

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde a redação final da tese, defendida por Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti, e aprovada pela comissão julgadora.

17/12/1992


Prof. Dr. Nelson Durán

**UM NOVO PROCESSO PARA O TRATAMENTO DE
EFLUENTE KRAFT: BIOLÓGICO E FOTOQUÍMICO**

MÁRCIA DEZOTTI

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

1992

CURRICULUM VITAE

Nome: Márcia Walquíria de Carvalho Dezotti

1. COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS:

1.1 VIII CBRAVIC (Congresso Brasileiro de Aplicação de Vácuo na Indústria e na Ciência), "Dopagem do Poli(p-fenileno-co-2,5-pirazina) com vapores de Iodo", julho de 1987, Rio de Janeiro.

1.2 "Poly(p-phenylene-co-2,5-pyrazine) a new type of conductive polymer", 31st. IUPAC Macromolecular Symposium, Merseburg, Republica Democrática Alemã, 1987.

1.3 "Poly(p-phenylene-co-2,5-pyrazine) a electrically conductive polymer", Freiburg, RFA, 1988.

1.4 "1º Simpósio Latino Americano de Polímeros" 24-29 de julho, 1988, Porlamar, Venezuela .

1.5 "Poly(p-phenylene-co-2,5-pyrazine) A Phenylene Based Conducting Copolymer". International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals, June, 26 - July, 2, 1988, Santa Fe, New Mexico.

1.6 Poli(p-fenileno-co-2,5-pirazina): um novo polímero condutor.
3º Encontro sobre materiais na indústria eletrônica e de

telecomunicações - 3º EMIET/CPQD - TELEBRÁS. 21-25 de novembro de 1988.

1.7 "Syntesis of Intrinsically Conductive Polymer"; VI Japan-Brazil Symposium on Science and Technology, 2, 8-18 (1988).

1.8 "An AM1 study on Poly(p-phenylene-co-2,5-pyrazine)", V Simpósio Brasileiro de Física Teórica, 19 - 23 de novembro de 1989.

1.9 "Descoloração da Lignina de Efluentes Kraft por Sistemas Fotoquímicos e Biológicos". 13º Reunião da Sociedade Brasileira de Química. 23-26 de maio de 1990, Caxambú, Brasil.

1.10 "Control of Chemical Oxygen demand (COD) by Photochemical and Biological Treatment of Kraft Effluent", 14º Reunião da Sociedade Brasileira de Química. 15-18 de maio de 1991, Caxambú, Brasil.

1.11 "Descolorization of Kraft Effluent by Soluble and Immobilized Lignin Peroxidase", 14º Reunião da Sociedade Brasileira de Química. 15-18 de maio de 1991, Caxambú, Brasil.

1.12 "Ligninase and peroxidase immobilization on solid support", XX Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 20-23 de abril de 1991, Caxambú, Brasil.

1.13 "Decoloracion de Efluente Kraft por Ligninasa Peroxidasas de *Chrysonilia sitophila*", VIII Reunion de Trabajo de Quimica

Bio-Organica Brasil-Chile, 14-16 de outubro de 1991, Talca, Chile.

2. TRABALHOS COM TEXTO COMPLETO PUBLICADO EM ANAIS:

2.1 "Syntesis of Intrinsically Conductive Polymer"; VI Japan-Brazil Symposium on Science and Technology, 2, 8-18 (1988).

2.2 "Poli(p-fenileno-co-2,5-pirazina): um novo polímero condutor". 3º Encontro sobre materiais na indústria eletrônica e de telecomunicações - 3º EMIET/CPQD - TELEBRÁS. 21-25 de novembro de 1988.

2.3 "Decoloracion de Efluente Kraft por Ligninasa Peroxidasas de *Chrysonilia sitophila*", VIII Reunion de Trabajo de Quimica Bio-Organica Brasil-Chile, pp 76-80, 14-16 de outubro de 1991, Talca, Chile.

2.4 "Poly(p-phenylene-co-2,5-pyrazine. A new eletricaly conductive polymer", I Simpósio Latinoamericano de Polímeros, 24-29 de julho de 1988, Porlamar - Venezuela.

3. PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS INTERNACIONAIS:

3.1 "Poly(p-phenylene-co-2,5-pyrazine), a new electrically conductive polymer" Synth.Met. 29, E 41 (1989).

3.2 "Poly(p-phenylene-co-2,5-pyrazine): An AM1 investigation"
Chem. Phys. **144**, 103 (1990).

3.3 "Decolorization of Kraft effluent by free and immobilized
lignin peroxidases and horseradish peroxidase" Biotechnol. Lett., **13**,
577 (1991).

3.4 "Biomass photochemistry XV. Photobleaching and biobleaching
of Kraft effluent" J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 62, 269 (1991).

*Ao meu filhinho
Pedro
com Amor.*

*Ao Wilson,
pelo carinho e
apoio constante.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela orientação da tese.
- À Profa. Dra. Irene Ferrer, pela colaboração no trabalho.
- Ao Jaime Rodriguez pelas sugestões e discussões sobre o trabalho.
- À Profa. Dra. Lúcia Innocentini-Mei e Henrique Trevisan pelo fornecimento das sílicas.
- Ao Prof. Dr. Fernando Galembeck por permitir a utilização do seu micro-computador.
- Ao Carlos Soares pela ajuda com o HPLC.
- Aos colegas do laboratório, pelo convívio diário.
- Ao Ricardo, pela disponibilidade e digitação.
- Aos meus pais e irmãos, por estarem sempre por perto.
- Ao CNPq, FAPESP, PADCT, FINEP, pelo apoio financeiro.

Índice

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Tratamento de Efluentes	1
I.1.1 - Avaliação da Toxicidade de um Efluente	3
I.2 - Composição do Efluente Kraft	5
I.2.1 - Lignina	5
I.2.2 - Obtenção pelo Método Kraft e Branqueamento da Polpa ..	7
I.3 - Tratamentos Utilizados para Efluente Kraft	9
I.3.1 - Tratamento Biológico	9
I.4 - Biodegradação da Lignina	15
I.5 - Enzimologia da Degradação da Lignina	15
I.6 - Imobilização de Fungos	19
I.7 - Chrysonilia sitophila	20
I. 8 - Imobilização de Enzimas	21
I.8.1 - Classificação e Aplicação de Enzimas Imobilizadas	22
I.8.2 - Efeitos da Imobilização	24
I. 8. 3 - Imobilização por Ligação Covalente	25
I.8.4 - Imobilização em Sílica	26
I.8.5 - Imobilização em Sefarose-4B ativada com CNBr	29
I.9 - Tratamento Fotoquímico	30
I.10 - Objetivos	34

II - PARTE EXPERIMENTAL

II.1 - Equipamentos	36
II.2 - Reagentes.....	36

II.3 - Microorganismo e Meio de Cultura	37
II.4 - Inóculo	37
II.5 - Determinação das Atividades Enzimáticas	38
II.5.1 - Ligninase	38
II.5.2 - Lacase	38
II.6 - Determinação de Açúcares	39
II.7 - Otimização da Produção Enzimática	39
II.7.1 - Condições Utilizadas para Todas as Culturas	39
II.7.2 - Suplemento de Glicose em Culturas Agitada e Estática ...	40
II.7.3 - Variação da Massa de Suporte para Imobilização	40
II.7.4 - Variação do Tipo de Suporte	40
II.7.5 - Adição de Glicerol	41
II.7.6 - Adição de Álcool Veratrílico	41
II.8 - Efluente Kraft	41
II.9 - Preparação do Efluente para Experimentos de Descoloração ..	42
II.9.1 - Determinação da Cor.....	42
II.10 - Determinação da Porcentagem de Água no Micélio (livre e imobilizado).....	43
II.11- Descoloração do Efluente por Micélio de <i>C. sitophila</i>	43
II.12 - Descoloração pelo Fungo Imobilizado em Nylon	44
II.13 - Descoloração do Efluente por Micélio Morto de <i>C. sitophila</i>	44
II.14 - Descoloração do Efluente pelo Caldo de <i>C. sitophila</i>	44
II.15 - Determinação da Massa Molar por Permeação em Gel	45
II.16 - Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)	45
II.17 - Obtenção do Caldo Liofilizado	46

II.18 - Purificação das Enzimas Ligninases I, II e III	46
II.19 - Imobilização em Sefarose-4B Ativada com CNBr	47
II.20 - Imobilização em Sílica 24/32 e 32/60	47
II.21 - Medida da Atividade Enzimática em Sílica e em Sefarose	49
II.22 - Preparação de Efluente para Tratamento com Enzimas Imobilizadas	50
II.23 - Descoloração do Efluente por Reação Fotocatalítica, Variando-se o Semicondutor	50
II.24 - Variação da Massa de ZnO e pH do Efluente	50
II.25 - Descoloração do Efluente sob Diferentes Condições de Irradiação: Utilização de Filtros	51
II. 26 - Determinação da Produção de CO ₂	51
II.27 - Adição de Manitol ao Meio Reacional	52
II.28 - HPLC para Amostras Irradiadas e não Irradiadas	52
II.29 - Tratamento Fotoquímico e Biológico Combinados	53

III - Resultados e Discussão

III. 1 - Otimização da Produção Enzimática	54
III.2 -Descoloração de Efluente Kraft pelo Fungo <i>Chrysonilia sitophila</i>	64
III.2.1 - Descoloração de Efluente Kraft Utilizando-se o Caldo Produzido pelo Fungo <i>Chrysonilia sitophila</i>	65
III.2.2 - Distribuição da Massa Molar para Efluente Kraft Tratado com o Fungo <i>Chrysonilia sitophila</i>	67
III.2.3 - Demanda Química de Oxigênio para o Tratamento de Efluente Kraft com <i>Chrysonilia sitophila</i>	68

III. 3 - Tratamento com Enzimas Imobilizadas	69
III.3.1 - Imobilização de HRP em Sílicas 24/32 e 32/60	69
III.3.2 - Imobilização do Caldo Liofilizado (Ligninases I, II e III não Purificadas) em Sílicas 24/32 e 32/60	72
III.3.3 - Imobilização em Sílica 32/60 das Ligninases I, II e III Purificada.....	75
III.3.4 - Imobilização de HRP, Ligninases I e III e Caldo Liofilizado em Sefarose-4B Ativada com CNBr	79
III. 4 - Tratamento Fotocatalítico	83
III.5 - Tratamento Fotocatalítico e Enzimático Combinados	91

IV - CONCLUSÕES

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Resumo

A liberação do efluente produzido no branqueamento da polpa química para o ambiente, representa o problema ambiental mais importante da indústria de polpa de papel. Esses efluentes possuem cor intensa (marrom ou preta), devido a presença de compostos derivados de lignina no processo Kraft. Requer-se, portanto, um tratamento para reduzir a sua cor intensa e a toxidez. Alguns dos tratamentos usados são os seguintes: precipitação, ultrafiltração, lagoas aeróbicas e/ou anaeróbicas, entre outros. Esses tratamentos são de alto custo, portanto, torna-se necessária a busca de alternativas de menor custo que apresentem a mesma eficiência. No presente trabalho estudou-se o tratamento das águas residuárias do primeiro estágio da extração alcalina (E₁) da indústria papeleira. Foram usados três processos diferentes para a descoloração desse efluente: (i) tratamento com o fungo *Chrysonilia sitophila*, que apresenta atividade ligninolítica; (ii) tratamento com enzimas produzidas pelo fungo *Chrysonilia sitophila* (ligninases) e de peroxidase immobilizadas em sílica e em Sefarose e (iii) tratamento fotoquímico onde se utilizaram radiações UV e Visível em presença de semicondutores, no caso ZnO e TiO₂. O fungo morto sob a forma de "pellets" adsorveu de 25% a 30% dos cromóforos do efluente, e 60% a 65% foram oxidados, obtendo-se uma descoloração total de 98% (sob as condições de tratamento). As enzimas ligninolíticas, excretadas pelo fungo no meio de cultivo, aplicadas no efluente provocaram uma descoloração do mesmo por oxidação, na presença de H₂O₂, em 6 horas. Ligninase III, caldo liofilizado e peroxidase de rabanete quando

Resumo

imobilizadas em Sefarose-4B ativada com CNBr, produziram descoloração do efluente de 38,4%, 29,3% e 53,5% respectivamente, em 48 h de tratamento. Ligninases II e III imobilizadas em sílica também descoloriram o efluente. No tratamento fotoquímico, obteve-se completa descoloração do efluente e a distribuição de massa molar indicou que houve total mineralização do efluente em duas horas de irradiação. Os três tratamentos apresentaram bons resultados, quanto à descoloração do efluente, mostrando assim, alternativas interessantes para o tratamento desse tipo de efluente.

Abstract

The release of spent liquors from conventional bleaching of chemical pulps into receiving water represents the most important environmental problem of the pulp and paper industry. These effluents have an intense color (brown or black) due to dissolved lignin-based compounds derived from the Kraft process. So, a treatment to reduce their intense color and toxicity is required. Some of the employed treatments are: precipitation, ultrafiltration, aerobic and/or anaerobic lagoons among others. These methods are very expensive, then it is necessary to search for some low-expensive that have the same efficiency. This work consists in effluents treatment, or more particularly the treatment of the first stage of alkaline extraction (E1) in the paper industry. Three different methods have been used to the bleaching effluent: (i) *Chrysonilia sitophila* fungus treatments, which shows a ligninolytic activity; (ii) treatment with the enzymes produced by the *Chrysonilia sitophila* fungus (ligninases) an peroxidase immobilized in silica and in sepharose, and (iii) photochemical treatment where UV and visible radiations were used in the presence of ZnO and TiO₂ as semiconductors. Mycelial pellets adsorbed 25% - 30% of liquor chromophores of which 60% - 65% were oxidized and a bleaching of 98% was obtained (under treatment conditions). Culture broth containing lignin - degrading enzymes efficiently removes in 6 h the color by oxidation in the presence of H₂O₂. Lignin peroxidase type III, lyophilized fungal culture and horseradish peroxidase immobilized on CNBr - Sepharose-4 B decolorized in 48 hs a 38,4%, 29,5% and 53,5%, respectively. Ligninase II

and III immobilized in silica produced also on effluent decoloration. In a photochemical treatment, under continued illumination, the solution becomes colorless and the molecular weight distribution in 2 h indicated almost total mineralization. These three treatments gave good results on effluent bleaching, indicating such an extent interesting alternative for the treatments of this kind of effluent.

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Tratamento de Efluentes

A produção de grandes quantidades de bens industrializados tem como consequência a produção de rejeitos, o que tornam necessários o controle e a monitoração dessas fontes poluidoras.

Para tanto, as indústrias devem ter conhecimento das propriedades físicas, químicas e biológicas de seus rejeitos, para que possam selecionar o processo de tratamento adequado. O objetivo de um programa de tratamento é a eliminação completa dos agentes poluidores ou a diminuição de suas concentrações, até o ponto onde são consideradas toleráveis para a vida aquática, aérea e terrestre. Um processo ideal deveria levar à eliminação completa dos agentes poluidores, através da mineralização, que consiste num processo oxidativo, onde são gerados: H_2O , CO_2 , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , etc.[1].

Como os efluentes industriais são responsáveis por mais da metade da carga poluente no ecossistema, merecem atenção especial [2]. A primeira consideração a ser feita a respeito de um efluente é se ele é biodegradável ou não. No último caso, recomenda-se um tratamento físico-químico, enquanto que para o biodegradável, o tratamento deve ser biológico [3].

Tratamentos Físico-Químicos

Alguns processos físico-químicos utilizados são [4] :

(a) **Precipitação e co-precipitação:** para efluentes que contém metais pesados, PO_4^{3-} , etc.

(b) **Troca-Iônica:** quando os efluentes contém: NH_4^+ , CN^- , Br^- , Pb^{2+} , etc.

(c) **Adsorção:** carvão ativado para remoção de radionuclídeos e metais; alumina ativada para remoção de fluorados, arsênio, húmus, etc.[5,6].

(d) **Separação por membranas:** redução do volume de lodos, recuperação e purificação de águas residuárias e concentração e/ou recuperação de um contaminante [7].

(e) **Oxidação química:** remoção de ferro e manganês, e no controle da flora e odor. Os oxidantes podem ser: O_3 , H_2O_2 , Cl_2 , etc.

Tratamento Biológico

A essência do tratamento biológico está na utilização de produtos orgânicos para o crescimento e a manutenção de microorganismos.

Quando se faz o tratamento de um efluente, que contém poluentes orgânicos, o que se deseja é que esses poluentes sejam totalmente oxidados a CO_2 e H_2O , ou a CH_4 .

Os processos biológicos podem ser classificados de acordo com a natureza do acceptor de elétrons e se dividem em: aeróbico e anaeróbico [8,9]. No aeróbico o oxigênio molecular é o acceptor de elétrons enquanto que no anaeróbico o oxigênio molecular está ausente e algumas formas de

carbono ou enxofre são aceptores de elétrons, por exemplo: NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 .

O microrganismo pode ser utilizado disperso no meio ou pode ser fixo em algum suporte. Um processo amplamente estudado utilizando o microrganismo fixo, é o disco biológico de contato (RBC) [10,11].

1.1.1 - Avaliação da Toxicidade de um Efluente

Uma avaliação da toxicidade e tratabilidade de um efluente é de extrema importância. Um efluente pode conter substâncias orgânicas biodegradáveis ou outros contaminantes inorgânicos (NH_4^+ , Fe^{2+} , Pb^{2+}) e, muitas vezes, pode conter todos esses poluentes ao mesmo tempo.

Espécies inorgânicas reativas são facilmente determinadas analiticamente, ao passo que a determinação de substâncias orgânicas solúveis tem sido problemática [12]. Os métodos mais utilizados para a estimativa de carbono orgânico solúvel são: a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO).

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é um parâmetro que fornece a biodegradabilidade do efluente. A técnica mais usada para a medida de DBO consiste em adicionar pequenas quantidades de esgoto, ou resíduo orgânico, a um determinado volume de água saturada de oxigênio, deixar a solução em frasco fechado, em uma incubadeira, a 20°C , durante certo número de dias, e medir quimicamente a quantidade de oxigênio que restou após a incubação. Durante esse período há a proliferação de bactérias que consomem a matéria orgânica e parte do oxigênio por respiração. Como a

concentração de oxigênio, a 20°C, é 9 mg/L, obtém-se por diferença, a quantidade de oxigênio consumida pelas bactérias naquele período de tempo. A importância das medidas da DBO, do ponto de vista ecológico é muito grande, pois através dela podemos saber quanto de oxigênio vai ser consumido no corpo de água receptor, por determinada quantidade de um certo tipo de esgoto ou resíduo industrial [13].

A DBO é uma medida que determina a quantidade de oxigênio utilizado pelas bactérias para oxidar todo composto orgânico solúvel, no tempo de duração do ensaio.

A demanda química de oxigênio (DQO) é obtida, oxidando-se a matéria orgânica por dicromato em meio ácido e alta temperatura. Por esse método obtém-se a oxidação de compostos orgânicos oxidáveis por dicromato.

Assim, o resultado obtido para a DQO é sempre maior ou igual a DBO [1]. Um efluente doméstico, por exemplo, que contém grande quantidade de matéria orgânica biodegradável apresenta uma DBO de cerca de 50% da DQO.

Como pode ser visto, a DQO e DBO fornecem resultados importantes, mas não muito confiáveis, sob o ponto de vista da concentração exata do carbono dissolvido. Uma técnica que vem ganhando espaço e confiabilidade é a determinação do carbono orgânico total (COT), onde a matéria orgânica é totalmente oxidada e o CO₂ produzido é determinado por sensores, frequentemente de infravermelho.

I.2 - Composição do Efluente Kraft

I.2.1 - Lignina

A lignina representa 20 a 30% do total da madeira e é composta, basicamente, de unidades primárias fenil propano hidroxiladas e/ou metoxiladas em diferentes proporções, formando um polímero aromático tridimensional amorfo.

A lignina é formada via processo radicalar a partir dos álcoois: coniferílico, cumarílico e sinapílico, denominados álcoois cinamílicos. A quantidade relativa desses álcoois no polímero determina o tipo de lignina. Ligninas de madeira dura são misturas poliméricas dos álcoois coniferílico e sinapílico, enquanto que ligninas de madeira mole são principalmente polímeros do álcool coniferílico. As estruturas desses álcoois são mostradas na figura I.1.

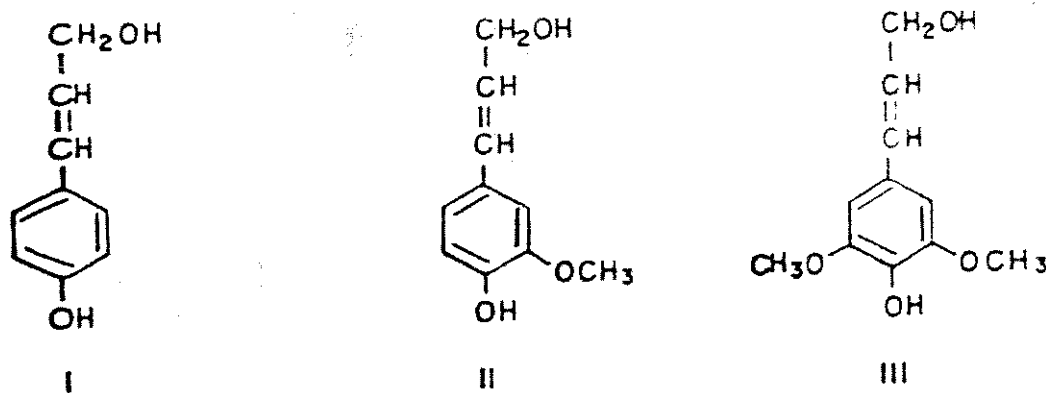


Figura I.1: Precursores da lignina: I-álcool cumarílico, II-álcool coniferílico e III-álcool sinapílico.

A lignina apresenta uma estrutura complexa devido ao seu mecanismo de biossíntese. Algumas estruturas hipotéticas para essa molécula tem sido propostas, uma delas está representada na figura I.2. A ligação mais importante presente na molécula de lignina é a do tipo β -O-4 que corresponde a pelo menos 50 % das ligações. Outros tipos de ligações são: α -O-4, β -5, β -1, 5-5 e β - β . A lignina, junto com a hemicelulose e pectina, rodeia os espaços entre as fibrilas de celulose, fornecendo às plantas resistência mecânica e uma proteção ao ataque de microrganismos.

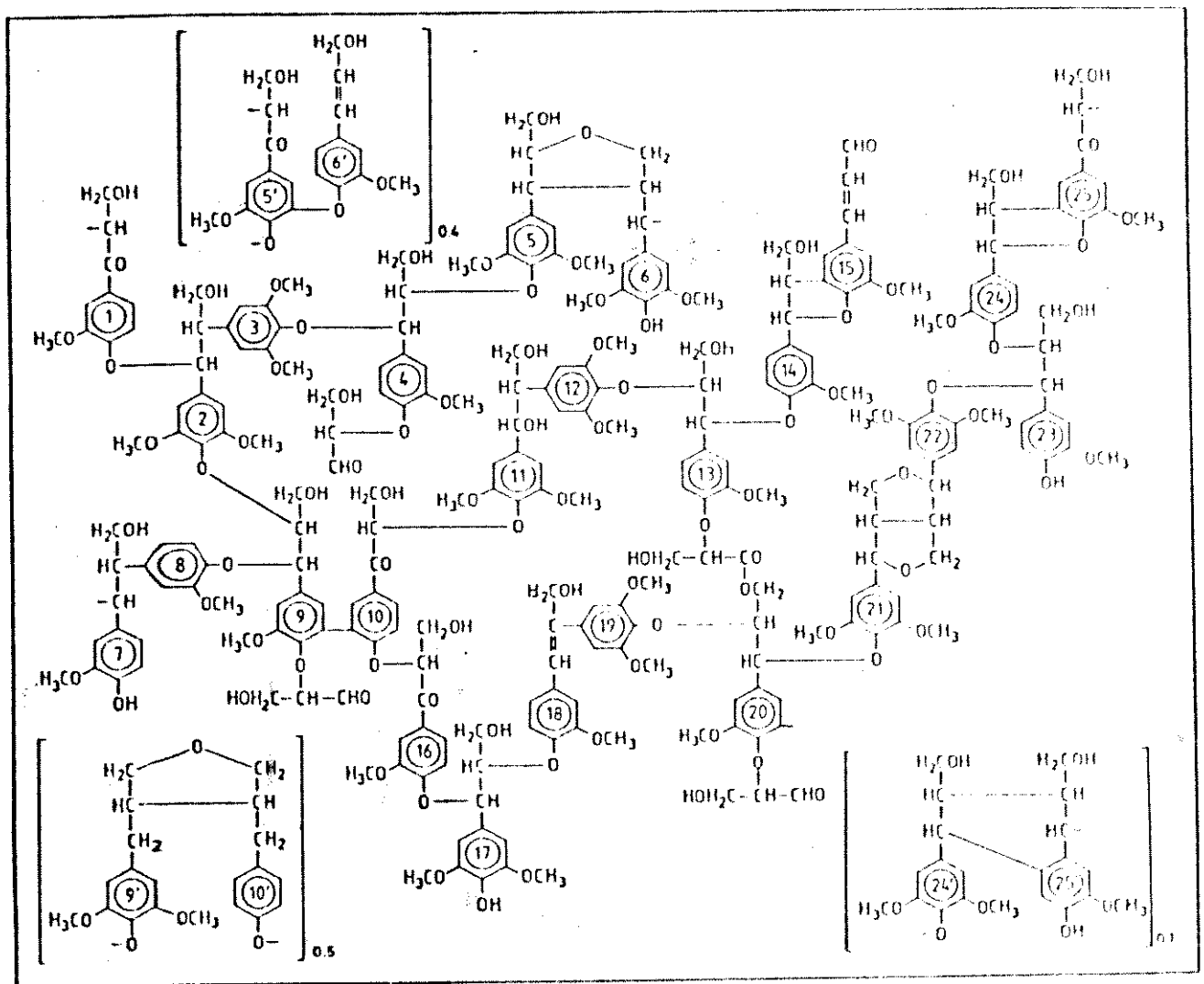


Figura I.2: Modelo para lignina de fuia (madeira dura), proposto por Nimz [14].

I.2.2 - Obtenção pelo Método Kraft e Branqueamento da Polpa

O processo de polpação predominante no Brasil é denominado Kraft (que emprega NaOH e Na₂S) e produz efluentes com alta DBO, turbidez, cor, sólidos suspensos e baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Este tratamento retira grande quantidade da lignina (90%) e o resíduo obtido é queimado em caldeira durante o processo. Na polpa Kraft obtida, a partir de madeiras duras, estima-se que cerca de 3 Kg de compostos orgânicos clorados são formados por tonelada de polpa, durante o branqueamento convencional. A maioria desses compostos são recalcitrantes. A lignina residual é removida pelo processo de branqueamento da polpa.

O branqueamento pode ser definido como um tratamento químico que tem por objetivo melhorar as propriedades da pasta celulósica [15]. Um dos processos usados para o branqueio da polpa é a sequência de etapas: C-D-E-D onde C é o tratamento com Cl₂, D é o tratamento com ClO₂ e E é a extração com NaOH. Os tratamentos com Cl₂ e ClO₂ modificam as ligninas tornando-as solúveis em água para serem extraídas posteriormente no estágio E. Tem-se assim, que 70 - 80% da cor do efluente é proveniente dessa fase.

No branqueamento convencional das polpas químicas ocorrem reações complexas envolvendo cloração, oxidação e desmetilação das unidades fenilpropano da lignina residual, formando um grupo de compostos denominados "cloroligninas". Assim, o efluente E1 (primeiro estágio da extração alcalina) é composto por cloroligninas produzidas nos estágios C e

D. Na figura I.3, tem-se exemplos de alguns clorofenóis presentes nesse efluente [16].

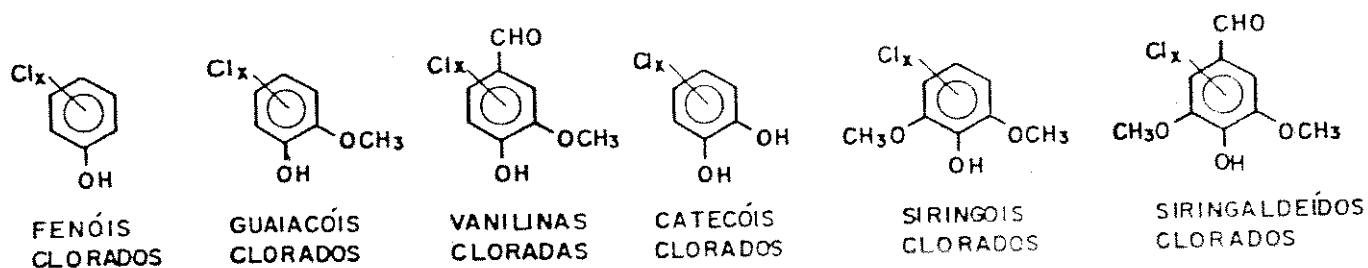


Figura I.3: Fenóis clorados predominantes em efluentes de polpas Kraft.

Mais de 300 compostos orgânicos clorados foram identificados nestes efluentes, desde os mais simples como, compostos fenólicos clorados até uma classe definida de cloroligninas nocivas, com massa molar média de 1 KDa (1000 g/mol). Os clorofenóis são formados durante o estágio de cloração. A tabela I.1 mostra as quantidades de clorofenóis encontradas nas águas de branqueio. A concentração destes não excede o nível letal (com exceção do tetracloroguaiacol). Também foram encontradas pequenas quantidades de dioxinas que poderiam ser praticamente eliminadas excluindo da sequência de branqueamento o cloro molecular [17].

Tabela I.1: Faixa de concentrações [mg/L] de clorofenóis em efluente Kraft não tratado e biotratado [17].

	Efluente Kraft		96-H Lc50 [µg/l]
	Não tratado	Biotratado	
Clorofenol	12 - 90	1 - 120	500 - 1000
Diclorofenol	22 - 100	12 - 60	1300 ^a
Dicloroguaicols	9 - 15	2 - 51	2800
Tetracloroguaiacol	22 - 420	2 - 240	400 - 1500
3,4,5-triclorocaterol	120 - 270	2 - 280	1000 - 1500
tricloroguaicols	<10 - 340	<1 - 220	700 - 1000 ^b
2,4,6-triclorofenol	<1 - 51	<1 - 61	450 - 2600

96-H Lc50 : Concentração letal média para truta arco-íris sob condições estáticas de bioensaio.

a: Isômero 4,5; b: Isômero 4, 5, 6.

I.3 - Tratamentos Utilizados para Efluente Kraft

I.3.1 - Tratamento Biológico

Processo aeróbico convencional

Tratamentos biológicos são efetivos na remoção (redução) da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) dos efluentes da indústria de polpa de papel. A faixa de redução do DBO está entre 40 e 90 % e a redução na demanda química de oxigênio (DQO) varia entre 40 e 70% para a indústria de papel e papelão, e entre 25 a 55% para a indústria de polpa química [18]. Lagoas aeradas foram as primeiras unidades de purificação biológica usadas para o tratamento desse tipo de efluente, onde volumes grandes são usados, porque é necessário um longo tempo de residência. Posteriormente, foi introduzido o sistema de lodo ativo onde a redução da DBO chega a faixa de 65 a 90%, quando o efluente possui de 0,5 a 3,0 kg DBO/m³. Mantendo esse sistema

aeróbicos fixos que funcionam como filtros também são usados para o tratamento deste tipo de efluente [19,20].

O tratamento aeróbico convencional não é muito efetivo na redução de clorofenóis, para a concentração requerida nos efluentes da indústria da polpa de papel. A remoção depende das condições de tratamento e em geral é baixa. Tratamentos que utilizam biofilmes imobilizados são interessantes, porque podem reter os fenóis que são degradados pelos microrganismos que crescem vagarosamente.

Tratamento Anaeróbico

Processos anaeróbicos aplicados no tratamento de efluentes da indústria de polpa de papel têm sido estudados desde 1980. Fenóis clorados monoméricos podem ser metabolizados durante o tratamento anaeróbico. O passo inicial da degradação desses compostos é a remoção dos átomos de cloro do anel aromático [21].

Hagblom e Sakinoja-Salonen [22] obtiveram uma remoção de 60 - 70% de fenóis clorados em reator anaeróbico, sendo que em reatores aeróbicos obtêm-se uma remoção de 50 - 60%. Uma comparação entre os processos anaeróbico e aeróbicos no tratamento de efluente Kraft é mostrado na tabela I.2.

A degradação anaeróbica envolve alguns passos. Primeiramente os materiais poliméricos (polissacarídeos, proteínas, etc.) são hidrolizados por enzimas extracelulares formando produtos menores que são transportados para dentro das células. Esses compostos são fermentados ou oxidados anaerobicamente a ácidos, álcoois, CO₂, H₂ e amônia. Os ácidos são

convertidos em acetatos, hidrogênio gasoso e CO₂. Ocorre então metanogênese a partir do H₂ e CO₂ [23].

Tabela I.2 : Uma Comparação entre Processos Aeróbico e Anaeróbico Aplicados a Efluentes da Indústria de Polpa Provenientes do Processo Kraft.

Aspectos	Anaeróbico	Aeróbico
Remoção de Poluentes		
DBO	B/C	B/C
DQO	C	C
Resinas ácidas	C/D	C
Ácidos graxos	B/A	B/A
Fenóis clorados	B/C	C
Ligninas e cloroligninas de alta massa molar	D	D/C
Cor	C/D	D/C

A = excelente; B = Bom; C = Regular; D = Deficiente

Os efluentes da indústria de polpa de papel atualmente são tratados pelos métodos clássicos: lagoas aeróbicas e anaeróbicas. No entanto, esses tratamentos se mostram ineficientes para eliminação de clorofenóis e ligninas cloradas de alta massa molar até um nível considerado tolerável (de acordo com os Padrões de Qualidade Ambiental-Água- resolução CONAMA N^o 20/86). São também ineficientes na remoção de cor. Entretanto, mostram-se razoáveis quanto a diminuição das DQO e DBO.

Resultados interessantes também são obtidos com processos combinados: anaeróbico e aeróbico. Um sistema combinado de um reator anaeróbico e em sequência um filtro aeróbico apresentou bons resultados na remoção de alguns fenóis clorados presentes em baixas concentrações em efluentes de branqueamento [22].

Utilização de fungos

Alguns fungos podem degradar a madeira e conseqüentemente a lignina. Esses microrganismos podem ser classificados da seguinte forma:

(a) Fungos de decomposição branca ("white rot fungi"), possuem a capacidade de degradar os três principais componentes da madeira (celulose, lignina e hemicelulose) em velocidades similares.

(b) Fungos de decomposição parda ("brown rot fungi"), são responsáveis pela degradação de polissacarídeos da madeira, causando limitadas modificações na lignina, não agem sob os anéis aromáticos.

(c) Fungos de decomposição branda ("soft rot fungi"), são responsáveis pelo amolecimento da superfície da madeira, degradam lentamente a lignina.

A habilidade dos fungos de decomposição branca em degradar cloroligninas e descolorir efluentes das indústrias de polpa de papel tem sido de grande interesse nos últimos anos. A atividade enzimática presente neste tipo de fungo é responsável pela descoloração e modificação das cloroligninas.

Muitos fungos de decomposição branca foram testados para a remoção de cor do efluente E1 (*Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia brevispora*,

Phlebia subserialis, *Poria cinerascens*, *Coriolus versicolor*, *Lentinus edodes* [24,25], *Picnoporus sanguineus* [26,27], etc.). Um outro interesse para o tratamento de resíduos industriais tem sido a utilização de células imobilizadas. O processo Mycor (remoção de cor pelo micélio) apresenta bons resultados quanto a descoloração deste efluente. Este processo é baseado na ação do fungo *P. chrysosporium* imobilizado, chamado disco biológico de contato (RBC) [28]. Estudos recentes utilizando o mesmo fungo imobilizado em nylon num biorreator de leite recheado, para o tratamento desse efluente, mostraram que este processo é tão eficiente quanto o processo Mycor (remoção de cor pelo micélio) [29]. Este fungo possui um sistema enzimático capaz de descolorir o efluente, degradando tanto a lignina quanto a lignina modificada. O processo de descoloração, tratando-se apenas do aspecto do desaparecimento dos cromóforos do efluente, é resultado da ação de enzimas extracelulares presentes no micélio. O fungo *P. chrysosporium* é ativo não apenas na degradação de ligninas e cloroligninas, mas também na degradação de outros poluentes orgânicos como: pentaclorofenol, anilinas cloradas, fenantreno, benzo[a]pireno, entre outros [30].

Anselmo e Novais [31] imobilizaram *Fusarium flocciferum* em poliuretana, para o tratamento de resíduos fenólicos. Os resultados mostraram que o micélio, quando imobilizado, age eficientemente na remoção de compostos tóxicos.

Prasad e Joyce [32] reportaram que o fungo *Trichoderma sp* imobilizado em discos metálicos apresentou bons resultados quanto à descoloração, correspondendo a 78%, com glicose como fonte adicional de carbono. O

fungo *Coriolus versicolor* foi imobilizado em alginato de cálcio por Livernoche et al. [33], o micélio removeu 80% da cor do efluente em três dias, utilizando sacarose adicional como fonte de carbono. Os fungos, quando imobilizados, parecem aumentar a estabilidade e eficiência dos processos de tratamento e a tecnologia de fungos em reatores tem mostrado bons resultados no tratamento desse tipo de efluente.

Alternativas Para Evitar Produção de Efluentes Tóxicos.

Um caminho para resolver o problema desse tipo de efluente é a busca de novas técnicas para o branqueamento da polpa. Um exemplo, é o uso de técnicas biológicas para a remoção da lignina e branqueamento da polpa.

Alguns fungos de decomposição branca tem sido usados no branqueamento da polpa [34]. Lignina-peroxidase, a primeira enzima isolada do fungo de decomposição branca *P. chrysosporium*, foi a primeira enzima utilizada no branqueamento da polpa, entretanto, conseguiu-se uma degradação limitada da lignina. Outras enzimas estão sendo aplicadas no branqueamento [35]. A utilização destas no primeiro estágio do branqueamento da polpa reduz a quantidade de branqueadores químicos nos estágios subsequentes. Tem-se conseguido um bom branqueamento da polpa utilizando processo de branqueamento com enzima sem utilizar Cl_2 e com quantidade reduzida de ClO_2 [35].

Assim, a biopolpação oferece a possibilidade de ser, no futuro, ao mesmo tempo, menos poluente e mais eficiente que os métodos convencionais [36,37].

I.4 - Biodegradação da Lignina

A lignina pode ser degradada por diversos tipos de fungos [38]. O fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*, isolado em 1974 por Budsall e Eslin [39], tem sido amplamente estudado como sistema modelo na compreensão do processo de degradação da lignina. Esse fungo possui um sistema enzimático que pode descolorir o primeiro estágio da extração alcalina (E1), degradando e modificando as cloroligninas. No entanto, outros fungos também são capazes de degradar a lignina: *Coriolus versicolor*, *Phlebia radiata*, etc [40]. O fungo *Chrysonilia sitophila* possui a capacidade de degradar lignina dioxano, lignosulfatos e álcool veratrílico [41], bem como compostos modelo de lignina [42]. Foram encontradas enzimas celulolíticas e lignolíticas em caldos de cultivo de *C. sitophila* sendo estas últimas isoladas e caracterizadas [43,44].

I.5 - Enzimologia da Degradação da Lignina

A biodegradação de lignina é o resultado da ação de várias enzimas, como fenol-oxidases, oxidases, dimetoxidases, etc.

Fenoloxidase engloba três tipos de enzimas: peroxidases, lacases e tirosinases. As peroxidases são hemoproteínas, requerem peróxido de hidrogênio, e são sensíveis a altas concentrações desse reagente. Lacases (extracelular) e tirosinases (intracelular) contêm cobre, não requerem peróxido de hidrogênio e variam entre si pela especificidade do substrato. As lacases catalisam a polimerização oxidativa de compostos fenólicos, os

quais são facilmente removíveis por filtração. Sob certas condições, podem degradar compostos fenólicos sintéticos e biológicos.

Em 1983, ambos grupos de Kirk [45] e Gold [46] anunciaram o isolamento de uma única enzima, ligninase, de caldos de cultura do fungo *P. chrysosporium*, capaz de oxidar lignina não fenólica e modelos de lignina. Desde então processos de biodegradação passaram a ser estudados a nível molecular.

Em 1985, ficou estabelecido que essa ligninase pode ser designada como peroxidase e passou a ser chamada de lignina-peroxidase (LiP) [47]. Posteriormente foi demonstrado em culturas de *P. chrysosporium*, que estas enzimas eram parte de uma família de isoenzimas [48]. Descobriu-se também a presença de uma outra peroxidase, dependente de manganês para a sua atividade, a manganês-peroxidase, MnP [49].

O ciclo catalítico da lignina-peroxidase está representado na figura I.4 e é semelhante ao de outras peroxidases [50]. A oxidação da enzima nativa pelo H_2O_2 , gera um complexo oxigênio grupo heme (composto I), que catalisa a oxidação mediada por transferência de um elétron e geração de radicais cátions em centros arílicos. A partir daí, a reação química se processa espontaneamente, fornecendo produtos oxidados de menor massa molar. A redução do composto I para a enzima ativa ocorre em duas etapas de transferência de um elétron. A conversão do composto I para o composto II é mais rápida do que a do composto II para a enzima nativa. O excesso de peróxido de hidrogênio inativa a enzima formando o composto III.

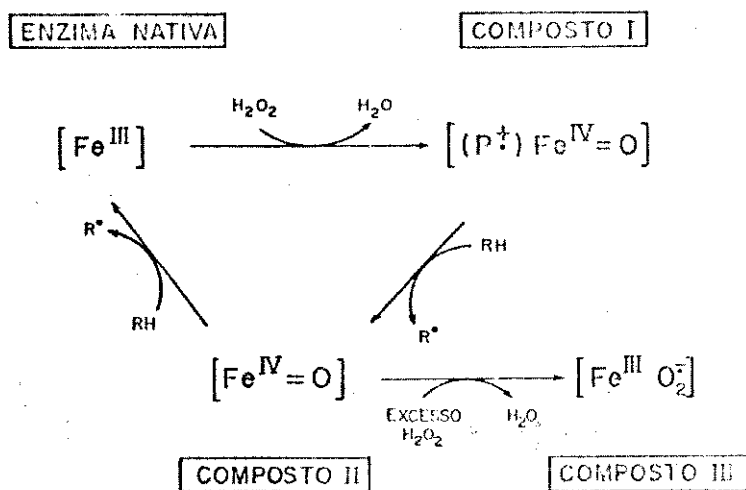


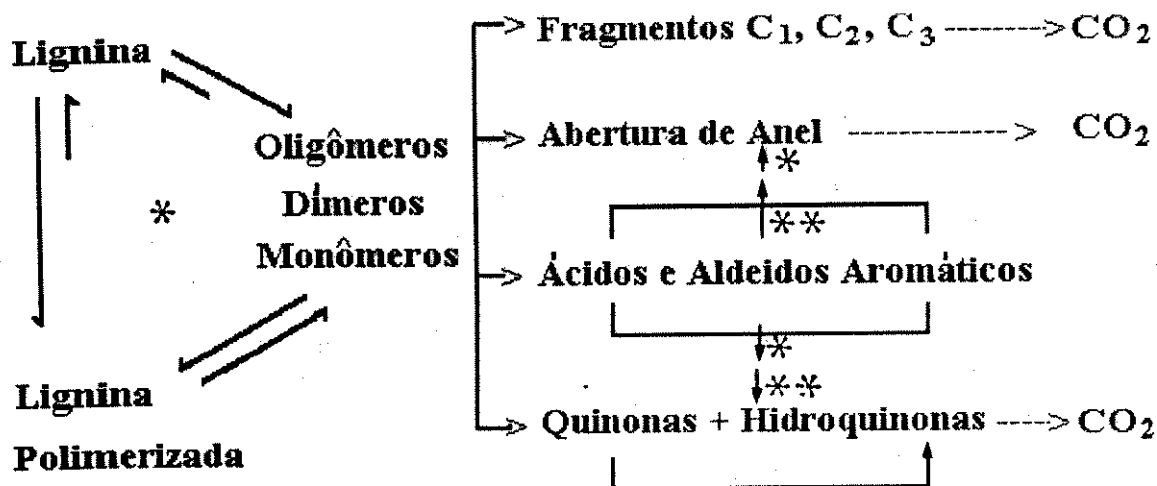
Figura I.4: Ciclo catalítico da lignina peroxidase.

A LiP pode oxidar anéis aromáticos não fenólicos ao seu correspondente cátion radical em pH ótimo, igual a 3,0. Reações características de radicais cátion de lignina e modelos de lignina incluem rupturas de ligações $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ e $\beta\text{-O-4}$, reações chamadas de depolimerização.

A LiP possui um potencial de oxidação superior as peroxidases típicas, como peroxidase de raiz forte (HRP) [51]. Esta enzima oxida todos os substratos oxidados por HRP, mais uma variedade de compostos aromáticos metoxilados, utilizados em estudos como compostos modelo de lignina, que não são substratos para HRP. Outras reações características incluem abertura do anel aromático, desmetoxilação, descarboxilação e reações de ligação entre fenóis.

A MnP é responsável pela oxidação de fenóis e ligninas fenólicas. A enzima oxida Mn(II) a Mn(III) e o complexo formado de Mn(III) pode oxidar subestruturas de ligninas fenólicas, levando a intermediários fenoxi radical. Subsequentemente, obtém-se quebra de $C\alpha-C\beta$ ou quebra da ligação alquil-fenil, produzindo fragmentos despolimerizados, incluindo quinonas e hidroquinonas.

É conhecido, no entanto, que a peroxidase provoca polimerização e despolimerização da lignina, obtendo-se um equilíbrio de depolimerização/polimerização. Um esquema de degradação da lignina é sugerido na figura I.5 [52].



* Oxidação

- lignina peroxidase
- fenol oxidase
- espécies ativas de oxigênio

** Redução

- quinona redutases
- aldeído redutases
- ácido redutases

Figura I.5: Esquema de degradação da lignina.

I.6 - Imobilização de Fungos

Desde a descoberta da primeira enzima lignolítica (ligninase), grandes esforços tem sido feitos para desenvolver métodos para aumentar a produção de lignina-peroxidase, devido a importância da biodegradação e

biotransformação da lignina. Um método que tem sido extensivamente estudado é a imobilização de fungos.

P. chrysosporium foi imobilizado em agar, agarose, nylon e poliuretana [53]. Os resultados mostraram que a produção enzimática do fungo quando imobilizado é significativamente maior em relação ao fungo livre.

Isto pode ser atribuído ao fato de que quando o fungo está aderido ao suporte, a superfície micelial exposta ao oxigênio é maior, o que facilitaria a excreção de enzimas [54,55].

Uma outra vantagem que esse tipo de imobilização pode apresentar é a produção contínua da enzima pelo fungo. Isto pode ser obtido retirando-se o caldo de cultivo e substituindo-se por um novo meio de cultura, por exemplo, já foi conseguida produção contínua de ligninase por *P. chrysosporium* por 20 culturas subsequentes [55].

I.7 - *Chrysonilia sitophila*

O ascomiceto *C. sitophila* é encontrado no estado anamorfo (presença de células + ou -, estado sexual), cujo teleomorfo corresponde a *Neusospora sitophila* [56].

C. sitophila TFB-27441 foi isolado por Campos e col. [57] de macerados de um inseto xilófago, *Tribolium ferrugineum*, encontrado em casca de arroz, proveniente do estado de Goiás (Brasil). A partir de então, estudos sobre a ação enzimática desse fungo tem sido realizados em nosso grupo

(Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, UNICAMP). Atividades celulolíticas, lignolíticas e produção de proteínas unicelulares (SCP) foram reportados [41,43]. Os caldos de cultivo de *C. sitophila* apresentaram alta atividade lignolítica e atividade celulolítica moderada. As atividades enzimáticas observadas foram semelhantes a fungos de decomposição branca como *P. chrysosporium* [58].

Foram otimizadas as condições de crescimento de *C. sitophila* utilizando celulose como única fonte de carbono. Os parâmetros estudados foram: concentração de nitrogênio, temperatura, pH, biotina, íons tartarato e composição de sais no meio de cultura [59].

As ligninases presentes no caldo de cultivo filtrado de *C. sitophila* foram isoladas, purificadas e caracterizadas. Identificaram-se três hemoproteínas, denominadas: ligninases I, II e III. A relação existente de cada uma delas é 33%, 62% e 5%, o pH ótimo é 3,0, 5,0 e 4,0 e a massa molar é 68.000, 50.200 e 47.500 Daltons para as ligninases I, II e III respectivamente [60].

1.8 - Imobilização de Enzimas

A maior parte dos processos industriais químicos empregam catalisadores não enzimáticos, mas a grande eficiência catalítica das enzimas, especificidade pelo substrato e condições amenas de operação tornam-nas de grande interesse na indústria e na pesquisa.

No entanto, células livres ou enzimas são catalisadores pequenos para serem filtrados por processos convencionais de baixo custo e a sua

recuperação (durante processos industriais) deve ser feita por centrifugação, encarecendo, desta forma, o processo.

Assim, a imobilização oferece uma possível solução para esses problemas na indústria, para tornar possíveis a sua reutilização e uso contínuo. A imobilização pode ser definida como um processo onde o movimento de enzimas, células, organelas, etc., fica restrito no espaço, resultando a enzima sob a forma insolúvel em água. Em 1916, foi imobilizada invertase em carvão e demonstraram que não houve perda na atividade da enzima. No entanto, maior ênfase na tecnologia da imobilização de enzimas foi dada nos últimos 30 anos [61].

1.8.1 - Classificação e Aplicação de Enzimas Imobilizadas [62]

Existem alguns caminhos para a classificação dos vários tipos de imobilização de enzimas.

O termo enzima imobilizada inclui:

(a) Enzimas modificadas para a forma insolúvel em água através de técnicas apropriadas.

(b) Enzimas solúveis quando usadas em reatores equipados com membranas semipermeáveis para ultrafiltração, que permite a passagem dos produtos e retém as moléculas de enzima dentro do reator.

(c) Enzimas com a sua mobilidade modificada por associação a um outro composto molecular, onde o composto final continua solúvel em água.

Essa classificação pode ser baseada na combinação entre a natureza da interação responsável pela imobilização e a natureza do suporte. A figura I.6 descreve um sistema de classificação.

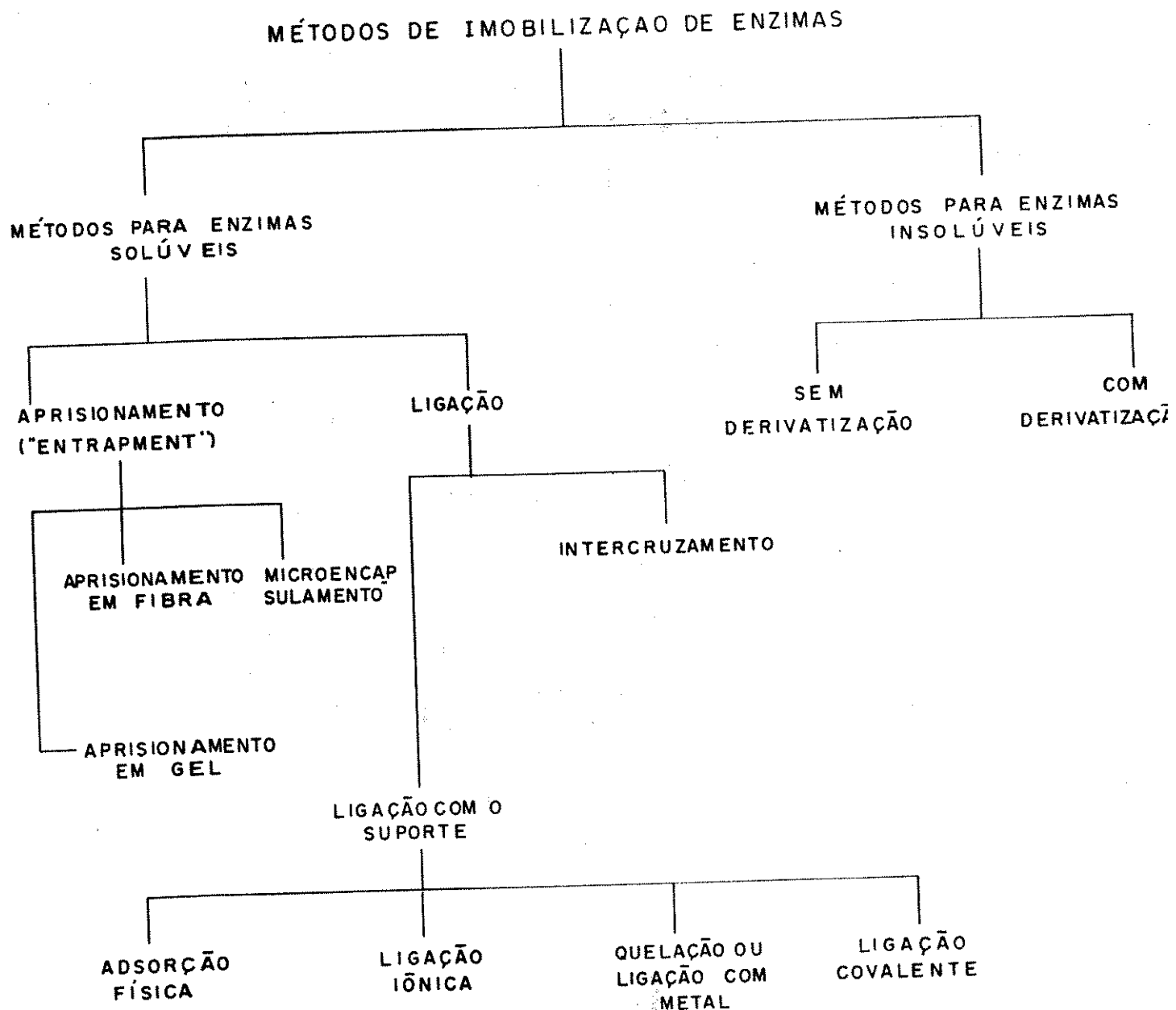


Figura I.6: Classificação de métodos para imobilização de enzimas.

São conhecidas várias aplicações da tecnologia de imobilização de enzimas, por exemplo, eletrodos enzimáticos (biossensores), na indústria farmacológica, e indústria alimentícia.

I.8.2 - Efeitos da Imobilização.

Estabilidade:

A estabilidade das enzimas imobilizadas depende da natureza intrínseca das mesmas e das condições de imobilização. Por exemplo, a imobilização de enzimas proteolíticas pode reduzir a habilidade da enzima causar sua própria inativação por autodigestão, porque quando imobilizadas, ficam isoladas evitando um ataque mútuo [63].

A estabilidade de muitas enzimas quando imobilizadas em suportes inorgânicos, como vidros ou cerâmicas, é maior devido à grande estabilidade dimensional desses suportes [64]. No entanto, também podem ser feitas muitas modificações na superfície da sílica introduzindo grupos para ligação com a enzima. O que se observa nestes casos é que variando o grupo reativo, a estabilidade da enzima muda, por exemplo, quando se liga a enzima à sílica através de ligações sulfonamida as estabilidades são menores do que quando se utilizam ligações tipo azo [65].

Propriedades Cinéticas [62]:

Em geral há perda de atividade da enzima, por desnaturação, durante o processo de imobilização. Depois de imobilizada, a enzima começa a sofrer a influência do microambiente do suporte, o qual é completamente

diferente do ambiente quando a enzima está livre em solução, o que pode levar também a sua desnaturação.

O pH ótimo da enzima livre e da enzima imobilizada pode ser alterado e isto vai depender se o suporte está carregado positiva ou negativamente (microambiente), sendo que em soluções com alta força iônica este efeito desaparece. A difusão do substrato do meio de reação para o microambiente, onde a enzima está imobilizada, pode ser o fator que mais altera a velocidade da reação. O efeito da massa molar do substrato passa a ser importante à medida que moléculas grandes se difundem a uma velocidade menor e estão mais sujeitas a interações estéricas com a matriz.

I. 8.3 - Imobilização por Ligação Covalente

Esse método está baseado em uma ligação covalente entre a enzima e o suporte, que é insolúvel em água. A determinação das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que para outros métodos de ligação com o suporte. Isto porque, a ligação entre a enzima e o suporte não pode se dar através de grupos funcionais da enzima, que são essenciais para a sua ação catalítica. Para se obter atividades altas nesse tipo de imobilização, deve-se proteger os resíduos de aminoácidos essenciais do sítio ativo. Existem alguns métodos para essa proteção [66]:

(a) A ligação entre o suporte e a enzima pode ser feita na presença de um inibidor competitivo ou substrato;

(b) A ligação com o suporte, utilizando a enzima complexada covalentemente e reversivelmente com um inibidor;

(c) A ligação com o suporte utilizando a enzima modificada quimicamente, sendo que depois de realizada a ligação com o suporte, a enzima pode ser modificada novamente para a forma ativa;

(d) Utilizando um precursor zimogênio.

Muitos tipos de suporte têm sido estudados para imobilização por ligação covalente, por exemplo, celulose, polímeros, agarose, sílica, etc. Assim como as suas propriedades, tamanho de poro, área superficial, etc.

A maioria dos suportes utilizados não possuem grupos reativos para fazer ligação com aminoácidos das enzimas, mas possuem grupos hidroxilas, amino, amida, ou carboxila que podem ser ativados (modificados) para serem utilizados na imobilização. Algumas dessas reações são: diazotação, alquilação, formação de ligação amida, etc. [62].

1.8.4 - Imobilização em Sílica

A imobilização em sílica é amplamente estudada, devido à sílica ser um material que não é atacado por microrganismos, de baixo custo, apresentando-se com diferentes estruturas físicas (particularmente de interesse o tamanho de poro) e pode ter sua superfície modificada quimicamente. É conhecida a imobilização de várias enzimas em superfície de sílica, como: hidrogenase [67], glucoamilase [68], catalase [69], glucose-oxidase [70], etc. Vários fatores são estudados, como: quantidade ótima de grupos ativos na superfície, tamanho de poro, concentração da enzima, etc.

Na grande maioria das vezes, suportes inorgânicos (sílica) são modificados quimicamente com organossilanos bifuncionais, entre os quais, os mais importantes são os trialcoxiaminoalquilsilanos; em particular: 3-aminopropiltriétoxisilano [71,72]. A figura I.7 mostra essa reação.

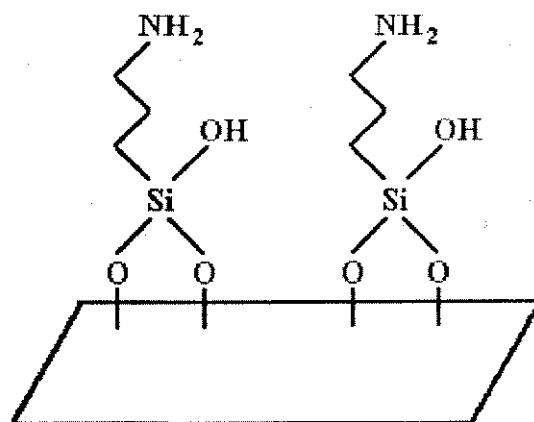
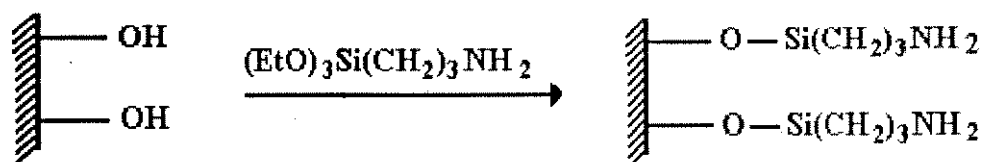


Figura I.7: Modificação da superfície da sílica com 3-aminopropiltriétoxisilano.

A imobilização de cloroperoxidase em sílica-aminopropil, não mostrou bons resultados quanto a atividade, ou seja, depois de imobilizada, grande parte perdeu a atividade. No entanto, a enzima imobilizada se mostrou estável. Após ser usada quatro vezes não houve perda da atividade. A baixa atividade específica resultante pode ser devida à modificação do sítio

catalítico da enzima durante a imobilização. Se muitos grupos ativos são criados na superfície, a enzima pode se ligar a mais de um grupo, o que conseqüentemente afeta a estrutura tridimensional da enzima [73].

Imobilizações mais ativas e estáveis são obtidas por ligações do tipo azo com sílica. A imobilização de peroxidase por esse método apresentou excelentes resultados quanto a atividade e estabilidade da enzima, que não se tornou inativa mesmo após dois meses de imobilizada [65].

Uma maneira de fazer esse tipo de imobilização é modificando a sílica-aminopropil através do processo descrito na figura I.8 [74]. A ligação entre o sal de diazônio obtido no processo se dá com grupos da enzima, como por exemplo: amino, tiol e fenólico [62].

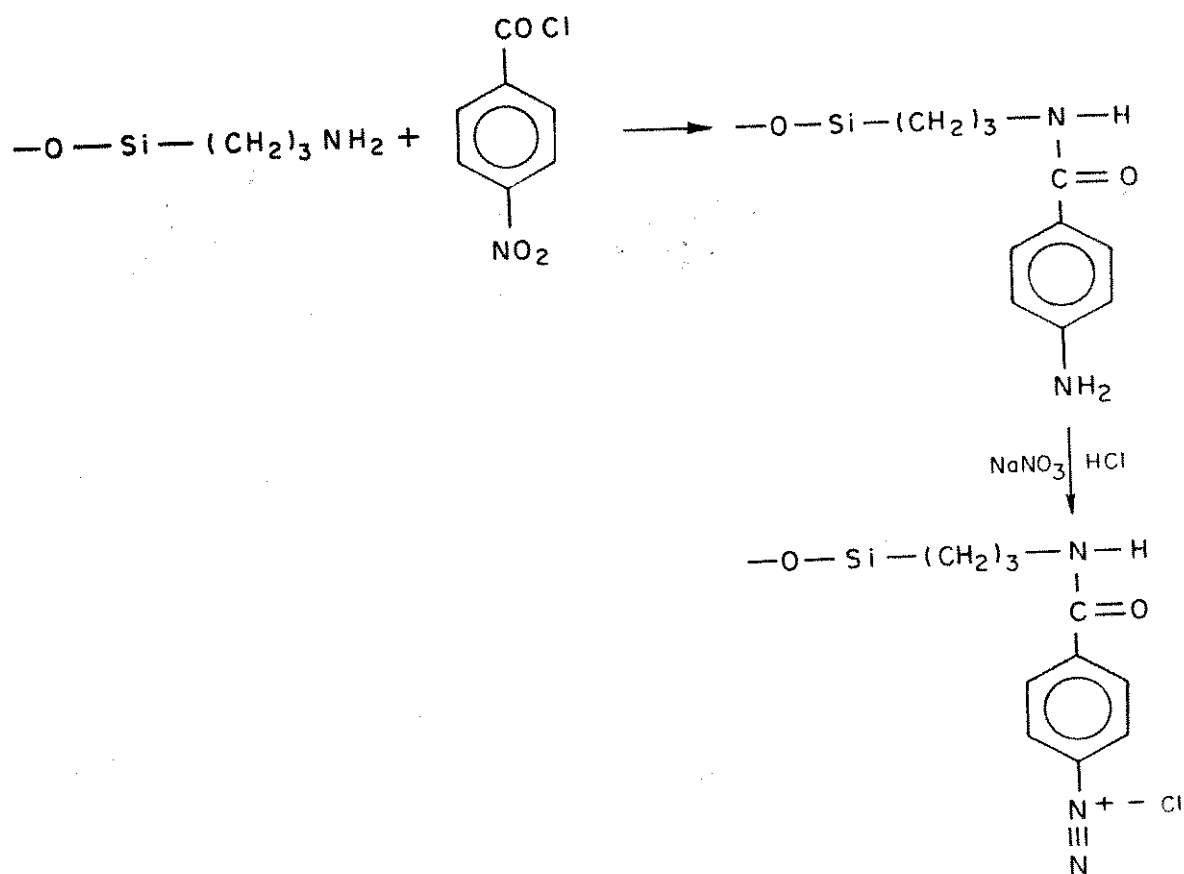


Figura I.8: Obtenção do sal de diazônio em sílica para imobilização via ligação tipo azo.

I.8.5 - Imobilização em Sefarose-4B ativada com CNBr

A ativação de Sefarose utilizando CNBr, resulta em um suporte insolúvel, no qual as enzimas podem ser ligadas covalentemente. O CNBr reage com os grupos hidroxila da Sefarose para formar imidocarbonatos cíclicos e acíclicos. A formação de inter cruzamento entre as cadeias de Sefarose pelas ligações acíclicas é responsável pela estabilidade térmica e aumento da insolubilidade do suporte, com conseqüente aumento no impedimento estérico. A figura I.9 mostra a estrutura da Sefarose após ativação [75]. Na imobilização os grupos imidocarbonatos reagem com grupos amino da enzima.

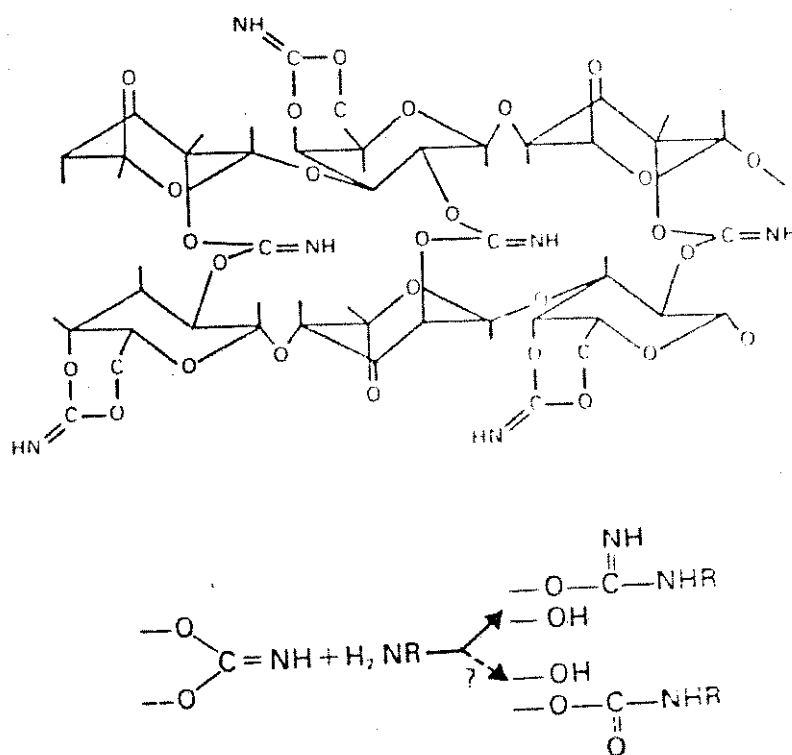


Figura I.9: Estrutura da Sefarose após ativação com CNBr.

Em geral, quando enzimas são imobilizadas em Sefarose ativada com CNBr a estabilidade, frente a desnaturação, é maior em relação a enzima livre.

Por exemplo, a enzima β -glucosidase, quando imobilizada em Sefarose ativada com CNBr, apresentou um tempo de vida, a 28 °C, de setenta dias e a enzima livre quatro dias. Também melhoraram as propriedades da enzima (estabilidade frente ao pH e temperatura) [76].

A imobilização de celulase em Sefarose ativada com CNBr apresentou bons resultados quanto a estabilidade, no entanto, a enzima perdeu 30% de atividade após ser usada por cinco vezes [77].

1.9 - Tratamento Fotoquímico.

A degradação fotocatalítica é um outro caminho interessante e não clássico para o tratamento de efluentes. A degradação fotocatalisada é conseguida com o auxílio de um fotocatalisador, no caso um semicondutor que possui a capacidade de transformar luz em corrente elétrica. A irradiação de um semicondutor tipo-n com luz de alta energia, energia do "gap", resulta na criação de buracos na banda de valência e elétrons na banda de condução. Isso pode ser visualizado na figura I.10 [78].

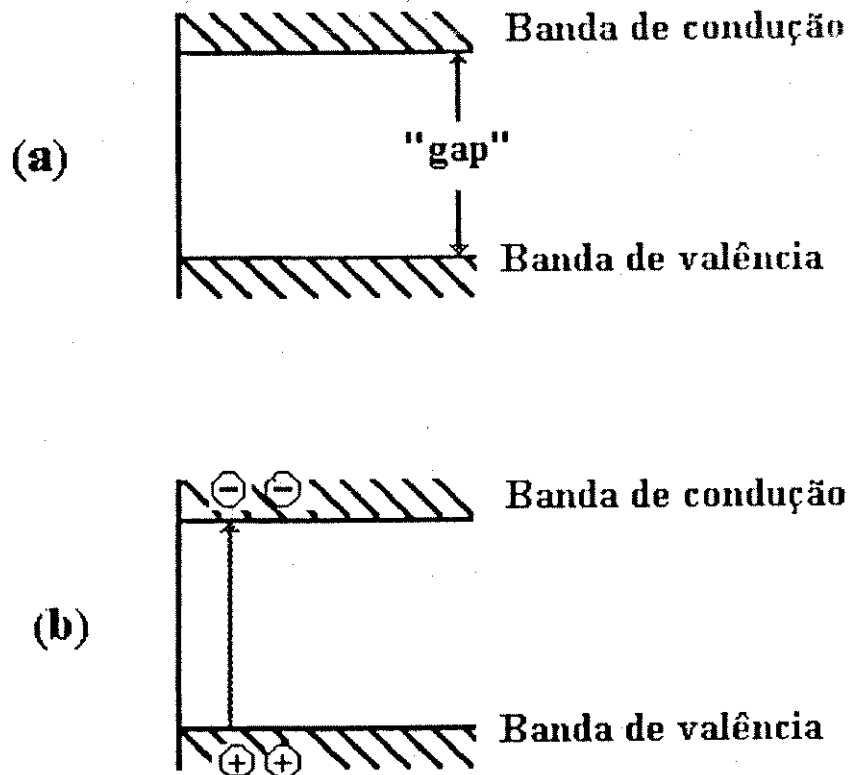


Figura I.10: (a) estrutura de bandas para um semicondutor sem irradiação e (b) estrutura de bandas para um semicondutor sob irradiação.

Essas cargas criadas no semicondutor podem se recombinar, os buracos podem se associar com espécies oxidáveis (H_2O , H_2O_2 , RH), e os elétrons com espécies reduzíveis (O_2 ou H^+) em solução, como demonstra a figura I.11 [79].

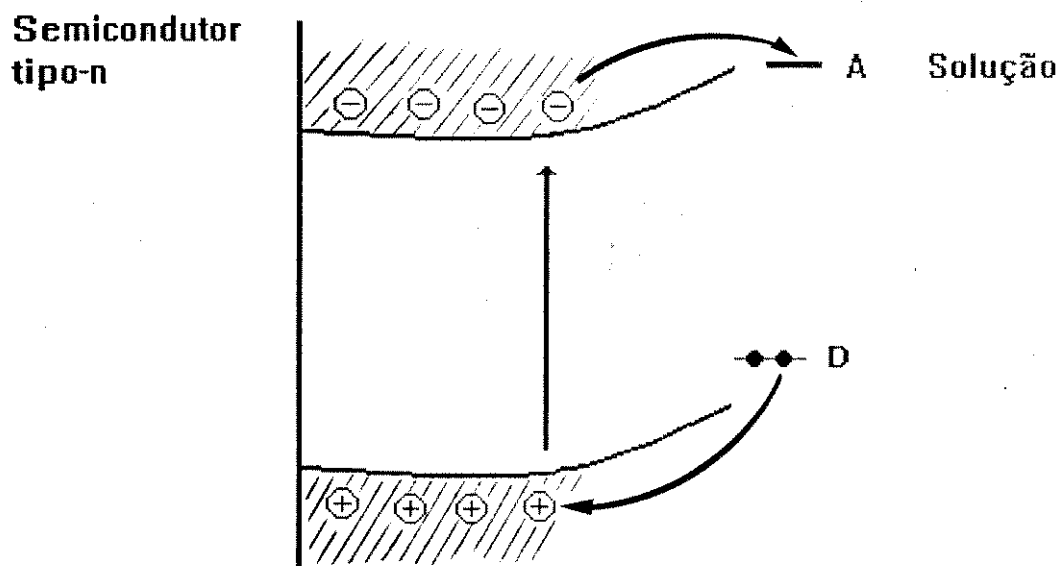
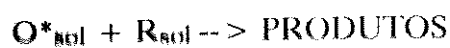
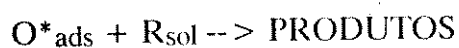
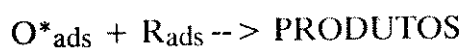


Figura I.11: Estrutura de bandas para uma partícula de semicondutor tipo-n, causando uma reação fotocatalítica.

Estudos experimentais recentes mostram a presença de oxigênio ativado (O^*) adsorvido na superfície do semicondutor e em solução. Esse oxigênio ativado reage com os reagentes contaminantes (R), em solução (R_{sol}) ou adsorvidos (R_{ads}), para formar os produtos. As reações que podem ocorrer são [80]:



A decomposição de várias substâncias orgânicas é feita por reações fotocatalisadas. A degradação de clorofórmio em suspensão aerada de TiO_2 sob irradiação, leva à total oxidação do clorofórmio para CO_2 e HCl [81,82]. Compostos organoclorados sofrem decomposição fotocatalítica em suspensão de TiO_2 com pequena quantidade de H_2O_2 , até a sua mineralização [83]. A detoxificação de contaminantes cianogênicos também pode ser feita por este método, obtendo-se a total decomposição de ferricianeto [84].

O semicondutor CdS possui "gap" na região visível, o que é vantajoso para a sua aplicação, uma vez que a energia solar seria suficiente para obter o semicondutor na forma ativa. A oxidação fotocatalítica de fenóis e fenóis clorados é conseguida até a formação de CO_2 , utilizando-se CdS como fotocatalisador [85].

A reação fotocatalisada utilizando-se um semicondutor como fotocatalisador se mostra como um método em potencial para tratamento de efluente Kraft, uma vez que é conhecida a fotodecomposição de lignina Kraft usando TiO_2 [86], ZnO , WO_3 , CdS e Fe_2O_3 [87].

1.10 - Objetivos

A meta deste trabalho foi o estudo de alternativas para o tratamento do efluente Kraft, sendo que nesse tratamento, o primeiro objetivo foi a sua descoloração. Para tanto, foram utilizados dois processos: o biológico e o fotoquímico.

No tratamento biológico foi utilizado o fungo *Chrysonilia sitophila* e as enzimas produzidas por ele. Nesta etapa do projeto fez-se o tratamento do efluente utilizando-se:

- O fungo *C. sitophila* sob a forma de "pellets";
- O fungo *C. sitophila* imobilizado em nylon;
- O caldo crú produzido pelo fungo, que contém enzimas lignolíticas;
- O caldo liofilizado, contendo as enzimas lignolíticas I, II e III, imobilizado em Sefarose e em sílica;
- Cada uma das enzimas produzidas pelo fungo (ligninases) purificadas e imobilizadas em Sefarose e em sílica.

Assim, iniciou-se o processo biológico utilizando o micélio do fungo, o qual foi refinado até a obtenção da ação de cada uma de suas enzimas separadamente, imobilizadas em dois tipos de suportes diferentes.

No tratamento fotoquímico utilizaram-se o ZnO e o TiO₂ como semicondutores e as etapas desse processo foram:

- Avaliação das melhores condições para a descoloração do efluente (pH, quantidade de semicondutor, região de comprimento de onda).

- Determinar se durante o tratamento houve mineralização do efluente, através de medidas de produção de CO_2 , análise da massa molar do efluente e diminuição na DQO.

- Determinar se radicais OH são responsáveis pela propagação da reação.

Um outro objetivo do projeto foi a avaliação da combinação dos dois processos (fotoquímico e biológico). Isso foi feito pré-irradiando-se o efluente e posteriormente adicionando-se o caldo produzido pelo fungo.

II - PARTE EXPERIMENTAL

II.1 - Equipamentos

- Sistema cromatográfico LKB 2137
- Fluxo laminar Veco modelo VLFS 12
- Espectrofotômetro Micronal B-382
- Autoclave vertical AV 75 Phoenix
- HPLC com detector UV/Visível Hewlett-Packard série 1050
- Incubador rotatório New Brunswick Scientific série 25
- Estufa de cultivo Fabbe Modelo 116
- Lâmpada de vapor de mercúrio 250 W PHILIPS
- Microscópio optico Olympus modelo CBA-K
- Liofilizador Edwards modelo L5KR
- Sistema de ultrafiltração MINITAM SYSTEM Millipore

II.2 - Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo que alguns deles, considerados mais específicos são listados a seguir:

Poliuretana (sintetizada e cedida pela Profa. Dra. Lúcia Innocentini-Mei.

Nylon 3M Scotch Brite

Poliester 3M (esponja Buf-Puf)

Álcool Veratrílico - Aldrich

DEAE Sephadex G-50 medlum (50-150 μ m)- Pharmacia

DEAE Sephadex A-50-120 - Pharmacia

Peroxidase tipo VI - Sigma

Cloreto de Lítio - Nuclear

Óxido de Zinco - Aldrich

Dióxido de Titânio (anatase e rutilo) - Aldrich

Manitol - Reagen

II.3 - Microorganismo e Meio de Cultura

O fungo *Crysonilia sitophila* TFB 27441 [88], de nossa coleção, foi mantido em placas de ágar e repicado a cada duas semanas.

O meio utilizado foi Fries modificado, contendo: glicose 1,5 g/L, ágar 1,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,6 g/L, KH_2PO_4 1,0 g/L, MgSO_4 0,5g/L, NaCl 0,1 g/L, CaCl_2 0,1g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 mg/L, ZnCl_2 0,15 mg/L, biotina e tiamina 1 mg/L, pH = 6,0 e T = 28°C.

Para as culturas líquidas utilizou-se glicose 1,0 g/L, e tampão biftalato 0,05 M (pH = 6,0), sem adição de ágar.

II.4 - Inóculo

A massa micelial contida em uma placa de Petri foi transferida para um Erlenmeyer com 50 mL de meio líquido. A seguir, agitou-se e filtrou-se em algodão, para separar o micélio da solução de esporos. A contagem desses últimos foi feita com o auxílio de uma cela Neubauer em microscópio. Foram inoculados em todas as culturas 10^7 esporos.

II.5 - Determinação das Atividades Enzimáticas

II.5.1 - Ligninase

A atividade de ligninase foi medida pela absorção à 310 nm do aldeído veratrílico ($E = 9.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Foram adicionados 550 μL de sobrenadante da cultura (previamente filtrado), 200 μL de peróxido de hidrogênio 2,0 mM e 250 μL de uma solução de álcool veratrílico 8 mM, em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH = 3,0). O branco foi obtido pela substituição do substrato por quantidade equivalente do tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH = 3,0).

Uma unidade de ligninase foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1,0 μmol de álcool veratrílico por minuto [89].

II.5.2 - Lacase

A atividade de lacase foi medida pela absorção a 460 nm da o-dianisidina oxidada ($E = 29.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Na cela de reação foram adicionados 600 μL de caldo filtrado, 200 μL de tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 5.0), 100 μL de o-dianisidina 1.0 mM e 100 μL de água destilada. O branco foi feito na ausência de o-dianisidina empregando um total de 300 μL de tampão citrato-fosfato 5,0 mM [90].

Uma unidade de atividade de lacase corresponde a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de o-dianisidina por minuto.

II.6 - Determinação de Açúcares

Para a determinação de açúcares redutores foi utilizado o método do DNS [91].

O reagente DNS foi preparado dissolvendo-se 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e 19,8 g de hidróxido de sódio em 1,4 L de água destilada. A esta solução foram adicionadas 306 g de tartarato de sódio e potássio, 7,6 g de fenol e 8,3 g de bissulfito de sódio.

Adicionou-se 3,0 g de reagente DNS a 1,5 mL de amostra. A mistura foi colocada em um banho a 100°C por 5 min e resfriada até a temperatura ambiente. A concentração de açúcares redutores nas culturas foi obtida a partir de uma curva de calibração de glicose, onde a absorbância foi lida a 550 nm.

II.7 - Otimização da Produção Enzimática

Para a utilização de fungo e do caldo de cultivo do mesmo, foi realizado um estudo para determinar algumas condições em que a produção de enzimas extra-celulares é aumentada.

II.7.1 - Condições Utilizadas para Todas as Culturas

Todas as culturas foram inoculados com 10^7 esporos, sendo oxigenadas por 3 min (vazão 20 mL/min) a cada 24 h, $T = 30^\circ\text{C}$ e agitadas a 150 rev/min. Todas as culturas foram feitas em triplicata.

II.7.2 - Suplemento de Glicose em Culturas Agitada e Estática

O acompanhamento de glicose no meio foi feito pelo método do DNS, descrito no item II.6, usando-se culturas não imobilizadas como controle. As amostras foram feitas em triplicata [54].

Em um Erlenmeyer de 250 mL adicionou-se 100 mL de meio Fries, 2 g de nylon sob a forma de cubos de $0,5 \text{ cm}^3$ e fez-se o inóculo. Adicionou-se, a cada 2 dias, quantidade suficiente de glicose para elevar sua concentração ao valor inicial de 0.1% (m/V), o controle foi feito com culturas sem o suplemento de glicose. Para tanto, fez-se uma solução em meio de cultura tamponada (pH = 6,0), com alta concentração de glicose, de modo que adicionando-se 5 mL dessa solução à cultura, a concentração final de glicose no meio foi de 0,1% (m/V).

II.7.3 - Variação da Massa de Suporte para Imobilização

Em um Erlenmeyer de 125 mL foram colocadas as seguintes massas de nylon: 0,3, 0,5, 1,0 e 1,5 g, sob a forma de cubos de $0,5 \text{ cm}^3$ e 75 mL de meio Fries. Foi feito o inóculo e as culturas foram mantidas sob agitação. Culturas não imobilizadas foram utilizadas como controle. As amostras foram feitas em triplicata.

II.7.4 - Variação do Tipo de Suporte

Em cada Erlenmeyer de 125 mL foi colocado um tipo de suporte: nylon, poliuretana ou poliéster sob a forma de 3 cubos de $2 \times 2 \times 1 \text{ cm}$ em 30 mL de

meio Fries. Foi feito o inóculo e as culturas foram mantidas sob agitação. Foram usadas, como controle, culturas não imobilizadas. As amostras foram feitas em triplicata.

II.7.5 - Adição de Glicerol

Adicionou-se glicerol no meio Fries, de modo a obter concentração final de 1,0% (m/V). As culturas encontram-se descritas no item II.7.4.

II.7.6 - Adição de Álcool Veratrílico

Álcool veratrílico foi adicionado no segundo dia de cultura. Para tanto, fez-se uma solução concentrada do mesmo em meio Fries e adicionou-se à cultura um volume suficiente dessa solução, de modo a obter concentração final, nas culturas, de álcool veratrílico 2,5 mM [92].

II.8 - Efluente Kraft

O licor da primeira extração alcalina E1 (pH = 8,2) foi fornecido pela RIGESA Papel e Celulose (E. S., Brasil). O efluente foi mantido à temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio e filtrado (filtro 0,5 mm) para remoção de partículas grandes.

II.9 - Preparação do Efluente para Experimentos de Descoloração

Primeiramente o efluente foi diluído em água destilada 1:1 e seu pH foi levado a 4,0 com H₂SO₄ 6N, onde parte das cloroligninas precipitam. Filtrou-se em filtro de papel e membrana Millipore (0,47 mm). Ajustou-se a absorvância do efluente para 0,5 (por diluição) e filtrou-se novamente em membrana Millipore (0,47 mm).

A absorvância inicial utilizada para todos os ensaios de descoloração foi 0,5 (1894 unidades de cor).

II.9.1 - Determinação da Cor

A cor foi avaliada de acordo com o método padrão CPPA conforme descrito por Livernoche e col. [93]. O pH do efluente foi ajustado para 7,6 com NaOH 1 N ou HCl 1 N. Após o ajuste do pH o efluente foi filtrado em membrana millipore 0,47 mm, para remoção de sólidos em suspensão. Foi determinada a absorvância a 465 nm do líquido filtrado contra água destilada.

As absorvâncias foram transformadas em unidades de cor (CU) de acordo com a equação :

$$Cu = 500 A2/A1$$

onde, A1 é a absorvância de uma solução padrão de platina-cobalto de 500 CU (A₄₆₅ = 0,132), A2 é a absorvância do efluente.

II.10 - Determinação da Porcentagem de Água no Micélio (livre e imobilizado)

Separou-se o micélio do caldo de cultivo por filtração em papel. Determinada massa de micélio úmido foi pesada, colocada em estufa por 24 h e pesada novamente. As amostras foram feitas em triplicata (86,4% é umidade).

II.11 - Descoloração do Efluente por Micélio de *Chrysonilia Sitophila*

Em 30 mL de efluente não esterilizado (pH 6,5) sem qualquer fonte de carbono e nitrogênio suplementar, foram adicionados 5,0 g de micélio úmido previamente lavado com água destilada (equivalente a 0,7 g de micélio seco, determinado conforme item II.10), com a finalidade de retirar o caldo contido em seu interior.

Os experimentos foram feitos em um Erlenmeyer de 125 mL a 30°C e agitados a 150 rev/min. A absorvância foi lida a 465 nm em intervalos de 1 h por um período de 4 h. A descoloração foi expressa como porcentagem da absorvância inicial.

Para corrigir o efeito de diluição do efluente pela água contida no interior do micélio úmido, o início do experimento (absorvância inicial) foi considerado após adição do micélio e agitação por alguns minutos. Esse procedimento foi seguido para todos os experimentos de descoloração com fungo.

II.12 - Descoloração pelo Fungo Imobilizado em Nylon

Primeiramente, a massa de fungo no suporte, foi determinada por diferença de peso (triplicata). Em 30 mL de efluente não esterilizado foram colocados 5 g de micélio imobilizado em nylon, previamente lavado com água destilada. Os experimentos foram feitos como descrito no item II.11.

II.13 - Descoloração do Efluente por Micélio Morto de *C. sitophila*

Para a determinação da adsorção da cor do efluente pelo micélio, utilizou-se o fungo morto. O micélio foi autoclavado por 30 min a 120 °C, sendo que 5 g de micélio úmido morto foram colocados em presença de 30 mL de efluente não esterilizado. Toda descoloração observada foi devida à adsorção pela massa micelial. Os experimentos foram feitos como descrito no item II.11.

II.14 - Descoloração do Efluente pelo Caldo de *C. sitophila*

Após o crescimento de *C. sitophila* nas condições padrões, o micélio foi filtrado em membrana Millipore e as atividades de ligninase e lacase foram medidas (20 U/L de ligninase e 0,02 U/L de lacase). Em 20 mL de efluente não esterilizado, adicionou-se 20 mL de caldo, que continha o "pool" de enzimas (volume total, 40 mL). Os experimentos foram feitos em Erlenmeyer de 125 mL, 30°C, pH = 6,5 e agitação a 150 rev/min⁻¹.

Em experimentos em presença de H_2O_2 , a concentração deste no meio foi de $0,48 \times 10^{-3}$ M. Como controle foram feitos experimentos apenas com efluente e H_2O_2 .

II.15 - Determinação da Massa Molar por Permeação em Gel

A uma coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia), 60x1,5 cm, preenchida até uma altura média de 23 cm, aplicou-se 0,5 mL de amostra (efluente com e sem tratamento). O eluente utilizado foi uma solução aquosa 0,1 N de NaOH e 0,1 N de LiCl, a uma vazão de 2,15 mL/min. O LiCl foi utilizado para evitar aglomeração das cloroligninas [94]. As cloroligninas foram determinadas a 280 nm.

II.16 - Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

A DQO foi determinada pelo método padrão APHA (1975) [95]. O método tem por base, a oxidação da matéria orgânica por uma mistura, em ebulição, de ácido crômico e ácido sulfúrico (dicromato de potássio em meio ácido). O excesso de dicromato foi titulado com sulfato ferroso amoniacal, usando como indicador, o complexo ferroso de orto-fenantrolina (ferroína). Os resultados foram expressos em mg/L de oxigênio. A DQO inicial do efluente com $A = 0,5$, foi em torno de 500 mg/L de O_2 .

II.17 - Obtenção do Caldo Liofilizado

Após o crescimento de *C. sitophila* nas condições padrões, o micélio foi filtrado em membrana Millipore. O filtrado (caldo) foi ultra-filtrado e então liofilizado.

II.18 - Purificação das Enzimas Ligninases I, II e III [44]

As culturas foram filtradas através de membranas Millipore (previamente foi adicionado fluoreto de p-metilfenilsulfonila para evitar proteólise). O filtrado foi concentrado a 80% do volume original. Após diálise por 12 h contra tampão tartarato de sódio 5mM (pH = 4,5), a amostra foi aplicada em uma coluna de DEAE Sephadex A-50-120 2x12 cm (Pharmacia). A coluna foi lavada com 100 mL de tampão tartarato de sódio (pH = 4,5) e um gradiente salino foi aplicado (0 -0,1 M NaCl) em 5 mM do mesmo tampão. Após eluição, as frações contendo hemoproteínas foram dialisadas, liofilizadas e estocadas a -20°C. As frações separadas e caracterizadas na Tabela II.1: [96]

Tabela II.1: Características Gerais das Frações de Proteínas de *C. sitophila*.

Fração	Atividade de Ligninase (U/L)	pH ótimo	% de carboidrato	Massa molar	Temp. ótima (°C)
Lig. I	121	3.0	25.7	68000	28
Lig. II	210	5.0	14.8	50200	28
Lig. III	108	4.0	17.4	47500	28

II.19 - Imobilização em Sefarose-4B Ativada com CNBr

Foram feitas as imobilizações em Sefarose 4-B ativada com CNBr das seguintes enzimas: Peroxidase (HRP tipo VI), Ligninase I, Ligninase III e do caldo liofilizado.

Primeiramente, 1,0 g de Sefarose-4B ativada com CNBr foi lavada e guardada por 1 h com uma solução de HCl 1 mM. Fez-se uma solução com 10 mg de enzima (purificada e não purificada) em tampão NaHCO₃ (10 mM, pH = 8,3) contendo NaCl, 0,5 mM. Misturou-se essa solução com a Sefarose e deixou-se em contato por 12 h a 4°C. Para bloquear os grupos ativos do suporte, que não se ligaram à enzima, adicionou-se ao gel uma solução de agente bloqueante, glicina 0,2 M (pH = 8,0) e para remover o excesso de proteína, o gel foi lavado alternativamente por três ou quatro vezes com tampão NaHCO₃ (pH = 8,3) e tampão acetato de sódio (pH = 4,2) cada um contendo NaCl 0,5 mM. As enzimas imobilizadas foram estocadas a 4°C [97].

II.20 - Imobilização em Sílica 24/32 e 32/60

Foram feitas as imobilizações em sílica, previamente tratadas (etapas 1 a 3), das seguintes enzimas: Peroxidase (HRP tipo VI), Ligninase I, Ligninase II, Ligninase III e do caldo liofilizado. Utilizou-se sílica de tamanhos diferentes, mesch 24/32 e 32/60 com diâmetro médio de poro de 440 Angstrons.

Etapa 1: Silanização

O suporte (sílica) foi imerso em uma solução 2% de γ -aminopropiltrimetoxissilano (2,5 mL de solução/g de sílica) por 1 h. Filtrou-se e o suporte foi seco a 50°C por 18 h. O silano que não reagiu foi lavado do suporte com água destilada e o suporte alquilamino foi seco a 100-110°C.

Etapa 2: Preparação do Suporte Arilamino

Para cada grama de suporte alquilamino, proveniente da etapa anterior, foi adicionado 2,5 mL de uma solução 5% de cloreto de 3,5-dinitrobenzoila em piridina (previamente seca)(m/V), a temperatura ambiente. Após 30 min o líquido foi filtrado, lavado com água destilada e seco a 100°C por 24 h.

Para cada grama do suporte acima adicionou-se 2,5 mL de uma solução 5% de ditonito de sódio (m/V), a reação foi feita sob refluxo (100°C) por 1 h. O suporte arilamino foi lavado com água destilada e seco a 100°C por 24 h.

Etapa 3: Ativação do Suporte e Imobilização da Enzima

Para cada grama de suporte arilamino, obtido na etapa 2, adicionou-se 5 mL de uma solução de HCl 2N. A mistura foi colocada em banho de gelo (0°C). Adicionou-se, então, 25 mg de nitrito de sódio por mL de solução de HCl, sob agitação. Após 30 min o sólido foi lavado com água gelada e depois com tampão citrato-fosfato gelado 0,05 M (pH = 7,0), obtendo-se a sílica ativada.

Para cada grama de sílica ativada adicionou-se 4 mL de solução de enzima e deixou-se a solução em contato com a sílica por 24 h à 4°C. O material foi lavado e guardado em tampão fosfato 0,05 M (pH = 7,0) [98].

As concentrações das soluções de enzima foram:

Peroxidase: 2,30 mg/mL

Caldo liofilizado: 2,46 mg/mL

Lig. I: \cong 1,00 mg/mL

Lig. II: \cong 0,50 mg/mL

Lig. III: \cong 0,5 mg/mL

II.21 - Medida da Atividade Enzimática em Sílica e em Sefarose

As medidas de atividade das enzimas imobilizadas foram feitas com álcool veratrílico, como descrito no item II.5.

Primeiramente, todos os reagentes foram colocados diretamente na cubeta, onde os 550 μ L de caldo foram substituídos por 550 μ L de água destilada. Com o auxílio de uma espátula, uma pequena quantidade de suporte sólido foi colocada sobre um papel de filtro dobrado em quatro, para retirar o excesso de líquido. O suporte foi então transferido para a cubeta e o conteúdo foi agitado. Esperou-se até que o suporte decantasse e leu-se a absorbância.

Depois de feita a medida, o suporte foi transferido para um papel alumínio, e seco em estufa por 24 h ($T = 100^{\circ}\text{C}$). O material foi pesado para obtenção do número de unidades por mg de suporte seco.

II.22 - Preparação de Efluente para Tratamento com Enzimas Imobilizadas

Para todos os ensaios de descoloração com enzimas imobilizadas foram utilizados: 10 mL de efluente ($A_i = 0,5$), H_2O_2 5 mM, $T = 25^\circ C$ e $pH = 5,0$. As quantidades de unidades enzimáticas utilizadas para cada ensaio são dadas nas respectivas figuras.

II.23 - Descoloração do Efluente por Reação Fotocatalítica, Variando-se o Semicondutor

A reação foi feita em um Becker de 50 mL, contendo 10 mL de efluente ($A_i = 0,5$), pH inicial 7,5 e 50 mg de fotocatalisador ZnO e TiO_2 . A solução foi irradiada na superfície utilizando-se uma lâmpada de vapor de mercúrio de 250 W Philips (sem o bulbo de vidro) a uma distância de 12 cm (fluência para $\lambda > 254$ nm 108 Wm^{-2} e para $\lambda > 300$ nm $68,4 \text{ Wm}^{-2}$). Durante a irradiação, a solução foi agitada magneticamente e borbulhada com O_2 a uma vazão de $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

II.24 - Variação da Massa de ZnO e pH do Efluente

Foram feitos estudos univariados da influência do pH , da massa do fotocatalisador, baseados nas condições descritas no item II.23.

Para tanto, fez-se a irradiação do efluente variando-se o pH entre 5,0; 7,5 e 9,0, com 50 mg de ZnO no meio reacional.

A dependência da descoloração em função da massa de ZnO, foi verificada através de experimentos usando-se: 10 mg, 25 mg e 50 mg de ZnO.

Com a finalidade de determinar se o processo de descoloração dependia de O₂, fez-se experimentos com 50 mg de ZnO (sob as mesmas condições descritas) e borbulhou-se N₂, no lugar de O₂, a uma vazão de 10 mL.min⁻¹.

II.25 - Descoloração do Efluente sob Diferentes Condições de Irradiação: Utilização de Filtros

Depois de estabelecidas as melhores condições experimentais para a descoloração do efluente (pH = 7,5, 50 mg de ZnO, O₂ e $\lambda > 254$ nm), foi feito o tratamento utilizando-se filtros para seleção de faixas de comprimentos de onda. Os filtros usados permitiram trabalhar a: $\lambda > 340$ nm, $\lambda > 320$ nm, e $\lambda > 300$ nm.

II. 26 - Determinação da Produção de CO₂.

A determinação de produção de CO₂ foi feita por diferença de massa. O CO₂ foi determinado acidificando o meio com ácido sulfúrico diluído, e a diminuição de massa observada foi devida a evolução de CO₂.

Para tanto, o efluente, sob as melhores condições estabelecidas, foi irradiado por diferentes intervalos de tempo e a sua massa pesada antes da irradiação. Um volume de 5 mL de uma solução de H₂SO₄ 3N (de massa conhecida), foi adicionado ao efluente, agitou-se e a mistura foi pesada novamente.

Conhecendo-se a massa da solução de H₂SO₄ e a massa de efluente antes da irradiação, pode-se determinar a massa de CO₂ produzida. O

resultado é expresso em mg/L de amostra [99]. As amostras foram feitas em triplicata.

II.27 - Adição de Manitol ao Meio Reacional

Com a finalidade de determinar se a reação de degradação se dá via radicais livres OH, estudou-se a influência da presença de um supressor [100]. Assim sendo, sob as melhores condições experimentais estabelecidas para a descoloração do efluente (item II.25), adicionou-se manitol, de modo que a concentração final deste, no meio reacional foi 0,05 M. Foi feita a irradiação do efluente por 2 h e lida a absorbância 465 nm.

II.28 - HPLC para Amostras Irradiadas e não Irradiadas

Realizaram-se análises qualitativas por HPLC, visando à detecção de derivados fenólicos de cloroligninas de baixa massa molar, para o efluente antes e depois do tratamento nas seguintes condições:

O volume de amostra injetada foi de 20 μ L com vazão de 1 mL/min; velocidade do papel de 1,0 cm/min; fase móvel H₂O:metanol 1:1; atenuação = 1 e com detector UV-Visível (λ = 254 nm).

Utilizou-se uma coluna Lichrosord RP-8 Hewlett-Packard - 9915 MO 574, dimensões 200x4,6 mm e tamanho das partículas 5mm.

Foi feito, para análises qualitativas, HPLC para amostras antes de irradiar e com 1,5 e 3,0 h de irradiação. As amostras foram diluídas em metanol à proporção de 1:1.

II.29 - Tratamento Fotoquímico e Biológico Combinados

Estes experimentos foram realizados pré-irradiando 20 mL de efluente, por um período de tempo de 15 min (o efluente foi irradiado sob as melhores condições estabelecidas descritas no item II.25) e filtrado em membrana de Millipore. Adicionou-se 20 mL de caldo filtrado de *C. sitophila* e ajustou-se o pH para 5,5. Os experimentos foram feitos à 30°C. O caldo utilizado continha 120 U/L de ligninase e 0,02 U/L de lacase.

III - Resultados e Discussão

III.1 - Otimização da Produção Enzimática:

Como mencionado anteriormente, uma das etapas deste projeto consiste na imobilização das enzimas produzidas pelo fungo *C. sitophila*. Para tanto, fez-se um estudo de alguns parâmetros que poderiam levar a um aumento da produção enzimática.

O fungo *C. sitophila* vem sendo estudado em nosso grupo de pesquisa há alguns anos, ao longo dos quais, suas condições de crescimento tem sido otimizadas [101].

É conhecido que a produção de enzimas está relacionada com as condições de cultivo. Assim, os parâmetros estudados neste trabalho para aumentar a produção enzimática foram: (i) agitação, (ii) alimentação de glicose (de 2 em 2 dias), (iii) variação da massa de suporte utilizada para imobilização do fungo, (iv) variação do tipo de suporte (nylon, poliuretana e poliéster), (v) presença de glicerol e (vi) presença de álcool veratrílico.

(i) Agitação:

É conhecido que o aumento da concentração de O₂ no meio de cultivo, aumenta a produção de ligninases e H₂O₂ em culturas do *P. chrysosporium* [102]. Assim sendo, a agitação foi usada como forma de incrementar a oxigenação do meio. Todavia, pôde ser constatado nas figuras III.1 e III.2, que não houve aumento significativo na produção de ligninases para as culturas agitadas, o que possivelmente se deve às oxigenações sucessivas do

meio, a cada 24 horas. Assim, pode-se concluir que o efeito da agitação seria sómente a oxigenação do meio.

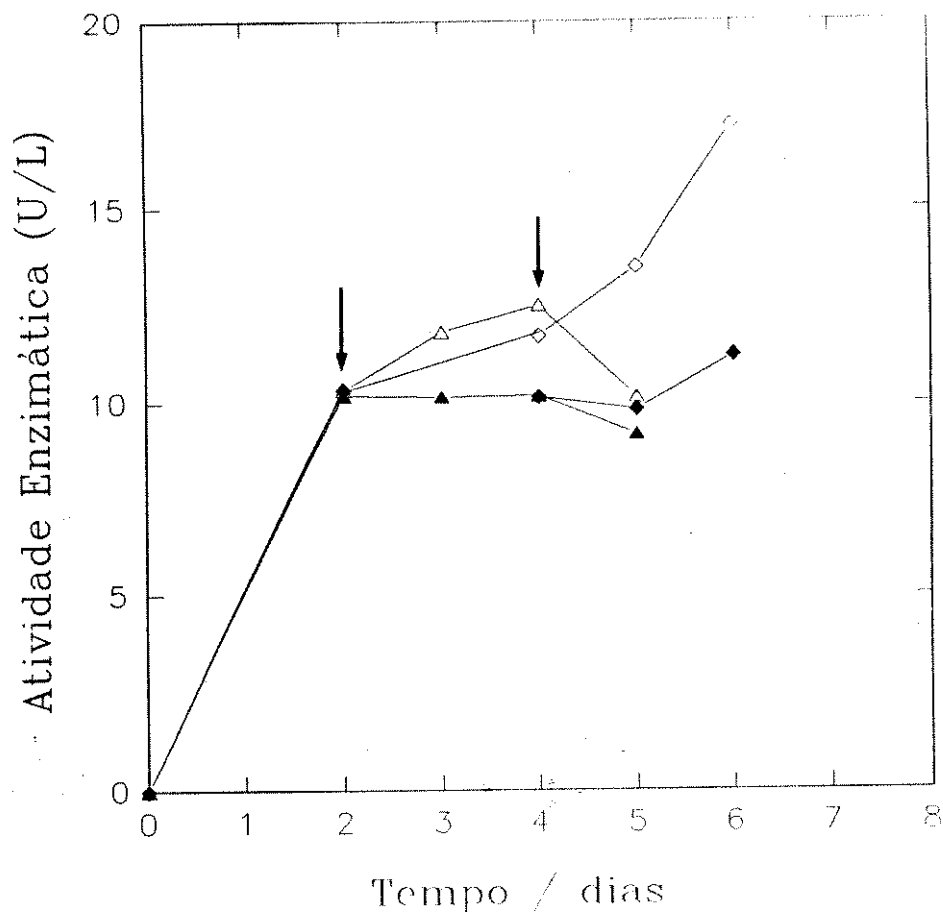


Figura III.1 : Atividade de ligninase do caldo em função do tempo, para culturas estáticas de fungo livre e imobilizado em nylon, com e sem suplemento de glicose. Foram usados 2 g de nylon (cubos de $0,5 \text{ cm}^3$), Erlenmeyer de 250 mL e 100 mL de meio. (▲) micélio livre sem suplemento de glicose, (◆) micélio livre com suplemento de glicose, (△) micélio imobilizado em nylon sem suplemento de glicose e (◇) micélio imobilizado em nylon com suplemento de glicose. (↓) adição de glicose.

Pelas figuras III.1 e III.2, pode-se observar que quando o fungo foi imobilizado em nylon, a produção de enzima extracelular para o fungo imobilizado em nylon foi sempre superior à do fungo livre (este fato também

pode ser observado em todos os experimentos subsequentes), conforme observado anteriormente para o fungo *P. chrysosporium* immobilizado em diferentes suportes, como: nylon, poliuretana, agar e sefarose [53,55]. Isto pode ser atribuído ao fato de que quando o fungo está aderido ao suporte, a superfície micelial exposta à atmosfera de oxigênio é maior, facilitando a excreção de enzimas [103].

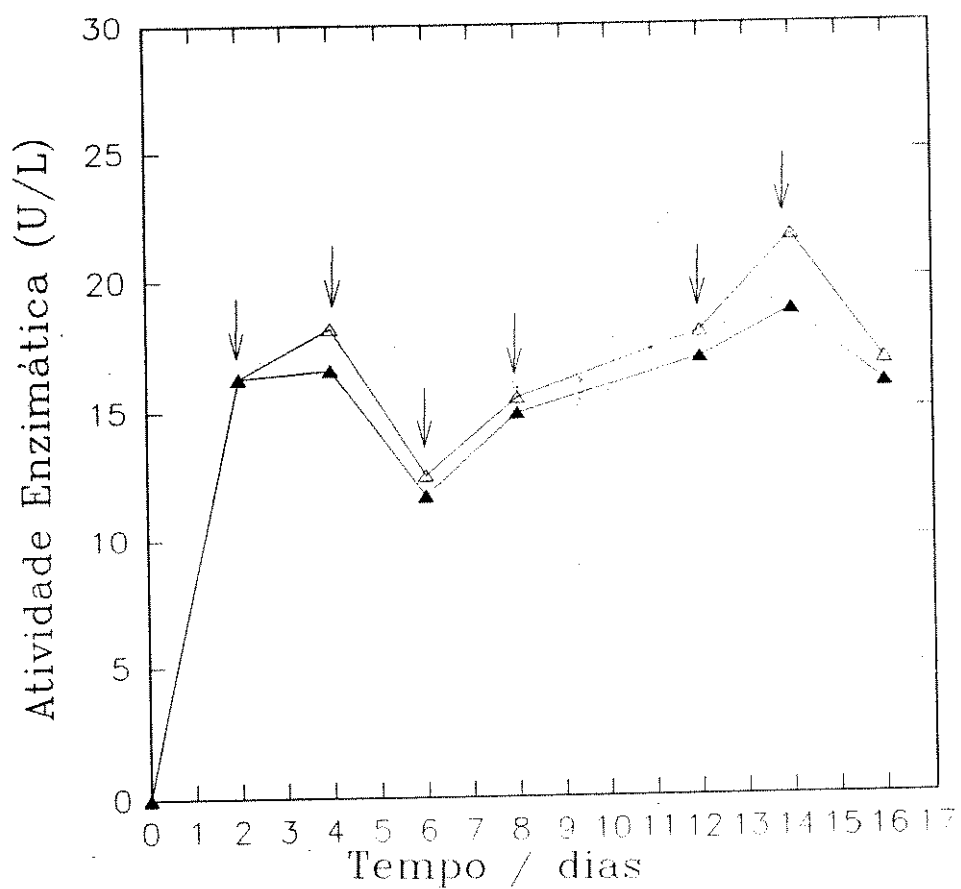


Figura III.2 : Atividade de ligninase do caldo em função do tempo, para cultura agitada de fungo livre e immobilizado em nylon, adicionando-se glicose cada 2 dias. Foram usados 2g de nylon (cubos de 0,5 cm³), Erlenmeyer de 250 mL e 100 mL de meio. (▲) micélio livre e (△) micélio immobilizado em nylon. (↓) adição de glicose ao meio de cultura.

(ii) Alimentação de glicose:

A concentração inicial de glicose de 0,1% (m/V) no meio de cultura recém preparado, foi consumida em dois dias de cultivo. Nesse período, suplementou-se o meio com glicose até concentração 0,1% novamente. Observou-se o mesmo efeito [104].

Na figura III.2, tem-se a atividade enzimática do caldo em função do tempo para culturas onde a glicose foi repostada a cada dois dias. Não foi observado aumento na produção de enzimas extracelulares com o tempo de cultivo nem a perda de atividade, que comumente ocorre em culturas de *C. sitophila* (vide figura III.3), ou seja a atividade enzimática do caldo se manteve.

É sabido que um fungo sob ausência de fonte de carbono, produz proteases, com a finalidade de degradar proteínas como fonte de carbono [105,106]. Com a reposição da glicose no meio de cultivo, provavelmente o fungo deixou de produzi-las e conseqüentemente não houve degradação das ligninases do caldo [107].

(iii) Variação da massa de suporte utilizada para imobilização do fungo:

Como já mencionado, as condições de cultivo são importantes para a produção enzimática. A figura III.3 apresenta a variação da atividade enzimática em função do tempo, para diferentes massas de suporte.

Observou-se uma pequena variação na atividade enzimática em função da massa do suporte, onde o máximo da atividade foi obtido utilizando a relação 1,0 g de suporte para 75 mL de meio.

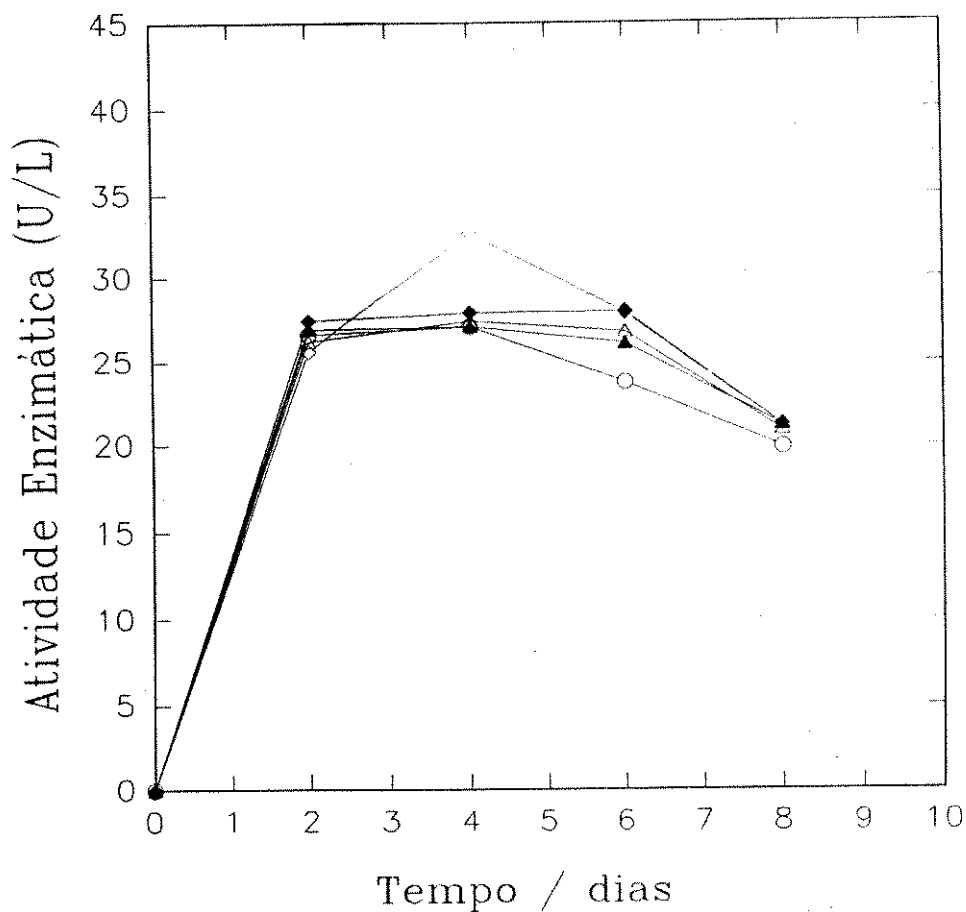


Figura III.3 : Atividade de ligninase do caldo em função do tempo, variando-se a massa de nylon. o nylon foi utilizado sob a forma de cubos de $0,5 \text{ cm}^3$, Erlenmeyer de 125 mL e 75 mL de meio. (○) micélio livre, (△) 0,3g, (▲) 0,5 g, (◇) 1,0 g e (◆) 1,5 g.

(iv) Variação do tipo de suporte:

Uma das técnicas utilizadas para aumentar a produção enzimática é a imobilização de microrganismos em diferentes tipos de suportes. Uma das mais altas produções de ligninases foi obtida imobilizando *P. chrysosporium* em vidro sinterizado (1200 U/L) [108]. Outros autores reportaram

diferenças ainda maiores na produção enzimática deste fungo imobilizado nesses mesmos suportes [54,109]. Assim, a variação do tipo de suporte pode render diferentes produções enzimáticas. A figura III.4 mostra a imobilização do fungo em nylon, poliuretana e poliéster. Não houve diferenças significativas entre os três suportes.

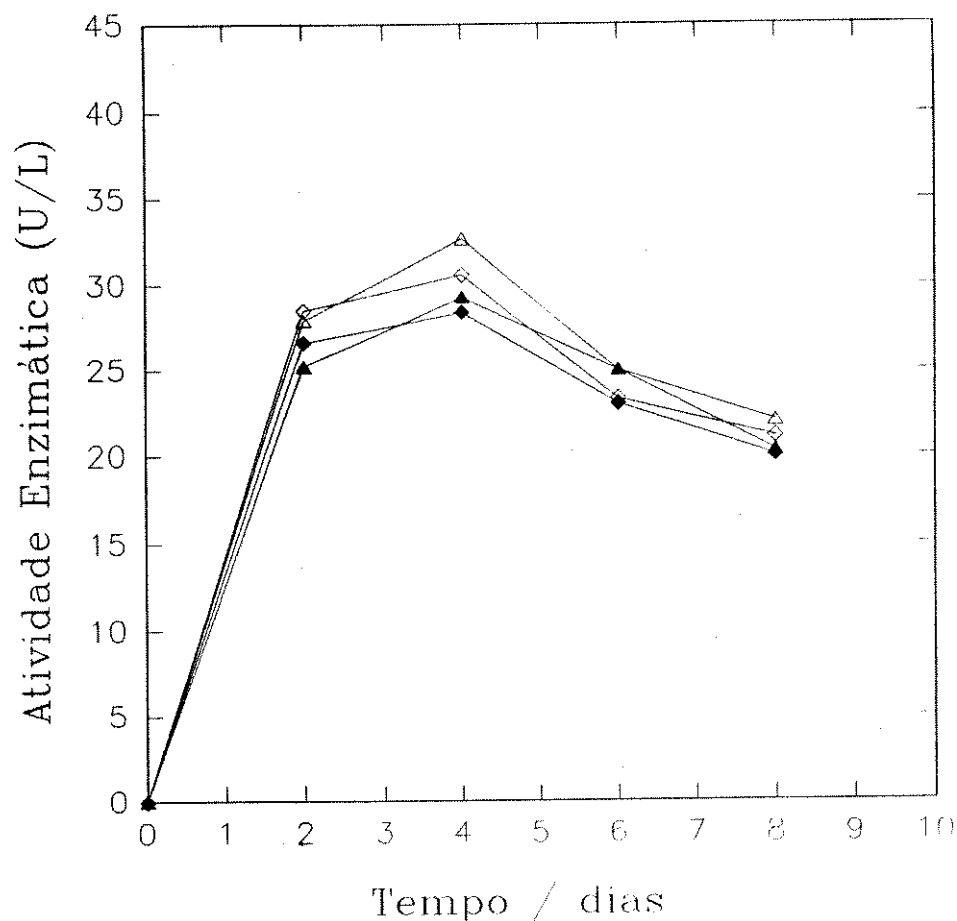


Figura III.4 : Atividade de ligninase do caldo em função do tempo. Utilizou-se Erlenmeyer de 125 mL, 30 mL de meio e o suporte foi utilizado sob a forma de 3 cubos de 2x2x1 cm. Fungo livre (◆), imobilizado em poliéster (▲), em nylon (◇) e em poliuretana (△).

No entanto, era de se esperar que as diferenças na produção enzimática não fosse m grandes, quando a única variação do sistema foi o tipo de suporte, Isto porque, os três suportes utilizados apresentam características físicas semelhantes, são espumas, inertes e insolúveis.

(v) Presença de glicerol:

Utilizando-se glicerol no meio de cultivo, como fonte adicional de carbono, obteve-se um pequeno aumento na produção enzimática. Os resultados são mostrados na figura III.5.

É conhecido que em cultura de *P. chrysosporium* utilizando glicerol como fonte de carbono, a inativação das ligninases é mais lenta. Isto porque na presença deste, a produção de peróxido é menor e conseqüentemente a inativação da enzima por peróxido diminui [110].

Assim, esse aumento de atividade pode ser atribuído à uma menor inativação das enzimas devido à presença de glicerol e não uma indução do fungo para produzir mais enzimas [111].

(vi) Presença de álcool veratrílico:

Alguns autores [104,109,112,113] mostraram que a produção de ligninases aumenta quando o meio de cultura contém álcool veratrílico adicional, que é um metabólito secundário de *P. chrysosporium*, bem como um substrato de lignina-peroxidase. No entanto, outros estudos demonstraram que álcool veratrílico não aumenta a produção enzimática,

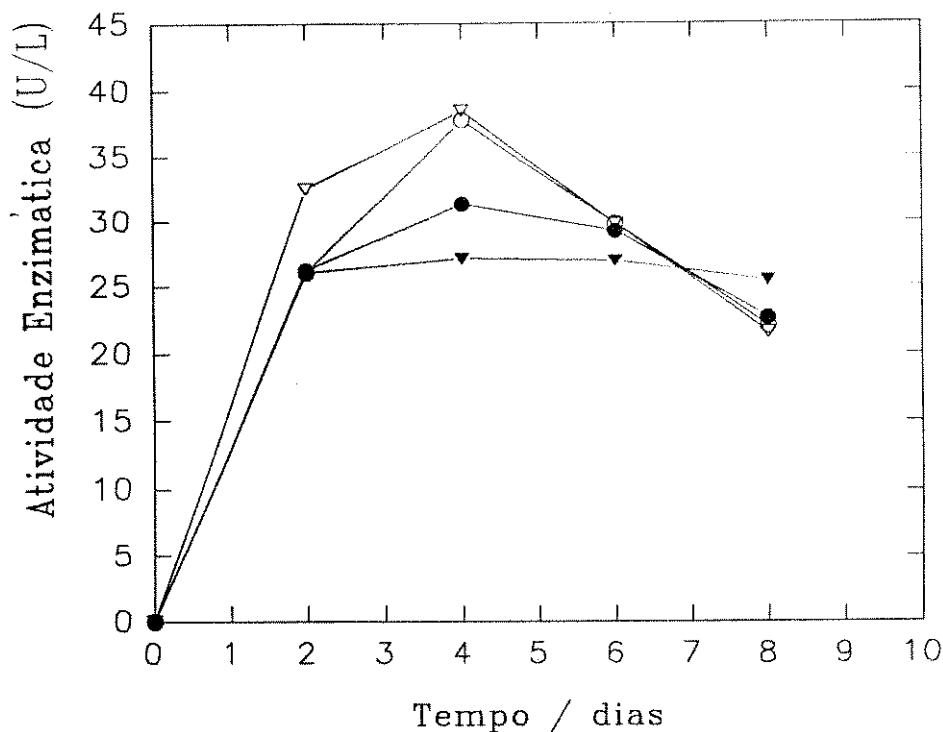


Figura III.5 : Atividade de ligninase do caldo em função do tempo. Utilizou-se 1,0% de glicerol em Erlenmeyer de 125 mL, 30 mL de meio e o suporte foi utilizado sob a forma de 3 cubos de 2x2x1 cm. (▼) micélio livre, (●) poliéster, (○) poliuretano e (▽) nylon.

mas sim, protege a enzima de inativação por peróxido de hidrogênio produzido durante o primeiro estágio de crescimento do fungo [112].

As figuras III.6 e III.7 mostram os resultados obtidos para culturas de *Chrysonilia sitophila* em meio contendo de álcool veratrílico.

Foi demonstrado anteriormente que os caldos de cultura de *C. sitophila* apresentam um máximo de atividade no quarto dia de cultivo e em seguida

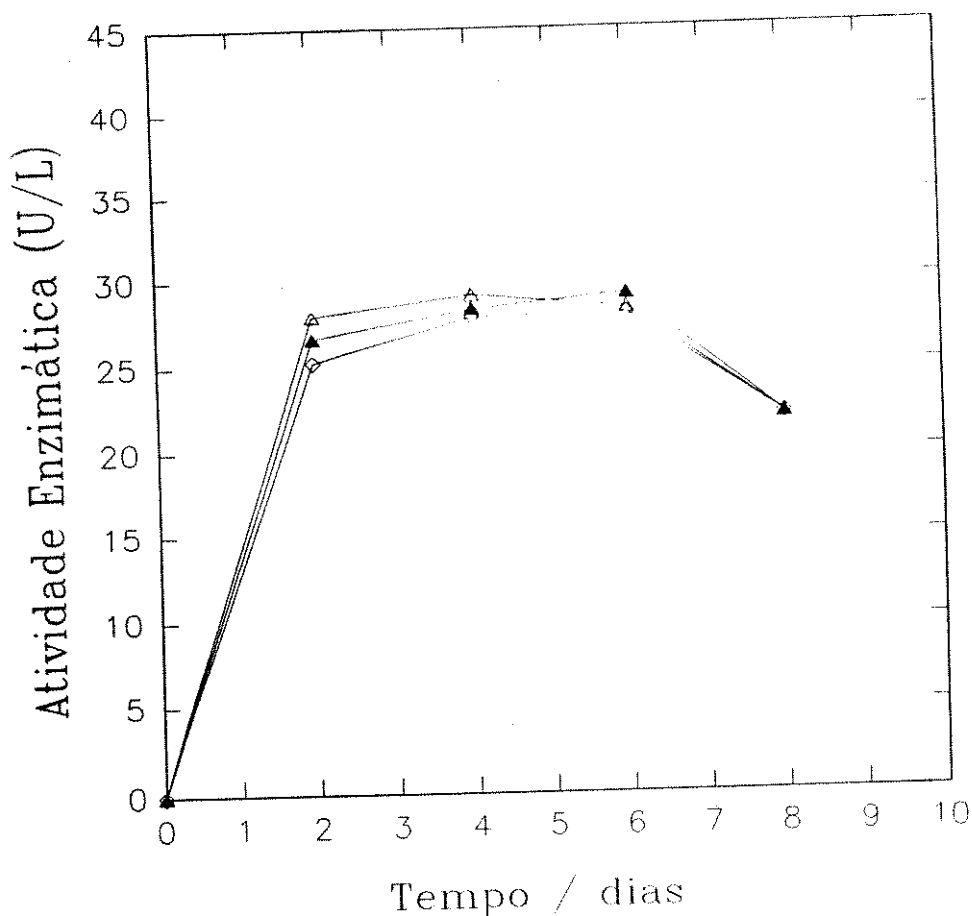


Figura III.6 : Atividade de ligninase do caldo em função do tempo. As condições utilizadas foram: Erlenmeyer de 125 mL, 30 mL de meio, suporte foi utilizado sob a forma de 3 cubos de 2x2x2 cm e no segundo dia de crescimento adicionou-se álcool veratrílico (2,5 mM). (◇) micélio livre, (▲) micélio immobilizado em poliéster e (△) micélio immobilizado em poliuretana.

a atividade começa a diminuir [41]. De acordo com a figura III.6, fica claro que a atividade permaneceu constante até o sexto dia de cultivo e começou a cair lentamente. Na figura III.7, observou-se um decréscimo na atividade para o micélio livre e immobilizado em poliéster, no entanto, este decréscimo foi muito menor quando comparados com culturas sem a presença de álcool

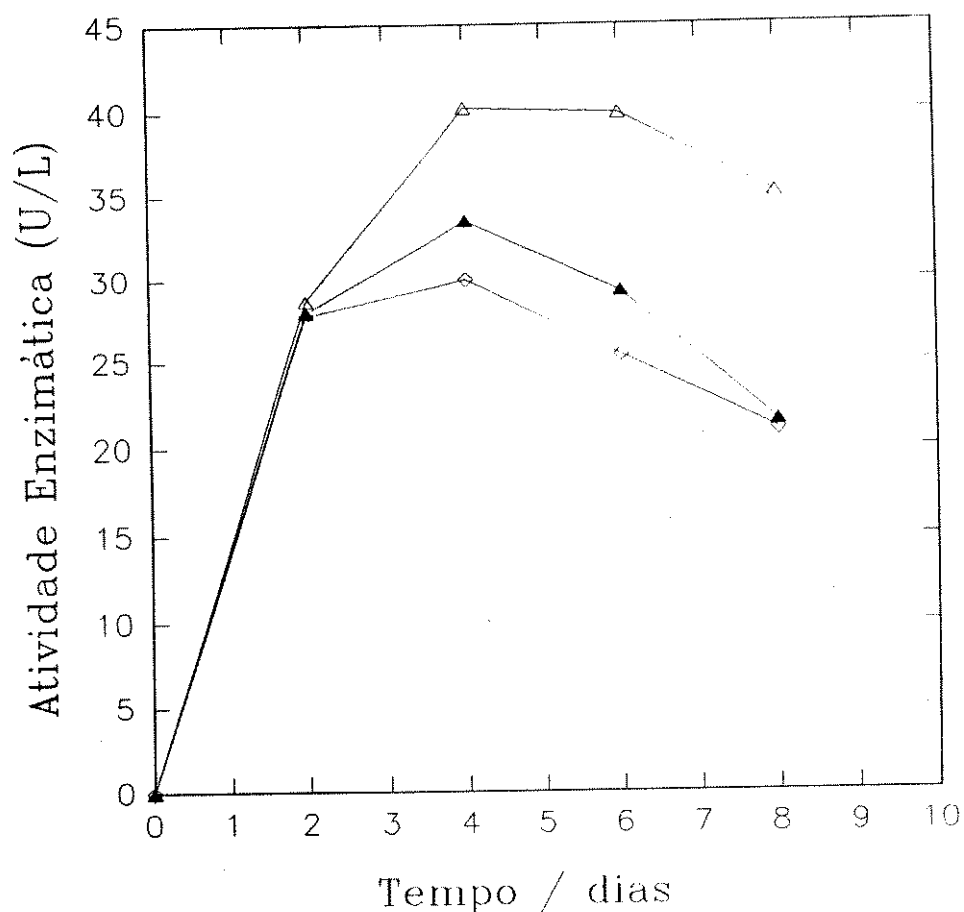


Figura III.7 : Atividade de ligninase do caldo em função do tempo. As condições utilizadas foram: 1,0 % de glicerol, Erlenmeyer de 125 mL, 30 mL de meio, o suporte foi utilizado sob a forma de três cubos de 2x2x1 cm e no segundo dia de crescimento adicionou-se álcool veratrílico (2,5 mM). (◇) micélio livre, (▲) micélio imobilizado em poliéster e (△) micélio imobilizado em poliuretano.

veratrílico. Assim, o álcool veratrílico não atua como indutor para a produção de ligninases em *C. sitophila*, mas como protetor da inativação da enzima.

Baseados nos resultados de produção enzimática para o fungo imobilizado em diferentes suportes, optou-se pelo nylon para conduzir os experimentos de descoloração do efluente.

III.2 - Descoloração do Efluente Kraft pelo Fungo *Chrysonilia sitophila*

Para descoloração do efluente, utilizou-se o fungo em pellets e imobilizado em nylon. As massas de fungo utilizadas foram aproximadamente iguais em ambos os casos. Esse procedimento foi empregado para determinar se o fungo imobilizado apresenta um desempenho melhor que o fungo livre. Os resultados da descoloração do efluente Kraft em função do tempo são mostrados na figura III.8.

A figura III.8 (A) mostra a influência do micélio sobre o efluente Kraft. Isso pode ser observado comparando-se os resultados obtidos para micélio vivo e morto. O micélio autoclavado (morto) adsorveu 30% da cor. Portanto, toda descoloração observada, acima desta, foi devido à ação enzimática do fungo. A descoloração observada para o micélio livre vivo foi de 80% e a imobilização do fungo em nylon resultou em um aumento de 20% na descoloração, comparando com o fungo livre. Isso pode ser atribuído ao fato do fungo imobilizado possuir uma área superficial maior que o fungo em pellets [114]. Oxigenação adicional não se mostrou importante, uma vez que o aumento na descoloração foi insignificante.

A partir da figura III.8 (B), verificou-se a eficiência na descoloração do efluente pelo micélio livre e imobilizado em nylon. A eficiência na descoloração do efluente pelo micélio aumentou com o aumento da quantidade de micélio no efluente. Quando se tem 10g de micélio por litro de efluente, a eficiência na descoloração foi maior para o micélio imobilizado em nylon, em relação ao micélio livre.

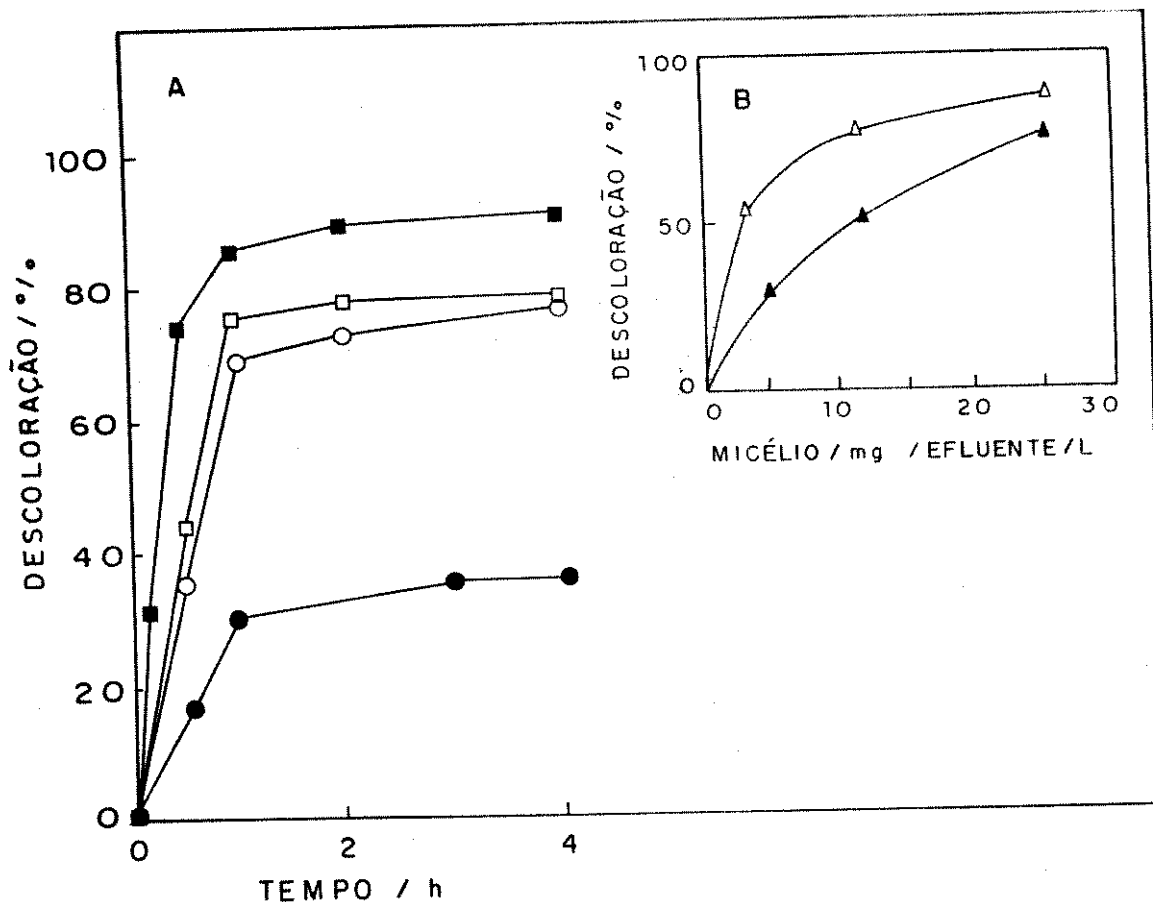


Figura III.8: (A) Descoloração do efluente, pelo micélio de *C. sitophila*, em função do tempo. As condições experimentais utilizadas para os ensaios foram: $V_{eff} = 30$ mL, $pH = 6,5$, $A_i = 0,5$ e $T = 29^{\circ}C$. (○) 5,0 g de micélio livre úmido (equivalente a 0,7 g de micélio seco) em presença de ar, (□) 5,0 g de micélio livre úmido (equivalente a 0,7 g de micélio seco) em presença de O_2 , (■) 5,0 g de micélio imobilizado em nylon (equivalente a 0,7 g de micélio seco) em presença de ar e (●) 5,0 g de micélio livre morto (equivalente a 0,7 g de micélio seco) em presença de ar. (B) Eficiência de descoloração. (▲) micélio livre e (△) micélio imobilizado em nylon.

III.2.1 - Descoloração de Efluente Kraft Utilizando-se o Caldo Produzido pelo Fungo *Chrysonilia sitophila*.

As enzimas excretadas pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium* (ligninase-peroxidase) são capazes de oxidar compostos modelo de lignina [115], assim como compostos fenólicos [116].

Como o fungo *C. sitophila* excreta enzimas com atividade lignolítica, foi feito o tratamento do efluente, utilizando-se o seu caldo, com a finalidade de se determinar quais enzimas agem no processo de descoloração. A figura III.9 mostra os resultados.

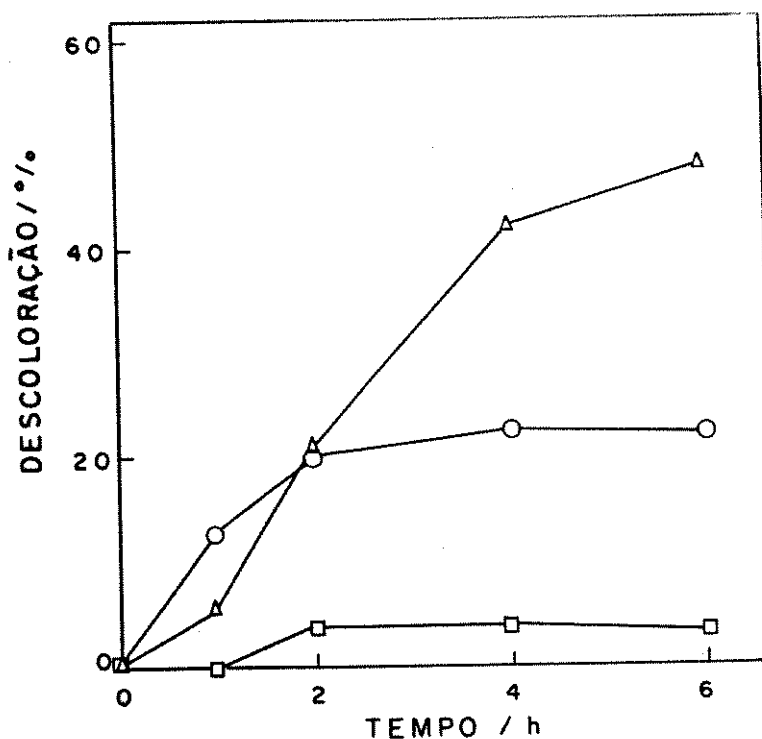


Figura III.9: Descoloração do efluente em função do tempo, utilizando-se o caldo produzido por *C. sitophila*. As condições utilizadas para todos os ensaios foram: pH = 6,5, $A_i = 0,5$ e $T = 30^\circ\text{C}$. O caldo continha 20 U/L de ligninase e 0,02 U/L de lacase. (○) 20,0 mL de caldo/20,0 mL de efluente, (Δ) 20,0 mL de caldo/20,0 mL de efluente, em presença de H_2O_2 ($0,48 \cdot 10^{-3}$ M) e (□) 20,0 mL de efluente e H_2O_2 ($0,48 \cdot 10^{-3}$ M).

Este tratamento resultou em 50% de descoloração do efluente, na presença de H_2O_2 . Utilizando o caldo sem H_2O_2 a descoloração obtida foi de 20%, que pode ser atribuída, provavelmente, à ação de lacase presente no caldo.

A descoloração observada sob ausência de H_2O_2 , pode ser devido à atividade de oxidase presente no meio de cultivo ou de lignina-peroxidase, uma vez que já foi detectado H_2O_2 em caldo de cultivo de *C. sitophila* [117].

III.2.2 - Distribuição da Massa Molar para Efluente Kraft Tratado com o Fungo *Chrysonilia sitophila*

Para determinar se o fungo atua sobre o efluente, apenas por modificação dos cromóforos, ou sobre a lignina, polimerizando-a ou despolimerizando-a, fez-se análises, com a finalidade de determinar se havia consumo das cloroligninas presentes no efluente durante o tratamento, através da distribuição de sua massa molar. Os resultados são apresentados na figura III.10.

Pela figura III.10 (A), nota-se claramente que não houve apenas uma modificação nos cromóforos do efluente, mas que o fungo está atuando diretamente sobre a lignina. A figura mostra que houve degradação das cloroligninas para cloroligninas de massas molares menores. Após 40 h de tratamento apenas uma pequena fração de lignina de alta massa molar permanece, e o consumo de biomassa foi em torno de 56%. Na figura III.10 (B), nota-se que o consumo de biomassa está diretamente relacionado com a porcentagem de descoloração. O consumo de biomassa pode estar relacionada com três fatores: (1) mineralização de lignina para CO_2 , (2) repolimerização para ligninas insolúveis, que são eliminadas por filtração usando filtro Millipore e (3) degradação da lignina para compostos menores, não detectáveis por permeação em gel a 280 nm.

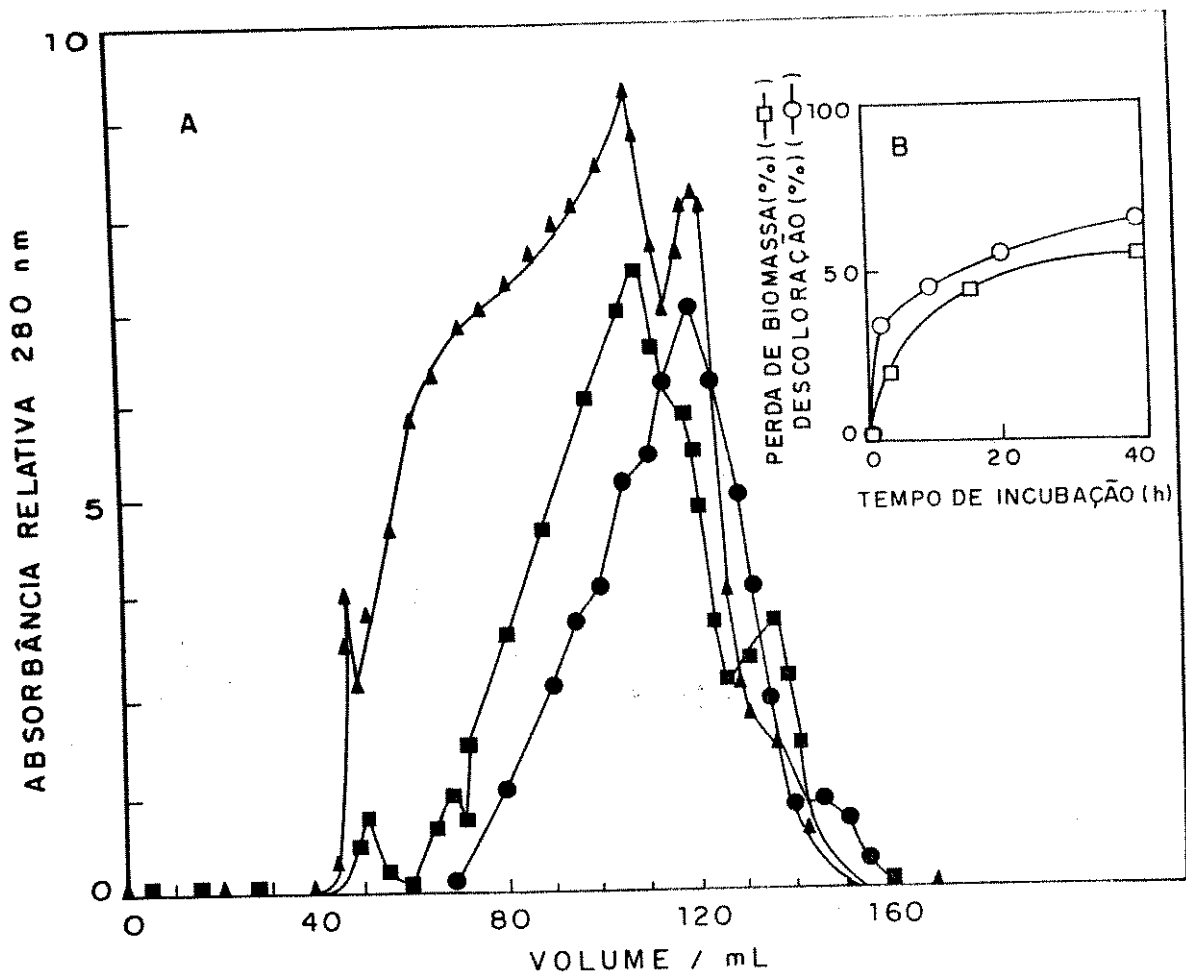


Figura III.10: (A) Permeação em gel (GPC) sephadex G-50 do efluente biotratado (5,0 g de micélio úmido/30 mL de efluente). As condições utilizadas são descritas na figura III.8. (▲) efluente antes do tratamento, (■) após 16 h de tratamento e (●) após 40 h de tratamento. (B) (□) consumo de biomassa e (○) descoloração por tempo de incubação.

III.2.3 - Demanda Química de Oxigênio para o Tratamento de Efluente Kraft com *Chrysonilia sitophila*

Quanto menor o valor obtido na medida da DQO, menor a quantidade de substâncias orgânicas oxidáveis presentes (por este método). Assim sendo, esta determinação pode indicar se houve mineralização da lignina. Nas mesmas condições experimentais usadas para o ensaio de descoloração

, a redução na DQO foi de 62,5 %. O valor obtido na redução da DQO foi condizente com o valor obtido para o consumo de biomassa.

III. 3 - Tratamento com Enzimas Imobilizadas

III.3.1 - Imobilização de HRP em Sílicas 24/32 e 32/60

As porcentagens de atividade retida após imobilização de peroxidase (HRP) em sílica são mostradas na tabela III.1.

Tabela III.1: Retenção de atividade de HRP em sílica 32/60 e 24/32.

	Unidades teóricas imobil. por mg de suporte seco	Unidades ativas imobil. por mg de suporte seco	rendimento (%)
HRP-sílica 32/60	7,65	3,90	51
HRP-sílica 24/32	4,40	2,00	46

As porcentagens de retenção de HRP são consideradas altas para esse tipo de imobilização [74], embora não seja objetivo desse trabalho a otimização da retenção da atividade.

Na figura III.11 são mostrados os resultados para a descoloração do efluente com esses materiais.

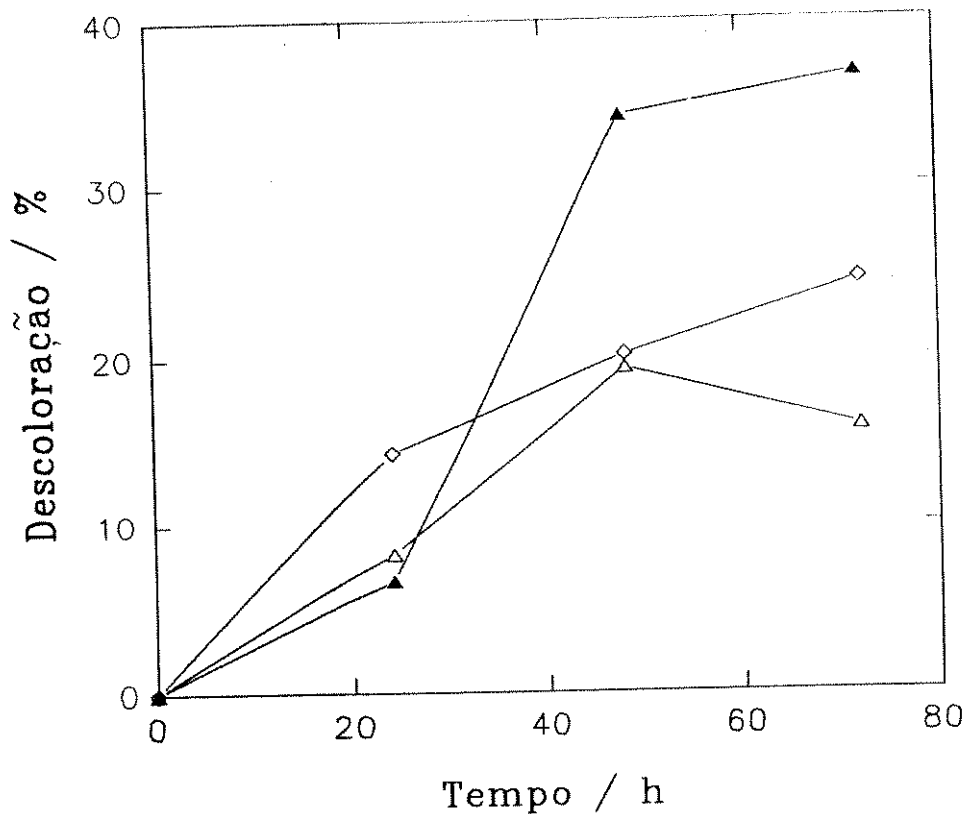


Figura III.11: Porcentagem de descoloração do efluente, sob tratamento com HRP imobilizada em sílica, em função do tempo. As condições utilizadas para todos os ensaios foram: pH = 5,0, T = 25°C, A_i = 0,5, V_{eff.} = 10 mL e H₂O₂ 5 mM. (◇) HRP livre (0,03 U), (△) HRP-sílica 24/32 (0,03 U) e (▲) HRP-sílica 32/60 (0,03 U).

Observou-se que HRP imobilizada em sílica 32/60 produziu uma descoloração de 36,7 %, enquanto que HRP imobilizada em sílica 24/32 a descoloração foi de 17%, após 72 h de tratamento. Entretanto, para a sílica 24/32 a porcentagem de descoloração para 72 h foi menor que para 48 h, ou seja, houve coloração do efluente novamente. Essa coloração pode estar associada à polimerização da lignina com consequente aparecimento de cromóforos, uma vez que é conhecido que HRP polimeriza e despolimeriza a lignina ao mesmo tempo [118]. Esta suposição pode ser confirmada pelas curvas de distribuição da massa molar do efluente sob tratamento com esses materiais, como indicado na figura III.12 (A) e (B).

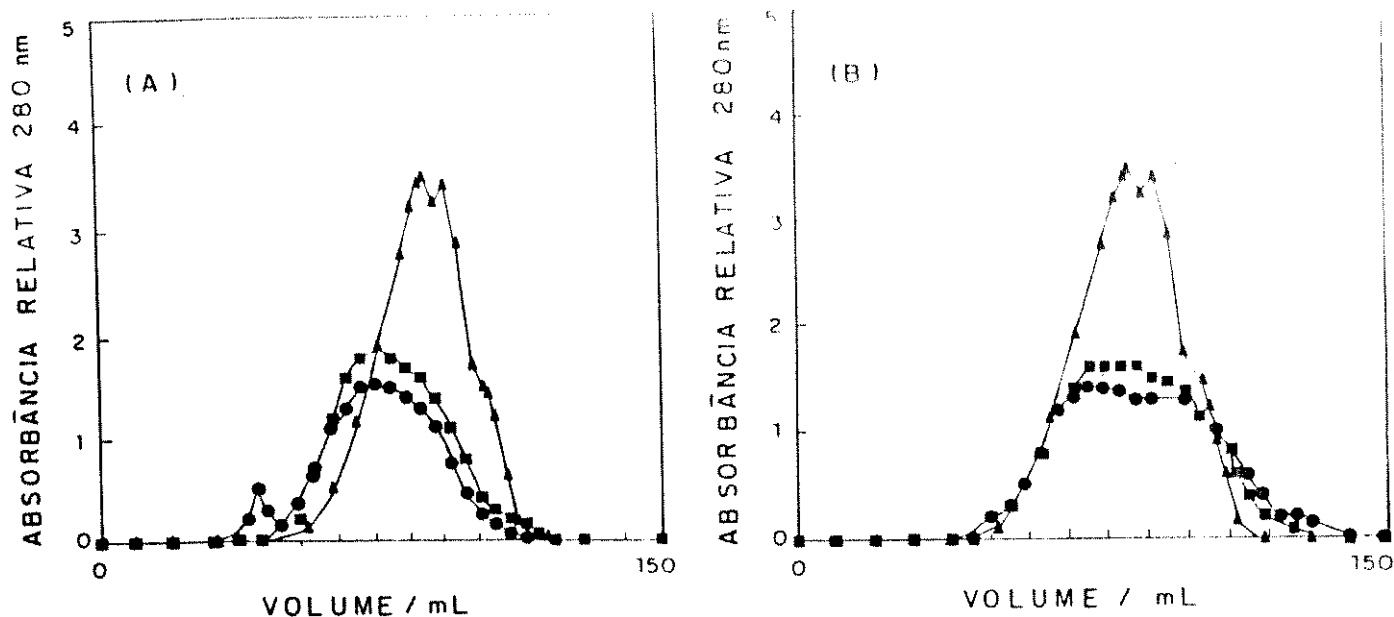


Figura III.12: Permeação em gel (GPC) sephadex G-50 do efluente tratado com HRP imobilizada em sílica. As condições utilizadas são descritas na figura III.11. (A) Tratamento com HRP-sílica 24/32, (\blacktriangle) efluente antes do tratamento, (\blacksquare) após 24 h de tratamento e (\bullet) após 48 h de tratamento. (B) Tratamento com HRP-sílica 32/60, (\blacktriangle) efluente antes do tratamento, (\blacksquare) após 24 h de tratamento e (\bullet) após 48 h de tratamento.

Nota-se que para HRP-sílica 24/32 houve um aumento na faixa de massa molar, ou seja, houve polimerização da lignina juntamente com sua degradação, que pode ser verificada pela diminuição da área do pico. Já para HRP-sílica 32/60 não se observou aumento da massa molar, apenas diminuição da área do pico, o que pode evidenciar o processo predominante, neste caso, de degradação da lignina.

A medida da DQO foi efetuada somente para o material que apresentou melhores resultados, HRP-sílica 32/60, utilizando-se 39 U de enzima em 10 mL de efluente. Após 5 dias de tratamento, observou-se uma diminuição

de 62,5% na DQO, o que indicou claramente que a enzima atuou sobre a lignina, possivelmente levando à sua mineralização.

Quanto à estabilidade da enzima imobilizada, observou-se que não houve perda da atividade enzimática, após ficar em presença do efluente por 5 dias, o que torna o processo muito interessante, uma vez que o material pode ser reutilizado. Além disso, a atividade enzimática permaneceu inalterada depois do material ter sido guardado por 2 meses.

III.3.2 - Imobilização do Caldo Liofilizado (Ligninases I, II e III não Purificadas) em Sílicas 24/32 e 32/60

As porcentagens de atividade retida após imobilização do caldo liofilizado em dois tipos de sílica (caldo-liof.-sílica) são mostrados na tabela III.2.

Tabela III.2: Retenção do caldo liofilizado imobilizado em sílica.

	Unidades teóricas imobil. por mg de suporte seco) $\times 10^3$	Unidades ativas imobil. por mg de suporte seco $\times 10^3$	retenção (%)
Caldo liofilizado-sílica 32/60	360	16	4,3
Caldo liofilizado-sílica 24/32	240	9	3,9

A descoloração do efluente usando o caldo-liof.-sílica 32/60 foi de 21%, enquanto que o caldo-liof.-sílica 24/32 e o caldo liof. livre, apresentaram porcentagens de descoloração de 14% e 6,4%, respectivamente, após 48 h de

tratamento. Observou-se que com 72 h de tratamento houve coloração do efluente, ou seja, foram formados cromóforos. Os resultados são mostrados na figura III.13.

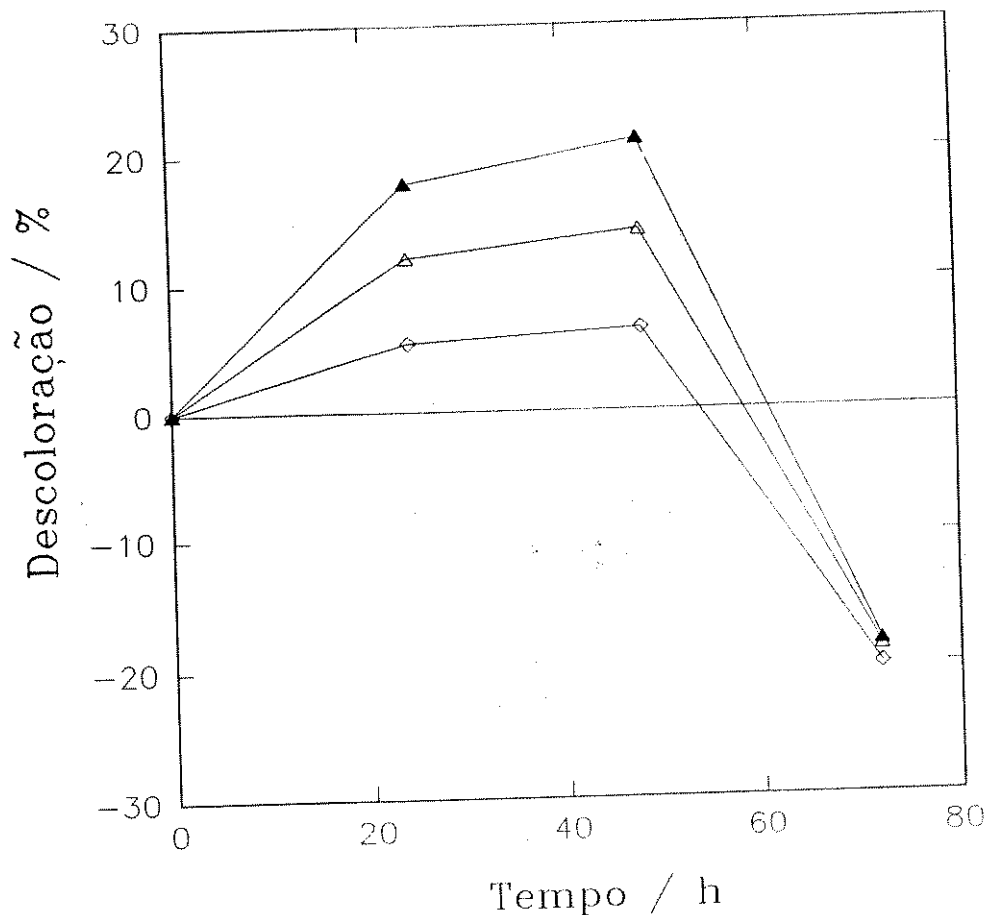


Figura III.13: Porcentagem de descoloração do efluente, sob tratamento com caldo imobilizado em sílica, em função do tempo. As condições experimentais foram: pH = 5,0, T = 25°C, A_i = 0,5, V_{eff.} = 10 mL e H₂O₂ 5 mM. (◇) caldo liofilizado livre (0,03 U), (△) caldo liof. sílica 24/32 (0,03) e (▲) caldo liof.-sílica 32/60 (0,03 U).

As curvas de distribuição de massa molar, apresentadas nas figuras III.14 (A) e (B), permitem verificar que a área do pico diminui para o tratamento do efluente com os dois materiais, sendo que este efeito é mais acentuado para o tratamento com caldo-liof.-sílica 32/60, que também

produziu maior descoloração. Os consumos de biomassa, em 48 h de tratamento, para caldo liof.-sílica 32/60 e para caldo liof.-sílica 24/32 foram 22% e 14% respectivamente. Esses dados concordam perfeitamente com os resultados obtidos nos ensaios de descoloração.

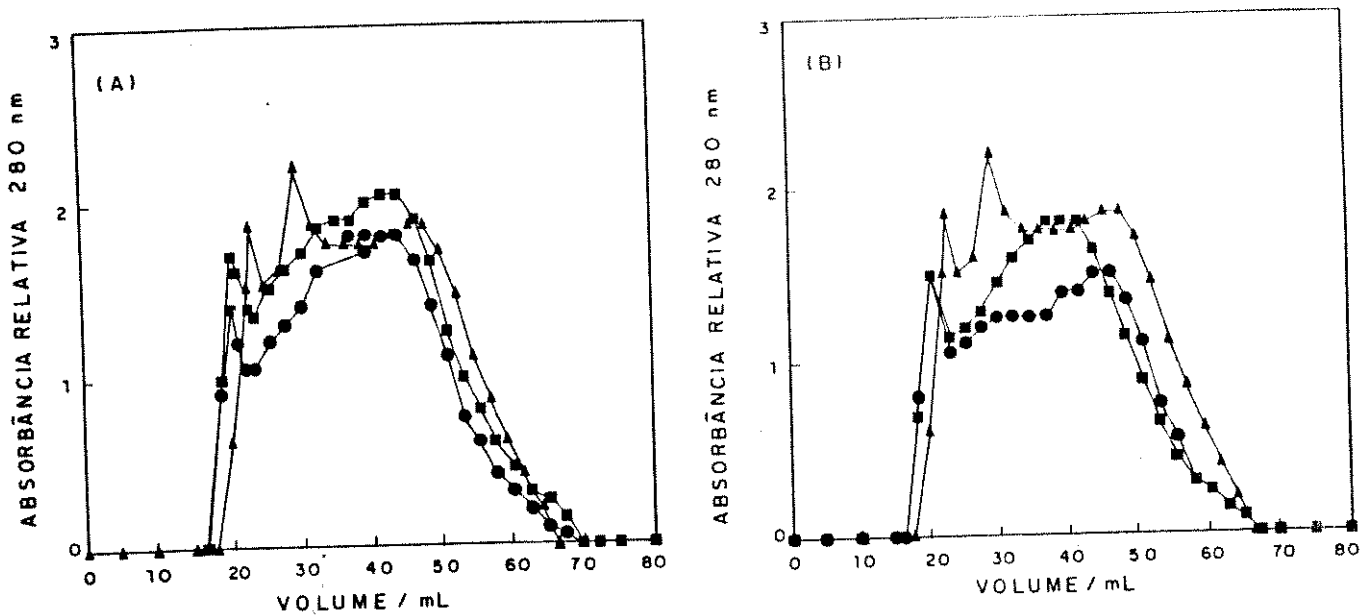


Figura III.14: Permeação em gel (GPC) Sephadex G-50 do efluente tratado com caldo liofilizado imobilizado em sílica. As condições utilizadas são descritas na figura III.13. (A) Tratamento com caldo liof.-sílica 24/32, (▲) efluente antes do tratamento, (■) após 24 h de tratamento e (●) após 48 h de tratamento. (B) Tratamento com caldo liof.-sílica 32/60, (▲) efluente antes do tratamento, (■) após 24 h de tratamento e (●) após 48 h de tratamento.

A medida da DQO foi feita com o material que apresentou melhores resultados, caldo liof.-sílica 32/60. Utilizou-se 0,9 U de caldo liof.-sílica 32/60 em 10 mL do efluente. Após 5 dias de tratamento o decréscimo da

DQO foi de 20%. Esse valor concorda com os resultados da descoloração e consumo de biomassa, que são menores que os obtidos para HRP-sílica.

A atividade do pool de enzimas (caldo) permaneceu inalterada após 5 dias na presença do efluente, o que indica que a imobilização é estável e que o material pode ser reutilizado. Além disso, para se fazer a imobilização do caldo não foi necessária a purificação das enzimas, que é um processo de alto custo. Depois do material ter sido guardado durante dois meses não houve perda da atividade, indicando que este método de imobilização, para estas enzimas, favorece a sua estabilidade.

Comparando-se HRP-sílica e caldo liof.-sílica, constatou-se que o tratamento com HRP-sílica foi mais eficiente quanto à descoloração do efluente e apresentou um consumo de biomassa maior. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que essas enzimas, quando imobilizadas, foram mais ativas que as respectivas enzimas livres para a descoloração e que essas enzimas, quando imobilizadas em sílica 32/60, apresentaram maiores descoloração e consumo de biomassa.

III.3.3 - Imobilização em Sílica 32/60 das Ligninases I, II e III Purificadas

Optou-se pela sílica 32/60 para a imobilização das ligninases, porque apresentou melhores resultados para a descoloração do efluente e porcentagem de retenção da atividade. Os resultados da imobilização são apresentados na tabela III.3, enquanto que a figura III.15 traz os resultados referentes à alteração de cor do efluente, a pH = 5,0, com estes materiais.

Tabela III.3: Retenção de atividade das ligninases I, II e III em sílica 32/60

	Unidades teóricas imobil. por mg de suporte seco $\times 10^3$	Unidades ativas imobil. por mg de suporte seco $\times 10^3$	retenção (%)
Lig. I-sílica 32/60	77,0	5,5	7,2
Lig. II-sílica 32/60	63,0	3,8	6,0
Lig. III-sílica 32/60	58,0	2,9	5,0

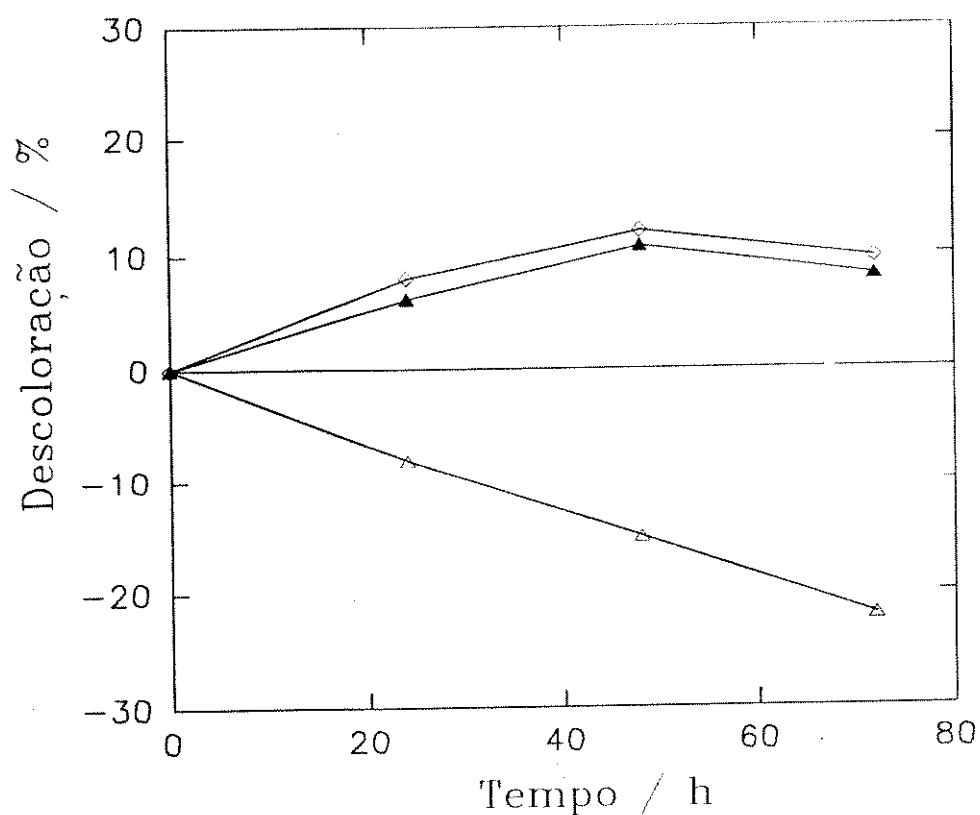


Figura III.15: Porcentagem de descoloração do efluente, sob tratamento com ligninases immobilizadas em sílica. As condições utilizadas para todos os ensaios foram: pH = 5,0, T = 25°C, $A_i = 0,5$, $V_{eff.} = 10$ mL e H_2O_2 5,0 mM. (△) Lig.I-sílica 32/60 (0,03 U), (▲) Lig.II-sílica 32/60 (0,03 U) e Lig.III-sílica 32/60 (0,03 U)(◇).

Observou-se que a Lig. I-sílica 32/60 sempre coloriu o efluente, o que pode ser devido ao pH utilizado durante o tratamento, já que o pH ótimo de atuação da Lig. I é 3,0 [117]. Apenas as ligninases II e III em sílica 32/60 atuaram descolorindo o efluente e as descolorações observadas foram praticamente iguais, o que está condizente com os pH ótimos que são 5,0 e 4,0 respectivamente.

Nas figuras III.16 (A), (B) e (C) estão indicadas as curvas de distribuição de massa molar para o tratamento do efluente com os três materiais. Para os três casos, observou-se uma diminuição na área do pico.

Após 48 h de tratamento, o consumo de biomassa foi maior para Lig. III-sílica 32/60, 19,7%, seguida de Lig. II-sílica 32/60, 19,2%, e Lig. I, 14,5%. As Lig. III e II mostraram-se mais eficientes.

As medidas da DQO, utilizando-se 0,3 U de Lig. I e 0,2 U de Lig. II e III, resultaram num decréscimo de 30,2%, 65,0% e 65,0% para as ligninases I, II e III respectivamente, após 5 dias de tratamento. Esses dados concordam com a descoloração do efluente e consumo de biomassa, pois a Lig. I-sílica 32/60 apresentou menor decréscimo na DQO, coloriu o efluente e apresentou menor consumo de biomassa. Apesar das porcentagens de descoloração não serem significativas, deve-se salientar o fato de que foram utilizados apenas 0,03 U de enzima para os ensaios de descoloração.

Após 5 dias em contato com o efluente, não foi observada perda na atividade, ou seja, a estabilidade da enzima depois de imobilizada foi excelente.

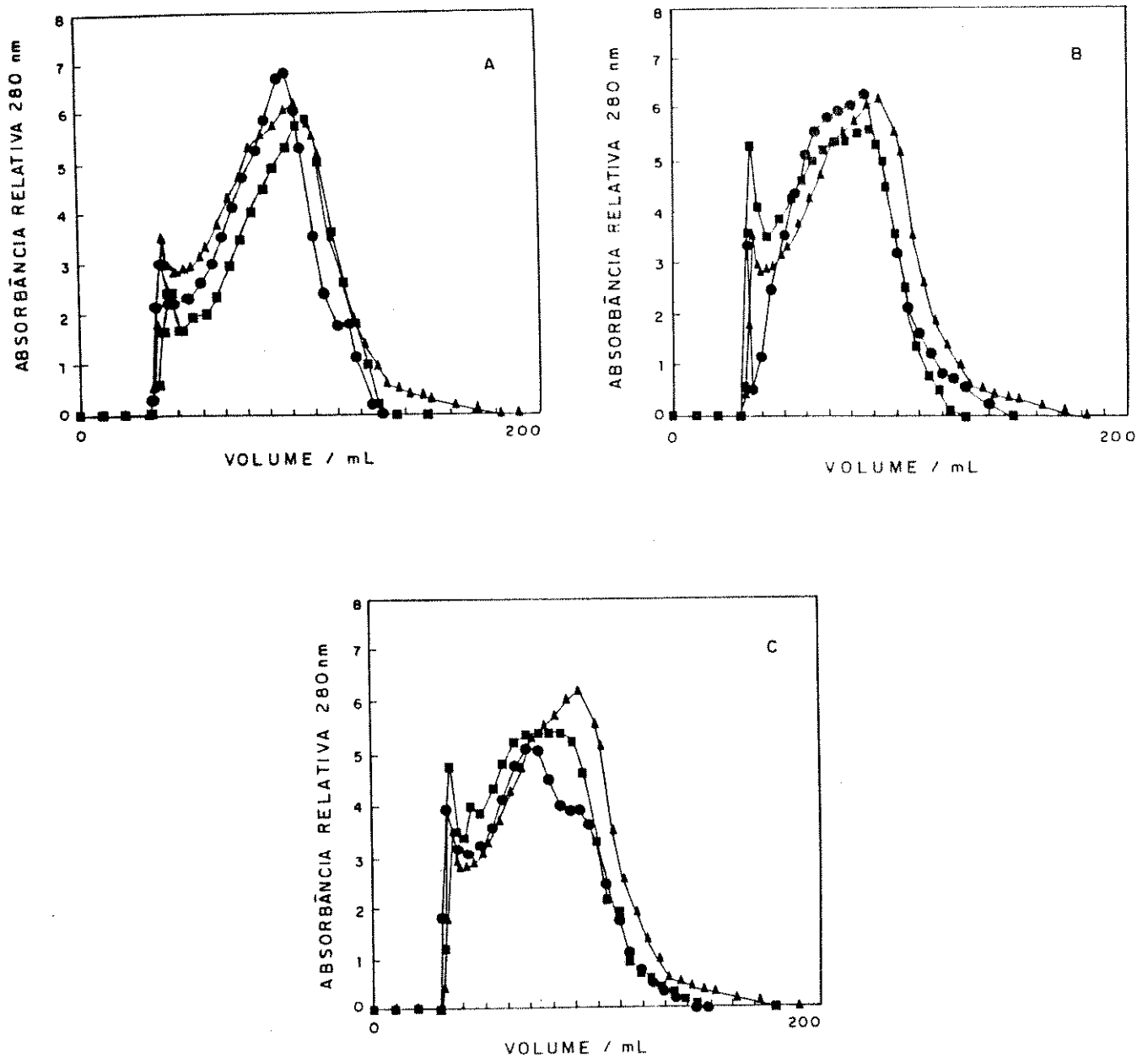


Figura III.16: Permeação em gel (GPC) sephadex G-50 do efluente tratado com ligninases imobilizadas em sílica. As condições utilizadas são descritas na figura III.15. (A) Tratamento com Lig.I-silica 32/60, (▲) efluente antes do tratamento, (●) 24 h de tratamento e (■) 48 h de tratamento. (B) Tratamento com Lig.II-silica 32/60, (▲) efluente antes do tratamento, (●) 24 h de tratamento e (■) 48 h de tratamento. (C) Tratamento com Lig.III-silica 32/60, (▲) efluente antes do tratamento, (■) 24 h de tratamento e (●) 48 h de tratamento.

A remoção de cor observada, para todas as enzimas imobilizadas ou livres, foi devida exclusivamente ao efeito catalítico e não simplesmente a adsorção de cor pela proteína, uma vez que, sob a ausência de peróxido e presença da enzima, não houve remoção de cor. Efeitos similares foram encontrados por Paia e Jurasek [119].

III.3.4 - Imobilização de HRP, Ligninases I e III e Caldo Liofilizado em Sefarose-4B Ativada com CNBr

As porcentagens de atividade retida após imobilização em Sefarose são mostradas na tabela III.4.

Tabela III.4: Retenção de atividade de HRP, Ligninases I e III e caldo liofilizado em Sefarose-4B ativada com CNBr.

	Unidades teóricas imobil. por mg de gel seco $\times 10^3$	Unidades ativas imobil. por mg de gel seco $\times 10^3$	retenção (%)
HRP-Sefarose	1,0	0,38	38,0
Lig. I-Sefarose	8,4	0,16	2,0
Lig II-Sefarose	79,0	6,30	8,0
Caldo - Sefarose	26,0	0,25	1,0

A figura III.17 mostra as porcentagens de descoloração do efluente, quando tratado com as enzimas livres e imobilizadas em Sefarose-4B ativada com CNBr.

Ligninase I livre não descoloriu o efluente, pois o efeito observado foi devido somente a ação do peróxido presente. A concentração de peróxido em todos os ensaios foi de 5 mM, e o controle (efluente mais peróxido)

produziu a mesma descoloração. No entanto, a Lig. I quando imobilizada, descoloriu o efluente durante as primeiras 48 h de tratamento e a partir daí, começou a colori-lo.

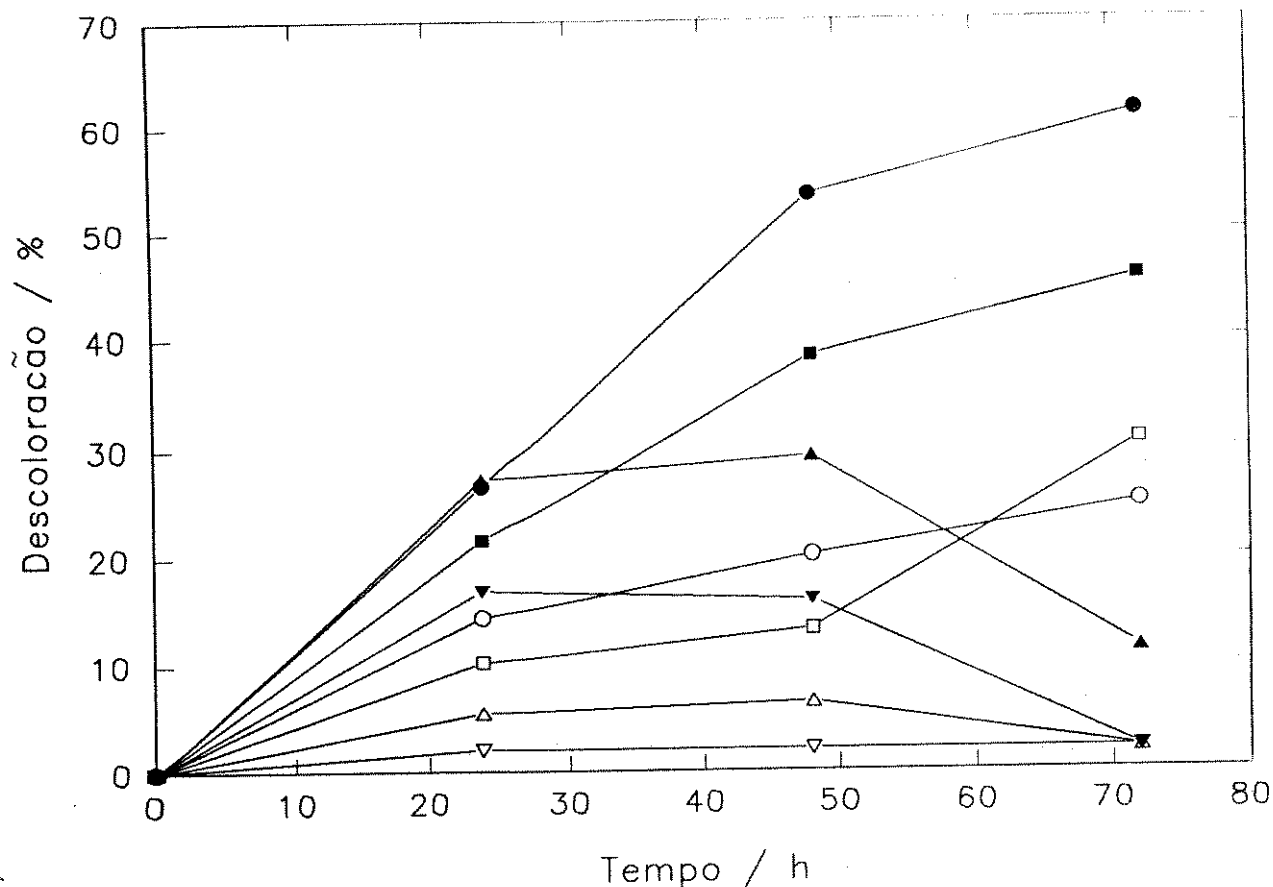


Figura III.17: Descoloração do efluente, sob tratamento com enzimas livres e imobilizadas em Sefarose, em função do tempo. As condições utilizadas foram: pH = 5,0, T = 25°C, A_i = 0,5, V_{efl.} = 10 mL e H₂O₂ 5 mM. (○) HRP livre (0,06 U), (●) HRP-Sefarose (0,06 U), (△) Lig. I livre (0,03 U), (▽) Lig. I-Sefarose (0,03 U), (□) Lig. III livre (0,10 U), (■) Lig. III-Sefarose (0,10 U), (▽) caldo liof. livre (0,03 U) e (▲) caldo liof.-Sefarose (0,03 U).

O caldo liofilizado livre descoloriu pouco o efluente, 16,4%, sendo que, após 48 h de tratamento, iniciou o processo inverso. A descoloração para o caldo liofilizado imobilizado foi maior, 29,3%, comparada com o caldo livre, ou seja, a enzima quando imobilizada atuou mais eficientemente na

descoloração do efluente. Esse efeito também foi observado para HRP e Lig. III livres e imobilizadas.

A distribuição da massa molar do efluente Kraft durante o tratamento com Lig. I, Lig. III, caldo liofilizado e HRP, livres e imobilizadas em Sefarose-4B ativada com CNBr são mostradas na figura III.18 (A) a (H).

A figura III.18 (A) (HRP livre) e (B) (HRP-sefarose) mostram que no caso (A) ocorreu repolimerização com consumo de 16% de biomassa. Para (B), 61% e 79% de consumo da biomassa foram observados em 24 e 72 h respectivamente e não foi observada repolimerização ou formação de cloroligninas com massas molares menores. O caldo liofilizado livre (C) e caldo liof.-sefarose (D) mostraram um consumo de biomassa de 13% e 24% respectivamente, não sendo observada repolimerização das cloroligninas. Houve um consumo de 12% da biomassa para lig. I livre (E), enquanto que para lig. I imobilizada (F) foi de 37% ,em 24 h de tratamento. O consumo de biomassa para ligIII livre (G) e imobilizada (H) foram similares, 22%, após 72 h de tratamento . A repolimerização da lignina foi completamente eliminada pela imobilização. As enzimas, quando imobilizadas, apresentaram um melhor desempenho frente à descoloração do efluente, assim como em relação ao consumo de biomassa, com exceção à lig. III livre e imobilizada [120].

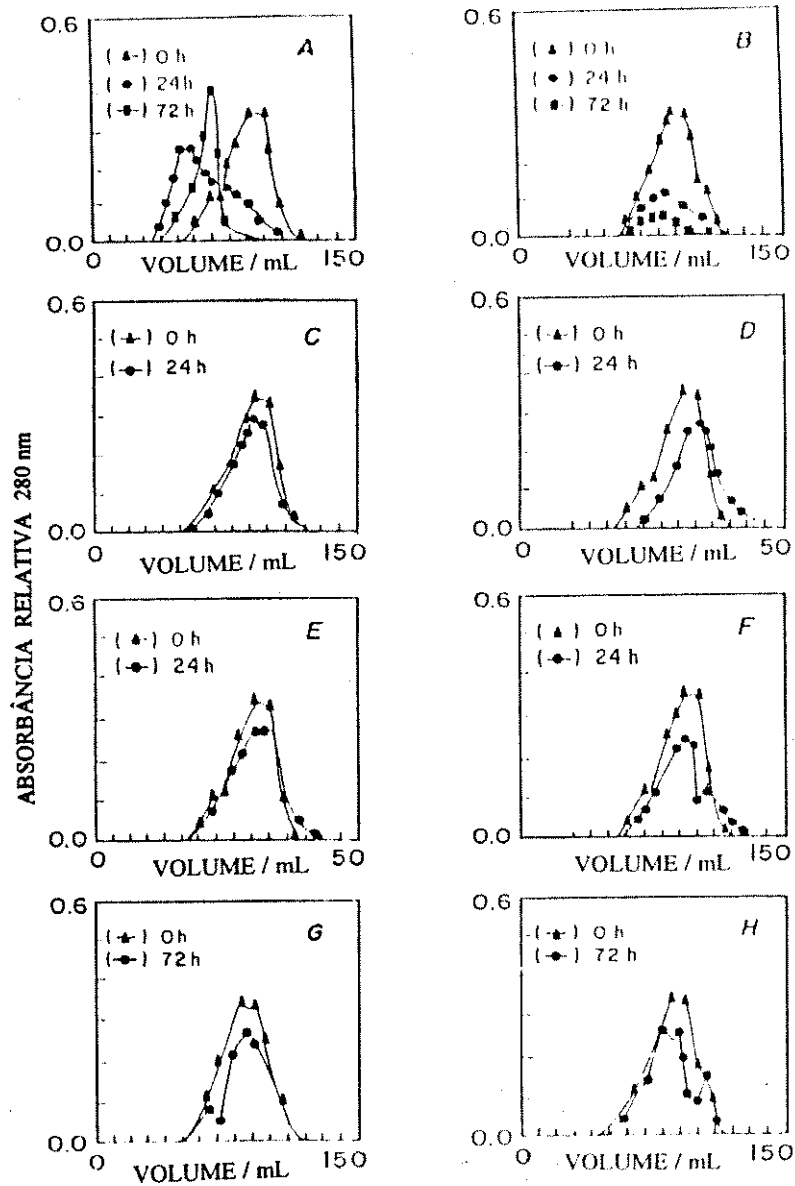


Figura III.18: Permeação em gel (GPC) sephadex G-50 do efluente tratado com enzimas livres e immobilizadas em Sefarose. As condições utilizadas são descritas na figura III.17. (A) HRP livre, (B) HRP-Sefarose, (C) caldo liof. livre, (D) caldo liof.-Sefarose, (E) Lig.I livre, (F) Lig.I-Sefarose, (G) Lig.III livre e (H) Lig.III-Sefarose.

III.4 - Tratamento Fotocatalítico

Quando o efluente com o semicondutor suspenso foi borbulhado com oxigênio e iluminado, sua cor desapareceu gradualmente. Isso pode ser visualizado na figura III.19, onde se utilizou ZnO e TiO₂ como semicondutores.

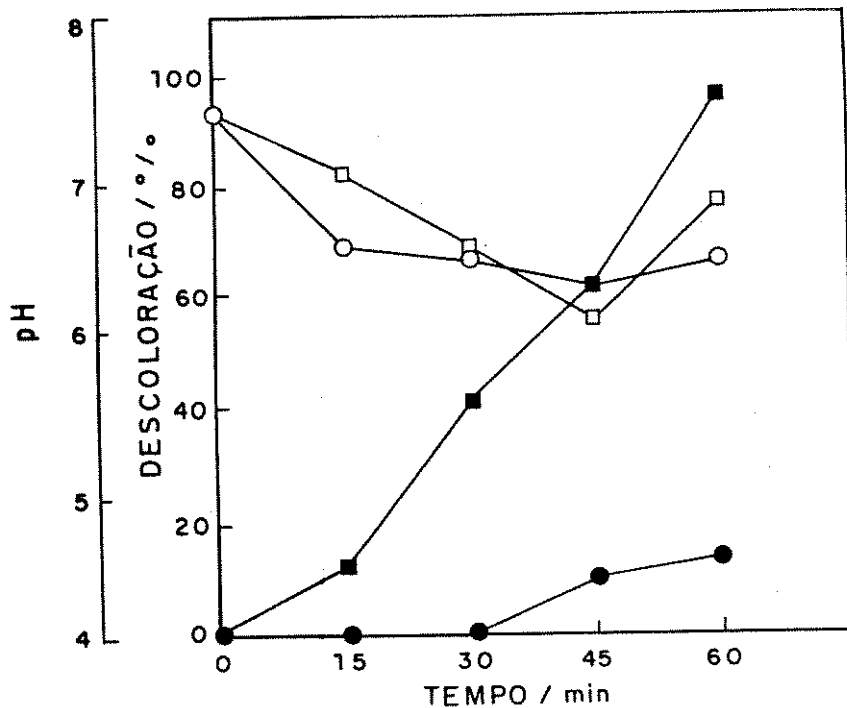


Figura III.19: Porcentagem de descoloração do efluente, sob tratamento fotocatalítico, em função do tempo e variação do pH durante o processo. As condições utilizadas foram: $A_i = 0,5$, $pH = 7,5$, $V_{eff.} = 10 \text{ mL}$, $\lambda > 254 \text{ nm}$ e O_2 . Descoloração (■) e variação do pH (□) para ZnO (50 mg); descoloração (●) e variação do pH (○) para TiO₂ (50 mg).

Constatou-se que utilizando ZnO a descoloração se processou rapidamente, chegando a 100% em 2 h. No entanto, quando se utilizou TiO₂ (tanto anatase quanto rutilo), a descoloração foi extremamente lenta.

Não ocorreu descoloração na ausência de fotocatalisador com iluminação e presença de O_2 , bem como na presença do fotocatalisador, iluminação e ausência de O_2 , o que indica que o processo de descoloração depende da presença de fotocatalisador e O_2 .

É conhecido que soluções de lignina podem ser degradadas, utilizando ZnO e TiO_2 [87]. O fato deste último não descolorir o efluente pode ser devido a algum efeito na superfície do óxido, como: tamanho do sítio ativo e ou pH da superfície.

Os resultados apresentados na figura III.19 mostram que o pH da solução modificou em função do tempo de reação, provavelmente devido aos produtos formados na degradação das cloroligninas. Como a descoloração obtida para TiO_2 foi muito lenta, optou-se por ZnO para conduzir todos os outros experimentos.

Em um pH ótimo, a velocidade de descoloração aumentou com a quantidade de fotocatalisador adicionado em solução, a qual diminuiu quando a quantidade de fotocatalisador foi suficientemente grande para absorver toda a irradiação. Em concentrações maiores que 5 g/L não foi observado aumento na velocidade de descoloração. Esses resultados são mostrados na figura III.20 (A).

A figura III.20 (B) mostra que, alterando o pH inicial da solução, a descoloração resultante foi diferente para o mesmo tempo de irradiação, sendo que pH mais altos favoreceram uma maior descoloração, esses resultados já foram observados anteriormente para descoloração de soluções de ligninas [87] e outros clorofenóis [121], pelo mesmo processo.

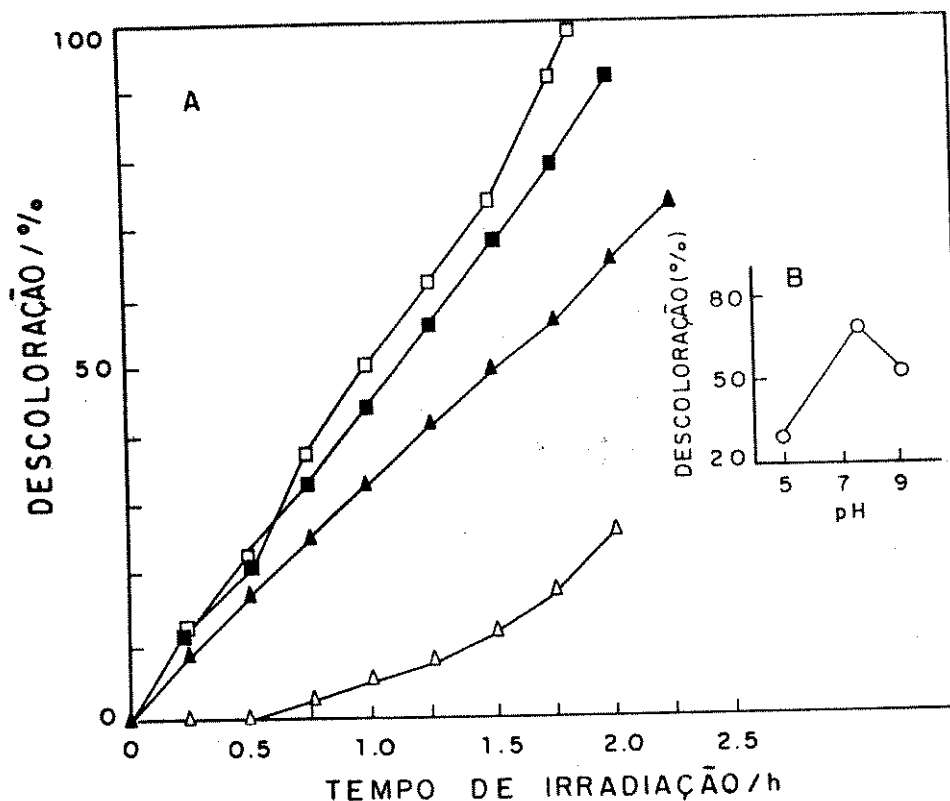


Figura III.20: (A) descoloração do efluente com diferentes concentrações em função do tempo. As condições utilizadas são descritas na figura III.20, (▲) 10 mg, (■) 25 mg, (□) 50 mg e (Δ) 50 mg em presença de N_2 (sem O_2). (B) descoloração do efluente, em 1,5 h de irradiação, por 50 mg de ZnO em função do pH inicial do efluente.

Em função dos resultados obtidos e relatados nas figuras III.20 (A) e (B), optou-se por conduzir todos os outros experimentos a $pH = 7,5$ e ZnO na concentração de 5 g/L.

Para obtenção de informações relevantes à respeito da transformação fotocatalítica, foram feitos experimentos onde a fotólise direta foi excluída. Para tanto, fez-se experimentos utilizando filtros para determinar qual a faixa de comprimento de onda seria responsável pela maior parte da descoloração.

Vale ressaltar que, experimentos sem uso de fotocatalisador e com oxigenação produziram coloração do efluente, observado pelo aumento da absorbância, provavelmente devido à formação de quinonas.

Os resultados obtidos para experimentos utilizando-se filtros são descritos na figura III.21.

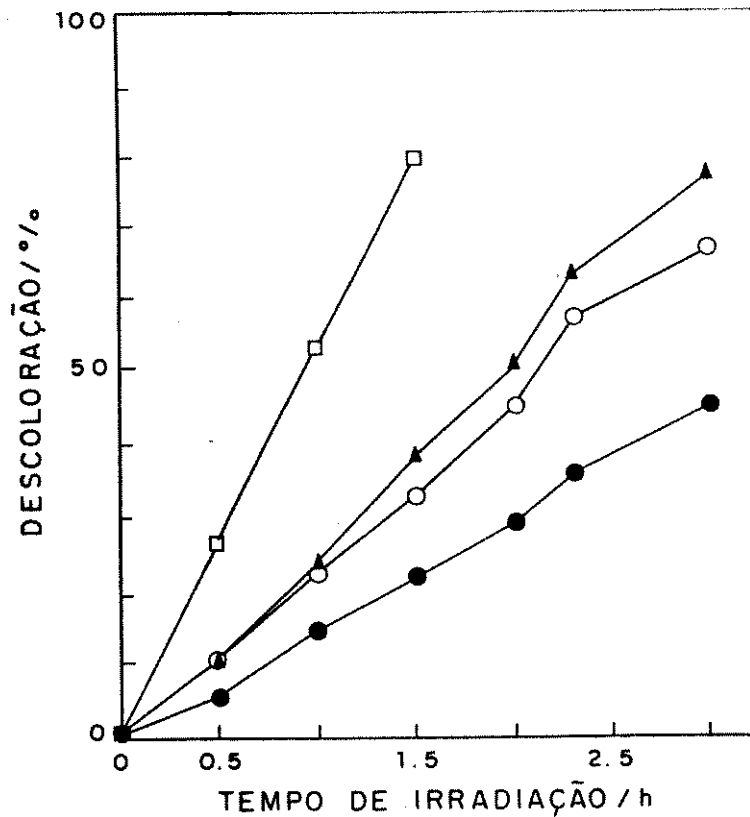


Figura III.21: Descoloração do efluente, sob tratamento fotocatalítico, em função do tempo, utilizando-se filtros. As condições utilizadas foram: 50 mg de ZnO, pH = 7,5, $A_i = 0,5$, $V_{\text{eff.}} = 10\text{ mL}$ e O_2 . (●) $\lambda > 340\text{ nm}$, (○) $\lambda > 320\text{ nm}$, (▲) $\lambda > 300\text{ nm}$ e (□) $\lambda > 254\text{ nm}$.

Observou-se que o processo de descoloração foi mais eficiente, com a lâmpada disponível, sem o uso de filtros, ou seja $\lambda > 254\text{ nm}$, no qual ocorreu 80% de descoloração em 1,5 h de irradiação. Por outro lado, quando se utilizou $\lambda > 340\text{ nm}$ após 1,5 h de irradiação houve 20% de descoloração.

A fluência desta lâmpada para $\lambda > 254$ nm é de 108 W m^{-2} e para $\lambda > 300$ nm é 68 W m^{-2} . Assim, irradiando-se o efluente por 1 h com $\lambda > 254$ nm equivale a irradiar o efluente por 1,75 h com $\lambda > 300$ nm, no entanto, as descolorações observadas para esses respectivos intervalos de tempo e comprimentos de onda foram 53% e 43%. Isso pode ser um indício de que a região de baixo comprimento de onda é mais eficiente, para esse sistema, na descoloração do efluente.

A mudança na distribuição de massa molar para o efluente, sob tratamento fotocatalítico, foi estudada por cromatografia de filtração em gel. Os resultados são mostrados na figura III.22.

Pelas curvas de distribuição de massa molar, nota-se que não houve polimerização da lignina. A área do pico diminui e observa-se que nos primeiros 30 min de irradiação foram formadas cloroligninas menores. Após 2 h de irradiação não se detecta mais a presença de lignina. A figura 22 (B) mostra que existe uma perfeita correlação entre os três parâmetros: descoloração, consumo de biomassa e formação de CO_2 . Mineralização foi observada, desde que houve um pronunciado consumo de biomassa, não ocorreu precipitação no efluente e houve formação de CO_2 , que pode ser visualizada mais claramente na figura III.23.

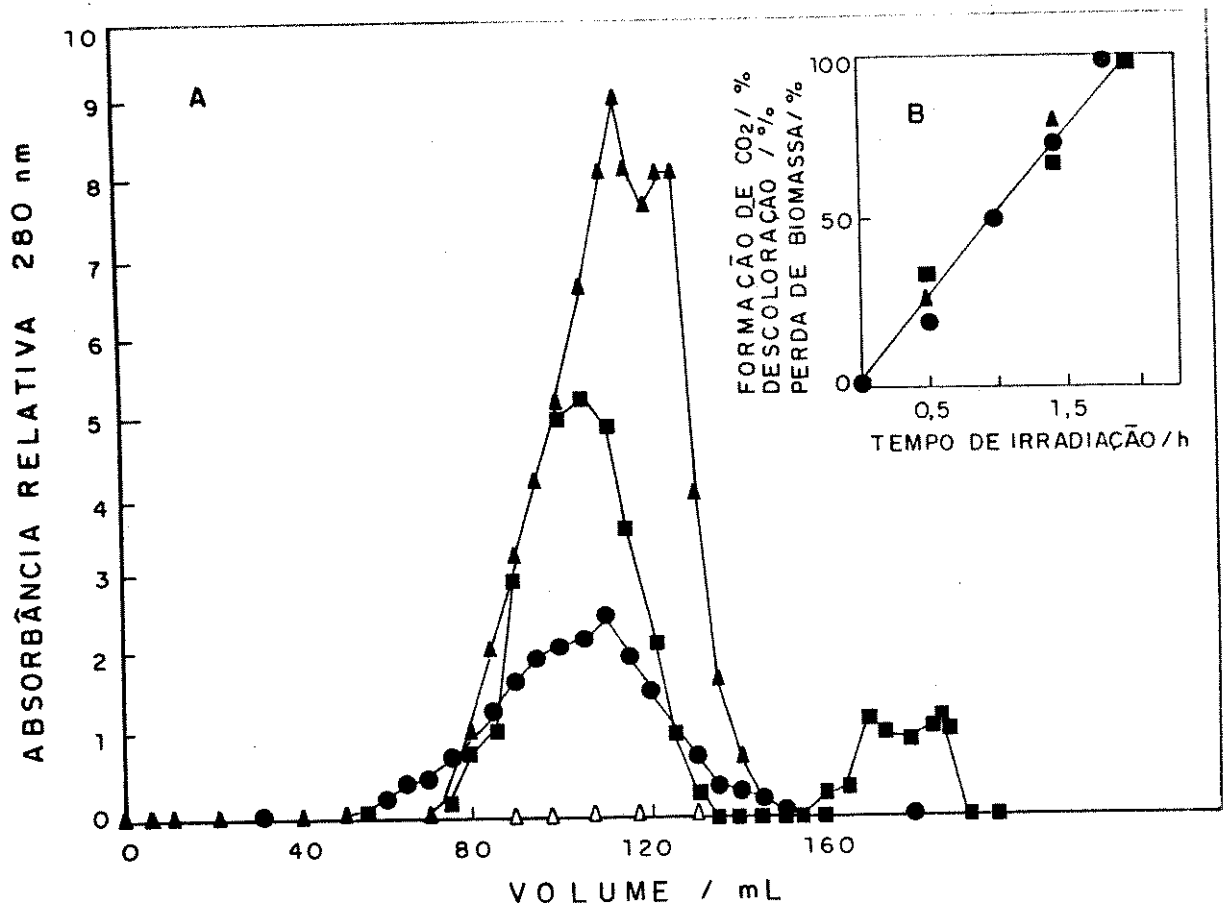


Figura III.22: (A) permeação em gel (GPC) sephadex G-50 do efluente tratado fotocataliticamente. As condições utilizadas são descritas na figura III.19, onde foram utilizados 2,5 g de micélio. (▲) efluente antes de irradiar, (■) efluente irradiado por 30 min, (●) efluente irradiado por 90 min e (△) efluente irradiado por 120 min. (B) correlação entre descoloração (●), consumo de biomassa (■) e formação de CO₂ (▲), em função do tempo de irradiação.

O fato de se detectar a formação de CO₂, indicou que cloroligninas estão sendo oxidadas até a sua mineralização, o que é extremamente interessante, uma vez que ao final do tratamento não restaram outros produtos orgânicos de massas molares menores que poderiam ser tóxicos [122].

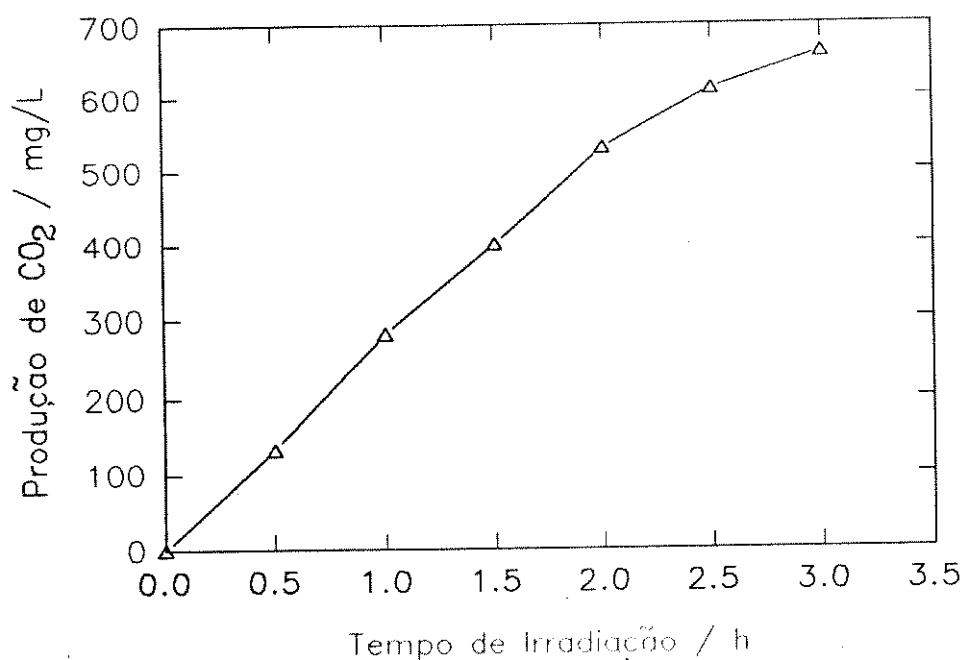


Figura III.23: Produção de CO₂ em função do tempo do irradiação. As condições utilizadas foram: $A_i = 0,5$, $\text{pH} = 7,5$, $V_{\text{eff.}} = 20 \text{ mL}$, 100 mg de ZnO , $\lambda > 254 \text{ nm}$ e O_2 .

Foram feitas medidas da DQO para o efluente antes e depois do tratamento. Após irradiação do efluente por 50 min (nas melhores condições descritas no item II.23) obteve-se um decréscimo de 77% na DQO e irradiando-se por 2 h o decréscimo foi de 90%. Esses resultados são condizentes com o consumo de biomassa do efluente durante o tratamento.

Foram feitas análises qualitativas por HPLC para as amostras antes de irradiar e com 1,5 e 3,0 h de irradiação, com a finalidade de se detectar compostos de baixa massa molar, não detectáveis pela permeação em gel. Os resultados são mostrados na tabela III.5.

Tabela III.5: HPLC para efluente sob tratamento fotocatalítico.

PICO	T = 0 h		T = 1,5 h		T = 3,0 h	
	T.R.	ÁREA	T.R.	ÁREA	T.R.	ÁREA
1	2,00	3,29				
2	2,55	13,94	2,55	19,47	2,59	18,30
3			2,70	6,25		
4	2,92	13,67	2,94	25,56	2,78	56,64
5	3,24	8,06	3,22	48,72		
6					3,27	25,86
7	3,38	48,08				
8	4,78	6,41				
9	5,08	6,16				

A partir dos dados da tabela III.5, pode-se verificar que ocorreram modificações na relação entre as áreas dos picos, bem como o desaparecimento de alguns deles.

No cromatograma obtido após 3 h de irradiação, observou-se a presença de 3 picos, embora, a descoloração total do efluente já havia sido assegurada após 2 h de irradiação, indicando que a sua total descontaminação necessita de um tempo maior de irradiação.

Para verificar se o processo de degradação estava associado à formação de radicais livres hidroxila ($\cdot\text{OH}$), que são propagadores da reação, adicionou-se ao meio reacional manitol, que é um absorvedor específico de radicais ($\cdot\text{OH}$) [123]. A concentração final desse no meio reacional foi 0,05 M. Após 2 h de irradiação não foi constatada descoloração alguma do efluente, confirmando a hipótese de que radicais hidroxila são importantes

no processo, de modo que ao serem aprisionados pelo manitol, não tiveram tempo hábil para a reação com a lignina.

III.5 - Tratamento Fotocatalítico e Enzimático Combinados

Nas condições ótimas estabelecidas para o tratamento fotocatalítico, pH 7,5 e ZnO a 0,5 g/L, foi feita a pré-irradiação do efluente ($\lambda > 254$ nm), por um curto período de tempo (15 min). Após esse tempo adicionou-se o caldo produzido pelo fungo. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Esse tratamento resultou em uma eficiente descoloração, a qual aumentou na presença de peróxido, que age como cofator enzimático. Os resultados são mostrados na figura III.24.

Ficou constatado um efeito sinérgico na resposta para os tratamentos fotocatalítico e biológico, visto que, na combinação de ambos a descoloração foi de 85%, enquanto que, isoladamente, obteve-se 50% para o caldo e H₂O₂ e 15 min de irradiação produzem 15% de descoloração, que levaria a um total de 65%. Assim, 20% da descoloração pode ser atribuída à ação combinada dos dois tratamentos.

O pré-tratamento fotocatalítico deve promover a quebra de ligações da lignina e formação de radicais. Essas espécies podem ser mais facilmente "reconhecidas" pelas enzimas, acelerando o processo de descoloração.

Esses resultados concordam com os resultados obtidos para a degradação de lignina dioxano de *Pinus radiata* D Don utilizando-se ligninase e HRP durante pré-tratamento fotoquímico [124].

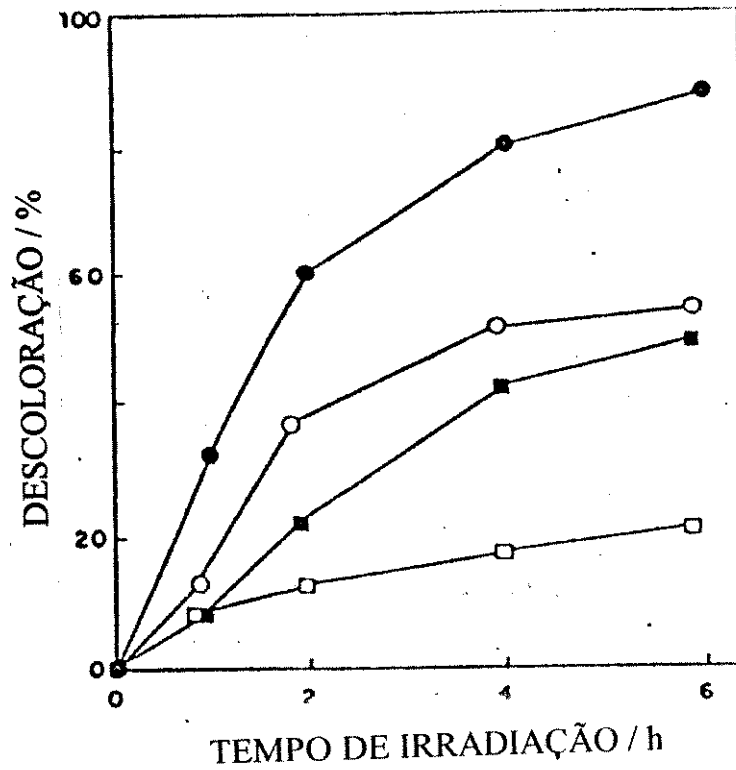


Figura III.24: Descoloração do efluente, sob tratamentos fotoquímico e biológico combinados, em função do tempo. (□) efluente e caldo, (○) efluente pré-irradiado e caldo, (■) efluente, caldo e H_2O_2 ($0,48 \cdot 10^{-3} M$) e (●) efluente pré-irradiado, caldo e H_2O_2 ($0,48 \cdot 10^{-3} M$)

IV - CONCLUSÕES

O estudo de algumas condições de cultivo, permite concluir que o fungo imobilizado em qualquer tipo de suporte, aumenta a atividade enzimática do caldo. A variação de outras condições, como: suplemento de glicose e presenças de álcool veratrílico e glicerol, mostrou a semelhança entre os fungos *P. chrysosporium* e *C. sitophila*. No entanto, qualquer das modificações das condições de cultivo, aqui utilizadas, não mostrou indução na produção de enzimas extracelulares.

A descoloração do efluente Kraft pelo fungo *C. sitophila* foi excelente, sendo que é importante destacar que, para o tratamento, não foram utilizadas fontes adicionais de carbono e/ou nitrogênio no efluente, o que torna o processo muito interessante. O fungo *C. sitophila* imobilizado em nylon, foi mais eficiente na descoloração do efluente, comparado com o fungo livre.

Foram observados o consumo de biomassa e a redução da DQO, onde provavelmente ocorreu mineralização das cloroligninas.

Quanto ao tratamento do efluente com as enzimas produzidas pelo fungo *C. sitophila*, imobilizadas em sílica e em Sefarose, foram obtidos bons resultados. As enzimas, quando imobilizadas, mostraram-se mais eficientes, na descoloração do efluente, que as respectivas enzimas livres, com excessão da lig.I livre e imobilizada em sílica 32/60, onde a coloração foi predominante. Os resultados para consumo de biomassa e redução da DQO, mostraram que as enzimas atuaram sobre as cloroligninas, despolimerizando-as e levando-a à sua mineralização.

A descoloração do efluente por tratamento fotocatalítico foi muito eficiente. Esse processo, além de produzir total descoloração do efluente, apresentou um consumo de biomassa de 100% e excelente redução da DQO. A mineralização foi constatada através da produção de CO₂. Assim, o processo fotocatalítico apresenta-se como uma alternativa promissora para o tratamento desse tipo de efluente, uma vez que este é muito tóxico e de difícil degradabilidade pelos processos convencionais.

Os resultados da combinação dos tratamentos fotoquímico e biológico, mostraram um efeito sinérgico, acelerando o processo de descoloração.

Os objetivos propostos para este trabalho foram alcançados e muitos estudos futuros podem ainda ser feitos, como: otimização da imobilização das enzimas, imobilização do ZnO, montagem um reator para a degradação fotocatalítica, bem como o estudo de outros semicondutores para este processo.

V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Madsen, E. L.; *Environ. Sci. Technol.*, 25, 1663 (1991)
- [2] Jardim, W.; *Química e Derivados*, 152, 36 (1988)
- [3] Eckenfelder, W. W.; Argaman, Y. e Miller, E.; *Environ. Progress*, 8, 40 (1989)
- [4] Jardim, W. F. e Figueiredo, R. F.; Apostila "Tratamento de Efluentes Industriais", (1989)
- [5] Budiansky, S. e Josephson, J.; *Environ. Sci. Technol.*, 14, 509, (1980)
- [6] Miller, S.; *Environ. Sci. Technol.*, 15, 502, (1981)
- [7] Josephson, J.; *Environ. Sci. Technol.*, 18, 375A (1984)
- [8] Rittmann, B. E.; *Environ. Sci. Technol.*, 21, 128 (1987)
- [9] Jewell, W. J.; *Environ. Sci. Technol.*, 21, 14 (1987)
- [10] Josephson, J.; *Environ. Sci. Technol.*, 18, 312A (1984)
- [11] Josephson, J.; *Environ. Sci. Technol.*, 16, 380A (1982)
- [12] Rittmann, E. R. e Huck, P. M.; *Critical Rev. Environ. Control.*, 19, 217 (1989)
- [13] Branco, S. M.; *Poluição: A Morte de Nossos Rios*, ed. ASCETESB, São Paulo, (1983)
- [14] Nimz, H. H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 13, 313 (1974)
- [15] Danilas, R. M.; *Celulose e Papel - Tecnologia de fabricação de polpa celulósica*, IPT So Paulo, 2^a ed., vol.1, Cap IX, 427 (1988)
- [16] Kringstad, K. P. e Lindstrom, K.; *Environ. Sci. Technol.*, 18, 236 A (1984)
- [17] Sant'Anna, G.L.; *Proc. 2nd Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Others Wood Componets* (Eds. N. Duran e E. Esposito), Campinas, SP, Brasil, 3, 297, (1992)
- [18] EPS-Canadá, Aquatic toxicity of pulp and paper mill effluent - A review, Report EPS 4/PF/1 (1987)

- [19] Cammarota, M.C.; Avaliação de um Biorreator Fúngico para a Remoção de Cor do Efluente do Branqueamento de Polpa Kraft, Tese Mestrado, Escola de Química / UFRJ (1991)
- [20] Esposito, E.; Processos Envolvidos no Tratamento Biológico de Efluentes: Utilização de um Biorreator de Leito Recheado, Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP (1992)
- [21] Field, J.A.; The Effect of Tannic Compounds on Anaerobic Waste Water Treatment, Dr. Thesis, Agricultural University of Wageningen, Holland, (1989)
- [22] Haggblom, M. e Salkinoja - Salonen, M.; *Wat. Sci. Tech.*, 24, 161 (1991)
- [23] Pavlostathis, S. G. e Giraldo-Gomez, E.; *Critical Rev. Environ. Control*, 21, (5,6): 411 (1991)
- [24] Esposito, E.; Canhos, V.P. e Duran, N.; *Biotechnol. Lett.*, 13, 571 (1991)
- [25] Duran, N.; Esposito, E. e Canhos, V.P.; *Cellulose-91*, (Ed. Ellis Hormmod e Simon Schuster), Inter. Corp., 000 (1992)
- [26] Esposito, E.; Innocentini-Mei, L. H.; Ferraz, A. e Canhos, V.P.; *J. Biotechnol.*, 15, 000 (1992)
- [27] Castro e Silva, A.; Esposito, E.; Ferraz, A. e Duran, N.; *Holzforchung*, 46, 000 (1992)
- [28] Yin, C.-F.; Joyce, T.W. e Chang, H.-M. *J. Biotechn.*, 10, 67 (1989)
- [29] Cammarota, M. C. e Sant'Anna, G. L.; *Environ. Technol.* 13, 65 (1992)
- [30] Hammel, K.E.; *Enzymes Microb. Technol.*, 11, 776 (1989)
- [31] Anselmo, A. M. e Novais, J. M.; *Wat. Sci. Tech.*, 25, 161 (1992)
- [32] Prasad, P. Y. e Joyce, T. W.; *Tappi J.*, 74, 165 (1991)
- [33] Livernoche, D.; Jurasek, L.; Desrochers, M. e Dorica, J.; *Biotechnol. Bioeng.*; 25, 2055 (1983)
- [34] Reid, I. D.; Paice, M. G.; Ho, C. e Jurasek, L.; *Tappi J.*, 73, 149 (1990)
- [35] Erikson, K.-E.; *Proc. 2nd Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Others Wood Components*, (eds. N. Duran e E. Esposito), Campinas, SP, Brasil, 3, 274, (1992)

- [36] Jurasek, L. e Paice, M. G.; *Biomass*, 15, 103 (1988)
- [37] Wegner, T. H.; Myers, G. C. e Leatham, G. F.; *Tappi J.*, 74, 189(1991)
- [38] Kirk, T. K.; *Ann. Rev. Phytopathol.*; 9, 185 (1971)
- [39] Burdsall, H. H. e Esllyn, W. E.; *Mycotaxon*, 1, 123 (1974)
- [40] Durán, N.; Ferraz, A e Mansilla, H.; *Arq. Biol. Tecnol.*, 33, 564 (1990)
- [41] Rodrigues, J.; "Estudo do Sistema Lignolítico do Ascomiceto *Chrysonilia sitophila*" Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP (1990)
- [42] Nogueira, R. F. P.; "Síntese e Biodegradação de Compostos-modelo de Lignina por *Chrysonilia sitophila*", Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP (1990)
- [43] Durán N.; Rodriguez, J.; Ferraz, A. e Campos, V.; *Biotechnol. Lett.*, 9, 357 (1987)
- [44] Durán N.; ; Ferrer, I. e Rodriguez, J.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 16, 157 (1987)
- [45] Tien, M. e Kirk, T. K.; *Science*, 221, 661 (1983)
- [46] Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Mayfield, M. B.; Kuwahara, M. e Gold, M. H.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 114, 1077 (1983)
- [47] Harvey, P. J.; Schoemaker, H. E.; Bowen, R. M. e Palmer, J. M.; *FEBS Lett.*, 183, 13 (1985)
- [48] Leisola, M. S. A.; Zozulic, B.; Meussdoerffer, F. e Fiechter, A.; *J. Biol. Chem.*, 262, 419 (1987)
- [49] Kuwahara, M. Glenn, J. K.; Morgan, M. A. e Gold, M. H.; *FEBS*, 169, 247
- [50] Gold. M. H.; Wariishi, H. e Valli, K.; ACS Symposium Series N 389 Biocatalysis in Agricultural Biotechnology (Ed. J. R. Whiteker e P. E. Sonnet), 9, 127 (1989)
- [51] Kersten, P.J.; Kalyanaraman, B.; Reinhammar, B. e Kirk, T.-K.; *Biochem. J.*, 268, 475 (1990)
- [52] Schoemaker, H. E. e Leisola, M. S. A.; *J. Biotechn.*, 13, 101 (1990)
- [53] Linko, S. e Zhong, L. -C.; *Biotechnol. Tech.*, 1, 251 (1987)
- [54] Capdevila, C.; Corriéu, G.; Asther, M.; *J. Ferment. Bioeng.*; 8, 60 (1989)
- [55] Zhong, L.-C.; Linko, S.; Lindholm, N. e Linko, Y.-Y.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 153 (1988)

- [56] Von Arx, J. A.; *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture* (Ed. Cramer, J., Valduz), 297 (1981)
- [57] Campo, V.; Salas, E.; Durán, N.; Rodriguez, J. e Baeza, J.; *Bol. Micol. (Chile)*, 2, 161, (1986)
- [58] Rodriguez, J. e Durán, N.; *Brasilian J. Med. Biol. Res.*, 21, 411 (1988)
- [59] Ferraz, A. e Durán, N.; *Rev. Microbiol.*, (Brasil), 20, 240 (1989)
- [60] Ferrer, I.; Esposito, E. e Durán, N.; *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 402 (1992)
- [61] Bullock, C.; *Educ. Chem.*, 179 (1989)
- [62] Kenedy, J. F. e White, C. A.; *Handbook of Enzyme Biotechnology*, ed. John Wiley & Sons, New York, N.Y., USA, cap 4, 147 (1986)
- [63] Bohak, Z. e Sharon, N.; *Biotechnological Applications of Proteins and Enzymes*; ed. Acad. Press, New York, N.Y., USA (1977)
- [64] Messing, R. A.; *Process. Biochem.*; 9 (II), 26 (1974)
- [65] Weetall, H. H.; *Biochem. Biophys. Acta*; 212, 1 (1970)
- [66] Zaborsky, O. R.; *Immobilised Enzymes*, CRC Press, Cleveland (1973)
- [67] Hatchikian, E. C. e Monsan, P.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 92, 1091 (1980)
- [68] Bohnenkamp, C. G. e Reilly, P. J.; *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1753 (1980)
- [69] Chang, H. N. e Rielly, P. J.; *Biotechnol. Bioeng.*, 20, 243 (1978)
- [70] Trevisan, H.C. e Innocentini-Mei, L.H.; *An. Acad. Bras. Sci.*, 64, 111 (1992)
- [71] Janowski, F. e Heyer, W.; *Wiss. Z. Univ. Halle*, 35, 30 (1986)
- [72] Janowski, F. e Fischer, G.; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 51, 263 (1991)
- [73] Kadima, T. A. e Pickard, M. A.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3473 (1990)
- [74] Olsson, B. e Ögren, L.; *Anal. Chim. Acta*, 145, 87 (1983)
- [75] Pharmacia, *Affinity Chromatography Principles and Methods* (Ed. Ljungforetagen AB, Sweeden), 14 (1986-1988)

- [76] Roy, S. K.; Raha, S.K; Dey, S. K. e Chakrabarty, S. L.; *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 431,(1989)
- [77] Fadda, M. B.; Dessi, M. R.; Mauruci, R.; Rinaldi, A. e Satta, G.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 306 (1984)
- [78] Kung, H. H.; *Transition Metal Oxids. Surface Chemistry and Catalysis*, Ed. Elsevier Science Publishers R. V., Amsterdam, 45, cap 14 (1989)
- [79] Izumi, I.; Dunn, W. W.; Wilbourn, K. O.; Fan, F. F.-R. e Bard, A. J.; *J. Phys. Chem.*, 84, 3207 (1980)
- [80] Ollis, D. F.; Pelizzetti, E. e Serpone, N.; *Environ. Sci. Technol.*, 25, 1523 (1991)
- [81] Kormann, C.; Bahremann, D. W. e Hoffmann, M. R.; *Environ. Sci. Technol.*, 25, 494 (1991)
- [82] Kondo, M. M. e Jardim, W. F.; *Wat. Res.*, 25, 823 (1991)
- [83] Sanaga, T.H.; Harada, K. e Tanaka, K.; *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.*, 54, 113 (1990)
- [84] Bhakta, D.; Shuka, S. S.; Chandrasekharaiah, M. S. e Margrave, J. L.; *Environ. Sci. Technol.*, 26, 625 (1992)
- [85] Davis, A. P. e Huang, C. P.; *Wat. Res.*, 24, 543 (1990)
- [86] Kobayakowa, K.; Sato, Y.; Nakamura, S. e Fujishima, A.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63, 3433 (1989)
- [87] Ohnishi, H.; Matsumura, M.; Tsubomura, H. e Iwasaki, M.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, 28, 719 (1989)
- [88] Ferraz, A. e Durán, N.; *Rev. Microbiol.*, 20, 240 (1989)
- [89] Tien, M. e Kirk, t. K.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 2280 (1984)
- [90] Szklarz, G.D.; Antibus, R.K.; Sinzabaugh, R.L. e Linkins, A.; *Mycol.*, 81, 234 (1989)
- [91] Miller, G. L.; *Anal. Chem.*, 31, 426 (1959)
- [92] Linko, S.; *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 410 (1988)
- [93] Livernoche, D.; Jurasek, L.; Desrochers, M. e Dorica, J.; *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2055 (1983)

- [94] Chum, H. L.; Johnson, D. K.; Tucher, M. P. e Himmel, M. E.; *Holzforschung*, 41, 97 (1987)
- [95] APHA AWWA WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th Ed., American Public Health Association, Washington, D. C. (1975)
- [96] Ferrer, I.; *Proc. 2nd Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Others Wood Componets* (Eds. N. Duran e E. Esposito), Campinas, SP, Brasil, 3, 348, (1992)
- [97] Roy, S. K.; Raha, S. K.; Dey, S. K. e Chakrarty, S. C.; *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 431 (1989)
- [98] Trevisan, H. "Imobilização de Glicose-oxidase em Suportes Silicíclicos", Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP (1990)
- [99] Kumar, S. e Viswanathan, L.; *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 179 (1991)
- [100] Duran, N.; *Chemical and Biological Generation of Excited States* (Ed. W. Adam e G. Cilento), Academic Press, 345 (1982)
- [101] Ferraz, A. L.; "Contribuição ao Estudo do Ascomiceto *Chrysonilia sitophila*: Biodegradação da Madeira e seus Componentes", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Brasil (1991)
- [102] Kirk, T. K. e Farrell, R. L., *An. Rev. Microbiol.*, 41, 465 (1987)
- [103] Asada, Y.; Miyabe, M.; Kikkawa, M. e Kuwahara, M.; *J. Ferment. Technol.*, 65, 483 (1987)
- [104] Gold, M. H.; Wariishi, K. e Valli, K.; *Biocatalysis in Agriculture Biotechnology*, (Ed. John R. Whitaker e Philip E. Sonnet) (American Chemical Society), EUA, cap 9 (1989)
- [105] Dosoretz, C. G.; Chen, H. -C. e Grethlein, H. E.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 395 (1990)
- [106] Dosoretz, C. G.; Dass, S. B.; Reddy, C. A. e Grethlein, H. E.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3429 (1990)
- [107] O'Reilly, S.; Eraso, S.; Campos, V.; Salas, E.; Baeza, J.; Ferraz, A.; Rodriguez, J. e Durán, N.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 267 (1991)

- [108] Jager, A. G.; Kern, H. W. e Wandrey, C. "Fourth International Conference .
Biotechnology the Pulp and Paper Industry", Raleigh, North Caroline, USA (1989)
- [109] Kirkpatrick, K. N. e Palmer, J.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 129 (1987)
- [110] Tonon, F. e Odir, E.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 466, (1988)
- [111] Kern, H. W.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 582 (1990)
- [112] Faison, B. D. e Kirk, T. K.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 299 (1985)
- [113] Leisola, M. S. A.; Meussdaerffer, F.; Waldner, R. e Fiechter, A.; *J. Biotechnol.*, 2, 379
(1985)
- [114] Lundquist, K.; Kirk, T. K. e Connors, W. J.; *Arch. Microbiol.*, 112, 291 (1977)
- [115] Capdevila, C.; Corriéu, G. e Asther, M.; *J. Ferment. Bioeng.*, 8, 60 (1989)
- [116] Aitken, M. D.; Venkatadri, R. e Irvine, R. L.; *Wat. Res.*, 23, 443 (1989)
- [117] Durán, N.; Dezotti, M. e Rodriguez, J.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 62, 269 (1991)
- [118] Schmidt, R. L. e Joyce, J. W.; *Tappi J.*, 63, 63 (1980)
- [119] Paice, M. G. e Jurasek, L.; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 477 (1984)
- [120] Ferrer, I.; Dezotti, M. e Durán, N.; *Biotechnol. Lett.*, 13, 577 (1991)
- [121] D'Oliveira, J. -C.; Al-Sayed, G. e Pichat, P.; *Environ. Sci. Technol.*, 24, 990 (1990)
- [122] Matthews, R. W.; *Wat. Res.*, 24, 653 (1990)
- [123] Durán, N.; Gomez, E. e Haun, M.; *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 51, 469 (1990)
- [124] Durán, N.; Ferrer, I.; Rodriguez, J.; Mansilla, J. e Baeza, J.; *J. Photochem.*, 41, 261 (1988)