitosana	Ligação covalente	<i>Sandal-fix Red;</i> <i>Sandal-fix Turq. Blue;</i> <i>Sandal-fix Golden yellow;</i> <i>Sandal-fix Black; Sandal-fix violet</i>	(ASGHER; NOREEN; BILAL, 2016)
Nanofibra de celulose	Ligação covalente	<i>Remazol Black 5;</i> <i>Remazol Brilliant Blue;</i> <i>Remazol Brilliant Violet;</i> <i>Reactive Orange 16;</i> <i>Reactive Red 120</i>	(SATHISHKUMAR et al., 2014)

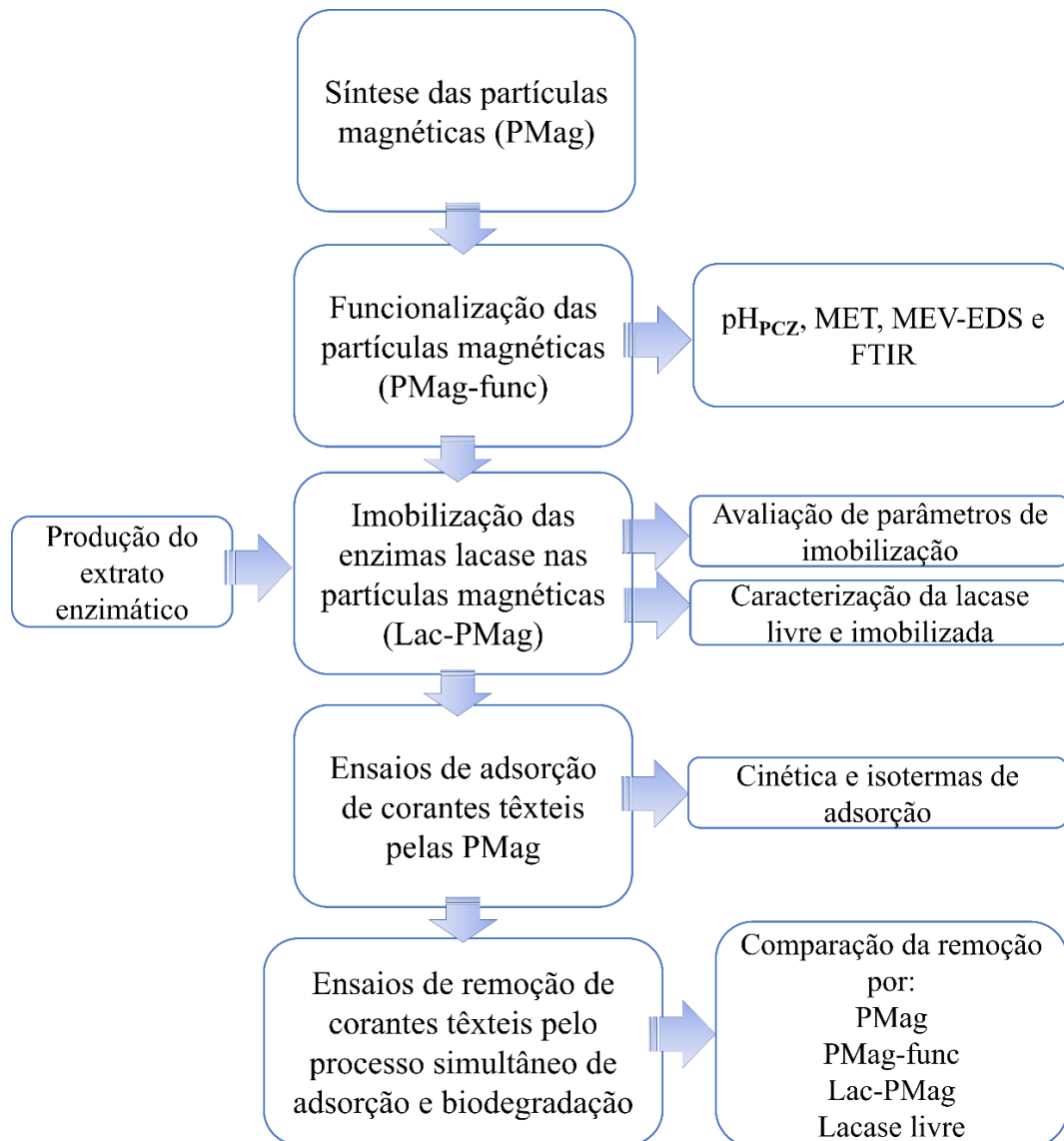
Fonte: Autoria própria (2020).

Tendo em conta esse contexto e os dados bibliográficos referentes aos estudos citados, a avaliação do processo simultâneo de adsorção e biodegradação, pela imobilização de lacases em PMag de óxido de ferro, afigura-se tecnicamente viável para a sua utilização na remoção de corantes têxteis. Além do que, nenhum estudo prévio relata esse processo simultâneo utilizando lacases e partículas magnéticas para o tratamento de efluente têxtil. Dessa forma, torna-se de grande interesse a síntese e investigação sobre este tipo de sistema de tratamento, bem como sobre os mecanismos envolvidos na remoção dos corantes.

4 METODOLOGIA

A Figura 4 contém o fluxograma em que estão apresentadas esquematicamente as etapas da metodologia utilizada para desenvolver esta pesquisa.

Figura 4. Fluxograma representando a metodologia utilizada na pesquisa.



Fonte: Autoria própria (2020).

4.1 Materiais e reagentes

O Sulfato de ferro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (pureza $\geq 99\%$), o (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES) (pureza $\geq 99\%$) e o 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS) (pureza $\geq 98\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes e solventes utilizados são todos de grau analítico. Os corantes têxteis foram cedidos por uma indústria têxtil da cidade de Curitiba, PR, Brasil.

4.2 Produção do extrato enzimático

O extrato enzimático das enzimas lacase foi obtido a partir dos fungos da podridão branca (*Trametes villosa*, *Lentinus crinitus*, *Pycnoporus* sp., *Agaricus* sp.) obtidos do banco de cepas do laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Curitiba, sede Ecoville. Para tanto, os fungos foram repicados e cultivados em placas de Petri contendo o meio Ágar Batata Dextrose (PDA) e as placas foram incubadas em estufa a 28°C por um período de sete dias. Após o tempo de crescimento, as placas de Petri foram transferidas para um refrigerador, onde permaneceram em conservação a 4°C .

A produção dos extratos enzimáticos foi realizada por cultivo semissólido, em triplicata. O cultivo foi composto por uma fermentação em estado semissólido na qual o inóculo foi preparado por meio da transferência de três plugs de micélio fúngico, para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Os plugs de micélio fúngico foram obtidos por cortes circulares, com o auxílio de tubos de ensaio estéreis. A transferência dos plugs foi realizada utilizando palitos de madeira estéreis, sendo depositados sobre meio de cultivo contendo os substratos, com o micélio fúngico voltado para cima.

O meio de cultivo semissólido foi preparado contendo: 50 mL de solução de glicose 10 g L^{-1} ; KH_2PO_4 3 g L^{-1} ; peptona 0,5%; resíduos agroindustriais como fonte de carbono (casca de arroz 1%; bagaço de uva Bordô 0,5%; 2 g de bagaço de cana) e íons metálicos como indutores (2 mL de MnSO_4 , CuSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 e de MgSO a 25 mM) (RIEDI, 2019). Esse meio de cultivo foi autoclavado e após a inoculação dos fungos, os Erlenmeyers foram incubados a 28°C por sete dias.

Posterior ao período de incubação, os meios foram submetidos à filtração em papel filtro (Framex, 11 cm de diâmetro) e centrifugados à 8000 rpm e 10°C . O sobrenadante foi utilizado como o extrato enzimático.

4.3 Síntese das partículas magnéticas de óxido de ferro

Para o preparo das partículas magnéticas de óxido de ferro (PMag), 1 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido em 100 mL de água destilada em béquer de vidro de 800 mL. Em seguida, foi adicionada lentamente uma solução de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}), em agitação contínua, até o pH atingir um valor na faixa de 10 a 12. Durante este processo, foram formados precipitados de ferro. Depois de ajustar o volume a 200 mL com água, o béquer contendo o precipitado foi colocado em um micro-ondas doméstico (Panasonic, NN5658BH-Manaus, AM, Brasil) e aquecido na potência máxima (1100 W) durante 10 minutos (POSPISKOVA; PROCHAZKOVA; SAFARIK, 2013). A suspensão formada de partículas magnéticas de óxido de ferro foi cuidadosamente lavada com água destilada para neutralizar o pH, com o auxílio da aplicação de um campo magnético (ímã). Posteriormente, as partículas foram secas em estufa à uma temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e raspadas e trituradas com o auxílio de uma espátula.

4.4 Imobilização das enzimas lacase nas PMag

Para imobilizar as enzimas lacase nas PMag foi realizado um processo de funcionalização da superfície dessas partículas com a adição de grupos funcionais que facilitam a ligação entre as enzimas e o suporte. Para tanto, utilizou-se a metodologia adaptada de Wang e colaboradores (2018), onde inicialmente 25 mg das PMag foram dispersas em uma solução contendo 5 mL de álcool etílico absoluto P.A., 0,1 mL de APTES e 0,5 mL de água destilada e foram mantidas em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil) por 12 horas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 180 rpm.

Após a silanização com APTES, as PMag foram adicionadas em uma solução de glutaraldeído (6%) e permaneceram sob agitação por mais 3 horas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ e 180 rpm. Com o auxílio de um ímã, foram realizadas lavagens com água destilada para remover o excesso de glutaraldeído (WANG et al., 2018). Após esse processo de funcionalização, obteve-se as partículas magnéticas funcionalizadas (PMag-func).

Para a imobilização enzimática, após realizadas as lavagens, as PMag-func (25 mg) foram adicionadas à uma solução (10 mL) contendo as enzimas lacase, em diferentes condições ($0,1, 0,3$ e 1 U mL^{-1}) diluída em Tampão Acetato de Sódio 50 mM pH 5, sob agitação a 180 rpm e $28 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 h. Por fim, as enzimas imobilizadas nas PMag-func (Lac-PMag) foram separadas magneticamente do sobrenadante e lavadas três vezes com o respectivo tampão, para

então determinar a sua atividade enzimática. A atividade enzimática do sobrenadante também foi determinada a fim de avaliar o montante de lacase não imobilizada (WANG et al., 2018).

4.5 Determinação da atividade enzimática da lacase

A atividade das enzimas lacase foi determinada utilizando-se espectrofotômetro UV-Visível (UV-M51 BEL Engineering S.R.L - Monza, MB, Itália) no comprimento de onda fixo de 420 nm, por meio do monitoramento da oxidação do ABTS. Para tanto, utilizou-se a metodologia adaptada de Hou e colaboradores (2004), onde 100 µL da amostra foram adicionados a um tubo de ensaio com 1,7 mL de Tampão Acetato de Sódio 50 mM pH 5, 200 µL de uma solução de ABTS 10 mM, permanecendo em banho maria por 5 min à 40 °C. As medidas de atividade foram realizadas em duplicata e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol do substrato ABTS por minuto (HOU et al., 2004).

Para descrever a eficiência da imobilização enzimática foram utilizados os parâmetros rendimento de imobilização (RI) e atividade recuperada (AR):

$$RI (\%) = \left(\frac{A_i - A_f}{A_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 10})$$

$$AR (\%) = \left(\frac{A_r}{A_t} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

Em que A_i é a atividade da enzima fornecida para a imobilização (U), A_f é a atividade da enzima no sobrenadante (U), A_r é a atividade das enzimas imobilizadas (U g⁻¹) e A_t é a atividade total fornecida para imobilização (U g⁻¹).

4.6 Ponto de carga zero

Para determinar o pH correspondente ao ponto de carga zero (pH_{PCZ}) foi utilizada a metodologia denominada “experimento dos 11 pontos” (REGALBUTO; ROBLES, 2004). O pH_{PCZ} foi avaliado para as PMag e para as Lac-PMag. Para tanto, foram pesadas 50 mg das amostras e adicionadas em 50 mL de solução aquosa, preparadas em 11 diferentes condições de pH inicial (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Após 24 horas, o pH de equilíbrio foi medido com

o auxílio de um pHmetro (Gehaka PG1800- São Paulo, SP, Brasil) e os gráficos do pH inicial *versus* pH final foram plotados. O pH_{PCZ} corresponde ao pH médio da faixa onde o pH se manteve constante, demonstrando o pH onde a superfície das amostras se comportou como um tampão.

4.7 Caracterização das partículas

4.7.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Análises morfológicas foram realizadas através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras de PMag foram observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1200EX-II a uma voltagem de aceleração de 80 kV, no Centro de microscopia eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CEM-UFPR), no campus Politécnico, em Curitiba-PR. Para as análises, as amostras foram preparadas pela deposição de uma gota da solução diluída feita com água e a amostra estudada, inseridas em uma grade de cobre revestido com carbono.

4.7.2 Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva

As partículas magnéticas foram caracterizadas pela técnica de Microscopia eletrônica de varredura com espectroscopia de energia dispersiva acoplada (MEV/EDS). O equipamento utilizado VEGA3 TESCAN está localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CEM-UFPR), no *campus* Politécnico, em Curitiba-PR. Para as análises, as amostras PMag e Lac-PMag foram metalizadas com ouro e observadas nos aumentos de 500 e 5000 vezes. Paralelamente ao MEV, foi realizado o EDS para identificação elementar qualitativa do material.

4.7.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Foram realizadas análises das amostras PMag, PMag-func e Lac-PMag em Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) (VARIAN, 640-IR, Santa Clara, California). As análises foram medidas em ATR (*Attenuated total reflection*) (PIKE-Miracle com cristal de ZnSe), na faixa de resolução de 4 cm⁻¹, faixa de leitura de 4000

a 650 cm^{-1} e 64 *scans*. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ), localizado na Sede Ecoville do Campus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

4.8 Caracterização das enzimas imobilizadas

4.8.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática das enzimas lacase

O efeito do pH sobre a atividade das enzimas livres e imobilizadas foi avaliado utilizando a determinação da atividade enzimática das lacases (seção 4.5) com ABTS em diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6 e 7). Para avaliar os diferentes pH foram utilizados tampões tartarato de sódio 50 mM pH 3,0, acetato de sódio 50 mM pH 4,0 e 5,0 e fosfato de sódio 50 mM pH 6,0 e 7,0. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e a metodologia foi adaptada de Brugnari e colaboradores (2018).

4.8.2 Estabilidade operacional das enzimas imobilizadas

Para avaliar a estabilidade operacional das enzimas imobilizadas, foram avaliados 5 ciclos operacionais consecutivos de reação de oxidação do ABTS. A reação foi realizada sob agitação e a atividade de lacase imobilizada foi medida como descrito anteriormente na seção 4.5. Para parar a reação, as lacases imobilizadas foram separadas da solução utilizando um ímã e lavadas 3 vezes com tampão Acetato de sódio 50 mM pH 5 antes de serem reutilizadas. Os ensaios foram realizados em duplicata e a estabilidade operacional ao longo dos ciclos foi avaliada por atividade relativa (%), definida como a relação entre a atividade enzimática no final de cada ciclo e a atividade enzimática do primeiro ciclo (FORTES et al., 2017).

4.8.3 Estabilidade de armazenamento das enzimas imobilizadas

Para avaliar a estabilidade de armazenamento, utilizou-se a metodologia adaptada de Fortes e colaboradores (2017). Para tanto, amostras individuais de lacase livre e imobilizada foram armazenadas a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 dias em tampão Acetato de sódio 50 mM pH 5. Antes da medição da atividade enzimática, as amostras imobilizadas foram lavadas três vezes com o respectivo tampão. As atividades de lacase livre e imobilizada foram determinadas de acordo

com o item 4.5. A estabilidade de armazenamento foi avaliada pela atividade relativa. A atividade relativa (%) foi definida como a relação entre a atividade enzimática em um determinado dia de armazenamento da enzima e a atividade inicial da enzima ($t = 0$) (FORTES et al., 2017).

Além disso, foi avaliada a estabilidade de armazenamento de enzimas lacase imobilizadas, sendo armazenada nessas mesmas condições, por um tempo de 8 meses.

4.9 Preparo das soluções de corantes e análise da remoção dos corantes

As amostras de corantes, *Acid Black 172* e *Acid Blue 277*, foram cedidas por uma indústria têxtil da região metropolitana de Curitiba, Paraná. As soluções de corantes foram produzidas a partir de diluições de uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} de cada corante.

As análises utilizadas para avaliar a concentração dos corantes foram realizadas em espectrofotômetro UV-Visível (UV-M51 BEL Engineering S.R.L, Monza, MB, Itália), a partir de curvas analíticas predeterminadas. Os comprimentos de onda (λ) utilizados foram 576 e 612 nm, para os corantes *Acid Black 172* e *Acid Blue 277*, respectivamente, sendo ambos os comprimentos de onda máximos de absorção de cada corante.

4.10 Adsorção dos corantes pelas partículas magnéticas (PMag)

4.10.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura no processo de remoção de cor

Os testes de adsorção foram realizados em batelada, em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL da solução aquosa de corante e 25 mg de PMag, sob agitação de 180 rpm em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil). Inicialmente, foram avaliadas diferentes condições de pH inicial (3, 4, 5, 6 e 7) na temperatura fixa de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, concentração de corante de 50 mg L^{-1} , por 4 horas. Os ajustes de pH foram realizados, antes da diluição dos corantes, na água destilada utilizada para o preparo das soluções, utilizando $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As condições iniciais definidas para os ensaios foram adaptadas de Semião e colaboradores (2020). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com controles de corante sem a presença das PMag. Após o tempo de adsorção requerido, com o auxílio de um campo magnético (ímã), as PMag foram separadas das soluções e foram realizadas as análises

de concentração de corante residual no sobrenadante, de acordo com a metodologia descrita no item 4.9.

O estudo do efeito da temperatura no processo de adsorção foi realizado variando a temperatura (25, 35, 45 e 55 °C) do processo de adsorção. Para tanto utilizou-se as mesmas condições iniciais no pH que obteve os melhores resultados de remoção de cor para cada corante. Após obtenção do pH e da temperatura que apresentaram as melhores taxas de adsorção, os mesmos foram utilizados para todos os testes seguintes.

4.10.2 Cinética da adsorção

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 25 mg de PMag em 10 mL de solução de corante, em pH 3,0 e concentração de 50 mg L⁻¹. Os frascos foram inseridos em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil), sob agitação de 180 rpm e temperatura 30 °C. Os frascos foram retirados nos tempos 0, 5, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 min e em seguida, com o auxílio de um campo magnético (imã), foram realizadas análises da concentração de corante residual no sobrenadante, em espectrofotômetro, de acordo com a metodologia descrita no item 4.9. Os ensaios experimentais foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram ajustados aos modelos de Pseudo-primeira, Pseudo-segunda ordem, Elovich e Difusão intrapartículas, visando demonstrar a qual modelo os dados se ajustam e dessa forma avaliar qual modelo melhor descreve o processo ocorrido. As equações dos respectivos modelos estão apresentadas no Quadro 2 da seção 3.4.1.

4.10.3 Isotermas da adsorção

Após determinado o tempo de equilíbrio, a partir dos dados de cinética, foram realizados os estudos das isotermas de adsorção. Em Erlenmeyers de 50 mL foram adicionados 25 mg de PMag e 10 mL das diferentes concentrações de solução corante (10, 25, 50, 75, 100 e 150 mg L⁻¹) com o pH ajustado para 3,0. Os frascos foram inseridos em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil), sob agitação a 180 rpm e 30 °C, até que atingissem o tempo de equilíbrio. Com o auxílio de um campo magnético (imã), as PMag foram separadas do sobrenadante que foi analisado para avaliar a concentração de corante residual, em espectrofotômetro UV-Visível (UV-M51 BEL Engineering S.R.L, Monza, MB, Itália), de acordo com a metodologia descrita no item 4.9. Os dados experimentais obtidos foram

ajustados aos modelos de isoterma de Langmuir, Freundlich, Sips e Temkin. As equações dos respectivos modelos também estão apresentadas no Quadro 2 da seção 3.4.1.

4.10.4 Dessorção e reúso

Os testes de dessorção e reúso foram realizados por 6 ciclos consecutivos em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil), sob agitação de 180 rpm e temperatura 30 °C. Depois da adsorção nas condições predeterminadas, as PMag foram separadas da solução com a aplicação de um campo magnético, e foram adicionadas em uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ para dessorção dos corantes por um período de 120 minutos, de acordo com a metodologia adaptada de Zheng e colaboradores (2019a). Após a dessorção, as PMag foram lavadas com água destilada para posterior reutilização.

4.11 Processo combinado de adsorção e biodegradação dos corantes pelas lacases imobilizadas nas partículas magnéticas (Lac-PMag)

Os testes de adsorção e biodegradação simultânea foram realizados em batelada, em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL da solução aquosa de corante e 25 mg de Lac-PMag (0,3 U mL⁻¹ de lacase em 25 mg de partículas), sob agitação de 180 rpm em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil). Para avaliar as possíveis interferências do processo de imobilização enzimática na remoção do corante, todos os testes também foram realizados com as PMag, com as PMag-func (partículas magnéticas após o processo de funcionalização com APTES e glutaraldeído e sem a adição das enzimas) e com as enzimas livres (extrato de enzimas lacase) (0,3 U mL⁻¹).

4.11.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura no processo de remoção de cor

Inicialmente, foram avaliadas diferentes condições de pH inicial (3, 4, 5, 6 e 7) na temperatura fixa de 30 °C, concentração de corante de 50 mg L⁻¹, por 4 horas. Os ajustes de pH foram realizados, antes da diluição dos corantes, na água destilada utilizada para o preparo das soluções, utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com controles contendo apenas o corante. Após o tempo requerido, com o auxílio de um campo magnético (ímã), as partículas foram separadas das soluções e foram realizadas

as análises de concentração de corante residual no sobrenadante, de acordo com a metodologia descrita no item 4.9.

O estudo do efeito da temperatura no processo de adsorção e biodegradação foi realizado variando a temperatura (25, 35, 45 e 55 °C) do processo. Para tanto utilizou-se as mesmas condições iniciais no pH que obteve os melhores resultados de remoção de cor para cada corante. Após obtenção do pH e da temperatura que apresentaram as melhores taxas de remoção, os mesmos foram utilizados para todos os testes seguintes.

4.11.2 Estudo dos efeitos do tempo de processo

O estudo dos efeitos do tempo na remoção do corante por adsorção e biodegradação foi realizado nas condições descritas inicialmente, em pH 3,0 e concentração dos corantes de 50 mg L⁻¹. Os frascos foram inseridos em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil), sob agitação de 180 rpm e temperatura 30 °C. Os frascos foram retirados nos tempos 5, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 min e em seguida, com o auxílio de um campo magnético (ímã), foram realizadas análises da concentração de corante residual no sobrenadante, em espectrofotômetro, de acordo com a metodologia descrita no item 4.9. Os ensaios experimentais foram realizados em triplicata.

4.11.3 Estudo dos efeitos da concentração inicial dos corantes

Após determinado o tempo de equilíbrio, a partir dos dados do estudo do efeito do tempo na remoção dos corantes, foram realizados os estudos avaliando a interferência da concentração inicial dos corantes. Os testes foram realizados nas condições descritas inicialmente, avaliando as diferentes concentrações de solução corante (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 e 300 mg L⁻¹) com o pH ajustado para 3,0. Os frascos foram inseridos em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil), sob agitação a 180 rpm e 30 °C, até que atingissem o tempo de equilíbrio. Com o auxílio de um campo magnético (ímã), as partículas foram separadas do sobrenadante que foi analisado para avaliar a concentração de corante residual, em espectrofotômetro UV-Visível (UV-M51 BEL Engineering S.R.L, Monza, MB, Itália), de acordo com a metodologia descrita no item 4.9.

4.11.4 Reúso

Os testes de reúso foram realizados por 4 ciclos consecutivos em incubadora shaker (Solab SL 222-Piracicaba, SP, Brasil), sob agitação de 180 rpm e temperatura 30 °C, com a concentração inicial de corantes de 50 mg L⁻¹. Depois da adsorção e biodegradação nas condições predeterminadas, as Lac-PMag foram separadas da solução com a aplicação de um campo magnético, e foram lavadas com Tampão Acetato de Sódio 50 mM pH 5, para posterior reutilização.

4.12 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Origin™ 8.5/2010. O teste de Tukey foi usado para comparação entre as médias, com diferença considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. Os dados experimentais foram ajustados aos modelos não lineares utilizando o *software* Origin™ 8.5/2010. O melhor ajuste foi determinado com base no coeficiente de determinação (R^2)

5 RESULTADOS

5.1 Produção do extrato enzimático

A produção das enzimas lacase a partir dos fungos da podridão branca *Trametes villosa*, *Lentinus crinitus*, *Pycnoporus* sp. e *Agaricus* sp. foi avaliada usando um meio de cultivo semissólido, o qual demonstrou ser eficiente para induzir a produção enzimática da lacase. A cepa que obteve melhores resultados na produção das enzimas lacase foi a de *Trametes villosa*, como pode ser observado na Tabela 1. Portanto, essa cepa foi utilizada para a produção das enzimas lacase utilizadas nas próximas etapas do estudo.

A diferença na atividade enzimática das lacases produzidas pelas cepas estudadas se deve não só devido às características bioquímicas de cada fungo, mas também à afinidade das mesmas com o meio de cultivo utilizado. No estudo de Yamanaka e colaboradores (2008), a composição do meio exerceu influência sobre a produção de enzimas lacases por *Trametes villosa* CCB176. Os autores obtiveram maior rendimento da atividade de lacase com a adição de cobre no meio e destacam a relevância do estudo nutricional do meio, na aplicação biotecnológica de cada espécie de fungo avaliada.

Tabela 1. Produção de lacases por fungos da podridão branca em cultivo semissólido estático após 7 dias de incubação.

Cepa	Atividade Enzimática (U L ⁻¹)
<i>Trametes villosa</i>	17.000,00
<i>Lentinus crinitus</i>	1.148,00
<i>Pycnoporus</i> sp.	2.851,00
<i>Agaricus</i> sp.	0,00

Fonte: Autoria própria (2020).

O meio de cultivo utilizado, contendo resíduos agroindustriais como substrato e íons metálicos como indutores para a produção de enzimas lacase, já foi estudado em laboratório (REIDI, 2019). Esse meio enriquecido fornece nutrientes semelhantes ao meio natural de crescimento de basidiomicetos e, portanto, viabiliza a produção de lacases com elevada atividade enzimática.

Resíduos agroindustriais, como as cascas de arroz, o bagaço de uva Bordô e o bagaço de cana, possuem baixo custo e ampla disponibilidade. Além de fornecerem os substratos lignocelulósicos necessários para a fermentação fúngica e para a indução da produção das enzimas lacase, o processo agrega valor a esses resíduos e minimiza o impacto ambiental causado pelo acúmulo dos mesmos na natureza. Dessa forma, a aplicação desses resíduos em

processos biotecnológicos é viável, onde o processo utiliza um produto de baixo valor agregado para a produção de outro com alto valor agregado, como é o caso das enzimas lacase (AKPINAR; OZTURK, 2017; ALEXANDRINO et al., 2007).

O uso de elementos traços no meio de cultivo para produção de lacases fúngicas também é relatado em literatura, com o objetivo de aumentar a atividade enzimática. No estudo de Knezevic e colaboradores (2014), o uso dos elementos traços Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} na produção de enzimas lacase a partir do fungo *Trametes gibbosa*, foram avaliados. Os autores relatam que nas concentrações ideais, os elementos estimularam o aumento da atividade enzimática das lacases. Além disso, os autores indicam que esse impacto positivo na atividade enzimática utilizando algumas concentrações de Mn^{2+} pode ser explicado pela indução da transcrição gênica, o que também foi relatado por Piscitelli et al. (2011).

A presença de íons metálicos como indutores, afeta a produção de enzimas lacase, o que ocorre como uma resposta de defesa dos microrganismos ao estresse ambiental em que são submetidos, sintetizando pigmentos que evitam a absorção desses metais como xenobióticos (GALHAUP; HALTRICH, 2001). No entanto, é possível observar que o mesmo meio utilizado, contendo os indutores, apresentou respostas diferentes para os diferentes fungos utilizados. Desse modo, alguns fungos tem a produção enzimática aprimorada quando utilizado os íons metálicos, enquanto outros podem sofrer a inibição da produção de enzimas.

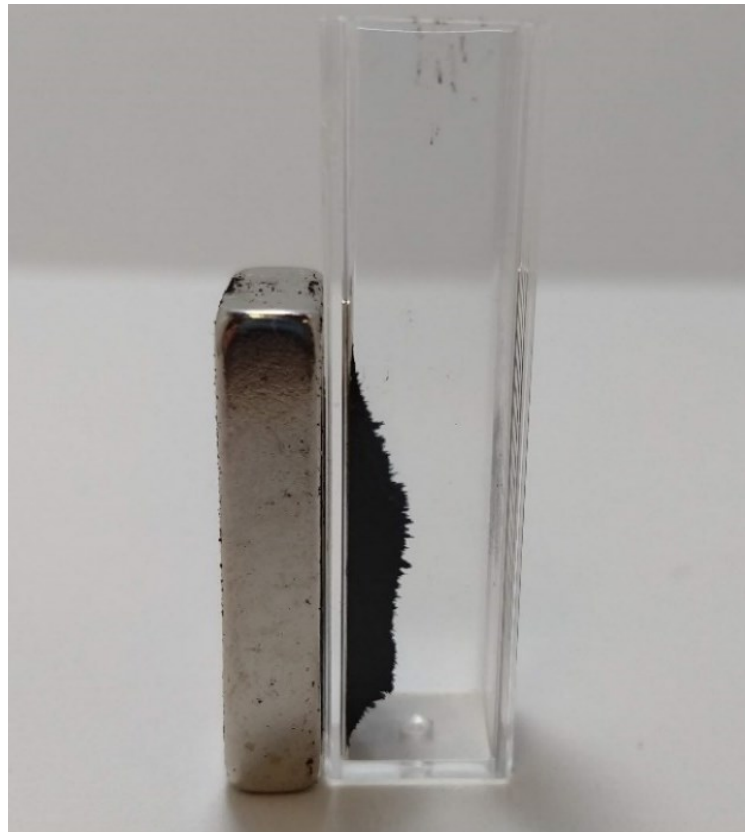
Lacases de *Trametes villosa* já foram relatadas em diferentes estudos, principalmente na forma comercializada (AHN et al., 2007; BASTO et al., 2007; XU et al., 1999; ZILLE et al., 2005). Outros fungos relatados na obtenção de enzimas lacases são os filamentosos pertencentes aos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*, como: *Irpex lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Myceliophthora thermophila*, *Chaetomium thermophile*, *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Suillus granulatus* (DESKA; KOŃCZAK, 2019).

Além disso, um estudo comparou a produção de lacases a partir de bactérias, fungos e plantas em relação a sua estrutura e função, relatando que as lacases fúngicas possuem uma melhor aplicação em processos catalíticos devido ao seu alto potencial redox (DWIVEDI et al., 2011). Outro fator importante, que aumenta o potencial de aplicação de lacases fúngicas na oxidação de poluentes é a especificidade de substrato relativamente baixa, o que torna as lacases eficientes na oxidação de uma grande variedade de substâncias (DESKA; KOŃCZAK, 2019).

5.2 Síntese das partículas magnéticas (PMag)

Durante o processo de síntese, a mudança de coloração na solução contendo sais de Fe após o ajuste do pH para a faixa de 11,0-12,0, caracterizou a precipitação do Fe para formação das partículas (POSPISKOVA; PROCHAZKOVA; SAFARIK, 2013; ZHENG et al., 2010). Após os processos de tratamento térmico em micro-ondas, lavagem e secagem em estufa, as partículas sintetizadas na forma de um pó na cor preta adquiriram propriedades magnéticas como pode ser observado na Figura 5, onde as mesmas são atraídas pela força de um campo magnético aplicado (ímã).

Figura 5. PMag expostas a um campo magnético (ímã).



Fonte: Autoria própria (2020).

Os autores Bruce e colaboradores (2004) relatam que os óxidos de ferro apresentam variação de cor e isso pode ser usado como um auxílio na sua identificação e pureza em alguns casos. O Quadro 5 indica as cores diferentes para cada óxido de ferro. De acordo com a coloração, a predominância das partículas sintetizadas nesse estudo é de magnetita.

Quadro 5. Cor dos diferentes tipos de óxido de ferro.

Óxido de ferro	Cor
Magnetita	Preto
Maghemita	Marrom avermelhado
Hematita	Vermelho
Ferroxita	Vermelho marrom
Lepidocrocita	Laranja
Goetita	Amarelo marrom
Akaganeita	Amarelo marrom

Fonte: Adaptado de Bruce et al. (2004)

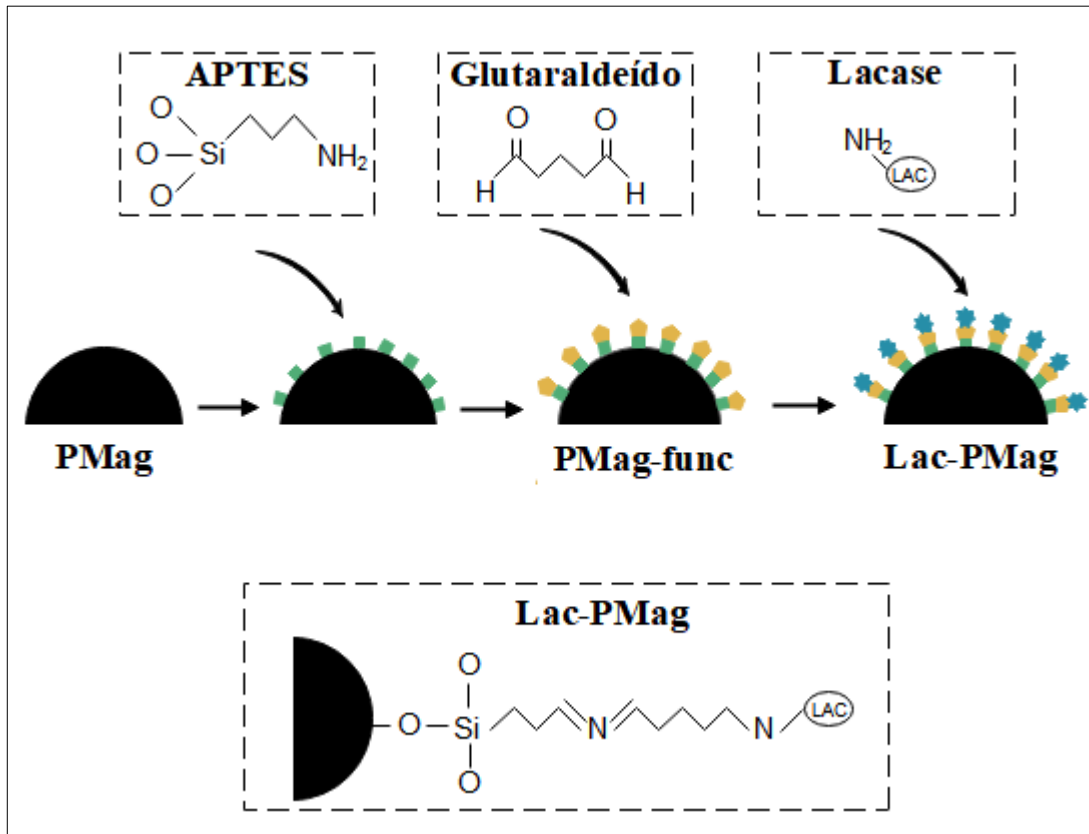
A magnetita é um material quimicamente estável e de ocorrência natural que é considerada um material não perigoso, não tóxico e não cancerígeno. Além disso, nanopartículas e micropartículas de magnetita vem sendo utilizadas com boa capacidade de adsorção na remoção de diferentes poluentes (DEBS et al., 2019).

5.3 Imobilização das enzimas lacase

Antes da imobilização das enzimas lacase, as PMag foram modificadas utilizando o APTES para a adição de grupos amino na superfície das partículas, processo chamado de silanização. A silanização é uma reação de compostos organossilanos com a superfície das PMag. A fórmula geral dos silanos é $Y(CH_2)_nSi(OR)_3$, sendo Y um grupo organofuncional ($-CH=CH_2$, $-Cl$, $-NH_2$ ou $-N=C=O$) e OR um grupo alcoxi ($-OCH_3$ ou $-OC_2H_5$). Os grupos $(OR)_3$ formam uma ligação covalente entre as moléculas do silano e as hidroxilas presentes na superfície das PMag, onde esses grupos se hidrolisam formando grupos silanois (Si-OH) (ALBUQUERQUE et al., 2017).

Na outra extremidade da ligação química, o APTES forneceu grupamentos amino que reagiram com os aldeídos do glutaraldeído, agente reticulador adicionado posteriormente. Essa ligação formou uma base de Schiff com os grupamentos provenientes da amina química e obteve-se assim as PMag-func. Após essas ligações, um grupo aldeído terminal foi fornecido, onde ligaram-se enzimas lacase (WANG et al., 2018), formando assim as Lac-PMag. Todo esse processo está esquematizado na Figura 6.

Figura 6. Esquema da imobilização das enzimas lacase nas PMag.



Nota: PMag: Partículas magnéticas; PMag-func: Partículas magnéticas funcionalizadas com APTES e glutaraldeído; Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.
Fonte: Autoria própria (2020).

As PMag demonstraram eficiência na imobilização das enzimas lacase com melhor rendimento de imobilização (RI) quando utilizadas as menores condições iniciais de enzima, sendo $99,84 \pm 0,18 \%$ quando utilizado $0,3 \text{ U mL}^{-1}$ de lacase e $99,55 \pm 0,20 \%$ quando utilizado $0,1 \text{ U mL}^{-1}$ (Tabela 2). Quando se aumentou a quantidade de enzima inicial no processo de imobilização, o rendimento de imobilização foi menor. Isso provavelmente se deve à saturação dos sítios de ligação das PMag, onde algumas moléculas de lacase encontraram sítios ativos livres e as que não se ligaram ao suporte, permaneceram no sobrenadante. Comportamento similar foi relatado em estudos anteriores (WU et al., 2019).

Apesar do RI apresentar valores estatisticamente iguais para as duas menores condições iniciais de lacase, definiu-se para avaliar os próximos testes de imobilização das enzimas lacase nas PMag, a condição de $0,3 \text{ U mL}^{-1}$. Essa condição foi escolhida por ser uma maior quantidade de enzima utilizada por grama de suporte, sem que ocorra o desperdício de enzimas lacase no sobrenadante, como ocorreu na maior condição inicial.

Tabela 2. Rendimento de imobilização e Atividade recuperada das enzimas lacase nas três condições iniciais avaliadas.

Condição inicial (U mL ⁻¹)	RI (%)	AR (%)
0,1	99,55 ^a ± 0,20	46,18 ^a ± 0,77
0,3	99,84 ^a ± 0,18	36,24 ^b ± 0,21
1,0	81,01 ^b ± 1,97	18,73 ^c ± 0,11

Nota: RI: Rendimento de imobilização; AR: Atividade recuperada. Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria (2020).

A atividade recuperada (AR) das enzimas imobilizadas foi mais alta nas menores concentrações iniciais de enzima. Em diversos estudos, o processo de imobilização enzimática demonstra baixa recuperação de lacase, porém, costumam apresentar melhorias na estabilidade operacional e estabilidade contra agentes desnaturantes (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

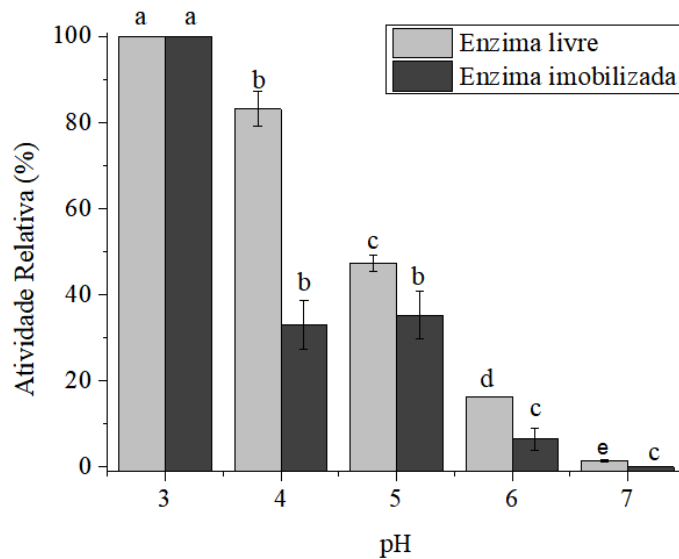
A ligação covalente, como a utilizada no processo de imobilização da enzimas lacase para formar as Lac-PMag, gera ligações fortes entre a enzima e o suporte, permitindo uma fácil manipulação e reutilização, sem que ocorra a lixiviação das enzimas do suporte (MOREIRA et al., 2017). No entanto, esse tipo de ligação possui uma desvantagem, que é a possível modificação da estrutura da lacase no seu sítio ativo, o que pode contribuir para a baixa recuperação da atividade da enzima imobilizada (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

No estudo de Fortes et al. (2017), os autores relatam que o aumento da atividade recuperada com a diminuição da concentração de enzima é um indicativo de saturação do suporte que se deve ao excesso de enzima em solução. Além disso, de acordo com Wang et al. (2013) e Jiang et al. (2009) que realizaram estudos de imobilização de lacase em nanopartículas de sílica mesoporosa e nanopartículas magnéticas, respectivamente, também ocorreu um decréscimo na atividade recuperada com o aumento da concentração inicial de enzima. Os autores descrevem que pode ocorrer uma barreira de limitações de transferência de massa devido à saturação, o que leva a interações entre uma proteína e outra e inibe a flexibilidade da conformação proteica.

Os efeitos do pH na atividade das enzimas livres e imobilizadas estão apresentados na Figura 7. Como pode ser observado, o valor ótimo de pH foi 3,0 para as duas formas avaliadas. Ambas as formas de lacase, livres e imobilizadas, apresentaram alta redução de atividade enzimática com o aumento do pH, sendo a atividade relativa da enzima imobilizada menor do que da enzima livre.

A diminuição da atividade relativa pode ocorrer devido a mudanças que ocorrem na conformação das enzimas durante o processo de imobilização. Além disso, em altos valores de pH, as enzimas podem ser desnaturadas pois a estrutura da proteína depende da ionização das cadeias laterais dos aminoácidos. A desnaturação é uma alteração na estrutura dimensional que pode causar a perda de função da proteína. Em valores extremos de pH, a carga líquida das proteínas é alterada, o que causa uma repulsão eletrostática e conseqüentemente a quebra de algumas ligações de hidrogênio (NELSON; COX, 2014).

Figura 7. Efeito do pH na atividade enzimática das enzimas livres e imobilizadas.



Nota: Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria (2020).

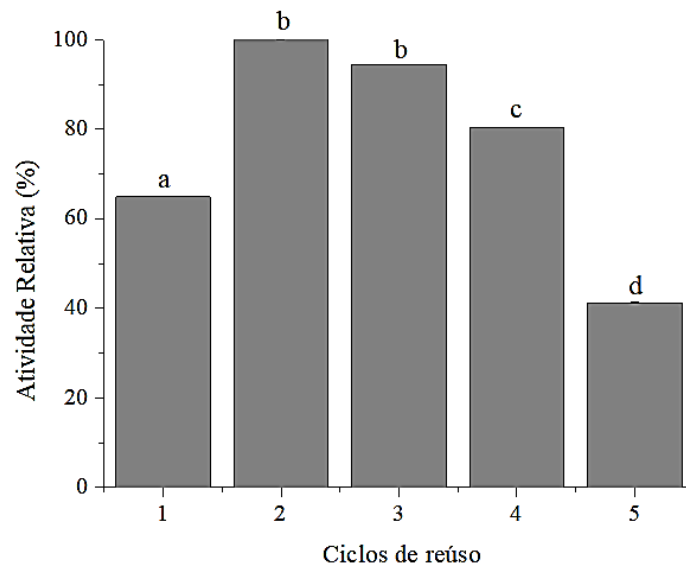
A estabilidade operacional das enzimas imobilizadas foi avaliada por 5 ciclos (Figura 8). O primeiro ciclo apresenta um valor menor, o que pode ser explicado pela reação que ocorre com o tipo de suporte escolhido para a imobilização. Como as PMag possuem capacidade de adsorção, no primeiro ciclo o produto da reação do ABTS é adsorvido pelas partículas, ocasionando essa menor degradação do substrato pelas enzimas imobilizadas. A partir do segundo ciclo, os sítios de ligação das PMag estão saturados e não ocorre mais a adsorção do ABTS e assim o mesmo é liberado ao meio reacional, possibilitando a leitura colorimétrica.

No terceiro ciclo, um decaimento gradual na atividade enzimática das lacases imobilizadas é observado até os dois ciclos seguintes. É importante ressaltar que no quinto ciclo a enzima imobilizada ainda retinha 41,0 % da sua atividade inicial. Esse decaimento já foi observado em outros estudos e pode ser atribuído à desnaturação gradual das enzimas e não à

dessorção das enzimas imobilizadas devido as ligações entre a enzima e o suporte serem ligações covalentes (FORTES et al., 2017).

Para a aplicação em escala industrial, é importante que a lacase imobilizada mantenha alta atividade enzimática por vários ciclos de reutilização e, ao mesmo tempo, que o processo seja de fácil recuperação. Dessa forma, devido a facilidade de recuperação da enzima imobilizada com a aplicação de um campo magnético externo e da possibilidade de utilização durante diferentes ciclos, esse estudo demonstra claramente o alto potencial de aplicação das Lac-PMag.

Figura 8. Estabilidade operacional das enzimas lacase imobilizadas.



Nota: Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria (2020).

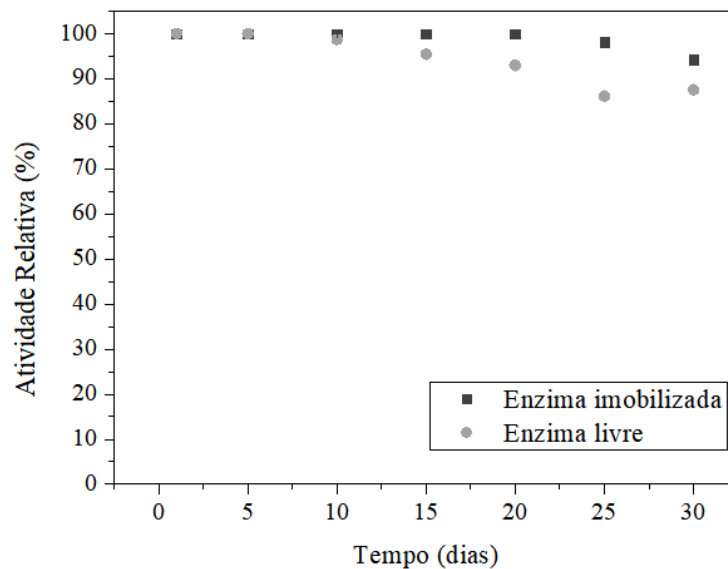
A estabilidade e a atividade das enzimas são naturalmente reduzidas durante um certo tempo de armazenamento. Neste estudo foi avaliada a estabilidade da lacase livre e imobilizada, armazenada a -4°C por 30 dias (Figura 9).

A enzima imobilizada reteve $94,28 \pm 0,01\%$ de sua atividade inicial, enquanto a enzima livre reteve $87,46 \pm 0,01\%$ de sua atividade inicial após 30 dias de armazenamento. Dessa forma, a lacase imobilizada manteve sua atividade enzimática inicial alta após 30 dias, o que demonstra que durante a imobilização, não ocorreram mudanças na conformação da enzima que afetam a estabilidade da lacase imobilizada. Além disso, no teste realizado com a enzima imobilizada e armazenada durante 8 meses, a atividade relativa ao primeiro de armazenamento

foi de $91,00 \pm 0,02\%$, ou seja, mesmo após 8 meses armazenada as enzimas imobilizadas ainda possuem alta atividade catalítica.

A estabilidade de armazenamento é um parâmetro significativo para biocatalisadores enzimáticos aplicados em processos de biotecnologia (FORTES et al., 2017). De acordo os resultados obtidos, as Lac-PMag possuem uma boa estabilidade de armazenamento, elucidando ainda mais o seu potencial para uso na degradação de diferentes compostos.

Figura 9. Estabilidade de armazenamento das enzimas livres e imobilizadas à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Fonte: Autoria própria (2020).

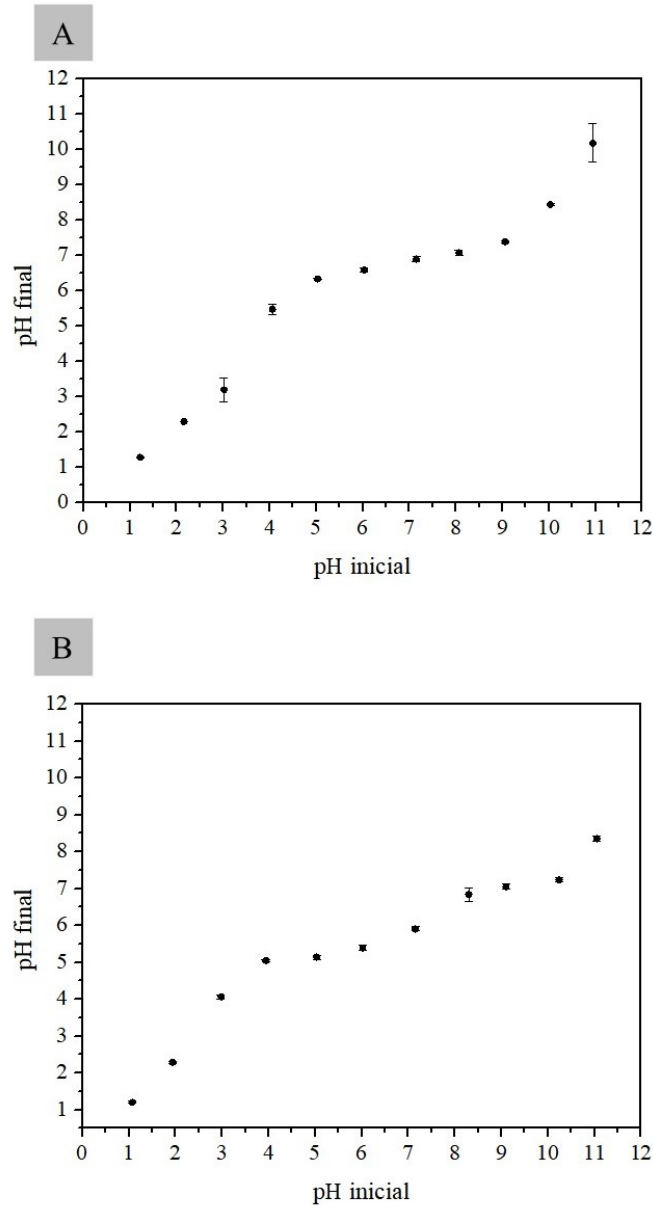
5.4 Ponto de carga zero

Os gráficos da determinação do pH_{PCZ} das PMag e das Lac-PMag estão apresentados na Figura 10. Pode-se visualizar que para as PMag o pH na faixa de 6,0 a 8,0 apresentou uma baixa modificação, sendo o pH_{PCZ} das mesmas igual a 7,0. Esse valor é consistente com dados publicados em literatura onde o valor relatado de pH_{PCZ} para partículas de óxido de ferro varia entre 6,5 e 7,4 (ABDULLAH et al., 2019). Já para as Lac-PMag, a faixa de pH que manteve uma constância foi de 4,0 a 6,0, com um pH_{PCZ} igual a 5,0.

A diferença no pH_{PCZ} após o processo de imobilização das enzimas lacase, ou seja, da produção das Lac-PMag, se deve à modificação ocorrida na superfície das partículas após a silanização com APTES e a funcionalização com glutaraldeído. Além disso, a ligação das

enzimas lacase na superfície das partículas também pode ter influenciado na diferença de pH_{PCZ} , devido a carga elétrica das proteínas.

Figura 10. Gráficos da determinação do ponto de carga zero das PMag (A) e das Lac-PMag (B).



Fonte: Autoria própria (2020).

A partir do pH_{PCZ} é possível avaliar o comportamento das cargas da superfície de uma substância sólida quando esta entra em contato com uma solução líquida. Quando o pH da solução estiver abaixo do pH_{PCZ} , a superfície do sólido estará carregada positivamente, e dessa forma a adsorção de ânions é facilitada para balancear estas cargas positivas. O contrário ocorre em soluções aquosas com um pH maior que o pH_{PCZ} , onde tem-se uma superfície negativamente

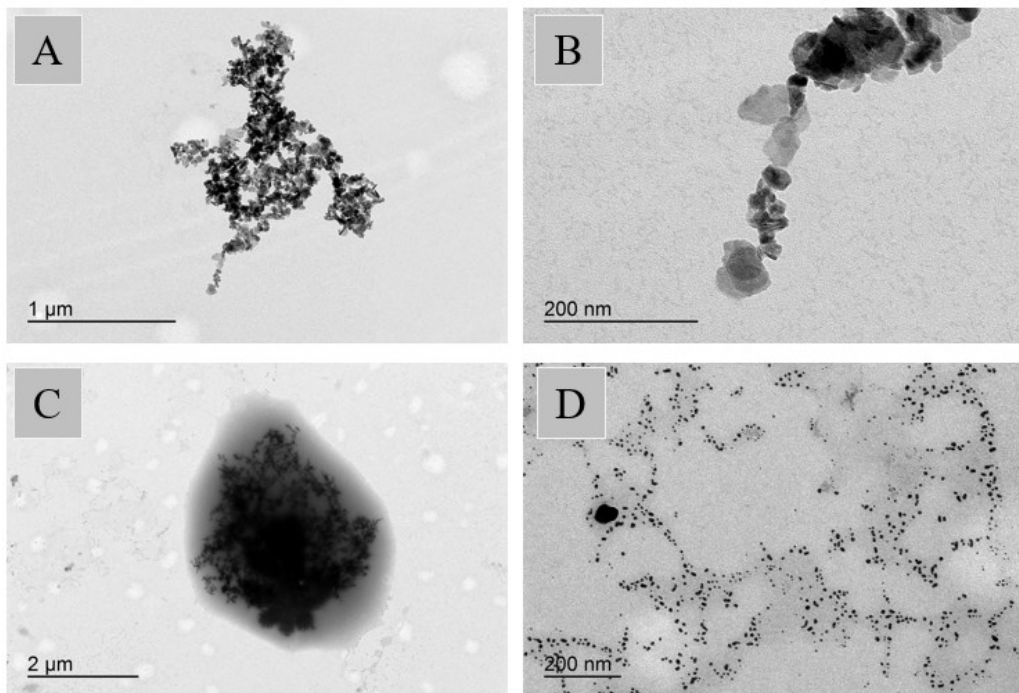
carregada, e dessa forma, a adsorção de substâncias catiônicas é facilitada (NASCIMENTO et al., 2014; REGALBUTO; ROBLES, 2004).

5.5 Caracterização das partículas magnéticas

5.5.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das PMag foi avaliada por meio de MET. Na Figura 11 pode ser observado que as mesmas se encontram em formas diversas e irregulares. Também pode ser observado em relação ao tamanho, que ocorre uma heterogeneidade no tamanho das partículas, o que demonstra que algumas estão em escala nanométrica e outras em escala micrométrica.

Figura 11. Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão das PMag com aumentos de 8.000 (A), 40.000 (B), 3.000 (C) e 20.000 vezes (D).



Nota: PMag: Partículas magnéticas.

Fonte: Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CEM-UFPR).

Devido as propriedades magnéticas das partículas e também ao próprio método de análise de microscopia eletrônica de transmissão, onde as partículas encontram-se suspensas em solução, as PMag formam aglomerados. Dessa forma, devido ao estado de aglomeração e a heterogeneidade no tamanho das partículas, a definição exata do tamanho médio das PMag é dificultada, e definiu-se que ocorre uma mistura de nanopartículas e micropartículas.

5.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

A análise de MEV foi empregada para caracterizar ainda mais a topografia da superfície dos materiais sintetizados. Como pode ser observado na Figura 12A-B, as PMag estão aglomeradas, possuem formas e tamanhos irregulares e a superfície rugosa. O aglomeramento deve-se à propriedade magnética, a qual mantém as partículas atraídas umas pelas outras e à alta energia superficial decorrente do tamanho reduzido (WANG et al., 2017).

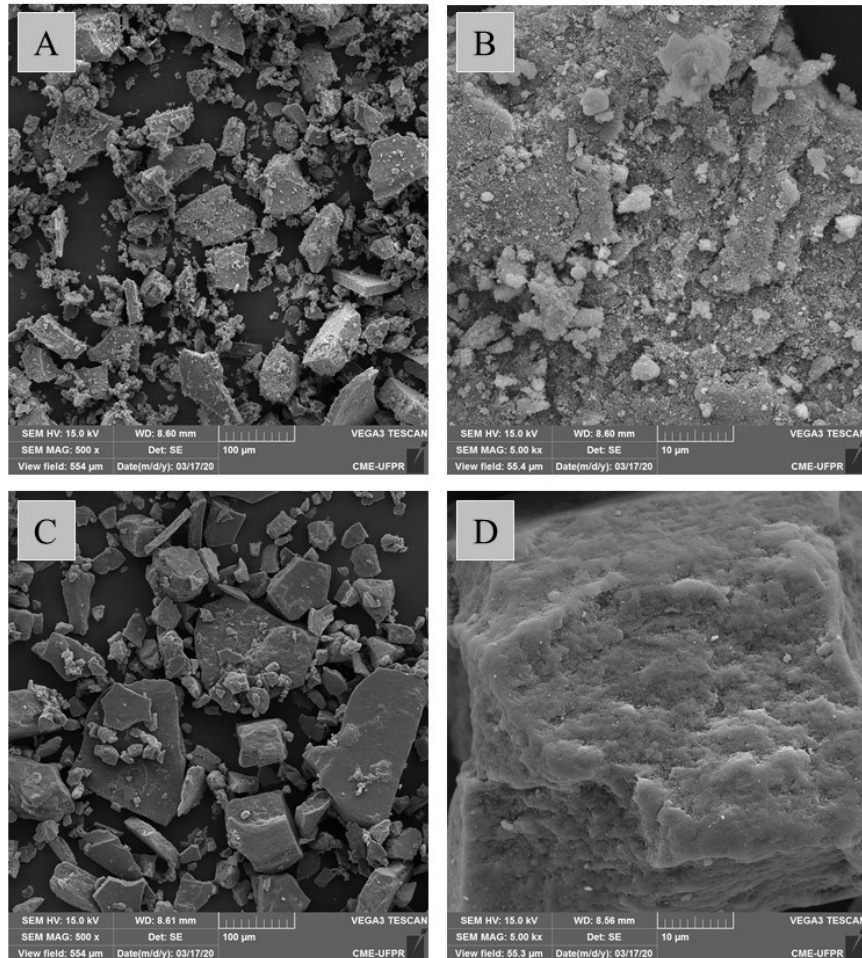
Além disso, as partículas magnéticas podem apresentar diferentes formas, cores, tamanhos, cargas iônicas da superfície e propriedades magnéticas, que variam de acordo com o método de síntese (DARWESH; MATTER; EIDA, 2019).

Na Figura 12C-D, é possível observar que ocorreu uma modificação na superfície das PMag após o tratamento utilizado para a imobilização das enzimas lacase. O processo de funcionalização com glutaraldeído e APTES, o qual foi realizado com o objetivo de inserir grupos funcionais para a ligação das enzimas lacase, também modificou a superfície das partículas, tornando-a mais lisa.

Vários métodos são empregados para revestir micro e nanopartículas com o objetivo de proteger os núcleos de óxido de ferro da corrosão e também para evitar que as partículas se aglomerem. Geralmente, é realizado um tratamento químico ou a adição de um polímero nas partículas para a fabricação de materiais magnéticos (ALI et al., 2016).

Além disso, estudos relataram a modificação da superfície dessas partículas com a adição de diferentes tipos de grupos funcionais, utilizando Carboxilatopilar [5] areno (ZHANG et al., 2019), Brometo de 2-bromoisobutiril e 3-aminopropiltrietoxissilano (YANG et al., 2019), N-[3-(Trimetoxissilil) propil] etilenodiamina (SAHOO et al., 2019), metacrilato de poli glicidilo (GUO et al., 2019) e APTES (CUI et al., 2018) como reagentes. Esse é um método considerável para aprimorar o desempenho de partículas magnéticas e, assim, estender suas aplicações, tanto para imobilização enzimática, quanto para aprimorar a adsorção de diferentes compostos (ZHANG et al., 2019).

Figura 12. Fotomicrografias de microscópio eletrônico de varredura: PMag com aumento de 500 vezes (A) e 5000 vezes (B); Lac-PMag com aumento de 500 (C) e 5000 vezes (D).



Nota: PMag: Partículas magnéticas; Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.
 Fonte: Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CEM-UFPR).

As microanálises por EDS forneceram análises qualitativas dos elementos químicos distribuídos na superfície das amostras, ou seja, a composição das partículas analisadas (Tabela 3).

A caracterização por EDS confirmou a presença de ferro (56,1 %), oxigênio (25,4 %), carbono (17,4 %), silício (0,8 %), manganês (0,2 %) e enxofre (0,1 %) nas PMag, indicando que a fabricação das partículas de Fe_3O_4 foi bem sucedida. A presença desses elementos também foi confirmada na amostra de Lac-PMag, exceto o manganês. Estes resultados indicaram que a estrutura do Fe_3O_4 não foi afetada ou oxidada pelas reações.

Quando comparados os elementos das PMag com os elementos encontrados nas Lac-PMag foi detectada a presença de cloro (0,2 %) e fósforo (0,2 %) na amostra de Lac-PMag e um aumento na quantidade de silício (1,6 %). Esses elementos que estão presentes na amostra,

são resultantes dos processos e dos reagentes utilizados para a imobilização das enzimas lacases nas partículas magnéticas.

Tabela 3. Resultados de EDS da composição química das PMag e das Lac-PMag (Dados em % de massa).

Elementos	PMag	Lac-PMag
Ferro	56,1	42,4
Oxigênio	25,4	29,2
Carbono	17,4	26,3
Silício	0,8	1,6
Manganês	0,2	---
Enxofre	0,1	0,1
Cloro	---	0,2
Fósforo	---	0,2

Nota: EDS: Espectroscopia de energia dispersiva; PMag: Partículas magnéticas; Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.

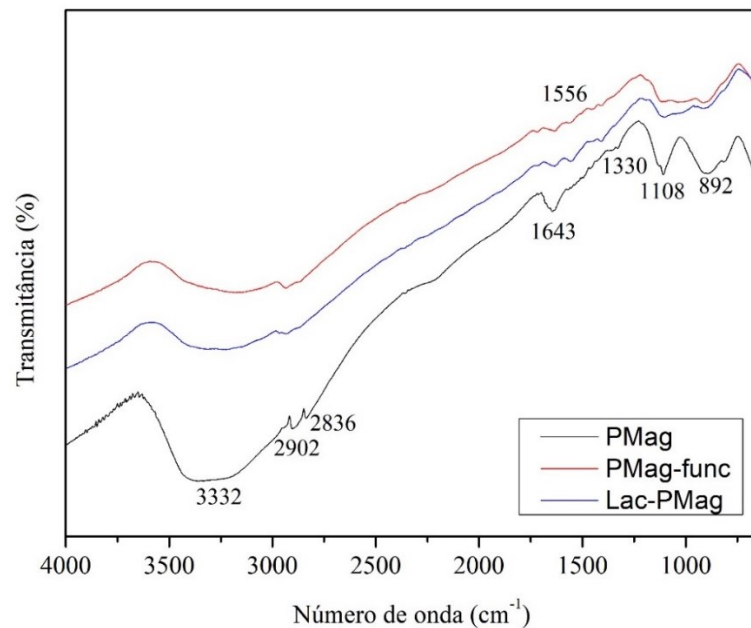
Fonte: Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CEM-UFPR).

5.5.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros de FT-IR das PMag, PMag-func e das Lac-PMag (Figura 13) foram determinados para confirmar a presença do grupo amino terminal nas partículas após o processo de funcionalização. Uma ampla banda é observada na faixa de $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ no espectro das PMag, que pode ser atribuída ao estiramento do grupo de hidroxila (O–H), o qual apresenta bandas características nesta faixa (GOMEZ et al., 2018). Além disso, a banda em 1643 cm^{-1} corresponde à vibração de flexão também de hidroxilas. As bandas em 2902 e 2836 cm^{-1} indicam as vibrações de alongamento simétrico e assimétrico de C–H existentes em grupos CH_2 (KASHEFI; BORGHEI; MAHMOODI, 2019). As bandas 1330 e 892 cm^{-1} representam vibrações de flexão de CH_2 e a banda em 1108 cm^{-1} representa a ligação Si–O (JIANG et al., 2009).

Após o processo de funcionalização (PMag-func) e da imobilização das enzimas lacase (Lac-PMag), ocorreu a modificação das bandas descritas acima, diminuindo a intensidade das mesmas. Além destas, surgiu uma banda em 1556 cm^{-1} que corresponde à vibração de flexão do N–H, presente em NH_2 (FORTES et al., 2017; GOMEZ et al., 2018; WANG et al., 2018). Portanto, pode-se inferir que a ligação dos grupos amino na superfície das partículas para formação das PMag-func e das Lac-PMag é confirmada.

Figura 13. Espectros no infravermelho das PMag, PMag-func e Lac-PMag.



Nota: PMag: Partículas magnéticas; PMag-func: Partículas magnéticas funcionalizadas com APTES e glutaraldeído; Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.

Fonte: Autoria própria (2020).

5.6 Adsorção dos corantes pelas partículas magnéticas (PMag)

5.6.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura

Em processos de adsorção, o pH da solução de corante influencia o processo de forma significativa devido à sua interferência nas propriedades da superfície do adsorvente e da ionização e dissociação das moléculas de corante. O efeito do pH na adsorção dos corantes pelo adsorvente PMag é ilustrado na Figura 14A. Para o corante *Acid Blue 277*, a eficiência de remoção decaiu de $85,2 \pm 1,70$ % para $4,7 \pm 2,65$ % com o aumento do pH da solução de 3,0 para 5,0. Nos valores de pH 6,0 e 7,0, não ocorreu a remoção do corante da solução.

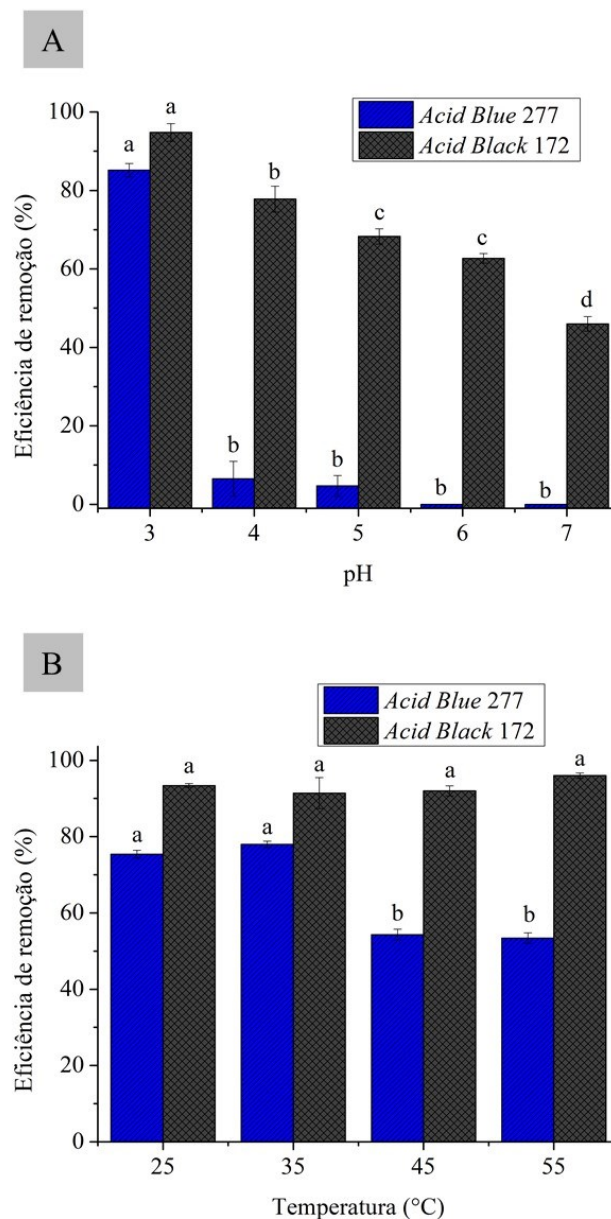
Para o corante *Acid Black 172*, a diferença de descoloração do corante com a mudança de pH não foi tão expressiva. Em pH 3,0 a descoloração foi de $94,8 \pm 2,25$ % diminuindo gradativamente até $46,0 \pm 1,86$ % em pH 7,0.

A menor taxa de adsorção dos corantes em meio alcalino ocorre devido à competição do excesso de íons OH com as moléculas de corante aniônico pelos locais de adsorção (WANG et al., 2015). Esse decréscimo na remoção dos corantes também pode ser explicado a partir do ponto carga zero (pH_{PZC}) do adsorvente. Em teoria, quando o pH é menor que o pH_{PZC} (7,0), a

superfície das PMag é protonada e se torna positivamente carregada. Esse fato propicia a adsorção de moléculas de corante com carga negativa por atração eletrostática.

O efeito da temperatura na adsorção dos corantes foi avaliado para as temperaturas 25, 35, 45 e 55 °C (Figura 14B). A adsorção do corante *Acid Blue 277* pelas PMag apresentou melhores resultados nas menores temperaturas 25 e 35 °C, sendo $75,4 \pm 1,03\%$ e $78,0 \pm 0,84\%$ de remoção, respectivamente.

Figura 14. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na remoção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* pelo adsorvente PMag. (10 mL de solução; concentração inicial de corante: 50 mg L^{-1} ; dosagem do adsorvente (PMag): 25 mg).



Nota: PMag: Partículas magnéticas. Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

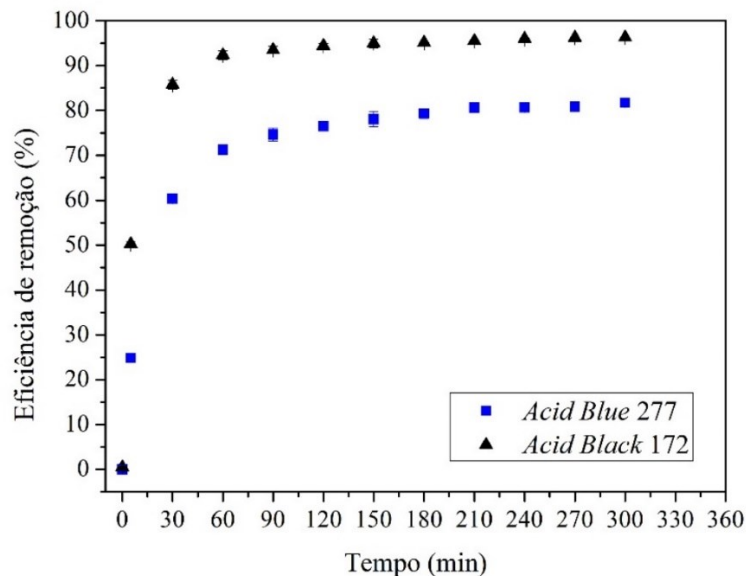
Fonte: Autoria própria (2020).

Para o corante *Acid Black 172*, não ocorreram mudanças significativas na remoção do corante com a mudança da temperatura, oscilando de $93,4 \pm 0,5$ % a 25°C para $96,0 \pm 0,67$ % a 55°C . Sendo assim, para dar continuidade nos testes, para ambos os corantes definiu-se que a temperatura utilizada seria 30°C , visando facilitar o processo por ser uma temperatura mais próxima da temperatura ambiente local e utilizada em processos de adsorção.

5.6.2 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção das PMag para os corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* foi investigada com 25 mg de adsorvente em solução de 10 mL de corante a uma concentração inicial de 50 mg L^{-1} . Como mostrado na Figura 15, a capacidade de adsorção de ambos os corantes no adsorvente aumenta rapidamente à medida que o tempo avança e atinge um estado de equilíbrio em 120 minutos de processo. Nesse tempo a eficiência de remoção dos corantes para as condições utilizadas foram de $76,51 \pm 0,26$ % e $94,42 \pm 0,50$ % para os corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*, respectivamente. A rápida adsorção nos estágios iniciais do processo de adsorção é atribuída à existência de grupos funcionais em abundância presentes na superfície das partículas (ZHENG et al., 2019b).

Figura 15. Efeito do tempo de contato na adsorção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*. (10 mL de solução; pH 3; concentração inicial de 50 mg L^{-1} ; dosagem do adsorvente (PMag): 25 mg; temperatura: 30°C).



Nota: PMag: Partículas magnéticas.
Fonte: Autoria própria (2020).

Comparado com alguns adsorventes relatados na literatura para adsorção de corantes, como micropartículas magnéticas de quitosana (WANG et al., 2015; ZHENG et al., 2019a), nanocompósito (LI et al., 2019b), micropartículas magnéticas (LONG; XIAO; CAO, 2017) e nanopartículas de polímeros (MOHAMMADIKISH; JAHANSHIRI, 2020), as PMag podem atingir o equilíbrio do processo de adsorção em tempo semelhante ou relativamente menor, demonstrando que esse material adsorvente tem grande potencial de aplicação no tratamento de águas residuais para remoção de corantes.

Estudar a cinética de adsorção é relevante não só para prever a taxa na qual os contaminantes alvo são removidos das soluções aquosas, mas também para fornecer dados importantes para o entendimento abrangente de quais mecanismos ocorrem no processo e as possíveis formas de controle da taxa (ZHENG et al., 2019a). A cinética de adsorção foi então descrita usando os modelos de Pseudo-primeira ordem, Pseudo-segunda ordem, Elovich e Difusão intrapartícula.

Os parâmetros relevantes e as curvas dos dados ajustados aos modelos são mostrados na Tabela 4 e na Figura 16, respectivamente. Como pode ser observado, o modelo de Pseudo-segunda ordem apresentou valores de coeficientes de correlação (R^2) próximos a 1, indicando que esse modelo pode correlacionar os dados da cinética para a adsorção de ambos os corantes. Quanto ao modelo de Difusão intrapartícula, os dados de adsorção não apresentaram um bom ajuste ao modelo, o que significa que a difusão intrapartícula não foi a etapa de controle da taxa.

O modelo de Pseudo-segunda ordem descreve que a etapa limitante da taxa pode ser caracterizada por uma sorção química envolvendo forças de valência por meio do compartilhamento ou troca de elétrons entre o material adsorvente (PMag) e o adsorvato (corantes) (WANG et al., 2015).

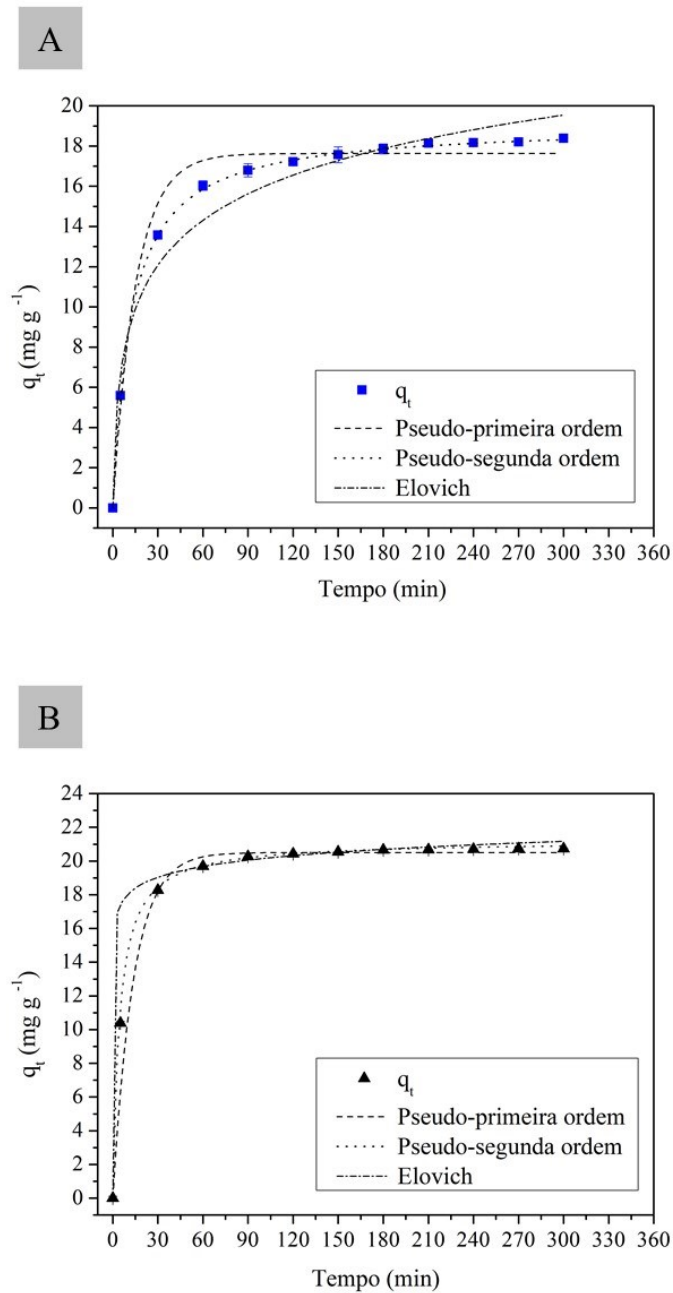
Tabela 4. Parâmetros cinéticos para a adsorção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* nas PMag.

Pseudo Primeira-Ordem	q_1	k_1	R^2
<i>Acid Blue 277</i>	17,631	0,066	0,998
<i>Acid Black 172</i>	20,506	0,073	0,906
Pseudo Segunda-Ordem	q_2	k_2	R^2
<i>Acid Blue 277</i>	19,006	0,004	0,999
<i>Acid Black 172</i>	21,196	0,010	0,990
Elovich	a	b	R^2
<i>Acid Blue 277</i>	4,262	0,305	0,997
<i>Acid Black 172</i>	2,706	1,081	0,835

Nota: PMag: Partículas magnéticas.

Fonte: A autoria própria (2020).

Figura 16. Modelos de cinética Pseudo-primeira ordem, Pseudo-segunda ordem e Elovich para a adsorção dos corantes *Acid Blue 277* (A) e *Acid Black 172* (B) nas PMag.



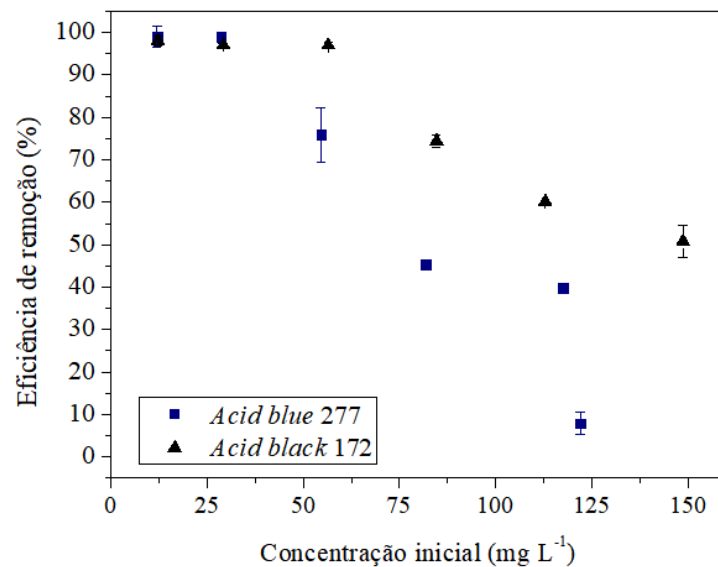
Nota: PMag: Partículas magnéticas.
Fonte: Autoria própria (2020).

5.6.3 Isotermas de adsorção

Para investigar o desempenho de adsorção das PMag para os dois corantes estudados, os modelos isotérmicos de equilíbrio de adsorção com diferentes concentrações iniciais foram avaliados a 30 °C. Esses modelos descrevem a relação entre a capacidade de adsorção de equilíbrio e a concentração de equilíbrio.

Como visto na Figura 17, a eficiência de remoção foi maior nas menores concentrações de corantes, o que ocorre devido a saturação dos sítios de ligação das PMag com o aumento da concentração do corante na solução. Na concentração inicial de 25 mg L^{-1} a eficiência de remoção para o corante *Acid Blue 277* foi de $99,1 \pm 0,83 \%$ e para o corante *Acid Black 172* foi $97,1 \pm 0,33 \%$. Os dados obtidos foram analisados pelos modelos isotérmicos de Freundlich, Langmuir, Sips e Temkin.

Figura 17. Eficiência de remoção em relação ao aumento da concentração inicial para os corantes *Acid Blue 277* e do *Acid Black 172*. (10 mL de solução; pH 3; tempo de reação: 120 minutos; dosagem do adsorvente: 25 mg; temperatura: $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$).



Fonte: Autoria própria (2020).

Como apresentado na Tabela 5 e na Figura 18, os dados de adsorção de ambos os corantes apresentaram maiores coeficientes de correlação (R^2) para o modelo de Sips. Esse modelo apresenta uma combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich, considerando que em baixas concentrações do adsorvato, o comportamento da adsorção é descrito pelo modelo de Freundlich. Em altas concentrações do adsorvato, a adsorção ocorre em monocamada, o que é descrito pela isoterma de Langmuir (OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, o modelo de Sips tem como um de seus parâmetros a capacidade máxima de adsorção, a qual foi $20,142 \text{ mg g}^{-1}$ para o corante *Acid Blue 277* e $36,702 \text{ mg g}^{-1}$ para o corante *Acid Black 172*.

Tabela 5. Parâmetros dos modelos de isotermas para a adsorção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* nas PMag.

Freundlich	k_F	n	R²	
<i>Acid Blue 277</i>	2,113	0,479	0,891	
<i>Acid Black 172</i>	1,016	0,708	0,957	
Langmuir	q_{max}	k_L	R²	
<i>Acid Blue 277</i>	26,707	0,024	0,964	
<i>Acid Black 172</i>	57,278	0,008	0,980	
Sips	q_{max}	k_s	n	R²
<i>Acid Blue 277</i>	20,142	0,041	1,718	0,998
<i>Acid Black 172</i>	36,702	0,020	1,395	0,999
Temkin	B_t	A_t	R²	
<i>Acid Blue 277</i>	6,526	0,189	0,972	
<i>Acid Black 172</i>	9,797	0,121	0,959	

Nota: PMag: Partículas magnéticas.

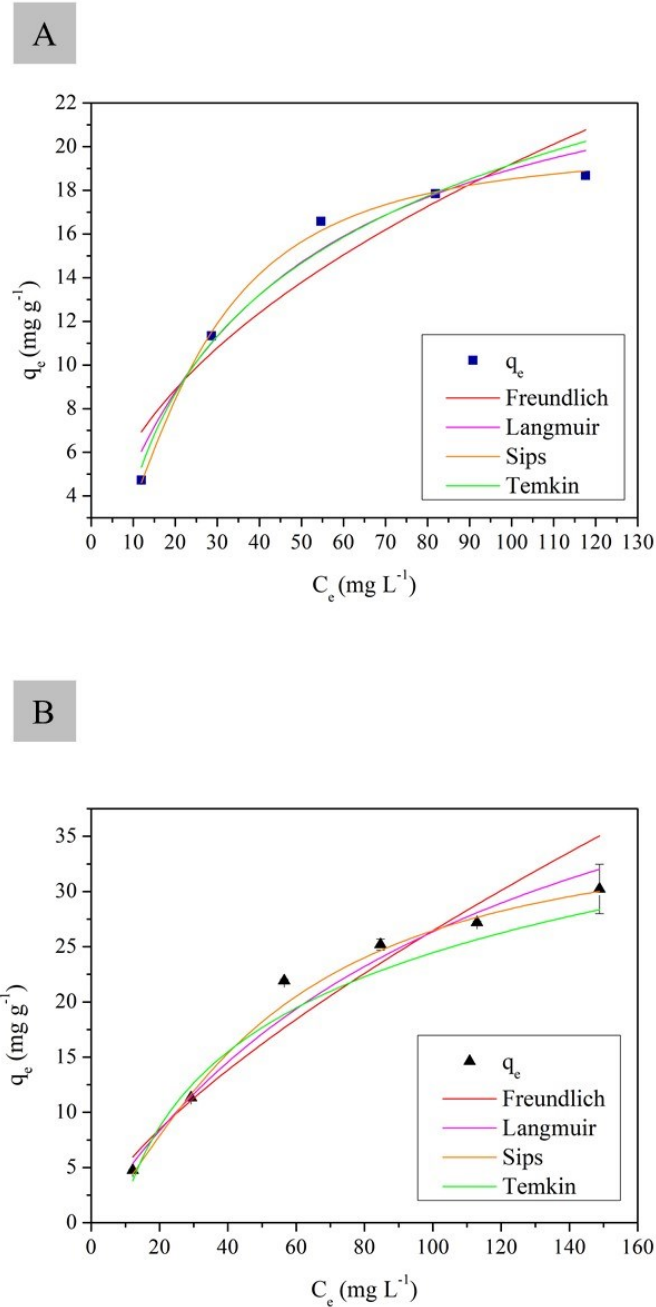
Fonte: Autoria própria (2020).

Autores que utilizaram partículas magnéticas associadas a outros materiais ou após algum pré-tratamento, apresentaram maiores capacidades de adsorção de corantes. A capacidade máxima de adsorção para os corantes *Food Yellow 3* e *Acid Yellow 23* utilizando micropartículas magnéticas de quitosana foi 357,14 mg g⁻¹ e 116,128 mg g⁻¹, respectivamente (ZHENG et al., 2019a). Para o adsorvente nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ modificadas com carboxilatopilar [5], a capacidade máxima de adsorção para o corante *Methylene Blue* foi 136,29 mg g⁻¹ e para o corante *Crystal Violet* foi 140,26 mg g⁻¹ (ZHANG et al., 2019).

No entanto, o adsorvente avaliado nesse estudo possui uma metodologia de síntese simples e fácil de ser aplicada quando comparado a outros adsorventes magnéticos, apresentando assim vantagens para ser utilizado na remoção de corantes.

Materiais adsorventes com tamanho reduzido são eficientes em processos de adsorção devido à grande área superficial que possuem em poucos gramas de partículas, o que proporciona uma grande razão área superficial/volume, quando comparados a materiais adsorventes em escala macro. Conseqüentemente, as partículas menores terão mais sítios ativos disponíveis, favorecendo a capacidade de adsorção dos corantes (NASCIMENTO et al., 2014). Dessa forma, as PMag utilizadas nesse estudo apresentaram eficiência na adsorção de corantes aniônicos, apresentando mais do que 95% de remoção dos corantes em suas condições ideais.

Figura 18. Modelos de isotermas Freundlich, Langmuir, Sips e Temkin para a adsorção dos corantes *Acid Blue 277* (A) e *Acid Black 172* (B) nas PMag.



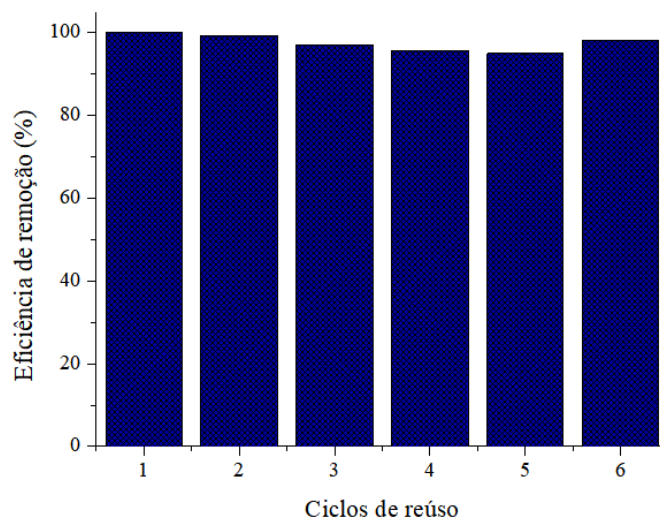
Nota: PMag: Partículas magnéticas.
Fonte: Autoria própria (2020).

5.6.4 Dessorção e reúso

A reutilização do adsorvente é um processo importante no que diz respeito à eficiência econômica na aplicação prática. Considerando que o processo de adsorção foi mais eficiente em pH ácido, para avaliar o reúso do material adsorvente o NaOH 0,5 M foi selecionado como

eluente para dessorção. Após a dessorção, o adsorvente foi lavado com água destilada e utilizado novamente no processo de adsorção. O processo foi repetido seis vezes para determinar a eficiência de remoção dos corantes. Os resultados são mostrados na Figura 19. A eficiência de remoção manteve-se pelos 6 ciclos demonstrando que as PMag podem ser utilizadas na remoção de corantes aniônicos durante diversos ciclos, mantendo 95 % de eficiência.

Figura 19. Eficiência do reúso das PMag na adsorção do corante *Acid Blue 277*. (Eficiência de remoção nas condições pH 3; concentração de corante 25 mg L^{-1} ; dosagem do adsorvente: 25 mg; temperatura: 30°C).



Nota: PMag: Partículas magnéticas.

Fonte: Autoria própria (2020).

5.7 Processo combinado de adsorção e biodegradação dos corantes pelas lacases imobilizadas nas partículas magnéticas

O processo de remoção dos corantes por meio da adsorção e da biodegradação simultânea foi realizado avaliando diferentes condições, com o objetivo de conferir a interferência de cada etapa do processo utilizado na imobilização das enzimas lacases. Para tanto, os testes de remoção dos corantes foram realizados utilizando as partículas magnéticas (PMag), as partículas magnéticas após o processo de funcionalização com APTES e glutaraldeído e sem as enzimas lacase (PMag-func), as enzimas lacase imobilizadas nas partículas magnéticas funcionalizadas (Lac-PMag) e as enzimas lacase em sua forma livre (Lacase livre).

5.7.1 Estudo dos efeitos do pH e da temperatura

O estudo dos efeitos do pH e da temperatura na remoção dos corantes foi avaliado com o objetivo de definir as melhores condições para o processo de adsorção com biodegradação simultânea. Na Tabela 6 é possível visualizar que para a remoção do corante *Acid Blue 277* as Lac-PMag e as PMag-func apresentaram baixa variação na eficiência de remoção para as condições de pH avaliadas. Já as PMag só apresentaram remoção do corante em pH 3 e a Lacase livre apresentou redução de 15 e 21% em pH 6 e 7, respectivamente. Para o corante *Acid Black 172*, as Lac-PMag, as PMag e as PMag-func apresentaram uma maior eficiência de remoção do corante em pH 3. A Lacase livre apresentou uma melhor remoção do corante em pH 4 e 5.

Como pH 3 também apresentou os melhores resultados no teste de pH ótimo das enzimas imobilizadas (Lac-PMag) e apresentou os melhores resultados de remoção de ambos os corantes nos testes de adsorção e biodegradação, optou-se por realizar os testes seguintes nessa condição de pH inicial.

Tabela 6. Efeito do pH na adsorção e biodegradação dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*. (10 mL de solução; concentração inicial de corante: 50 mg L⁻¹; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL⁻¹; temperatura: 30°C).

		Eficiência de remoção (%)				
		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
<i>Acid Blue</i>	Lac-PMag	98,92 ^a ± 0,36	98,04 ^a ± 0,49	98,71 ^a ± 0,06	92,69 ^b ± 1,13	95,62 ^c ± 0,47
	PMag	67,97 ^a ± 1,09	0,18 ^b ± 2,02	0,45 ^b ± 0,39	0,16 ^b ± 0,28	0,66 ^b ± 0,76
	PMag-func	98,12 ^a ± 0,01	97,95 ^a ± 0,01	97,31 ^a ± 0,01	97,99 ^a ± 0,01	97,43 ^a ± 0,01
	Lacase livre	86,70 ^a ± 0,01	86,18 ^a ± 0,01	86,10 ^a ± 0,01	73,73 ^b ± 0,01	65,20 ^c ± 0,02
<i>Acid Black 172</i>	Lac-PMag	95,54 ^a ± 0,42	86,84 ^b ± 1,95	72,24 ^c ± 2,48	70,36 ^c ± 0,55	78,84 ^d ± 1,34
	PMag	97,35 ^a ± 0,21	30,38 ^b ± 0,14	15,93 ^c ± 2,59	4,51 ^d ± 3,12	2,10 ^d ± 0,66
	PMag-func	82,05 ^a ± 0,36	78,51 ^b ± 0,57	70,24 ^c ± 0,86	70,70 ^c ± 0,72	69,57 ^c ± 0,06
	Lacase livre	47,90 ^a ± 3,10	60,10 ^b ± 0,84	57,80 ^b ± 1,20	45,90 ^a ± 0,38	32,70 ^c ± 5,08

Nota: Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas; PMag: Partículas magnéticas; PMag-func: Partículas magnéticas funcionalizadas com APTES e glutaraldeído. Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria (2020).

Os testes de remoção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*, realizados em diferentes temperaturas de processo (Tabela 7), apresentaram baixa ou nenhuma diferença para todas as condições avaliadas. Dessa forma, de acordo com os testes de adsorção realizados anteriormente, definiu-se 30°C como temperatura de processo.

Os resultados do estudo dos efeitos do pH e da temperatura na adsorção e biodegradação dos corantes apresentou maiores percentuais de remoção para as PMag-func e para as Lac-PMag. Esse fator indica que o processo de funcionalização das partículas com APTES e glutaraldeído melhorou o processo de remoção dos corantes. Como já dito anteriormente, o processo de silanização com o APTES adere grupamentos amino na superfície das partículas e o glutaraldeído forma um “*cross-link*”, auxiliando a ligação das moléculas de corantes nas partículas magnéticas (COSTA et al., 2019).

Estudos apontam que o processo de modificação da superfície de partículas magnéticas, tanto em escala nano como micro, aumenta os sítios de ligação das partículas, o que favorece de forma substancial o processo de adsorção de diferentes compostos (ZHANG et al., 2019).

Tabela 7. Efeitos da temperatura na adsorção e biodegradação dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*. (10 mL de solução; pH 3; concentração inicial de corante: 50 mg L⁻¹; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL⁻¹).

		Eficiência de remoção (%)			
		25 °C	35 °C	45 °C	45 °C
<i>Acid Blue</i>	Lac-PMag	98,30 ^a ± 0,50	96,82 ^b ± 0,63	95,44 ^c ± 0,56	94,79 ^c ± 0,12
	PMag	70,42 ^a ± 2,56	71,21 ^a ± 1,07	70,89 ^a ± 3,15	73,34 ^a ± 2,02
	PMag-func	98,24 ^a ± 0,64	98,24 ^a ± 0,42	97,82 ^a ± 0,84	97,76 ^a ± 0,65
	Lacase livre	81,33 ^a ± 2,44	82,41 ^a ± 1,73	81,45 ^a ± 2,62	81,22 ^a ± 3,02
<i>Acid Black 172</i>	Lac-PMag	91,42 ^a ± 1,81	92,61 ^a ± 0,67	91,87 ^a ± 2,71	93,90 ^a ± 1,84
	PMag	95,56 ^a ± 1,30	94,88 ^a ± 0,37	94,94 ^a ± 0,65	95,44 ^a ± 0,77
	PMag-func	88,86 ^a ± 0,52	95,04 ^a ± 4,15	92,19 ^a ± 1,96	93,45 ^a ± 3,08
	Lacase livre	47,82 ^a ± 1,23	47,33 ^b ± 0,99	44,27 ^c ± 1,26	66,50 ^{a,b,c} ± 6,96

Nota: Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas; PMag: Partículas magnéticas; PMag-func: Partículas magnéticas funcionalizadas com APTES e glutaraldeído. Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Fonte: Autoria própria (2020).

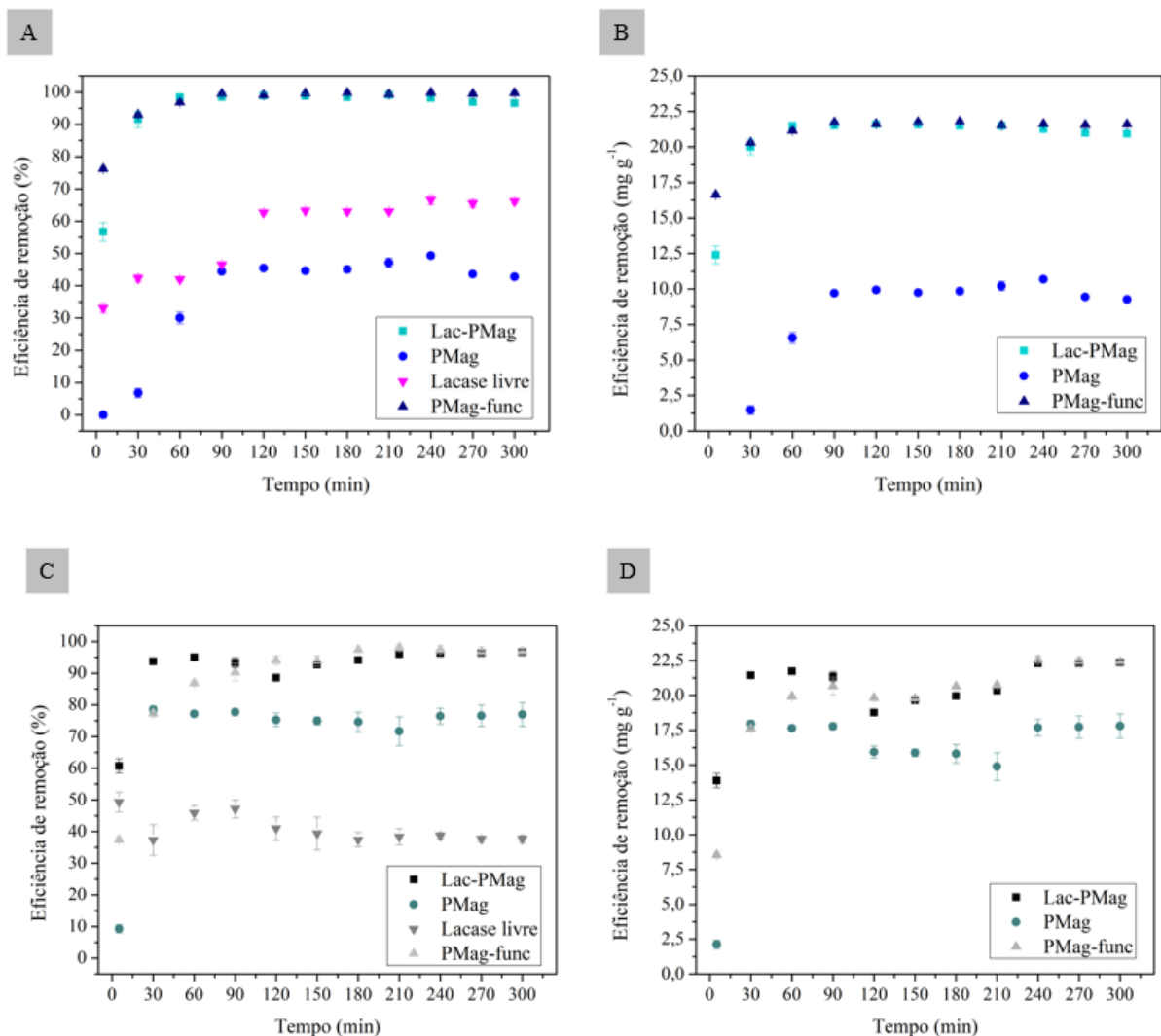
5.7.2 Estudo dos efeitos do tempo de processo

O tempo de processo para remoção dos corantes pela adsorção e biodegradação simultânea foi avaliado com o objetivo de encontrar um tempo de equilíbrio, onde a remoção dos corantes atinge a capacidade máxima. Os resultados estão apresentados nos gráficos da Figura 20.

Pode ser observado que, para ambos os corantes, a remoção apresentou melhores resultados para as PMag-func e para as Lac-PMag, sendo ainda mais evidente para o corante *Acid Blue 277*. A remoção dos corantes se desenvolveu rapidamente nos estágios iniciais conforme mostrado na inclinação das curvas dos gráficos, e depois, tornou-se linear

gradualmente. O tempo de equilíbrio para todas as condições avaliadas foi definido como 120 minutos, onde a partir de então, a remoção dos corantes se manteve constante. Nesse tempo, o corante *Acid Blue 277* foi completamente removido pelas PMag-func e pelas Lac-Mag, enquanto as PMag e a Lacase livre removeram $45,49 \pm 0,64 \%$ e $62,70 \pm 6,61 \%$, respectivamente. Para o corante *Acid Black 172*, a remoção em 120 minutos foi de $88,58 \pm 0,21$, $75,25 \pm 2,12$, $40,95 \pm 3,69$ e $94,09 \pm 1,35 \%$ para as Lac-PMag, PMag, Lacase livre e PMag-func, respectivamente.

Figura 20. Efeito do tempo na adsorção e biodegradação dos corantes *Acid Blue 277* (A-B) e *Acid Black 172* (C-D). (10 mL de solução; pH 3; concentração inicial de corante: 50 mg L^{-1} ; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: $0,3 \text{ U mL}^{-1}$; temperatura: 30°C).



Nota: PMag: Partículas magnéticas; PMag-func: Partículas magnéticas funcionalizadas com APTES e glutaraldeído; Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.

Fonte: Autoria própria (2020).

Nas PMag-func, a remoção ocorre pela adsorção dos corantes que foi melhorada em relação as PMag, devido ao processo de funcionalização das mesmas, como já descrito anteriormente. Quando imobilizadas as enzimas lacase nessas partículas (Lac-PMag), não ocorreram diferenças significativas na remoção dos corantes em relação as PMag-func. Dessa forma, infere-se que o processo de adsorção foi limitante para a remoção dos corantes nas condições avaliadas, com concentração inicial do corante de 50 mg L⁻¹.

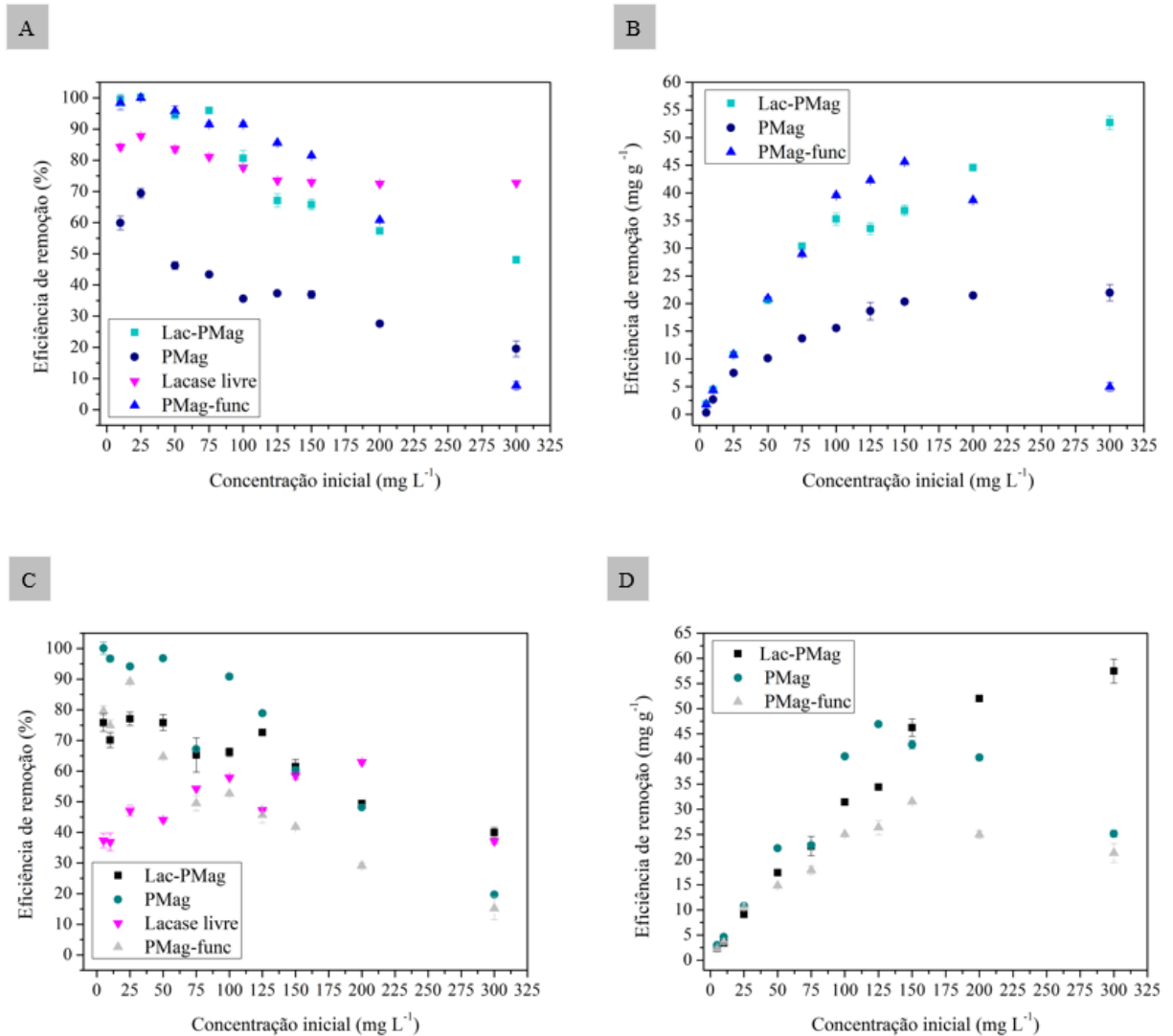
5.7.3 Estudo dos efeitos da concentração inicial dos corantes

Para avaliar o processo de adsorção e biodegradação em diferentes concentrações iniciais de corante, testes do estudo dos efeitos da concentração inicial foram realizados. Na Figura 21, pode ser observado que utilizando as Lac-PMag, o corante *Acid Blue 277* apresentou remoção de mais de 95 % em 120 minutos para as concentrações iniciais de 5, 10, 25, 50 e 75 mg L⁻¹. A partir da concentração de 100 mg L⁻¹, a remoção do corante diminuiu gradativamente, até atingir 48,10 ± 1,12 % na concentração inicial de 300 mg L⁻¹.

Utilizando as PMag-func, a remoção do *Acid Blue 277* foi semelhante, porém, quando comparada a capacidade de remoção em termos de quantidade de corante removido por grama de partículas utilizadas, ocorreram diferenças significativas. Nas maiores concentrações iniciais de corante, as Lac-PMag demonstraram uma maior capacidade de remoção dos corantes por grama de Lac-PMag utilizada. Nas concentrações de 200 e 300 mg L⁻¹, as Lac-PMag demonstraram uma capacidade de remoção de 44,60 ± 0,17 e 52,72 ± 1,23 mg g⁻¹, respectivamente. Já as PMag-func removeram 38,71 ± 0,14 e 4,94 ± 0,83 mg g⁻¹ para essas mesmas concentrações. Quando comparado com as PMag e a Lacase livre, a remoção do corante *Acid Blue 277* pelas Lac-PMag também foi maior.

Para o corante *Acid Black 172*, nas menores concentrações a remoção do corante foi maior quando utilizadas as PMag. Nas maiores concentrações do corante, a combinação de adsorção e biodegradação, utilizando as Lac-PMag, também mostrou diferenças claras em relação à biodegradação ou adsorção sozinhas. Nas concentrações de 150, 200 e 300 mg L⁻¹, a remoção do corante foi de 46,24 ± 1,74, 52,03 ± 0,09 e 57,47 ± 2,38 mg g⁻¹, respectivamente, utilizando as Lac-PMag. Quando utilizado as PMag-func, a remoção para essas concentrações iniciais foi de 31,56 ± 0,12, 25,01 ± 0,77 e 21,32 ± 1,91 mg g⁻¹.

Figura 21. Efeito da concentração inicial na adsorção e biodegradação dos corantes *Acid Blue 277* (A-B) e *Acid Black 172* (C-D). (10 mL de solução; pH 3; dosagem de partículas: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL⁻¹; temperatura: 30°C; 120 minutos).



Nota: PMag: Partículas magnéticas; PMag-func: Partículas magnéticas funcionalizadas com APTES e glutaraldeído; Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.

Fonte: Autoria própria (2020).

De acordo com os resultados obtidos, é evidente que a adsorção é a etapa de maior controle na remoção de ambos os corantes. As PMag-func possuem alto potencial de adsorção dos corantes, principalmente devido à funcionalização realizada na superfície dessas partículas. Porém, quando utilizadas as Lac-PMag, infere-se que ao saturar os sítios de ligação para a adsorção do corante, ocorre a biodegradação de parte restante desse corante presente em solução. É nessa etapa do processo que ocorre a ação das enzimas lacase imobilizadas nas partículas, obtendo-se assim o processo combinado de adsorção e biodegradação. Além disso, outro possível mecanismo que pode ocorrer, é a biodegradação pelas enzimas lacase das

moléculas adsorvidas nas partículas. A adsorção, nesse caso, facilita o acesso das enzimas à essas moléculas de corante.

Os autores Fan et al. (2017), avaliaram a adsorção e biodegradação de corante utilizando a bactéria *Pseudomonas putida* ligada a nanopartículas de Fe₃O₄. Nesse estudo, a concentração do corante avaliado diminuiu rapidamente no início, indicando que a adsorção pelas nanopartículas de Fe₃O₄ desempenhou um papel fundamental e que as moléculas de corante foram adsorvidas da solução. Posteriormente, após um equilíbrio de adsorção ocorreu a biodegradação do corante pelo microrganismo, complementando o processo de remoção do corante.

O processo simultâneo de adsorção e biodegradação de corantes por lacases imobilizadas em um suporte, pode promover a interação das moléculas de corantes com os sítios ativos das lacases (NGUYEN et al., 2016).

Outros estudos relataram a imobilização de enzimas em suportes com capacidade de adsorção. Os autores enfatizam que, a utilização dessas enzimas imobilizadas, levam a um desempenho mais consistente para a remoção de contaminantes devido à adsorção e biodegradação combinadas (NGUYEN et al., 2016; XU et al., 2013).

A maioria dos estudos que avaliam a biodegradação de corantes com concentrações iniciais de corante de até 100 mg L⁻¹ (CHEN et al., 2017; DAÂSSI et al., 2014; DAI et al., 2016; GLAM; GLAM, 2016; LIU et al., 2016; RONG et al., 2017; SATHISHKUMAR et al., 2014; ZHENG et al., 2016). Portanto, a utilização das Lac-PMag para a remoção dos corantes têxteis *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*, é significativa quando utilizada em altas concentrações (>100 mg L⁻¹) de corante, demonstrando o potencial das Lac-PMag na adsorção e biodegradação simultâneas.

Outro fator importante nesse estudo é a eficiência de remoção dos corantes pela lacase livre. A biodegradação das lacases livres quando comparada com com a biodegradação dos corantes pelas Lac-PMag, demonstrou menor eficiência. No entanto, mesmo resultando em uma menor eficiência, salienta-se que as enzimas lacases foram produzidas por um método simples e de baixo custo, a partir do fungo *Trametes villosa*. Dessa forma, as lacases produzidas apresentaram potencial para remoção dos corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172* em sua forma livre e imobilizadas nas partículas magnéticas.

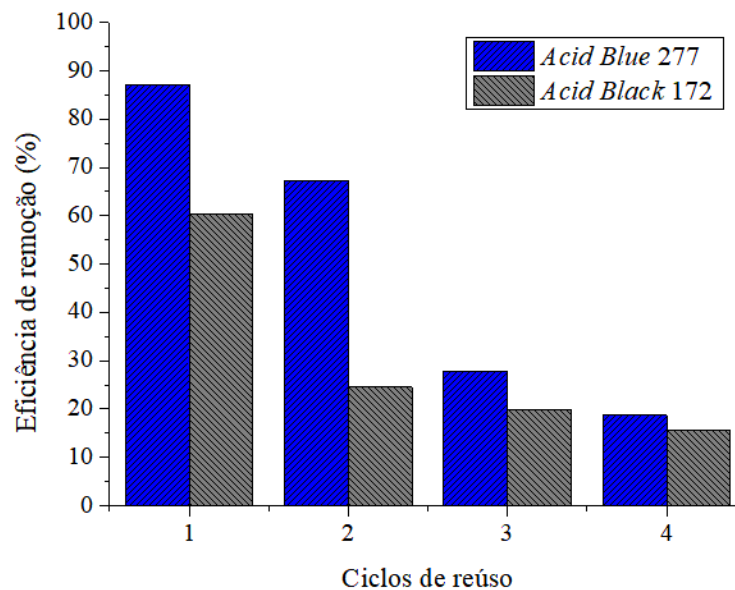
5.7.4 Reúso

Para investigar a reutilização das Lac-PMag, ciclos de reúso foram avaliados. Os ciclos foram realizados após lavar as Lac-PMag com tampão Acetato de sódio 50 mM pH 5. Dessa forma, após a adsorção e biodegradação dos corantes, as Lac-PMag eram lavadas e utilizadas em um novo ciclo. A dessorção dos corantes não foi realizada nessas etapas, para que não ocorresse a desnaturação das enzimas lacase imobilizadas.

Como pode ser observado na Figura 22, as Lac-PMag podem ser reutilizadas em mais de um ciclo, mantendo 18 % de remoção do corante *Acid Blue* 277 no quarto ciclo e 15 % de remoção do corante *Acid Black* 172, também no quarto ciclo. No primeiro ciclo ocorreu a adsorção e biodegradação dos corantes e nos ciclos seguintes, após a saturação para adsorção, ocorreu a biodegradação dos corantes, catalisada pelas enzimas lacase imobilizadas nas partículas magnéticas. Resultado semelhante foi descrito por Nguyen et al. (2016).

Dessa forma, este estudo demonstra o potencial das Lac-PMag na remoção dos corantes têxteis, que devido à fácil separação utilizando um campo magnético (imã) e ao potencial de remoção em mais de um ciclo de reúso, podem ser utilizadas de forma mais eficiente e econômica.

Figura 22. Eficiência do reúso das Lac-PMag na adsorção e biodegradação dos corantes *Acid Blue* 277 e *Acid Black* 172 (Eficiência de remoção nas condições pH 3; concentração de corante: 50 mg L⁻¹; dosagem das Lac-PMag: 25 mg; dosagem de lacase: 0,3 U mL⁻¹; temperatura: 30°C).



Nota: Lac-PMag: Lacases imobilizadas nas partículas magnéticas.

Fonte: A autoria própria (2020).

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, as PMag foram propositalmente selecionadas para imobilizar as enzimas lacase, visando a remoção de corantes têxteis considerando a interação sinérgica entre adsorção e biodegradação. A síntese de partículas magnéticas por micro-ondas apresentou-se eficiente e é considerada uma metodologia simples, rápida e de baixo custo. Observou-se morfologia heterogênea e uma aglomeração das partículas com predominância de magnetita e tamanhos que variam da escala nano até a escala micro.

Os efeitos de parâmetros importantes na adsorção dos corantes pelas PMag foram avaliados. Definiram-se assim as condições ideais para adsorção, sendo possível observar que as PMag removeram eficientemente os corantes das soluções aquosas em um tempo de equilíbrio de 120 minutos e pH de 3,0. O modelo de Pseudo-Segunda ordem foi o que melhor descreveu a cinética de adsorção dos corantes pelas PMag. Os dados de isotermas ajustaram-se ao modelo Sips, demonstrando uma adsorção onde em baixas concentrações do adsorvato, o comportamento da adsorção é descrito pelo modelo de Freundlich e em altas concentrações é descrito pela isoterma de Langmuir.

A imobilização das enzimas lacase para produção das Lac-PMag também foi avaliada. O material apresentou 99,85 % de rendimento de imobilização das enzimas lacase após a sensibilização com APTES e glutaraldeído. As enzimas imobilizadas apresentaram estabilidade operacional e de armazenamento, com 41 % da atividade enzimática inicial no quinto ciclo de reuso e 94 % da atividade enzimática inicial após 30 dias de armazenamento.

A remoção dos corantes por adsorção e biodegradação combinadas, utilizando as Lac-PMag, apresentou resultados promissores quando utilizadas em maiores concentrações de corantes. Os resultados indicam capacidade de remoção dos corantes de 52 e 57 mg g⁻¹, para os corantes *Acid Blue 277* e *Acid Black 172*, respectivamente, quando utilizada a concentração inicial de 300 mg L⁻¹ de corante.

Além disso, em todas as etapas do trabalho foram realizados testes de reuso dos materiais sintetizados, os quais indicaram a reutilização eficiente dos mesmos em diferentes ciclos. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos, é possível obter um material para o tratamento de efluente têxtil contendo corantes, o qual torna-se eficiente pelo processo combinado de adsorção pelas partículas magnéticas e biodegradação pelas enzimas lacase.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o objetivo de aprofundar mais o estudo, algumas análises futuras são sugeridas. Para uma melhor caracterização das PMag, as partículas podem ser analisadas pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), utilizada para a avaliação do tamanho de partículas em suspensão. Além disso, pode ser realizada uma curva de magnetização em magnetômetro, com o objetivo de medir a intensidade, direção e sentido dos campos magnéticos das partículas produzidas.

Em relação aos testes de remoção de corantes, para avaliar os produtos da adsorção e biodegradação pelas enzimas lacase imobilizadas, podem ser realizadas análises em HPLC (*High performance liquid chromatography*) e GCMS/MS (*Gas chromatography–Mass spectrometry*). Além disso, podem ser realizados testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, como uma ferramenta para avaliar, prever ou detectar efeitos causados nos organismos vivos pelos corantes, antes e após o tratamento.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. O. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. In: SARIASLANI, S.; GADD, G. M. **Advances in Applied Microbiology**, [s.l.] : Elsevier, 2013. v. 82. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>>

ABDULLAH, N. H. et al. Solid matrices for fabrication of magnetic iron oxide nanocomposites: Synthesis, properties, and application for the adsorption of heavy metal ions and dyes. **Composites Part B: Engineering**, [s. l.], v. 162, p. 538–568, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.12.075>>

AHN, M. et al. Characteristics of *Trametes villosa* laccase adsorbed on aluminum hydroxide. **Enzyme and microbial technology**, [s. l.], v. 41, p. 141–148, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.12.014>>

AKPINAR, M.; OZTURK, R. Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. **3 Biotech**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0742-5>>

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 40, n. 3–4, p. 997–1026, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.008>>

ALBUQUERQUE, I. L. T. et al. Modificação da superfície de nanocompósitos de Fe₂O₃/Fe₃O₄ visando seu uso para imobilização da glicose oxidase. **Cerâmica**, [s. l.], v. 63, p. 244–252, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0366-69132017633662080>>

ALEXANDRINO, A. M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack : Fr). **Cienc. Tecnol. Aliment.** [s. l.], v. 27, n. 2, p. 364–368, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000200026>>

ALI, A. et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science And Applications**, [S.L.], v. 9, p. 49-67, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2147/nsa.s99986>>

AMIN, R. et al. Immobilization of laccase on modified Fe₃O₄@SiO₂@Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste. **International Journal**

of **Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 114, p. 106–113, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.086>>

ANANTHASHANKAR, A. G. Production, Characterization and Treatment of Textile Effluents: A Critical Review. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, [s. l.], v. 05, n. 01, p. 1–18, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7048.1000182>>

APHESTEGUY, J. C. et al. Magnetite nanoparticles prepared by co-precipitation method in different conditions. **Materials Chemistry and Physics**, [s. l.], v. 161, p. 243–249, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.05.044>>

ASGHER, M.; NOREEN, S.; BILAL, M. Enhancing Catalytic Functionality of *Trametes versicolor* IBL-04 Laccase by Immobilization on Chitosan Microspheres A monomeric 64-kDa laccase from *Trametes versicolor* IBL-04 was immobilized onto. **Chemical Engineering Research and Design**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2016.12.011>>

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006. Disponível em: <[10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x)>

BASTO, C. et al. Stability and decolourization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields. **Ultrasonics Sonochemistry**, [s. l.], v. 14, p. 355–362, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2006.07.005>>

BAYRAMOGLU, G. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Biodegradation of Cibacron Blue 3GA by insolubilized laccase and identification of enzymatic byproduct using MALDI-ToF-MS : Toxicity assessment studies by *Daphnia magna* and *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 170, n. December 2018, p. 453–460, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.014>>

BERMEK, H.; ERIKSSON, K. Lignin, Lignocellulose, Ligninase. **Encyclopedia of Microbiology**, [s. l.], p. 373–384, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00152-8>>

BERRADI, M. et al. Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02711>>

BILAL, M. et al. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. **Environment International**, [s. l.], v. 124, n. January, p. 336–353, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.01.011>>

BRUCE, I. J. et al. Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, [s. l.], v. 284, n. 1–3, p. 145–160, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.06.032>>

BRUGNARI, T. et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 634, p. 1346–1351, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.051>>

BURKINSHAW, S. M.; SALIHU, G. The wash-off of dyeings using interstitial water. Part 4: Disperse and reactive dyes on polyester/cotton fabric. **Dyes and Pigments**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 548–560, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.06.006>>

CAO, L. Immobilised enzymes : science or art ?. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], p. 217–226, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014>>

CARDOSO, B. K. et al. *Panus strigellus* laccase decolorizes anthraquinone, azo, and triphenylmethane dyes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 16, p. 558–563, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.026>>

CHANG, Q. et al. Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite. **Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 961–968, 2015. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(15\)60856-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(15)60856-7)>

CHEN, J. et al. Enhanced Performance of Magnetic Graphene Oxide-Immobilized Laccase and Its Application for the Decolorization of Dyes. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 221, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/molecules22020221>>

CHENGALROYEN, M. D.; DABBS, E. R. The microbial degradation of azo dyes: Minireview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 389–399, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1198-8>>

CHHABRA, M.; MISHRA, S.; SREEKRISHNAN, T. R. Combination of chemical and enzymatic treatment for efficient decolorization/degradation of textile effluent: High operational stability of the continuous process. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 93, p. 17–24, 2015. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.09.007>>

CHHABRA, M.; MISHRA, S.; SREEKRISHNAN, T. R. Immobilized laccase mediated dye decolorization and transformation pathway of azo dye acid red 27. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–9, 2015. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40201-015-0192-0>>

CHOWDHURY, S. et al. Adsorption thermodynamics, kinetics and isosteric heat of adsorption of malachite green onto chemically modified rice husk. **Desalination**, [s. l.], v. 265, n. 1–3, p. 159–168, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.07.047>>

CLAUS, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. **Micron**, [s. l.], v. 35, n. 1–2, p. 93–96, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>>

CONAMA. Resolução n 357, 18 de março de 2005. **Diário Oficial**, [s. l.], n. 053, p. 58–63, 2005.

COSTA, J. B. et al. Enhanced biocatalytic sustainability of laccase by immobilization on functionalized carbon nanotubes / polysulfone membranes. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 355, n. August 2018, p. 974–985, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.178>>

CUI, J. et al. Shielding effects of Fe³⁺-tannic acid nanocoatings for immobilized enzyme on magnetic Fe₃O₄@silica core shell nanosphere. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 343, n. December 2017, p. 629–637, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.002>>

DAÂSSI, D. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Coriopsis gallica* into Ca-alginate beads. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s. l.], v. 90, p. 71–78, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.02.006>>

DAI, J. et al. Journal of Environmental Chemical Engineering Immobilization of laccase from *Pleurotus ostreatus* on magnetic separable SiO₂ support and excellent activity towards azo dye decolorization. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 2585–2591, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.04.037>>

DARWESH, O. M.; MATTER, I. A.; EIDA, M. F. Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.11.049>>

DAS, A.; JASWAL, V.; YOGALAKSHMI, K. N. Degradation of chlorpyrifos in soil using laccase immobilized iron oxide nanoparticles and their competent role in deterring the mobility of chlorpyrifos. **Chemosphere**, [s. l.], v. 246, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125676>>

DAS, A.; SINGH, J.; YOGALAKSHMI, K. N. Laccase immobilized magnetic iron nanoparticles: Fabrication and its performance evaluation in chlorpyrifos degradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 117, p. 183–189, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.007>>

DEBS, K. B. et al. Oil spill cleanup employing magnetite nanoparticles and yeast-based magnetic bionanocomposite. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 230, n. September 2018, p. 405–412, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.094>>

DESKA, M.; KOŃCZAK, B. Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process – State of the art. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 84, n. May, p. 112–123, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.024>>

DUARTE BAUMER, J. et al. Toxicity of enzymatically decolored textile dyes solution by horseradish peroxidase. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 360, n. August, p. 82–88, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.102>>

DWIVEDI, U. N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>>

ERKURT, H. Biodegradation and Detoxification of BPA: Involving Laccase and a Mediator. **Clean - Soil, Air, Water**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 932–939, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/clen.201400628>>

FAN, J. et al. Adsorption and biodegradation of dye in wastewater with Fe₃O₄@MIL-100 (Fe) core-shell bio-nanocomposites. **Chemosphere**, [S.L.], v. 191, p. 315-323, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.042>>

FERNANDES, R. A. et al. EDTA-Cu (II) chelating magnetic nanoparticles as a support for laccase immobilization. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 158, n. May 2016, p. 599–605, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2016.11.011>>

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013>>

FERREIRA, R. C. et al. Application of activated carbon dendê in nature and functionalized on amid acid in paracetamol adsorption. **Revista Materia**, [s. l.], v. 23, n. 1, 2018. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-707620170001.0304>>

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 156, n. 1, p. 2–10, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>>

FORTES, C. C. S. et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [s. l.], v. 117, n. March, p. 1–8, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.009>>

FREIRE, F. B.; FREITAS, S. I. De. Avaliação Da Remoção De Cor De Um Efluente Têxtil Sintético. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 241–249, 2010.

FREUNDLICH, H. Over the adsorption in solution. [s.l.] **Journal of Physical Chemistry**, v. 57, 1906.

FUNGARO, D. A. et al. Zeolite from fly ash-iron oxide magnetic nanocomposite: Synthesis and application as an adsorbent for removal of contaminants from aqueous solution. In: ANDREYEV, M. K; ZUBKOV, O. L. **Zeolites: Synthesis, Chemistry and Applications**, [s.l: s.n.]: Nova Science Publishers, p. 1-34, 2012. Disponível em: < <https://www.ipen.br/biblioteca/2012/17797>>

GADD, G. M. Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 13–28, 2009. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/jctb.1999>>

GALHAUP, C.; HALTRICH, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 56, n. 1-2, p. 225-232, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s002530100636>>

GAO, Z. et al. Co - immobilization of laccase and TEMPO onto amino - functionalized magnetic - nanoparticles and its application in acid fuchsin decolorization. **Bioresources and Bioprocessing**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40643-018-0215-7>>

GARCÍA-MORALES, R. et al. Biotransformation of emerging pollutants in groundwater by laccase from *P. sanguineus* CS43 immobilized onto titania nanoparticles. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 710–717, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.006>>

GLAM, S. S. A.; GLAM, N. S. A. Immobilization of laccase onto a porous nanocomposite : application for textile dye degradation. **Turkish Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 262–276, 2016. Disponível em: < <https://doi.org/10.3906/kim-1504-63>>

GOMEZ, I. J. et al. Nitrogen-doped Carbon Nanodots for bioimaging and delivery of paclitaxel. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 6, n. 35, 2018. Disponível em: < <https://scite.ai/reports/10.1039/c8tb01796d>>

GUO, S. et al. Willow tree-like functional groups modified magnetic nanoparticles for ultra-high capacity adsorption of dye. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 101, p. 99–104, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.04.041>>

GUPTA, V. K.; SUHAS. Application of low-cost adsorbents for dye removal - A review. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 90, n. 8, p. 2313–2342, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2008.11.017>>

HAO, Y. et al. Kinetics and thermodynamics of diquat removal from water using magnetic graphene oxide nanocomposite. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 93, n. 10, p. 1713–1720, 2015. Disponível em:< <https://doi.org/10.1002/cjce.22278>>

HO, Y. S.; MCKAY, G. A Comparison of chemisorption kinetic models applied to pollutant removal on various sorbents. **Process Safety and Environmental Protection**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 332–340, 1998. Disponível em: < <https://doi.org/10.1205/095758298529696>>

HOFRICHTER, M. et al. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 871–897, 2010. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2633-0>>

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00267-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00267-X)>

HOU, J. et al. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. **Journal of Membrane Science**, [s. l.], v. 452, p. 229–240, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2013.10.019>>

IRANIFAM, M. Analytical applications of chemiluminescence-detection systems assisted by magnetic microparticles and nanoparticles. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 51, p. 51–70, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.014>>

IRIARTE-MESA, C.; DÍAZ-CASTAÑÓN, S.; ABRADELO, D. G. Facile immobilization of *Trametes versicolor* laccase on highly monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 181, n. May, p. 470–479, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.012>>

JIANG, Y. et al. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization : Enzyme activity in catalyzing esterification. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 58, p. 103–109, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.001>>

JUN, L. Y. et al. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 102961, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102961>>

KARAMI, C.; TAHER, M. A. A catechol biosensor based on immobilizing laccase to Fe₃O₄@Au core-shell nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 129, p. 84–90, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.015>>

KASHEFI, S.; BORGHEI, S. M.; MAHMOODI, N. M. Superparamagnetic enzyme-graphene oxide magnetic nanocomposite as an environmentally friendly biocatalyst: Synthesis and biodegradation of dye using response surface methodology. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 145, n. October 2018, p. 547–558, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.023>>

KHATRI, A. et al. A review on developments in dyeing cotton fabrics with reactive dyes for reducing effluent pollution. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 50–57, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.09.017>>

KHELIFI, E. et al. Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 163, n. 2–3, p. 1056–1062, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.060>>

KNEZEVIC, A. The effect of trace elements on wheat straw degradation by *Trametes gibbosa*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S.L.], v. 96, p. 152–156, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.10.004>>

KOPP, W. et al. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, [s. l.], v. 193, n. C, p. 217–228, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mseb.2014.12.002>>

KUNZ, A. et al. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 78–82, 2002.

KUO, C. H. et al. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 2538–2545, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.026>>

LAGERGREN, S. Y. **Zur Theorie der sogenannten Adsorption geloster Stoffe**. [s.l.] Handlingar, 1898.

LALNUNHLIMI, S.; VEENAGAYATHRI, K. Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 39–46, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.013>>

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 9, p. 1361–1403, set. 1918.

LE, T. T. et al. Degradation of synthetic pollutants in real wastewater using laccase encapsulated in core-shell magnetic copper alginate beads. **Bioresource Technology**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.077>>

LI, A. H. et al. Graphene oxide-enzyme hybrid nanoflowers for efficient water soluble dye removal. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 338, p. 93–101 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.05.014>>

LI, H. et al. Bacterial degradation of anthraquinone dyes. **Journal of Zhejiang University: Science B**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 528–540, 2019. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1631/jzus.b1900165>>

LI, L. et al. Hybrid Fe₃O₄/MOFs for the adsorption of methylene blue and methyl violet from aqueous solution. **Desalination and Water Treatment**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 1973–1980, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19443994.2014.937751>>

LI, Y. et al. Applied Clay Science A magnetic core-shell dodecyl sulfate intercalated layered double hydroxide nanocomposite for the adsorption of cationic and anionic organic dyes. **Applied Clay Science**, [s. l.], v. 183, p. 105309, 2019. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.clay.2019.105309>>

LIMA, D. R.; ALMEIDA, I. L. A.; PAULA, V. I. Degradação Do Corante Azul Reativo 5G Pelo Processo Oxidativo Avançado Uv/H2O2. **E-Xacta**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 101–109, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18674/exacta.v9i2.1915>>

LIU, Q. et al. Removal of tetracycline from aqueous solution by a Fe₃O₄ incorporated PAN electrospun nanofiber mat. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s. l.], v. 28, p. 29–36, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2014.04.016>>

LIU, Y. et al. Laccase Immobilization on Poly(p-Phenylenediamine)/Fe₃O₄ Nanocomposite for Reactive Blue 19 Dye Removal. **Applied Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 8, p. 232-235, 17 ago. 2016. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.3390/app6080232>>

LONG, Y.; XIAO, L.; CAO, Q. Co-polymerization of catechol and polyethylenimine on magnetic nanoparticles for efficient selective removal of anionic dyes from water. **Powder Technology**, [s. l.], v. 310, p. 24–34, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2017.01.013>>

MEHTA, D.; MAZUMDAR, S.; SINGH, S. K. Journal of Water Process Engineering Magnetic adsorbents for the treatment of water / wastewater — A review. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 7, p. 244–265, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2015.07.001>>

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the art for the biosorption process - A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 170, n. 6, p. 1389–1416, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-013-0269-0>>

MOHAMMADIKISH, M.; JAHANSHIRI, D. Rapid adsorption of cationic and anionic dyes from aqueous solution via metal-based coordination polymers nanoparticles. **Solid State Sciences**, [s. l.], v. 99, p. 106063, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2019.106063>>

MOHAMMED, L. et al. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. **Particuology**, [s. l.], v. 30, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2016.06.001>>

MONTE BLANCO, S. P. D. et al. Kinetic, equilibrium and thermodynamic phenomenological modeling of reactive dye adsorption onto polymeric adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 307, p. 466–475, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.08.104>>

MORADI, S. et al. Design and synthesis of a versatile cooperative catalytic aerobic oxidation system with co-immobilization of palladium nanoparticles and laccase into the cavities of MCF. **Journal of Catalysis**, [s. l.], v. 382, p. 305–319, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcat.2019.12.023>>

MOREIRA, M. T. et al. Formulation of Laccase Nanobiocatalysts Based on Ionic and Covalent Interactions for the Enhanced Oxidation of Phenolic Compounds. **Applied sciences**, [s. l.], v. 7, n. 8, p. 851, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/app7080851>>

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V.; YAROLOV, Y. I. Laccase-mediator systems and their applications: a review. **Applied Biochemistry And Microbiology**, [S.L.], v. 43, n. 5, p. 523-535, set. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1134/s0003683807050055>>

MUTHUVELU, K. S. et al. A novel method for improving laccase activity by immobilization onto copper ferrite nanoparticles for lignin degradation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 152, p. 1098-1107, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.198>>

NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Amino acid induced hyper activation of laccase and its application in dye degradation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. February, p. 101064, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101064>>

NADAROGLU, H. et al. Biodegradation of some azo dyes from wastewater with laccase from *Weissella viridescens* LB37 immobilized on magnetic chitosan nanoparticles. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 31, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100866>>

NASCIMENTO, R. F. et al. **ADSORÇÃO: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. 256 p.

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

NGUYEN, L. N. et al. Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by granular activated carbon-bound laccase in a packed-bed enzyme reactor. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 210, p. 108–116, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.014>>

OLIVEIRA, S. P. et al. Avaliação da capacidade de adsorção do corante azul de metileno em soluções aquosas em caulinita natural e intercalada com acetato de potássio (Evaluation of the capacity of adsorption of methylene blue die in aqueous. **Cerâmica**, [s. l.], v. 59, n. 350, p. 338–344, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0366-69132013000200021>>

ORZECOWSKI, J. et al. Avaliação do potencial de descoloração e de detoxificação de corantes têxteis por lacase de *Pleurotus sajor-caju*. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 59–80, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.18593/eba.v18i1.16443>>

PADHIYAR, H. et al. Parametric and kinetic investigations on segregated and mixed textile effluent streams using *Moringa oleifera* seed powders of different sizes. **Journal of Water Process Engineering**, [s. l.], v. 34, n. September 2019, p. 101159, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101159>>

PARK, D.; YUN, Y. S.; PARK, J. M. The past, present, and future trends of biosorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 86–102, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12257-009-0199-4>>

PATIL, M. R.; KHAIRNAR, S. D.; SHRIVASTAVA, V. S. Synthesis, characterisation of polyaniline–Fe₃O₄ magnetic nanocomposite and its application for removal of an acid violet 19 dye. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 495–502, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13204-015-0465-z>>

PEIXOTO, F. P.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. Corantes Têxteis: Uma Revisão. **Holos**, [s. l.], v. 5, p. 98, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.15628/holos.2013.1239>>

PISCITELLI, A. et al. Induction and Transcriptional Regulation of Laccases in Fungi. **Current Genomics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 104–112, 2011. Disponível em :<<https://sci-hub.se/10.2174/138920211795564331>>

POSPISKOVA, K.; PROCHAZKOVA, G.; SAFARIK, I. One-step magnetic modification of yeast cells by microwave-synthesized iron oxide microparticles. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 456–461, 2013.

PUBCHEM. **Acid Blue 277**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acid-Blue-277>>.

PUBCHEM. **Acid Black 172**. Disponível em: <
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acid-Black-172>>.

QIU, X., et al. Laccase immobilized on magnetic nanoparticles modified by amino-functionalized ionic liquid via dialdehyde starch for phenolic compounds biodegradation. **Chemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 391, 2020. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2019.123564>>

QIU, Y. et al. One-step preparation of nano-Fe₃O₄ modified inactivated yeast for the adsorption of patulin. **Food Control**, [s. l.], v. 86, p. 310–318, 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.005>>

RAMÍREZ-MONTOYA, L. A. et al. Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from *Trametes versicolor*. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 212, p. 30–37, 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2015.08.040>>

RANGABHASHIYAM, S.; BALASUBRAMANIAN, P. Characteristics, performances, equilibrium and kinetic modeling aspects of heavy metal removal using algae. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 5, p. 261–279, 2019. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.07.009>>

REGALBUTO, J. R.; ROBLES, J. O. The Engineering of Pt / Carbon Catalyst Preparation. **University of Illinois**, Chicago, p. 13, 2004.

REIDI, H. P. **Purificação, caracterização e imobilização de lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida**. 2019. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

ROBINSON, P. J.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. The Properties of Magnetic Supports in Relation to Immobilized Enzyme Reactors. **Biotechnol Bioeng**, v. 14, p. 603-606, 1973. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/bit.260150318>>

RONG, J. et al. Preparation of Efficient, Stable, and Reusable Laccase–Cu₃(PO₄)₂ Hybrid Microspheres Based on Copper Foil for Decoloration of Congo Red. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 4468-4477, 2017. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00820>>

ROY, U. et al. Assessment on the decolourization of textile dye (Reactive Yellow) using *Pseudomonas* sp. immobilized on fly ash: Response surface methodology optimization and toxicity evaluation. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 223, p. 185–195, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.06.026>>

SAHOO, J. K. et al. Amine functionalized magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and rapid removal of Congo red dye. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 282, p. 428–440, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.03.033>>

SATAPATHY, M. K.; BANERJEE, P.; DAS, P. Plant-mediated synthesis of silver-nanocomposite as novel effective azo dye adsorbent. **Applied Nanoscience**, Switzerland, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13204-013-0286-x>>

SATHISHKUMAR, P. et al. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Laccase immobilization on cellulose nanofiber : The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, [s. l.], v. 100, p. 111–120, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.008>>

SEKULJICA, N.Ž. et al. Decolorization of Anthraquinonic Dyes from Textile Effluent Using Horseradish Peroxidase: optimization and kinetic study. **The Scientific World Journal**, [S.L.], v. 2015, p. 1-12, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2015/371625>>

SEMIÃO, M. A. et al. Journal of Environmental Chemical Engineering Residual diatomaceous earth as a potential and cost e ff effective biosorbent of the azo textile dye Reactive Blue 160. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 103617, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103617>>

SHEN, Y. F. et al. Tailoring size and structural distortion of Fe₃O₄ nanoparticles for the purification of contaminated water. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 100, n. 18, p. 4139–4146, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.004>>

SHI, L. et al. Removal of sulfonamide antibiotics by oriented immobilized laccase on Fe₃O₄ nanoparticles with natural mediators. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 279, p. 203–211, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.070>>

SILVA, M. F.; PINEDA, E. A. G.; BERGAMASCO, R. Aplicação de óxidos de ferro nanoestruturados como adsorventes e fotocatalisadores na remoção de poluentes de águas residuais. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 393–398, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140311>>

SINGH, R. L.; SINGH, P. K.; SINGH, R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes - A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 104, p. 21–31, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.027>>

SIPS, Robert. On the Structure of a Catalyst Surface. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 490-495, 1948.

SOLÍS, M. et al. Microbial decolouration of azo dyes: A review. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 12, p. 1723–1748, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.08.014>>

SONDHI, S. et al. Immobilization of laccase-ABTS system for the development of a continuous flow packed bed bioreactor for decolorization of textile effluent. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 117, p. 1093–1100, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.007>>

SUN, H. et al. Journal of Colloid and Interface Science Immobilization of laccase in a sponge-like hydrogel for enhanced durability in enzymatic degradation of dye pollutants. **Journal of colloid and interface science**, [s. l.], v. 450, p. 353–360, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.037>>

TEMKIN, M. J.; PYZHEV, V. Kinetic of ammonia synthesis on promoted iron catalysts. **Acta Physiochim URSS**, v. 12, p. 217–222, 1940.

THINH, N. N. et al. Magnetic chitosan nanoparticles for removal of Cr(VI) from aqueous solution. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 1214–1218, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.013>>

VIJAYALAKSHMIDEVI, S. R.; MUTHUKUMAR, K. Improved biodegradation of textile dye effluent by coculture. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 114, p. 23–30, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.039>>

WANG, H. et al. Rapid Decolorization of Phenolic Azo Dyes by Immobilized Laccase with Fe₃O₄ / SiO₂ Nanoparticles as Support. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. [s. l.], v. 52, n. 12 p. 4401-4407, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ie302627c>>

WANG, J. et al. Preparation of mesoporous magnetic Fe₂O₃ nanoparticle and its application for organic dyes removal. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 248, p. 13–18, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.10.026>>

WANG, J.; GUO, X. Adsorption kinetic models: Physical meanings, applications, and solving methods. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 390, p. 122-156, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122156>>

WANG, P. et al. Removal of Reactive Blue 21 onto magnetic chitosan microparticles functionalized with polyamidoamine dendrimers. **Reactive and Functional Polymers**, [s. l.], v. 91–92, p. 43–50, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.04.007>>

WANG, Q. et al. Synthesizing magnetic support for laccase immobilization for the purification of pre-hydrolysis liquor. **BioResources**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1885–1894, 2018.

WEBER, W. J.; MORRIS, J. C.; STUMM, W. Determination of Alkylbenzenesulfonates by Ultraviolet Spectrophotometry. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 34, n. 13, p. 1844-1845, dez. 1962. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ac60193a048>>

WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 157, n. 2, p. 174-209, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>>

WONG, J. K. H. et al. Potential and challenges of enzyme incorporated nanotechnology in dye wastewater treatment: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 103261, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103261>>

WU, E. et al. Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. **Chemosphere**, [s. l.], v. 233, p. 327–335, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.150>>

WU, F. C.; TSENG, R. L.; JUANG, R. S. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 150, n. 2–3, p. 366–373, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.01.014>>

XIAO, Y.; LIANG, H.; WANG, Z. MnFe₂O₄/chitosan nanocomposites as a recyclable adsorbent for the removal of hexavalent chromium. **Materials Research Bulletin**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 3910–3915, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.05.099>>

XU, F. et al. Targeted Mutations in a *Trametes villosa* Laccase. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 274, n. 18, p. 12372-12375, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.18.12372>>

XU, P. et al. Uniform magnetic chitosan microspheres with radially oriented channels by electrostatic droplets method for efficient removal of Acid Blue. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [s. l.], v. 104, p. 210–218, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.09.016>>

XU, R. et al. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrillar membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 149, p. 111–116, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.030>>

YAMANAKA, R. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 39, p. 78-84, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/bjm/v39n1/a19v39n1.pdf>>

YANG, H. et al. Rapid removal of anionic dye from water by poly(ionic liquid)-modified magnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**, [s. l.], v. 284, p. 383–392, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.04.029>>

YAROPOLOV, A. I. et al. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism and Applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 49, p. 257-280, 1994. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02783061>>

YASEEN, D. A.; SCHOLZ, M. Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Berlin, v. 16, 1193–1226, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13762-018-2130-z>>

ZANONI, M. V. B.; YANAMAKA, H. **Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. [s.l: s.n.], 2016. Disponível em: <<https://wordpress.ft.unicamp.br/laeg/wp-content/uploads/sites/33/2017/10/Corantes.pdf>>

ZHANG, H. et al. One-pot solvothermal synthesis of Carboxylatopillar[5]arene-modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for ultrafast separation of cationic dyes. **Dyes and Pigments**, [s. l.], v. 162, p. 512–516, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.10.061>>

ZHENG, B. et al. Fast microwave synthesis of Fe₃O₄ and Fe₃O₄/Ag magnetic nanoparticles using Fe²⁺ as precursor. **Inorganic Materials**, [s. l.], v. 46, n. 10, p. 1106–1111, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1134/s0020168510100146>>

ZHENG, C. et al. Modified magnetic chitosan microparticles as novel superior adsorbents with huge “force field” for capturing food dyes. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 367, n. January, p. 492–503, 2019. a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.120>>

ZHENG, F. et al. International Biodeterioration & Biodegradation Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 69–78, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.03.004>>

ZHENG, X. et al. Novel anionic polyacrylamide-modify-chitosan magnetic composite nanoparticles with excellent adsorption capacity for cationic dyes and pH-independent adsorption capability for metal ions. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], p. 123706, 2019. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123706>>

ZILLE, A. et al. Degradation of Azo Dyes by *Trametes villosa* Laccase over Long Periods of Oxidative Conditions. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 11, p. 6711-6718, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.11.6711-6718.2005>>