



UNICAMP



1150060830



IQ

T/UNICAMP R71t

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**TRATAMENTO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA PAPELEIRA POR
PROCESSO COMBINADO QUÍMICO (OZONIZAÇÃO) E
ENZIMÁTICO (LACASE)**

TESE DE DOUTORADO

Maria Aparecida Rosa

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

CAMPINAS

março/2004

UNIDADE	<u>I Q</u>
Nº CHAMADA	<u>1101204</u>
	<u>R71t</u>
V	EX
TOMBO, BC/	<u>60832</u>
PROC.	<u>16-117-04</u>
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	<u>11,00</u>
DATA	<u>28-11-04</u>
Nº CPD	

Bib Id 332342

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R71t

Rosa, Maria Aparecida.

Tratamento de efluente de indústria papeleira por processo combinado químico (ozonização) e enzimático (lacase) / Maria Aparecida Rosa. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Efluente papeleiro. 2. Ozonização.
3. Processo enzimático. 4. Lacase. I. Caballero, Nelson Eduardo Durán. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

**“A verdadeira descoberta não consiste em divisar novas terras, mas em ver
com novos olhos.”**

Marcel Proust

À minha família,

dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Nelson Durán, pela dedicação, profissionalismo, estímulo, amizade e orientação competente no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Química Biológica: Márcia, Luciana, Edna, Lívia, Natália, Sandra, Ana Paula, Marcelo, Rosana, Patrícia, Priscila, Juliano, Renato, pelo apoio e amizade durante todos esses anos;

Ao Chico, pela ajuda técnica e amizade;

Aos professores e funcionários do Instituto de Química que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

A Dra. Rosângela Abakerli e a EMBRAPA Meio Ambiente, por terem concedido dois meses de afastamento das minhas funções para redação e defesa desta tese;

A FAPESP pelo apoio financeiro;

Muito obrigada.

RESUMO

“TRATAMENTO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA PAPELEIRA POR PROCESSO COMBINADO QUÍMICO (OZONIZAÇÃO) E ENZIMÁTICO (LACASE)”

Autor: Maria Aparecida Rosa

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Palavras-chave: efluente papelero; ozonização; processo enzimático; lacase; remediação.

Neste trabalho foi estudado um sistema que combina dois diferentes processos, químico e enzimático, visando o tratamento de efluente papelero Kraft E₁. O tratamento químico foi baseado na ozonização do efluente (POA-processo oxidativo avançado), enquanto que o enzimático utilizou a enzima lacase, produzida pelo fungo *Trametes versicolor*.

A caracterização do efluente Kraft E₁ foi realizada frente a vários parâmetros físico-químicos: fenóis totais, cor, carbono orgânico total (COT) e demanda química de oxigênio (DQO). A eficiência do tratamento por ozonização foi avaliada pela redução da toxicidade, cor, fenóis totais, COT e DQO do efluente. Resultados obtidos para redução de cor e fenóis totais foram de 65 e 50 % respectivamente, em 120 min de tratamento. Foram realizados estudos aplicando diferentes doses de ozônio e pH do efluente com o objetivo de aumentar a eficiência do processo, sendo que o melhor resultado obtido foi em pH 10 e concentração de 14 mg L⁻¹ de O₃.

No tratamento por processo enzimático, foi estudada a imobilização da enzima lacase em diferentes suportes, por métodos de imobilização química (ligações covalentes) e física (adsorção). A lacase foi imobilizada em montmorilonita KSF, por ligações covalentes e por adsorção, com 55 e 15 % de imobilização, respectivamente. Eupergit[®]C mostrou uma ótima capacidade de imobilização (100 %). Esta última, quando comparada com a enzima imobilizada em montmorilonita KSF apresentou grande superioridade, pela simplicidade no processo de imobilização e eficiência em vários ciclos, tendo sido utilizada para montagem do reator enzimático. O tratamento com a lacase imobilizada em Eupergit[®]C apresentou redução de fenóis totais de 35 %. O processo combinado ozonização/lacase imobilizada em Eupergit[®]C foi o que apresentou os melhores resultados para o tratamento do efluente Kraft E₁.

ABSTRACT

“COMBINED CHEMICAL (OZONE) AND ENZYMATIC (LACCASE) TREATMENT OF PAPER MILL EFFLUENT”

Author: Maria Aparecida Rosa

Supervisor: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Keywords: paper effluent; ozonation; enzymatic process; laccase; remediation.

The efficiency of combined chemical (ozone) and enzymatic (laccase) process in the treatment of Kraft E₁ mill effluent were studied. The reduction of total phenols, color, total organic carbon (TOC), chemical oxygen demand (COD) and the toxicity, were evaluated. For the chemical treatment an advanced oxidation process (POA) and in the biological process laccase, were used. Laccase was produced by the white-rot-fungi *Trametes versicolor*.

Different doses of ozone and pH of the effluent were studied. Treatment using pH 10 and concentration of 14 mg L⁻¹ of O₃ in 60 min, showed a total phenols and color removal of 50 and 65 %, respectively. The increase of pH as the reduction of ozone concentration influenced the kinetics properties of the process. The immobilization of the enzyme laccase in different supports for chemical (covalents bonds) and physics (adsorption) methods was studied. The laccase showed 55 and 15 % of chemical and physics immobilization in montmorillonite KSF, respectively. Eupergit®C showed 100 % of immobilization and have been used for assembling of the enzymatic reactor. The immobilized laccase in Eupergit®C treatment showed total phenols removal of 35 %. The combined process ozonio/laccase showed good results for the treatment of the Kraft E₁ effluent.

CURRICULUM VITAE

MARIA APARECIDA ROSA

Data de nascimento: 13/01/1967

Naturalidade: Campinas/SP

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química (1995 – 2000)

Instituto de Química - UNICAMP – Campinas/SP

Título da Dissertação: “Estudos envolvendo a modificação e a interação do Lapachol com compostos de metais de transição”.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Domingues Vargas - Área: Química Inorgânica

Licenciatura Plena em Química (1987 – 1991)

Instituto de Química – UNICAMP – Campinas/SP

Tecnologia de Alimentos (1982 – 1984)

Colégio Técnico de Campinas da UNICAMP - COTUCA - Campinas/SP

2. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Cargo: Técnico Nível Superior III (início Dez/2002)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA - Rodovia Campinas/Mogi Mirim, Km 127,5 - Jaguariúna/SP

Cargo: Especialista em Sistemas Laboratoriais I (Jan a Dez/1998)

Ministério da Agricultura e do Abastecimento – Laboratório Regional de Apoio Animal – LARA/SP – Rodovia Heitor Penteado, Km 3,5 - Campinas/SP

3. ATIVIDADES ACADÊMICAS

Artigos científicos

Assalin M.R., Rosa M.A., Durán N. Remediation Kraft Effluent by Ozonation: Effect of Applied Ozone Concentration and Initial pH. *Ozone Scie. & Eng.* (2003). No prelo.

Almeida, E., Assalin, M.R., Rosa, M.A., Duran, N. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. *Quim Nova* (2003). No prelo.

Assalin M.R., Almeida E.S., Rosa M.A., Moraes S.G. and Durán N. Application of Ozonation Process in Industrial Wastewaters: Textile, Kraft E₁ and Whey Effluents. *Environ. Technol.* (2003). Submetido.

Peralta-zamora P., Pereira C.M., Tiburtius E.R.L., Moraes S.G., Rosa M.A., Minussi R.C., Durán N. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Appl. Catalysis B: Environ.* **42**, 131-144 (2003).

Durán, N.; Rosa, M.A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, **31** (7), 907-931 (2002).

Camara C.A., Pinto A.C., Rosa M.A., Vargas M.D. Secondary amines and unexpected 1-aza-anthraquinones from 2-methoxylapachol. *Tetrahedron*, **57**, 9569-9574 (2001).

Trabalhos Completos Publicados em Anais/Proceedings de Congressos Nacionais/Internacionais

Rosa, M.A.; Assalin, M.R. e Durán, N. (2003). Remediação de Efluente Papeleiro Kraft E₁ por Ozônio: Avaliação da Toxicidade. I Fórum das Universidades Públicas Paulistas: Ciência e Tecnologia em Resíduos, de 18 a 20 de maio, São Pedro, SP.

Rosa, MA; Assalin, M.R., Durán, N. (2002). Tratamento Enzimático em Efluente Papeleiro Kraft E₁- Avaliação de Toxicidade. VI Símpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, de 01 a 05 de setembro, Vitória, ES.

Zanella L., Rosa M.A., Durán N. (2002). Produção e semi-purificação de lacase de *Trametes versicolor* por sistemas aquosos bifásicos., VII Símpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, 2 a 6 de dezembro, Maringá – PR.

Assalin, M.R.; Rosa, M.A; Zanella, L. e Durán, N. (2001) Biorremediação de Efluente Papeleiro: Tratamento Combinado Químico (Ozonização) x Biológico (Lacase) . I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, de 12 a 14 de novembro, São Paulo, SP.

Rosa M.A. e Durán N. (2001). Covalent Immobilized Laccase On Activated Montmorillonite Acting On Kraft E₁ Bleaching Effluent. Proc. 7th-Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, de 02 à 05 de Setembro, Belo Horizonte – M.G.

Resumos Publicados em Anais de Congressos Nacionais: 8

Resumos Publicados em Anais de Congressos Internacionais: 7

4. ATIVIDADES DIDÁTICAS

Auxiliar didático da graduação - Disciplina: Química Analítica Instrumental – QA 415
Programa de Estágio Docente – PED (2002). Carga horária semanal: 8 h

Professora de Química para o ensino médio

Período de 1999 a 2000 – Campinas/SP

Período de 1992 a 1995 – Cosmópolis/SP

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
ABREVIATURAS	xvii
GLOSSÁRIO	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Biotecnologia Ambiental	1
1.2 Tratamento de efluentes industriais	2
1.3 Indústrias papelarias	3
1.4 Contaminação ambiental por compostos fenólicos	7
1.5 Tratamento Químico	8
1.5.1 Ozonização	9
1.5.2 Aplicação de ozônio no tratamento de efluentes industriais	12
1.6 Tratamento Biológico	13
1.6.1 Lacase	14
1.6.2 Produção de lacase por fungo	17
1.6.3 Imobilização enzimática	18
1.6.4 Imobilização de lacase em diferentes suportes	21
1.6.4.1 Suporte sólido para imobilização enzimática	22
1.6.5 O potencial uso industrial da lacase	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivos específicos	26
3 PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1 Caracterização do efluente Kraft E ₁	27
3.2 Controle analítico	27

3.2.1 Determinação de pH	27
3.2.2 Determinação de cor a 465 nm	27
3.2.3 Determinação de DQO (Demanda Química de Oxigênio)	27
3.2.4 Determinação de COT (Carbono Orgânico Total)	28
3.2.5 Determinação de fenóis totais	28
3.3 Determinação de toxicidade	29
3.3.1 Ensaio de toxicidade com a alga <i>S. capricornutum</i>	29
3.3.2 Ensaio de toxicidade com o micro crustáceo <i>Artêmia salina</i>	29
3.4 Processo de ozonização	30
3.4.1 Produção e medida de ozônio	30
3.4.2 Tratamento de efluente papaleiro pelo processo de ozonização	30
3.5 Processo enzimático	31
3.5.1 Microorganismo	31
3.5.2 Meio de manutenção	31
3.5.3 Produção de lacase em meio líquido	31
3.5.4 Determinação de atividade enzimática da lacase livre	32
3.5.5 Imobilização de lacase (por adsorção) em montmorilonita KSF	33
3.5.6 Imobilização de lacase (covalentemente) em montmorilonita KSF (LIM)	33
3.5.7 Imobilização de lacase (covalentemente) em Eupergit®C (LIE)	34
3.5.8 Determinação da atividade da lacase imobilizada	35
3.5.9 Ensaio do reuso da lacase imobilizada	35
3.5.10 Ensaio de degradação de 2,4-diclorofenol por lacase livre e imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF	35
3.5.11 Tratamento de efluente Kraft E ₁ com lacase livre (LAC) e imobilizada em Eupergit®C (LIE)	36
3.5.12 Tratamento de efluente Kraft E ₁ com lacase imobilizada em Eupergit®C (LIE) em um reator enzimático	36
3.6 Processo combinado de tratamento de efluente Kraft E ₁ com ozonização e com lacase imobilizada em Eupergit®C (LIE)	37

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Efluente Kraft E ₁	38
4.1.1 Caracterização do efluente	38
4.2 Tratamento químico - ozonização	38
4.2.1 Ozonização em condições alcalinas	38
4.2.2 Influência do pH na eficiência da ozonização	41
4.2.3 Influência da dose de ozônio na eficiência da ozonização	44
4.2.4 Remoção de toxicidade por ozonização	46
4.3 Conclusões parciais	48
4.4 Tratamento enzimático	48
4.4.1 Produção de lacase	48
4.4.2 Estudos da Imobilização de lacase em suportes sólidos	50
4.4.3 Imobilização de lacase em montimorillonita KSF por ligações covalentes e por adsorção	51
4.4.4 Estudos comparativos entre imobilização de lacase (covalente) em Eupergit [®] C e montimorillonita KSF	52
4.4.5 Teste para reuso da lacase imobilizada	54
4.4.5.1 Reuso da lacase imobilizada covalentemente em montimorillonita KSF	54
4.4.5.2 Reuso da lacase imobilizada covalentemente em Eupergit [®] C	55
4.4.6 Degradação de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) por lacase livre (LAC) e imobilizada covalentemente em montimorillonita KSF (LIM) na presença e ausência de (HBT)	57
4.4.7 Tratamento de efluente Kraft E ₁ por lacase livre (LAC) e imobilizada em Eupergit [®] C (LIE A e B)	59
4.4.8 Reator enzimático - Tratamento de efluente Kraft E ₁ por lacase imobilizada em Eupergit [®] C (LIE A e B)	60
4.5 Tratamento de efluente Kraft E ₁ por processo combinado	61
4.5.1 Processo combinado ozonização e lacase imobilizada em Eupergit [®] C	61

4.5.2 Processo combinado lacase immobilizada em Eupergit®C e ozonização	62
5 CONCLUSÕES FINAIS	63
6 REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Organograma de classes de tratamento de efluentes.	3
Figura 1.2	Estrutura esquemática de um fragmento de lignina.	4
Figura 1.3	Exemplos de compostos organoclorados presentes nos efluentes das indústrias papelarias.	5
Figura 1.4	Geração de ozônio por efeito corona.	9
Figura 1.5	Representação esquemática do sítio ativo da lacase.	15
Figura 1.6	Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase.	15
Figura 1.7	Representação esquemática da oxidação de grupos fenólicos de lignina pela lacase.	16
Figura 1.8	Diferentes tipos de processos de imobilização: (a) métodos químicos; (b) métodos físicos.	19
Figura 1.9	Representação esquemática do método de aminoalquilação em imobilização enzimática.	21
Figura 1.10	Estrutura química do Eupergit®C.	23
Figura 3.1	Sistema empregado na ozonização do efluente Kraft E ₁	31
Figura 3.2	Reator enzimático para tratamento do efluente com a enzima imobilizada.	37
Figura 4.1	Consumo de ozônio ($\lambda = 258 \text{ nm}$) em efluente Kraft E ₁ em função do tempo de ozonização (pH 10; $C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).	39
Figura 4.2	Redução (%) da concentração de Cor, COT, Fenóis totais, DQO no processo de ozonização (pH 10; $C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$; $Abs_0 = 0,204$; $C_{0(COT)} = 1029 \text{ mg L}^{-1}$; $C_{0(\text{fenóis totais})} = 27 \text{ mg L}^{-1}$; $C_{0(DQO)} = 1860 \text{ mg L}^{-1}$).	40
Figura 4.3	Velocidade de remoção de fenóis totais em pH 10,0 e 12,0 ($C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).	41
Figura 4.4	Velocidade de remoção de COT em pH 10,0 e 12,0 ($C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).	42
Figura 4.5	Velocidade de descoloração em pH 10 e 12 ($C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).	43

Figura 4.6	Descoloração (%) do efluente ozonizado (pH 10) em diferentes doses de ozônio: 14 e 7 mg L ⁻¹ .	45
Figura 4.7	Redução (%) de fenóis totais do efluente ozonizado (pH 10) em diferentes doses de ozônio: 14 e 7 mg L ⁻¹ .	45
Figura 4.8	Redução (%) de COT do efluente ozonizado (pH 10) em diferentes doses de ozônio: 14 e 7 mg L ⁻¹ .	46
Figura 4.9	Porcentagem de inibição da taxa de crescimento da alga para várias diluições do efluente.	47
Figura 4.10	Atividade enzimática medida durante a produção de lacase pelo fungo <i>Trametes versicolor</i> . Amostras individuais de A à H.	49
Figura 4.11	Resultados de imobilização de lacase extrato bruto e semi-purificada em ambos os suportes montmorilonita KSF e Eupergit®C.	53
Figura 4.12	Reuso da lacase imobilizada em montmorilonita KSF (LIM) na presença de 2,6-Dimetoxifenol em oito ciclos.	55
Figura 4.13	Degradação de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) por lacase livre (LAC) e imobilizada em montmorilonita KSF (LIM) na presença e ausência de 1-hidroxibenzotriazol (HBT).	58
Figura 4.14	Redução (%) de fenóis totais (C_0 (fenóis totais) = 27 mg L ⁻¹) em efluente Kraft E ₁ por lacase livre (LAC 1000 U L ⁻¹) e imobilizada em Eupergit®C: LIE A (9 U g ⁻¹) e LIE B (100 U g ⁻¹).	59
Figura 4.15	Redução (%) da concentração de Cor, COT, Fenóis totais, no tratamento de efluente Kraft E ₁ com LIE (pH 5; Abs ₀ = 0,172; C_0 (COT) = 832 mg L ⁻¹ ; C_0 (fenóis totais) = 29 mg L ⁻¹).	60
Figura 4.16	Redução (%) da concentração de Fenóis totais, no tratamento combinado O ₃ /LIE (pH 5; C_0 (fenóis totais) = 26 mg L ⁻¹) em efluente Kraft E ₁ .	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Caracterização do Efluente Kraft E ₁ bruto. Faixa de valores para diferentes amostras coletadas.	38
Tabela 4.2	Consumo de ozônio em função do tempo de tratamento no efluente Kraft E ₁ .	40
Tabela 4.3	Resultados obtidos na produção do extrato bruto liofilizado de lacase.	49
Tabela 4.4	Resultados obtidos na imobilização da lacase em montmorilonita KSF por ligações covalentes e por adsorção.	51
Tabela 4.5	Imobilização de lacase em montmorilonita KSF e Eupergit®C.	52
Tabela 4.6	Resultados de atividade imobilizada de lacase extrato bruto em Eupergit®C.	56
Tabela 4.7	Resultados do reuso da lacase imobilizada em Eupergit®C.	57

ABREVIATURAS

APHA	American Public Health Association
COT	Carbono orgânico total
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
E^0	Potencial formal (V)
E_1	Efluente da fase de extração alcalina
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental Americana)
E_{ox}	Enzima na forma oxidada
E_{red}	Enzima na forma reduzida
ISO	International Organization for Standardization
POA	Processo oxidativo avançado
rpm	rotações por minuto
RSD	Relative Standard Deviation (desvio padrão relativo)
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Ultravioleta

GLOSSÁRIO

Contaminantes: substâncias que usualmente não causam danos de qualquer tipo, mas que estão presentes em concentrações maiores do que ocorrem naturalmente.

DBO: É a quantidade de oxigênio necessária para que microorganismos aeróbios mineralizem, sob determinadas condições, a matéria orgânica de uma amostra. É o parâmetro mais usual na medição de poluição orgânica aplicada às águas residuárias.

DQO: É a quantidade de oxigênio necessário para oxidar quimicamente a matéria orgânica de uma amostra.

Oxigênio dissolvido: Oxigênio necessário para a respiração de microorganismos aeróbios. É fundamental para se verificar e manter condições aeróbias em um curso de água que recebe material poluidor. Também é utilizado para controlar processos de aeração.

Poluentes: materiais ou substâncias químicas que causam efeitos adversos sobre qualquer organismo.

Toxicidade Aguda: Efeitos adversos que ocorrem em um curto período de tempo, após a exposição de um organismo a única dose de substância (poluente) ou depois de múltiplas doses em até 24 horas.

Toxicidade Crônica: Efeitos adversos que ocorrem em um organismo durante a maior parte de seu ciclo de vida.

Xenobióticos: compostos sintéticos freqüentemente introduzidos no ambiente em concentrações que causam efeitos indesejáveis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biotecnologia Ambiental

Embora exista uma preocupação universal em se evitar episódios de contaminação ambiental, estes eventos prejudiciais continuam acontecendo, principalmente porque grande parte dos processos produtivos são intrinsecamente poluentes. Ao longo das décadas, a atividade industrial tem produzido rejeitos gasosos, líquidos e sólidos nocivos ao meio ambiente. Dentro deste contexto, uma importante parcela do processo de contaminação pode ser atribuída a atividades das refinarias de petróleo, indústrias químicas, têxteis e papelarias. No entanto, não menos importante é a contribuição da atividade agrícola, dos esgotos sanitários e dos resíduos domésticos.

Com a evolução dos processos industriais e o conseqüente surgimento de inúmeros produtos que rapidamente tornaram-se de primeira necessidade, a atividade industrial adquiriu um caráter essencial na sociedade contemporânea. Embora a sua importância seja indiscutível, a atividade industrial costuma ser responsabilizada, e muitas vezes com justa razão, pelo fenômeno de contaminação ambiental, principalmente graças a dois fatores de extrema importância: a) o acúmulo de matérias-primas e insumos, que envolve sérios riscos de contaminação por transporte e disposição inadequada; e b) ineficiência dos processos de conversão, o que necessariamente implica a geração de resíduos.

Muitos estudos têm sido realizados buscando desenvolver tecnologias capazes de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes industriais, sendo que a aplicabilidade destes tipos de sistemas está subordinada ao desenvolvimento de processos modificados e ao estabelecimento de sistemas de reciclagem de efluentes, atividades que implicam em tecnologias evolutivas e ainda indisponíveis universalmente [Freire *et al.*, 2000a].

Um dos principais objetivos da biotecnologia ambiental é a prevenção da poluição por uso de sistemas de tratamento no final dos ciclos produtivos e/ou na recuperação de ambientes altamente contaminados. A biotecnologia ambiental pode operar em dois níveis;

- na diminuição da quantidade de produtos tóxicos produzidos ou na redução do nível de toxicidade dos resíduos através de modificação do tipo de processo industrial;
- diretamente no tratamento dos resíduos produzidos ou do ambiente poluído (por exemplo, no tratamento dos corpos d'água para onde são despejados os efluentes industriais).

1.2 Tratamento de efluentes industriais

Devido à extrema complexibilidade dos efluentes industriais, e a diversidade de compostos tóxicos que podem ser encontrados nos mesmos, cada estudo de viabilidade de tratamento deve ser realizado de maneira isolada. Isto é, os processos desenvolvidos devem ser direcionados a um tipo particular de efluente, já que não existem procedimentos padronizados que possam ser aplicados no tratamento de um grande número de efluentes. Em função disto, muitas alternativas têm sido estudadas. De maneira geral, procura-se uma alternativa que permita, não somente a remoção de substâncias contaminantes, mas a sua completa mineralização (processo pelo qual um composto é convertido em espécies inócuas como CO_2 , H_2O e outras formas inorgânicas). Na Figura 1.1 está esquematizado, de uma maneira geral, os principais métodos de tratamento de efluentes industriais [Freire *et al.*, 2000a].

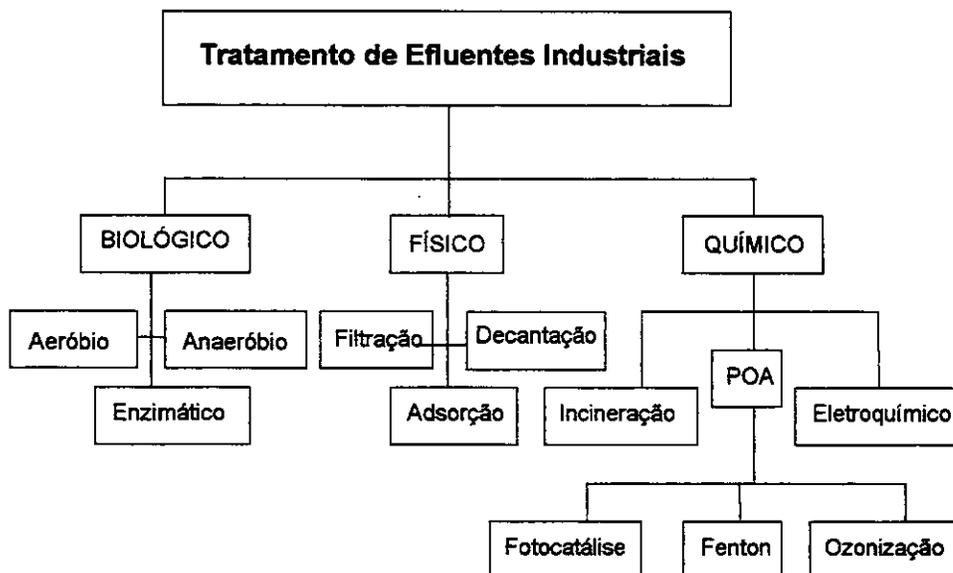


Figura 1.1 Organograma das principais classes de tratamento de efluentes.

1.3 Indústrias Papeleiras

A indústria de papel e celulose, representa atualmente um dos mais expressivos setores industriais do mundo. Historicamente, é uma das maiores consumidoras de recursos naturais (madeira, água) e energia (combustíveis fósseis, eletricidade), ocupando o terceiro lugar no mundo em consumo de água. O volume de água consumido depende do tipo de papel a ser produzido, podendo ser superior a 60 m³ por tonelada de papel, mesmo utilizando as mais modernas e eficientes técnicas para a produção do papel. Além de sua indiscutível importância econômica, as empresas de papel e celulose apresentam um elevado potencial de contaminação ambiental, não somente pela significativa descarga de poluentes no ambiente, mas também pelo elevado volume de efluente gerado (80 m³ de água/tonelada de polpa), o que implica num grande volume de efluente a ser tratado antes de seu lançamento nos corpos aquáticos receptores [Nakamura *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 2001].

A indústria papeleira tem uma grande importância para a economia da América do Sul devido a grande disponibilidade de recursos florestais. Brasil e Chile são os maiores produtores de celulose por área. No Brasil, utiliza-se preferencialmente madeira de *Eucalyptus grandis*, com uma produção ao redor de 6 milhões de toneladas de polpa por ano. Em ambos os países estimam-se duplicar a produção em um curto prazo [Mansilla *et al.*, 2001].

O processo de polpação predominante no mundo é o processo Kraft, o qual utiliza hidróxido de sódio (NaOH) e sulfeto de sódio (Na₂S) como agentes de cozimento da madeira. É capaz de remover aproximadamente 90 % da lignina presente na madeira. A lignina é um polímero natural, amorfo e altamente condensado, que representa entre 20 e 30 % em massa de madeira, constituído de fenóis (unidade principal), hemicelulose e pectina (que preenchem os espaços existentes entre as fibras de celulose e as células do tecido da madeira). A Figura 1.2 apresenta a estrutura esquemática de um fragmento de lignina [Leisola e Fiechter, 1985].

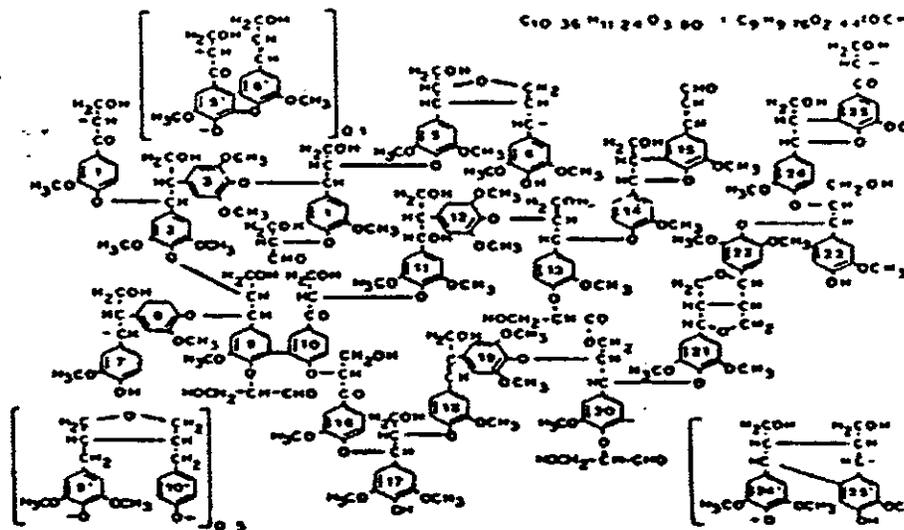


Figura 1.2 Estrutura esquemática de um fragmento de lignina.

Numa primeira etapa de produção de papel, durante o processo Kraft, ocorre a digestão das pastilhas de madeira com uma mistura de NaOH/Na₂S com o propósito de solubilizar a lignina. Em seguida, a lignina solubilizada é concentrada e queimada para gerar energia que será usada no mesmo processo de polpação. A polpa que se obtém neste processo é posteriormente oxigenada para continuar a deslignificação, alcançando teores ao redor de 2 a 3 % de lignina residual. Numa segunda etapa, durante o processo de branqueio em que se utiliza uma mistura de cloro e dióxido de cloro, formam-se fenóis clorados (como clorofenóis e cloroligninas) por reação da lignina residual, que está quimicamente ligada à celulose. A quantidade do volume de efluente gerado na seqüência de branqueio é muito menor (ao redor de 10 m³/ton polpa), porém é nesta etapa que se formam os compostos de maior periculosidade. Compostos de baixo peso molecular são freqüentemente encontrados nos efluentes de branqueio de celulose, sendo descritos na literatura como bio-acumuláveis, tóxicos e com alto potencial carcinogênico [Solomon, 1996; Mansilla *et al.*, 2001]. A Figura 1.3 apresenta alguns exemplos de compostos organoclorados presentes nos efluentes das indústrias papeleiras [Freire *et al.*, 2000b].

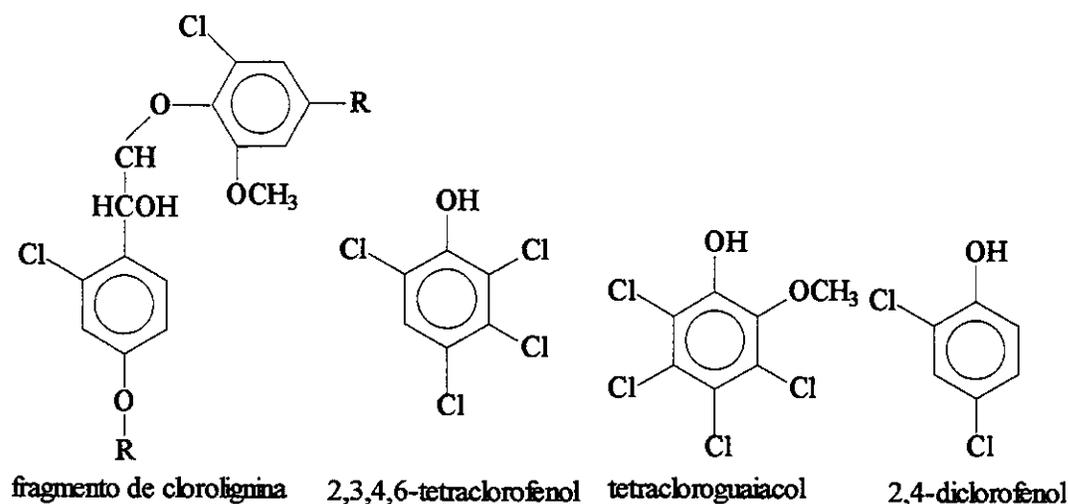


Figura 1.3 Exemplos de compostos organoclorados presentes nos efluentes das indústrias papeleiras.

A toxicidade associada aos efluentes industriais está intimamente relacionada com a presença de compostos recalcitrantes que não são biodegradados pelos organismos normalmente presentes em sistemas biológicos de tratamento, nos usuais tempos de retenção hidráulica aplicados, sendo então lançados nos corpos aquáticos receptores [Peralta-Zamora *et al.*, 1997; Von Gunten, 2003]. Devido ao efeito de acumulação, podem atingir concentrações superiores à dose letal de alguns organismos, como invertebrados e peixes, levando à ocorrência de morte. Além disso, os efeitos carcinogênicos e mutagênicos eventualmente podem ser observados em humanos como resultado da bioacumulação ao longo da cadeia alimentar [Alvarez *et al.*, 2001].

Os sistemas convencionais de tratamento de efluentes de uma planta de celulose constam de um processo primário (flotação com ar, floculação e sedimentação) e outro secundário (lagoas aeradas e lodos ativados), que se apresentam, em geral, bastante eficientes na remoção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO). No entanto, se a carga de compostos organoclorados na etapa de branqueio for muito alta, os processos secundários de branqueio podem colapsar para uma baixa biodegradabilidade da matéria orgânica dissolvida, em especial se o efluente contém ligninas cloradas de alta massa molecular. Pode-se chegar a inativar e inclusive destruir a flora microbiana, devido à alta toxicidade do substrato. Parte deste problema tem sido resolvido com a incorporação de novas seqüências de branqueio, como a utilização de dióxido de cloro ao invés de cloro molecular (processo ECF, do inglês, elementary chlorine free) ou ausência total de compostos de cloro (processo TCF, do inglês, total chlorine free). Porém, estes processos não eliminam totalmente o impacto ambiental das descargas líquidas. Outra opção consiste no uso de processos totalmente livres de efluentes (TEF, do inglês, total effluent free), o de ciclo fechado, onde a maior parte da água é reciclada no próprio processo. Neste caso, é imperativo tratar a água com um processo eficiente que permita seu reuso [Mansilla *et al.*, 2001].

1.4 Contaminação ambiental por compostos fenólicos

Um número considerável de poluentes orgânicos, que se encontram largamente distribuídos no meio ambiente, possuem estruturas fenólicas [Nistor *et al.*, 1999]. Os compostos fenólicos constituem-se numa das classes de compostos orgânicos de maior relevância, pois estes compostos despertam interesse sob vários pontos de vista, tais como: 1) clínico e farmacológico – vários neurotransmissores e medicamentos possuem estruturas fenólicas; 2) alimentício – alguns derivados fenólicos são responsáveis pelas propriedades organolépticas de muitas frutas e flores e influem na qualidade de, por exemplo, azeite e bebidas (principalmente sucos e vinhos); 3) industrial – esta classe de composto é empregada nos processos de produção de plásticos, corantes, desinfetantes, resinas, polímeros sintéticos, pesticidas, papel, etc.; 4) ambiental – os produtos de degradação de muitos pesticidas e as atividades industriais acima descritas são responsáveis por um elevado grau de contaminação ambiental de solos e corpos d'água pelos compostos fenólicos [Svitel e Miertus, 1998; Rossato *et al.*, 2001].

Uma grande variedade de compostos orgânicos é gerada durante os processos industriais, muitas dos quais são recalcitrantes aos processos de tratamento de efluentes normalmente utilizados pelas indústrias. O tipo e a abundância dos compostos fenólicos gerados variam em função do processo industrial em particular [Prahacs *et al.*, 1996; Reyes *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2001].

A contaminação por fenóis merece destaque, uma vez que fenóis substituídos, como cloro, alquil e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos [Campanella *et al.*, 1993; Ortega *et al.*, 1994; Russell e Burton, 1999]. Mesmo em pequenas concentrações ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$), os compostos fenólicos afetam o gosto e odor de águas potáveis e peixes. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram na pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de toxicidade e mutagenicidade, além de afetarem as velocidades de reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese e apresentarem

propensão para bioacumulação [Parker *et al.*, 1993; Campanella *et al.*, 1993; Russell e Burton, 1999]. Metabólitos de cloroguaiacóis têm sido detectados na bile de peixes que vivem em regiões próximas a indústria de papel e celulose [Schnell *et al.*, 2000].

Deste modo, os fenóis e especialmente seus derivados clorados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a alta toxicidade e persistência no ambiente e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da Comissão Européia [Vicent, 1991] e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana) [EPA, 1980/1984]. A diretiva 80/778 da Comunidade Econômica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para fenóis individuais [Puig *et al.*, 1996]. O Instituto Norte-Americano para Saúde e Segurança Ocupacional estabeleceu como limite de exposição à concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para fenol e, por exemplo, $2,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para isômeros de cresol [Vilchez *et al.*, 1996].

1.5 Tratamento químico

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) englobam uma série de tecnologias emergentes, algumas delas recentes outras resgatadas de conhecimentos de domínio público, extremamente competitivas no cenário ambiental, que têm sido aplicadas com sucesso na descontaminação *in situ* de solos, na desinfecção de água, na remoção de cor e de contaminantes orgânicos e inorgânicos em efluentes industriais, na esterilização de ar, além de uma vasta gama de aplicações na destruição de passivos e ativos ambientais. Os procedimentos utilizados em tecnologias oxidativas são baseados na geração de intermediários altamente reativos que iniciam uma seqüência de reações, resultando na destruição e remoção de poluentes orgânicos [Chiron *et al.*, 2000]. Ozônio e os processos oxidativos avançados (POA) relacionados tais como O_3/UV , $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$; O_3/TiO_2 têm servido de alternativa para o tratamento de efluentes industriais que contenham compostos recalcitrantes, tais como os organoclorados,

mostrando-se bastante eficazes no processo de descontaminação ambiental [Masten e Davis, 1994; Freire *et al.*, 2000a].

1.5.1 Ozonização

O ozônio é capaz de reagir com uma numerosa classe de compostos orgânicos, devido, principalmente, ao seu elevado potencial de oxidação ($E^0 = 2,08 \text{ V}$) superior ao de compostos reconhecidamente oxidantes, como H_2O_2 e o próprio cloro [Kunz *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2001]. Devido à instabilidade do ozônio, aproximadamente 3 segundos na fase gasosa, (o que impede sua armazenagem), torna-se necessário sua geração *in situ*.

O ozônio pode ser produzido por três diferentes técnicas: exposição do O_2 à luz ultravioleta, eletrólise do ácido perclórico e descarga eletroquímica [Balakrishnan *et al.*, 2002]. Dentre os diferentes processos de produção apresentados, o que utiliza descarga elétrica, também conhecido por efeito corona (Figura 1.4), é o mais utilizado pela maioria dos ozonizadores comerciais, principalmente pelo fato de se obter uma maior taxa de conversão do oxigênio, resultando numa maior concentração de ozônio. Neste método, o ozônio é gerado pela passagem de ar ou oxigênio puro entre dois eletrodos submetidos a uma elevada diferença de potencial (aproximadamente 10 KV), conforme equações 1 e 2. O rendimento deste processo varia entre 1 e 4 % (m/m) e entre 6 e 14 % (m/m) para sistemas alimentados por ar ou oxigênio puro, respectivamente [Lin e Yeh, 1993; Kunz *et al.*, 1999; Balakrishnan *et al.*, 2002].

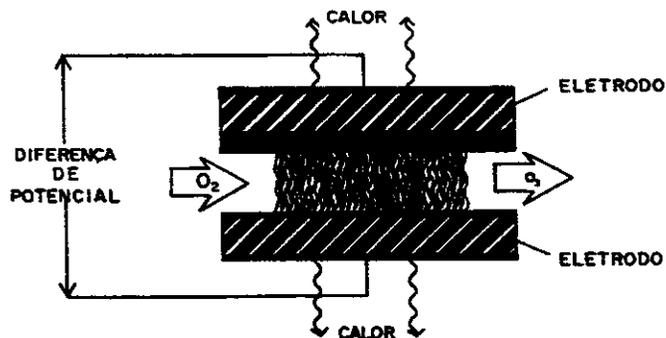
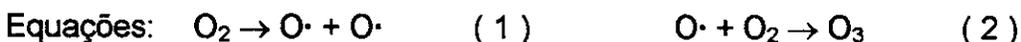
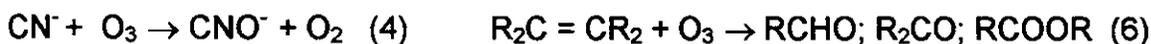


Figura 1.4 Geração de ozônio por efeito corona [Lin e Yeh, 1993].



A decomposição do ozônio em águas naturais é caracterizada por uma rápida diminuição da concentração inicial do ozônio seguida de uma segunda fase na qual a concentração de ozônio diminui seguindo uma cinética de primeira ordem, sendo que o principal produto de decomposição do ozônio é o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). O ozônio pode reagir via dois mecanismos: reação direta (adição eletrofílica ou cicloadição) e reação indireta (via radical livre $\text{HO}\cdot$) [Masten e Davis, 1994; Von Gunten, 2003].

Reação direta: ozônio reage com moléculas orgânicas ou inorgânicas, por adição eletrofílica. Alguns exemplos de reações por oxidação direta são mostrados nas equações: 3, 4, 5 e 6 [Freire *et al.*, 2000a].



Onde R = radical alquila ou H

Reação indireta: reação do ozônio, via radical livre $\text{HO}\cdot$ resultantes das reações de decomposição do ozônio representadas nas equações (7) (8) (9) e (10) [Freire *et al.*, 2000a].



A estabilidade do ozônio no meio depende de diversos fatores, dentre eles o pH merece especial atenção, uma vez que os íons hidroxila iniciam o processo de decomposição do ozônio, como mostrado nas equações 9 e 10 [Freire *et al.*, 2000a; Von Gunten, 2003]. Desta maneira, a oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos durante a ozonização pode ocorrer via ozônio (reação direta - predominante em pH ácido) ou radical hidroxila (reação indireta - predominante em pH alcalino), embora na prática haja contribuição dos dois mecanismos. A reação direta, (ataque eletrofílico pelo ozônio molecular) é atribuída a compostos que contêm ligações do tipo C=C, grupos funcionais específicos como (OH, CH₃ OCH₃) e átomos que apresentam densidade de carga negativa como N, P, O e S. A reação indireta é não seletiva sendo capaz de promover um ataque a compostos orgânicos 10⁶-10⁹ vezes mais rápido que conhecidos agentes oxidantes como o H₂O₂ e o próprio O₃, verificado pelo alto potencial de oxidação do radical hidroxila ($E^\circ \cong 3,06 \text{ V}$) presente na reação indireta [Arslan *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2001]. Entretanto, cada uma das espécies oxidantes assume diferentes graus de importância, em função da aplicação específica do ozônio. Enquanto processos de desinfecção ocorrem predominantemente via ozônio molecular, processos de oxidação podem ocorrer por meio de ambos os agentes oxidantes, ozônio e radical hidroxila [Masten e Davis, 1994; Von Gunten, 2003].

Os avanços nos sistemas de geração de ozônio têm diminuído a energia requerida para sua produção resultando numa considerável redução nos custos envolvidos para sua aplicação, o que vêm tornando a utilização deste processo bastante atrativa [Freire *et al.*, 2001].

Além da ozonização via ozônio molecular e via radical hidroxila, outras possibilidades de aplicação de ozônio na remediação de efluentes, como ozonização catalítica e nanocatálise heterogênea, estão disponíveis na literatura. Também, ozônio combinado com luz ultra-violeta (O₃/UV), com peróxido de hidrogênio (O₃/H₂O₂) ou uma combinação destes (O₃/UV/H₂O₂), além de O₃/ultrasom, O₃/TiO₂ que apresentam resultados efetivos na remediação de alguns efluentes industriais [Freire *et al.*, 2001; Balcioglu e Arslan, 2001].

1.5.2 Aplicação de ozônio no tratamento de efluentes industriais

A aplicação do processo de ozonização na remediação do efluente papelero tem se mostrado bastante eficiente em descoloração, remoção de toxicidade e aumento da biodegradabilidade [Chiou *et al.*, 1995; Freire *et al.*, 2000 Nishijima *et al.*, 2003].

Diversos processos oxidativos avançados foram aplicados na degradação dos compostos orgânicos presentes em efluente papelero de maneira a obter a maior eficiência e o menor custo [Perez *et al.*, 2002]. Dentre os processos estudados, o ozônio foi bastante efetivo mas relativamente caro, porém, quando associado a outro POA (utilização de luz ultravioleta) foi possível reduzir o custo operacional em 25 %. Por exemplo, para a degradação de fenol, um dos componentes mais tóxicos presentes no efluente papelero, o ozônio foi o processo que apresentou o menor custo, comparado aos outros POA [Esplugas *et al.*, 2002].

Radetski *et al.* (2002), observaram 80 % de redução de cor (medidos a 523 nm) e aproximadamente 87 % de redução de DQO para o efluente têxtil ozonizado em pH 10. Além disso, a ozonização foi capaz de reduzir os efeitos fitotóxicos, provavelmente devido à oxidação da fração orgânica tóxica presente no efluente.

Kunz *et al.* (2002), aplicaram ozônio na degradação de três corantes reativos (R-5, R-19 e R-21) utilizados na indústria têxtil, em dois diferentes valores de pH, 7 e 11. A influência do pH de ozonização foi mais significativa para o corante R-5. Este corante é pertencente ao grupo azo, cuja estrutura química é bastante resistente à degradação. A descoloração, bem como a redução de carbono orgânico total (COT), para este corante é mais efetiva em pH 11. A ozonização conseguiu reduzir a toxicidade para o corante R-19, não apresentou alteração para o corante R-5 e para o R-21, a toxicidade foi aumentada, principalmente para a ozonização realizada em pH 7.

Freire *et al.* (2001), aplicaram ozônio para o tratamento de efluente papelero em pH 3 e 11 enfocando principalmente a redução de COT, fenóis totais

e cor. Verificaram que a descoloração do efluente em pH 11 foi 1,8 vezes mais rápida que em pH 3. Além disso a redução de fenóis totais em pH 11 foi de 90 % enquanto que em pH 3 foi de 40 %, após 90 minutos de tratamento. A toxicidade aguda foi reduzida para ambos os tratamentos, sendo que o tratamento realizado em pH 11 foi mais efetivo.

Freire *et al.* (2000b), estudaram o uso da ozonização no tratamento de efluente papaleiro Kraft E₁. A eficiência do tratamento foi analisada por parâmetros químicos típicos: COT, fenóis totais, distribuição de massa molar e redução da toxicidade aguda em efluente tratado (determinada usando *Escherichia coli*). Testes de toxicidade são importantes quando o processo de ozonização é empregado, principalmente porque compostos tóxicos podem ser gerados durante um tratamento com ozônio [Langlais *et al.*, 1992; Gagnon *et al.*, 1997]. O efluente tratado apresentou descoloração e redução de fenóis totais e uma dose pequena e econômica de ozônio mostrou-se efetiva na redução da toxicidade, supondo-se que a redução de fenóis totais foi o principal responsável pelo decréscimo na toxicidade aguda.

Dentre os métodos químicos, os processos oxidativos são os mais comumente usados para descoloração, devido a sua simplicidade de aplicação. A ozonização de um efluente textil é bastante eficiente na redução de cor e DQO, tornando-se aceitável para despejo em águas do meio ambiente. Este método mostra uma preferência para moléculas de corante com ligações duplas. Uma das vantagens é que o ozônio pode ser aplicado no estado gasoso e com isto, não aumenta o volume de água residual e lodo [Robinson *et al.*, 2001].

1.6 Tratamento biológico - Enzimas

Os tratamentos de efluentes baseados em processos biológicos são os mais freqüentemente utilizados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente, transformando compostos orgânicos tóxicos em CO₂ e H₂O (ou CO₂ e CH₄), com custos relativamente baixos. A capacidade de certos microrganismos para degradar substâncias orgânicas tóxicas é um fato bem

documentado [Buitrón e Gonzáles, 1996]. Em essência, o tratamento biológico fundamenta-se na utilização dos compostos tóxicos de interesse como substrato para o crescimento e a manutenção de microrganismos. A principal aplicação deste tipo de processo está orientada na remoção da matéria orgânica presente nos rejeitos industriais, usualmente medida na forma de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) ou carbono orgânico total (COT) [Subramani et al., 1995].

Os processos enzimáticos correspondem a uma das mais recentes tecnologias para o tratamento biológico de efluentes. Muitos esforços têm sido feitos para avaliar as possibilidades oferecidas pelas enzimas em biotecnologia e aplicações ambientais [Karam e Nicell, 1997; Gianfreda e Bollag, 2002; Durán et al., 2002].

1.6.1 Lacase

Lacase é uma cuproproteína do pequeno grupo de enzimas chamadas cupro-proteínas azuis, cuprooxidases azuis ou ainda apenas oxidases azuis [Thurston, 1994]. As lacases geralmente apresentam quatro átomos de cobre circunvizinhos, os quais estão distribuídos entre diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos: cobre tipo 1, 2 e 3 diferenciados por possuírem propriedades características específicas que os permitem desempenhar papel importante no mecanismo catalítico da enzima. Na Figura 1.5 é apresentada a estrutura do sítio ativo da lacase [Malmstrom et al., 1975; Yaropolov et al., 1994; Mcmillin e Eggleston, 1997]. Segundo Call e Mücke (1997), os cobres tipo 1 e 2 estão envolvidos na captura e transferência de elétrons e os cobres tipo 2 e 3 em ligações com o oxigênio. Na Figura 1.6 é apresentado o esquema do ciclo catalítico da lacase [Durán et al., 2002].

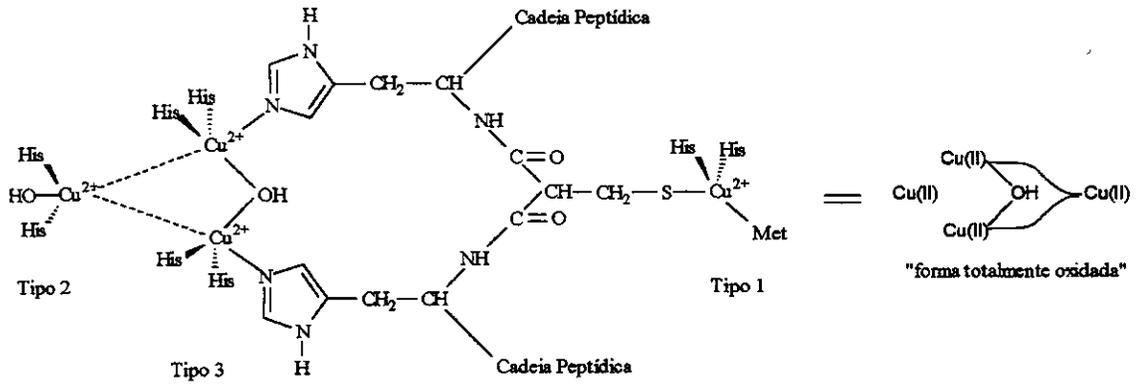


Figura 1.5 Representação esquemática do sítio ativo da lacase [Durán *et al.*, 2002].

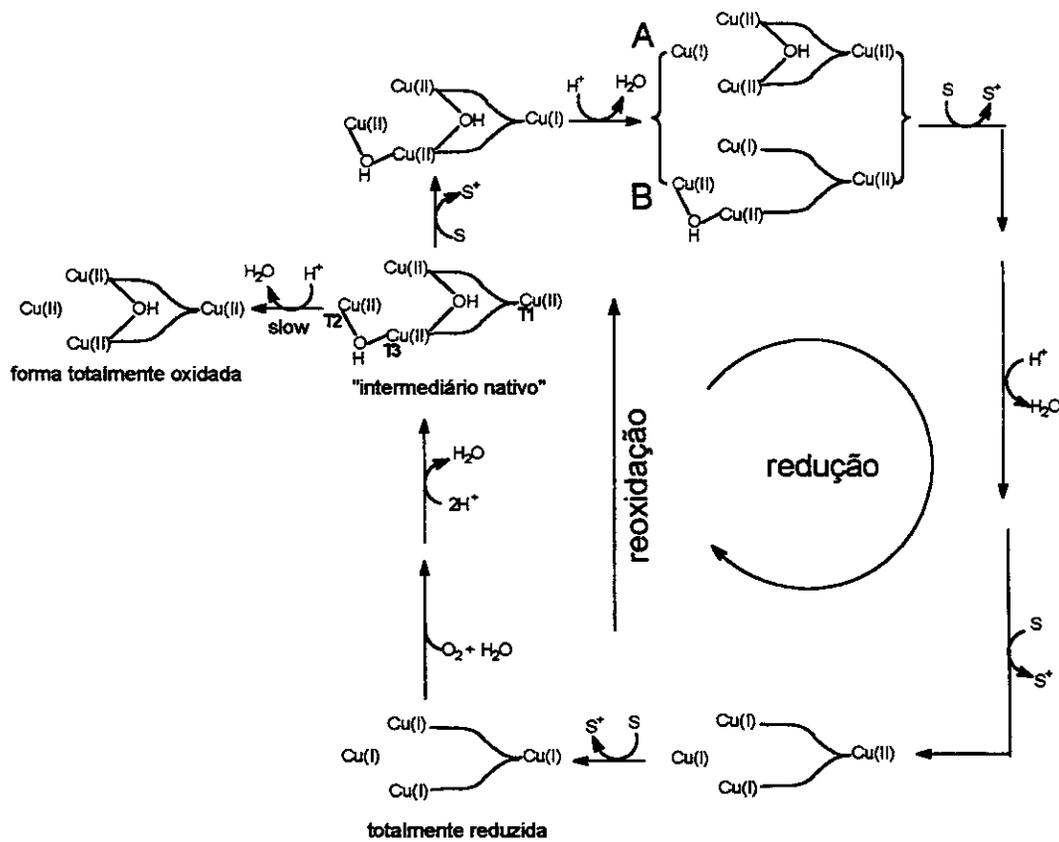


Figura 1.6 Representação esquemática do ciclo catalítico da lacase [Durán *et al.*, 2002].

Lacase é uma fenoloxidase (*p*-difenol oxidase, EC 1.10.3.2) que catalisa a oxidação de várias substâncias aromáticas e inorgânicas (particularmente fenóis) com a concomitante redução de oxigênio para água. Oxida polifenóis, metoxi fenóis substituídos, diaminas e uma considerável série de outros substratos [Thurston, 1994; Xu, 1996; Minussi *et al.*, 2002]. Compostos fenólicos estão amplamente distribuídos na natureza e sua oxidação ou derivatização oxidativa é importante em processos tais como oxidação celular, proteção da parede celular, escurecimento em frutas, processamento de sucos e vinhos, deslignificação de polpas, fortalecimento de produtos compostos, descoloramento de tecidos, detoxificação de solos e águas poluídas.

As lacases oxidam compostos fenólicos até radicais ariloxila, os quais polimerizam espontaneamente formando complexos insolúveis, que podem ser removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (Figura 1.7). Siringaldazina (*N,N'*-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzilideno hidrazina) é considerada um substrato somente de lacase, sendo que o peróxido de hidrogênio deve estar excluído uma vez que este composto é também oxidado pela peroxidase dependente de manganês produzida por muitos basidiomicetos ligninolíticos [Alberti e Klivanov, 1981; Xu, 1996; Smith *et al.*, 1997; Durán e Esposito, 2000; Minussi *et al.*, 2002].

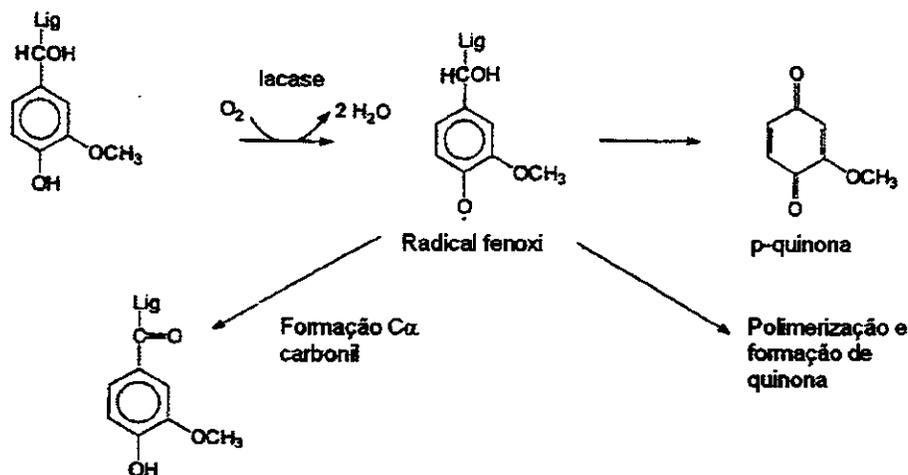


Figura 1.7 Representação esquemática da oxidação de grupos fenólicos de lignina pela lacase.

1.6.2 Produção de Lacase por Fungos

Lacase é uma enzima amplamente distribuída em plantas superiores e fungos. Lacases são produzidas por ascomicetos (p. ex. *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Podospora anserina*), por deuteromicetos (p. ex. *Botrytis cinerea*) e por basidiomicetos (p. ex. *Collybia velutipes*, *Fomes annosus*, *Fomes fomentarius*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pholiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus*, *Poria subacida*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Trametes sanguinea*, *Trametes versicolor*, *Rhizoctonia praticola*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coriolus hirsutus*, *Dichomitus squalens*) [Bollag e Leonowicz, 1984; Karaharian *et al.*, 1998; Perie *et al.*, 1998]. Em função disto, os fungos degradadores da madeira podem ser divididos em três grupos de acordo com a morfologia da degradação que estes produzem na madeira: fungos de degradação branca, marron e macia. Os basidiomicetos de degradação branca são os mais eficientes organismos degradadores de lignina e outros fenóis, sendo capazes de mineralizar lignina eventualmente até CO₂ e H₂O [Kirk e Farrel, 1987; Orth *et al.*, 1993; Hatakka, 1994; Tuor *et al.*, 1995]. A habilidade comum destes fungos é oxidar compostos fenólicos relacionados à lignina, que na maioria das vezes está associada com enzimas extracelulares ligninolíticas, em particular lacases [Barr e Aust, 1994]. As lacases produzidas por diferentes fungos diferem quanto a sua inducibilidade, número de isoformas, massa molecular, pH ótimo, especificidade pelo substrato [Bollag e Leonowicz, 1984].

Em algumas espécies de fungos, a introdução de substâncias indutoras no meio de cultivo inicia a biossíntese de uma nova forma extracelular, enquanto que as formas constitutivas são sintetizadas continuamente. Segundo Bollag e Leonowicz (1984), os fungos *Fomes annosus*, *Pholiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus* e *Trametes versicolor* apresentam uma nova isoforma da enzima induzida por 2,5-xilidina (2,5-dimetilanilina). Esta, dentre os indutores de lacase, vem sendo muito utilizada para o estudo desta enzima em fungos, tais como: *Ceriporiopsis subvermispora* [Fukushima e Kirk, 1995], *Trametes villosa* [Yaver *et al.*, 1996] e *Pycnoporus cinnabarinus* [Eggert *et al.*, 1996].

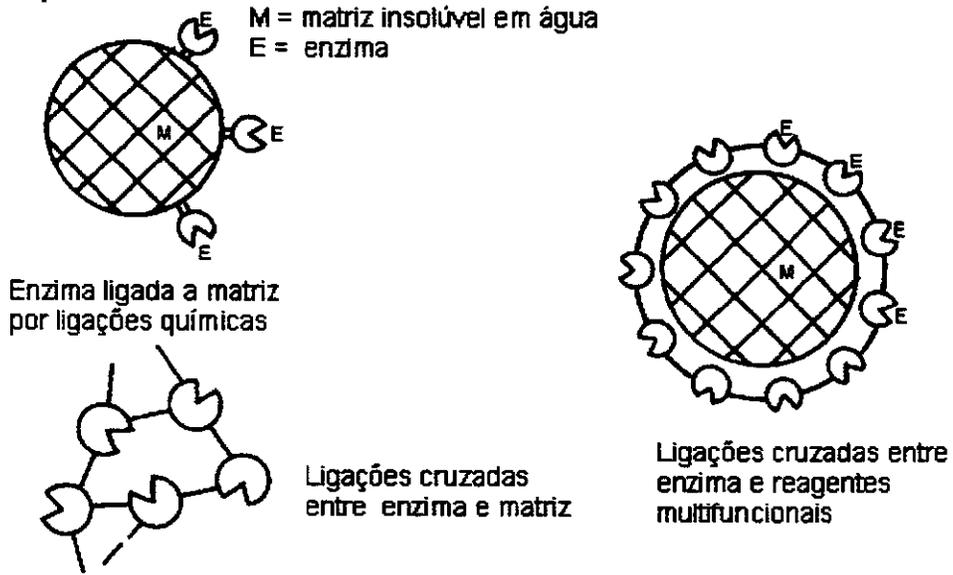
1.6.3 Imobilização enzimática

O emprego de processos enzimáticos somente será economicamente viável se as enzimas forem imobilizadas em suportes adequados. O uso efetivo das enzimas pode ser dificultado por algumas propriedades peculiares das proteínas enzimáticas, tais como alta sensibilidade a agentes desnaturantes, diminuição de atividade ou efeitos tóxicos. Alguns desses fatores podem ser removidos pelo uso de enzimas imobilizadas. Este caminho tem provado ser mais vantajoso para catálise enzimática do que seu uso com enzima livre [Durán *et al.*, 2002].

Muitos métodos são disponíveis para imobilização de enzimas. Desde que os métodos usados para procedimento de imobilização influenciam grandemente as propriedades dos resultados biocatalíticos, a seleção de estratégias de imobilização determinam os processos específicos para a catálise. Eles incluem vários parâmetros tais como, atividade catalítica, efetivação da utilização catalítica, desativação, regeneração cinética e custos. Toxicidade de reagentes de imobilização também devem ser considerados juntamente com o processo de imobilização, despejo de resíduos e aplicação.

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar enzimas sobre suportes sólidos. Eles são principalmente baseados sobre mecanismos químicos e físicos. Métodos de imobilização química incluem: a) ligação da enzima a matriz por ligações covalentes; b) ligações cruzadas (*cross-linking*) entre a enzima e a matriz e c) ligações cruzadas entre a enzima e reagentes bifuncionais. Métodos físicos, como adsorção, envolvem a captação (*entrapment*) das moléculas da enzima dentro dos poros da matriz (Figura 1.8) [Zaborsky, 1974; Duran *et al.*, 2002].

(a) Métodos químicos



(b) Métodos físicos

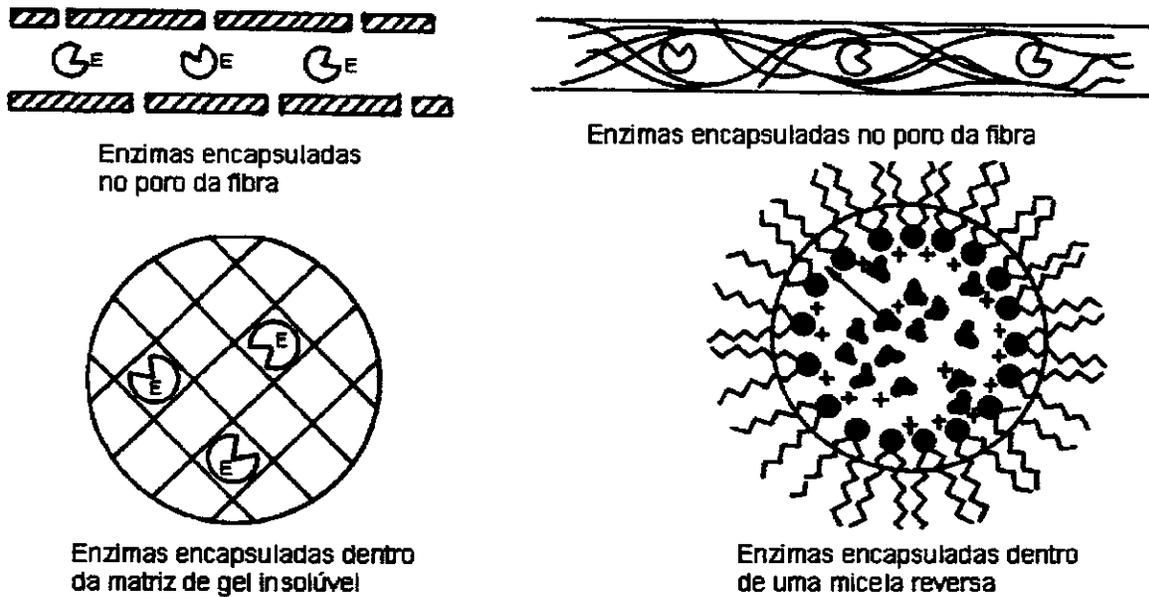


Figura 1.8 Diferentes tipos de processos de imobilização: (a) métodos químicos; (b) métodos físicos.

Ambos os métodos químicos e físicos apresentam vantagens e desvantagens que dependem de uma variedade de fatores. Mudanças conformacionais podem ocorrer na imobilização covalente de uma enzima. Em geral, métodos de imobilização química tendem a reduzir a atividade neste sentido, desde que as ligações covalentes formadas como resultados desta imobilização podem perturbar a estrutura nativa da enzima. Tais ligações covalentes fornecem forte estabilidade na enzima ligada e pode, em alguns casos, reduzir as características da enzima com subseqüentes alterações na sua atividade específica. Entretanto, métodos de imobilização física perturbam menos a enzima e conseqüentemente apresentam retenção de suas propriedades [Durán *et al.*, 2002].

Um dos sistemas mais largamente usados para captação da enzima em uma rede polimérica é a imobilização com gel de poliacrilamida, obtido por polimerização/ligações cruzadas de acrilamida na presença da enzima. Elas podem ser adsorvidas em uma variedade de suportes, oferecendo em muitos casos a conveniência prática de regeneração por simples substituição da enzima desativada por uma fresca, ativa cataliticamente [Piacquadio *et al.*, 1997]. Uma estratégia amplamente usada de imobilização enzimática por ligações covalentes, freqüentemente utiliza modificações nas superfícies de suportes inorgânicos, como por exemplo a silanização, que se baseia no recobrimento da superfície com grupos funcionais orgânicos usando um reagente organofuncional aminosilano. Tais recobrimentos ou grupos amino superficiais nativos, podem ser derivatizados para grupos aldeídos usando glutaraldeído, sendo então ligado à enzima (Figura 1.9) [Messing, 1975].

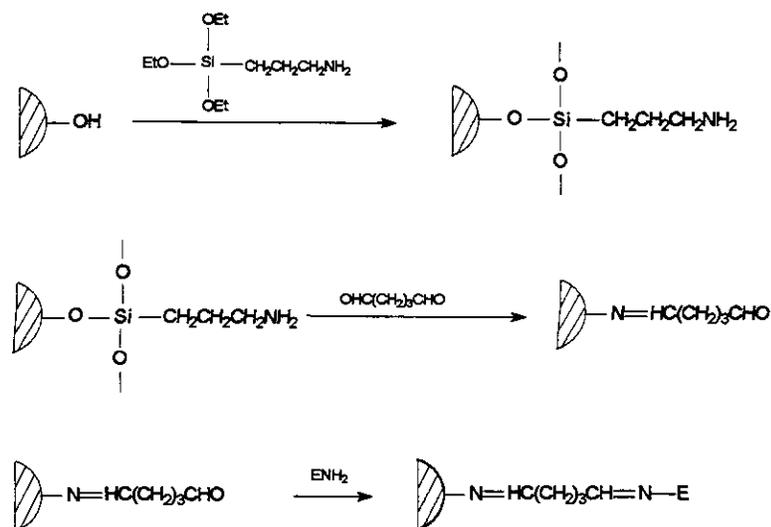


Figura 1.9 Representação esquemática do método de amino-alkilação em imobilização enzimática.

1.6.4 Imobilização de lacase em diferentes suportes

Durán *et al.* (2002) revisaram a imobilização da Lacase (de diversas fontes de origem) em uma variedade de suportes, avaliando as possibilidades oferecidas pela enzima em biotecnologia e aplicações ambientais. Lacase de *Trametes versicolor* foi imobilizada sobre solo argiloso, caolinita e montimorilonita, usando pré-tratamento com 3-aminopropiltriétoxi-silano (APTS) e Glutaraldeído [Ruggiero, 1989; Gianfreda e Bollag, 1994]. Foram obtidas altas porcentagens de atividade da lacase imobilizada (78 % em lacase-solo; 94 % em lacase-montimorilonita; 97 % em lacase-caolinita) e bons resultados na remoção de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) em soluções modelo (98 % em lacase-caolinita e em lacase-solo; 69 % em lacase-montimorilonita;). Também foram obtidos bons resultados com a imobilização desta mesma enzima com sepharose CL-6B. Esta associação enzima-gel mostrou boa estabilidade em solventes orgânicos e tolerância a temperaturas elevadas [Milstein *et al.*, 1989]. Dois exemplos práticos de lacase de *Lentinus edodes*, imobilizadas em quitosana e Eupergit[®]C, foram aplicadas no tratamento de efluente de indústria de óleo de oliva (característico por apresentar altas concentrações de fenóis) obtendo-se significante redução de fenóis,

combinado por um decréscimo da toxicidade do efluente [D'Annibale *et al.*, 1999; 2000]. A imobilização da lacase com quitosana foi realizada por adsorção com subsequente adição de glutaraldeído (ligações cruzadas), apresentado 30 % de rendimento. A imobilização usando Eupergit®C, um epoxi poliacrilato ativado, apresentou uma capacidade catalítica de 340 unidades por miligrama de suporte, ao lado do aumento da estabilidade térmica e tempo de estocagem. Um reator de leito fluidizado operando em modo de recirculação foi montado, obtendo uma redução de 20 % de fenóis totais no efluente. Foi possível restaurar a eficiência do reator, após oito consecutivos ciclos de tratamento, com procedimentos de lavagens usando soluções tamponadas de alta força iônica. Resultados similares, habilidade de retenção de atividade e estocagem, foram obtidos com lacase de *Pleurotus ostreatus*, imobilizada covalentemente sobre o mesmo suporte [Hublik e Schinner, 2000]. A simplicidade nesse processo de imobilização, a estabilidade e a eficiência de defenolização, bem como as propriedades hidrodinâmicas do Eupergit®C com lacase, favorecem sua aplicação em tratamento de efluentes de características fenólicas.

1.6.4.1 Suporte sólido para imobilização enzimática

Eupergit®C é um suporte para imobilização de enzimas com potencial industrial para utilização em química fina e farmacêutica [Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000]. Foi desenvolvido entre 1974 e 1980 pela Röhm, Alemanha [Kraemer *et al.*, 1975], sendo a primeira indústria a introduzir a tecnologia enzimática, aproximadamente 100 anos atrás. Otto Röhm também inventou em 1930 a polimerização de metil meta acrilato, o qual é conhecido hoje como vidro acrílico e como consequência natural, desenvolveu o carregador para enzimas sobre a base de polimerização de metil acrilato.

Eupergit®C consiste de esferas macroporosas com diâmetros entre 100 e 250 μm , produzidos por copolimerização de *N,N'*-metileno-bis-(metacrilamida), glicidil metacrilato, alilglicidil éter e metacrilamida (Figura 1.10). Sua estrutura é

química e mecanicamente estável, inclusive em pH entre 0-14, não apresentando expansão ou redução, mesmo em mudanças bruscas de pH. É altamente compatível com qualquer tipo de reator, inclusive não necessitando de biorreatores especiais. Eupergit®C liga-se a proteínas via grupos oxiranos que reagem em pH neutro ou alcalino, com grupos amino de proteínas moleculares por ligações covalentes, resultando enzimas em faixa de pH onde ela é estável e não perde a atividade [Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000].

Devido à alta densidade dos grupos oxiranos na superfície das esferas (600 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de Eupergit®C seco), a capacidade ligante de uma enzima é de aproximadamente 100 mg proteína g^{-1} Eupergit® C (massa seca). É comercialmente disponível mundialmente, sendo empregada várias toneladas por ano para utilização em biocatálise. Com relação à produtividade, na maioria dos casos apresenta-se maior que 1000 kg produto/kg de Eupergit®C seco. O custo do Eupergit® C na produção de Eupergit®C-enzimas, na maioria dos casos, é menos do que US\$ 0.42/kg de produto, que é por exemplo, menos de 1% do custo avaliado em US\$ 42/kg de produto [Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000].

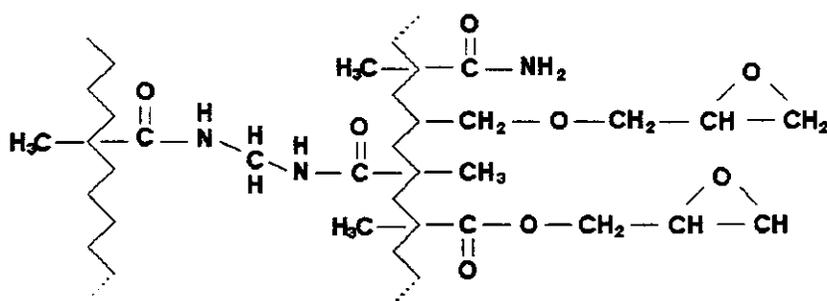


Figura 1.10 Estrutura química do Eupergit®C.
[<http://www.rohmamerica.com/Eudragit/EUPERGIT>]

1.6.5 O potencial uso industrial da lacase

Estudos envolvendo a biodegradação de compostos tóxicos presentes em efluentes tem aumentado significativamente nos últimos anos. Industrialmente tem crescido o interesse em enzimas extracelulares de fungos devido ao seu potencial de degradação de vários compostos xenobióticos, fenólicos altamente tóxicos e lignina [Mansur *et al.*, 1998; Durán e Esposito, 2000; Wesenberg *et al.*, 2003].

Nas últimas duas décadas, muitos esforços têm sido feitos para entender os mecanismos de biodegradação da lignina por lacase para uso em aplicações industriais, principalmente para deslignificação/branqueamento de polpas Kraft. Entretanto, a eficiência catalítica da lacase é insuficiente para muitos processos industriais (tratamento de efluentes, delignificação de materiais lignocelulósicos, etc.) [Castro *et al.*, 2003; Valtcheva *et al.*, 2003]. Devido a isto, estudos têm sido feitos com o uso de mediadores (compostos que interagem com a enzima, facilitando o estágio inicial do processo). A oxidação de benzilálcool com a enzima lacase por compostos mediadores adequados rende produtos carbonílicos, enquanto que a lacase não pode oxidar substratos não-fenólicos diretamente. O tipo de oxidação ocorre pela forma oxidada do mediador ($\text{Med}_{(\text{ox})}$), geralmente por interação com a enzima. O mediador ($\text{Med}_{(\text{ox})}$) pode seguir por duas rotas de oxidação do substrato, a) transferência de elétrons (ET), b) transferência de átomos de radical hidrogênio (HAT). Resultado obtido com lacase e o mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT), mostrou seguir a rota HAT [Baiocco *et al.*, 2003].

Itoh *et al.* (2000), estudaram a transformação de clorofenóis pela lacase extracelular de *Coriolus versicolor*, por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), observando que a transformação foi dependente do número e da posição dos átomos de cloro na molécula. Dentre os monoclорofenóis, 2-CP (2-clorofenol) foi transformado em 19%; 3-CP e 4-CP não foram transformados. Dentre os diclorofenóis, 2,3-, 2,4-, 2,6-DCP foram substratos susceptíveis a lacase com 16, 32 e 46 % de transformação, respectivamente. O triclorofenol 2,4,6-TCP foi o mais susceptível, com 74 % de transformação.

Castro *et al.* (2003) estudaram uma série de compostos modelos, fenólicos e não fenólicos, imitando estruturas condensadas de ligninas para oxidação com lacase de *Trametes versicolor* na presença de HBT e $[\text{SiW}_{11}\text{VO}_{40}]^{5-}$ (SiW_{11}V) como mediador. Ambos os modelos lacase-mediador apresentaram significativa degradação (confirmados pela presença de produtos de oxidação, analisados por cromatografia gasosa e espectroscopia de massa), porém, o mediador (SiW_{11}V) foi o que apresentou melhores resultados. O uso de mediadores é dificultado por seus custos, problemas de regeneração e degradação em reações de oxidação.

2 OBJETIVOS

Estudo do tratamento de efluente de indústria papelreira Kraft E₁, utilizando processo químico (ozonização) e enzimático (lacase).

2.1 – Objetivos específicos:

- Caracterização do efluente Kraft E₁ frente a vários parâmetros físico-químicos: COT, Fenóis totais, DQO, Cor e pH. Avaliação da toxicidade pelos organismos-teste: alga *Selenastrum capricornutum* e micro-crustáceo *Artêmia salina*.
- Avaliação da eficiência do tratamento de ozonização aplicado no efluente Kraft E₁ para COT, Cor, Fenóis totais, DQO, pH e toxicidade.
- Produção de lacase pelo fungo *Trametes versicolor* em cultura líquida.
- Imobilização de lacase em dois diferentes suportes:
 - Montmorilonita KSF
 - Eupergit®C
- Avaliação do suporte mais adequado para imobilização enzimática na montagem de um reator para tratamento de efluente Kraft E₁.
- Reuso da lacase imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF e em Eupergit®C por vários ciclos.
- Aplicação da Lacase Imobilizada no tratamento de efluente Kraft E₁.
- Montagem de um reator enzimático com lacase imobilizada em Eupergit®C.
- Aplicação dos processos combinados: químico (ozonização) e Enzimático (lacase imobilizada em Eupergit®C) no tratamento do efluente Kraft E₁.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 – Caracterização do efluente Kraft E₁

O efluente utilizado foi obtido após o primeiro estágio de extração alcalina (E₁) de polpa de madeira de *Eucalyptus grandis* proveniente de uma empresa situada na região do município de Campinas. O efluente foi estocado em frascos plásticos de 1 L, em freezer (temperatura de aproximadamente -18°C). A caracterização consistiu na determinação dos seguintes parâmetros: pH, cor, DQO, COT, fenóis totais e toxicidade.

3.2 – Controle analítico

3.2.1 – Determinação do pH

As medidas de pH foram determinadas utilizando o aparelho Orion modelo EA 940 da Coler Parmer, com eletrodo de vidro combinado, da mesma marca.

3.2.2 – Determinação de cor a 465 nm

A remoção de cor do efluente foi avaliada pela diminuição da absorção de acordo com o procedimento descrito no método [Livernoche *et al.*, 1983], empregando um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000. O comprimento de onda foi determinado pela absorbância máxima do efluente na região do visível (465 nm) em pH 7,6. Neste procedimento foi utilizado 1 mL de amostra filtrada em membrana de acetilcelulose 0,45 µm e 1 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,6.

3.2.3 – Determinação da DQO (Demanda Química de Oxigênio)

Este método é utilizado para a determinação de oxigênio necessário para

oxidar toda a matéria orgânica presente na amostra que seja susceptível a um forte agente oxidante, como o dicromato de potássio. O método utilizado é o de refluxo fechado colorimétrico APHA 5220 C 5-12 (1995), empregando dicromato de potássio como solução digestora na presença de H_2SO_4/Ag_2SO_4 , à elevada temperatura, na presença de um catalisador (sulfato de prata). A análise consistiu em adicionar 2,5 mL de amostra, 1,5 mL da solução digestora e 3,5 mL de H_2SO_4/Ag_2SO_4 em um tubo de digestão, deixando digerir em bloco digestor por 2 horas a $150^\circ C$. Em seguida, resfriou-se à temperatura ambiente, procedendo à leitura da absorvância a 600 nm.

3.2.4 – Determinação de COT (Carbono Orgânico Total)

Com este método determina-se o teor total de carbono existente na amostra (tanto orgânico como inorgânico). O método utilizado é o APHA 5310B (1992). O equipamento utilizado foi o Shimadzu, modelo TOC 5000A. Neste método, uma pequena porção da amostra homogeneizada, filtrada em membrana de acetilcelulose $0,45 \mu m$ e diluída e a seguir injetada para o interior de uma câmara de aquecimento com um catalisador oxidativo, como óxido de cobalto. A água é vaporizada e o carbono orgânico é oxidado a CO_2 , sendo quantificado por meio de um analisador de infravermelho não dispersivo. O carbono inorgânico é medido pela passagem da amostra em uma câmara de reação que contém ácido fosfórico, sob estas condições o carbono inorgânico é convertido a CO_2 e quantificado de maneira semelhante à descrita anteriormente. O carbono orgânico total é então obtido pela diferença entre o carbono total e o carbono inorgânico.

3.2.5 – Determinação de fenóis totais

A determinação de fenóis totais foi estimada colorimetricamente segundo o método padrão APHA 5550B (1992). A mistura de reação foi composta de 1 mL de amostra, 0,250 mL de solução carbonato-tartarato de sódio (200 g de carbonato de sódio, 12 g de tartarato de sódio dihidratado, diluídos para 1000 mL de água

destilada) e 0,025 mL do reagente Folin-Ciocalteu (uma mistura de heteropoliácidos fosfomolibdico fosfotungstico), Aldrich, EUA. Foram utilizadas micropipetas em todas as alíquotas. Após 30 minutos à 20°C foi lida a absorbância a 700 nm e comparada com curva-padrão de fenol. Os produtos de oxidação resultantes formaram um complexo azul com molibdênio e tungstênio.

3.3 – Determinação da Toxicidade

3.3.1 – Ensaio de toxicidade com a alga *Selenastrum capricornutum*:

O ensaio de toxicidade utilizando a alga verde de água doce *Selenastrum capricornutum* foi feito conforme descrito por Reginatto (1998), adquirida da coleção de culturas de algas da EMBRAPA, localizada em Jaguariúna/SP. Foi utilizado o fluorímetro Aminco modelo SPF-500C. Este ensaio consiste no crescimento das algas em diferentes diluições do efluente (pH ajustado para 7,0), na qual é adicionada uma solução de nutrientes de composição definida. A duração do ensaio é de 72 h. A determinação do crescimento e/ou inibição da concentração da alga é determinada pela fluorescência da alga a 680 nm. A excitação é realizada em 435 nm.

3.3.2 – Ensaio de toxicidade com o micro crustáceo *Artêmia salina*:

A toxicidade frente a *Artêmia salina* foi determinada apenas pela porcentagem de morte do organismo na presença de diferentes concentrações do efluente (pH ajustado para 7,0) por um período de 24 h [Meyer *et al.*, 1982]. O método consistiu em avaliar a morte das larvas de *Artêmia salina* (ovos de camarão disponíveis em lojas de alimentos para peixes), cultivando-os em diferentes concentrações de poluentes em frascos contendo 5 mL de solução salina (38 g L⁻¹ de sal marinho). Após 24 horas foi feita contagem dos sobreviventes, determinando-se a dose limite de poluente.

3.4 – Processo de Ozonização

3.4.1 – Produção e medida de ozônio

O ozônio foi gerado a partir de oxigênio puro, utilizando-se um ozonizador marca OZOCAV ZT-2 (Inter Ozone Ingenieria Ecológica, Santiago-Chile), instalado no próprio laboratório. O princípio de geração de ozônio baseia-se no método de descarga por efeito corona. O ozônio produzido foi determinado espectrofotometricamente, utilizando um aparelho de marca Micronal modelo B 382, fazendo-se passar uma corrente gasosa que contém uma mistura de oxigênio e ozônio por uma célula de fluxo de gás, a 258 nm ($\epsilon = 3000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O ozônio residual do sistema foi destruído pela passagem do gás por um frasco lavador contendo iodeto de potássio [Kunz *et al.*, 1999].

3.4.2 – Tratamento do efluente papelero pelo processo de ozonização

O efluente submetido a ozonização teve seu pH previamente ajustado ao valor desejado, sendo ozonizado à temperatura ambiente, num reator tubular de fluxo ascendente com dispersor de vidro sinterizado, com diâmetro de 4,6 cm, altura de 30,0 cm, com capacidade para 500 mL, liberando o gás da base para o topo do reator, passando por uma placa porosa de vidro sinterizado (Figura 3.1) [Kunz *et al.*, 1999]. O volume utilizado de amostra foi de 400 mL, a vazão de entrada do gás foi de 15 L h^{-1} de O_2 resultando numa concentração de O_3 na fase gasosa de 14 mg L^{-1} . Após 10 minutos, necessários para que o equipamento atingisse o estado estacionário, o efluente foi ozonizado durante 120 minutos. A eficiência do método foi avaliada pela determinação de COT, fenóis totais, DQO e cor.

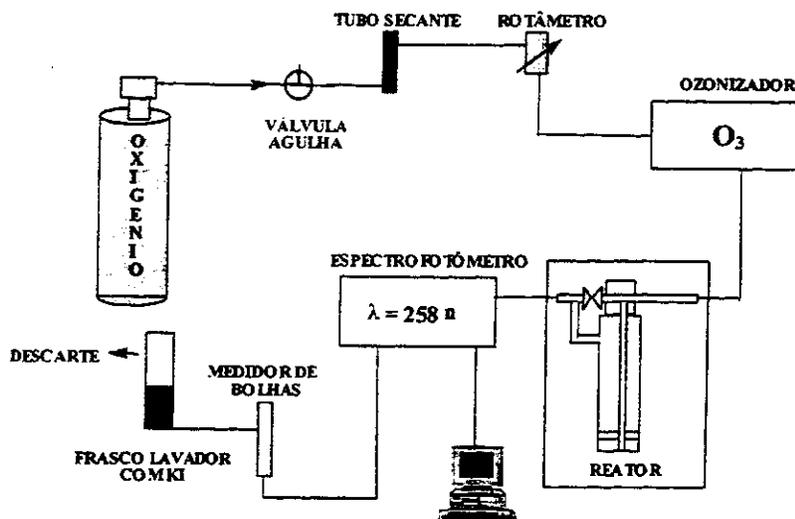


Figura 3.1 Sistema empregado na ozonização do efluente papaleiro.

3.5 – Processo Enzimático

3.5.1 – Microorganismo

O fungo utilizado foi *Trametes versicolor* (CCT 4521) pertencente à coleção do Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas.

3.5.2 – Meio de Manutenção

O fungo foi mantido e repicado semanalmente em placas de Petri contendo o meio ágar-extrato de malte a um pH de aproximadamente 5,4 em condições estéreis. A incubação foi feita a 28°C por 5-10 dias ou até a máxima esporulação.

3.5.3 – Produção de lacase em meio líquido

A produção de lacase a partir do fungo *Trametes versicolor*, foi realizada em meio líquido com duração de 18 dias (28°C, agitação contínua de 240 rpm) até a

obtenção do extrato bruto sólido (liofilizado) [Minussi, 2002]. A Lacase semi-purificada utilizada foi doada pela Dra. R.C. Minussi, tendo sido purificada em colunas DEAE-Sephadex A-50 e Concanavalin A-Sepharose 4B.

O fungo *Trametes versicolor* foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 200 mL de meio de cultivo, em condições estéreis. O meio de cultivo consistiu de (g L^{-1}): 5 g de extrato de malte, 10 g de peptona, 0,005 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 20 g de glicose. O pH do meio foi ajustado para 5,4 e após 96 horas de crescimento $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de 2,5 xilidina foi adicionado ao meio de cultivo [Von Hunolstein *et al.*, 1986].

O caldo de cultivo contendo a enzima foi filtrado (tamis de 380 mesh) e congelado em freezer por 5 dias. O caldo enzimático foi descongelado e novamente filtrado em membrana Millipore $0,45 \mu\text{m}$ para retirada de polissacarídeos que tenham sido precipitados. A amostra foi então congelada utilizando-se gelo seco e etanol em balão de 500 mL. Procedeu-se a liofilização (Liofilizador Edwards L5KR) da amostra. Foi obtido o extrato bruto sólido da lacase (LAC), bastante higroscópico, armazenado em freezer.

3.5.4 – Determinação da atividade enzimática da lacase livre

A atividade de lacase livre foi determinada espectrofotometricamente utilizando siringaldazina como substrato enzimático, no filtrado da cultura, empregando um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000. A oxidação de siringaldazina ($\epsilon = 65.000$) foi conduzida numa mistura de reação contendo 0,6 mL do caldo filtrado, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) e 0,1 mL de siringaldazina (solução etanólica) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, num volume final de 1,0 mL. A reação teve início pela adição da siringaldazina e a velocidade de oxidação desta foi acompanhada durante 5 minutos a 525 nm. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto [Szkларz *et al.*, 1989].

3.5.5 – Imobilização de lacase (por adsorção) em montmorilonita KSF

A montmorilonita KSF, $m = 0,500 \text{ g}$, foi previamente ativado com 15,5 mL de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 45°C , por 2 h. Todo o conteúdo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. O resíduo foi lavado diversas vezes com água destilada até pH neutro. Em seguida o suporte tratado foi incubado, sob agitação, à temperatura ambiente, com uma solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) com quantidade suficiente de lacase, por 2 h. Foi utilizado o extrato bruto da lacase (LAC), numa quantidade total de 592 U L^{-1} (siringaldazina). A enzima imobilizada foi separada por centrifugação, lavada diversas vezes com tampão até que não mais fosse detectada atividade na solução de lavagem, estocada em suspensão em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), no refrigerador. Os ensaios de atividade e proteína foram feitos nos sobrenadantes das lavagens durante o processo de imobilização. A análise de atividade foi realizada por espectrofotometria (siringaldazina) e de proteína, de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina (BSA) como padrão.

3.5.6 – Imobilização da lacase (covalentemente) em montmorilonita KSF (LIM)

Montmorilonita KSF, $m = 0,800 \text{ g}$, foi previamente ativada com 20 mL de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 45°C , por 2 h. Todo o conteúdo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. O resíduo foi lavado diversas vezes com água destilada até pH neutro. Em seguida, todo o material foi tratado com 20 mL de uma solução 2% de 3-amino-propiltriétoxissilano em acetona a 45°C , em agitação, por 12 h. Depois de centrifugado, o sobrenadante foi descartado e todo o resíduo foi tratado com 20 mL de uma solução 5% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0), evacuado em um dessecador para remover bolhas e incubado por 1 h a temperatura ambiente. Depois de várias lavagens com água deionizada e tampão fosfato (pH 7,0), o resíduo foi incubado com 8,0

mL de solução contendo quantidade suficiente de enzima em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e agitado a 4°C por 24 h. Foi utilizado o extrato bruto da lacase (em solução tampão), numa quantidade total de 1175 U L⁻¹ (siringaldazina). A lacase imobilizada foi separada por centrifugação, lavada diversas vezes com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,0), até que a solução de lavagem não apresentasse atividade e estocado em suspensão no refrigerador [Gianfreda e Bollag, 1994].

Os ensaios de atividade e proteína foram feitos nos sobrenadantes das lavagens durante o processo de imobilização. A análise de atividade foi realizada por espectrofotometria (siringaldazina) e de proteína, de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina (BSA) como padrão.

3.5.7 – Imobilização da lacase (covalentemente) em Eupergit®C (LIE)

Uma solução de extrato bruto da lacase (LAC) contendo aproximadamente 1000 U L⁻¹ (siringaldazina) foi imobilizada em Eupergit®C, por reação de 1,0 g de suporte seco, em 10,0 mL de tampão fosfato 1,5 mol L⁻¹ pH 7,0 a 25°C. A mistura foi agitada a 200 rpm por 24 h [D'Annibale *et al.*, 2000]. A lacase imobilizada (LIE) foi filtrada em membrana de acetilcelulose 0,45 µm, lavada com várias porções de água destilada, até que não fosse mais detectada atividade na solução de lavagem. Em seguida, lavada com solução de NaCl 1,0 mol L⁻¹ e três vezes com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) sendo estocado em suspensão, no mesmo tampão, em refrigerador.

Os ensaios de atividade e proteína foram feitos nos sobrenadantes das lavagens durante o processo de imobilização. A análise de atividade foi realizada por espectrofotometria (siringaldazina) e de proteína, de acordo com o método de Lowry *et al.* (1951), usando albumina bovina (BSA) como padrão.

3.5.8 – Determinação da atividade da lacase imobilizada

O ensaio para determinação da atividade da lacase imobilizada utilizou um monitor biológico de oxigênio, YSI Model 23 Oxygen Monitor, acoplado a um banho termostaticado a 25°C. A atividade foi determinada utilizando 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) 10 mmol L⁻¹ como substrato enzimático, em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{O}_2$ [Eisenthal e Danson, 1995; D'Annibale *et al.*, 1996]. Este ensaio foi utilizado somente nos testes de reuso da enzima imobilizada.

3.5.9 – Ensaio do reuso da lacase imobilizada

Lacase imobilizada, m = 0,200 g, foi adicionada ao recipiente reacional do monitor biológico de oxigênio, acoplado a um banho termostaticado, juntamente com 2,7 mL de tampão citrato fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 3,8) sob agitação constante, a 25°C ($\pm 0,1$). A solução foi saturada com ar comprimido por 1 minuto, sendo conectado o eletrodo de oxigênio. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de solução de 2,6-DMP 10 mmol L⁻¹, com o auxílio de uma micro-seringa. A reação teve início pelo consumo de O₂ dissolvido no meio enzimático, por um determinado tempo (min). A solução foi saturada novamente com ar comprimido e adicionada 0,1 mL de solução de 2,6-DMP 10 mmol L⁻¹. Este ciclo foi repetido por várias vezes.

3.5.10 – Ensaio de degradação de 2,4-diclorofenol por lacase livre e imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF (LIM)

Foi utilizado volume total de 50 mL de solução de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), numa concentração de 50 mg L⁻¹, à temperatura ambiente, sob agitação em cada um dos tratamentos: (1) 2,4-DCP + HBT + LIM; (2) 2,4-DCP + HBT + LAC; (3) 2,4-DCP + LAC e (4) 2,4-DCP + LIM. O mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT) foi utilizado numa concentração de 0,34 mmol L⁻¹. Foi utilizada lacase imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF (LIM), m = 0,200 g e o extrato bruto da

lacase livre (LAC) (aproximadamente 500 U L⁻¹). A eficiência dos tratamentos foi avaliada monitorando-se a redução do teor de fenóis totais, por até 5 h.

3.5.11 – Tratamento de efluente Kraft E₁ com lacase livre (LAC) e imobilizada em Eupergit[®]C (LIE)

O efluente Kraft E₁ (40 mL) com pH inicial aproximadamente 10, foi ajustado para 5,0 com H₂SO₄ 1,0 mol L⁻¹, mantido sob agitação à temperatura ambiente. Foram utilizadas lacase livre (LAC) com 1000 U L⁻¹ e imobilizada em Eupergit[®]C (LIE A e B, com atividade de 9 e 100 U g⁻¹, respectivamente). Foi utilizada massa de 0,200 g para ambos os suportes. A eficiência foi avaliada monitorando-se a redução no teor de fenóis totais (reação de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método padrão APHA 5550B, 1992) durante o tempo do tratamento.

3.5.12 – Tratamento de efluente Kraft E₁ com lacase imobilizada em Eupergit[®]C (LIE) em um reator enzimático

Foi montado um reator enzimático de leito fluidizado com capacidade para 80 mL, usando a enzima imobilizada LIE (contendo 31 U g⁻¹ de suporte seco; massa total = 10,0 g), correspondendo a 40 mL do complexo lacase-Eupergit[®]C (o complexo enzimático deve ser mantido constantemente em suspensão, garantindo sua atividade catalítica). O pH do efluente Kraft E₁ foi corrigido para 5,0 com H₂SO₄ 1,0 mol L⁻¹. O volume de 400 mL do efluente, foi mantido à temperatura ambiente, sob agitação e constantemente borbulhado com ar comprimido. O efluente foi re-circulado dentro da coluna do reator com o auxílio de uma bomba peristáltica, utilizando fluxo ascendente de 8,0 mL min⁻¹, durante todo o tempo do tratamento (Figura 3.2). A eficiência do tratamento foi avaliada pela determinação de COT, fenóis totais e cor.

3.6 Processo combinado de tratamento de efluente Kraft E₁ com ozonização e lacase imobilizada em Eupergit® C

O efluente foi submetido a ozonização a pH 10, à temperatura ambiente, por 60 minutos. O volume da amostra ozonizada foi de 400 mL, com uma vazão de entrada do gás foi de 15 L h⁻¹ de O₂ (concentração de O₃ no gás de 14 mg L⁻¹). Na seqüência, foi aplicado o tratamento enzimático com a lacase imobilizada, conforme item 3.5.12. A eficiência do tratamento foi avaliada pela determinação de COT, fenóis totais e cor.

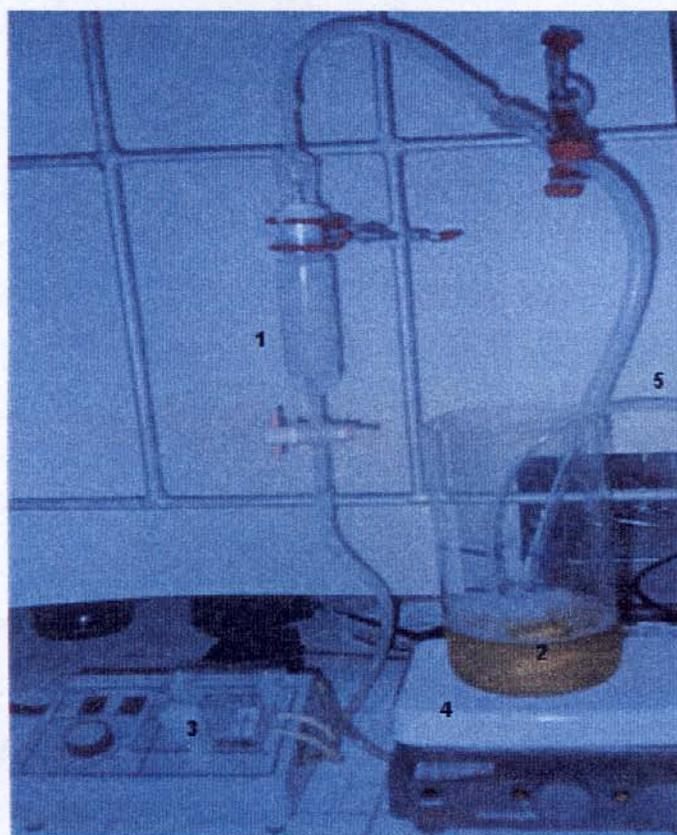


Figura 3.2 Reator enzimático para tratamento do efluente com enzima imobilizada.

Onde: 1-reator de coluna de vidro com capacidade para 80 mL; 2-reservatório de efluente; 3-bomba peristáltica; 4-agitador magnético; 5-mangueira para entrada de ar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFLUENTE KRAFT E₁

4.1.1 Caracterização do efluente

A eficiência da ozonização no tratamento do efluente foi avaliada pela redução da concentração de vários parâmetros do efluente Kraft E₁ bruto, sendo eles: COT, Cor, Fenol e DQO. Na Tabela 4.1 está apresentada a faixa de valores observados para estes parâmetros em diferentes amostras coletadas.

Tabela 4.1. Caracterização do Efluente Kraft E₁ bruto. Faixa de valores para diferentes amostras coletadas.

Cor (absorbância, $\lambda=465$ nm)	pH	COT (mg L ⁻¹)	Fenóis totais (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)
0,150 - 0,300	10,0 - 11,0	500 - 1500	10 - 25	1500 - 2500

4.2 TRATAMENTO QUÍMICO - OZONIZAÇÃO

4.2.1 Ozonização em condições alcalinas

A ozonização em meio ácido não é eficiente para o tratamento do efluente papeleiro Kraft E₁, como observado na literatura por Freire *et al.* (2001), sendo que em condições alcalinas a geração de radicais hidroxila a partir do ozônio é favorecida [Masten e Davis, 1994]. Desta maneira, os estudos foram realizados apenas em pH básico.

O tratamento do efluente foi realizado em pH 10 com produção inicial de ozônio de 14 mg L⁻¹ correspondente a um fluxo de oxigênio de 15 L h⁻¹. A ozonização foi monitorada por 120 minutos. Após este período foi possível

observar que o ozônio gerado não foi mais consumido na degradação do efluente, pois a absorbância medida ($\lambda = 258 \text{ nm}$) retornou ao valor inicial medido pela geração de ozônio, como mostrado na Figura 4.1. Na Figura 4.2 estão apresentadas as reduções obtidas para fenóis totais, cor, COT e DQO durante todo o processo de ozonização.

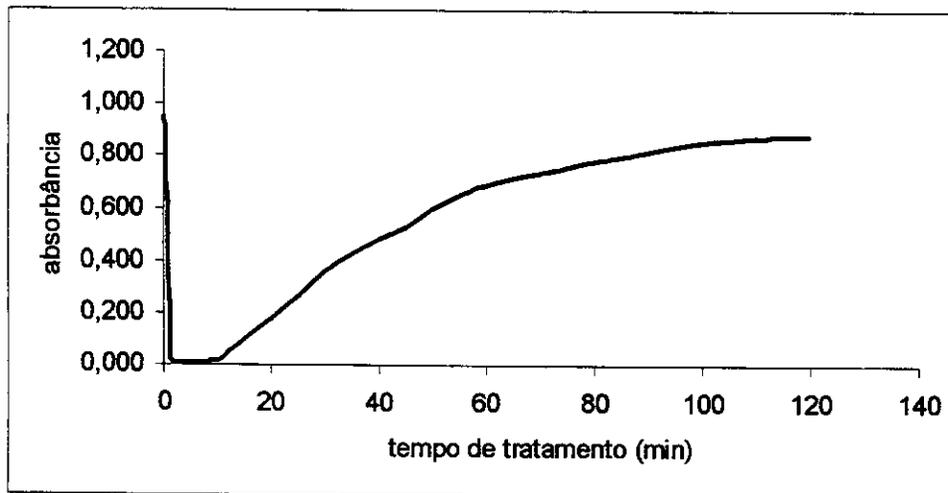


Figura 4.1 Consumo de ozônio ($\lambda = 258 \text{ nm}$) em efluente Kraft E₁ em função do tempo de ozonização (pH 10; $C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).

Na Figura 4.2 observa-se que a cor do efluente foi reduzida, obtendo-se 67 % de redução em 120 min. A redução de fenóis totais foi de 50 % em 120 min. Para COT e DQO a redução foi menos acentuada para o mesmo período de tratamento, mostrando que a ozonização é mais eficiente para a remoção de cor e fenóis totais do efluente. Observou-se ainda que as remoções obtidas em 120 minutos não foram muito superiores àquelas obtidas em 60 minutos de tratamento. Por exemplo, para a remoção de fenóis totais a redução em 60 minutos foi de 49 % e em 120 minutos, 50 %. Um ganho real foi obtido apenas para cor, na qual a redução aumentou de 56 % (60 minutos) para 67 % em 120 min. Em função disso, do ponto de vista econômico, é mais interessante a realização do tratamento em 60 minutos, economizando parte do ozônio que seria consumido em 120 minutos. O consumo de ozônio durante o tratamento (em mg L^{-1}) está mostrado na Tabela

4.2. Assim, de acordo com os resultados apresentados, o tempo de tratamento de 60 minutos foi o mais adequado tanto do ponto de vista da degradação do efluente como econômico.

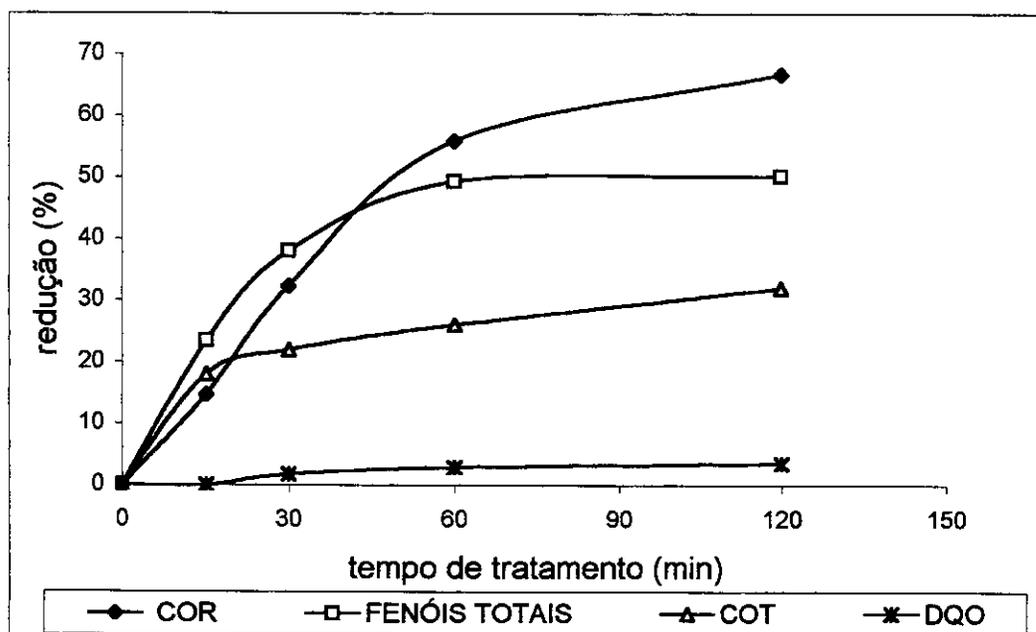


Figura 4.2 Redução (%) da concentração de Cor, COT, Fenóis totais, DQO no processo de ozonização ($\text{pH } 10$; $C_0(\text{O}_3) = 14 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Abs}_0 = 0,204$; $C_0(\text{COT}) = 1029 \text{ mg L}^{-1}$; $C_0(\text{fenóis totais}) = 27 \text{ mg L}^{-1}$; $C_0(\text{DQO}) = 1860 \text{ mg L}^{-1}$).

Tabela 4.2 Consumo de ozônio em função do tempo de tratamento no efluente Kraft E₁ (condições de tratamento: $\text{pH } 10$; $C_0(\text{O}_3) = 14 \text{ mg L}^{-1}$).

tempo min	consumo de O ₃ mg L ⁻¹
0	0
10	34
20	76
40	248
60	469

4.2.2 Influência do pH na eficiência de ozonização

A influência do pH (10 e 12) no tratamento do efluente Kraft E₁, por meio de ozonização foi estudada, utilizando concentração de ozônio de 14 mg L⁻¹ correspondente a um fluxo de oxigênio de 15 L h⁻¹ para ambos pH. Nas Figuras 4.3, 4.4 e 4.5 estão apresentadas as reduções obtidas para fenóis totais, COT e cor a 465 nm. A influência da DQO em diferentes pH não foi estudada, pois os resultados anteriores apresentaram-se pouco significativos (redução de 3,5 % em 120 minutos de tratamento; pH 10). Observou-se que para todos os parâmetros estudados o efeito da degradação em pH 12 foi inferior àquele observado para pH 10. A remoção de fenóis totais foi o parâmetro que menos sofreu influência da concentração de íons hidroxila durante o processo de ozonização. Embora o efeito da remoção de fenóis totais seja menor neste pH, após 90 minutos de tratamento, a redução apresentou-se próxima para ambos valores de pH (Figura 4.3).

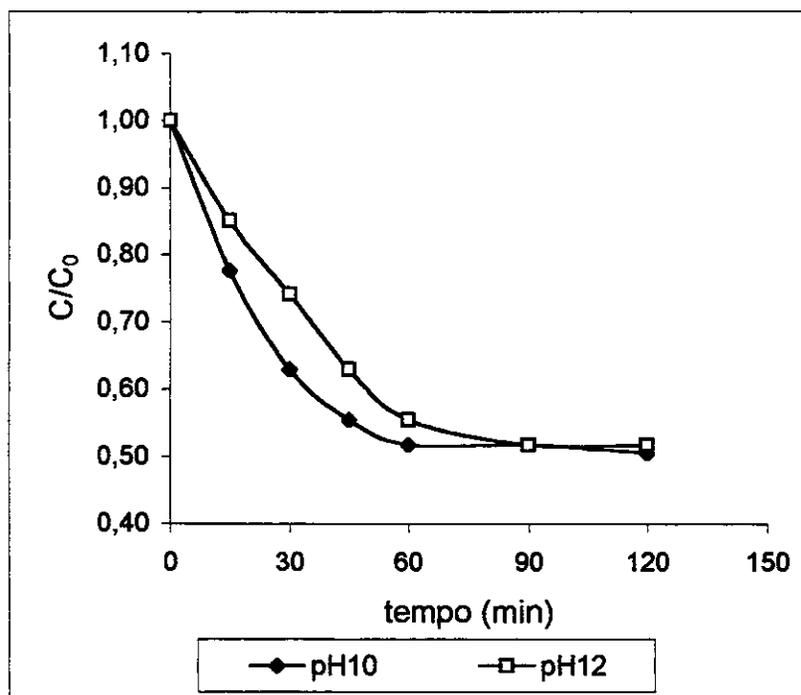


Figura 4.3 Remoção de fenóis totais em pH 10,0 e 12,0 ($C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).

A remoção de COT foi estudada em ambos os pH. Após 120 minutos de tratamento, a redução de COT em pH 10 foi de 32 % e apenas 13 % para o pH 12 (Figura 4.4). Mesmo após 300 minutos de tratamento, a redução máxima obtida pela ozonização realizada em pH 12 foi de 19 %, indicando que a aplicação apenas de ozônio no tratamento do efluente não é satisfatória, uma vez que a carga orgânica não é removida.

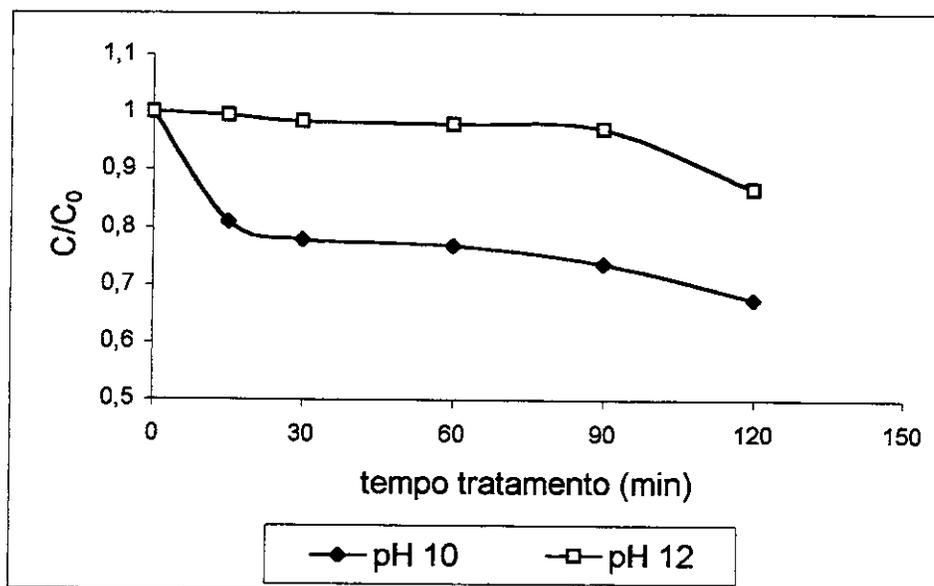


Figura 4.4 Remoção de COT em pH 10,0 e 12,0 ($C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).

A principal vantagem observada pela aplicação de ozônio no tratamento do efluente foi com relação à remoção de cor, sendo obtidos 67 e 59 % para os pH 10 e 12, respectivamente (Figura 4.5). Isto implica que o ozônio quebra as moléculas responsáveis pela cor apresentada pelo efluente, mas não é capaz de atingir a mineralização das mesmas uma vez que a remoção de COT e DQO foi pouco significativa.

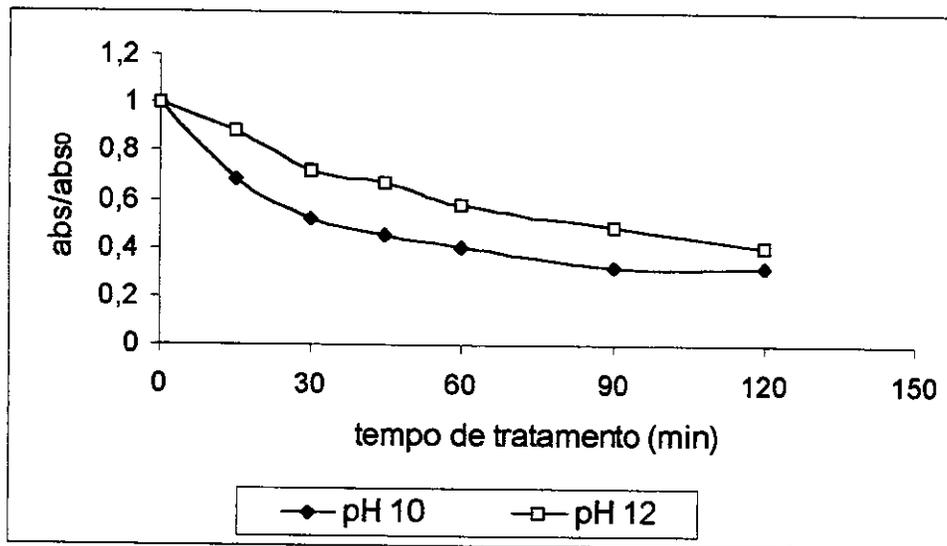


Figura 4.5 Descoloração em pH 10 e 12 ($C_{0(O_3)} = 14 \text{ mg L}^{-1}$).

Para ambas amostras ozonizadas, não houve significativas alterações no pH em relação ao valor inicial apresentado (diminuição máxima de 0,8 unidades de pH) o que confirma o mecanismo reacional apresentado pelo ozônio, além da dificuldade em alterar o pH em condições alcalinas.

Pelos resultados apresentados, a diferença entre os pH alcalinos afeta principalmente o efeito de degradação do efluente para todos os parâmetros estudados. Na Figura 4.1 observa-se que o consumo de ozônio terminou em aproximadamente 120 minutos para pH 10, enquanto que para a ozonização em pH 12, mesmo após 300 minutos de tratamento, o ozônio ainda estava sendo consumido (resultados não apresentados para pH = 12). Portanto, o tratamento do efluente Kraft E₁ por ozonização em pH 10 foi o que apresentou melhores resultados.

O efeito da ozonização no processo de degradação do efluente é controlado pela transferência de massa do ozônio da fase gasosa para a fase aquosa, que consiste nos seguintes passos: (i) difusão do ozônio através da fase gasosa até a interface entre as fases gasosa - aquosa, (ii) transporte sobre a

interface limite da fase aquosa e (iii) transferência para a fase aquosa [Sevimli e Kinaci, 2002]. Entretanto, este é um sistema dependente, pois a concentração de ozônio dissolvido varia consideravelmente com a razão de decomposição do ozônio, o qual depende das características do efluente. Outro fator que pode afetar o processo de ozonização é a natureza dos produtos formados em determinado pH, pois em condições específicas, diferentes intermediários são predominantes [Alvarez *et al.*, 2001].

4.2.3 Influência da dose de ozônio na eficiência da ozonização

A influência da dose de ozônio na remoção de cor, fenóis totais e COT foi estudada para duas diferentes concentrações de ozônio 14 mg L^{-1} e 7 mg L^{-1} correspondente a um fluxo de oxigênio de 15 L h^{-1} e 8 L h^{-1} , respectivamente. Ambas as ozonizações foram realizadas em pH 10 durante 120 minutos.

O tratamento do efluente com maior dose de ozônio foi mais efetivo, tanto para redução de fenóis totais como descoloração. Para doses maiores de ozônio utilizado obteve-se redução de fenóis totais e descoloração de 50 e 67 %, enquanto que utilizando menor dose de ozônio, obteve-se apenas 39 e 32 % respectivamente (Figuras 4.6 e 4.7). A remoção de COT após 120 minutos de tratamento foi de 32 e 6 % para as doses de 14 mg L^{-1} e 7 mg L^{-1} , respectivamente (Figura 4.8). Portanto, o processo de ozonização para remoção da carga orgânica do efluente Kraft E₁ não foi eficiente, mesmo aplicando-se diferentes doses de ozônio, bem como alterações no pH do meio. Para a maior dose de ozônio aplicada, a eficiência de remoção para todos os parâmetros estudados também aumentou. O aumento da dose de ozônio aplicada deve aumentar a transferência de massa resultando num aumento da concentração de ozônio na fase aquosa [Sevimli e Kinaci, 2002].

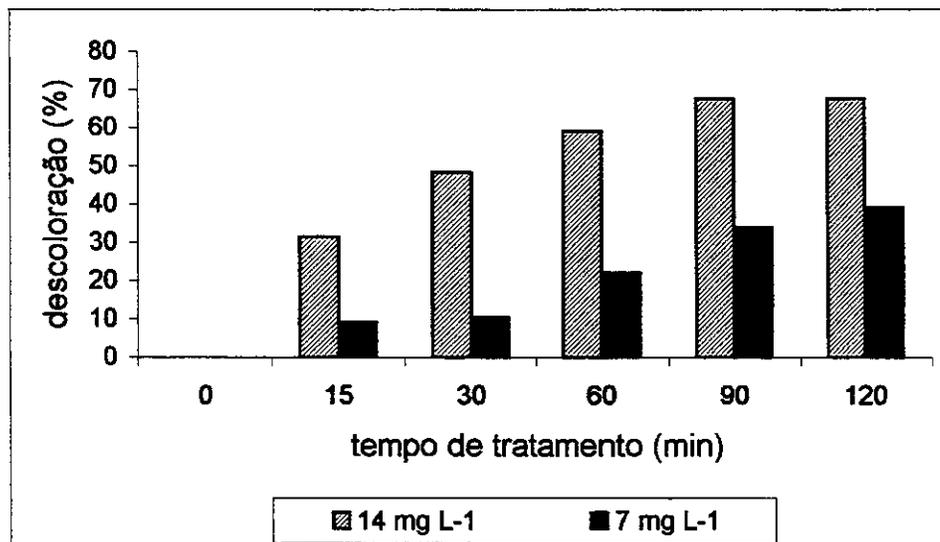


Figura 4.6 Descoloração do efluente ozonizado (pH 10) em diferentes doses de ozônio: 14 e 7 mg L⁻¹.

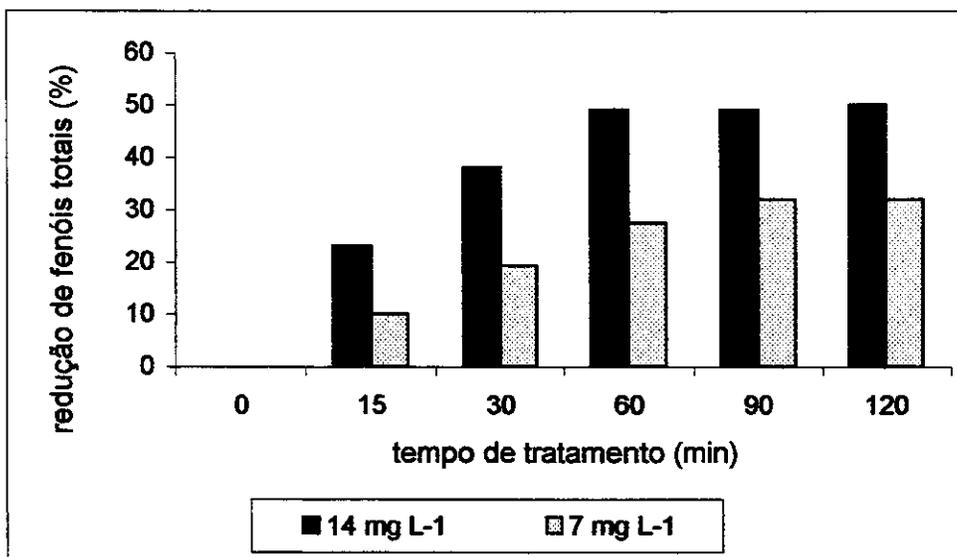


Figura 4.7 Redução de fenóis totais do efluente ozonizado (pH 10) em diferentes doses de ozônio: 14 e 7 mg L⁻¹.

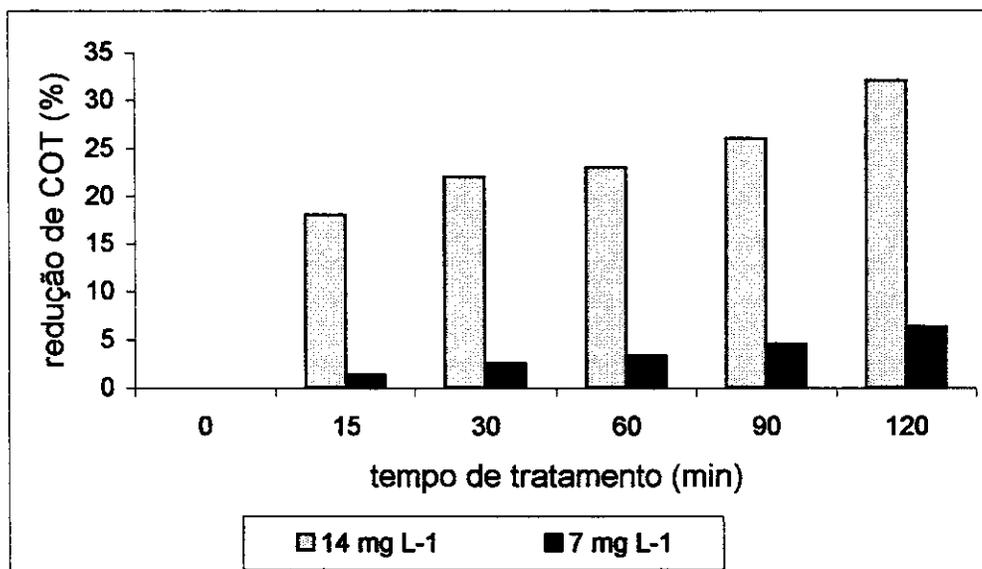


Figura 4.8 Redução de COT do efluente ozonizado (pH 10) em diferentes doses de ozônio: 14 e 7 mg L⁻¹.

4.2.4 Remoção de toxicidade por ozonização

Os problemas ambientais associados com as atividades das indústrias papeleras são numerosos e extensivamente documentados [Solomon, 1996; Freire *et al.*, 2000b; Mansilla, 2001]. Estes processos geram grandes volumes de efluentes de coloração escura, que contém espécies químicas persistentes de alta e baixa massa molecular as quais podem estar associadas com a toxicidade crônica e aguda. Foram dois os níveis tróficos da cadeia alimentar utilizados nos ensaios de toxicidade: produtor primário, representado pela alga *Selenastrum capricornutum* (cujo parâmetro avaliado é a inibição de crescimento) e consumidor, representado pelo micro-crustáceo *Artêmia salina* (sendo o único parâmetro avaliado a sobrevivência ou morte do organismo).

A toxicidade do efluente Kraft E₁ frente à alga *Selenastrum capricornutum* e ao micro-crustáceo *Artêmia salina*, foi avaliada antes (efluente bruto) e após (efluente tratado) o tratamento do efluente com ozônio a pH 10, durante 60 minutos, com o objetivo de verificar se a ozonização gerou produtos mais tóxicos

que seus precursores. A sensibilidade do organismo-teste frente ao efluente também foi avaliada.

No teste de toxicidade do efluente bruto, o crescimento da alga foi inibido em 100 % para todas as doses de efluente estudadas (compreendidas entre 8 e 75 %) o que significa morte dos organismos-teste, indicando que esta alga é bastante sensível ao efluente estudado. Para o efluente ozonizado, apenas para a dose de 8 % foi verificada inibição no crescimento da alga de 3,7 %, significando redução de toxicidade do efluente ozonizado (Figura 4.9). Nas demais doses estudadas, também foram observadas morte dos organismos-teste.

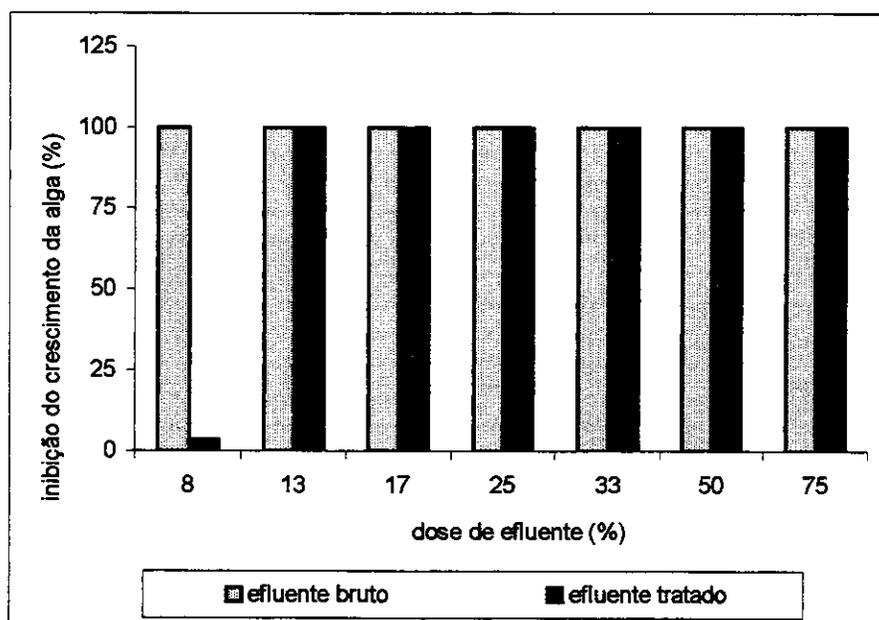


Figura 4.9 Inibição da taxa de crescimento da alga para várias diluições do efluente.

O teste de toxicidade com o micro-crustáceo *Artêmia salina*, não apresentou boa sensibilidade frente ao efluente estudado, tanto em pH neutro, como no pH original do efluente (pH \approx 10). Foram necessárias doses do efluente superiores a 90 % para resultar em morte de 10 a 20 % dos organismos-teste, em 24 h de exposição, tanto para o efluente bruto como tratado, evidenciando que este organismo-teste não se mostrou indicado para avaliação de toxicidade.

4.3 Conclusões parciais

As melhores condições de ozonização para tratamento do efluente Kraft E₁ foram em pH 10 e 14 mg L⁻¹ de O₃ o que resultou em 67 % de redução de cor e 50 % de fenóis totais em 120 min de tratamento. Porém, considerando-se do ponto de vista econômico, 60 minutos de tratamento foi bastante satisfatório, pois economiza parte do ozônio que seria consumido em 120 minutos, com pouco comprometimento dos resultados. Com relação às variações nas doses de ozônio e pH, tanto o aumento de pH como a redução da dose de ozônio utilizada, influenciaram o efeito de degradação, tornando o processo de remoção mais lento para todos os parâmetros estudados. A remoção de COT, bem como DQO do efluente mostraram-se pouco significativos, conseqüentemente, ineficientes para atingir a mineralização.

O teste de toxicidade (frente à alga *Selenastrum capricornutum*) realizado em efluente Kraft E₁ tratado com ozônio, permitiu verificar a redução da toxicidade quando comparada com o efluente bruto, indicando que o tratamento com ozônio não gerou produtos mais tóxicos que seus precursores.

4.4 TRATAMENTO ENZIMÁTICO

4.4.1 Produção de lacase

A lacase extra-celular produzida a partir do fungo *Trametes versicolor* em meio líquido apresentou atividade média final de 6500 U L⁻¹ em 1600 mL de caldo de cultivo após 18 dias (espectrofotometricamente, utilizando siringaldazina como substrato enzimático, a 525 nm) [Bollag e Leonowicz, 1984; Minussi, 2002]. A produção de lacase foi acompanhada periodicamente obtendo-se o perfil de cada amostra, como observado na Figura 4.10 (foram utilizados 8 Erlenmeyers com 200 mL de caldo de cultivo cada – amostras de A à H). A adição do indutor xilidina ao caldo de cultivo no quarto dia da produção foi fundamental para o aumento da atividade enzimática no meio, tendo sido obtido 10600 U L⁻¹ na amostra H no 14°

dia. A partir do 14º dia de incubação foi observado que a atividade de lacase no meio estabilizou ou decaiu para a maioria das amostras, optando-se pelo encerramento do ensaio. O volume total do caldo enzimático liofilizado produziu 11,5 g do extrato bruto da lacase (LAC) (Tabela 4.3). Esta foi utilizada nos procedimentos de imobilização e semi-purificação da enzima.

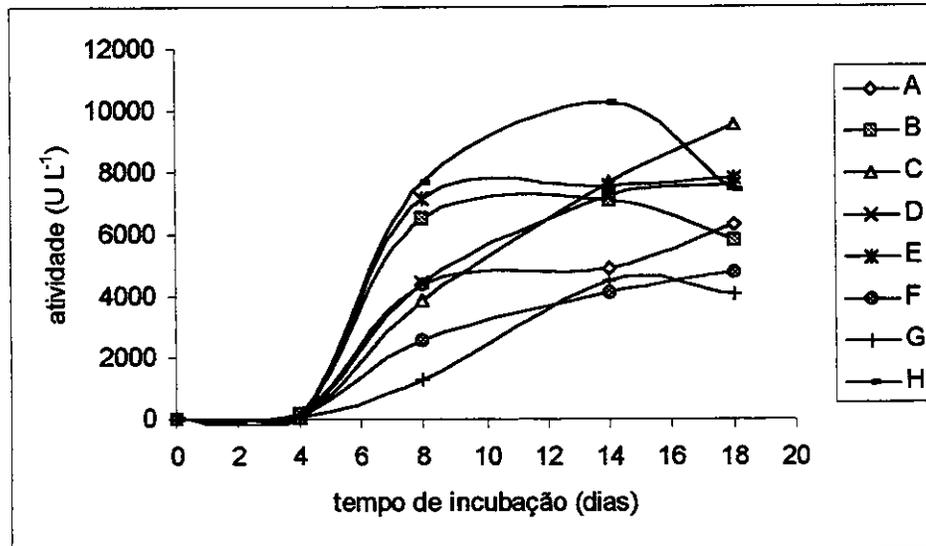


Figura 4.10 Atividade enzimática medida durante a produção de lacase pelo fungo *Trametes versicolor*. Amostras individuais de A à H.

Tabela 4.3 Resultados obtidos na produção do extrato bruto liofilizado de lacase.

massa total g	atividade* U g ⁻¹	proteína mg g ⁻¹	atividade específica** U mg ⁻¹
11,5	456	238	1,9

* utilizando siringaldazina como substrato enzimático

** atividade por mg de proteína

Pela determinação da atividade específica é possível avaliar o grau de purificação de uma enzima. A lacase semi-purificada obtida a partir do extrato bruto liofilizado (testada nos experimentos de imobilização), apresentou uma atividade específica 50 vezes maior do que a lacase extrato bruto; podendo chegar ao redor de 100 vezes ou mais até obtê-la totalmente purificada. No estudo de produção e purificação de lacase de *Trametes versicolor* realizado por Minussi (2002), foram identificadas duas isoformas dessa enzima. Parâmetros cinéticos como K_M (usados para prever a habilidade de uma enzima em se ligar ao substrato) foram calculados, possibilitando principalmente a caracterização da mesma. O processo de purificação de uma enzima geralmente apresenta elevado custo (resultado da necessidade de várias etapas de tratamento), contribuindo para inviabilizar seu uso. Devido a isto, foi estudada a utilização do extrato bruto da lacase não purificado comparando-se com a enzima semi-purificada, no processo de imobilização enzimática, visando sua aplicação no tratamento de efluente papeleiro.

4.4.2 Estudos de imobilização de lacase em suportes sólidos

Existem várias técnicas que podem ser aplicadas para imobilizar enzimas sobre suportes sólidos, baseados principalmente sobre mecanismos químicos e físicos, que apresentam vantagens e desvantagens dependendo de uma variedade de fatores, por exemplo, mudanças conformacionais que podem ocorrer na imobilização covalente de uma enzima, levando a subseqüentes alterações na sua atividade específica; perda de estabilidade da enzima ligada por imobilização física, etc. Para a escolha do melhor suporte sólido para imobilização da lacase foram considerados vários métodos disponíveis na literatura [Durán *et al.*, 2002], optando-se pela montmorilonita KSF e Eupergit®C, avaliando os melhores resultados entre imobilização química e física para parâmetros como, atividade catalítica, desativação cinética, toxicidade de reagentes de imobilização, aplicação, etc.

4.4.3 Imobilização de lacase em montmorilonita KSF por ligações covalentes e por adsorção

A lacase foi imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF seguindo a estratégia de silanização (ver introdução, Figura 1.9) [Messing, 1975; Gianfreda e Bollag, 1994], obtendo-se uma imobilização de 55 % de atividade e 32 % de teor de proteína. Os resultados de retenção de atividade e proteína da enzima sobre o suporte sólido, foram obtidos por análises realizadas no volume total das soluções de lavagens, sendo então subtraídos dos valores de atividade e proteína da solução enzimática inicial. Esta forma de análise mostrou-se eficiente e prática para o acompanhamento dos ensaios de imobilização.

A imobilização da enzima por adsorção em montmorilonita KSF apresentou 15 % de atividade e 33 % de teor de proteína, muito inferior ao valor obtido pela imobilização covalente no mesmo suporte (Tabela 4.4). Este procedimento mostrou-se interessante por ser mais rápido e simples, porém inviável pelos resultados obtidos.

Tabela 4.4 Resultados obtidos na imobilização da lacase em montmorilonita KSF por ligações covalentes e por adsorção.

Enzima imobilizada	Suporte seco (g)	atividade imobilizada		proteína imobilizada	
		(U g ⁻¹)	(%)	(mg g ⁻¹)	(%)
LIM (ligações covalentes)	0,800	6,5	55	1,2	32
LIM (adsorção)	0,500	1,8	15	1,1	33

LIM: lacase imobilizada em montmorilonita KSF

Entre esses dois processos avaliados, imobilização química e física, o primeiro mostrou-se mais eficiente, sendo utilizado na continuidade dos estudos de imobilização enzimática. Esses resultados estão de acordo com a literatura [Durán *et al.*, 2002], pois os métodos físicos, como adsorção, dependem da

captação das moléculas da enzima dentro dos poros da matriz que variam, por exemplo, com o tamanho da enzima, tamanho do poro, estabilidade da enzima ligada, pois as interações são fracas (Van Der Waals). No entanto, a imobilização química utiliza ligações covalentes, que são interações fortes entre a enzima e a matriz, o que favorece o processo de imobilização, ou seja, uma vez ligada, a enzima adquire maior estabilidade sobre o suporte.

4.4.4 Estudos comparativos entre imobilização da lacase (covalentemente) em Eupergit® C e montmorilonita KSF

Na busca por um suporte para imobilização da lacase com melhores resultados, de fácil manipulação e aplicação inclusive em reatores enzimáticos testou-se o suporte Eupergit®C, conforme procedimento de D'Aniballe *et al.* (2000), comparativamente com a montmorilonita KSF (imobilização covalente).

Para ambos os procedimentos de imobilização, em montmorilonita KSF e em Eupergit®C, foram utilizadas lacase extrato bruto e semi-purificada com atividade inicial para ambas de aproximadamente 10 U g⁻¹ de suporte seco, objetivando avaliar as vantagens ou desvantagens em usar a enzima extrato bruto. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 4.5 e Figura 4.11.

Tabela 4.5. Imobilização de lacase em montmorilonita KSF e Eupergit®C.

Amostras	Proteína imobilizada		Atividade imobilizada	
	mg g ⁻¹ suporte	%	U g ⁻¹ suporte	%
LIM EB	1,5	30	7,3	61
LIM SP	0,9	50	7,6	70
LIE EB	1,9	51	9,1	100
LIE SP	1,9	100	10,7	100

Onde: LIM EB (lacase extrato bruto imobilizada em montmorilonita KSF)

LIM SP (lacase semi-purificada imobilizada em montmorilonita KSF)

LIE EB (lacase extrato bruto imobilizada em Eupergit® C)

LIE SP (lacase semi-purificada imobilizada em Eupergit® C)

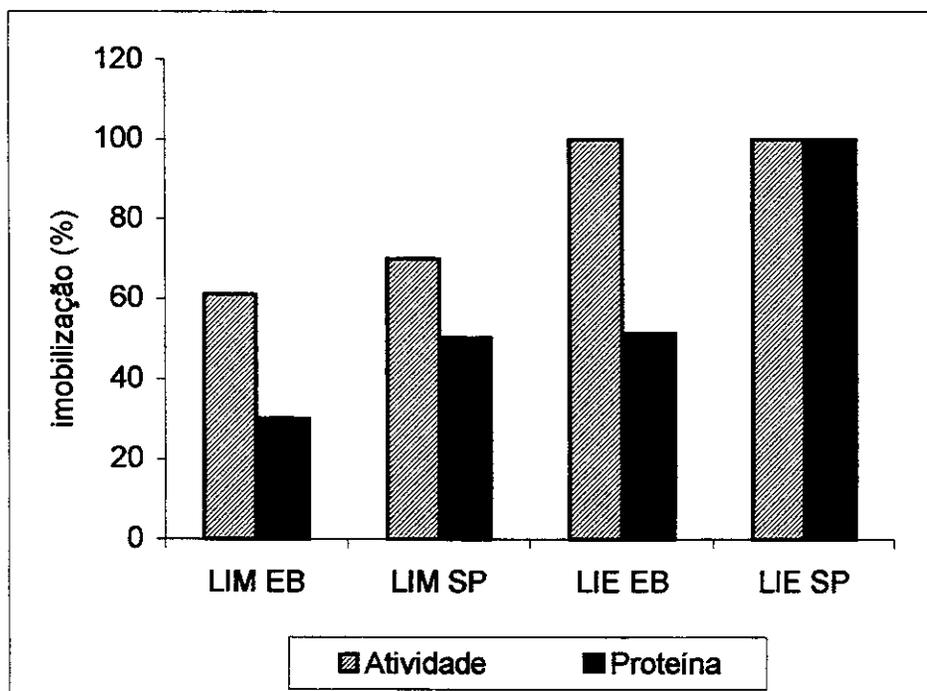


Figura 4.11 Resultados de imobilização do extrato bruto e da lacase semi-purificada em ambos os suportes montmorilonita KSF e Eupergit®C.

Montmorilonita KSF mostrou 70 e 61 % de retenção de atividade proveniente da lacase semi-purificada e extrato bruto, respectivamente. No caso da imobilização de proteínas, foram obtidos valores de 50 e 30 %. Eupergit®C apresentou 100 % de capacidade de imobilização, para ambas, atividade e proteína, com o uso da lacase semi-purificada. Os resultados com lacase extrato bruto mostraram 100 % de imobilização de atividade e somente 51 % de imobilização de proteína. Isto se deve provavelmente a presença de grande quantidade de outros tipos de proteínas existentes no extrato bruto da lacase. Os valores da atividade específica inicial para a lacase extrato bruto e semi-purificada de 2,4 e 5,5 U mg⁻¹ de proteínas, respectivamente, justificam este fato, pois foi utilizada a mesma quantidade de atividade enzimática inicial para ambas (aproximadamente 1000 U L⁻¹). Comparando ambos os suportes, o Eupergit®C mostrou-se como o mais eficiente para ser utilizado na imobilização da lacase, bastante superior a montmorilonita KSF, tendo como vantagens adicionais

facilidade no processo de imobilização, ausência de resíduos tóxicos, além de ser de baixo custo. Os resultados obtidos com a lacase extrato bruto e semi-purificada não justificam o uso desta última, pois ambas apresentaram 100 % de retenção de atividade enzimática. A preferência pela utilização do suporte Eupergit®C é confirmada pela praticidade em utilizá-lo em reatores enzimáticos, visando o tratamento de efluente industrial.

4.4.5 Teste para reuso da lacase imobilizada

O método de análise para determinação da atividade enzimática da lacase, por espectrofotometria, usando siringaldazina como substrato, é bastante eficiente e prático para utilização com enzima livre, porém é ineficaz para análise da atividade da enzima depois que ela está imobilizada no suporte sólido. Devido a isto, foi necessário o uso de outra técnica de análise de atividade enzimática, medida através do consumo de oxigênio dissolvido na presença de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP), em $\mu\text{mol min}^{-1}$ de O_2 [D'Annibale *et al.*, 1996]. Este tipo de análise é importante pois evidencia se a enzima foi de fato imobilizada no suporte, com retenção de sua atividade, já que o processo de imobilização utilizado pode provocar mudanças na estrutura da enzima, comprometendo seu sítio ativo.

4.4.5.1 Reuso da lacase imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF

O reuso da lacase imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF (LIM), foi estudada com adições consecutivas de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) no meio enzimático. A atividade da LIM no primeiro ciclo foi de $0,390 \mu\text{mol min}^{-1}$ de O_2 . Em adições subseqüentes, no mesmo reator, observou-se uma diminuição da atividade em relação ao primeiro ciclo, ficando ao redor de 86 % no segundo ciclo e 80 % no terceiro ciclo ($0,300 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1}$), tornando-se praticamente constante até o oitavo ciclo (Figura 4.12). O decréscimo da atividade inicial de $0,390$ para $0,300 \mu\text{mol O}_2 \text{ min}^{-1}$ é possivelmente devido ao sítio ativo da lacase ter sido

afetado pela concentração inicial de quinona (produto da reação) até o terceiro ciclo. Depois dessa etapa, a enzima foi insensível a este intermediário na oxidação de 2,6-DMP. Dados da literatura suportam a observação de que a acumulação de estruturas quinonóicas sobre a matriz pode levar a parcial inibição da atividade da lacase immobilizada [D'Annibale *et al.*, 1999]. Estes resultados mostraram que a lacase immobilizada covalentemente sobre montmorilonita KSF permaneceu inalterada depois de oito ciclos, apresentando nenhuma inativação. Esta análise foi muito importante, pois foi possível verificar que a imobilização (covalente) da lacase sobre este suporte não sofreu alterações em suas propriedades catalíticas, sendo viável seu reuso.

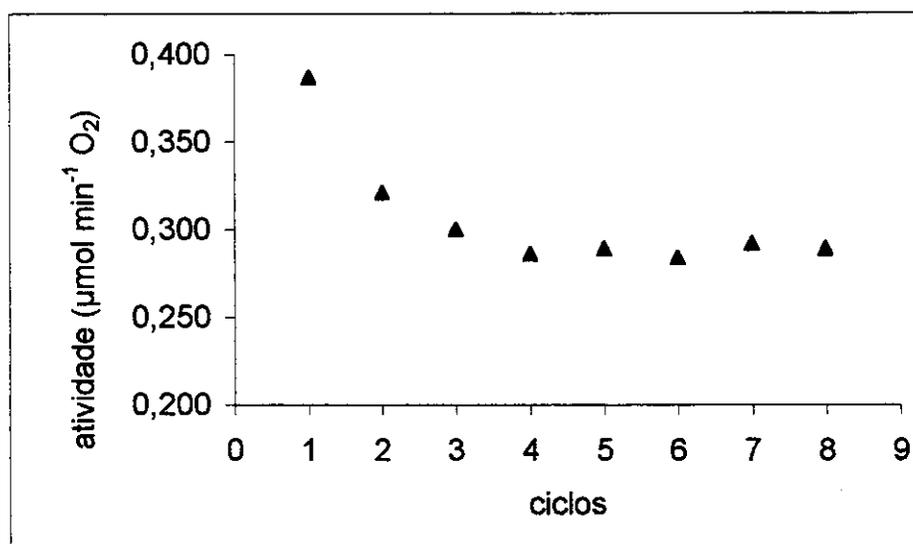


Figura 4.12 Reuso da lacase immobilizada em montmorilonita KSF (LIM) na presença de 2,6-Dimetoxifenol em oito ciclos.

4.4.5.2 Reuso da lacase immobilizada covalentemente em Eupergit[®]C

A lacase immobilizada covalentemente em Eupergit[®]C (LIE) foi estudada em dois níveis de retenção de atividade, LIE A e B com aproximadamente 9 e 100 U g⁻¹ de suporte seco, com 100 e 94 % de imobilização, respectivamente (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Resultados de atividade imobilizada de lacase extrato bruto em Eupergit®C.

Amostra	atividade inicial (siringaldazina)	atividade imobilizada	
	U L ⁻¹	U g ⁻¹ suporte	%
LIE A	906	9,0	100
LIE B	10752	101,0	94

Onde: LIE (lacase imobilizada em Eupergit®C)

O reuso da LIE A e B foi testado com adições consecutivas de 2,6-DMP, no meio enzimático. Pelos resultados apresentados na Tabela 4.7, foi verificado que a imobilização covalente da lacase com este suporte não alterou suas propriedades catalíticas, ou seja, a afinidade da lacase pelo substrato permaneceu praticamente inalterada depois da adição de 2,6-DMP em dez ciclos consecutivos, sem alterações significativas da atividade para ambas as enzimas estudadas. Entretanto, comparando-se os valores médios de atividade de LIE A e LIE B por consumo de oxigênio dissolvido (em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{O}_2$), esperava-se que a LIE B apresentasse um desempenho aproximadamente 10 vezes maior do que a LIE A, o que não ocorreu, ficando ao redor de 6 vezes. Portanto, a utilização de 100 U g⁻¹ de suporte no processo de imobilização com a lacase extrato bruto não foi eficiente, indicando a utilização de quantidades menores de atividade inicial. Desta forma, um novo experimento nas mesmas condições foi realizado partindo-se de 31 U g⁻¹ de suporte para LIE C (100 % de atividade imobilizada). O valor de atividade de LIE C por consumo de oxigênio dissolvido foi de 0,503 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{O}_2$, coerente com os resultados obtidos para LIE A. Em função desses resultados, foi utilizada a condição de imobilização de LIE C para montagem do reator enzimático para tratamento do efluente Kraft E₁.

Tabela 4.7 Resultados do reuso da lacase imobilizada em Eupergit®C.

ciclos	LIE A atividade ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{O}_2$)	LIE B atividade ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{O}_2$)
1	0,177	1,213
2	0,167	1,197
3	0,189	1,293
4	0,172	0,986
5	0,171	1,150
6	0,193	1,074
7	0,199	1,306
8	0,184	1,210
9	0,189	0,905
10	0,188	0,787
média	0,18	1,11
desvio padrão	0,01	0,17
% desvio padrão	5,82	15,4

Onde: LIE A (lacase imobilizada em Eupergit®C com 9 U g⁻¹ de suporte seco)

LIE B (lacase imobilizada em Eupergit®C com 100 U g⁻¹ de suporte seco)

4.4.6 Degradação de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) por lacase livre (LAC) e imobilizada covalentemente em montmorilonita KSF (LIM) na presença e ausência de HBT

A habilidade da enzima livre e imobilizada em transformar 2,4-DCP foi estudada como um modelo para degradação de fenóis. Na Figura 4.13 observa-se que a quantidade de 2,4-DCP oxidada pela lacase LIM e LAC aumentou rapidamente durante o tempo inicial da incubação (15 min).

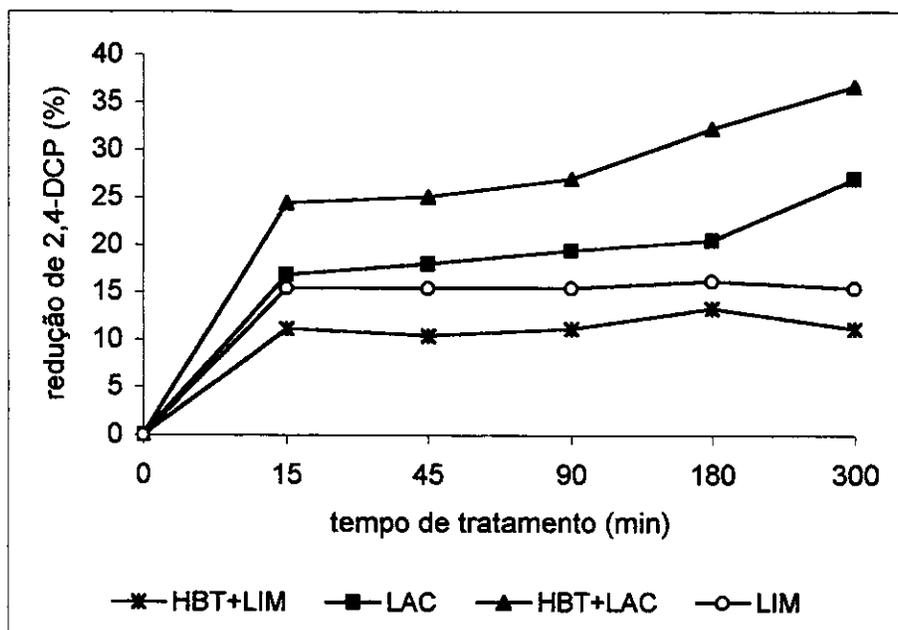


Figura 4.13 Degradação de 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) por lacase livre (LAC) e imobilizada em montmorilonita KSF (LIM) na presença e ausência de 1-hidroxibenzotriazol (HBT).

Estes resultados mostraram 25 e 35 % de degradação de 2,4-DCP por lacase livre na ausência e presença de HBT, respectivamente, observando-se um pequeno efeito do mediador no sistema após 300 min. Porém, a lacase imobilizada (LIM) na presença do mediador não apresentou efeito na degradação de 2,4-DCP, inclusive apresentando resultados inferiores ao sistema sem mediador. Isto se deve provavelmente ao fato do mediador não interagir eficientemente com a enzima imobilizada, inclusive prejudicando seu desempenho [Baiocco, 2003]. Entretanto quando foram comparadas, lacase livre (LAC) e imobilizada (LIM), esta última mostrou-se menos eficiente (ao redor de 12 a 15 % de redução). Isto pode ser explicado pela mudança da conformação estrutural da enzima quando esta foi imobilizada, ou seja, não apresentando boa interação com este substrato, nestas condições [Bailey e Ollis, 1986].

4.4.7 Tratamento de efluente Kraft E₁ por lacase livre (LAC) e imobilizada em Eupergit[®]C (LIE A e B)

A redução da concentração de fenóis totais em efluente Kraft E₁, em ambas LIE A e B, com atividade de 9 e 100 U g⁻¹ de suporte, respectivamente, mostraram resultados melhores do que a LAC em 24 h, bem como durante todo o tempo de tratamento (Figura 4.14). A LIE B apresentou maior redução de fenóis totais (40 % em 24 h) comparada com as demais. Em apenas 3 h de tratamento, a LIE B já havia reduzido em mais de 30 % a concentração de fenóis totais do efluente Kraft E₁. Estes resultados confirmam a superioridade da lacase imobilizada sobre a livre para o tratamento do efluente Kraft E₁, bem como a eficiência do processo de imobilização da lacase neste suporte.

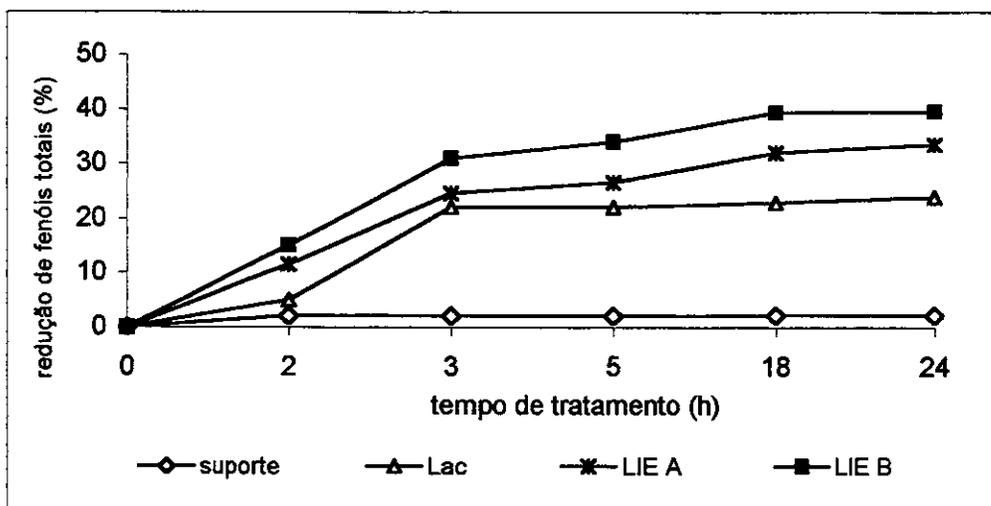


Figura 4.14 Redução de fenóis totais (C_0 (fenóis totais) = 27 mg L⁻¹) em efluente Kraft E₁ por lacase livre (LAC 1000 U L⁻¹) e imobilizada em Eupergit[®]C: LIE A (9 U g⁻¹) e LIE B (100 U g⁻¹).

4.4.8 Reator enzimático - Tratamento de efluente Kraft E₁ com lacase imobilizada em Eupergit®C (LIE)

Foi montado um reator enzimático com a enzima imobilizada LIE (contendo 31 U g⁻¹ de suporte seco; massa total = 10,0 g). O pH do efluente Kraft E₁ foi corrigido para 5 (melhor faixa de atuação da lacase). O volume de 400 mL do efluente foi recirculado dentro da coluna do reator utilizando um fluxo de 8,0 mL min⁻¹, por 120 min, resultando num total de 24 ciclos. O tratamento foi avaliado para redução de cor, COT e fenóis totais. Os resultados mostraram 34 % de redução de fenóis totais em 120 min de tratamento, enquanto que a redução de COT foi de 13 % e de cor menor que 5 %. Entretanto, com 45 min de tratamento a redução de fenóis totais ficou ao redor de 30 %, indicando que o tempo de tratamento pode ser reduzido sem significativa perda de eficiência. Estes resultados indicam que o reator enzimático mostrou-se eficiente para redução de fenóis totais, mas não para redução de cor e mineralização do efluente (Figura 4.15).

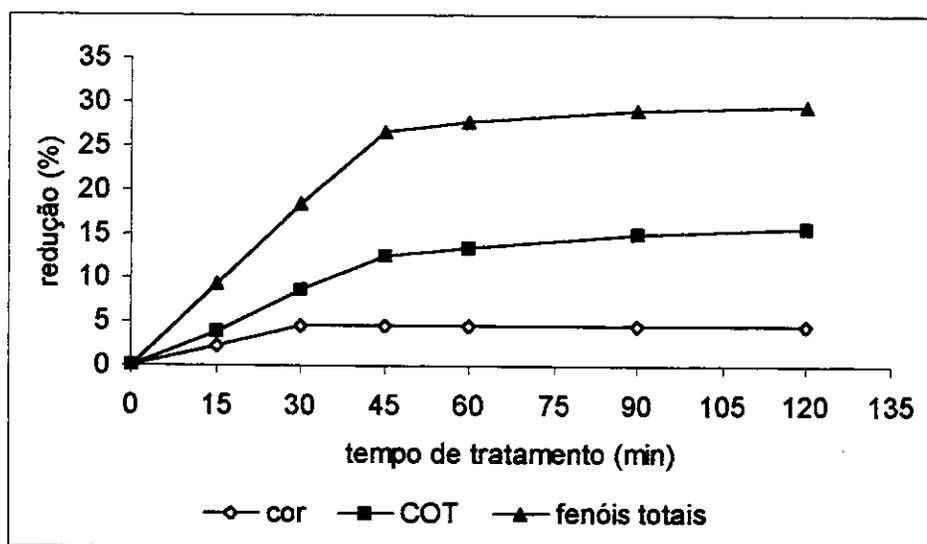


Figura 4.15 Redução da concentração de Cor, COT, Fenóis totais, no tratamento de efluente Kraft E₁ com LIE (pH 5; Abs₀ = 0,172; C₀ (COT) = 832 mg L⁻¹; C₀ (fenóis totais) = 29 mg L⁻¹).

4.5 Tratamento de efluente Kraft E₁ por processo combinado

4.5.1 Processo combinado ozonização e lacase imobilizada em Eupergit® C

O efluente foi ozonizado em pH 10, a temperatura ambiente, por 60 minutos. O volume da amostra ozonizada foi de 400 mL, numa vazão de entrada do gás de 15 L h⁻¹ de O₂ resultando numa concentração de O₃ no gás de 14 mg L⁻¹. Na seqüência, foi aplicado o tratamento com a lacase imobilizada. Foi montado um reator enzimático com a enzima imobilizada LIE (contendo 31 U g⁻¹ de suporte seco; massa total = 10,0 g). O pH do efluente Kraft E₁ foi corrigido para 5 (melhor faixa de atuação da lacase). O volume de 400 mL do efluente foi recirculado dentro da coluna do reator utilizando um fluxo de 8,0 mL min⁻¹, por 120 min, resultando num total de 24 ciclos. O tratamento combinado apresentou 52 % de redução para fenóis totais, no processo com ozônio e adicionalmente 18 % de redução com a LIE (resultando em 70 % de redução no tratamento total). A redução para cor foi de 76 % na ozonização e nenhuma redução significativa para a LIE. Portanto, os resultados obtidos no tratamento do efluente por processo combinado O₃/LIE para redução de fenóis totais, mostrou um importante acréscimo com o tratamento enzimático (Figura 4.16).

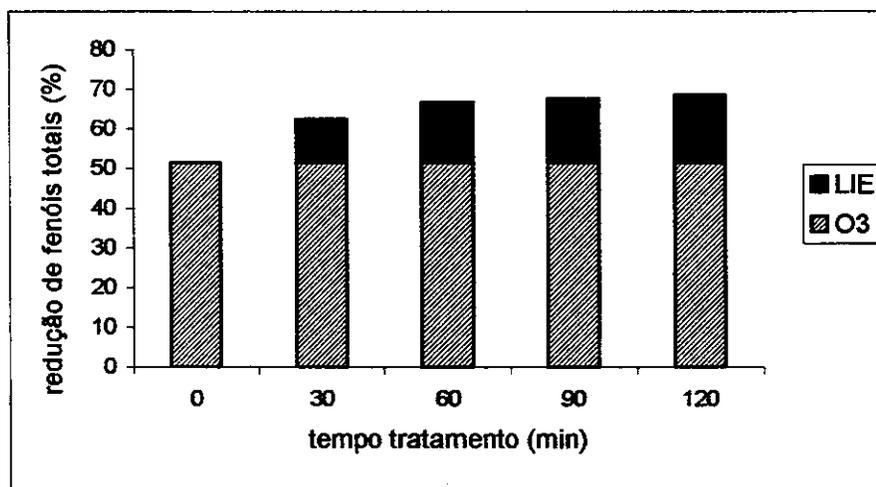


Figura 4.16 Redução da concentração de Fenóis totais, no tratamento combinado O₃/LIE (pH 5; C₀ (fenóis totais) = 26 mg L⁻¹) em efluente Kraft E₁.

4.5.2 Processo combinado lacase immobilizada em Eupergit® C e ozonização

Este tratamento combinado foi realizado inicialmente pelo processo enzimático seguido da ozonização (vice-versa do item 4.5.1). Os resultados para redução de cor foram menores que 5 % com o processo enzimático e 80 % com a ozonização. Foram observados 32 % de redução de fenóis totais com o tratamento enzimático, porém, com o subsequente tratamento de ozonização houve um aumento da concentração de fenóis totais no efluente em 60 minutos (LIE/C_0 (fenóis totais) = 22 mg L⁻¹; O_3/C_0 (fenóis totais) = 15 mg L⁻¹; O_3/C (fenóis totais) = 24 mg L⁻¹). Provavelmente isto ocorreu devido à presença de estruturas quinonóicas no efluente pós-tratamento enzimático (produtos característicos de oxidação de substratos fenólicos pela lacase), que teriam sofrido hidroxilação durante o tratamento de ozonização (o pH do efluente teve que ser ajustado para 10 antes do tratamento com ozônio). Mvula e Sonntag (2003), estudaram produtos da ozonólise de fenóis em soluções aquosas, em pH 3, 7 e 10 tais como: catecol, hidroquinona, 2-hidroxi-benzoquinona, 1,4-benzoquinona, 2,4-dihidroxibifenil que evidenciam tais fatos. Os resultados obtidos indicaram que o processo combinado LIE/O₃ não foi eficiente para o tratamento de efluente Kaft E₁.

5. CONCLUSÕES FINAIS

As melhores condições de ozonização para tratamento do efluente Kraft E₁ foram em pH 10 e 14 mg L⁻¹ de O₃ o que resultou em 67 % redução de cor e 50 % de fenóis totais em 120 min de tratamento. Porém, considerando-se do ponto de vista econômico, 60 minutos de tratamento é bastante interessante, pois reduz parte do ozônio que seria consumido, com pouco comprometimento dos resultados. Com relação às variações nas doses de ozônio e pH, tanto o aumento de pH como a redução da dose de ozônio utilizada, influenciaram o efeito de degradação, tornando o processo de remoção mais lento para todos os parâmetros estudados. A remoção de COT, bem como DQO do efluente mostraram-se pouco significativos, conseqüentemente, ineficientes para atingir a mineralização.

Os testes de toxicidade realizados em efluente papaleiro tratado com ozônio permitiram verificar a redução da toxicidade (frente alga *Selenastrum capricornutum*) quando comparada com o efluente bruto, indicando que o tratamento com ozônio não gerou produtos mais tóxicos que seus precursores. O teste de toxicidade com o micro-crustáceo *Artêmia salina*, não apresentou boa sensibilidade frente ao efluente estudado, evidenciando que este organismo-teste não se mostrou indicado para avaliação de toxicidade.

Os ensaios para escolha de um suporte eficiente e viável para imobilização da enzima apresentaram ótimos resultados, inclusive na montagem de um reator enzimático. A lacase imobilizada covalentemente sobre montmorilonita KSF apresentou 55 % de atividade, permanecendo ativa frente ao substrato 2,6-dimetoxifenol, para reuso em vários ciclos. O suporte Eupergit[®]C mostrou uma ótima capacidade de imobilização (31 U g⁻¹ de suporte, correspondendo a 100 % de atividade) e a lacase imobilizada covalentemente neste suporte mostrou-se ativa frente ao substrato 2,6-dimetoxifenol, para reuso em vários ciclos. Quando comparada com montmorilonita KSF, apresentou grande superioridade frente a esta. A Lacase imobilizada em Eupergit[®] C (LIE) mostrou bons resultados na degradação de fenóis totais em efluente Kraft E₁ (34 % em 120 min de

tratamento), redução de COT (13 %) e cor (< 5 %), indicando que o reator enzimático mostrou-se eficiente para redução de fenóis totais, mas não para descoloração e mineralização do efluente.

O tratamento combinado O₃/LIE apresentou redução de cor do efluente de 76 % somente no processo de ozonização e mínima redução no processo enzimático. Entretanto, o tratamento para redução de fenóis totais no efluente foi de 70 %, com um importante acréscimo obtido pelo tratamento enzimático. Porém, o processo combinado LIE/O₃ não foi eficiente para o tratamento de efluente Kaft E₁.

6. REFERÊNCIAS

- Alberti B.N., Klibanov A.M., *Biotechnol. Bioeng.*; 3:373-379 (1981).
- Alvarez A.B.C., Diaper C., Parsons S.A., *Environ. Technol.*; 22:409-427 (2001).
- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater , 19^a ed. New York, American Public Health Association. N^o 5220 C 5-12,1995.
- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18^a ed. New York, American Public Health Association. N^o 5550 B, 5-41 (1992).
- APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18^a ed. New York, American Public Health Association. N^o 5310 B 5-11 (1992).
- Arslan I., Balcioglu I.A., Tuhkanen T., *Water Sci. Technol.*; 42:13 -18 (2000).
- Bailey J.E., Ollis D.F. (Eds), *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2^a Ed. McGraw-Hill Publ. N.Y., p. 157 (1986).
- Baiocco P., Barreca A.M., Fabbrini M., Galli C., Gentili P., *Org. Biomol. Chem.*; 1:191-197 (2003).
- Balakrishnan P.A., Arunagiri A., Rao P.G., *J. Electrostat*, 56:77-86 (2002).
- Balcioglu I.A; Arslan I., *Water Sci. Technol.*; 43:221-228 (2001).
- Barr D.P., Aust S.D., *Environ. Sci. Tecnol.*; 28:78-87 (1994).
- Bollag J.M., Leonowicz A., *Appl. Environ. Microbiol.*; 48:849-854 (1984).
- Buitrón G., Gonzáles A., *Water Sci. Technol.*; 34:764-771 (1996).
- Call H.P., Mücke I., *J. Biotechnol.*; 53:163-202 (1997).
- Campanella L., Beone T., Sammartino M.P., Tomassetti M., *Analyst*, 118:979-984 (1993).
- Castro A.I.R.P., Evtuguin D.V., Xavier, A.M.B., *J. Mol. Catal.B: Enzym.*; 22:13-20 (2003).
- Chiou C., Mariñas B.J., Adams J.Q., *Ozone Scie. & Eng.*; 17:329-344 (1995).
- Chiron S., Fernandez-Alba A., Rodrigues A., Garcia-Calvo E., *Water Res.*; 32:366-377 (2000).
- D'Annibale A., Celletti D., Di Mattia E., Felici F., Sermanni G.G., *Acta Biotechnol.*; 16:257-270 (1996).

- D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Di Mattia E., Sermanni G.G., *Process Biochem.*; 34:697-706 (1999).
- D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Sermanni G.G., *J. Biotechnol.*; 77:265-273 (2000).
- Durán N., Esposito E., *Appl. Catalysis B: Environ.*; 714:1-17 (2000).
- Durán N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L., *Enzyme Microb. Technol.*; 31: 907-931 (2002).
- Eggert C., Temp U., Eriksson K.E.L., *Appl. Environ. Microbiol.*; 62:1151-1158 (1996).
- Eisenthal R., Danson M.J., *Enzyme Assays a practical approach*. IRL Press at Oxford, University Press: Oxford, Cap. 6 (1995).
- Esplugas S., Gimenez J., Contreras S., Pascual E., Rodriguez M., *Water Res.*; 36: 1034-1042 (2002).
- Evans T., Sweet B., Manoluscu D., Mason J., *Pulp Paper Can.*; 96:60-65 (1995).
- Freire R.S., Kubota L.T., Durán N., *Environ. Technol.*; 22:897-903 (2001).
- Freire R.S., Pelegrini R., Kubota L.T., Durán N., *Quim. Nova*; 23:504-511 (2000a).
- Freire R.S., Kunz A., Durán N., *Environ. Technol.*; 21:717-721 (2000b).
- Fukushima Y., Kirk T.K., *Appl. Environ. Microbiol.*; 61(3):872-876 (1995).
- Gagnon G.A., Booth S.D.J., Peldszus S., Mutti D., Smith F., Huck P.M., *J. Amer. Water Works Assoc.*; 89:88-97 (1997).
- Gianfreda L., Bollag J.M., *Soil Sci. Soc. Am. J.*; 58:1672-1681 (1994).
- Gianfreda, L., Bollag J.M., *Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants*. In: R.G. Burns and R.P. Dick (eds.) Inc., New York. p. 495-538 (2002).
- Hatakka A., *Microbiol. Rev.*; 13:125-135 (1994).
- Hublik G., Schinner F., *Enzyme Microb. Technol.*; 27:330-336 (2000).
- Itoh K., Fujita M., Kumano K., Suyama K., Yamamoto H., *Soil Biol. Biochem.*; 32:85-91 (2000).
- Karahanian E., Corsini G., Lobos S., Vicuna R., *Biochim. Biophys. Acta*; 1443:65-74 (1998).

- Karam J., Nicell J.A., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*; 69:141-153 (1997).
- Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*; 10:157-176 (2000).
- Kirk T.K., Farrell R.L., *Ann. Rev. Microbiol.*; 41: 465-505 (1987).
- Kraemer D.M., Lehmann K., Pennewiss M., Plainer H., In: Peeters, H. Ed., *Protides of Biological Fluids, 23rd Colloquium*, Pergamon, Oxford, 501-511 (1975).
- Kunz A., Freire R.S., Rohwedder J.J.R., Durán N., Mansilla H., Rodriguez J., *Quim. Nova*; 22:425-428 (1999).
- Kunz A., Mansilla H.D., Durán N., *Environ. Technol.*; 23:911-918 (2002).
- Langlais B., Legube B., Beuffe M., Doré M., *Water Sci. Technol.*; 25:135-143 (1992).
- Leisola M.S.A., Fiechter A., *Adv. Biotechnol. Process*; 5: 59-89 (1985).
- Lin S.H., Yeh K.L., *Chem. Eng.*; 100:112-118 (1993).
- Livemoché D., Jurasek L., Desrochers M., Dorica J., *Biotechnol. Bioeng.*; 25:2055-2065 (1983).
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *J. Biol. Chem.*; 193:265 (1951).
- Malmström B.G., Andréasson L.E., Reinhammar B., *Copper-containing oxidases and superoxide dismutase*. In: Boyer, P.D. *The enzymes*. New York: Academic Press, p. 507-579 (1975).
- Mansilla H.D., Lizama C., Gutarra A., Rodríguez J., *Ciencia y Tecnología para el Desarrollo -CYTED*. Editado por Miguel A. Blesa; p. 285-294 (2001).
- Mansur M., Suarez T., Gonzalez A.E., *Appl. Environ. Microbiol.*; 64:771-774 (1998).
- Masten S.J., Davies S.H.R., *Environ. Sci. Technol.*; 28:181-185 (1994).
- McMillin D.R., Eggleston M.K., *Bioinorganic chemistry of laccase*. In: *Multi-Copper Oxidases*, Messerschmidt, A. (ed.), p. 129-166 (1997).
- Messing R.A., Academic Press, N. York, p. 225 (1975).
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam, L.B., Jacobsen D.E., Nichols D.E., McLaughlin J.L., *J. Med. Plant Res.*; 45:31-34 (1982).
- Milstein O., Nicklas B., Huettermann A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 31:70-74 (1989).

- Minussi R.C., Pastore G.M., Durán N., *Trends Food Sci. Technol.*; 13:205-216 (2002).
- Minussi R.C., *Produção, purificação, caracterização e aplicação industrial de lacase fúngica*. Tese de doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas (2002).
- Mvula E., Von Sonntag C., *Org. Biomol. Chem.*; 1:1749-1756 (2003).
- Nakamura Y., Sawada T., Kobayashi F., Godliving M., *Water Sci. Technol.*; 35:277-282 (1997).
- Nishijima W., Fahmi H., Mukaidani T., Okada M., *Water Res.*; 37:150-166 (2003).
- Nistor C., Emnéus J., Gorton L., Ciucu A., *Anal. Chim. Acta*; 387:309-319 (1999).
- Ortega F., Domínguez E., Burestedt E., Emnéus J., Gorton L., Marko-Varga G., *J. Chromatogr. A*; 675:65-76 (1994).
- Orth A.B., Royse D.J., Tien M., *Appl. Environ. Microbiol.*; 59:4017-4023 (1993).
- Parker W.J., Farquhar G.J., Hall E.R., *Environ. Sci. Technol.*; 27:1783-1788 (1993).
- Peralta-Zamora P., Espósito E., Reyes J., Durán, N., *Quim. Nova*; 20:186-190 (1997).
- Perez M., Torrades F., Domenech X., Peral. J., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*; 5: 525-532 (2002).
- Perie F.H., Reddy G.V.B., Blackburn N.J., Gold M.H., *Arch. Biochem. Biophys.*; 353: 349-355 (1998).
- Piacquadio P., DeStefano G., Sammartino M., Sciancalepore V., *Biotechnol. Tech.*; 11:515-517 (1997).
- Prahacs S.M., Hall K.J., Duncan W., *Water Res.*; 30:2301-2308 (1996).
- Puig D., Ruzgas T., Emnéus J., Gorton L., Marko-Varga G., Barceló D., *Electroanalysis*; 8: 885-891 (1996).
- Radetski C.M., Rosa S.M.C, Rosa E.V.C., Sierra M.M.D., Simionatto, E.L., *Environ. Technol.*; 23: 537-545 (2002).
- Reginatto V., *Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga Scenedesmus subspicatus para o estudo de efluente industriais*. Tese de Doutorado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas (1998).

- Reyes J., Dezotti M., Mansilla H. Villaseñor J., Esposito E., Durán N., *Appl. Catal. B. Environ.*; 15:211-217 (1998).
- Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P., *Bioresource Technol.*; 77:247-255 (2001).
- Rossato S.S., Freire R.S., Durán N., Kubota L.T., *Quim. Nova*; 24:77-85 (2001).
- Ruggiero P., Sarkar J.M., Bollag J.M., *Soil Sci. Soc. Am. J.*; 147:361-370 (1989).
- Russell I.M, Burton S.G., *Anal. Chim. Acta.*; 389:161-170 (1999).
- Sevimli M.F., Kinaci C., *Water Sci. Technol.*; 45:279-286 (2002).
- Smith M., Thurston C.F., Wood D.A., *Fungal laccases: role in the delignification and possible industrial applications*. In: Multi-Copper oxidases., Messerschmidt, A., (ed.) p. 201-224 (1997).
- Solomon K.R., *Pure & Appl. Chem.*; 68:1721-1730 (1996).
- Subramani P., Shanmugas K.P., Ravikumar X.J., *Wast Treat. Plants*; 1:382-389 (1995).
- Svitel J., Miertus S., *Environ. Sci. Technol.*; 32:828-836 (1998).
- Szklarz G.D., Antibus R.K., Sinsabaugh R.L., Linkins A., *Micology*, 81:234-23 (1989).
- Thompson G., Swain J., Kay M., Forster C.F., *Bioresource Technol.*; 77:275-286 (2001).
- Thurston C.F., *Microbiology*, 140:19-26 (1994).
- Tuor U., Winterhalter H., Fiechter A., *J. Biotechnol.*; 41:1-17 (1995).
- Valtcheva E., Veleva S., Radeva G., Valtchev I., *React. Kinet. Catal. Lett.*; 78:183-191 (2003).
- Vicent G., In *Organic Micropollutants in the Aquatic Environmental*; Angeletti G., Bjorseth A. (Eds); Klumer, Dordrecht, p. 285 (1991).
- Vilchez J.L, del Olmo M., Diez C., Molina A., Orbe I., *Anal. Chim. Acta*; 335:23-29 (1996).
- Von Gunten U., *Water Res.*; 37:1443-1467 (2003).
- Von Hunolstein C., Valenti P., Visca P., Antonini G., Nicoli L., Orsi N., *J. Gen. Appl. Microbiol.*; 32:185-191 (1986).

Wesemberg D., Kyriakides I., Agathos S.N., *Biotechnol. Advances*; 22:161-187 (2003).

Xu F., *Biochemistry*; 35:7608-7614 (1996).

Yaropolov A.I., Skorobogat'ko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyer S.D., *Appl. Biochem. Biotechnol.*; 40:257-280 (1994).

Yaver D.S., Xu F., Golightly E.J., Brown K.M., Brown S.H., Rey M.W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., Dalboge, H., *Appl. Environ. Microbiol.*; 62:834-841 (1996).

Zaborsky O.R., *Immobilized Enzymes*; CRC Press, Ohio, USA, p.175 (1974).