



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SABRINA MORO VILLELA

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE E SEU USO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE
EFLUENTES DE INDÚSTRIAS PAPELEIRAS

Florianópolis

2006

SABRINA MORO VILLELA

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE E SEU USO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE
EFLUENTES DE INDÚSTRIAS PAPELEIRAS

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção do
título de mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Danilo Wilhelm Filho

Carlos Henrique Lemos Soares

Florianópolis

2006

SABRINA MORO VILLELA

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE E SEU USO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE
EFLUENTES DE INDÚSTRIAS PAPELEIRAS

Dissertação apresentada ao corpo docente descrito abaixo, como parte dos requisitos solicitados pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de Biotecnologia Ambiental.

Aprovado por:

Javier Ignacio Vernal

Membro Titular/Relator

Nelson Eduardo Durán Caballero

Membro Titular

Iolanda Cruz Vieira

Membro Titular

Regina Vasconcellos Antonio

Membro Suplente

Florianópolis/ 2006

AGRADECIMENTOS

Aos professores Carlos Henrique Lemos Soares e Danilo Wilhelm Filho, pela orientação e valiosas sugestões com relação à execução deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Ivana Eunice Baptista, Liz Cristina Camargo Ribas, Vitor Enumo, Paulo Zunino e Anabelle Barroso Paiva, pelo incentivo e amizade.

Ao amigo Américo Cruz Júnior, pelo incentivo e ajuda na execução das atividades experimentais.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado.

A Novozymes e ao Laboratório QUITTECH do departamento de química (UFSC), pela doação da enzima e da quitosana, respectivamente.

À Prefeitura Municipal de Garopaba, pelo transporte escolar.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

"Que cada um considere a si mesmo, não como um homem procurando satisfazer sua própria sede de conhecimento, mas como um colaborador numa grande obra comum relacionada com os interesses supremos da humanidade".

Hermann von Helmholtz

RESUMO

IMOBILIZAÇÃO DE LACASE E SEU USO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS PAPELEIRAS

Os efluentes das indústrias papeleiras são constituídos de vários compostos fenólicos tóxicos. Dentre esses compostos, alguns de elevadas massas molares (MM) são biotransformados apenas por alguns organismos como fungos da classe Basidiomycota. Diversos estudos demonstram que a biotransformação da madeira por estes fungos depende principalmente de sua capacidade de produzir enzimas lignolíticas extracelulares como as lacases. As lacases catalisam oxidação de uma série de compostos aromáticos, especialmente compostos fenólicos. Várias aplicações vêm sendo sugeridas para essas enzimas, dentre elas, o seu uso na biorremediação de compostos fenólicos e, conseqüentemente, efluentes que possuam tais compostos. No entanto, a aplicação destas, como de quaisquer enzimas na forma livre, torna-se inviável devido a peculiaridades das mesmas, como o fato de perderem atividade em condições e meios desnaturantes. Dessa forma, para aumentar a estabilidade operacional das enzimas, as mesmas podem ser imobilizadas em suportes sólidos, que lhes conferem maior resistência à perda de atividade. Considerando isso, o presente trabalho teve como principal objetivo imobilizar a enzima lacase em esferas de quitosana e avaliar seu potencial para biotransformação de amostras do efluente de uma indústria de papel e celulose. Inicialmente foi possível observar que, apesar da enzima ter adquirido valores baixos de estabilidade operacional, tornou-se mais resistente a diversas condições e meios desnaturantes tais como: pH e temperatura elevados, presença de inibidores e solventes. Em um segundo momento, foram realizados ensaios de biotransformação das amostras de efluente com a enzima imobilizada. O processo de biotransformação foi acompanhado em diversos períodos de tempo pelos seguintes parâmetros: fenóis totais, fenóis de baixa MM, cor e DQO. Com base nos resultados obtidos foi possível observar que, após 24 horas de incubação da enzima imobilizada com o efluente, houve remoção de aproximadamente 65% de fenóis totais, 65% de fenóis de baixa MM e 60% de cor. Embora não se tenha observado modificações estatisticamente significativas nos níveis de DQO após tratamento enzimático, foi possível concluir que a enzima imobilizada em esferas de quitosana possui grande potencial de biotransformação dos compostos fenólicos que, por sua vez, são os que detêm os agentes químicos responsáveis pela elevada toxicidade desse tipo de efluente.

Palavras chaves: Lacase, imobilização, efluentes, compostos fenólicos, quitosana, papel e celulose.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LACCASE AND ITS USE IN PAPER MILL EFFLUENTS BIOTRANSFORMATION

Paper mill effluents are formed by several toxic phenol compounds. Among such compounds, some of them of high molecular-mass (MM) are biotransformed only by some organisms such as fungi from Basidiomycota type. Several studies prove that wood biodegradation by these fungi mainly depends on its capacity of producing extracellular ligninolytic enzymes such as laccase ones. Laccase enzymes catalyze oxidation of a variety of aromatic compounds, especially phenol ones. Several applications have been suggested for these enzymes, among them, its use in bioremediation of phenol compounds, thus, effluents which contain such compounds. Nevertheless, these applications and any other involving enzymes in its free form are not possible because of its peculiarities, as for example, they lose activity under denaturants means and conditions. Thus, to increase enzymes operational stability, they can be immobilized in solid supports which supply more resistance to activity loss. Considering this, the present essay, has as main aim to immobilize a laccase enzyme in chitosan spheres and evaluate its biotransforming potential of a paper mill effluent sample. Initially it was possible to observe that, in spite of the enzyme had acquired operational stability low values, it became more resistant to many conditions and denaturant means, such as: high pH and temperature, inhibitors and solvents presence. In a second stage, some biotransformations tests were performed with effluent samples and the immobilized enzyme. Biotransformation process was surveyed during different periods of time according to the following patterns: total phenols, low MM phenols, color and DQO. With basis in obtained results it was possible to notice that after 24 incubation hours of the immobilized enzyme and the effluent, 65% of MM phenols were removed and 60% of the color ones. Although statistically significant changes in DQO levels were not observed after enzymatic treatment, it was possible to conclude that the immobilized enzyme in chitosane spheres have a great biodegrading potential of phenol compounds which, at the same time, are the ones which stop chemical agents, responsible for such kind of effluent high toxicity.

Keywords: Laccase, immobilization, paper mill effluents, phenol compounds, chitosan, paper and cellulose.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação da estrutura química da celulose.....	23
FIGURA 2: Representação da estrutura química da lignina.....	24
FIGURA 3: Fluxograma simplificado da produção de celulose utilizando o processo de polpação tipo Kraft e branqueamento convencional.....	26
FIGURA 4: Exemplo de compostos organoclorados presentes nos efluentes das indústrias de papel e celulose.....	28
FIGURA 5: Representação da estrutura tridimensional da lacase de <i>Trametes versicolor</i>	31
FIGURA 6: Representação da estrutura do sítio ativo das lacases.....	34
FIGURA 7: Ciclo catalítico das lacases.....	35
FIGURA 8: Métodos mais comuns utilizados para a imobilização de enzimas.....	40
FIGURA 9: Representação da estrutura química da quitina.....	41
FIGURA 10: Representação da estrutura química da quitosana.....	42
FIGURA 11: Esquema simplificado dos processos de fabricação industrial de quitosana.....	43
FIGURA 12: Curva de titulação potenciométrica da solução de quitosana e ácido clorídrico.....	61
FIGURA 13: Curva de viscosidade reduzida versus concentração da solução de quitosana...63	
FIGURA 14: a) Isotherma de adsorção de nitrogênio a 77 K da quitosana; b) gráfico BET da quitosana.....	65
FIGURA 15: Espectro Infravermelho da quitosana em pastilha de KBr.....	66
FIGURA 16: Esferas em processo de lavagem com água destilada.....	68
FIGURA 17: Modificação dos parâmetros geométricos (raio médio e porosidade) das esferas de quitosana ativadas com soluções de diferentes porcentagens glutaraldeído em pH=8,0 e temperatura de 25°C.....	69

FIGURA 18: Porcentagem de proteínas acopladas após 1 e 5 horas de incubação da solução enzimática (0,5 g/L) com esferas de quitosana ativadas com diferentes porcentagens de glutaraldeído.....	73
FIGURA 19: Atividade enzimática do sobrenadante durante o período de incubação das esferas ativadas com soluções de glutaraldeído de diferentes porcentagens com a solução enzimática (0,5 g/L) à 25°C em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0.....	74
FIGURA 20: Atividade enzimática das esferas de quitosana ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0 após as mesmas serem submetidas a um período de incubação de 5 horas com solução enzimática (0,5 g/L) à 25°C.....	75
FIGURA 21: Atividade residual da enzima livre e imobilizada em esferas ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído após 30, 60 e 120 minutos de pré-incubação em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0 e temperatura de 50°C.....	77
FIGURA 22: Atividade residual da enzima livre e imobilizada em esferas ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído após 30 minutos de incubação em solução alcalina (pH=10) e temperatura de 25°C.....	77
FIGURA 23: Atividade residual da enzima imobilizada em esferas ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído antes e após as mesmas serem submetidas a um período de estocagem de 10 dias a temperatura de 25°C em água ultrapura.....	78
FIGURA 24: Efeito do pH sobre a atividade da enzima livre e imobilizada. A atividade enzimática foi medida em tampão tartarato (0,1M) e tampão fosfato (0,1) a 25°C.....	83

FIGURA 25: Gráfico de Michaelis-Menten [V-(velocidade de reação) versus S-(concentração de siringaldazina)] para a formação de composto que absorve em 525 nm, catalisada pela lacase livre e imobilizada em esferas de quitosana.....	84
FIGURA 26: Efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima livre a 25°C em tampão tartarato pH=4,0.....	87
FIGURA 27: Efeito de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ sobre a atividade da enzima livre e imobilizada a 25°C em tampão tartarato pH=4,0.....	88
FIGURA 28: Determinação da atividade enzimática residual da enzima livre e imobilizada em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0, após um período de incubação de 30 minutos em temperaturas que variaram de 25 à 70°C.....	89
FIGURA 29: Efeito do solvente + tampão fosfato pH=4,0 (% v/v) sobre a atividade residual da enzima livre e a enzima imobilizada à 25°C.....	93
FIGURA 30: Estabilidade operacional da lacase imobilizada em quitosana à 25°C. Todos os dados foram significativos para análises em triplicata.....	96
FIGURA 31: Concentração de fenóis totais em amostras de efluente de diferentes concentrações, incubadas com 1g (a) e 2g (b) de suporte contendo enzima imobilizada, após o tempo de reação: 0, 1, 3 e 24 horas.....	99
FIGURA 32: Análises de cor em amostras de efluente de diferentes concentrações, incubadas com 1g (a) e 2g (b) de suporte contendo enzima imobilizada, após o tempo de reação: 0, 1, 3 e 24 horas.....	99
FIGURA 33: Determinação de fenóis de baixa MM, fenóis totais e cor após 1, 3 e 24 horas de incubação do efluente com a lacase imobilizada.....	101
FIGURA 34: Curva de titulação potenciométrica do efluente antes e após incubação com a lacase imobilizada por 24 horas utilizando como titulante solução de HCl (0,01M).....	104

FIGURA 35: Espectros UV antes e após 24 horas de incubação da lacase imobilizada com soluções de (a) guaiacol, (b) pirocatecol, (c) pirogallol e (d) vanilina.....	109
FIGURA 36: Curva de calibração para determinação de proteínas totais utilizando soluções com diferentes concentrações de proteína padrão (albumina bovina).....	126
FIGURA 37: Curva de calibração para determinação de fenóis de baixa MM (método da 4-AAP) utilizando soluções com diferentes concentrações de fenol.....	127
FIGURA 38: Curva de calibração para determinação de fenóis totais (método Folin) utilizando soluções com diferentes concentrações de fenol.....	128
FIGURA 39: Curva de calibração para determinação de DQO utilizando soluções com diferentes concentrações de KHP.....	130

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: Ilustração esquemática das ligações cruzadas entre duas cadeias poliméricas de quitosana com o glutaraldeído.....	70
ESQUEMA 2: Ilustração esquemática da enzima imobilizada sobre o suporte (esferas de quitosana) com auxílio do agente bifuncional (glutaraldeído).....	72
ESQUEMA 3: Mecanismo proposto para formação do grupo imino.....	72
ESQUEMA 4: Principais estruturas cromóforas básicas identificadas na madeira.....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Conteúdos de quitina de alguns crustáceos, insetos e microrganismos.....	42
TABELA 2: Parâmetros cinéticos para a lacase livre e imobilizada.....	84
TABELA 3: Quociente entre valores de K_m e $V_{máx}$ antes e após a imobilização enzimática obtidos por outros autores.....	85
TABELA 4: Determinação de DQO após 0, 1, 3 e 24 horas de tratamento do efluente com a lacase imobilizada	103
TABELA 5: Determinação da característica de cor do efluente, antes e após incubação com a lacase, imobilizada por 24 horas.....	107
TABELA 6: Porcentagens de remoção dos compostos: guaiacol, pirocatecol, pirogalol e vanilina após 24 horas de incubação com a lacase imobilizada.....	110
TABELA 7: Soluções para determinação da curva padrão de proteínas.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
MM	Massa Molar
MM _m	Massa Molar Média
K _m	Constante de Michaelis-Menten
V _{máx}	Velocidade máxima de uma reação enzimática
kDa	Unidade de massa molar
U	Unidade internacional de atividade enzimática
HBT	1-hidróxi-benzotriazole
ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato
GD	Grau de Desacetilação
BET	Brunauer, Emmett e Teller
[η]	Viscosidade intrínseca
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
ECF	Elemental chlorine free ou branqueamento livre de cloro elementar
TCF	Total chlorine free ou branqueamento totalmente livre de cloro
CEDED	Seqüência de branqueamento da polpa (C ₁ =Cl ₂ ; E ₁ = NaOH; D ₁ =ClO ₂ ; E ₂ = NaOH e D ₂ = ClO ₂).
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
4-AAP	4- Aminoantipiridina
Abs	Absorbância
Q	Quinona
C	Carbonila

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ESQUEMAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
SUMÁRIO.....	15
1.0-INTRODUÇÃO.....	18
1.1-OBJETIVOS.....	21
1.1.1- OBJETIVO GERAL.....	21
1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2.0-REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1- A PRODUÇÃO DO PAPEL.....	23
2.2- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EFLUENTES DAS INDÚSTRIAS PAPELEIRAS.....	27
2.3- TRATAMENTOS DE EFLUENTES MAIS EMPREGADOS PELAS INDÚSTRIAS.....	29
2.4- TRATAMENTOS ALTERNATIVOS DE EFLUENTES INDUSTRIAIS.....	30
2.5-LACASE.....	30
2.5.1-ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO.....	31
2.5.2-AS FUNÇÕES DAS LACASES NA NATUREZA.....	32
2.5.3- SÍTIO ATIVO.....	34
2.5.4- CICLO CATALÍTICO.....	35
2.5.5-APLICAÇÕES.....	35
2.6-IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	38
2.7-QUITINA E QUITOSANA.....	41
2.7.1-Produção e aplicações da quitosana.....	43
3.0-MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
PARTE 1: IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE.....	45
3.1-MATERIAIS.....	45
3.2-CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	45
3.2.1-Determinação do grau de desacetilação (GD).....	45
3.2.2-Determinação da massa molar média (mmm).....	46
3.2.3-Determinação da área superficial.....	47
3.2.4-Análise por espectro de infravermelho (IV).....	47
3.3-PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE QUITOSANA.....	48
3.3.1-Preparação das esferas.....	48
3.3.2-Ativação das esferas com glutaraldeído.....	48

4.3.3-Determinação de porosidade, densidade e diâmetro das esferas.....	49
3.4-CARACTERIZAÇÃO DA LACASE.....	50
3.4.1-determinação da massa molar da lacase.....	50
3.4.2-determinação da atividade enzimática.....	50
3.4.3-determinação do melhor pH.....	51
3.4.4-propriedades cinéticas frente a diferentes substratos.....	51
3.4.5-estabilidade da lacase frente a inibidores.....	51
3.4.6- Propriedades de termoestabilidade da lacase.....	52
3.4.7-determinação de estabilidade da lacase frente pH alcalino.....	52
3.4.8-determinação de estabilidade frente a solventes.....	52
3.4.9-Determinação de estabilidade frente à estocagem.....	53
3.4.10-Efeito do uso repetido sobre a atividade residual da enzima imobilizada.....	53
3.5-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO.....	53
3.5.1-Otimização do tempo necessário para promover a imobilização da enzima.....	53
3.5.1.1-determinação de proteínas totais.....	54
3.5.2-otimização da concentração de glutaraldeído para promover a ativação das esferas.....	54
PARTE 2: BIOTRANSFORMAÇÃO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA PAPELEIRA.....	55
3.6-EFLUENTE.....	55
3.7-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO EFLUENTE COM A ENZIMA IMOBILIZADA.....	55
3.7.1-Determinação de fenóis totais.....	56
3.7.2-Determinação de cor.....	56
3.8- MODIFICAÇÕES QUÍMICAS CAUSADAS NO EFLUENTE APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA.....	56
3.8.1-determinação de fenóis totais de baixa MM.....	57
3.8.2-característica da cor.....	57
3.8.3-demanda bioquímica de oxigênio (DQO).....	58
3.8.4-determinação de grupos ionizáveis utilizando titulação potenciométrica.....	58
3.9-BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA.....	58
3.10-ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	59
4.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
PARTE 1: IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE.....	60
4.1-CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	60
4.1.1-Determinação do grau de desacetilação (GD).....	60
4.2.2-Determinação da massa molar média (mmm).....	63
4.2.2-Determinação da área específica.....	64
4.2.3-Análise por espectroscopia de infravermelho (IV).....	65
4.3-PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE QUITOSANA.....	66
4.3.1-Preparação das esferas.....	67
4.3.2-caracterização física das esferas ativadas.....	68
4.4-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO.....	70
4.5-CARACTERIZAÇÃO DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA.....	81
4.5.1-determinação do melhor pH.....	81
4.5.2-propriedades cinéticas frente a diferentes substratos.....	83
4.5.3-estabilidade frente A inibidores.....	86
4.5.4-propriedades de termoestabilidade.....	88

<i>4.5.5-determinação de estabilidade frente a solventes</i>	90
<i>4.5.6- Estabilidade operacional da enzima imobilizada</i>	94
PARTE 2-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE	97
4.6- OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO EFLUENTE COM A ENZIMA IMOBILIZADA	97
4.7- MODIFICAÇÕES QUÍMICAS CAUSADAS NO EFLUENTE APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA	100
4.7.1- NATUREZA QUÍMICA DA COR DOS EFLUENTES, ANTES E APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO	104
4.8- AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA	107
5.0-CONCLUSÕES	111
6.0-RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
7.0-REFERÊNCIAS	114
ANEXO A - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	125
ANEXO B - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (MÉTODO FOLIN) E FENÓIS DE BAIXA MM (MÉTODO 4-AAP)	127
ANEXO C: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE DQO	130

1.0-INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores fabricantes de celulose e papel do mundo. Segundo o relatório estatístico de 1999, divulgado pela Bracelpa (Associação Brasileira de Celulose e Papel), a produção nacional, no ano de 1999, atingiu um volume de 7,2 milhões de toneladas de celulose e 6,9 milhões de toneladas de papel. O país é o 7º maior produtor mundial de celulose e o 11º de papel.

Além de seu destaque econômico, as indústrias de papel e celulose produzem um grande volume de efluentes, cujas características variam dependendo do processo de fabricação utilizado (COSTA, 2004). O processo de fabricação do papel resume-se nas seguintes etapas: corte da madeira e peneiramento, polpação, branqueamento da polpa obtida e fabricação do papel, sendo que os efluentes mais tóxicos são gerados na etapa de branqueamento da polpa.

Nos processos convencionais, as polpas são branqueadas por cloro molecular (Cl_2), seguido de sucessivas extrações alcalinas, com NaOH concentrado. Dessa forma, os efluentes gerados na etapa de branqueamento são constituídos de uma grande diversidade de compostos organoclorados. Esses compostos são de difícil biodegradação, podem exercer significativo efeito tóxico à comunidade biológica, e conferem aos efluentes cores e altas cargas de matéria orgânica consumidora de oxigênio (LORA, 2000). Além de compostos organoclorados, os efluentes também contêm ácidos carboxílicos aromáticos, clorados e não clorados, ligninas de baixa MM e seus produtos de degradação, e também compostos de elevadas MM (LORA, 2000; SOARES, 1998).

Os tratamentos dos efluentes mais empregados por essas indústrias são as lagoas de estabilização, lagoas de aeração e o lodo ativado, que são eficientes na redução de DQO e na fração de compostos fenólicos de baixa MM. No entanto, não reduzem a fração de compostos

fenólicos de alta MM. Os tratamentos convencionais também não reduzem a cor dos efluentes, que por sua vez, é atribuída principalmente aos compostos fenólicos de alta MM (MELO e AZEVEDO, 1997, ALI e SREEKRISHNAN, 2001).

Considerando isso, outros métodos, principalmente relacionadas à etapa de branqueamento das polpas e ao tratamento desses efluentes, vêm sendo estudados. Dentre eles, merecem destaque os processos enzimáticos que visam a utilização de enzimas lignolíticas extracelulares obtidas de fungos degradadores de madeira. Dentre a vasta diversidade de enzimas lignolíticas existentes, encontram-se as lacases (MELO e AZEVEDO, 1997).

As lacases (EC 1.10.3.2), são enzimas que catalisam, por extração de um elétron, uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos incluindo mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas com concomitante redução de oxigênio para água.

Essas enzimas vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como: biodegradação de xenobióticos e efluentes industriais, descoloração de corantes, biorremediação de solos contaminados, produção de etanol, clarificação de vinhos e chás, e produção de biossensores (MAYER e STAPLES, 2002).

No entanto, as aplicações citadas para as lacases possuem menor viabilidade com a utilização das mesmas na forma livre, ou seja, seu uso efetivo é normalmente dificultado devido às mesmas estarem sujeitas a fatores químicos, físicos e biológicos que limitam sua vida útil durante uso ou estocagem (JESUS, 1998). Muitas destas características indesejáveis podem ser removidas ou amenizadas com o uso dessas enzimas na forma imobilizada (ZANIN e MORAES, 2004).

A imobilização enzimática pode ser definida como um método que permite o confinamento da enzima numa região definida, sem perda de atividade catalítica. A fixação ou

encerramento das enzimas em suportes sólidos proporciona diversas vantagens sobre as enzimas livres, tais como: maior estabilidade operacional e aumento da vida útil da enzima, facilidade de separação do produto do catalisador, em processos analíticos e em reatores de fluxo contínuo (DURÁN et al., 1998). Vários tipos de suportes vêm sendo estudados para a imobilização das lacases, dentre eles destaca-se a quitosana (KRAJEWSKA, 2004).

A quitosana é o derivado mais importante da quitina, possuindo várias propriedades físicas, químicas e biológicas que tornam este polímero muito versátil quimicamente quando comparado à quitina (THARANATHAN e KITTUR, 2003).

Dentro deste contexto e baseando-se em estudos preliminares, o objetivo deste trabalho foi promover a imobilização da lacase e avaliar seu potencial de biotransformação do efluente coletado de uma indústria papelreira de Santa Catarina.

1.1-OBJETIVOS

1.1.1- OBJETIVO GERAL

Imobilizar a lacase em esferas de quitosana e avaliar seu potencial na biodegradação do efluente de uma indústria de papel e celulose.

1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Promover a caracterização da quitosana utilizada para confeccionar as esferas frente a parâmetros como: MM, grau de desacetilação (GD), área superficial e análise dos grupos funcionais;
- 2) Caracterizar as esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído no que diz respeito à porosidade, densidade e diâmetro das mesmas;
- 3) Determinar o período de tempo e a concentração de glutaraldeído necessários para promover a imobilização da enzima. Além disso, verificar qual a concentração de glutaraldeído utilizada para ativar as esferas, que proporciona a enzima maior estabilidade frente a pH alcalino, temperatura de 50°C e estabilidade, após um período de estocagem de dez dias;
- 4) Avaliar a atividade enzimática da lacase livre e imobilizada, frente a diferentes parâmetros físicos e químicos e determinar os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{máx}$) em relação a diferentes substratos;

- 5) Avaliar o efeito do uso repetido sobre a atividade residual da enzima imobilizada;
- 6) Avaliar a biotransformação provocada no efluente de uma indústria de papel e celulose após incubação do mesmo com a lacase imobilizada, através de parâmetros como: cor, fenóis de baixa MM, fenóis totais e DQO;
- 7) Avaliar a biotransformação provocada em diferentes compostos fenólicos (contidos nos efluentes das indústrias de papel e celulose), após incubação dos mesmos com a lacase imobilizada.

2.0-REVISÃO DA LITERATURA

2.1- A PRODUÇÃO DO PAPEL

A madeira é a matéria prima básica para a produção do papel, sendo composta de quatro componentes principais: celulose, lignina, hemicelulose e outros componentes.

A **celulose** é o principal constituinte da madeira e das fibras vegetais. Tal como o amido, a celulose é formada de cadeias constituídas de unidades D-glicose conforme ilustrado na Figura 1. A difratometria de raios X e a microscopia eletrônica indicam que as longas cadeias de celulose dispõem-se lado a lado, paralelamente em feixes (MORRISON e BOYD, 1996).

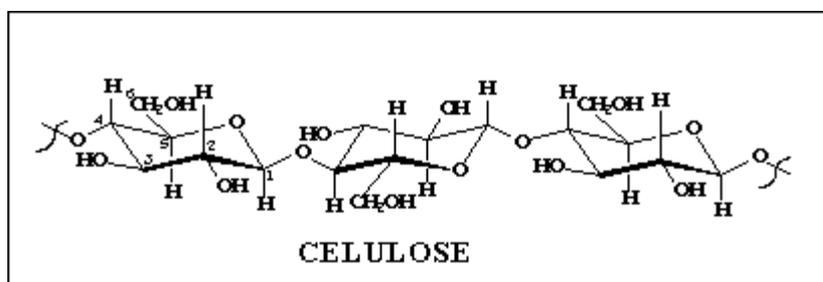


Figura 1: Representação da estrutura química da celulose.

A **lignina** (Figura 2) é um polímero tridimensional amorfo associado à parede celular, cuja função é de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. Grande parte da lignina encontrada na parede celular é intimamente interceptada pela hemicelulose, formando uma matriz que circunda as fibras de celulose. Biossinteticamente, a lignina parece ser formada basicamente de três precursores alcoólicos: *p*-cumárico, coniferílico e o sinapílico (KIRK e FARRELL, 1987).

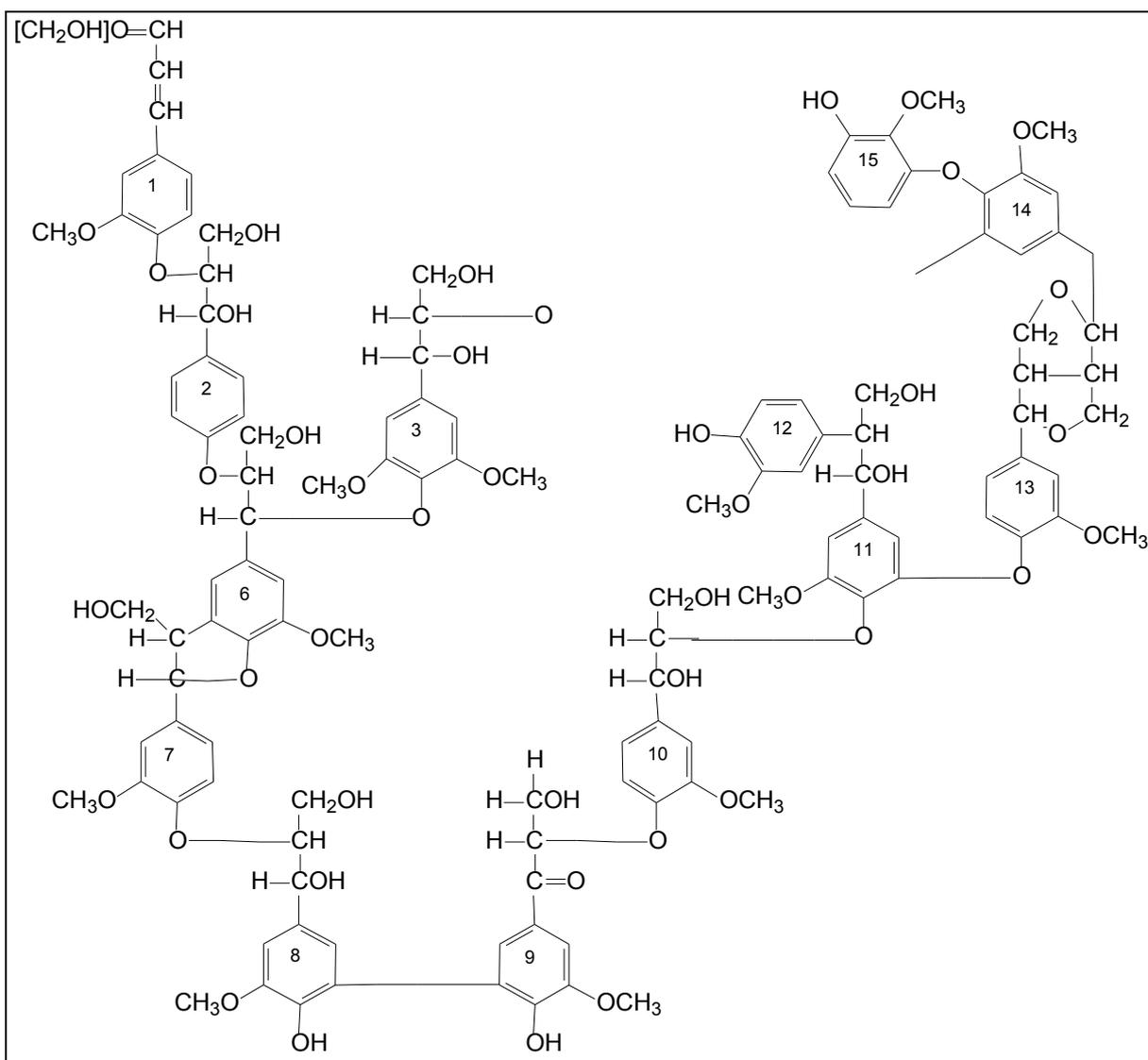


Figura 2: Representação da estrutura química da lignina.

A **hemicelulose** é um grupo de polissacarídeos, constituído de vários tipos de unidades de açúcares que podem ser definidos como solúveis em álcali, estando localizada também, na parede celular da biomassa vegetal. Esses polissacarídeos incluem substâncias pectinas, β -glucanas não celulósicas e diversos açúcares, tais como, D-xilose, D-manose, D-glicose, D-galactose e D-galacturônico. Enquanto os **outros componentes** são materiais não pertencentes à parede celular e que podem ser classificados em materiais solúveis em água (não extrativos); compostos inorgânicos (teores inferiores a 1%) pectinas; e materiais solúveis

em solventes orgânicos (extrativos), como terpenos e seus derivados, graxas, ceras e seus componentes (CASTRO, 2001).

O componente de maior interesse para a produção do papel é a celulose. Dessa forma, todo o processo de produção objetiva a separação desta fibra, que por sua vez, detém a resistência mecânica necessária para constituir o papel.

O processo de fabricação do papel se resume nas seguintes etapas:

1) Remoção da casca e picagem da madeira: primeiramente, a madeira sofre um processo de descascamento, picagem e peneiramento dos cavacos. Esse processo torna-se necessário, pois o conteúdo de celulose na casca é muito baixo. Após a remoção da casca, a madeira passa por um processo de picagem, sendo que este processo torna-se necessário para facilitar a penetração dos químicos utilizados na etapa subsequente (DEON, 2001).

2) Polpação: este processo (produção de polpas) tem como principal objetivo a solubilização e remoção da lignina, hemicelulose e os extrativos da madeira, sendo que derivados de lignina residual, são os que conferem uma cor escura à polpa e, conseqüentemente, ao papel. Dos processos tecnológicos de polpação, o mais utilizado no mundo e no Brasil, é o processo que emprega sulfeto em meio alcalino, mais conhecido como processo Kraft (SOARES, 1998).

O processo Kraft (resistente em alemão), foi inventado pelo alemão Dahl em 1884, e utiliza uma solução alcalina de sulfeto de sódio e carbonato de sódio, que atua entre 160-180°C (lixívia branca) (BLUN, 1996). Uma solução de sulfato de sódio é utilizada na fase subsequente à de cozedura, na qual após a separação da celulose, prepara-se e recupera-se o líquido de cozedura (lixívia negra).

3) Branqueamento: A polpa obtida no processo anterior ainda possui uma pequena porcentagem de lignina residual que confere à polpa uma coloração escura. A lignina residual origina a maior parte dos cromóforos, embora os extrativos da madeira também contribuam

para a cor. Os íons metálicos como ferro e cobre podem formar complexos coloridos com os compostos fenólicos presentes na celulose e, assim, intensificar sua cor. A presença de ácidos húmicos nas águas das fábricas pode também colorir a polpa, assim como a presença de casca finamente dividida e taninos. Portanto, para que o papel torne-se branco, é necessário que o mesmo seja submetido a um processo otimizado de branqueamento (SOARES, 1998).

Para o completo branqueamento das polpas, nos processos convencionais, é utilizado o tratamento com cloro molecular (Cl_2), com dióxido de cloro (ClO_2), seguido de sucessivas extrações alcalinas, com NaOH concentrado (Figura 3) (SOARES, 1998).

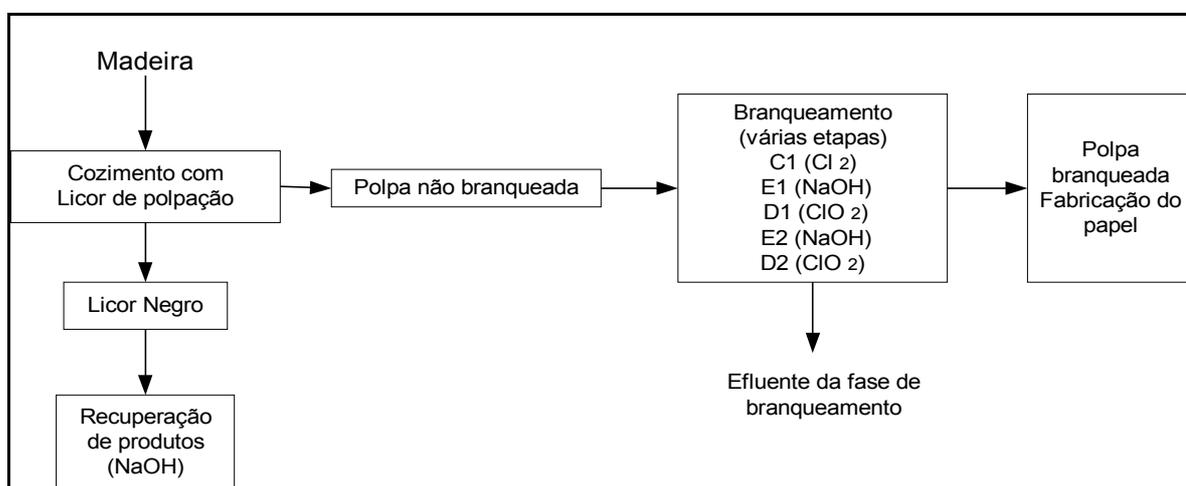


Figura 3: Fluxograma simplificado da produção de celulose utilizando o processo de polpação tipo Kraft e branqueamento convencional (SOARES, 1998).

4) Produção do papel: Após a polpa passar por um processo de refinamento para obter as características desejadas, tem-se o acréscimo de aditivos, de acordo com o tipo de papel a ser produzido. Os aditivos utilizados geralmente são o sulfato de alumínio e a cola. Uma vez preparada a massa, esta segue para a máquina de papel, que é composta, geralmente, de uma mesa plana, uma seção de prensas e secagem. Na mesa plana tem-se a formação de uma folha de papel. Logo após, esta folha passa pela seção de prensas e, por fim, por cilindros

secadores aquecidos com vapor. A folha obtida é enrolada, formando uma bobina de papel (DEON, 2001, BLUN, 1996).

2.2– COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EFLUENTES DAS INDÚSTRIAS PAPELEIRAS

Os efluentes gerados através dos processos convencionais são os mais tóxicos contendo vários compostos como açúcares provenientes da madeira, carboidratos, ácidos orgânicos, ácidos resinosos, compostos neutros e produtos da transformação de ligninas, além de uma série de organoclorados derivados. Estes últimos são formados a partir de reações entre a lignina, presente nas fibras e o cloro empregado no branqueamento convencional (MELO e AZEVEDO, 1997). Os compostos formados, especialmente os organoclorados, são de difícil biodegradação, e podem causar toxicidade aguda ou crônica em organismos aquáticos, eutrofização dos corpos de água e conseqüentes modificações nas comunidades de plantas e animais. Dentre as muitas substâncias identificadas nos efluentes, estão as ligninas de baixa MM e seus produtos de degradação (Figura 4), ácidos carboxílicos aromáticos, clorados e não clorados, e também compostos de elevadas MM (SOARES, 1998).

No entanto, os constituintes dos efluentes gerados dependem das condições nas quais ocorreu o branqueamento, e também do tipo de madeira utilizada. Pode haver também uma variação da quantidade dos produtos químicos aplicados no branqueamento ou até da própria seqüência dos mesmos. Normalmente a seqüência aplicada no branqueamento é a do tipo (CEDED) $C_1=Cl_2$; $E_1=NaOH$; $D_1=ClO_2$; $E_2=NaOH$ e $D_2=ClO_2$ (Figura 3).

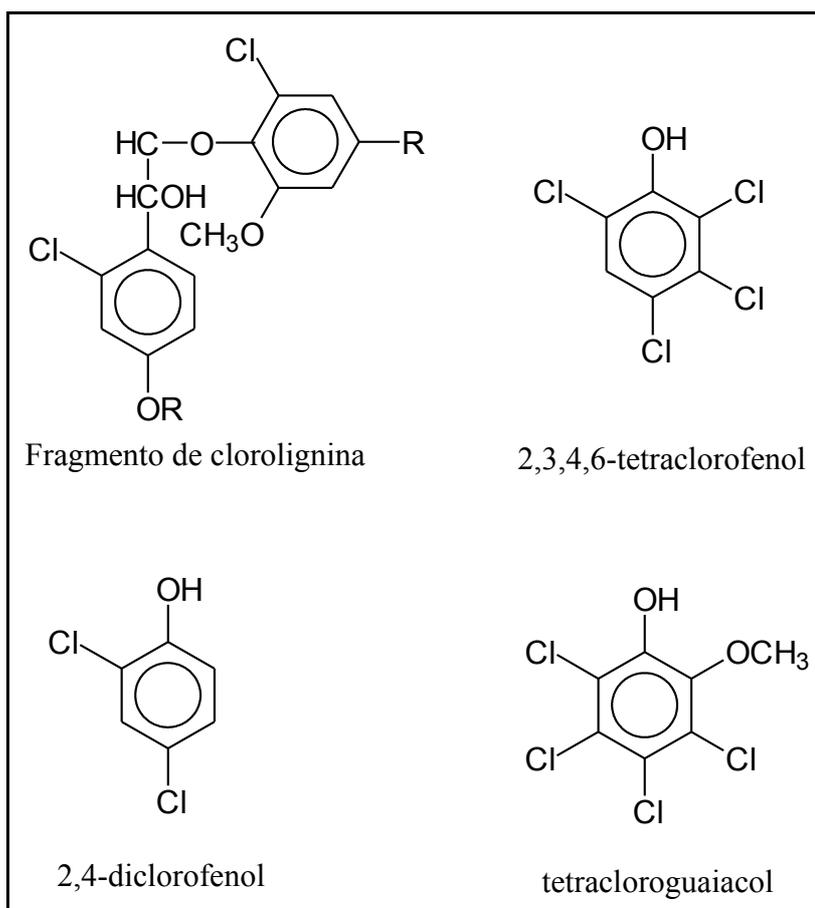


Figura 4: Exemplo de compostos organoclorados presentes nos efluentes das indústrias de papel e celulose (FREIRE et al., 2000).

Recentemente, seqüências de vários estágios de compostos oxidantes têm sido largamente aplicadas ao branqueamento de polpas Kraft. Compostos oxigenados podem substituir total ou parcialmente o cloro de processos convencionais. Quando o cloro elementar é eliminado do processo, esta tecnologia é chamada ECF “elemental chlorine free” ou branqueamento livre de cloro elementar. Quando o branqueamento é feito sem o uso de qualquer forma de cloro é denominado TCF “total chlorine free” ou branqueamento totalmente livre de cloro (SOARES, 1998).

2.3– TRATAMENTOS DE EFLUENTES MAIS EMPREGADOS PELAS INDÚSTRIAS

As lagoas de estabilização ou lagoas aeradas são freqüentemente empregadas para reduzir os níveis de sólidos suspensos e a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) dos efluentes. O decréscimo tanto das quantidades de organoclorados quanto da toxicidade é muito variável. As lagoas aeradas são o método mais comumente empregado nas indústrias papeleras e consiste em um tipo de tratamento biológico que utiliza lagoa com aeração mecânica para suprir o oxigênio necessário para a biodegradação da matéria orgânica presente no efluente (MELO e AZEVEDO, 1997). Este método promove a redução de 55 a 80% de DBO, 25% de substâncias organocloradas totais e, particularmente, alguns compostos são reduzidos em até 90%. No entanto, as frações de altas MM e as cores dos efluentes não são reduzidas. As desvantagens desse método são o alto tempo de retenção (aproximadamente 7 dias), e o alto custo de implantação, principalmente devido à energia gasta pelos aeradores mecânicos. A principal vantagem desse método está relacionada à biomassa gerada que não necessita de tratamento (SOARES, 1998).

Outro tratamento empregado por algumas indústrias papeleras é o lodo ativado. O processo consiste essencialmente de um tratamento aeróbico, que oxida a matéria orgânica a CO_2 e H_2O , NH_4 e nova biomassa. O ar é promovido por aeração mecânica ou difusores (MELO e AZEVEDO, 1997). Esse método promove redução de 90% de DBO, 40% de substâncias organocloradas totais, porém, as frações de altas MM e as cores dos efluentes também não são reduzidas. A desvantagem deste método é o grande volume de resíduos sólidos gerados, os quais devem ser tratados para se evitar que os organoclorados adsorvidos contaminem o ambiente. As vantagens desse método são o menor espaço e tempo de retenção requerido (8 a 24 horas) e a produção de resultados mais uniformes (SOARES, 1998).

2.4- TRATAMENTOS ALTERNATIVOS DE EFLUENTES INDUSTRIAIS

Vários métodos alternativos vêm sendo propostos para o tratamento dos efluentes das indústrias papelarias, como processos de adsorção (CRINI, 2005), processos avançados de oxidação (MUÑOZ et al., 2005), fotocatalise (AMAT et al., 2005) e os tratamentos enzimáticos (CASA et al., 2003). Os tratamentos enzimáticos merecem destaque por utilizarem enzimas lignolíticas extracelulares obtidas de várias espécies de fungos degradadores de madeira. Dentre as enzimas lignolíticas estudadas merecem destaque as lacases.

2.5-LACASE

As lacases (EC 1.10.3.2) (Figuras 5) possuem MM na região de 60-100 kDa e apresentam-se geralmente na forma de 2 ou 3 isoenzimas (www.biochem.ucl.uk/bsm/enzymes). São enzimas multi-cobres que catalisam a oxidação de compostos mono-, di-e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas. A reação de oxidação catalisada pelas lacases ocorre com a extração de um elétron de um substrato fenólico gerando um radical fenoxila conforme as equações abaixo.



Os radicais formados atuam em reações não catalíticas como acoplamento de radicais, desprotonação e ataque nucleofílico por água. Logo, estas reações múltiplas produzem: a) polimerização, b) quebras alquil-aril, c) oxidação C α e desmetilação (SOARES, 1998).

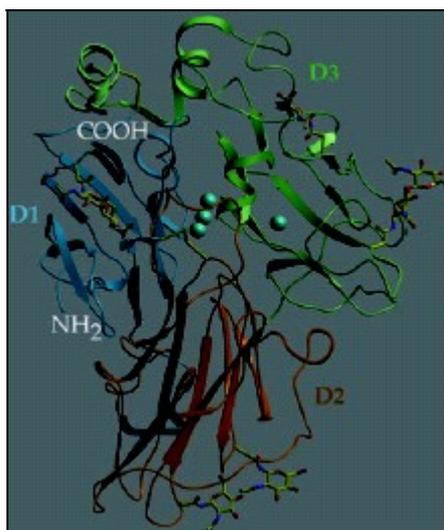


Figura 5: Representação da estrutura tridimensional da lacase de *Trametes versicolor*. A disposição das cadeias polipeptídicas D1, D2 e D3, encontram-se ilustradas em cores diferentes. As esferas azuis representam os íons cobre do sítio catalítico. Carbohidratos e pontes dissulfeto encontram-se ilustrados na forma de barras (PIONTEK; ANTORINI; CHOINOWSKI, 2002).

2.5.1-ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO

A existência dessa enzima foi demonstrada pela primeira vez por Yoshida em 1883, em uma planta, a *Rhus vernicifera*. Entretanto, a sua atividade tem sido demonstrada em mais de 60 tipos de fungos, em várias plantas superiores, em algumas bactérias e também em solos (MAYER, 1987, LEONOWICZ e BOLLAG, 1987, FAURE; BOUILLANT; BALLY, 1994, ALEXANDRE et al., 1996). Além disso, algumas fenoloxidasas que demonstram as mesmas “propriedades das lacases”, têm sido purificadas de insetos como o *Drosophila melanogaster* (SUGUMARAN et al., 1992).

As lacases são mais comumente encontradas em fungos, especialmente àqueles pertencentes à subdivisão Basidiomycotina, que estão envolvidos na degradação da lignina e completa mineralização desse substrato (TUOMELA et al., 2000).

Em muitos casos, as condições de crescimento do fungo determinam as quantidades produzidas de lacase. Dessa forma, vários fatores afetam a produção da lacase como: adição de um composto atuando como um indutor na síntese desta proteína, o aumento ou diminuição das concentrações de nitrogênio, luminosidade, meios de cultivo entre outros fatores.

2.5.2-AS FUNÇÕES DAS LACASES NA NATUREZA

Como já citado anteriormente, as lacases são produzidas principalmente por fungos da subdivisão Basidiomycotina. Isto pode indicar que a principal função das lacases na natureza seja despolimerização da lignina. No entanto, esta função contrasta com as lacases das plantas que fazem parte do sistema de síntese da lignina. Curiosamente, as lacases são classificadas como polifenol oxidases, ou seja, enzimas capazes de catalisar a oxidação de substâncias fenólicas e iniciar os processos de despolimerização. Estudos conduzidos *in vitro* com compostos modelos de lignina indicam que a primeira etapa de degradação da lignina é uma reação oxidativa com perda de 1 elétron de um grupo fenólico de lignina para produzir fenoxirradicais, os quais podem reagir através de mecanismos não enzimáticos (HATAKKA, 1994). Concorrentemente, devido à atividade polimerizante da enzima, os produtos de baixa MM podem formar compostos maiores. Essas ações contrastantes sugerem que a biodegradação da lignina por lacases fúngicas provavelmente ocorra na natureza através de mecanismos enzimáticos mais complicados. O processo de biodegradação envolve efeitos sinérgicos de outras enzimas (peroxidases, glioxal oxidases, glicose oxidases, aril álcool oxidases), e compostos não enzimáticos que interagem para estabelecer um equilíbrio entre polimerização enzimática e despolimerização da lignina.

Estudos realizados por Bourbonnais e Paice (1990) demonstraram que a atividade polimerizante das lacases sobre a lignina foi detectada quando a reação ocorria na presença de ácido 3-etilbenzothiazole-6-sulfônico (ABTS) e Remazol Blue. Essas substâncias atuam como mediadores, que permitem a lacase catalisar a oxidação e clivagem de substratos não fenólicos. Outro mediador sugerido é o 1-hidróxi-benzotriazole (HBT), que permite taxas de deslignificação muito superiores em relação à enzima atuando isoladamente.

Muitos experimentos sugerem que a lacase atua polimerizando ou despolimerizando a lignina. No entanto, o número de enzimas envolvidas na transformação da lignina, sua função específica e importância relativa ainda são processos não esclarecidos.

As lacases também estão envolvidas na morfogênese e crescimento de rizomorfos e na esporulação. Estudos realizados com corpos de frutificação maduros de *Lentinus edodes* mostraram que a atividade da lacase aumentou durante o crescimento dos corpos de frutificação, indicando uma possível função de desenvolvimento (LEATHAN e STAHMANN, 1981).

O trabalho de Edens (1999) evidenciou que as lacases também podem estar associadas à virulência de doenças de plantas, um exemplo disso, é o fungo fitopatogênico *Gaeumannomyces graminis* que produz lacase, indicando que essa enzima pode estar envolvida na despolimerização da lignina na planta hospedeira.

As lacases também parecem atuar na biossíntese de melanina em bactérias como *Azospirillum lipoferum*, atuando na oxidação de o-difenol e p-difenol, em presença de oxigênio, e conferindo a subsequente polimerização de produtos quinônicos, dando origem a moléculas grandes como a melanina (SUGUMARAN et al., 1992). Além disso, estudos têm revelado que as lacases têm importantes funções na síntese de húmus nos solos. Assim, os biopolímeros de plantas, incluindo lignina e outras macromoléculas, são clivadas por atividades microbianas em unidades monoméricas. Os polifenóis resultantes são

transformados em quinonas por fenoloxidasas (incluindo as lacases) e, após a reação com vários tipos de compostos, incluindo compostos amino, eles dão origem a substâncias húmicas de grande complexidade (HATAKKA, 1994).

2.5.3- SÍTIO ATIVO

As lacases contém quatro átomos de Cu, os quais têm sido classificados de acordo com a Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), em três tipos: Tipo 1 ou azul, tipo 2 ou normal e Tipo 3, sendo que este último é constituído por dois átomos de cobre antiferromagneticamente acoplados (Figura 6) (SUNDARAN et al., 1997).

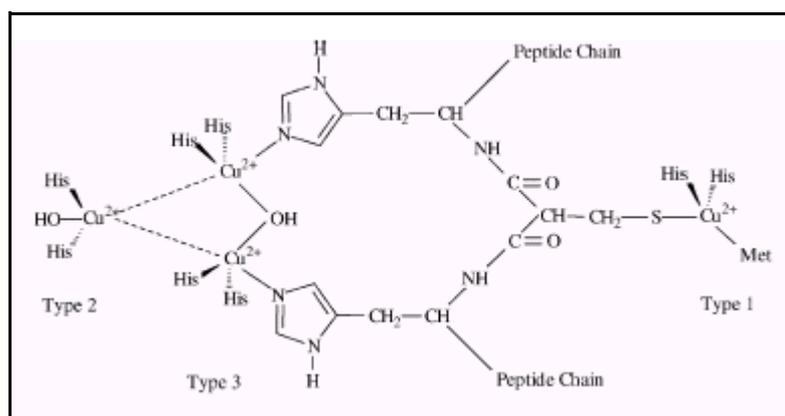


Figura 6: Representação da estrutura do sítio ativo das lacases (SOLOMON; SUNDARAN; MACHONKIN, 1996).

A espectroscopia de absorção de raios X e o dicroísmo circular magnético têm revelado que os cobres tipo 2 e 3 combinam-se para formar uma estrutura trinuclear que está envolvida na ligação com o oxigênio. Esta estrutura trinuclear formada pelos cobres tipos 2 e 3 está coordenada por 8 resíduos de histidina. O cobre tipo 1 está coordenado por 2 resíduos de histidina e 1 resíduo de cisteína, e parece estar relacionada ao processo de captura dos elétrons (COLE et al., 1990).

2.5.4- CICLO CATALÍTICO

O ciclo catalítico das lacases envolve sucessivas transferências de elétrons entre os átomos de cobre. A estequiometria do ciclo compreende 4Cu^{+2} (ligados a uma única proteína ou a cadeias protéicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e uma molécula de O_2 (SOARES, 1998). A Figura 7 ilustra resumidamente o ciclo catalítico das lacases, onde pode-se observar a lacase nativa, constituída dos seus 4 átomos de Cu com estado de oxidação +2. À medida que a enzima vai promovendo a oxidação de seus substratos, os átomos de Cu vão se reduzindo e transferindo seus elétrons, de forma que o sítio 1 sempre esteja pronto para promover a oxidação de um substrato, até a completa redução de todos os sítios e sua reoxidação formando água para retomar novamente o ciclo.

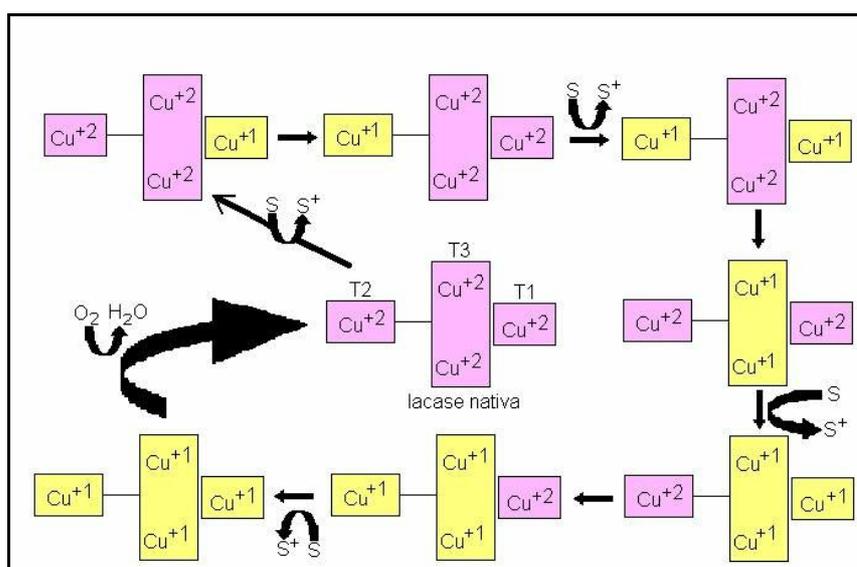


FIGURA 7: CICLO CATALÍTICO DAS LACASES (MODIFICADO DE DURÁN ET AL., 2002).

2.5.5- APLICAÇÕES

Na área ambiental as lacases vêm sendo investigadas para a **biotransformação de compostos fenólicos**, conseqüentemente podem ser utilizadas no tratamento de efluentes que

detém tais compostos. Estudos realizados evidenciam uma intensa despolimerização de compostos fenólicos de altas MM do efluente de uma indústria papelreira com concomitante redução de cor em até 60%, após 45 minutos de incubação do efluente com a lacase de *Aspergillus sp* (VILLELA e SOARES, 2005). Cho e colaboradores (1999), demonstraram que na presença de lacase de *Cerrena unicolor*, 85% de 2,4,5-triclorofenol foi removido de uma mistura reacional.

Munari, Gaio e Dillon (2003) avaliaram a degradação de fenóis totais de um efluente de uma indústria papelreira em meios submersos com *Pleurotus sajor-caju*, e observaram que após 13 dias de incubação a redução de fenóis foi de até aproximadamente 59%. Esta redução foi associada à excreção de lacases e peroxidases que também foram medidas no mesmo período de tempo.

D'annibale e colaboradores (1999) utilizaram lacase de *Lentinula edodes* imobilizada em quitosana para avaliar a redução de uma série de compostos fenólicos, e observaram que após 24 horas de incubação dos mesmos com a enzima imobilizada, ocorreu a redução de até 100% de algumas espécies fenólicas.

Além dos estudos envolvendo a possibilidade de aplicação das lacases no tratamento de efluentes, há pesquisas indicando o potencial dessa enzima em processos de polpação. Dessa forma, a enzima atua no branqueamento da polpa em substituição ao cloro. O estudo de Camarero e colaboradores (2004) ilustra a eficiência de **biobranqueamento** em polpas de papel usando o sistema lacase+HBT, onde foi observado decréscimo de 63-68% do número de kappa da polpa estudada. O número de kappa é um parâmetro que estima a quantidade de lignina residual existente na polpa.

As lacases também são eficientes na **degradação de vários xenobióticos** como os PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons); um exemplo é o estudo de Dodor, Hwang e Ekunwe (2004) que utilizou a lacase de *Trametes versicolor* imobilizada em kaolinite na

presença de ABTS. Esse sistema promoveu a oxidação de antraceno e benzo[a]pireno em 80% e 85%, respectivamente.

Bressler, Fedorak e Pickard (2000) utilizaram a lacase purificada de *Coriolopsis gallica* para oxidar carbazole, N-etilcarbazole, fluoreno e dibenzotiofeno em presença de HBT como mediador. O estudo revelou que carbazole e N-etilcarbazole foram removidas completamente após 18 horas de incubação com o sistema enzima-mediador, enquanto que o fluoreno e o dibenzotiofeno obtiveram taxas de remoção de 75% e 60%, respectivamente.

As lacases também são capazes de **degradar vários tipos de corantes**, e, conseqüentemente, podem ser utilizadas no tratamento de efluentes das indústrias têxteis. Para ilustrar essa aplicação tem-se o estudo de Chagas e Durrant (2001), que utilizaram *Pleurotus sajor-caju*. Esse fungo promoveu descoloração de 100% do amaranth e new coccine, 50% orange G e 20% de tartrazine, sendo que esses resultados foram diretamente relacionados à ação de enzimas lignolíticas, especialmente as lacases.

Peralta-Zamora e colaboradores (2003), observaram a eficiente descoloração promovida pela lacase de *Trametes versicolor* imobilizada sobre os seguintes corantes: Remazol Brilhante Blue R, Remazol Black B, Reativo orange 122 e Reativo red 251.

Outros estudos têm ilustrado a aplicação dessas enzimas para **remoção de compostos fenólicos em cervejas, vinhos e sucos**, e um exemplo é o trabalho de Servilli e colaboradores (2000), que utilizaram a lacase imobilizada para remoção de compostos fenólicos do mosto de fermentação. Esses compostos conferem cor e gosto desagradável nos vinhos, além de inibir os processos fermentativos.

O trabalho de Murugesan, Angayarkanni e Swaminathan (2002) ilustra outra interessante aplicação para as lacases, na **melhoria da qualidade do chá preto**. Esses autores verificaram que adição das lacases, assim como de outras polifenoloxidasas, no processo de fabricação do chá preto, melhoram a qualidade do mesmo devido ao aumento da quantidade

de teaflavina, tearubigena e cafeína, entre outros compostos. Vale a pena esclarecer, que a variação da qualidade do chá preto depende de complexos eventos metabólicos durante o processamento das folhas de *Camellia sinensis*. Durante o processamento as polifenoloxidasas oxidam polifenóis presentes nas folhas resultando na formação dos componentes do chá preto. No entanto, os processos convencionais de obtenção do chá causam a ruptura das folhas e perda de grandes quantidades dessas enzimas afetando, conseqüentemente, a qualidade do chá.

Na área analítica, a necessidade de métodos mais versáteis para a detecção tanto de fenol como de espécies fenólicas, principalmente para o monitoramento ambiental, tem estimulado a produção de uma variedade de novos métodos analíticos (ROSATTO et al., 2001). Dentre esse métodos analíticos encontram-se **biossensores**, utilizando várias fenoloxidasas. Para ilustrar esta aplicação tem-se o trabalho de Freire, Durán e Kubota (2001), os quais utilizaram lacase de *Trametes versicolor* na construção de um eletrodo para detecção de compostos fenólicos. Os autores observaram bons resultados de detecção quando utilizaram eletrodos constituídos de fibras de carbono e lacase imobilizada covalentemente com carbodiimida e glutaraldeído.

Considerando o exposto acima, é possível observar que as lacases, em função de suas propriedades, têm sido crescentemente investigadas para uma variedade de aplicações que se estendem desde seu uso na área ambiental, até aplicações nas indústrias de alimentos, métodos analíticos, entre outros.

2.6-IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

As lacases, assim como quaisquer enzimas, estão sujeitas à inativação por diversos fatores químicos, físicos e biológicos, podendo estes ocorrer quando estocadas ou durante o

uso. Considerando isso, existe a necessidade de estabilizar a enzima contra essa inativação para utilizá-la nas várias aplicações já citadas. Faz-se então, necessário, o emprego de um método para que a mesma não perca sua atividade catalítica e sua estereoseletividade. Frente a este problema, várias técnicas vêm sendo desenvolvidas para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e utilização (JESUS, 1998).

Por razões práticas e econômicas, é freqüentemente vantajoso usar enzimas imobilizadas sobre suportes sólidos, por serem fáceis de manusear e por serem recuperadas em qualquer tempo de reação sem considerável perda de atividade catalítica (JESUS, 1998).

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização química estão: I) ligação da enzima no suporte através de ligações iônicas; II) ligação da enzima no suporte através de ligações covalentes; III) ligação cruzada entre a enzima e o suporte, IV) ligação da enzima no suporte promovida por reagentes multifuncionais. Vale a pena esclarecer que o reagente multifuncional é geralmente uma molécula que possui a capacidade de ligar a enzima no suporte. Vários reagentes multifuncionais podem ser utilizados, envolvendo diferentes tipos de aminoácidos das enzimas e grupos funcionais do suporte. Entre os agentes multifuncionais mais utilizados pode-se destacar o glutaraldeído, carbodiimida (EDC) e γ aminopropiltrietoxissilano (γ -APTS).

Os métodos físicos envolvem o encerramento das moléculas de enzima dentro dos poros de uma matriz polimérica, micelas reversas, microcápsulas ou entre membranas macroscópicas (Figura 8) (DURÁN et al., 2002).

Ambos métodos físicos e químicos possuem suas vantagens e desvantagens que dependem de vários fatores. Em geral, os métodos de imobilização química tendem a reduzir a atividade da enzima, onde as ligações covalentes podem perturbar a estrutura tridimensional da enzima nativa. No entanto, essas ligações covalentes promovem uma forte e estável ligação entre a enzima e o suporte, onde, em alguns casos, pode alterar a especificidade da enzima. Os métodos de imobilização física perturbam a enzima menos e conseqüentemente causam menor alteração das propriedades da mesma. Dessa forma, a escolha entre os métodos físicos e químicos depende de vários fatores. Usualmente, é preferível obter uma enzima com menor atividade, mas com maior estabilidade do que uma enzima com uma alta atividade, mas que possui uma pequena estabilidade (DURÁN et al., 2002).

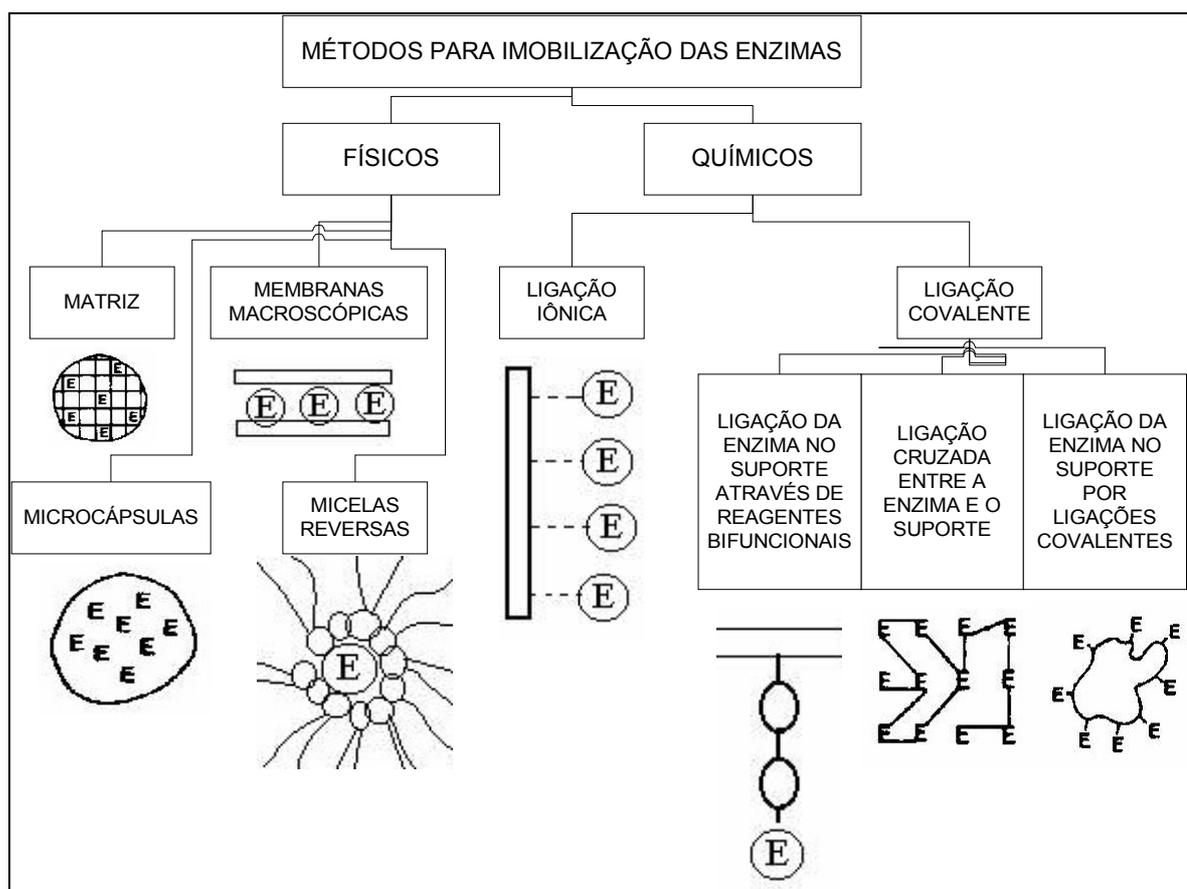


Figura 8: Métodos mais comuns utilizados para a imobilização de enzimas

(Fonte: <http://www.cape.canterbury.ac.nz/Archive/IMMOB/immob.htm>).

Vários tipos de suportes vêm sendo estudados para a imobilização das lacases, dentre eles encontram-se: vidro poroso, gel de alginato, gel de poliacrilamida, vitrocerâmicos, grafite, alumina, membrana de nylon, membrana de teflon, poliuretano, platina, quitina, quitosana e outros (DURÁN et al., 2002).

2.7-QUITINA E QUITOSANA

A quitina, denominação usual para o polímero β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) (Figura. 9), é o precursor direto da quitosana e foi descoberta em cogumelos pelo professor francês Henri Braconnot, em 1811, recebendo então a denominação inicial de fungina. O nome quitina foi dado por Odier, em 1823, quando esta foi isolada de insetos.

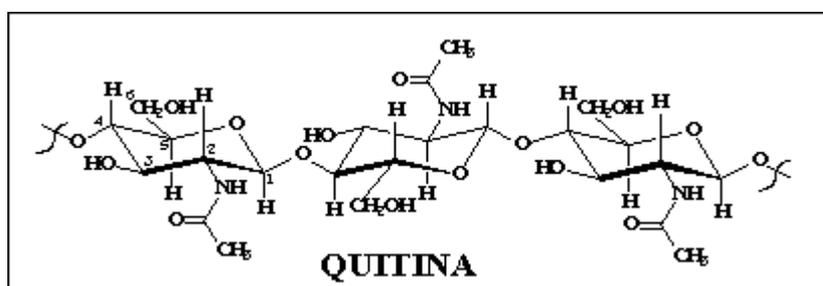


Figura 9: Representação da estrutura química da quitina.

A quitina é um polímero constituído por uma seqüência linear de açúcares monoméricos β -(1 \rightarrow 4)-2-acetoamido-2-deoxi-D-glicose ou (N-acetilglicosamina) possuindo, assim, estrutura semelhante à fibra vegetal denominada celulose (Figura 1). A diferença estrutural entre as duas fibras deve-se aos grupos hidroxilas localizados na posição 2, que na quitina foram substituídos por grupos acetoamino, sendo a mais abundante fibra de ocorrência

natural depois da celulose (FURLAN, 1997). A quitina é encontrada em abundância na natureza (Tabela 1), tendo como principais fontes naturais as carapaças de crustáceos.

Tabela 1: Conteúdos de quitina de alguns crustáceos, insetos e microrganismos. **a.** peso úmido do corpo; **b.** peso total seco da cutícula; **c.** peso úmido da cutícula e **d.** peso seco da parede celular (THARANATHAN e KITTUR, 2003)

Tipo de animal	Conteúdo de quitina (%)	Tipo de animal	Conteúdo de quitina (%)
Crustáceos		Moluscos	
Caranguejo (Carcinus)	64,2 b	Ostra	6,1
Caranguejo azul (Callinectes)	14,0 a	Lula	41
Camarão (Crangon)	69,1 c	Krill (concha desproteínada)	40,2
Camarão (Alsakan)	28,0 d	Fungos	
Lagosta (Nephrops)	69,8 c	<i>Aspergillus niger</i>	42,0 d
Lagosta (Homarus)	60-75 c	<i>Penicillium notatum</i>	18,5 d
Insetos		<i>Penicillium chrysogenum</i>	20,1 d
Barata (Periplaneta)	2,0 d	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,9 d
Cockroach (Blatella)	18,4 c	<i>Mucor rouxii</i>	44,5

O derivado mais importante da quitina é a quitosana. A quitosana (Figura 10) foi descoberta em 1859, pelo professor C. Rouget, quando este pesquisador colocou em ebulição uma solução de hidróxido de potássio com quitina.

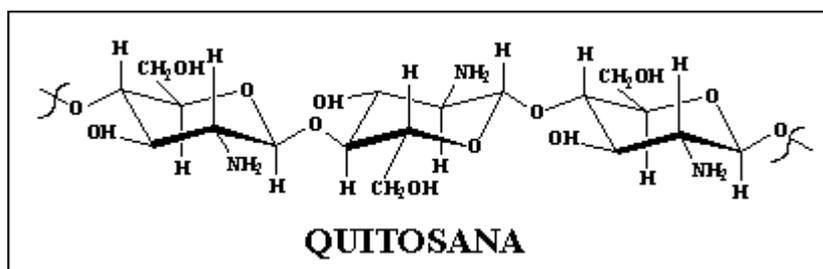


Figura 10: Representação da estrutura química da quitosana.

2.7.1-PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DA QUITOSANA

A quitosana é obtida por reação de hidrólise alcalina da quitina, resultando no biopolímero constituído predominantemente das unidades de β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose, apresentando em sua cadeia aproximadamente 70-90% de grau de desacetilação (FURLAN, 1997). A transformação da quitina em quitosana modifica suas propriedades, de modo que a quitosana insolúvel em água, torna-se solúvel na maioria dos ácidos orgânicos, como ácido acético, ácido fórmico e ácidos inorgânicos, incluindo o ácido clorídrico. A produção comercial ocorre essencialmente através de fontes marinhas (Figura 11).

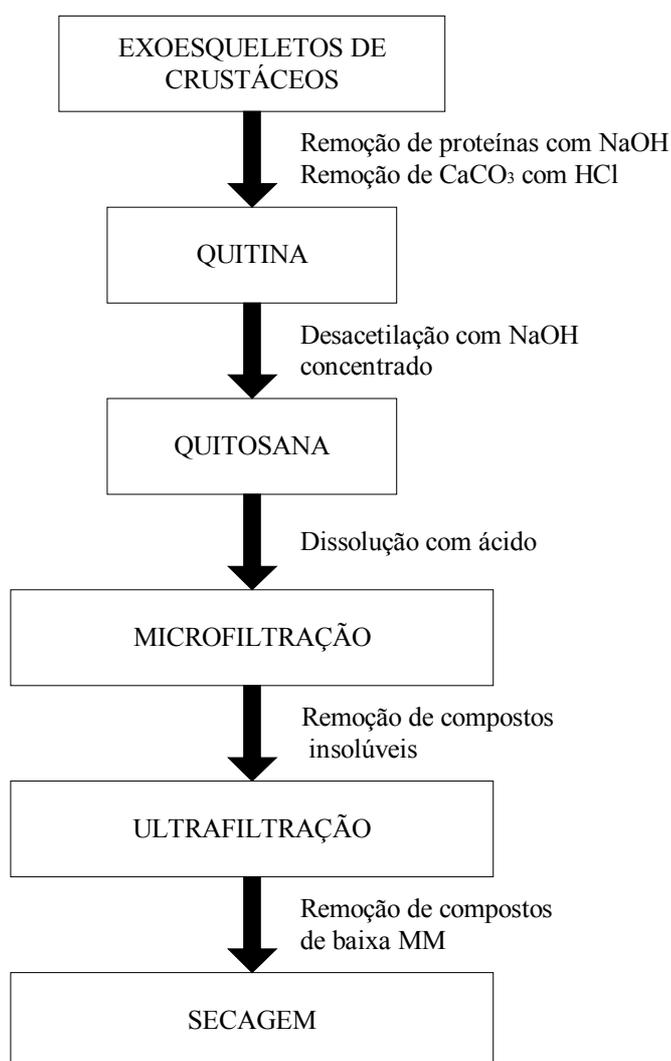


Figura 11: Esquema simplificado dos processos de fabricação industrial de quitosana (SKAUGRUD et al., 1998).

Devido à presença de grupos amino livres na quitosana e sua conseqüente solubilidade em soluções aquosas de certos ácidos, seu caráter de polieletrólito e suas propriedades físicas, químicas e biológicas, tornam este polímero mais versátil quimicamente quando comparado com seu análogo, à quitina. Dessa forma, a quitosana torna-se uma atraente alternativa para muitas aplicações.

Na área ambiental, a quitosana vem sendo utilizada para promover a clarificação das águas, tendo a capacidade de remover óleos, graxas, metais pesados e partículas de matéria que causam turvação em águas (JUANG e SHAO, 2002). Esse material também tem sido estudado para promover a remoção de compostos tóxicos e coloridos de efluentes industriais.

A quitosana possui algumas propriedades biológicas tais como, atividade antimicrobiana e cicatrizante, que tem sido atribuída aos fragmentos (oligossacarídeos) resultantes da degradação enzimática da quitosana. Essas propriedades, associadas à capacidade de formar filmes, fizeram da quitosana o biopolímero escolhido como substrato para o desenvolvimento de lentes de contato, invólucro protetor para preservação de frutas e verduras, tratamento de lesões na pele, encapsulamento de fragrâncias, pigmentos, no preparo de loções, cremes e outros (SANTFORD e HUTCHINGS, 1997). Além disso, vêm sendo utilizada como suporte para imobilização de microrganismos e enzimas, devido às propriedades já citadas, e, principalmente, em função de sua matéria prima ser de baixo custo, pois se trata, principalmente, de resíduos da indústria pesqueira. (AMORIM et al., 2003, SAKURAGAWA; TANIAI; OKUTANI, 1998, PALMIERI; GIARDINA; SANNIA, 2005).

3.0-MATERIAIS E MÉTODOS

PARTE 1: IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE

3.1-MATERIAIS

A quitosana e a enzima lacase de *Aspergillus sp* (Denilite™^{II} Base) foram doadas respectivamente pelo Laboratório QUITTECH - Departamento de Química (UFSC) e Novozymes. A siringaldazina foi adquirida junto a Sigma e o glutaraldeído 25% da Vetec.

3.2-CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

A amostra de quitosana foi caracterizada por determinação do grau de desacetilação (GD), massa molar média (MM_m), área superficial e análise por espectro de infravermelho.

3.2.1-DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO (GD)

Para a quantificação dos grupamentos amino presentes na estrutura da quitosana, foi realizada uma titulação potenciométrica, onde uma solução de 0,2 g de quitosana diluída em 20 mL de ácido clorídrico 0,3 M e 200 mL de água destilada foi titulada com uma solução de NaOH 0,2 M. Foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL da solução titulante até seu volume final de 80 mL. A porcentagem dos grupamentos amino foi calculada de acordo com a equação (1):

$$(1) \%GD = \frac{M(V2 - V1)161}{W} \times 100$$

Onde $V1$ = volume de NaOH correspondente à neutralização do excesso de HCl na solução; $V2$ = volume de NaOH correspondente à neutralização dos grupamentos amino presentes no polímero; M = concentração da solução de NaOH; W =massa da amostra de quitosana em mg. O valor 161 corresponde à massa equivalente a um monômero do polímero (BROUSSIGNAC, 1970).

3.2.2-DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA (MM_m)

A massa molar média foi determinada pelo método viscosimétrico, onde foram utilizadas soluções de $1 \cdot 10^{-4}$ a $5 \cdot 10^{-4}$ g de quitosana, que foram posteriormente filtradas em uma membrana de porosidade 0,45 μ m. Para o preparo das soluções citadas, foi utilizado como solvente uma solução de tampão (ácido acético 0,3 M / acetato de sódio 0,2 M, pH \sim 4,5). Os tempos de escoamento obtidos correspondem à média de três determinações que foram realizadas em um viscosímetro $\varnothing 0,54$ mm AVS-350, acoplado a um banho termostatizado CT52 regulado em 25°C, ambos da Schott-Geräte.

A viscosidade relativa (η_{rel}), específica (η_{esp}) e reduzida (η_{red}) foram determinadas utilizando as equações (2), (3) e (4), respectivamente. A viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade reduzida à diluição infinita (coeficiente linear de η_{red} versus concentração da solução de quitosana).

$$(2) \eta_{rel.} = \frac{t}{t_0}$$

$$(3) \eta_{esp.} = \eta_{rel.} - 1$$

$$(4) \eta_{red.} = \frac{\eta_{esp.}}{c}$$

Onde: η =viscosidade; t_o =tempo de escoamento do solvente; t =tempo de escoamento da solução e c =concentração.

Para o cálculo da massa molar média foi utilizada a equação (5), proposta por Rinaudo; Milas e Le Dung (1993).

$$(5) [\eta] = KM^a$$

Onde: $[\eta]$ = viscosidade intrínseca do polímero; M = massa molar média do polímero; K e a = constantes características do sistema polímero-solvente.

3.2.3-DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL

A determinação da área superficial da quitosana foi realizada através da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K, usando o aparelho Quantachrome Corporation, modelo Autosorb 1 MP, do Laboratório de Físico-Química Experimental (UFSC). Foi utilizado 26,8 mg de quitosana e um tempo de análise de 230,6 minutos. A área superficial do suporte foi determinada pelo método BET.

3.2.4-ANÁLISE POR ESPECTRO DE INFRAVERMELHO (IV)

A análise foi realizada com auxílio de um Espectrofotômetro FT Perkin Elmer 16PC da Central de Análises-UFSC. O espectro foi obtido com um disco de 0,5 mm contendo 2 mg de quitosana em 98 mg de KBr, onde os mesmos foram dessecados por 24 horas a 100°C, sob condições de pressão reduzida. Como referência foi utilizado um disco contendo apenas KBr.

3.3-PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE QUITOSANA

3.3.1-PREPARAÇÃO DAS ESFERAS

Para a otimização de produção das esferas, amostras contendo 1 g de quitosana foram diluídas em diferentes volumes de soluções de ácido acético 5% e ácido clorídrico 0,05/ 0,1, 0,2 e 0,3 M. As soluções obtidas foram gotejadas em soluções de NaOH 1 e 2 M. As soluções de quitosana foram gotejadas nas soluções de NaOH com auxílio de uma bomba peristáltica Perimax 12 Spetec. Logo após, as esferas obtidas permaneceram no banho de precipitação por uma noite. Na seqüência, as mesmas foram lavadas com água ultrapura até o pH da solução resultante ter atingido um valor próximo a 8,0 (GOY, ASSIS, CAMPANA-FILHO, 2004).

3.3.2-ATIVACÃO DAS ESFERAS COM GLUTARALDEÍDO

O processo de ativação das esferas consistiu em adicionar 2 mL de soluções de glutaraldeído 0; 1; 3; 5; 7 e 9% em 30 esferas de quitosana previamente lavadas. O período de contato entre as esferas e as soluções de glutaraldeído foi de uma noite. As soluções de glutaraldeído foram preparadas utilizando como solvente o tampão fosfato pH=8,0 (ADRIANO et al., 2003). Após o tempo de reação, as esferas foram lavadas com água destilada, sendo a água de lavagem testada com reagente de Feder até que o sobrenadante aparecesse isento do aldeído (GOY, ASSIS, CAMPANA-FILHO, 2004). O Reagente de Feder é usado para determinação qualitativa de aldeídos, é constituído por uma solução de tiosulfato de sódio e cloreto de mercúrio. Esta solução forma uma turvação na presença de aldeídos (MORITA e ASSUMPCÃO, 1995).

4.3.3-DETERMINAÇÃO DE POROSIDADE, DENSIDADE E DIÂMETRO DAS ESFERAS.

Em um balão volumétrico de 10 mL, previamente pesado (m_1), foram adicionadas 20 esferas previamente filtradas em funil de Büchner. Após a adição das esferas, o balão foi novamente pesado (m_2) e na seqüência o volume do mesmo foi preenchido com água destilada, pesando-o novamente (m_3). Para os cálculos foram utilizadas as seguintes equações:

$$(6) \text{ Massa do gel (mg)} = m_2 - m_1$$

$$(7) \text{ Massa da água (ma)} = m_3 - m_1$$

$$(8) \text{ Volume de água (Va)} = \frac{ma}{\rho a}$$

$$(9) \text{ Volume de gel (Vg)} = 10 - Va$$

$$(10) \text{ Densidade do gel (}\rho g\text{)} = \frac{mg}{Vg}$$

$$(11) \text{ Raio médio} = 3\sqrt{\frac{3Vg}{20(4\pi)}}$$

Para a determinação da porosidade foi utilizado o método gravimétrico, no qual uma determinada massa de esferas permanece na estufa em 60°C por 24 horas. Após esse período, foi possível conhecer a massa de água perdida, onde foi assumido que o resíduo resultante foi constituído apenas pelo polímero.

$$(12) \text{ Porosidade} = \frac{mH_2O}{(\rho H_2O \cdot Vg)}$$

Onde, mH_2O = massa de água perdida durante o período de exposição das esferas na estufa e ρH_2O = densidade de água no gel (g/mL) (GONÇALVES, 1996).

3.4-CARACTERIZAÇÃO DA LACASE

3.4.1-DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR DA LACASE

A massa molar foi determinada por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu, equipado com um detector SPD-10A UV-VIS e com uma coluna Diol-150 da Shimadzu. O eluente utilizado foi o tampão Tris (pH=9,0), com um fluxo de 1 ml/min. A proteína padrão utilizada foi do tipo MW-GF-200 kit; Sigma.

3.4.2-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a enzima livre e imobilizada, foram realizadas as determinações enzimáticas utilizando-se o método de Ander e Eriksson (1976). Esse método se baseia na oxidação de siringaldazina para sua forma quinona, que apresenta absorção à 525nm ($\epsilon = 65 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Os dados foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro Hewlett-Packard. Para determinação da atividade foram utilizados: 500 μL de tampão fosfato (0,1 M) pH=4,0, 50 μL de solução enzimática 0,5 g/L ou 0,07 g de suporte com enzima e 25 μL de solução alcoólica de siringaldazina (0,5 g/L) em uma cubeta de quartzo de 1 mL ou cubeta de vidro de 3 mL para o caso da enzima imobilizada. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para oxidar 1 μM de substrato por minuto.

3.4.3-DETERMINAÇÃO DO MELHOR pH

A reação citada anteriormente (item 3.4.2), foi acompanhada a temperatura de 25°C em tampões tartarato (0,1 M) pH=3,0/ 3,5/ 4,0/ 4,5/ 5,0 e 5,5 e em tampões fosfato (0,1 M) pH=6,0/ 6,5/ 7,0/ 7,5 e 8,0 com o objetivo de determinar o pH no qual a enzima livre e imobilizada adquire a maior atividade enzimática.

3.4.4-PROPRIEDADES CINÉTICAS FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS

As propriedades cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da enzima livre e imobilizada foram obtidas com três substratos: ABTS (Merck), Siringaldazina (Sigma) e Vermelho de fenol (Vetec). Para o cálculo de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foi utilizada a relação de Michaelis-Menten com auxílio do software ENZFITTER (1987, Biosoft, USA).

3.4.5-ESTABILIDADE DA LACASE FRENTE A INIBIDORES

Foram determinadas as estabilidades da enzima livre e imobilizada frente a inibidores como: EDTA (Caal), $K_3Fe(CN)_6$ (Cinética Química), NaN_3 (Difco), $K_2Cr_2O_7$ (Cinética Química) e H_2O_2 (Merck), utilizando 0,5 mM de cada um desses compostos na mistura de reação já descrita (item 3.4.2).

3.4.6- PROPRIEDADES DE TERMOESTABILIDADE DA LACASE

As enzimas livre e imobilizada foram adicionadas em tampão tartarato pH=4,0 e pré-incubadas a temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60 e 70°C. As análises de atividade enzimática (item 3.4.2) residual foram realizadas nas alíquotas retiradas em 30, 60 e 120 minutos de incubação. A determinação da atividade enzimática residual foi calculada de acordo com a equação:

$$(13) \textit{Atividade enzimática residual (\%)} = \frac{U_{final}}{U_{inicial}}(100)$$

Onde: U_{final} = atividade enzimática após o período de incubação e $U_{inicial}$ = atividade enzimática antes do período de incubação.

3.4.7-DETERMINAÇÃO DE ESTABILIDADE DA LACASE FRENTE pH ALCALINO

As enzimas livre e imobilizada foram suspensas em solução NaOH pH=10,0, onde a atividade enzimática (item 3.4.2) residual foi determinada após 30 minutos (equação 13).

3.4.8-DETERMINAÇÃO DE ESTABILIDADE FRENTE A SOLVENTES

As enzimas livre e imobilizada foram incubadas com soluções de Etanol (Nuclear), Dioxano (Nuclear), Acetato de etila (Grupo Química), Acetona (Nuclear) e Glutaraldeído (Vetec) em concentrações de 0, 10, 30, 50, 70 e 90%. A atividade enzimática (item 3.4.2) residual foi determinada após 30 minutos de incubação da enzima com os solventes.

3.4.9-DETERMINAÇÃO DE ESTABILIDADE FRENTE À ESTOCAGEM

As enzimas livre e imobilizada foram submetidas a um teste de estabilidade durante um período de estocagem de 10 dias a temperatura de 25°C em água ultrapura, onde a atividade enzimática (item 3.4.2) residual foi determinada (equação 13).

3.4.10-EFEITO DO USO REPETIDO SOBRE A ATIVIDADE RESIDUAL DA ENZIMA IMOBILIZADA

As esferas contendo a enzima imobilizada foram adicionadas em uma cubeta de vidro (3 mL) juntamente à 1 mL de tampão tartarato pH=4,0 e 25 µL de siringaldazina. Após completa oxidação do substrato (item 3.4.2), as esferas foram lavadas com água destilada e o mesmo procedimento foi repetido cinco vezes. Dessa forma, a possibilidade de reuso da enzima imobilizada nas esferas de quitosana foi determinada através das medidas de atividade enzimática (equação 13) residual em cinco ciclos consecutivos de oxidação da siringaldazina.

3.5-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

3.5.1-OTIMIZAÇÃO DO TEMPO NECESSÁRIO PARA PROMOVER A IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

As esferas de quitosana previamente ativadas como discutido no item 3.3.2, foram incubadas com 10 mL de solução enzimática 0,5 g/L. O conjunto foi submetido à leve agitação, onde alíquotas de sobrenadante foram retiradas em 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas para a determinação de atividade enzimática (item 3.4.2) e proteínas totais (3.5.1.1). Após a determinação da atividade enzimática e proteínas totais, foi possível calcular a porcentagem

de proteína acoplada utilizando a equação (14) (HUNG, CHIOU, WU, 2003) e o rendimento de imobilização utilizando a equação (15):

$$(14) \% \text{ proteína acoplada} = \frac{\text{quantidade proteína acoplada}}{\text{quantidade proteína introduzida}} (100)$$

$$(15) \% \text{ rendimento de imobilização} = \frac{U_{fs}}{U_{is}} (100)$$

Onde: U_{fs} = atividade enzimática do sobrenadante após o período de incubação e U_{is} = atividade enzimática do sobrenadante antes do período de incubação.

3.5.1.1-DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas foi determinada com o auxílio de um espectrofotômetro a 595 nm com Coomassie Blue (BRADFORD, 1976). O conteúdo de proteína foi calibrado com soluções de albumina bovina, de concentrações que variaram de 0 a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. O coeficiente de regressão linear (r^2) foi de 0,9861, conforme ilustrado no anexo A.

3.5.2-OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTARALDEÍDO PARA PROMOVER A ATIVAÇÃO DAS ESFERAS

O objetivo desse experimento foi avaliar qual a concentração de glutaraldeído que favorece de forma mais eficiente a imobilização enzimática, e verificar qual das diferentes concentrações de glutaraldeído utilizadas para ativar as esferas, dá origem a enzima que adquire maior estabilidade frente a diferentes temperaturas, após 30 minutos (3.4.6), pH alcalino (3.4.7) e um período de estocagem de 10 dias (3.4.9).

PARTE 2: BIOTRANSFORMAÇÃO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA PAPELEIRA

3.6-EFLUENTE

O efluente utilizado neste trabalho foi adquirido em março de 2004, junto à Klabin S.A. Indústria de Papel e Celulose, localizada na região de Correia Pinto-SC. A indústria é produtora de polpas não branqueadas e branqueadas através do processo convencional utilizando cloro molecular. O efluente detinha os seguintes parâmetros físico-químicos: pH=7,7; condutividade=1,250 mS e DQO (Demanda Química de Oxigênio)= 606,3 mg de O₂/L.

3.7-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO EFLUENTE COM A ENZIMA IMOBILIZADA

Em Erlenmeyers de 1000 mL foram adicionados 500 mL de efluente nos seguintes títulos em volume: 70, 35, e 17,5%. O solvente utilizado para diluir o volume de efluente foi tampão tartarato pH=5,5. Cada conjunto de 3 frascos contendo as diferentes porcentagens de efluentes foi incubado com 1g e 2 g de suporte com enzima imobilizada. Além destes, mais um conjunto de frascos também foram incubados com 1 g de suporte sem a enzima imobilizada. Os valores de 1 e 2 g equivalem a 60 e 120 esferas respectivamente. Os frascos foram mantidos sob aeração e temperatura de aproximadamente 25°C. O processo de biotransformação dos efluentes foi acompanhado em relação ao parâmetro cor e fenóis totais. A análise desses parâmetros foi realizada em alíquotas retiradas em tempo 0, 1, 3 e 24 horas de incubação do efluente com as esferas (D'ANNIBALE et al., 1999). Além disso, também

foram realizados controles negativos, ou seja, experimentos de biotransformação do efluente com esferas de quitosana sem a enzima imobilizada. O objetivo do experimento foi avaliar a possibilidade de adsorção significativa de fenóis totais e cor nas esferas de quitosana.

3.7.1-DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

O total de fenóis do efluente tratado e não tratado foi verificado através do método Folin, onde 50 µL de reagente Folin foram adicionados a 50 µL de carbonato de sódio 15% e 2,5 mL de amostra. O método baseia-se na reação de compostos aromáticos com grupos hidróxi com o reagente Folin (ácido fosfórico tungstato e ácido fosfórico molibdato), que gera um produto que absorve a 700 nm (APHA, 1989).

3.7.2-DETERMINAÇÃO DE COR

A determinação da cor do efluente foi realizada através do método espectrofotométrico (APHA, 1989), onde a leitura da amostra com pH corrigido para 7,6, é realizada em 465 nm.

3.8- MODIFICAÇÕES QUÍMICAS CAUSADAS NO EFLUENTE APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA

Para determinação das modificações químicas causadas no efluente após tratamento de 24 horas com as esferas de quitosana contendo a enzima imobilizada, foram analisados os

seguintes parâmetros: fenóis totais (3.7.1), fenóis totais de baixa MM (3.8.1), medidas de cor (3.7.2), característica da cor (3.8.2), demanda bioquímica de oxigênio (DQO)(3.8.3) e determinação de grupos ionizáveis utilizando titulação potenciométrica (3.8.4).

3.8.1-DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS DE BAIXA MM

A concentração de fenóis totais de baixa MM do efluente tratado e não tratado com a enzima foi verificada através do método da 4-aminoantipirina, onde 50 µL de tampão glicina 0,1 M a pH=9,7, contendo 1% de ferrocianeto de potássio, foram adicionados a 0,5 mL de 4-AAP e 0,5 mL de amostra. O método baseia-se na reação de 4-AAP com estruturas fenólicas oxidadas com ferricianeto de potássio, monitoradas a 505 nm (YANG e HUMPHREY,1975).

3.8.2-CARACTERÍSTICA DA COR

Para determinação de cor referente a porção quinona do efluente, antes e após tratamento enzimático, foi utilizado 3 mL de efluente com pH=7,6, onde 85 mg de ditionito de sódio foram adicionados. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 5,5. Após 24 horas o pH foi novamente ajustado para 7,6, a amostra foi centrifugada a 12000 g por 5 minutos e a leitura da absorção do sobrenadante realizada em 465 nm.

Para a determinação de cor referente à porção total de quinona e carbonila do efluente foi utilizado 3 mL de efluente com pH=7,6, onde 0,1 g de borohidreto de sódio foram adicionados. Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 10,5. Após 24 horas o pH foi

novamente ajustado para 7,6, a amostra foi centrifugada a 12000 g por 5 minutos e a leitura da absorção do sobrenadante realizada em 465 nm (MOMOHARA et al., 1989).

3.8.3-DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

Em tubos de borossilicato foram adicionados 3,5 mL de solução de H₂SO₄, 1,5 mL de solução para a digestão e 2,5 mL de amostra. Logo após, os tubos foram fechados, levemente agitados e adicionados em um bloco de digestão (AT 520 Alfa Tecno Química) a 150°C por 2 horas. Após o período de digestão, foi realizada a leitura de cada solução no espectrofotômetro a 600 nm (APHA, 1998). Os procedimentos para a obtenção da curva de calibração e do preparo das soluções utilizadas encontram-se no anexo C.

3.8.4-DETERMINAÇÃO DE GRUPOS IONIZÁVEIS UTILIZANDO TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Para analisar as modificações dos grupamentos ionizáveis contidos no efluente, antes e após tratamento enzimático, foi realizada uma titulação potenciométrica, onde 50 mL do efluente foi titulado com uma solução HCl 0,01 M. As titulações foram conduzidas com adições manuais de 0,5 mL de titulante até o volume final de 50 mL de solução HCl (SOARES e DURÁN, 1998).

3.9-BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA

Com o objetivo de avaliar a biotransformação de compostos fenólicos de diferentes estruturas químicas, foram realizadas leituras em vários comprimentos de onda dos substratos,

antes e após tratamento enzimático. Os substratos estudados foram vanilina, pirocatecol, pirogalol e guaiacol em uma concentração de 0,1 g/mL. O solvente utilizado nas soluções dos compostos citados foi tampão tartarato pH=5,5. O tratamento foi realizado em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de substrato e 4 esferas de quitosana com enzima imobilizada por 30 minutos.

3.10-ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os resultados observados dos itens 4.3.2 (Caracterização das esferas de quitosana), 4.5.6 (Estabilidade operacional da lacase imobilizada) e 4.7 (Modificações químicas causadas no efluente após tratamento com a enzima imobilizada), foi realizado o teste ANOVA/MANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os testes citados foram realizados através do software Statistica 6.0.

Os demais resultados observados foram submetidos apenas ao teste One-Way ANOVA, utilizando o software Origin 5.0.

4.0-RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 1: IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE

4.1-CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

Como mencionado anteriormente (item 2.7.1), a quitosana pode ser aplicada em muitas áreas, sendo que a versatilidade desse polímero deve-se às suas características físicas, químicas e biológicas, tais como, habilidade de quelar metais, resistência de tensão, capacidade para formar filmes e atividade bactericida (THARANATHAN e KITTUR, 2003, MATHUR e NARANG, 1990). Essas características são fortemente influenciadas pelo grau de desacetilação (GD), massa molar média (MM_m) e área específica, o que justifica a análise desses parâmetros.

4.1.1-DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DESACETILAÇÃO (GD)

Vários métodos vêm sendo descritos na literatura para determinação do GD, dentre eles destacam-se, a titulação potenciométrica (BROUSSIGNAC, 1970), espectroscopia UV (TAN et al., 1998), espectroscopia de infravermelho (SHIGEMASA et al., 1996, DUARTE, et al., 2002), espectroscopia de massa (DUARTE et al., 2001) e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (LAVERTU et al., 2003). No entanto, o melhor método para a determinação do GD ainda tem sido motivo de muitas investigações.

A titulação potenciométrica foi o método escolhido neste trabalho em função de sua simplicidade e precisão. A Figura 12 ilustra o perfil da curva obtida através da titulação potenciométrica da solução de quitosana utilizada. Foi possível observar que a curva apresenta dois pontos de inflexão, sendo o primeiro relacionado à neutralização do excesso de

HCl na solução e o segundo ponto referente à neutralização dos grupos amino protonados. O GD calculado por este método foi de 72,5%, sendo que este valor representa a média de três determinações.

A efeito de comparação com a literatura, vários valores de GDs foram encontrados, variando de 50,0 a 92,3% (LIN et al., 2002, MARTINO et al., 1996, JIANG et al., 2005, YANG; WANG; TAN, 2004, ADAMIEC e MODRZEJEWAKA, 2004). Dessa forma, a quitosana utilizada neste trabalho possui um GD dentro da faixa de valores encontrados na literatura, utilizados para promover imobilização enzimática.

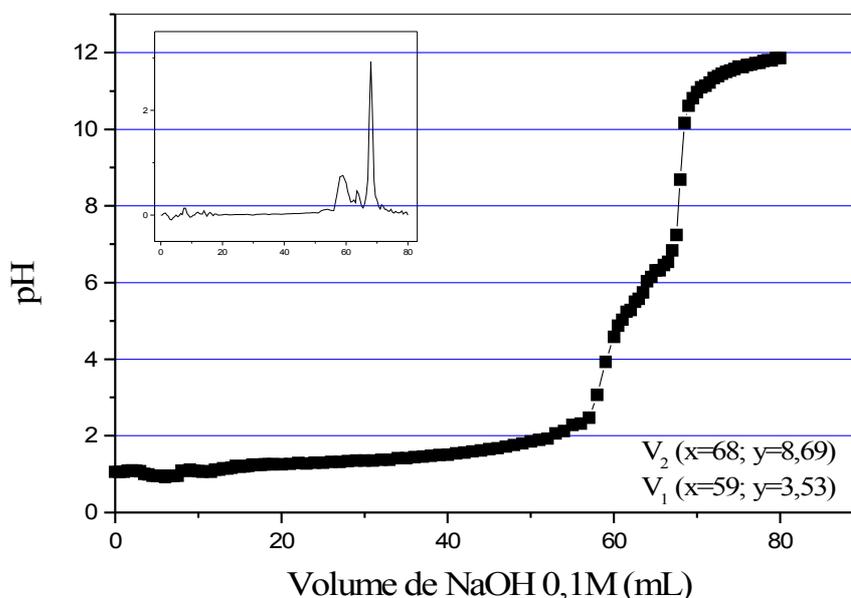


Figura 12: Curva de titulação potenciométrica da solução de quitosana e ácido clorídrico (0,3 M). Os pontos representam a média de três determinações. O quadro menor ilustra a derivada primeira da curva de titulação, onde os pontos máximos representam os pontos de inflexão.

O grau de desacetilação (GD) é um parâmetro que define a fração de unidades desacetiladas existentes na cadeia polimérica (DUARTE et al., 2001). Esse parâmetro define se o polímero é quitina ou quitosana. Arbitariamente quando o $GD \geq 40\%$ o polímero é definido como quitosana (TAN et al., 1998). O GD influencia a solubilidade da quitosana,

pois quanto maior a quantidade dos grupos amino, maior é a repulsão eletrostática entre as cadeias e, conseqüentemente, maior é a solvatação em água.

Além de modificar as características da quitosana, o GD é um parâmetro importante, pois está diretamente relacionado ao rendimento de imobilização enzimática. Essa afirmativa pode ser confirmada pelo estudo de Rodrigues e colaboradores (2005), os quais otimizaram a imobilização da lipase em microesferas de quitosana com diferentes GDs. Os resultados revelaram que o rendimento de imobilização e estabilidade da enzima imobilizada frente a diversos fatores físicos foi significativamente maior utilizando a quitosana com maior GD. A influência do GD em relação à quantidade de enzima acoplada também foi um parâmetro estudado por Alsarra e colaboradores (2002), os quais observaram maior atividade enzimática e quantidade de proteínas encapsuladas em esferas confeccionadas com quitosana de maior GD. As observações citadas evidenciam que a quitosana com maior GD possui maior número de grupos amino, que por sua vez, poderia formar maior número de ligações com o agente bifuncional (glutaraldeído), ou se tornarem disponíveis para formar mais ligações iônicas com as moléculas de enzimas.

Através da curva de titulação também foi possível determinar o pKa do polímero. Dessa forma, considerando a equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 16), e ainda, que no ponto estequiométrico da curva de titulação existe praticamente a mesma concentração de ácido e base (Equação 17), é possível determinar o pKa do polímero através do pH do segundo ponto de inflexão, que se localiza próximo ao pH=8,0.

$$(16) \text{ pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{ácido}]}{[\text{base}]}$$

$$(17) \text{ pH} = \text{pKa}$$

Teoricamente, o pKa da quitosana é de aproximadamente 6,5 (KRAJEWSKA, 2004). No entanto, como em todos os polieletrólitos, a constante de dissociação da quitosana depende vários de fatores, dentre eles o GD e a densidade de carga do polímero.

4.2.2-DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR MÉDIA (MM_m)

Através da Figura 13, que ilustra a curva de viscosidade reduzida versus concentração da solução de quitosana, verifica-se que a viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi determinada pela extrapolação dos dados de viscosidade à diluição infinita. Considerando isso, o valor obtido para $[\eta]$ foi igual a 419,232.

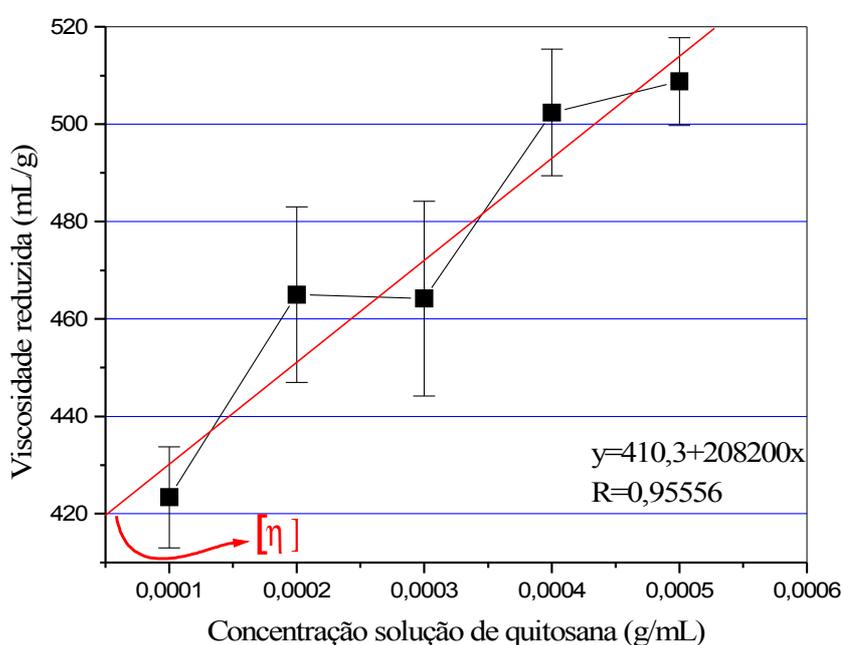


Figura 13: Curva de viscosidade reduzida versus concentração da solução de quitosana.

Utilizando-se a equação (5), e empregando valores para $K=0,076$ e $a=0,76$ (item 3.2.1) em solvente composto por acetato de sódio 0,2 M e ácido acético 0,3 M, a MM_m da quitosana utilizada neste trabalho foi determinada em 83,79 kDa.

Os resultados publicados por Delanoy e Yu (2005), que investigaram o efeito da MM da quitosana em relação a atividade e estabilidade do conjugado lacase-quitosana, revelaram que a presença de grandes moléculas de quitosana no conjugado, tendem a provocar um aumento na viscosidade da solução, reduzindo, conseqüentemente os fenômenos de

transferência de massa e taxa de oxidação. Esses fenômenos influenciaram de forma negativa as medidas de atividade enzimática e a constante catalítica da lacase conjugada (k_{cat}). Os autores observaram que quitosanas com MM acima de 500 kDa causaram maior perda de atividade no conjugado citado. Considerando isso, a quitosana utilizada neste trabalho possui um valor desejável para ser utilizada em processos de imobilização da lacase.

4.2.2-DETERMINAÇÃO DA ÁREA ESPECÍFICA

O método utilizado neste trabalho para determinação da área específica de um sólido baseia-se na determinação da quantidade de um adsorvato (geralmente um gás) necessário para recobrir a superfície de um adsorvente (sólido). Dessa forma, quando o sólido é exposto a um gás em um sistema fechado à temperatura constante, o mesmo passa a adsorver o gás, ocorrendo assim um aumento de sua massa e um decréscimo da pressão do adsorvato. Após um determinado tempo, a massa do sólido e a pressão do gás assumem um valor constante. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido. Considerando isso, para se obter informações sobre as características, e, principalmente, sobre a área específica de um sólido a partir da isoterma de adsorção, vários métodos foram desenvolvidos com base em modelos empíricos e teóricos (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001). O modelo utilizado neste trabalho foi o de Brunauer, Emmett e Teller (BET).

A Figura 14a ilustra a isoterma de adsorção obtida para a quitosana, onde é possível observar que seu formato é característico de sólidos não porosos. Além disso, através das informações obtidas com auxílio da isoterma e do modelo citado, foi possível obter o plot de BET da quitosana (Figura 14b), onde a área calculada foi de 4,86 m²/g. Esse é um valor baixo se comparado com outros materiais também utilizados para promover a imobilização de

enzimas, tais como a sílica mesoporosa, que possui uma área de aproximadamente 300 m²/g (BLANCO et al., 2004), sílica gel com 422 m²/g (PERALTA-ZAMORA et al., 2003) e vidro de porosidade controlada com 87 m²/g (ROGALSKI et al., 1995). Segundo Zanin e Moraes (2004) para que um determinado suporte adquira um número significativo de moléculas de enzima por adsorção física, o mesmo deve possuir uma área específica mínima de 10 m²/g. Dessa forma, é possível inferir que apenas uma fração desprezível de moléculas da enzima deva sofrer apenas adsorção física durante o processo de imobilização.

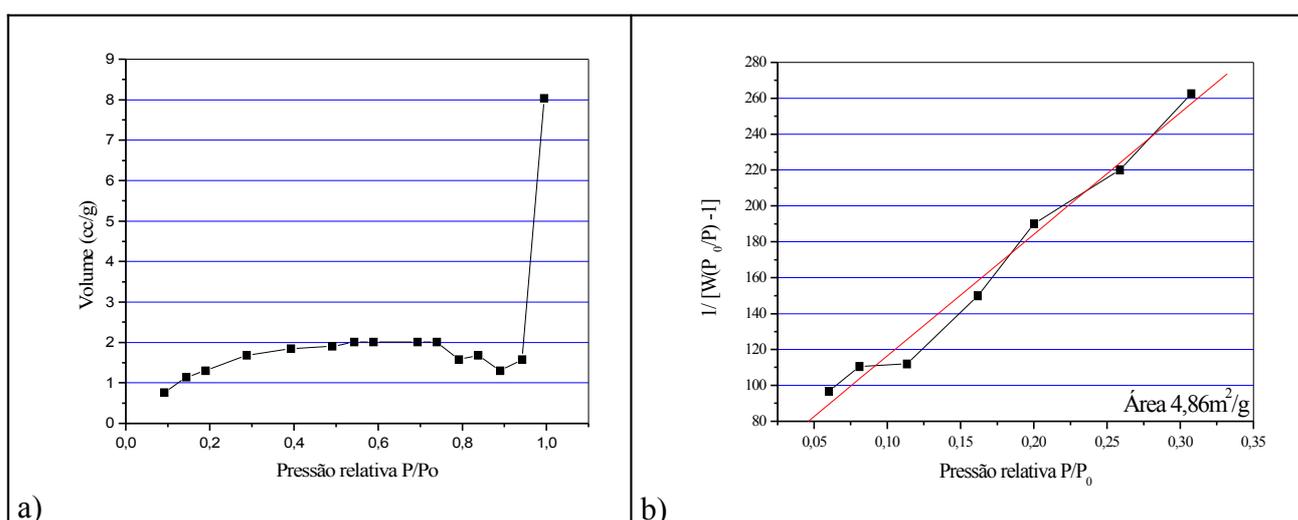


Figura 14: a) Isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K da quitosana; b) gráfico BET da quitosana.

4.2.3-ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (IV)

A espectroscopia de infravermelho é uma análise importante, pois fornece informações estruturais sobre o material de interesse. Observando o espectro de infravermelho da quitosana (Figura 15), é possível notar que as principais bandas são: banda de estiramento axial de OH a 3.371,17 cm⁻¹, a qual aparece sobreposta à banda de estiramento N-H; banda de estiramento C-H a 2.879,38 cm⁻¹; deformação axial de C=O de amida I a 1.656,66 cm⁻¹;

deformação angular de N-H de amina primária a $1.378,94\text{ cm}^{-1}$; banda de estiramento C-O de álcool primário a $1.081,94\text{ cm}^{-1}$, e bandas de estruturas polissacarídicas na região de $890 - 1156\text{ cm}^{-1}$ (SILVERTEIN, 1991). Todas as bandas observadas são muito semelhantes às bandas descritas por SHIGEMASA et al., 1996. Além disso, a comparação do espectro obtido (Figura 15) com outras amostras comerciais de quitosana investigadas por Santos e colaboradores (2003), demonstra que todas apresentaram basicamente os mesmos grupos funcionais.

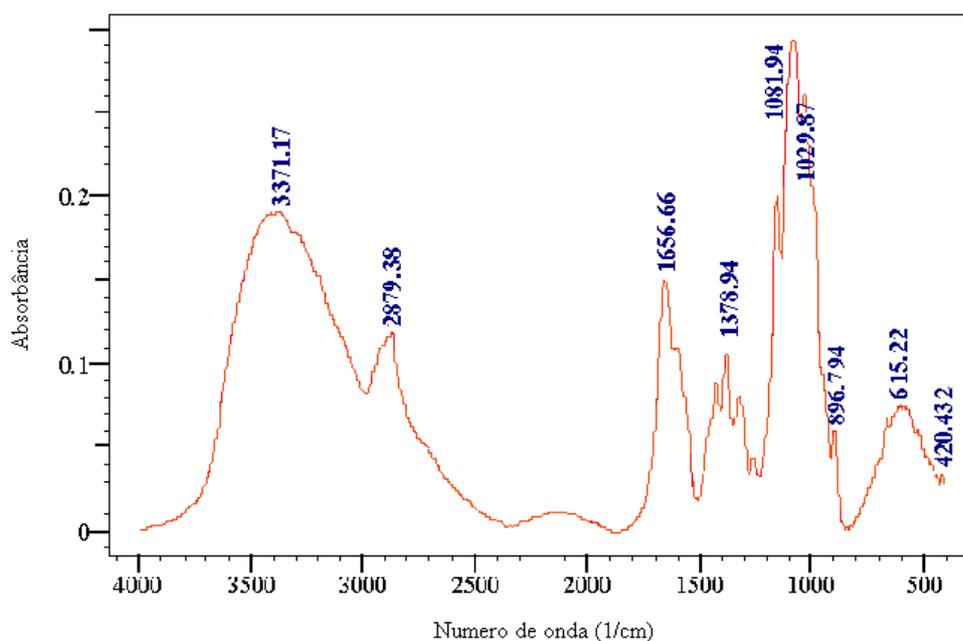


Figura 15: Espectro Infravermelho da quitosana em pastilha de KBr.

4.3-PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ESFERAS DE QUITOSANA

Muitas das aplicações realizadas com a quitosana são possíveis quando a mesma encontra-se em formato esférico (JUANG e SHAO, 2002, ADRIANO et al., 2003, D'ANNIBALE et al., 1999). O formato esférico é desejado por apresentar a vantagem de uma melhor caracterização superficial, o que permite estabelecer parâmetros geométricos que são

úteis para a reprodutibilidade do processo e para demais comparações (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004).

4.3.1-PREPARAÇÃO DAS ESFERAS

Várias metodologias podem ser utilizadas para obtenção de esferas de quitosana com dimensões controladas, dentre elas destacam-se: coagulação, inversão de fases e o spray-drying (GOY; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2004).

A coagulação foi o método escolhido para a obtenção das esferas, neste trabalho, por ser o mais simples e um dos mais utilizados.

Por inspeção visual, foi verificado que a formação das esferas mais resistentes e uniformes (Figura 16), com aproximadamente 3,74 mm de diâmetro cada, foram obtidas a partir da solução contendo 1 g de quitosana em 30 mL de ácido acético 5% e um banho de precipitação constituído da solução de NaOH 2 M.



Figura 16: Esferas em processo de lavagem com água destilada.

As esferas precipitadas com banho de coagulação constituído da solução de NaOH (1 M) não possuíram boa resistência mecânica e dissolveram-se em soluções com pH abaixo de 7,0. Essa observação demonstrou que o fator decisivo para o sucesso da obtenção das esferas foi o banho de precipitação, e não os tipos de ácidos utilizados para promover a solubilização da quitosana. Esse resultado corrobora as observações de Chiou e Wu (2004), que utilizaram metodologia semelhante (banho de coagulação com NaOH 1 M) para o preparo das esferas, e observaram que as mesmas se dissolviam parcialmente em soluções com $\text{pH} < 6,0$.

4.3.2-CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DAS ESFERAS ATIVADAS

A ativação das esferas de quitosana foi realizada com várias concentrações de glutaraldeído. Dentro deste contexto, foram avaliadas as possíveis modificações causadas sobre os parâmetros geométricos das esferas de quitosana, como raio médio, densidade e porosidade. A Figura 17 ilustra os resultados obtidos, onde é possível observar uma queda nos valores de porosidade e raio médio das esferas ativadas com soluções de glutaraldeído acima de 7%. Esse efeito ocorre devido ao aumento do número de grupos aldeídos na superfície do polímero, ocasionando a formação de ligações imino entre os próprios grupos amino do polímero (ligações entrecruzadas), conforme ilustra o Esquema 1.

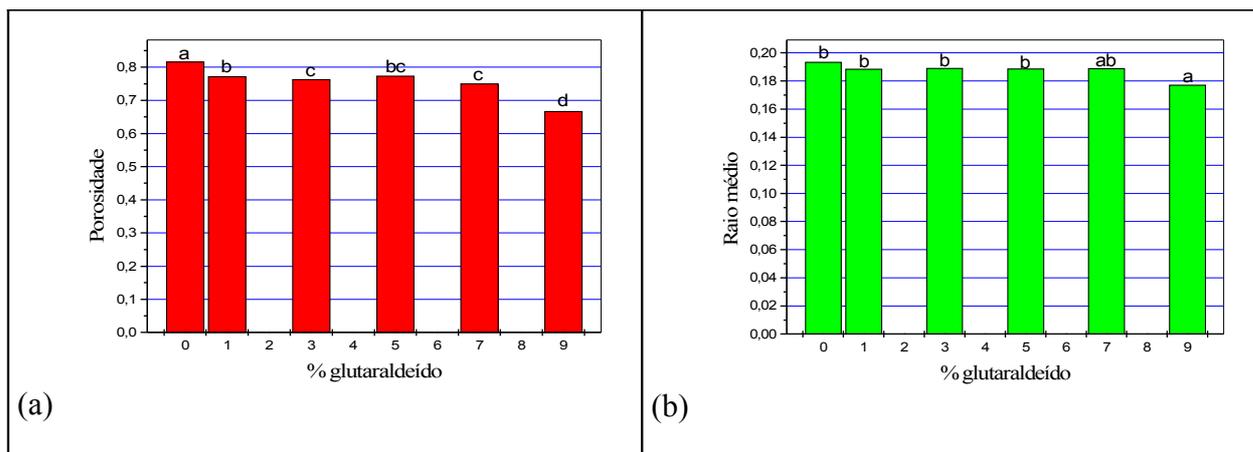
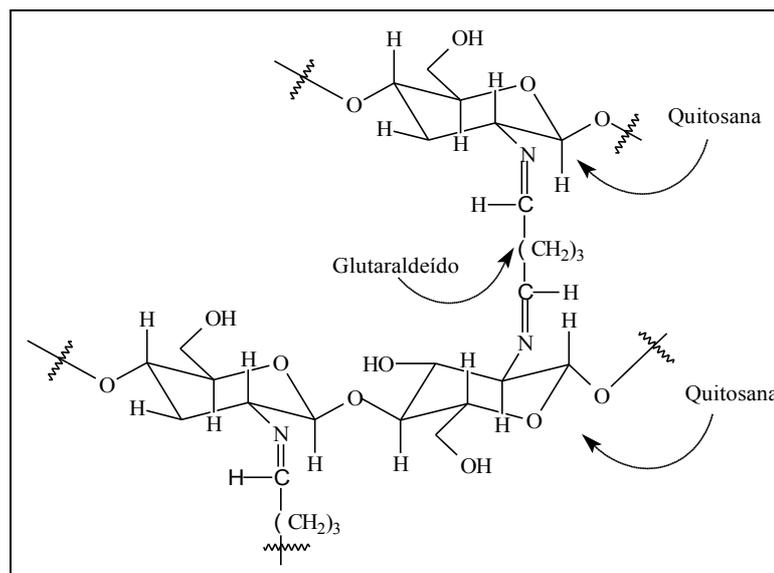


Figura 17: Modificação dos parâmetros geométricos (raio médio e porosidade) das esferas de quitosana ativadas com soluções de diferentes porcentagens glutaraldeído em pH=8,0 e temperatura de 25°C. As comparações entre as diferentes concentrações de glutaraldeído para um único parâmetro geométrico foram realizadas utilizando-se ANOVA/Teste de Tukey HDS ($p < 0,05$). Médias seguidas com a mesma letra não diferem significativamente entre si, sendo $a > b > c > d$. Médias baseadas em 3 repetições.

Além da queda de porosidade e diminuição do raio médio das esferas submetidas à ativação com soluções de glutaraldeído com porcentagem acima de 7%, também foi possível observar que essas esferas tornaram-se menos resistentes e mais quebradiças. Essa observação sugere que o uso das soluções de 7 e 9% de glutaraldeído provocam uma severa desidratação das esferas. Por outro lado, foi observado que esferas ativadas com porcentagens baixas de glutaraldeído (0,5%) apresentavam-se mais frágeis e gelatinosas. Esse resultado corrobora as observações de Siso e colaboradores (1997) que obtiveram esferas de quitosana mais frágeis quando ativadas com soluções de glutaraldeído de baixa porcentagem (0,5%). Além disso, o trabalho citado também abordou mudanças semelhantes geradas nas esferas de quitosana, com relação à porosidade, quando as mesmas foram ativadas com soluções de diferentes concentrações de glutaraldeído. Os resultados obtidos para densidade foram considerados não significativamente diferentes entre si.



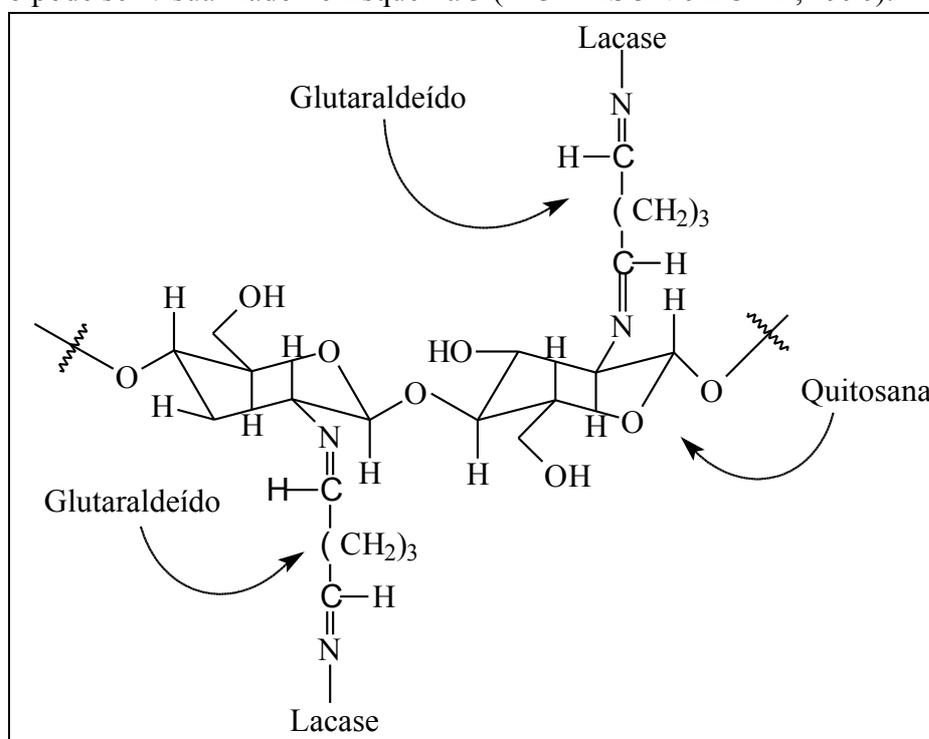
Esquema 1: Ilustração esquemática das ligações cruzadas entre duas cadeias poliméricas de quitosana com o glutaraldeído.

4.4-OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO

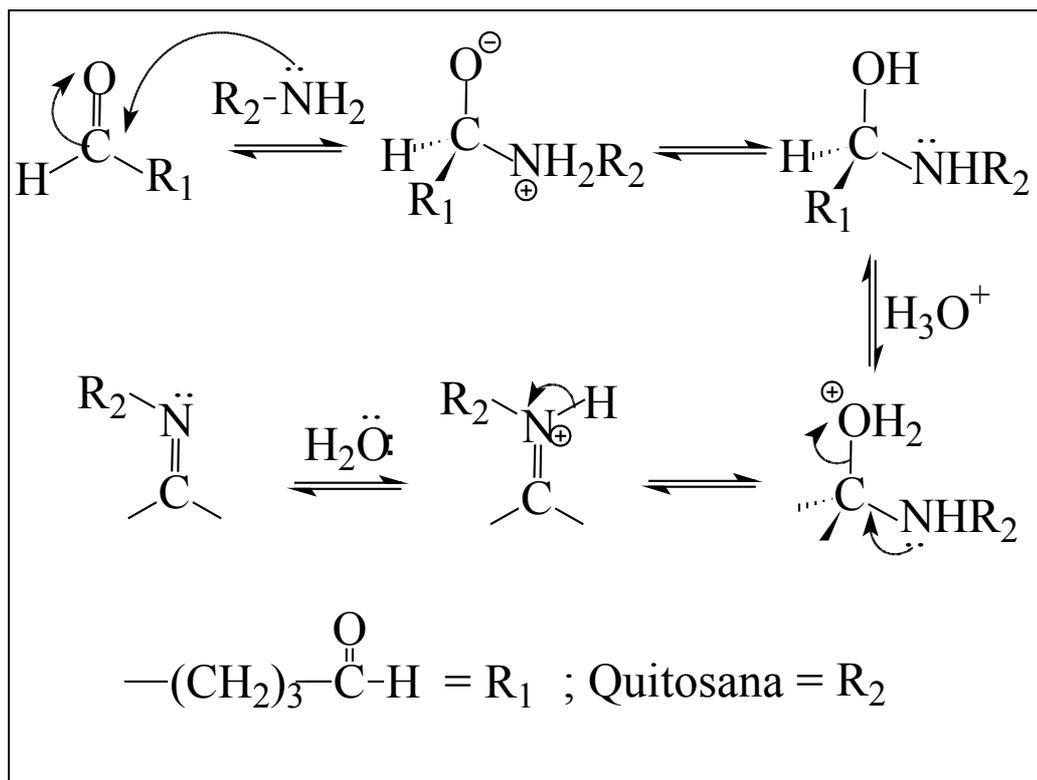
Durante o processo de imobilização, ocorre o envolvimento de vários resíduos contendo grupos amino da enzima, que por sua vez, podem influenciar nas características físicas e químicas da enzima de forma benéfica ou não. Quando a molécula da enzima está ligada a um suporte, a mesma precisa conservar suas distâncias intermoleculares, o que torna sua conformação mais rígida. Dessa forma, a molécula torna-se mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por agentes desnaturantes. No entanto, quando a concentração de glutaraldeído é muito alta, uma quantidade maior de grupos aldeídos reage com um número maior de resíduos da enzima tornando sua estrutura muito rígida, com conseqüente distorção de sua conformação, causando a perda de atividade (JIANG et al., 2005). Isto justifica a necessidade da otimização do processo de imobilização da enzima nas esferas de quitosana, pois o objetivo é utilizar uma concentração que envolva um número ideal de resíduos da

enzima, proporcionando a mesma uma melhor estabilidade frente a fatores físicos e químicos como: elevada temperatura, pH muito alcalino e tempo de armazenamento (itens 4.4.6; 4.4.7; 4.4.9).

Conforme citado no item 4.3.2, o processo de ativação das esferas com as soluções de glutaraldeído foi realizado em pH=8,0, pois durante o processo de entrecruzamento, o grupo aldeído reage com grupo amino da quitosana para formar o grupo imino (CH=N) (Esquema 2). A formação do grupo imino ocorre preferencialmente em pH alcalino, onde os grupos amino encontram-se desprotonados. Neste caso, a formação desse grupo deve ocorrer preferencialmente em $\text{pH} \geq 8,0$, conforme ilustrado no item 4.1.1, onde os grupos amino do polímero devem estar completamente desprotonados. O grupo amino desprotonado é um nucleófilo mais eficiente que o mesmo na forma protonada, devido ao menor compartilhamento do par de elétrons do nitrogênio. O mecanismo da reação de formação do grupo imino pode ser visualizado no Esquema 3 (MORRISON e BOYD, 1996).



Esquema 2: Ilustração esquemática da enzima imobilizada sobre o suporte (esferas de quitosana) com auxílio do agente bifuncional (glutaraldeído) (JIANG et al., 2005).



Esquema 3: Mecanismo proposto para formação do grupo imino.

Embora o mecanismo ilustrado seja o mais aceito, propostas alternativas vêm sendo estudadas. O trabalho de Oyrton, Monteiro e Airoidi (1999) revelou, com auxílio de técnicas como RMN C^{13} e Espectroscopia Raman, que a estabilização da ligação ocorre através do envolvimento de duplas ligações etilênicas conjugadas. Essa idéia ganha muito apoio pela estabilidade desta interação, que, por sua vez, é irreversível e bastante resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado por interações que envolvem simplesmente a formação das ligações imino. O trabalho de Júnior (1999) ilustra um estudo de caracterização do conjugado quitosana-glutaraldeído com espectros IR. Seu estudo revelou o surgimento de uma banda em torno de 1562 cm^{-1} que pode ser associada à ligação etilênica no conjugado quitosana-glutaraldeído quando comparado ao espectro da quitosana pura. Essa observação sugere que no polímero existe a presença de ligação imina conjugada com ligação dupla etilênica. Esses resultados evidenciam que, além da formação dos grupos imino (bases

de Schiff), existe a formação de ligação imina conjugada com dupla etilênica durante interação da quitosana com glutaraldeído.

Com relação aos ensaios de imobilização, foram realizadas análises de atividade enzimática e proteínas totais do sobrenadante durante o processo de incubação das esferas com a solução de enzima. O objetivo desse ensaio foi conhecer o período de tempo necessário para ocorrer a imobilização da lacase. Através dos resultados obtidos, foi possível observar que ocorreu um significativo aumento na porcentagem de proteínas acopladas. Esse aumento foi, de forma geral, proporcional ao tempo de incubação das esferas com a solução enzimática e ao aumento da porcentagem de glutaraldeído utilizada para a ativação das esferas (Figura 18).

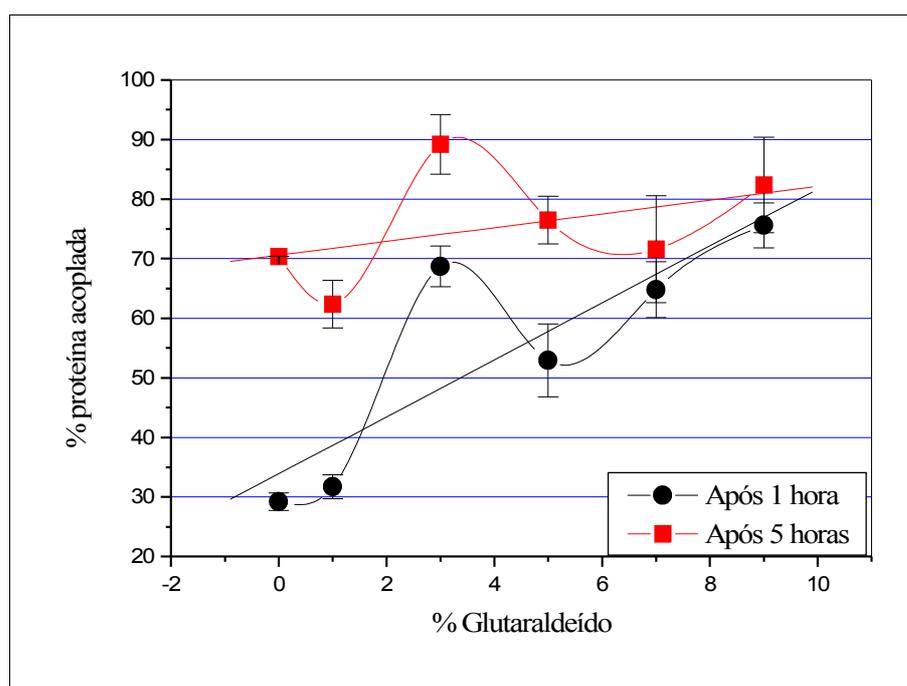


Figura 18: Porcentagem de proteínas acopladas após 1 e 5 horas de incubação da solução enzimática (0,5 g/L) com esferas de quitosana ativadas com diferentes porcentagens de glutaraldeído.

Com relação à atividade enzimática medida no sobrenadante durante o processo de imobilização, pôde-se verificar que o decréscimo da atividade foi proporcional ao aumento do tempo de incubação com as esferas e também ao aumento da porcentagem de glutaraldeído

nas soluções usadas para ativar essas esferas (Figura 19). O trabalho de Blanco e colaboradores (2004) sugere que o tempo ideal para a imobilização enzimática seja determinado através da falta de atividade enzimática ou mesmo, de um valor constante de atividade no sobrenadante do sistema (solução enzimática + suporte). Outra informação relevante é de que, parte dos estudos publicados sobre imobilização enzimática em suportes poliméricos, mostram que os protocolos adotados possuem tempos de imobilização de aproximadamente 4 horas (JIANG et al., 2005, CETINUS; ÖZTOP, 2000, PERALTA-ZAMORA et al., 2003, FREIRE; DURÁN; KUBOTA, 2001). Considerando isso, estipulou-se um período de otimização do processo de imobilização de 5 horas. No entanto, como pode ser visualizado na Figura 19, não houve perda total ou estabilização da atividade do sobrenadante, o que sugere não haver saturação das esferas de quitosana pelas moléculas da enzima no período de tempo estudado. Dessa forma, é possível supor que, para haver completa saturação das esferas pelas moléculas da enzima, talvez seja necessário, um tempo maior de imobilização.

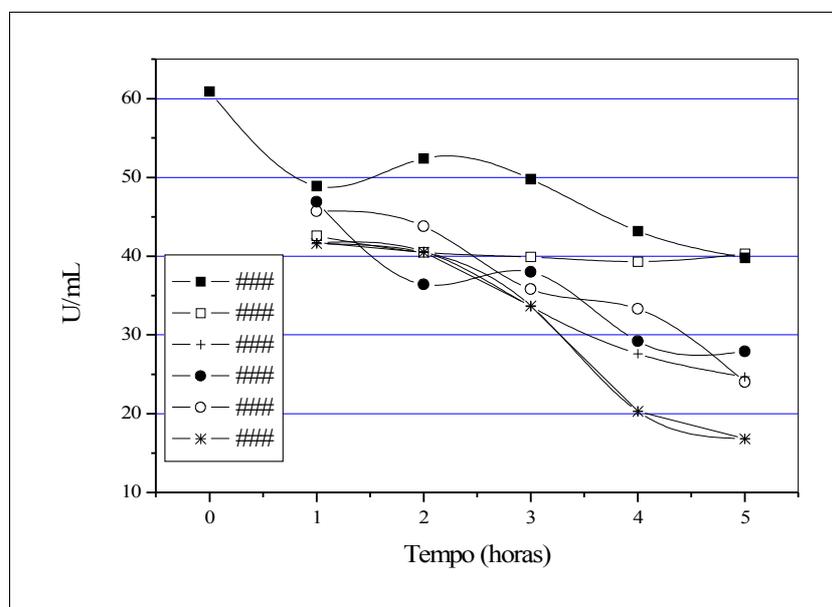


Figura 19: Atividade enzimática do sobrenadante durante o período de incubação das esferas ativadas com soluções de glutaraldeído de diferentes porcentagens com a solução enzimática (0,5 g/L) à 25°C em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0. Os pontos das curvas representam as médias de três repetições.

Assim, o período de imobilização adotado foi o máximo utilizado, de cinco horas. É interessante destacar que outros parâmetros podem ser acompanhados para otimizar o tempo de imobilização necessário, como por exemplo, a atividade enzimática nas esferas ao longo do período de incubação das mesmas com a solução enzimática. O estudo de Jiang e colaboradores (2005) ilustra o acompanhamento deste parâmetro para fazer a otimização do tempo de imobilização. Esses autores observaram que as esferas obtinham um pico de atividade em 2 horas com um severo declínio para períodos maiores de tempo, sugerindo que o excesso de moléculas de enzima na superfície do suporte também causa perda de atividade das mesmas. Esse é apenas outro fenômeno, que vai justificar a importância do experimento de otimização do tempo necessário para que ocorra a imobilização da enzima. Para verificar se este efeito também era operante no presente estudo, ao término do processo de imobilização, após 5 horas, foi analisada a atividade enzimática das esferas, onde foi possível observar (Figura 20) que as esferas ativadas com solução 1% de glutaraldeído detinham a maior atividade enzimática.

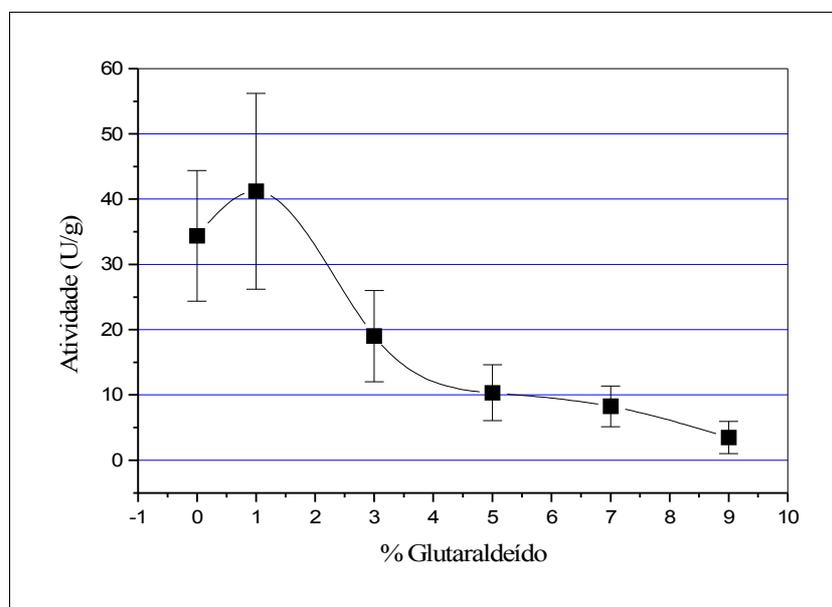


Figura 20: Atividade enzimática das esferas de quitosana ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0 após as mesmas serem submetidas a um período de incubação de 5 horas com solução enzimática (0,5 g/L) à 25°C.

Além disso, observou-se que o aumento da porcentagem de glutaraldeído foi inversamente proporcional à atividade enzimática das esferas. Esse resultado difere do obtido no estudo realizado por Jiang e colaboradores (2005) que também realizaram a otimização da porcentagem de glutaraldeído a ser utilizada para ativar microesferas magnéticas de quitosana, mas observaram que as mesmas ativadas com solução 8% de glutaraldeído detinham os maiores valores de atividade. Entretanto, vale ressaltar que os autores utilizaram partículas de óxido de ferro durante o processo de fabricação das esferas, o que possivelmente tenha ocasionado a diferença observada entre os resultados obtidos.

De forma geral, foi possível verificar através das figuras 18, 19 e 20, que as esferas ativadas com maior porcentagem de glutaraldeído ($\geq 3\%$), possuíram maior quantidade de moléculas de proteínas acopladas e possivelmente maior quantidade de moléculas de enzima imobilizadas em sua superfície. Entretanto, quanto maior a porcentagem desse acoplamento, menor foi o valor de atividade enzimática, devido, possivelmente, aos processos comentados no item 4.4.

Para finalmente determinar qual a porcentagem de glutaraldeído fornece a quantidade ideal de grupos aldeídos para imobilizar a enzima, foram analisada a estabilidade térmica (Figura 21), estabilidade frente a pH alcalino (Figura 22) e estabilidade durante um período de estocagem das esferas de quitosana ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído (Figura 23).

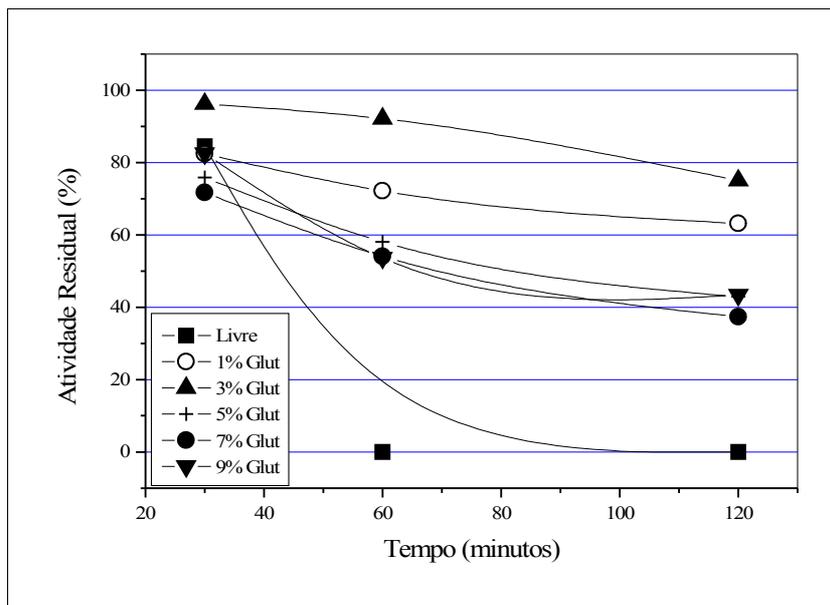


Figura 21: Atividade residual da enzima livre e imobilizada em esferas ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído após 30, 60 e 120 minutos de pré-incubação em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0 e temperatura de 50°C. Os pontos das curvas representam as médias de três repetições.

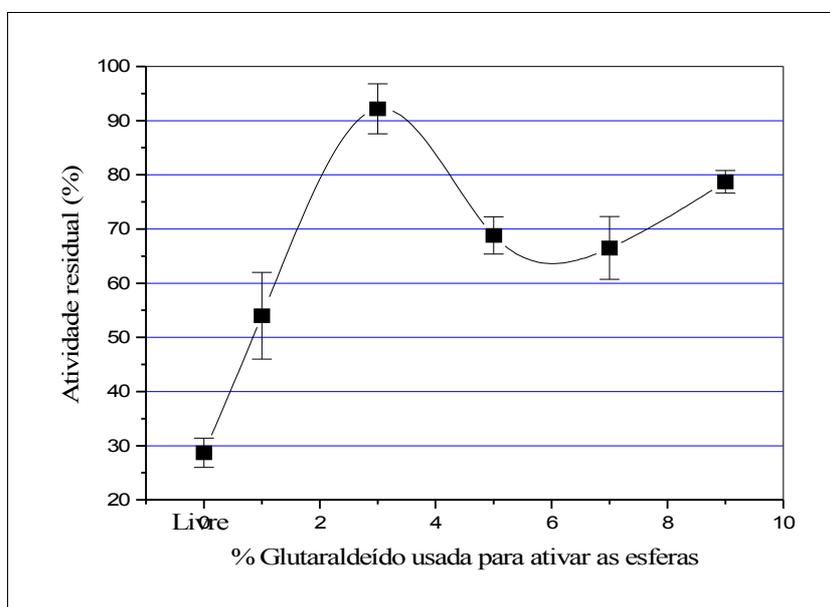


Figura 22: Atividade residual da enzima livre e imobilizada em esferas ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído após 30 minutos de incubação em solução alcalina (pH=10) e temperatura de 25°C.

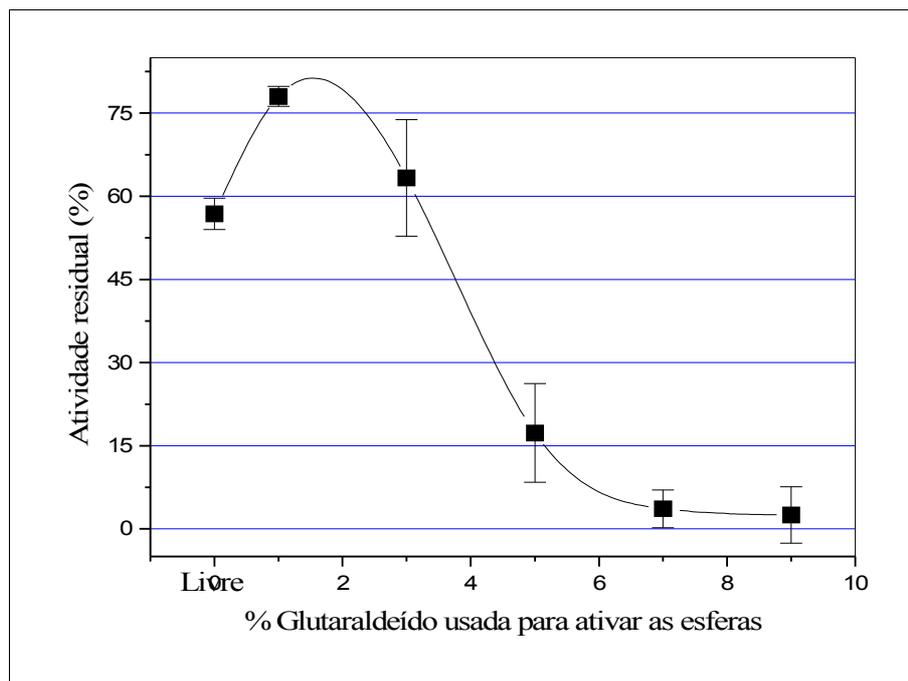


Figura 23: Atividade residual da enzima imobilizada em esferas ativadas com soluções de diferentes porcentagens de glutaraldeído antes e após as mesmas serem submetidas a um período de estocagem de 10 dias a temperatura de 25°C em água ultrapura.

Os resultados obtidos (Figura 21 e 22) indicaram que as esferas ativadas com solução 3% de glutaraldeído, apesar de promoverem uma certa perda de atividade enzimática (Figura 20) nas esferas, representaram maior estabilidade frente a pH alcalino e temperatura de 50°C. Com relação aos ensaios de estabilidade frente a um período de estocagem de 10 dias à 25°C, as esferas ativadas com solução de glutaraldeído 1% tiveram melhores resultados em relação às esferas ativadas com solução de glutaraldeído 3%. No entanto, devido à diferença relativamente pequena existente entre as atividades de ambas (Figura 23), foi determinado que a porcentagem ideal para promover a ativação das esferas de quitosana foi de 3%, pois forneceu maior estabilidade à enzima frente aos parâmetros estudados. Considerando isso, a escolha da porcentagem ideal de glutaraldeído utilizada para ativar as esferas foi baseada na relação: perda de atividade versus ganho de estabilidade frente a agentes desnaturantes (pH

alcalino, temperatura de 50°C e período de estocagem). Ou seja, conclui-se que, foi preferível provocar uma determinada queda na atividade enzimática para, em contrapartida, este efeito ser compensado pelo aumento de estabilidade, do que não provocar nenhuma perda de atividade enzimática e também não proporcionar à enzima nenhuma estabilidade adicional (DURÁN et al., 2002).

Os resultados obtidos diferem do estudo realizado por Adriano e colaboradores (2005), que também realizaram a otimização da concentração de glutaraldeído para imobilizar Penicilina G acilase em esferas de quitosana frente aos mesmos parâmetros citados e observaram que a melhor porcentagem de glutaraldeído foi de 5%. A diferença de resultados observados deve-se, provavelmente, às distintas características conformacionais e químicas apresentadas pela Penicilina G acilase em relação a lacase.

Com relação aos resultados dos ensaios de estabilidade da enzima livre e imobilizada frente a um período de estocagem, foi possível observar que os mesmos concordam, em parte com o trabalho de Yang, Wang e Tan (2004) que estudaram a estabilidade de estocagem da glicose oxidase livre e imobilizada por adsorção física em gel de quitosana-SiO₂ à 30°C. Os autores observaram que a enzima livre perdeu totalmente a atividade após 8 dias, enquanto a imobilizada ainda reteve atividade de 86% após 10 dias. Esses resultados evidenciam que a quitosana é um suporte que favorece a retenção de atividade enzimática, embora o trabalho de Chibata (1978) ilustre que as enzimas imobilizadas por ligações covalentes em suportes inorgânicos sejam mais estáveis do que as mesmas imobilizadas em suportes orgânicos.

Hung e colaboradores (2003) também publicaram resultados semelhantes, embora tenham imobilizado lipase em esferas de quitosana utilizando o método de imobilização binária (glutaraldeído + carbodiimida). Os ensaios de estabilidade frente a um período de estocagem de sete dias e temperatura de 25°C revelaram que a enzima livre detinha uma

atividade enzimática residual de 35%, enquanto a enzima imobilizada detinha 67% de atividade enzimática residual.

O trabalho de Chiou e Wu (2004) ilustra um estudo de imobilização de lipase em esferas de quitosana utilizando carbodiimida no processo de ativação das esferas. Esses autores realizaram um estudo de estabilidade da enzima imobilizada e observaram que as esferas estocadas em solução aquosa perdiam significativa porcentagem de atividade, principalmente, nos primeiros cinco dias devido a um processo de “entumescimento” das esferas. Esse aumento de diâmetro das esferas, possivelmente ocasionou um aumento das distâncias intermoleculares com conseqüente decréscimo das forças de atração entre as moléculas, ruptura e liberação da molécula de enzima. Baseando-se neste estudo, foi realizado um ensaio de estabilidade da enzima imobilizada em esferas ativadas com 3% de glutaraldeído após 10 dias de estocagem a temperatura de 4°C, onde foi obtida uma atividade residual 9% maior se comparada com as esferas ativadas com 3% de glutaraldeído e submetidas a um período de estocagem de 10 dias à 25°C. Esse resultado sugere que, a influência de um processo de “entumescimento” das esferas com a enzima imobilizada pode ter ocorrido, sendo que a temperaturas mais baixas as mesmas possuem maior retenção de atividade. Além disso, é relevante esclarecer que os experimentos relacionados à estabilidade não foram realizados com as esferas sem ativação com glutaraldeído, devido à reduzida resistência mecânica das mesmas. Essa observação evidencia a importância do glutaraldeído, que, além de possibilitar a imobilização enzimática, confere as esferas maior resistência mecânica devido às reações de entrecruzamento ilustradas no Esquema 1. Essa afirmação pode ser confirmada pelo estudo de Cetinus e Öztop (2003) que ilustraram a importância da utilização de glutaraldeído para promover o aumento estabilidade operacional de esferas de quitosana.

4.5-CARACTERIZAÇÃO DA LACASE LIVRE E IMOBILIZADA

O primeiro parâmetro determinado para a lacase livre foi a MM, que por sua vez foi determinada por HPLC. Através dos cromatogramas e comparando-se com o padrão utilizado, foi possível observar que a enzima detinha uma MM de aproximadamente 65 kDa. Esse valor condiz com os demais valores apresentados para as lacases fúngicas na literatura (LEONTIEVSKY et al., 1997, HEINZKILL et al., 1998, LEONOWICZ e BOLLAG, 1987).

Além da MM, também foram determinados outros parâmetros que podem expressar as possíveis mudanças nas propriedades enzimáticas após o processo de imobilização, ou seja, apesar da reconhecida superioridade das enzimas imobilizadas frente às livres, o processo de imobilização pode modificar a cinética e as propriedades físico-químicas da enzima, normalmente reduzindo sua atividade específica. Várias são as mudanças descritas sobre as propriedades das enzimas, sendo que estas são causadas principalmente em função fatores como: (a) efeitos conformacionais; (b) efeitos estereoquímicos; (c) efeitos microambientais e (d) efeitos difusionais ou de transferência de massa (ZANIN e MORAES, 2004). Com o objetivo de detectar as possíveis mudanças nas propriedades enzimáticas após o processo de imobilização, foram realizados experimentos citados nas seções 4.4.3 à 4.4.8 e discutidos a seguir.

4.5.1-DETERMINAÇÃO DO MELHOR PH

O perfil de atividade versus pH da enzima livre e imobilizada foi realizado conforme descrito no item 4.4.3. Os resultados estão ilustrados na Figura 24, onde foi possível observar que o processo de imobilização provocou mudanças no pH ótimo da enzima. A enzima livre apresentou maior atividade em pH=4,0, enquanto a mesma imobilizada apresentou maior

atividade em $\text{pH}=5,5$. Esses resultados indicam que o processo de imobilização acarretou mudanças no pH ótimo da enzima em direção a valores mais elevados de pH . Para compreender este comportamento, tem-se o estudo realizado por Goldstein, Levin e Katchalski (1964), que relevou a existência de uma diferença na concentração de íons H^+ entre o microambiente, no qual a enzima está imobilizada (suporte polieletrólito) e a solução que envolve este suporte. A concentração de íons H^+ ao redor de um polieletrólito com carga negativa é maior que na solução. Esse comportamento se inverte quando o polieletrólito tem carga positiva. Dessa forma, a curva de pH versus atividade de enzima imobilizada em suporte com carga elétrica pode deslocar-se para regiões mais alcalinas quando o suporte é carregado negativamente e regiões mais ácidas quando o suporte é carregado positivamente. Seguindo este raciocínio, foi esperada uma mudança no pH ótimo da lacase imobilizada em direção a valores mais baixos de pH , pois o suporte utilizado (quitosana) é policatiônico. No entanto, vários trabalhos publicados também ilustram perfis de pH ótimo diferentes do esperado. Os trabalhos de D'annibale e colaboradores (1999), Cetinus e Öztop (2000), Cetinus e Öztop (2003) e Jiang e colaboradores (2005), os quais imobilizaram lacase em esferas de quitosana, catalase em filme de quitosana, catalase em esferas de quitosana e lacase em microesferas magnéticas de quitosana, respectivamente, obtiveram como resultados a permanência do pH ótimo para as enzimas imobilizadas em relação às enzimas livres.

Outro comportamento inesperado e semelhante aos resultados obtidos neste trabalho é apresentado no estudo de Abdel-Naby e colaboradores (1999), que imobilizaram dextranase em quitosana usando 2,5% de glutaraldeído e verificaram que o pH ótimo mudou de 5,5 para 6,0 após o processo de imobilização.

Embora o trabalho de Goldstein, Levin e Katchalski (1964) seja uma ferramenta útil para explicar os fenômenos de mudança de pH ótimo após os processos de imobilização, vale a pena ressaltar que essas mudanças podem estar associadas a outros fatores, além da carga do

polímero. A posição do centro catalítico da enzima e o tamanho da molécula a ser biocatalisada são dois fatores envolvidos na distância do processo de reação da superfície do suporte e, conseqüentemente, de sua exposição à superfície carregada (LANTE et al., 2000).

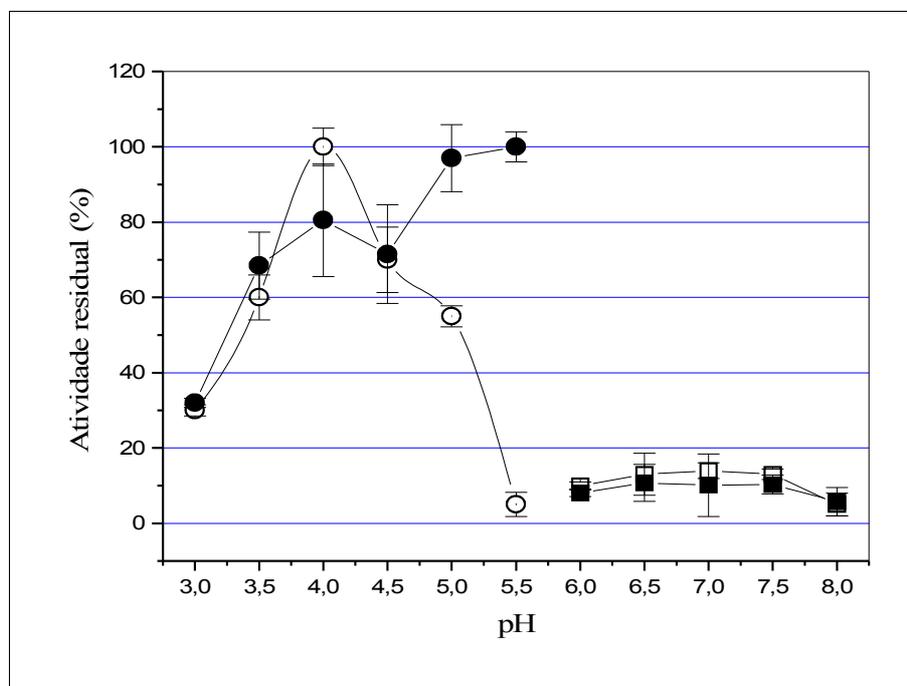


Figura 24: Efeito do pH sobre a atividade da enzima livre (símbolo aberto) e imobilizada (símbolo fechado). A atividade enzimática foi medida em tampão tartarato (0,1M) (círculos) e tampão fosfato (0,1 M) (quadrados) a 25°C.

4.5.2-PROPRIEDADES CINÉTICAS FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS

A análise de parâmetros cinéticos como o K_m e o $V_{máx}$ são importantes, pois revelam as mudanças de especificidade em relação aos substratos que as enzimas sofrem após o processo de imobilização. Considerando isso, a cinética de atividade oxidativa da lacase livre e imobilizada foi investigada usando-se várias concentrações de ABTS, siringaldazina e vermelho de fenol como substratos. Para efeito ilustrativo, a figura 25 apresenta o gráfico de

Michaelis-Menten de atividade da lacase livre e imobilizada sobre a siringaldazina, enquanto que, os valores obtidos para as constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ estão ilustrados na tabela 2.

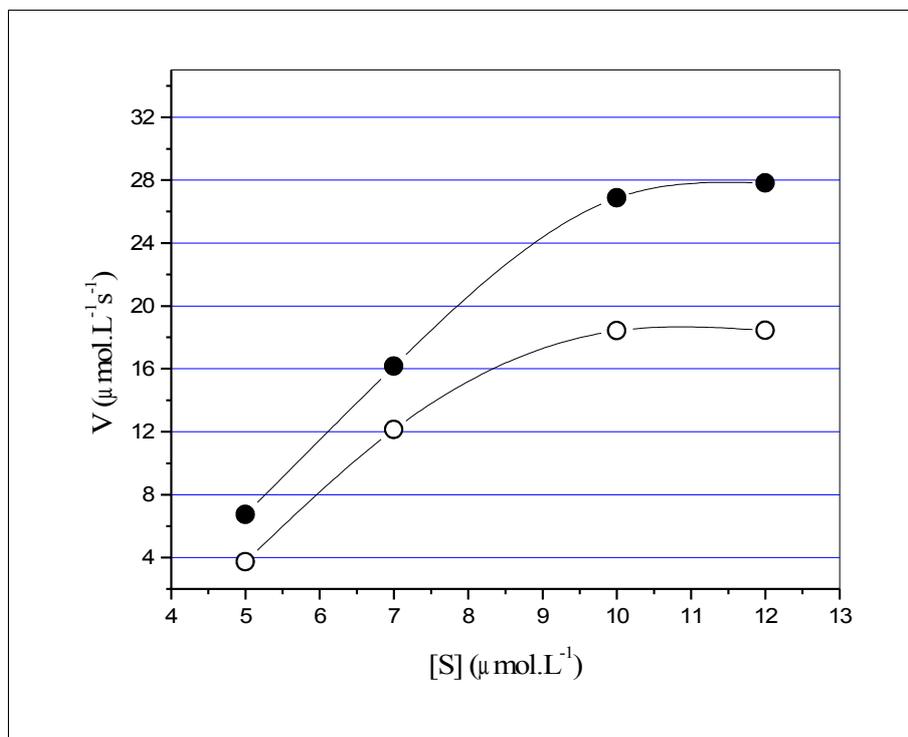


Figura 25: Gráfico de Michaelis-Menten [V-(velocidade de reação) versus S-(concentração de siringaldazina)] para a formação de composto que absorve em 525 nm, catalisada pela lacase livre e imobilizada em esferas de quitosana. Os pontos das curvas representam as médias de 3 repetições.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos para a lacase livre e imobilizada.

Forma da lacase	Substrato utilizado	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol/s}$)	K_m (μM)
Livre	siringaldazina	$34,18 \pm 12,889$	$4,62 \pm 3,371$
Imobilizada		$86,86 \pm 0,127$	$47,05 \pm 0,053$
Livre	ABTS	$8,97 \pm 0,036$	$0,271 \pm 0,075$
Imobilizada		$166,82 \pm 0,205$	$79,31 \pm 0,085$
Livre	vermelho de fenol	$15,51 \pm 1,58$	$6,26 \pm 1,39$
Imobilizada		$47,64 \pm 10,86$	$12,97 \pm 5,95$

Através dos dados obtidos, foi possível verificar que houve um significativo aumento dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para enzima imobilizada em relação à enzima livre. A maior taxa

de aumento foi obtida com o ABTS, onde o K_m e o $V_{m\acute{a}x}$ aumentaram respectivamente 292,65 e 18,59 vezes em relaao à enzima livre. Comparando-se com a literatura, os resultados obtidos corroboram muitos trabalhos que também ilustraram aumento dos valores para esses parâmetros, após o processo de imobilizaao da enzima, conforme ilustrado na tabela 3.

Tabela 3: Quociente entre valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ antes e após a imobilizaao enzimática obtidos por outros autores.

Enzima	Suporte	$\frac{(V_{m\acute{a}x})_{imobilizada}}{(V_{m\acute{a}x})_{livre}}$	$\frac{(K_m)_{imobilizada}}{(K_m)_{livre}}$	Referência
lacase	vidro poroso	6,57	Não determinado	ROGALSKI <i>et al</i> , 1995
β -glicosidase	quitosana	Não determinado	3,68	MARTINO <i>et al</i> , 1996
galactosidade	Eupergit C	2,84	0,94	HERNAIZ, CROUT, 2000
lipase	quitosana	10,8	1,04	HUNG <i>et al</i> , 2003
catalase	quitosana	3,81	2,21	CETINUS, OZTOP, 2003
lipase	quitosana	123,4	29,4.	HUA-SHAO, WU, 2004
lacase	nylon	0,16	0,028	DURANTE <i>et al</i> , 2004.
lacase	kaolinite	0,63	0,67	DODOR, HWANG, EKUNWE, 2004.
lacase	quitosana	4,65	0,89	JIANG <i>et al</i> , 2005

Considerando a Tabela 2 e Tabela 3, é possível verificar que o trabalho de Jiang e colaboradores (2005) ilustra os valores de parâmetros que mais se assemelham com os resultados obtidos neste trabalho. De fato, esses autores utilizaram uma metodologia muito semelhante para o processo de imobilizaao.

Outro fato observado foi a relaao existente entre o valor dos parâmetros cinéticos e a MM dos substratos, ou seja, foi verificado que o aumento da MM do substrato parece estar associado ao aumento da diferena dos valores obtidos para as constantes cinéticas em ambas formas de enzima (livre e imobilizada). Dessa forma, a diferena aumenta em ordem

crecente para os substratos: vermelho de fenol > siringaldazina > ABTS que possuem respectivamente MM de 354/ 360 e 548 g/mol. É relevante esclarecer que, além das características dos substratos, outros eventos podem contribuir para o aumento do valor de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, como: a) perda de flexibilidade da enzima necessária para a ligação com o substrato (ZANIN e MORAES, 2004); b) limitação da difusão do substrato e produtos devido à natureza não porosa do suporte (CETINUS e ÖZTOP, 2003); c) formação de uma camada de solvente ao redor da esfera (camada de Nernst), que pode conter concentração de substrato menor em relação à solução (CRESSEWILL e SANDERSON, 1970);

4.5.3-ESTABILIDADE FRENTE A INIBIDORES

Os efeitos de vários inibidores sobre a lacase livre e imobilizada foram investigados. Os resultados (Figura 26) demonstram que EDTA, $K_2Cr_2O_7$ e $KFe(CN)_6$ não provocaram inibição enzimática nas concentrações estudadas. Dentro deste contexto, o trabalho de Rogalski e colaboradores (1995) ilustra uma comparação entre as lacases de *Plebia radiata* e *Cerrena versicolor* com relação ao efeito inibitório de agentes quelantes. Esses autores observaram que a lacase de *P. radiata* foi mais resistente à inibição devido ao menor conteúdo de átomos de Cu no centro catalítico. Outro estudo também ilustrou que o EDTA não provocou inibição sobre lacase de *Cerrena unicolor* (Rogalski et al., 1999). Dessa forma, é possível supor que a lacase utilizada neste trabalho deve possuir um número reduzido de átomos de Cu, o que explica sua menor susceptibilidade à inibição pelo EDTA. No caso do H_2O_2 e NaN_3 , mostraram-se potentes inibidores. Considerando isso, para avaliar se a imobilização foi capaz de tornar a enzima menos vulnerável frente a tais inibidores, foram realizados experimentos de determinação de atividade da enzima livre e imobilizada com os

mesmos. Os resultados revelaram que a enzima imobilizada foi menos suscetível à inibição com H_2O_2 .

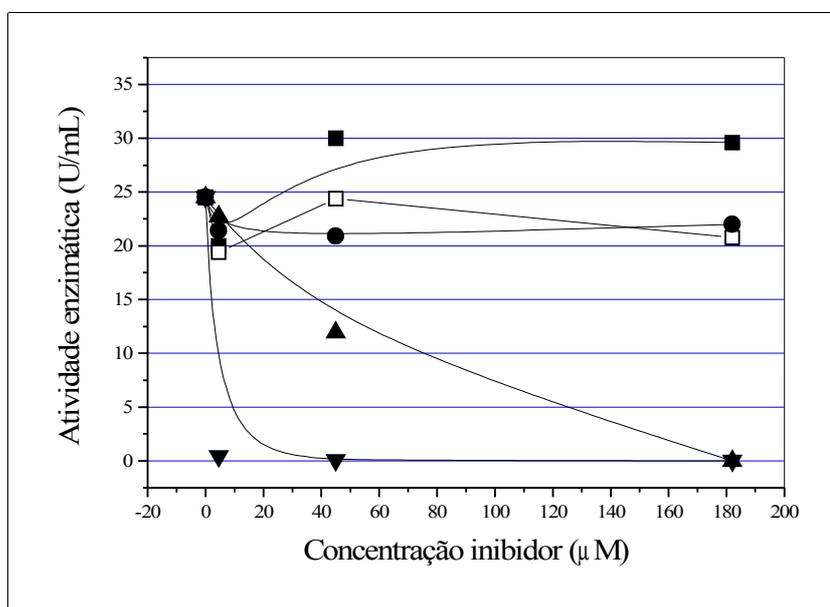


Figura 26: Efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima livre a 25°C em tampão tartarato pH=4,0. Os símbolos ■, □, ●, ▲, ▼ correspondem respectivamente a EDTA, $K_2Cr_2O_7$, $K_3Fe(CN)_6$, H_2O_2 e NaN_3 . Os pontos das curvas representam as médias de 3 repetições para cada análise.

Conforme ilustra a Figura 27, a enzima imobilizada foi capaz de reter a atividade em 50% em solução de 45 μM de H_2O_2 , enquanto a enzima livre, submetida a mesma concentração de inibidor foi capaz de reter apenas 10%. No entanto, a enzima imobilizada foi vulnerável à inibição por NaN_3 da mesma forma que a enzima livre. Esses resultados confirmaram o trabalho de Rogalski e colaboradores (1999), que mostram um estudo de atividade enzimática da lacase imobilizada em vidro de porosidade controlada em soluções de NaN_3 , onde foi observado que o processo de imobilização causa uma retenção de atividade desprezível se comparado com a enzima livre.

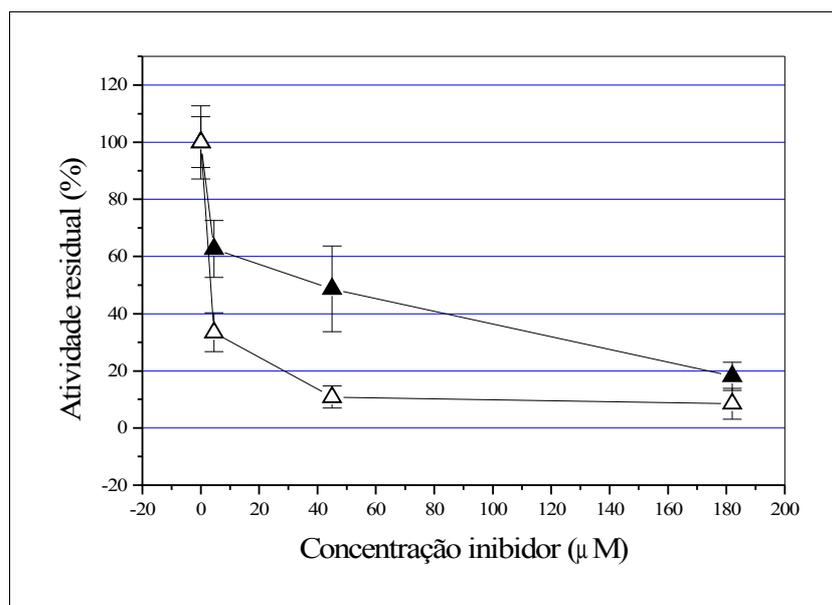


Figura 27: Efeito de diferentes concentrações de H₂O₂ sobre a atividade da enzima livre (símbolo aberto) e imobilizada (símbolo fechado) a 25°C em tampão tartarato pH=4,0.

4.5.4-PROPRIEDADES DE TERMOESTABILIDADE

As enzimas livre e imobilizada foram pré-incubadas com tampão tartarato pH=4,0 por 30 minutos em várias temperaturas. Os resultados (Figura 28) revelaram que a enzima imobilizada adquiriu uma termoestabilidade muito superior à enzima livre. Em uma temperatura de 40°C, a enzima imobilizada foi ≈70% mais ativa que a enzima livre e à temperatura de 50°C ocorreu completa desnaturação da enzima livre, enquanto a enzima imobilizada ainda possuía uma atividade residual de 40%.

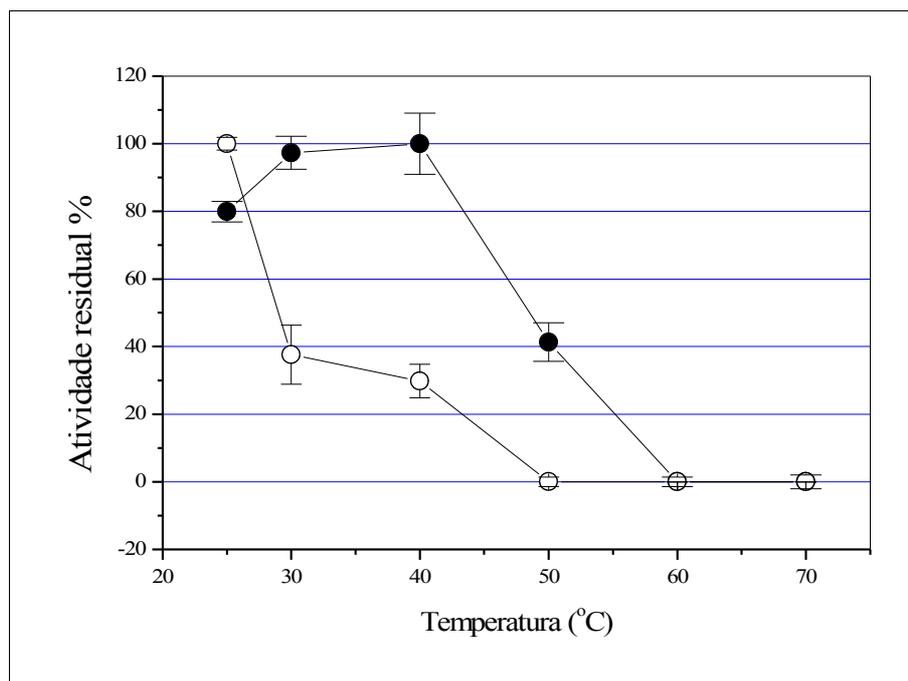


Figura 28: Determinação da atividade enzimática residual da enzima livre (símbolo aberto) e imobilizada (símbolo fechado) em tampão tartarato (0,1M) pH=4,0, após um período de incubação de 30 minutos em temperaturas que variaram de 25 à 70°C.

Esse resultado indica que a atividade da enzima tornou-se menos dependente da temperatura após o processo de imobilização. Embora D'annibale e colaboradores (1999) tenham observado apenas um pequeno abrandamento da perda de atividade em temperaturas maiores que 60°C, Jiang e colaboradores (2005) verificaram que o processo de imobilização conferiu à enzima um aumento significativo da estabilidade térmica em relação à enzima livre. Após 210 minutos de incubação em temperatura de 60°C, a lacase imobilizada possuía uma atividade residual de 74% enquanto a lacase livre possuía atividade residual de 19,4%. Cetinus e Öztop (2003) que imobilizaram catalase em esferas de quitosana, também observaram bons resultados com retenção de atividade de até 60% após 13 ciclos com a enzima imobilizada. Observações semelhantes foram ilustradas no trabalho de Noda, Furuda e Suda (2001) que imobilizaram alfa-amilase em esferas de quitosana, e observaram que à 60°C

a enzima imobilizada ainda retinha boa parte da atividade enquanto a livre não possuía nenhuma atividade.

Outros resultados semelhantes ao comportamento de termoestabilidade apresentado neste trabalho, apenas foram encontrados com enzimas imobilizadas em suportes inorgânicos (WANG e CHIO, 1998, HERNAIZ e CROUT, 2000). Essa observação corrobora os dados de Zanin e Moraes (2004), quando os mesmos citam que os suportes inorgânicos conferem à enzima maior termoestabilidade se comparado aos suportes orgânicos.

Em suma, considerando os resultados apresentados, é possível verificar que a molécula da enzima adquire considerável resistência térmica após o processo de imobilização e ressalta as possíveis aplicações que podem ser conferidas à lacase imobilizada em processos industriais com temperaturas mais elevadas.

4.5.5-DETERMINAÇÃO DE ESTABILIDADE FRENTE A SOLVENTES

As lacases vêm sendo intensamente estudadas para biodegradação de uma série de xenobióticos, entretanto, grande parcela desses compostos possui pouca solubilidade em água. Dessa forma, o processo de imobilização também visa proteger a enzima das interações com o solvente e evitar sua desativação catalítica para que a mesma possa ser utilizada de forma efetiva na biodegradação desses compostos. Dentro deste contexto, foram realizados experimentos de estabilidade da enzima livre e imobilizada frente a solventes (em sua maioria, utilizados com biocatalisadores) de diferentes características estruturais e hidrofóbicas.

Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que a acetona foi o solvente que provocou maior desativação para ambas formas de lacase (Figura 29b), embora a forma imobilizada tenha retido 100% de sua atividade em solução 10% de acetona. Para soluções com mais de 30% de acetona, ambas formas foram capazes de reter pouca atividade. Esses resultados corroboram os comentários realizados no trabalho de Bell, Janssen e Halling (1996), que citaram o maior efeito nocivo da acetona provocado sobre a lacase imobilizada em relação a outros solventes como álcoois e dioxano.

A enzima imobilizada forneceu bons resultados de retenção de atividade em relação à enzima livre frente aos demais solventes (Figura 29a, 29d e 29e). Os valores mais altos de retenção de atividade foram obtidos com as soluções de glutaraldeído (Figura 29c), onde foram observados valores de até $\approx 94,9\%$ maior para a enzima imobilizada em relação a livre. De forma geral, os resultados obtidos são interessantes, pois mostram que a enzima imobilizada tem a capacidade de reter boa parte de sua atividade mesmo diante de solventes muito hidrofóbicos como o dioxano e o acetato de etila, o que demonstra a possível aplicação dessas enzimas na biodegradação de compostos recalcitrantes, tais como ligninas comerciais insolúveis em água. O trabalho de Milstein e colaboradores (1993) ilustra os bons resultados obtidos para retenção de atividade em soluções de diferentes porcentagens de hexano, acetonitrila, tetrahydrofurano, dioxano e tampão citrato pH=4,5, incubadas com lacase de *Trametes versicolor* imobilizada em Sepharose.

Os autores constataram maiores valores de retenção de atividade para enzima imobilizada incubada com dioxano do que a mesma incubada apenas com tampão citrato pH=4,5. Dessa forma, é possível concluir que a enzima imobilizada foi cataliticamente ativa em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar, ou em certos casos até superior quando as mesmas encontram-se em ambientes aquosos. Acredita-se que as enzimas imobilizadas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico, porque permanecem na sua forma original, não se

desdobrando em meio orgânico. Essa característica deve-se, em parte, ao aumento das interações entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos e ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares, além da estabilidade estrutural fornecida pelas ligações cruzadas com glutaraldeído. No entanto, para que a enzima imobilizada tenha eficiência catalítica em meio orgânico, ela necessita ter uma quantidade mínima de água ligada, o que também deve assegurar a sua integridade (BELL; JANSSEN; HALLING, 1996).

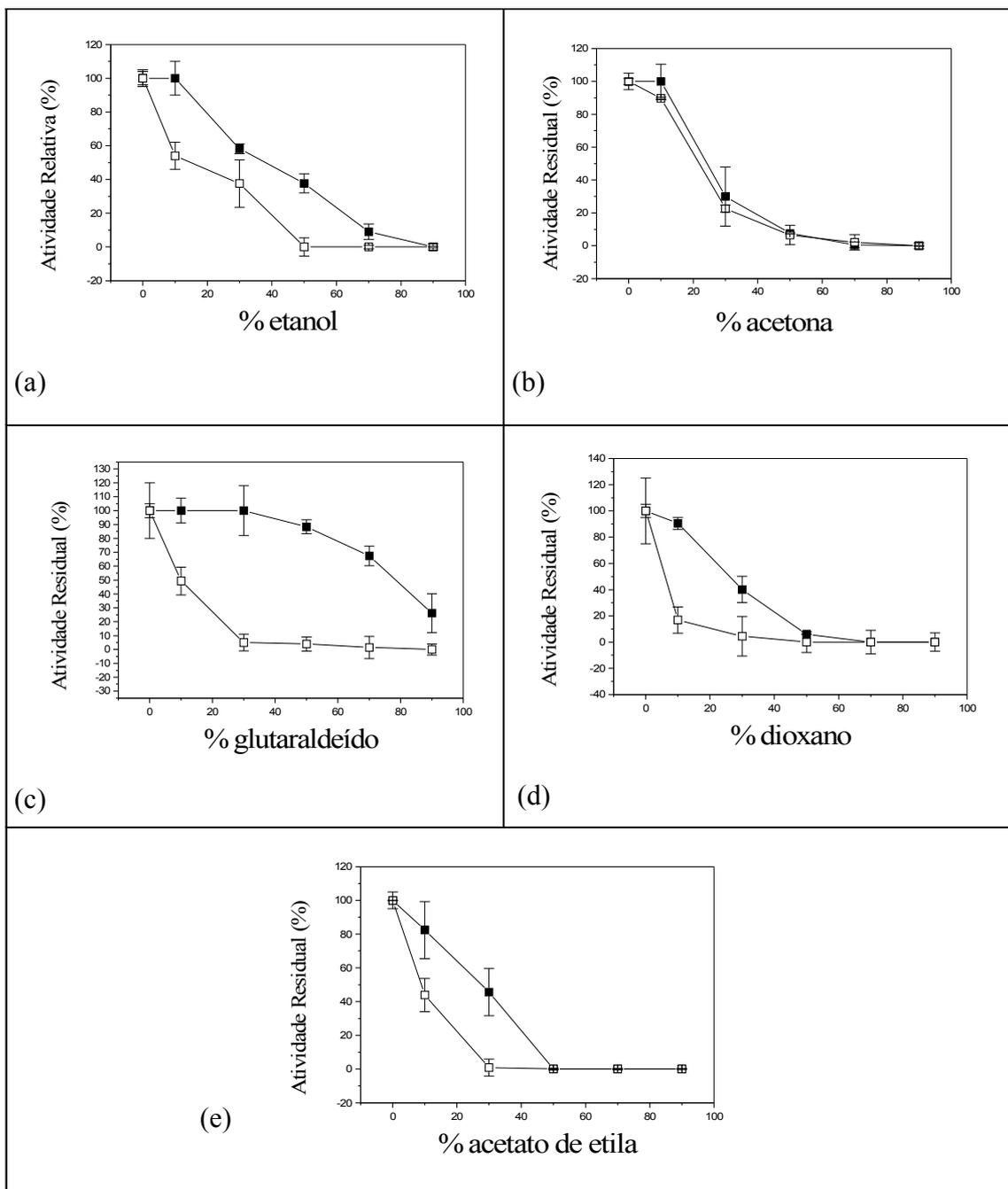


Figura 29: Efeito do solvente + tampão fosfato pH=4,0 (% v/v) sobre a atividade residual da enzima livre (símbolo aberto) e a enzima imobilizada (símbolo fechado) à 25°C.

4.5.6- ESTABILIDADE OPERACIONAL DA ENZIMA IMOBILIZADA

No desenvolvimento dos processos com enzimas imobilizadas, um parâmetro fundamental é a estabilidade operacional. Os processos com enzimas imobilizadas somente serão mais econômicos que os processos com a enzima livre, se for possível que a enzima imobilizada seja capaz de reter considerável atividade enzimática após vários ciclos de uso. Dessa forma, haveria uma redução no custo operacional do processo advindo do menor consumo de enzima, além de compensar as despesas adicionais com os processos de imobilização (ZANIN e MORAES, 2004).

Considerando a importância desse parâmetro foram realizados cinco ciclos oxidativos consecutivos usando a siringaldazina como substrato para determinar a manutenção da atividade em condições operacionais. A Figura 30 ilustra a atividade da enzima imobilizada após cada ciclo oxidativo, que por sua vez, foi composto por uma solução 13,88 mM do substrato e tampão pH=4,0 à 25°C. Através dos resultados obtidos foi possível verificar que após cinco ciclos a atividade residual final da enzima imobilizada foi de apenas 2,25%. Esses resultados evidenciam que o processo de imobilização acarretou pouca estabilidade operacional a lacase. A título de comparação com os dados da literatura, é possível verificar que os autores observaram resultados muito distintos quando utilizaram como suporte a quitosana. Para ilustrar essa afirmação temos os trabalhos de:

- 1) Amorim e colaboradores (2003) que imobilizaram lipase em filme de quitosana ativada com 5% de glutaraldeído, e verificaram a estabilidade operacional que foi avaliada durante 4 ciclos de reuso. Esses autores observaram que a atividade caiu para 45% da atividade inicial já no segundo hidrolítico.

2) Cetinus e Öztop (2000) verificaram a estabilidade operacional de catalase imobilizada em filme de quitosana ativado com glutaraldeído e observaram que após a 4 ciclos oxidativos, a atividade enzimática foi reduzida a 50%.

3) D'annibale e colaboradores (1999) imobilizaram lacase em esferas de quitosana ativadas com 1% de glutaraldeído, observaram que, após 30 ciclos oxidativos utilizando como substrato o ABTS, a lacase ainda possuía uma atividade residual de 80%.

4) Jiang e colaboradores (2005) também obtiveram valores acima de 80% de atividade residual após oxidação de dez bateladas contendo solução de ABTS por lacase imobilizada em microesferas de quitosana ativadas com glutaraldeído;

Segundo Zanin e Moraes (2004), a estabilidade operacional da enzima imobilizada está diretamente relacionada ao suporte e o método de imobilização utilizado. Entretanto, observando os resultados obtidos neste trabalho e dos autores citados, é possível notar a ausência de um comportamento regular ou esperado para a estabilidade operacional da enzima imobilizada. Essas observações indicam que, possivelmente, além das características do suporte e do processo de imobilização utilizado, outros fatores podem ser levados em consideração por modificarem o parâmetro de estabilidade operacional das enzimas, tais como: (a) o desprendimento da enzima do suporte; (b) a obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; (c) a perda do suporte por atrito ou dissolução e, (d) crescimento de microrganismos.

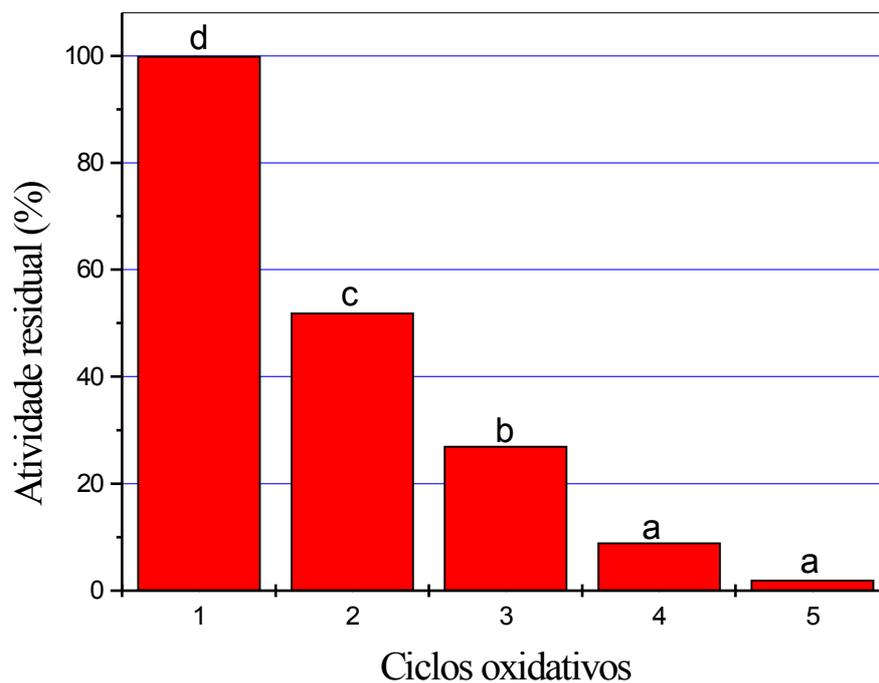


Figura 30: Estabilidade operacional da lacase imobilizada em quitosana à 25°C. Todos os dados foram significativos para análises em triplicata. As médias se baseiam em 3 repetições onde, as que são representadas pela mesma letra são estatisticamente não significantes entre si, sendo $a < b < c < d$

PARTE 2-TRATAMENTO DO EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

Além das justificativas citadas no item 1.0, o que impulsionou a realização deste experimento foram os bons resultados obtidos anteriormente, relacionados aos ensaios de biodegradação do efluente com a lacase. Esses resultados revelaram que a enzima foi capaz de remover 60% de cor e 70% de fenóis totais após 45 minutos de incubação da mesma com o efluente (VILLELA e SOARES, 2005). Dessa forma, o estudo foi realizado na tentativa de viabilizar o uso da lacase imobilizada como possível método alternativo ou combinada a outros processos tradicionais para o tratamento dos efluentes das indústrias papeleiras.

4.6- OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DO EFLUENTE COM A ENZIMA IMOBILIZADA

Os ensaios de otimização de biodegradação foram realizados com amostras de efluente em diferentes concentrações (17,5% - 35% - 70%) e diferentes quantidades do suporte (1 e 2 g de esferas de quitosana com a enzima imobilizada). Os parâmetros monitorados foram os fenóis totais e a cor do efluente, nos tempos de 0, 1, 3 e 24 horas. O controle negativo também foi determinado empregando-se os mesmos ensaios, porém utilizando apenas as esferas de quitosana sem a enzima imobilizada.

Através dos resultados obtidos, (Figura 31; Figura 32) foi possível verificar que ocorreu maior remoção de fenóis totais e de cor com o sistema constituído por 2 g de suporte

contendo a enzima imobilizada e efluente com porcentagem de 17,5. Neste caso, a enzima imobilizada foi capaz de remover aproximadamente 61,7% de cor e 69% de fenóis totais.

Para efeito de comparação com os dados da literatura, o trabalho de Soares e Durán (1998) estudou a eficiência de remoção de cor e compostos fenólicos de um efluente semelhante incubado com *Trametes villosa*. Estes autores observaram que após 48 horas de incubação, houve remoção de 70% de cor e 80% de compostos fenólicos. Os bons resultados encontrados foram atribuídos às enzimas oxidativas excretadas pelo fungo, em especial às lacases. D'annibale e colaboradores (2000) também realizaram um estudo semelhante, analisando a remoção de fenóis totais e cor do efluente de uma indústria de azeite de oliva utilizando lacase imobilizada, e verificaram que a mesma foi capaz de remover até 70% de fenóis totais, e aproximadamente 20% de cor. Esses resultados revelam, portanto, que a enzima pode ser utilizada para a remoção de compostos fenólicos e cor dos efluentes. É interessante comentar que ainda existem poucos estudos de biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras utilizando lacase. A maioria dos trabalhos publicados refere-se a estudos de biodegradação por lacase utilizando compostos fenólicos individuais. (BOURBONNAIS et al., 1995, CASTRO; EVTUGUIN; XAVIER, 2003, HUBLIK e SCHINNER, 2000).

Através das Figuras 31(a) e 32(a), também foi possível verificar que as esferas sem a enzima imobilizada (controle negativo) não causaram modificação significativa dos parâmetros analisados. Esse resultado confirma as afirmações citadas no item 4.2.3, onde a caracterização da área específica da quitosana revelou que a mesma possuía apenas 4,86 m²/g. Com a quitosana na forma esférica, sua área deve diminuir ainda mais, diminuindo ou mesmo inviabilizando os possíveis fenômenos de adsorção física dos componentes do efluente. Dessa forma, os resultados observados, relacionados à remoção de cor e fenóis totais, deve-se preferencialmente aos processos oxidativos catalisados pela enzima imobilizada.

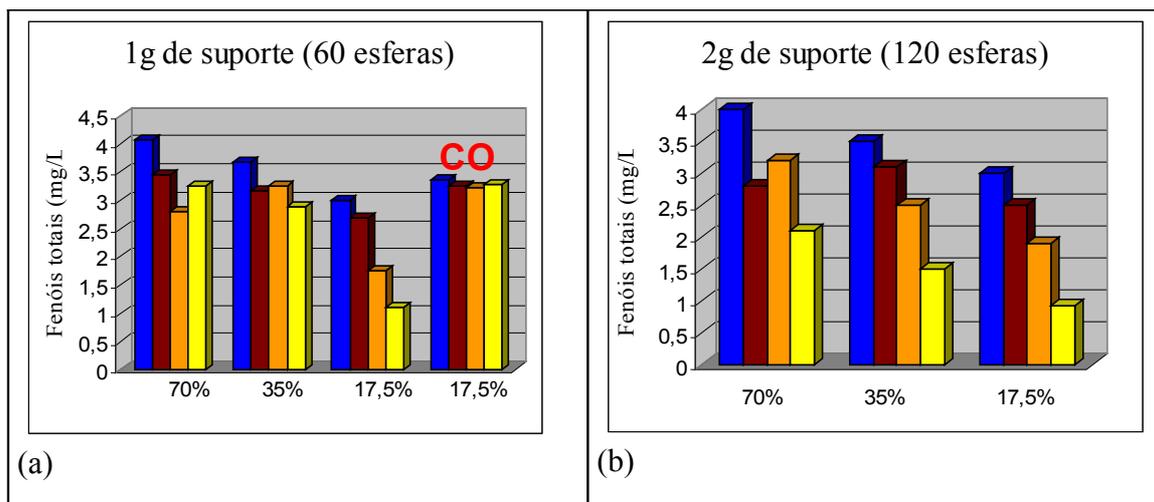


Figura 31: Concentração de fenóis totais em amostras de efluente de diferentes concentrações, incubadas com 1g (a) e 2g (b) de suporte contendo enzima imobilizada, após o tempo de reação: 0 h (azul); 1 h (vermelho); 3 h (laranja) e 24 h (amarelo) . CO representa o conjunto de dados da incubação do efluente com esferas de quitosana sem a enzima imobilizada.(controle).

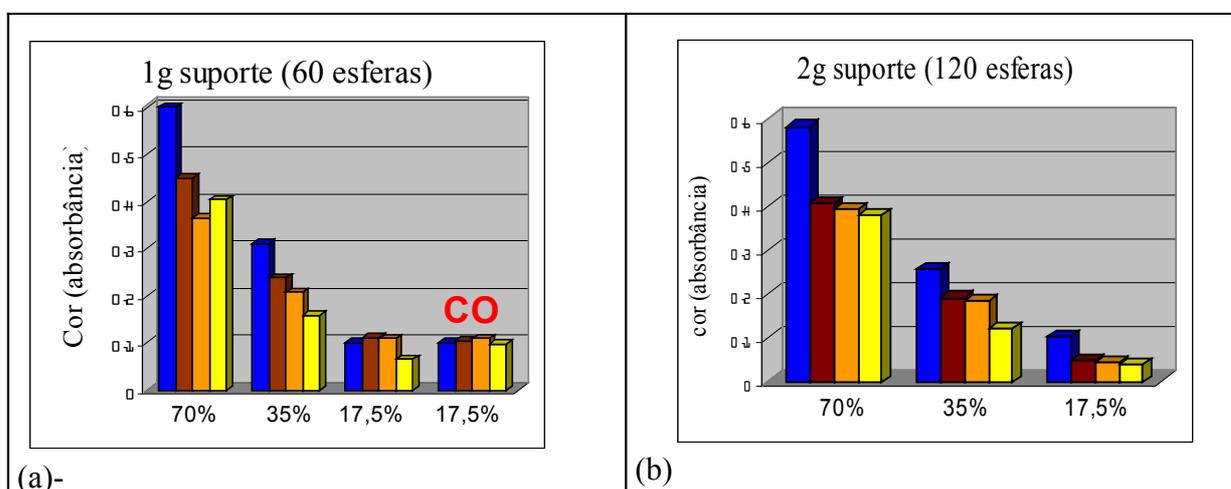


Figura 32: Análises de cor em amostras de efluente de diferentes concentrações, incubadas com 1g (a) e 2g (b) de suporte contendo enzima imobilizada, após o tempo de reação: 0 h (azul); 1 h (vermelho); 3 h (laranja) e 24 h (amarelo) . CO representa o conjunto de dados da incubação do efluente com esferas de quitosana sem a enzima imobilizada.(controle).

4.7- MODIFICAÇÕES QUÍMICAS CAUSADAS NO EFLUENTE APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA

Nesse ensaio foram realizadas análises de outros parâmetros, além da determinação de cor e fenóis totais, para o sistema escolhido na etapa anterior. O objetivo desse experimento foi tentar identificar possíveis modificações químicas causadas no efluente pela ação da lacase imobilizada. Considerando isso, um novo ensaio de biotransformação foi realizado com o sistema composto por 2 g de suporte com enzima imobilizada e 17,5% de efluente. Os parâmetros (cor, fenóis totais, fenóis de baixa MM e DQO) foram analisados em diferentes tempos. Além disso, também foram determinadas as características químicas da cor e as modificações dos grupos ionizáveis, antes e após o tratamento enzimático de 24 horas.

Os resultados ilustrados na Figura 33 revelaram que a enzima degradou de forma eficiente, além dos compostos fenólicos totais (remoção de ~65%), compostos fenólicos de baixa MM (remoção de ~65%) e cor (remoção de ~60%) do efluente.

Quanto à cinética de remoção, não foram observadas mudanças significativas dos parâmetros analisados no efluente, após 1 e 3 horas de incubação do mesmo com a enzima imobilizada. No entanto, ocorreu depleção significativa de cor, fenóis totais e fenóis de baixa MM no efluente após 24 horas de reação com a enzima.

Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente, onde a remoção de cor e fenóis do efluente foi diretamente associada à capacidade da lacase em despolimerizar compostos de alta MM do efluente. Os resultados obtidos através de técnicas cromatográficas revelaram que o material orgânico contido no efluente sofreu intensa degradação, indicada por uma acentuada diminuição da área total obtida nos cromatogramas medidos a 240, 280 e 310 nm antes e após tratamento com a lacase (VILLELA e SOARES, 2005). Dessa forma, é possível inferir que nos experimentos realizados neste trabalho também tenha ocorrido a

despolimerização, levando-se em consideração que a enzima utilizada foi a mesma, embora estivesse na forma imobilizada.

A remoção de compostos fenólicos do efluente é importante, pois:

a) Compostos fenólicos de baixa MM são os agentes químicos responsáveis pela toxicidade apresentada pelos efluentes.

b) Compostos fenólicos de alta MM, em tese, não possuem toxicidade aguda, porém tendem a sofrer degradação em condições ambientais para formar compostos fenólicos de baixa MM, conseqüentemente tóxicos (SOARES, 1998).

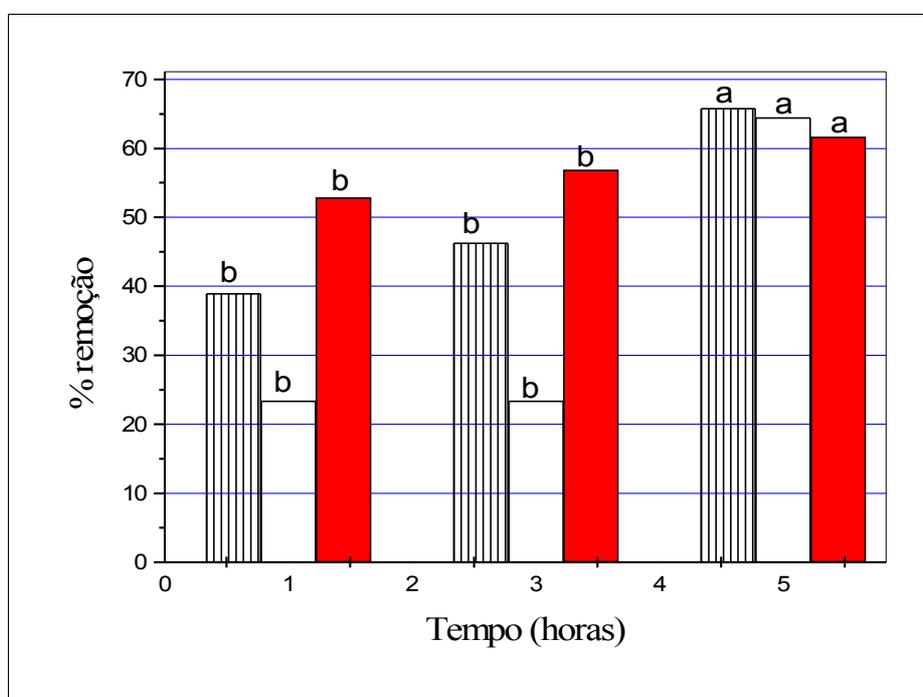


Figura 33: Determinação de fenóis de baixa MM (barras listradas), fenóis totais (barras claras) e cor (barras vermelhas) após 1, 3 e 24 horas de tratamento do efluente com a lacase imobilizada. As médias baseiam-se em 3 repetições, onde as que são representadas pela mesma letra são estatisticamente não significantes entre si, sendo $a > b$.

Outro parâmetro indispensável nos estudos de caracterização dos efluentes industriais, e que normalmente é utilizado para avaliar a eficiência dos sistemas de tratamento dos mesmos é o potencial de depleção de oxigênio causado pela matéria orgânica presente na água residuária em questão. A demanda de oxigênio pode ser avaliada através da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) ou demanda química de oxigênio (DQO). Embora as duas técnicas tenham vantagens e desvantagens, a DQO talvez seja o parâmetro mais usado pela rapidez e simplicidade do método (AQUINO, 2003).

A medida de DQO baseia-se na avaliação do potencial de matéria redutora de uma amostra, através de um processo de oxidação química em que se emprega um agente oxidante forte como o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$). Considerando a importância desse parâmetro, o mesmo foi analisado durante o processo de biotransformação do efluente provocado pela lacase imobilizada.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 4), foi possível observar que não houve alteração da DQO durante o processo de biotransformação do efluente.

O trabalho de Casa e colaboradores (2003) ilustra resultados semelhantes. Os autores realizaram o tratamento do efluente de uma indústria de azeite de oliva com lacase, e verificaram 65% de redução de fenóis totais, 86% de orto-difenóis e apenas 5% de redução de DQO.

Essas constatações podem ser explicadas com base na composição química do efluente e no modo de ação das lacases, que por sua vez, catalisam apenas a oxidação de compostos fenólicos. No entanto, os efluentes possuem outras substâncias (item 2.2) que, eventualmente, mesmo após tratamento enzimático, ainda conferem aos efluentes altos valores de DQO.

Tabela 4: Determinação de DQO após 0, 1, 3 e 24 horas de tratamento do efluente com a lacase imobilizada .

Tempo (horas)	0	1	3	24
DQO ($\mu\text{g O}_2/\text{L}$)	886,7 \pm 9,40	856,7 \pm 17,46	910 \pm 44,12	880 \pm 0,49

Além dos parâmetros citados, também foi avaliada a modificação do estado dos grupos ionizáveis, antes e após tratamento enzimático, através de uma titulação potenciométrica.

Conforme ilustra a Figura 34, a curva de titulação potenciométrica obtida para o efluente sem tratamento apresentou um ponto de inflexão no intervalo de pH 4,5 a 5,5, portanto, exibindo duas inclinações, sendo a primeira delas (a) menos acentuada do que a segunda (b). A região da curva com inclinação mais acentuada (b) assinala uma variação mais brusca de pH, o que indica um maior número de grupamentos com pK em torno de 8. A região da curva (a) ilustra um número menor de espécies com pK em torno de 2. Estes valores de pK podem ser inferidos a partir do tratamento de Henderson-Hasselbach, que descreve o comportamento de grupamentos ionizáveis a partir da curva de titulação, conforme ilustra o item 4.4.1.

A titulação potenciométrica do efluente após tratamento da enzima imobilizada apresentou um perfil diferente. A região da curva (c) é mais inclinada que a segunda região da mesma (d). Essa mudança de perfil evidencia que o tratamento com a enzima uma modificação na natureza das espécies ionizáveis, onde as espécies com pK em torno de 2 tornaram-se em número maior, enquanto as espécies com pK em torno de 8 tiveram a sua quantidade reduzida. Possivelmente, as espécies com pK em torno de 8 e que sofreram depleção, sejam compostos fenólicos, e as espécies com pK em torno de 2 sejam ácidos carboxílicos.

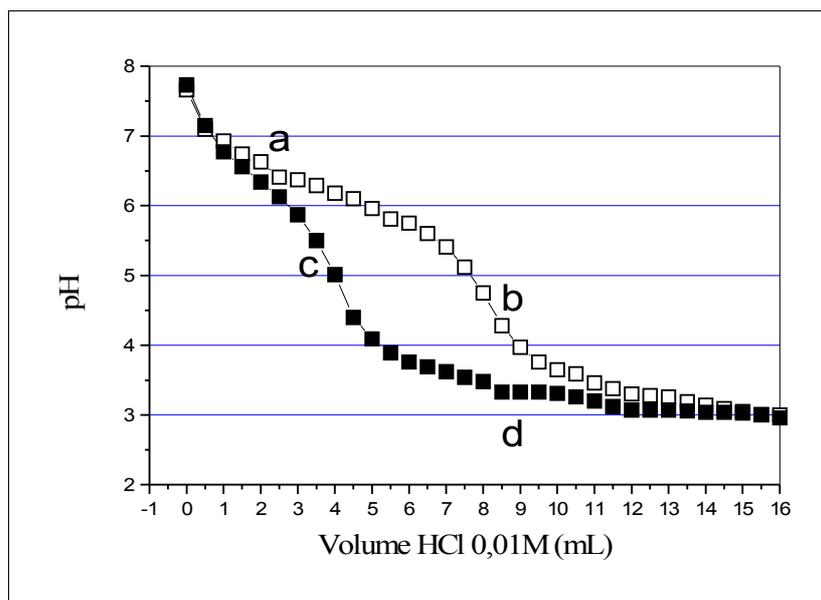
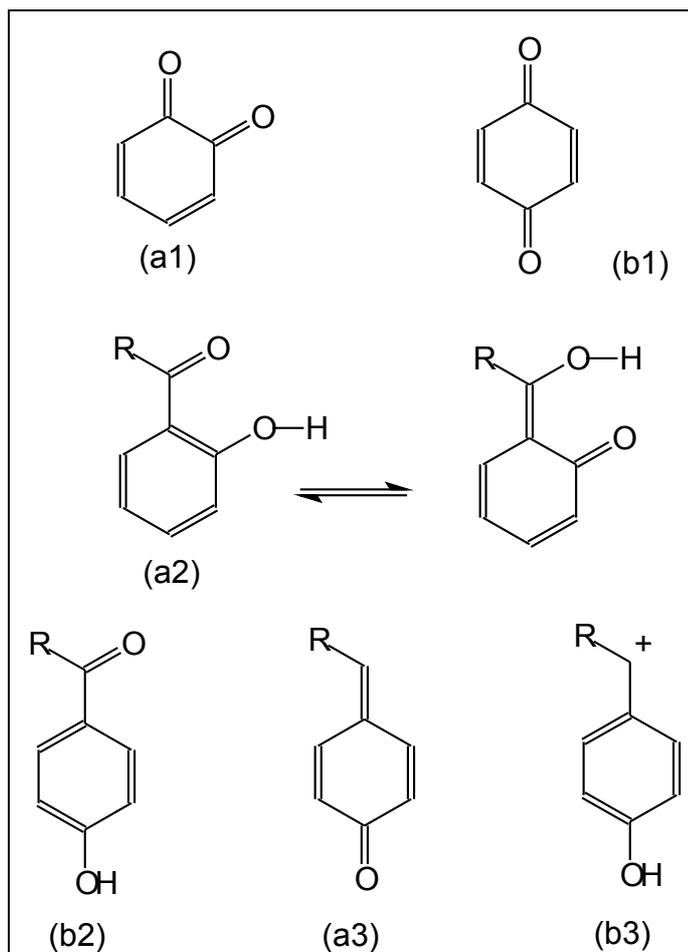


Figura 34: Curva de titulação potenciométrica do efluente antes e após incubação com a lacase imobilizada por 24 horas utilizando como titulante solução de HCl 0,01M. O (símbolo aberto) representa o efluente sem tratamento e o (símbolo fechado) após tratamento. Os pontos das curvas representam as médias de 3 repetições.

4.7.1- NATUREZA QUÍMICA DA COR DOS EFLUENTES, ANTES E APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO

A presença de várias estruturas cromóforas básicas na madeira vem sendo identificada. As três principais estruturas são: a) orto e para-quinonas [Esquema 4 (a1)(b1)]; b) orto-hidróxi e para-hidróxi-fenil cetonas [Esquema 4(a2)(b2)]; c) para-quinonas e íons carbânion [Esquema 4(a3)(b3)] (FLEURY e RAPSON, 1968). Além das estruturas citadas, outros compostos como polissacarídeos, íons metálicos e os extrativos da madeira podem contribuir para a cor da madeira e, conseqüentemente, dos efluentes das indústrias papeleiras.



Esquema 4: Principais estruturas cromóforas básicas identificadas na madeira

(FLEURY; RAPSON, 1968).

Para tentar identificar a fração das estruturas citadas e, conseqüentemente, a natureza da cor do efluente, várias reações utilizando agentes redutores vêm sendo empregadas. Dentre os agentes redutores mais utilizados, merecem destaque o íon ditionito e o íon borotetrahidreto que agem através de diferentes mecanismos, tornando-se mais seletivos para uma determinada estrutura cromófora do que para outra. O ditionito age reduzindo as frações quinonas, enquanto o borotetrahidreto, por ser um agente redutor mais forte, age reduzindo as frações quinonas (Q) e também outros grupos carbonilas (C).

Considerando o exposto acima, foi realizado um experimento de determinação da natureza da cor do efluente, antes e após 24 horas de tratamento com a enzima imobilizada. Os experimentos foram conduzidos com ditionito de sódio e borotetrahidreto de sódio conforme citado no item 3.8.2.

Os resultados obtidos para esse experimento encontram-se ilustrados na Tabela 5. Analisando o quociente entre os valores de absorvância obtidos para o efluente quando tratado com borotetrahidreto, revelou a presença de estruturas (Q) e (C), e aquelas obtidas com o efluente tratado com ditionito revelou apenas as estruturas (Q), antes e após o tratamento enzimático, conforme ilustrado na Tabela 5, foi possível verificar que existe uma proporção menor de estruturas quinonas nos efluentes sem tratamento enzimático do que no efluente após o mesmo. Esses resultados podem ser explicados baseando-se no fato das lacases catalisarem a oxidação de estruturas fenólicas para dar origem a quinonas, conforme comentado no item 2.5.

Associando os resultados obtidos neste experimento com os de descoloração dos efluentes após tratamento enzimático, foi possível supor que os compostos carbonílicos são os maiores responsáveis pela cor dos efluentes sem o tratamento enzimático.

Em estudos realizados por Imsgard, Falkehag e Kringstad (1971) sobre a natureza da cor em ligninas de madeira - espécie de Pinus - demonstraram que estruturas o-quinonóides foram responsáveis por até 60% da absorção na região do visível em 457 nm. Vale a pena esclarecer que essa comparação é interessante, uma vez que a indústria papelreira cujo efluente foi estudado, utiliza principalmente a madeira de Pinus. Estes dados revelaram que a lignina estudada por esses autores e a lignina residual presente no efluente estudado neste trabalho apresentaram características totalmente distintas.

Tabela 5: Determinação da característica de cor do efluente, antes e após incubação com a lacase, imobilizada por 24 horas. O símbolo (Q)(C) representa a Abs obtida, indicativa da porção quinona e carbonila. O símbolo (Q) representa a Abs obtida, indicativa da porção quinona.

Compostos responsáveis pela cor do efluente	Abs (465 nm) do efluente sem tratamento enzimático	Abs (465 nm) do efluente após tratamento enzimático	$\frac{Abs(Q)}{Abs(Q)(C)}$
Quinonas (Q) e carbonilas (C)	0,041±0,009	0,013±0,006	0,585
Quinonas (Q)	0,024±0,004	0,009±0,002	0,692

4.8- AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS APÓS TRATAMENTO COM A ENZIMA IMOBILIZADA

Conforme citado anteriormente (item 2.2) e ilustrado pelo trabalho de caracterização de Kringstad e Mörck (1983), os efluentes possuem uma série de compostos fenólicos de baixa MM. Considerando isso, esse experimento teve como objetivo avaliar a capacidade da enzima imobilizada para a biodegradar alguns compostos fenólicos sabidamente presentes no efluente e que possuem comprovada toxicidade.

Através dos espectros UV obtidos dos compostos fenólicos, antes e após tratamento enzimático (Figura 35 e Tabela 6), foi possível observar que a enzima imobilizada foi capaz de oxidar de forma eficiente a maior parte dos compostos fenólicos estudados. O guaiacol foi mais resistente à oxidação pela enzima com uma taxa de remoção de 21,72%, enquanto os demais compostos foram removidos com taxas de 80,51 a 100% (Tabela 6). Esse resultado evidencia que o aumento de substituintes no anel aromático diminui a estabilização do anel por ressonância e facilita a remoção do elétron catalisada pela enzima. Essa afirmação pode

ser confirmada pelo estudo de Farnet e colaboradores (2004). Esses autores observaram que o aumento de substituintes clorados no anel aromático de compostos fenólicos foi proporcional ao aumento de reatividade dos mesmos frente à lacase purificada de *Marasmius quercophilus*.

Segundo Lante e colaboradores (2000), os compostos dimetóxfenol, 2,4-diclorofenol e α -naftol, foram os menos resistentes à oxidação, com faixas de remoção de 69–56%. Em contraste, ácido clorogênico, 3-metóxfenol, fenol e β -naftol, foram mais resistentes e mostrando valores de oxidação de 7 a 18%.

Os valores de remoção obtidos para os compostos fenólicos, exceto para o guaiacol, corroboram com os resultados observados por D'annibale e colaboradores (1999). Esses autores observaram que compostos fenólicos orto substituídos são menos resistentes a reações de oxidação que compostos meta-substituídos.

A diferença dos valores de remoção obtidos para o guaiacol e o pirocatecol (ambos orto substituídos) deve-se possivelmente, à natureza do grupo substituinte associada ao mecanismo de ação das lacases.

O guaiacol é um composto que possui em sua estrutura um grupo OCH_3 , o qual, por sua vez, é considerado um substituinte eletrodoador. Os substituintes eletrodoadores atuam cedendo elétrons para o anel aromático, o que diminui a acidez do composto fenólico, devido ao maior compartilhamento dos elétrons do oxigênio da hidroxila. Dessa forma, a remoção do elétron torna-se dificultada, tornando o composto mais resistente à reação de oxidação.

Em contrapartida, o pirocatecol é um composto que possui em sua estrutura um grupo OH . O grupo OH é considerado um substituinte eletroatraente, ou seja, torna o composto fenólico mais ácido, permitindo, conseqüentemente, a retirada mais fácil do elétron do oxigênio da hidroxila para formação do radical fenox.

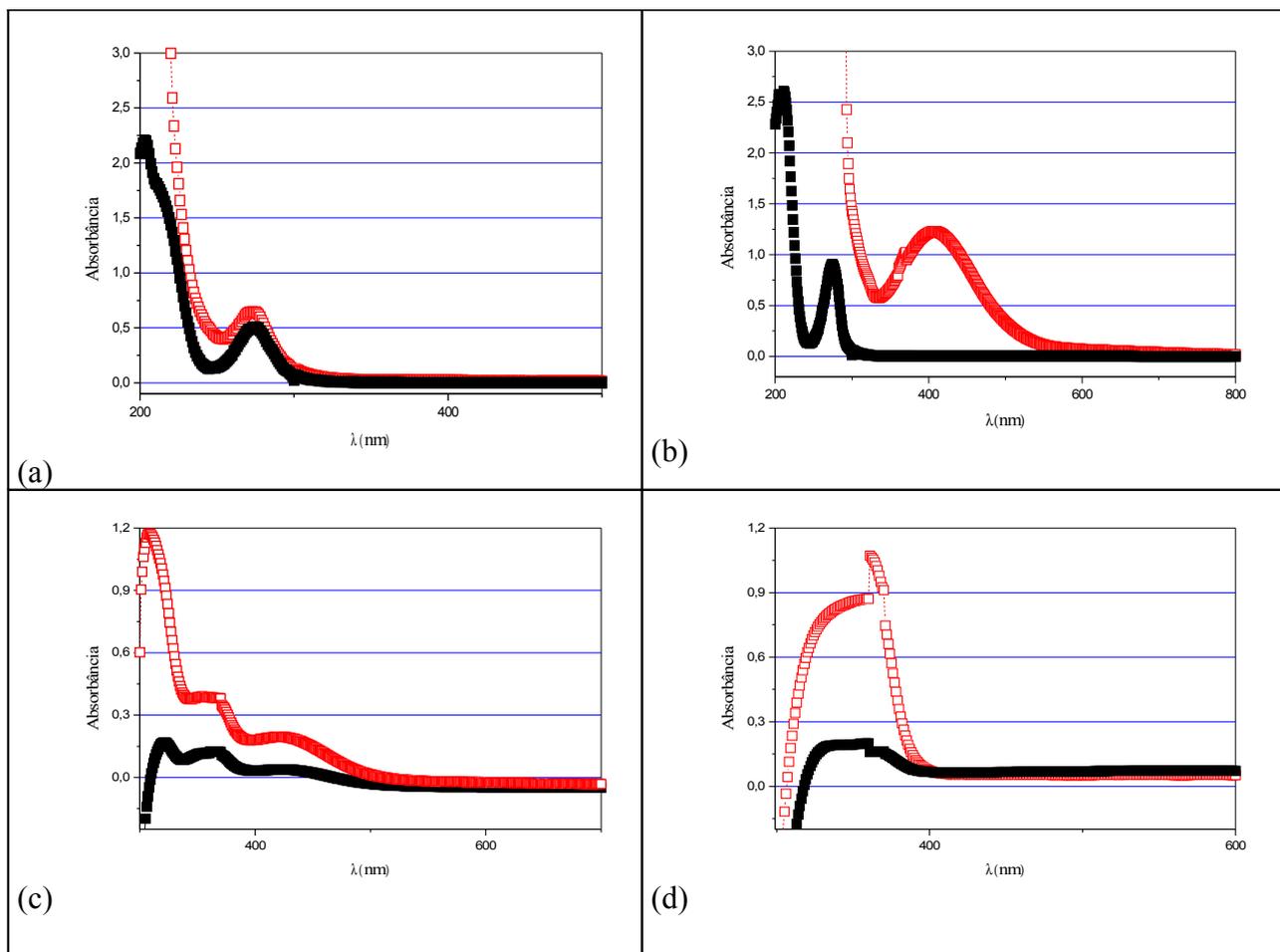
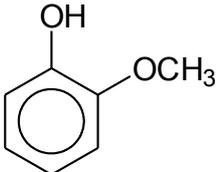
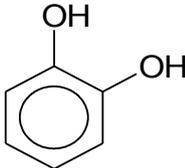
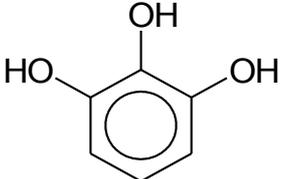
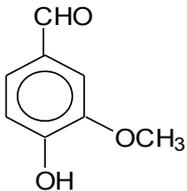


Figura 35: Espectros UV antes (símbolo aberto) e após 24 horas (símbolo fechado) de incubação da lacase imobilizada com soluções de (a) guaiacol, (b) pirocatecol, (c) pirogalol e (d) vanilina.

Tabela 6: Porcentagens de remoção do guaiacol, pirocatecol, pirogalol e vanilina após 24 horas de incubação com a lacase imobilizada.

SUBSTÂNCIA	ESTRUTURA QUÍMICA	λ (nm)	REDUÇÃO APÓS TRATAMENTO ENZIMÁTICO (%)
Guaiacol		275	21,72
Pirocatecol		405	100
Pirogalol		308 421	95,90 80,51
Vanilina		361	85,05

5-CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1) A caracterização da quitosana utilizada para confeccionar as esferas, revelou que a mesma obteve uma $MM_m=83,8$ Kda, $GD=72,5\%$ e uma área superficial de $4,86$ m²/g. Se comparados com a literatura, os resultados obtidos revelaram que a quitosana utilizada possuiu valores dentro da faixa de valores encontrados na literatura e utilizados para promover imobilização enzimática.

2) A caracterização dos parâmetros geométricos das esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído, revelou que os valores de porosidade e raio médio diminuíram à medida que a concentração de glutaraldeído aumentou. Esse comportamento deveu-se, possivelmente, ao aumento do número de grupos aldeídos na superfície do polímero, o que provocou o aumento de ligações imino entre os próprios grupos amino do polímero.

3) A concentração de glutaraldeído utilizada para ativar as esferas de quitosana, e que promoveu maior estabilidade da enzima imobilizada frente aos parâmetros de pH alcalino, temperatura de 50°C e estabilidade, após período de estocagem de dez dias, foi de 3%.

4) Quanto aos ensaios de estabilidade da lacase livre e imobilizada em relação a condições e meios desnaturantes, revelaram que a enzima imobilizada em esferas de quitosana foi significativamente mais estável em relação a tais condições se comparada com a enzima livre. Esses resultados indicam que o uso dessa enzima imobilizada apresenta-se como uma ótima metodologia para um grande número de processos industriais que normalmente envolvem reações em condições menos brandas de temperatura e pH.

5) A enzima imobilizada também foi significativamente mais estável frente a diversas concentrações de solventes de diferentes características estruturais e hidrofóbicas. Esses resultados confirmam outras aplicações para as lacases, como seu uso na biotransformação de xenobióticos em meios orgânicos.

6) Apesar dos bons resultados de estabilidade relacionados a outros parâmetros, o processo de imobilização acarretou pouca estabilidade operacional à lacase. Este foi considerado um ponto negativo do processo de imobilização realizado neste trabalho, pois o uso efetivo dos processos enzimáticos somente será mais econômico se a enzima puder ser reutilizada.

7) A enzima imobilizada foi capaz de biotransformar com muita eficiência compostos fenólicos de baixa MM, compostos fenólicos totais e a cor do efluente em estudo. Estes dados são indicativos do uso potencial desta enzima para compor novas tecnologias para o tratamento dos efluentes das indústrias papeleiras.

6.0-RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Devido às limitações de tempo, não foram realizados alguns experimentos que poderiam auxiliar no esclarecimento de determinados comportamentos observados e conseqüentemente fornecer maior validade ao trabalho. Portanto, sugerem-se como objeto de estudo para trabalhos futuros os seguintes itens:

- 1) Realizar testes de rendimento de imobilização, conforme ilustra o trabalho de Araújo e colaboradores (2005), para avaliar se as esferas de quitosana possuem a capacidade de adsorver fisicamente e de forma significativa o substrato, interferindo na medida de atividade enzimática.
- 2) Realizar a otimização do processo de imobilização, levando-se em consideração, não apenas, as propriedades de estabilidade da enzima imobilizada frente à enzima livre, mas as propriedades de reuso da mesma.
- 3) Realizar medidas de atividade enzimática e proteínas totais na água de “lavagem” das esferas com a enzima imobilizada e utilizada nos testes de reuso, para avaliar se existe perda de enzima durante o processo de reuso.
- 4) Avaliar a influência da força iônica do meio sobre a estabilidade operacional da enzima imobilizada, pois segundo Zanin e Moraes (2004), a estabilidade operacional de enzimas imobilizadas em suportes catiônicos e aniônicos é fortemente influenciada pela força iônica, sendo que os melhores resultados de estabilidade foram obtidos quando se utilizou soluções com força iônica inferior a 0,01 M.
- 5) Utilizar outros tipos de reatores, que possam evitar ou minimizar a possível “lixiviação” da enzima das esferas de quitosana e conseqüentemente aumentar a estabilidade operacional da mesma.

7.0-REFERENCIAS

ABDEL-NABY, M. et al. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. **Process Biochemistry**, New York, v.34, p.391-398, 1999.

ADAMIEC, J., MODRZEJEWSKA, Z. Sorptivity and structural characteristics of spray-dried chitosan microparticles. In: **Proceedings of the 14th International Drying Symposium**. São Paulo, Brazil, 22-25 August 2004, vol B, p. 1510-1517.

ADRIANO, W.S. et al. Stabilization of penicilium g acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brasilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.22, p.529-538, 2005.

ALEXANDRE, G. et al. Population dynamics of a motile and a non-motile *Azospirillum liposferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, New York, v.19, p.271-278, 1996.

ALI, M., SREEKRISHNAN, T.R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. **Advances in Environmental Research**, New York, v.5, p.175-196, 2001.

ALSARRA, I.A. et al. Molecular weight and degree of deacetylation effects on lipase-loaded chitosan bead characteristics. **Biomaterials**, New York, v.23, p.3637-3644, 2002.

ANDER, P.; ERIKSSON, K. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, Paris, v.109, p.1-8, 1976.

AMAT, A.M. et al. Solar photo-catalysis to remove paper mill wastewater pollutants. **Solar Energy**, New York, v.79, p.393-401, 2005.

AMORIM, R.V.S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, New York, v.89, p.35-39, 2003.

APHA AWWA. Standard Methods for examination of water and wastewater 550B, 17th edition. American Public Health Association, New York, 1989.

- AQUINO, S. Caracterização da DQO efluente de sistemas de tratamento biológico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, São Paulo, v.8, p.135-144, 2003.
- ARAÚJO, J.H.B. et al. A comparative study on fungal laccases immobilized on chitosan. *Brazilian Archives of biology and technology*, São Paulo, v.48, p.1-6, 2005.
- BELL, G., JANSSEN, A.E.M., HALLING, P. Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 20, p.471-477, 1996.
- BERGAMASCO, R. et al. Characterization of free and immobilized invertase regarding activity and energy of activation. **Brasilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v.17, p.4-7, 2000.
- BLANCO, R.M. et al. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization characterization of the support and the catalysts. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, New York, v.30, p.83-93, 2004.
- BLUN, L. **Kraft Pulp Production**. Environmental Defence Fund, 1996. Disponível em <<http://www.rfu.org/KraftPulp.htm>>. Acesso em: 11 janeiro 2006.
- BOURBONNAIS, R., PAICE, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates-An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEMS Microbiology Ecology**, London, v.1, p.99-102, 1990.
- BOURBONNAIS, R. et al. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) on Kraft lignin depolymerization. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.61, p.1876-1880, 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- BRESSLER, D.C., FEDORAK, P.M., PICKARD, M.A. Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by laccase of *Corioliopsis gallica*. **Biotechnology Letters**, New York, v. 22, p. 1119-1125, 2000.
- BROUSSIGNAC, J. Un hault polymere naturel per connum dans l'industrie le chitosan, **Chimie et Industrie-Genie Chimique**, Paris, v.99, p.1241-1249, 1972.

CAMARERO, S. et al. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v.35, p.113-120, 2005.

CASA, R. et al. Reduction of the phenolic components on olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum Desf.*) germinability. **Chemosphere**, London, v.50, p.959-966, 2003.

CASTRO, H.F. **Processos químicos industriais II** apostila 4, 2001, faculdade de engenharia química de Lorena.

CASTRO, A.I.R.P, EVTUGUIN, D.V.,XAVIER, A.M.B. Degradation of biphenyl lignin model compounds by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and heteropolyanion [SiW₁₁VO₄₀]⁵⁻. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, New York, v.22, p.13-20, 2003.

CETINUS, S.A., ÖZTOP, H.N. Immobilization of catalase on chitosan film. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v.26, p.497-501, 2000.

CETINUS, S.A., ÖZTOP, H.N. Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v.32, p.889-894, 2003.

CHAGAS, E.P., DURRANT, L.R., Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v.29, p.473-477, 2001.

CHIBATA, I. **Immobilized enzymes**. New York, Interscience Publishers, 1972.

CHIOU, S., WU, W. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, New York, v.25, p.197-204, 2004.

CHO, N. et al. Effect of coniferyl alcohol addition on removal of chlorophenols from water effluent by fungal laccase. **Journal of Wood Science**, Tokyo, v.45, p.174-178, 1999.

COLE, J.L. et al. Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an X-ray absorption Edge Study. **Journal American Chemical Society**, U.S.A., v.112, p.2243-2249, 1990.

COSTA, R., **Meio ambiente, preocupação das pesquisas com papel**. Portal da Unicamp.

Disponível em <www.unicamp.br/unicamp/divulgacao/BDNP/NP_392/NP_392.html>
Acesso em 15 de julho de 2004.

CRESSEWELL, P.; SANDERSON, A.R.; Preparation, properties and substrate exclusion effects of an insoluble pronase derivate. **Biochemistry Journal**, New York, v.119, p.447-451, 1970.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in polymer science**, New York, v.30, p.38-70, 2005.

DALANOY, G., LI, Q., YU, J. Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, London, v.35, p.89-95, 2005.

D'ANNIBALE, A. et al. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. **Process Biochemistry**, New York, v.34, p.697-706, 1999.

D'ANNIBALE, A. et al. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. **Journal of Biotechnology**, New York, v.77, p.265-273, 2000.

DELANOY, G., LI, Q., YU, J. Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, London, v.35, p.89-95, 2005.

DEON, A. M. **Medição do custo das perdas associadas ao processo produtivo de fabricação de celulose e papel**. 2001.112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DODOR, D.E., HWANG, H., EKUNWE, S.I.N. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v. 4, p. 1-8, 2004.

DUARTE, M.L. et al. Determination of the degree of acetylation of chitin materials by ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. **Biological Macromolecules**, New York, v.28, p. 359-363, 2001.

DURÁN, N., ROSA, M.A., D'ANNIBALE, A., GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, p.907-931, 2002.

DUARTE, M.L. et al. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR espectroscopy. **Internatioal Journal of Biological Macromolecules**, London, v.31, p.1-8, 2002.

EDENS, W.A. et al. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gauemannomyces graminis* var. tritici. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.65, p.3071-3073, 1999.

FARNET A. et al. Purification of laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.34, p.549-554, 2004.

FAURE, D., BOUILLANT, M.L., BALLY, R. isolation of *azospirillum lipoferum* 4t tn5 mutants affexted in melanization and laccase activity. **Applied Environmental Microbiology**, New York, v.60, p.3413-3415,1994.

FLEURY, R.A.; RAPSON, W.H. Characterization of chromophoric groups in groundwood and lignin model compounds by reaction with specific reducing agents. **Pulp and paper magazine of canada**, Montreal, v.67, p.62-68,1968.

FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, New York , v.54, p.681-686, 2001.

FREIRE, R.S. et al. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, São Paulo, v.23, p.504-511, 2000.

FURLAN, L. **Adsorção de corantes reativos e fotossensíveis por aminopolissacarídeos naturais**. 1997.Tese (Doutorado em química)-Universidade Federal de Santa Catarina-Florianópolis.

GOLDSTEIN, L., LEVIN, Y., KATCHALSKI, E. A water-insoluble polycationic derivave of Trypsin. II. Effect of the polyelectrolyte carrier on the kinetc behavior of the bound Trypsin. **Biochemistry**, New York, v.3, p.1913-1919, 1964.

GONÇALVEZ, L.R.B. **Estudo do processo de produção de etanol a partir de amido liquefeito, usando enzima e microrganismo coimobilizados em gel de pectina**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GOY, R.C.; ASSIS, O.B.G.; CAMPANA-FILHO, S.P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Brasileira de Biotecnologia**, São Paulo, v.33, p.30-34, 2004.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, New York, v.13, p.125-135, 1994.

HEINZKILL, M. et al. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (*Family Coprinacea*). **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.64, p.1601-1606, 1998.

HERNAIZ, M.J.; CROUT, D.H.G. Immobilization/ etabilization on Eupergit C of the beta-galactosidase from *B. circulans* and alfa-galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbiol Technology**, New York, v.27, p.26-32, 2000.

HUBLIK, G., SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.27, p.330-336, 2000.

HUNG, T. et al. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, New York, v.26, p.69-78, 2003.

IMSGARD, F.; FALKEHAG, S.I.; KRINGSTAD, P. On possible chromophoric structures in spruce wood. **Tappi**, Taiwan, v.54, p.1680-1684, 1971.

KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annals Reviews Microbiology**, London, v. 41, p.465-505, 1987.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan- based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.35, p.126-139, 2004.

KRINGSTAD, K.P.; MÖRCK, R. ¹³C NMR spectra of kraft lignins. **Holzforschung**, Germany, v.37, p.237-244, 1983.

JESUS, P.C. "Enzimas imobilizadas em Crisotila e Organo-Gel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos", Tese. 1998. 125f. (Doutorado em química)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JIANG, D. et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, New York, v.25, p.15-23, 2005.

JUANG, R., SHAO, H. Effect of pH on competitive adsorption of Cu(II), Ni(II) and Zn(II) from water onto chitosan beads. **Adsorption**, New York, v.8, p.71-78, 2002.

JÚNIOR, O.A.C.M. **Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana**. 1999. 113f. Tese (Doutorado em química) - Universidade Estadual de Campinas - Campinas.

LANTE, A. et al. Biodegradation of phenols by laccase immobilized in a membrane reactor. **Process Biochemistry**, New York, v.36, p.51-58, 2000.

LAVERTU, M. et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v.32, p.1149-1158, 2003.

LEATHAN, G.F., STAHMANN, M.A., Studies on the laccase EC-1.10.3.2 of *Lentinus edodes*: Specificity, localization and association with the development of fruiting-bodies. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v.125, p. 147-158, 1981.

LEONOWICZ, A., BOLLAG, J.M. Laccases in soil and the feasibility of their extraction. **Soil Biological Biochemistry**, New York, v.19, p.237-242, 1987.

LEONTIEVSKY, A.A. et al. Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, London, v.156, p. 9-14, 1997.

LIN, H. et al. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.31, p.588-592, 2002.

LORA, E.E.S., "**Prevenção e controle da poluição nos setores energético, industrial e de transporte**", Aneel - Agência Nacional de energia elétrica, Brasília- DF, 2000.

MARTINO, A. et al. Immobilization of beta-glucosidase from a commercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. **Process Biochemistry**, New York, v.31, p.281-285, 1996.

MATHUR, N.K., NARANG, C.K. Chitin and Chitosan, versatile polysaccharides from Marine Animals. **Journal of Chemical Education**, New York, n.11, v.67, (1990) p. 938-942.

MAYER, A.M. Polyphenol oxidases in plants-recent progress. **Phytochemistry**, London, v.26 p.11-20 (1987).

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, London, v.60 p.551-565 (2002).

MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**. Embrapa. Jaguariúna SP, p.278-279, 1997.

MILSTEIN, O., NICKLAS, B., HÜTTERMANN, A. Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v.31, p.70-74, 1989.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.W.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**. Padronização, preparação e purificação. Ed. Edgard Blüchner Ltda, São Paulo, SP, p.627,1995.

MORRISON, Robert; BOYD, Robert. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

MUNARI, F.M.; GAIO, T.A.; DILLON, A.J.P. Cinética da secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papeleira. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis. Anais. Florianópolis, 2003. 1 CD-ROM.

MUÑOZ, I. et al. Environmental assessment of different advanced oxidation processes applied to a bleaching Kraft mill effluent. **Chemosphere**, London, v.62, p.9-16, 2005.

MURUGESAN, G.S.; ANGAYARKANNI, J.; SWAMINATHAN, K. Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea. **Food chemistry**, New York, v.79, p.411-417, 2002.

NODA, T., FURUTA, S., SUDA, I. Sweet potato beta-amylase immobilized on chitosan beads and its application in the semi-continuous production of maltose. **Carbohydrate polymers**, New York, v.44, p.189-195, 2001.

OYRTON, A.C., MONTEIRO, Jr., AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal Biological Macromolecules**, New York, v.26, 119-128, 1999.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Laccase-mediated Remazol Blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. **Biotechnology Progress**, London, v.21, p.1436-1441, 2005.

PERALTA-ZAMORA, P. et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Applied catalysis B: Environmental**, New York, v.42, p.131-144, 2003.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **Journal of Biological Chemistry**, U.S.A., v. 277, p.37663-37669, 2002.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; LE DUNG, P. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal Biological Macromolecules**, New York, v.15, p. 281–285, 1993.

RODRIGUES, D.S. et al. Imobilização covalente da Lipase de *Candida antarctica B* em quitosana-glioxil. . In: **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife. **Anais**. Recife. UFPE, 2005. 1 CD-ROM.

ROGALSKI, J. et al. Immobilized of laccase from *Phlebia radiata* on controlled porosity glass. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, New York, v.95, p.99-108, 1995.

ROGALSKI, J. et al. Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, New York, v.6, p.29-39, 1999.

ROSATTO, S.S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, São Paulo, v.24, p.77-86, 2001.

SAKURAGAWA, A.; TANAI, T.; OKUTANI, T. Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase to chitosan beads. **Analytica Chimica Acta**, Paris, v.374, p.191-200, 1998.

SANDFORD, P.A.; HUTCHINGS, G.P. **Chitosan-a natural cationic biopolymer: commercial applications. Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/ Proper Relations and Applications**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987.

SANTOS, J.E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros**, São Paulo, v.13, p.8-12, 2003.

SERVILLI, M. et al. A novel method for removing phenols from grape must. **American Journal of Enology and Viticulture**, U.S.A, v.51, p.357-361,2000.

SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Biological Macromoléculas**, New York, v.18, p.237-242, 1996.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrometria de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1994.

SISO, M.I.G. et al. Enzyme encapsulation on chitosan microbeads. **Process Biochemistry**, New York, v.32, p.211-216, 1997.

SKAUGRUD, O. et al. Biomedical and Pharmaceutical Applications of alginate and chitosan. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, New York, v.16, p.23-41, 1998.

SOARES, C.H.L., DURÁN, N. Degradation of low and high molecular mass fractions of Kraft E1 effluent by *Trametes villosa*. **Environmental Technology**, New York, v. 19, p.883-891,1998.

SOARES, C.H.L. **Estudos mecanísticos da degradação de efluentes de indústrias de papel e celulose por fungos Basidiomicetos degradadores de madeira**. 1998. 133f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

SOLOMON E.J., SUNDARAN, U.M., MACHONKIN, T.E. Multicopper oxidase and oxygenases. **Chemical Reviews**, U.S.A., v. 96, p.2563-2605, 1996.

SUGUMARAN, M. et al. Studies on the enzyme involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. **Archives Insect biochemistry Physiological**, Paris, v.19, p.271-283, 1992.

SUNDARAN, U.M. et al. Spectroscopic investigation of peroxide binding to the trinuclear copper cluster site in laccase: correlation with the peroxy-level intermediate and relevance to catalysis. **Journal American Chemical Society**, New York, v.119, p.12525-12540, 1997

TAN, C.S., KHOR, E., TAN, T.K, WONG, S.M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination, **Talanta**, New York, v.45, p.713-719, 1998.

TEIXEIRA, V.G.; COUTINHO, F.M.B.; GOMES, A.S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, São Paulo, v.24, p.808-818, 2001.

THARANATHAN, R.N; KITTUR, F.S. Chitin-The undisputed biomolecule of Great potencial, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v1, p.61-87, 2003.

THOMPSON, G. et al. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. **Bioresource Technology**, New York, v.77, p.275-286, 2001.

TUOMELA, M. et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, New York, v.72, p.169-183, 2000.

VILLELA, S.M.; SOARES, C.H.L. Uso de enzimas lignolíticas na biodegradação de efluentes de indústrias de papel e celulose. In: **XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**. Recife. **Anais**. Recife. UFPE, 2005. 1 CD-ROM.

WANG, S., CHIO, S. Reversible immobilization of chitinase via coupling to reversibly soluble polymer. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.22, p.634-640, 1998.

YANG, R.D.; HUMPHREY, A.E. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. **Biotechnology Bioengineering**, New York, v.17, p.1211-1235, 1975.

YANG, Y.M., WANG, J.W., TAN, R.X. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-SiO₂ gel. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.34, p.126-131, 2004.

ZANIN, Gisella M.; MORAES, Flávio. Faria. Enzimas imobilizadas. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.35-85, 2004.

ANEXO A - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

Em tubos de ensaio foram adicionadas as soluções descritas na Tabela 7. As soluções resultantes foram agitadas vigorosamente e submetidas à leitura com auxílio de um espectrofotômetro GBC-UV em 595 nm após 5 minutos de repouso. A curva de calibração obtida está ilustrada na Figura 36.

ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Em um tubo de ensaio foi adicionado 50 μL de amostra e 2,5 mL de corante. A solução resultante foi submetida à leitura em 595 nm.

Tabela 7: Soluções para determinação da curva padrão de proteínas.

Tubos	Concentração (μg)	Albumina (μL)	H ₂ O (μL)	Comassie Blue (mL)
1	0	0	50	2,5
2	5	5	45	2,5
3	10	10	40	2,5
4	20	20	30	2,5
5	30	30	20	2,5
6	40	40	10	2,5
7	50	50	0	2,5

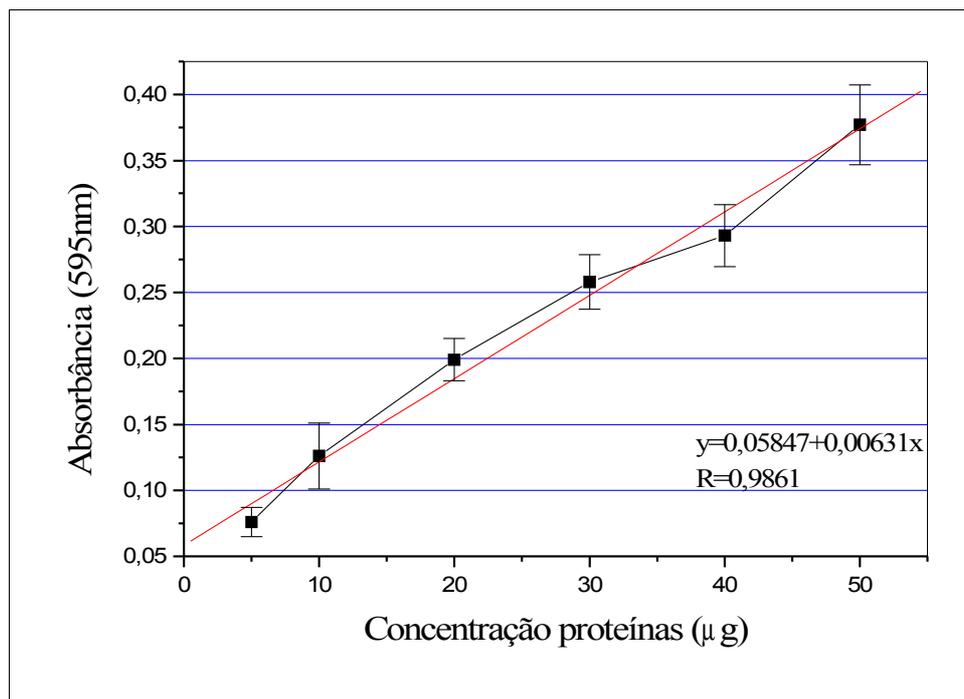


Figura 36: Curva de calibração para determinação de proteínas totais utilizando soluções com diferentes concentrações de proteína padrão (albumina bovina).

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Para o preparo da solução de Comassie Blue foi dissolvido 100 mg do corante em 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%. Logo após, a solução resultante foi diluída para 1 litro e filtrada em funil de Büchner.

Para o preparo da solução-padrão de proteína (1 mg/mL) foi dissolvido 100 mg de albumina bovina em 100 mL de solução salina 0,15 M. A solução resultante foi armazenada em freezer (-20°C).

ANEXO B - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (MÉTODO FOLIN) E FENÓIS DE BAIXA MM (MÉTODO 4-AAP)

MÉTODO 4-AAP

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução de 33 mg/L de fenol. Logo após, através de várias diluições, foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 3,3, 1,65, 1,1 e 0,55 mg/L. A tubos de ensaio foram adicionados 1 mL de cada solução citada a 0,1 mL de solução $K_3Fe(CN)_6$ e 1 mL de 4-AAP. Em seguida, foi realizada a leitura de cada solução em espectrofotômetro a 505 nm, onde foi possível obter a curva de calibração ilustrada na Figura 37.

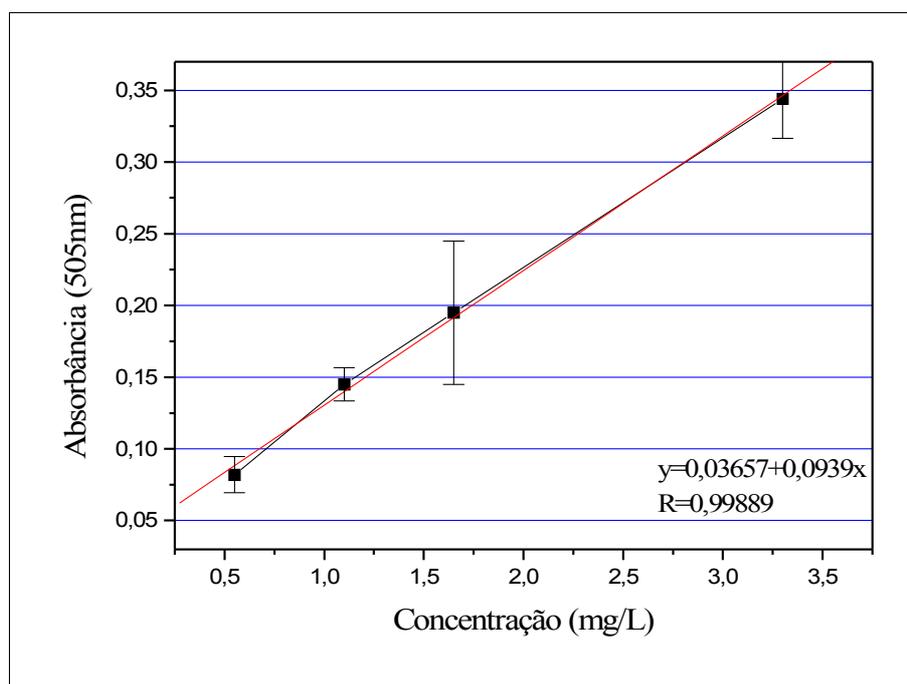


Figura 37: Curva de calibração para determinação de fenóis de baixa MM (método da 4-AAP) utilizando soluções com diferentes concentrações de fenol.

MÉTODO FOLIN

A curva de calibração foi preparada utilizando as mesmas soluções citadas no item anterior. No entanto, cada soluções (2,5 mL) foi adicionada a tubos de ensaio contendo 0,05 mL de reagente Folin e 0,5 mL de carbonato de sódio 15%. Logo após, as soluções foram incubadas em um Banho-Maria com temperatura de 37°C por 30 minutos. Em seguida foi realizada a leitura de cada solução no espectrofotômetro a 760 nm, onde foi possível obter a curva de calibração ilustrada na Figura 38.

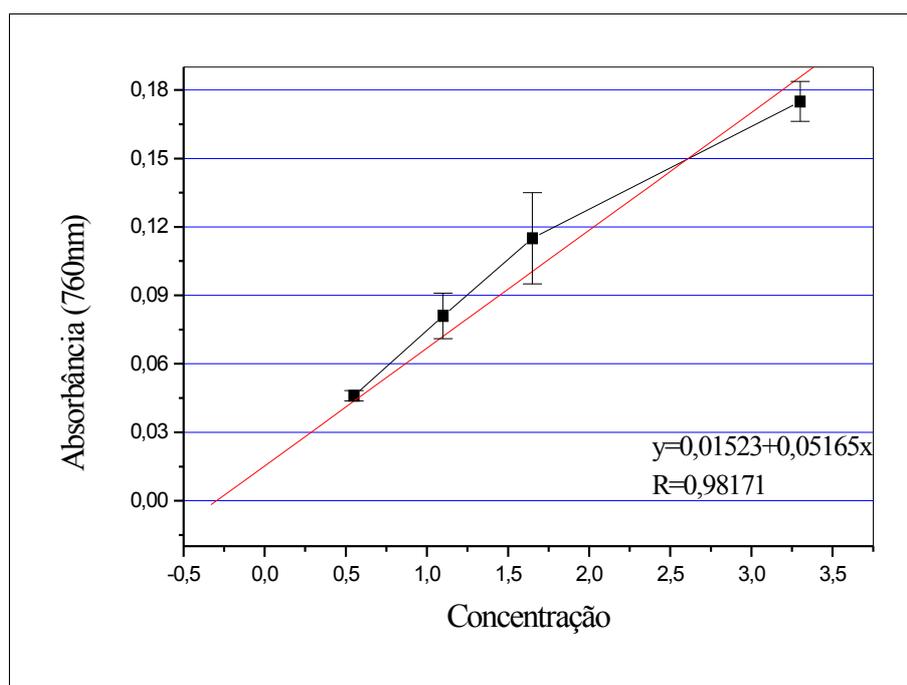


Figura 38: Curva de calibração para determinação de fenóis totais (método Folin) utilizando soluções com diferentes concentrações de fenol.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

- (A) Solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5%: 0,5 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 10 mL de solução tampão glicina 0,1 M pH=9,7.
- (B) Solução 4-AAP 0,25%: 0,25 g de 4-AAP em 100 mL de solução tampão glicina 0,1 M pH=9,7.
- (C) Tampão glicina 0,1 M: 1,875 g de glicina em 250 mL de água destilada.

ANEXO C: CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE DQO

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução de 765 mg ftalato potássio de hidrogênio (KHP), que equivale teoricamente a 900 mg de O₂/L. Logo após, através de várias diluições foram preparadas soluções com as seguintes concentrações: 700, 500, 200, 100 e 50 µg de O₂/L, que, posteriormente, foram adicionadas (2,5 mL) a tubos de borossilicato, juntamente à 3,5 mL de solução de H₂SO₄ e 1,5 mL de solução para a digestão. Logo após, os tubos foram fechados, levemente agitados e adicionados em um bloco de digestão a 150°C por 2 horas. Após o período de digestão, foi realizada a leitura de cada solução no espectrofotômetro a 600 nm, onde foi possível obter a curva de calibração ilustrada na Figura 39.

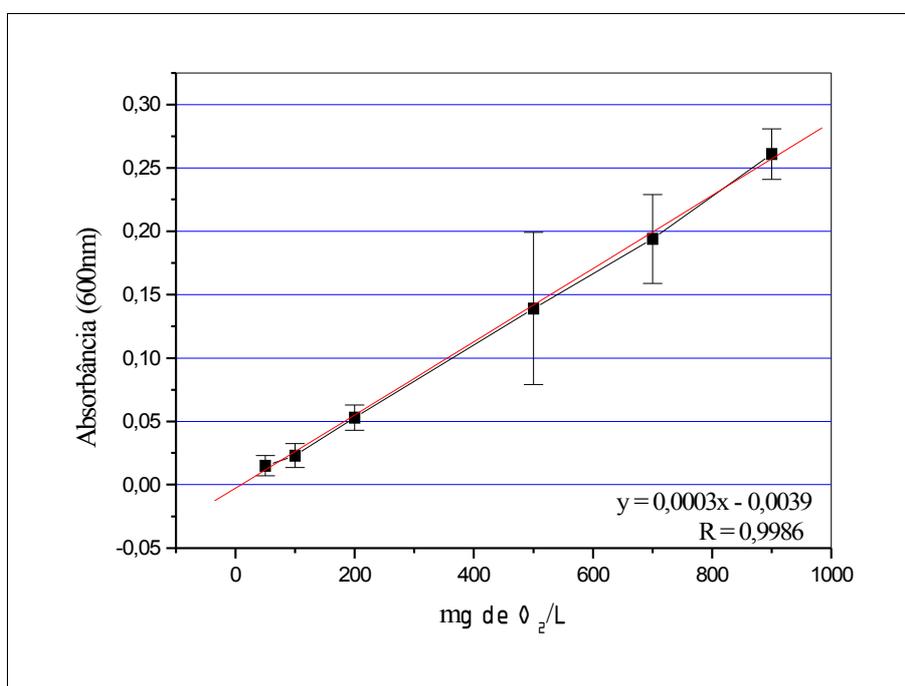


Figura 39: Curva de calibração para determinação de DQO utilizando soluções com diferentes concentrações de KHP.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

- A) Solução de Digestão: foi preparada com a adição de 500 mL de água destilada em 10 g de $K_2Cr_2O_7$ P.A. previamente seco a $103^\circ C$ por 2 horas. Em seguida, foi adicionado a esta solução 167 mL de H_2SO_4 concentrado e 33,3 g de $HgSO_4$. A solução resultante foi diluída para 1000 mL.
- B) Reagente de H_2SO_4 : foi adicionado Ag_2SO_4 em H_2SO_4 na razão 5,5 g de Ag_2SO_4 / Kg de H_2SO_4 . A solução resultante foi deixada em repouso durante dois dias até o uso.