

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**APLICAÇÃO DE LACASES IMOBILIZADAS EM QUITOSANA
NA BIOCONVERSÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
REATORES BATELADA E CONTÍNUO**

TESE DE DOUTORADO

EVERTON SKORONSKI

**Florianópolis
novembro/2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**APLICAÇÃO DE LACASES IMOBILIZADAS EM QUITOSANA
NA BIOCONVERSÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
REATORES BATELADA E CONTÍNUO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

**Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Lemos Soares
Co-orientador: Prof. Dr. Jair Juarez João**

**Florianópolis
novembro/2010**

“Research is to see what everybody else has seen and to think what nobody else has thought”

Albert Szent-Gyorgyi

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Irmo Hintz Skoronski (*in memoriam*) e Letícia Wernke Skoronski por contribuir hora de forma direta, hora de forma indireta, na minha formação social e acadêmica.

Ao professor Agenor Furigo Júnior pela orientação, compreensão, incentivo e amizade ao longo dos meus sete anos de pós-graduação.

Ao professor Carlos Henrique Lemos Soares pela orientação, amizade, disponibilização de material e apoio durante toda a realização do trabalho.

Ao professor Jair Juarez João por permitir que grande parte do trabalho pudesse ter sido realizada nas dependências do CENTEC-UNISUL, por orientar na realização do trabalho, além do incentivo e amizade demonstrada ao longo do tempo.

À minha namorada Mylena Fernandes pelo carinho, compreensão, amizade e conforto proporcionado, além de contribuir na realização dos experimentos e na formatação da tese.

Aos alunos de iniciação científica do curso de Engenharia Química da UNISUL Felipe Gomes dos Santos, Ariel Wachholz, Arliana Caon, Tiago Fratoni, Tarcila Borges e Wilian Pereira de Souza, pela amizade e colaboração na execução dos experimentos.

Aos colegas do Engebio Gisanara Dors, Américo Cruz Júnior e Sabrina Villela pela amizade e companheirismo demonstrado ao longo da pós-graduação.

Aos professores Antônio Augusto, Edna Amante, Paulo, Renato e Jorge Ninow por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

À professora Erly Perini Popoaski por viabilizar a minha inserção no mercado de trabalho e na vida acadêmica, além de ter ajudado minha família em vários momentos difíceis e à professora Maria Carminati Lima por colaborar diretamente no meu ingresso no magistério de ensino médio e depois no nível superior.

Por fim, a todos os professores do programa de pós-graduação em Engenharia Química da UFSC e ao funcionário Edevilson Silva pelo apoio prestado durante estes sete anos, e pelo seu profissionalismo exemplar como servidor público federal.

SKORONSKI, E. **Aplicação de lacases imobilizadas em quitosana na bioconversão de compostos fenólicos em reatores batelada e contínuo.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

RESUMO

Palavras-chave: compostos fenólicos, lacase, imobilização, quitosana, bioconversão, reatores contínuos.

Neste trabalho foi estudada a imobilização de enzimas lacases de *Aspergillus sp* em quitosana, através de ligação cruzada e sua aplicação na bioconversão de compostos fenólicos em reatores operando em regime batelada e fluxo contínuo (reator de leito fixo). Inicialmente, foi realizada a otimização do processo de imobilização através de um planejamento fatorial do tipo DCCR (delineamento experimental central composto e adição de ponto rotacional). Dentre os níveis de fatores estudados, o experimento que permitiu a obtenção de biocatalisadores com a maior atividade enzimática foi realizado com concentração de glutaraldeído de 1%, pH de 6,5, tempo de 5,0 horas e concentração de enzima igual a 6 g.L⁻¹. Em seguida foi avaliada a estabilidade da enzima imobilizada na estocagem. Verificou-se que a melhor condição para manutenção da atividade enzimática é em solução tampão pH 8,0, na temperatura de 8 °C. Além disso, o biocatalisador foi aplicado na oxidação de 18 diferentes derivados fenólicos. Foi observado que o 4-nitrofenol não pode ser convertido enquanto o 2,5-xilenol e 2,6-xilenol, 2,3,5-trimetilfenol e o *p*-etilfenol apresentaram conversões acima de 90%, na temperatura de 40°C. Por fim, a lacase imobilizada foi aplicada na bioconversão de dois substratos padrões a siringaldazina e o 2,6-dimetoxifenol para realização do estudo cinético do processo e avaliação da estabilidade operacional. Em regime batelada, foi observado que não é possível reutilizar o biocatalisador quando este participa da reação envolvendo a siringaldazina, enquanto que no processo com o 2,6-DMP, a enzima mantém sua atividade inicial por até 8 ciclos reacionais. Em fluxo contínuo, quando o biocatalisador é utilizado para mediar a bioconversão de 2,6-DMP, a atividade da enzima imobilizada é mantida por um tempo maior em relação ao observado na bioconversão da siringaldazina.

SKORONSKI, E. **Aplicação de lacases imobilizadas em quitosana na bioconversão de compostos fenólicos em reatores batelada e contínuo.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ABSTRACT

Keywords: phenolic compounds, laccase, immobilization, chitosan, bioconversion, packed bed reactors.

The immobilization of laccase (*Aspergillus sp*) on chitosan by cross-linking and its application on bioconversion of phenolic compounds in batch and continuous flow reactors (fixed bed reactor) were studied. The immobilization of enzyme was optimized using an experimental design RCCD (Rotational central composite design). Among the different levels of factors studied, the optimized conditions (in order to obtain the major enzyme activity) were glutaraldehyde concentration of 1%, pH 6.5, immobilization time of 5.0 hours and enzyme concentration of 6 g.L⁻¹. The stability of the immobilized enzyme along the storage time was evaluated. The best condition for maintenance of enzyme activity is in buffer pH 8.0 at 8 °C. Also, the biocatalyst was applied to the biotransformation of eighteen different phenol derivatives. It was observed that 4 – nitrophenol was not converted while the 2,5 – xylenol and 2,6 – xylenol, 2,3,5 – trimethylphenol and the ethylphenol showed reactions yields up 90% at 40 °C. The immobilized laccase was applied to bioconversion of two substrates: syringaldazine and 2,6 – dimethoxyphenol. The kinetic of process and enzyme operational stability was studied. In batch reactors, it was not possible to reuse the enzyme when it was applied to syringaldazine bioconversion. Therefore, when the enzyme is applied to bioconversion of 2,6 – DMP, the activity was stable for eight reaction batches. The biocatalyst was applied in packed bed reactors. For the bioconversion of 2,6 – DMP, the activity of the immobilized enzyme is maintained for a longer time if compared to that observed in the bioconversion of syringaldazine.

SUMÁRIO

Lista de figuras	x
Lista de tabelas	xvi
Lista de abreviaturas.....	xviii
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1. Geral	4
2.2. Específicos.....	4
3. Revisão bibliográfica.....	6
3.1. Impactos ambientais de estruturas fenólicas.....	6
3.2. Métodos tradicionais de remediação de compostos fenólicos	7
3.2.1. Adsorção em carvão ativado	7
3.2.2. Oxidação química.....	8
3.2.3. Biodegradação.....	8
3.3. Aplicação de enzimas oxidativas na remediação de estruturas fenólicas	9
3.3.1. Peroxidases.....	9
3.3.2. Polifenoloxidasas	9
3.3.3. Obtenção de peroxidases e fenoloxidasas	10
3.4. Aplicação de lacases.....	11
3.4.1. Considerações gerais	11
3.4.2. Aplicação de lacases no tratamento de efluentes	15
3.4.3. Imobilização de lacases.....	16
4. Material e métodos	21
4.1. Enzima.....	21
4.2. Reagentes.....	21
4.3. Material.....	21

4.4.	Otimização do processo de imobilização	22
4.4.1.	Caracterização da quitosana.....	22
4.4.2.	Obtenção das cápsulas de quitosana	22
4.4.3.	Imobilização da lacase nas cápsulas de quitosana	23
4.4.4.	Medida da atividade enzimática.....	26
4.4.5.	Caracterização do biocatalisador obtido	26
4.5.	Avaliação da influência do tempo de estocagem do biocatalisador	27
4.6.	Aplicações na bioconversão de diferentes derivados fenólicos em regime batelada.	29
4.6.1.	Experimentos de bioconversão de derivados fenólicos mediados pela lacase imobilizada	29
4.6.2.	Determinação da concentração de fenóis de baixa massa molecular.	31
4.7.	Estudo cinético da bioconversão de compostos fenólicos em reator batelada.....	32
4.7.1.	Avaliação da cinética de bioconversão utilizando siringaldazina.	32
4.7.2.	Avaliação da cinética de bioconversão utilizando 2,6 – dimetoxifenol (2,6 – DMP).....	33
4.7.3.	Ajuste de modelos cinéticos.....	34
4.7.4.	Avaliação da estabilidade operacional frente a vários ciclos oxidativos.....	34
4.8.	Estudo da estabilidade do biocatalisador aplicado em reator contínuo de leito fixo.	34
4.8.1.	Experimentos em reator contínuo	34
4.8.2.	Ajuste de modelo de perda de atividade do biocatalisador	36
5.	Resultados e Discussão	38
5.1.	Caracterização da quitosana	38
5.2.	Otimização do processo de imobilização	40

5.3.	Caracterização do biocatalisador obtido.	45
5.4.	Avaliação da atividade do catalisador na estocagem.....	46
5.5.	Aplicação da enzima imobilizada na bioconversão de derivados fenólicos de baixa massa molecular.....	52
5.6.	Estudo cinético em reator batelada.....	57
5.6.1.	Obtenção das curvas cinéticas de bioconversão da siringaldazina.	57
5.6.2.	Avaliação da capacidade de reutilização do biocatalisador na bioconversão da siringaldazina.	60
5.6.3.	Avaliação das curvas cinéticas de bioconversão do 2,6 - DMP.	67
5.6.4.	Ajuste de modelos matemáticos às curvas cinéticas de bioconversão do 2,6 - dimetoxifenol.	69
5.6.5.	Avaliação da capacidade de reutilização do biocatalisador na bioconversão de 2,6-dimetoxifenol.	71
5.7.	Avaliação da estabilidade do biocatalisador aplicado em reatores contínuos de leito fixo.	76
5.7.1.	Avaliação da estabilidade do biocatalisador na bioconversão de siringaldazina.	77
5.7.2.	Avaliação da estabilidade do biocatalisador na bioconversão do 2,6-dimetoxifenol.	80
5.7.3.	Ajuste do modelo de desativação de Sadana.....	86
6.	Conclusões	89
7.	Sugestões.....	92
8.	Referências.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Representação esquemática do sítio ativo da lacase.	12
Figura 3.2 - Ciclo catalítico da lacase. Na Figura, S é um substrato na sua forma reduzida e S ⁺ é um substrato na sua forma oxidada; T1, T2 e T3 representam as espécies de cobre tipo 1, 2 e 3, respectivamente.	13
Figura 3.3 - Principais métodos de imobilização de enzimas	17
Figura 3.4 - Representação da fórmula estrutural da quitosana	19
Figura 4.1 - Processo de gotejamento da solução de quitosana em solução de hidróxido de sódio 2 mol.L ⁻¹ , através de uma bomba peristáltica.	23
Figura 4.2 – Etapas envolvidas no processo de formação das cápsulas do biocatalisador: 1- dissolução da quitosana, 2-precipitação, 3-ativação com glutaraldeído e 4-imobilização.	24
Figura 4.3- Imagem do sistema empregado para estudo da aplicação da lacase imobilizada em reator contínuo de leito fixo.	35
Figura 4.4 - Diagrama esquemático apresentando os dispositivos empregados na avaliação da bioconversão de compostos fenólicos em reator contínuo com lacase imobilizada.	36
Figura 5.1 – Curva de titulação potenciométrica para determinação do grau de desacetilação da quitosana utilizada no estudo.	38
Figura 5.2 – Apresentação da primeira derivada da curva de titulação potenciométrica. Os dois picos assinalados se referem às duas inflexões apresentadas pela curva da Figura 5.1.	39
Figura 5.3– Diagrama de Pareto demonstrando o nível de influência dos fatores pH (X ₁), concentração de glutaraldeído (X ₂), tempo de imobilização (X ₃), e concentração de enzimas (X ₄) sobre a atividade enzimática resultante do processo de imobilização.	43
Figura 5.4 – Diagrama apresentando a correlação entre os valores previstos pelo modelo matemático e os dados obtidos experimentalmente (R ² = 0,85511).	45
Figura 5.5 – Imagem da cápsula de quitosana obtida após o processo de gotejamento e precipitação em hidróxido de sódio 2 mol.L ⁻¹	45

Figura 5.6 – Imagem da cápsula de quitosana imobilizada em pH 6,5, em solução 6 g.L ⁻¹ de enzima lacase. A cápsula foi previamente ativada em solução 1% de glutaraldeído (v/v).....	46
Figura 5.7 – Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos foram realizados sem adição de meio líquido e mantidos em repouso nas temperaturas de 8 e 23 °C.....	47
Figura 5.8 - Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos tiveram a adição de água deionizada como meio para incubação. As temperaturas foram mantidas em 8, 23 e 40°C. Os experimentos foram realizados com enzima livre e imobilizada.....	48
Figura 5.9 - Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos receberam a adição de solução tampão fosfato pH 8,0 como meio para incubação. As temperaturas foram mantidas em 8, 23 e 40°C e os experimentos foram realizados com enzima livre e imobilizada.....	49
Figura 5.10 - Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos foram com a adição de solução tampão tartarato pH 4,0 como meio para incubação. As temperaturas utilizadas foram 8, 23 e 40°C e os experimentos realizados com enzima livre e imobilizada.....	50
Figura 5.11– Valores de velocidades iniciais em função da concentração de substrato obtidas para os experimentos realizados a 20 °C.	58
Figura 5.12 – Valores de velocidades iniciais em função da concentração de substrato obtidas para os experimentos realizados a 30 °C.	59
Figura 5.13 – Valores de velocidades iniciais em função da concentração de substrato obtidas para os experimentos realizados a 40 °C.	60
Figura 5.14 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 5 cápsulas e a temperatura foi mantida a 20 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	61
Figura 5.15 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 10 cápsulas e a temperatura foi mantida a 20 °C. Os testes foram	

realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	62
Figura 5.16 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 15 cápsulas e a temperatura foi mantida a 20 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	62
Figura 5.17 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 5 cápsulas e a temperatura foi mantida a 30 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	63
Figura 5.18 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 10 cápsulas e a temperatura foi mantida a 30 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	63
Figura 5.19 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 15 cápsulas e a temperatura foi mantida a 30 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	64
Figura 5.20 – Reação de oxidação da siringaldazina em sua quinona equivalente (tetrametoxi-azo-bis-metilenoquinona).	64
Figura 5.21 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 5 cápsulas e a temperatura foi mantida a 40 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	65
Figura 5.22 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 10 cápsulas e a temperatura foi mantida a 40 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	65
Figura5.23– Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 15 cápsulas e a temperatura foi mantida a 40 °C. Os testes foram	

realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.....	66
Figura 5.24 - Resultados obtidos para os experimentos utilizando o 2,6-dimetoxifenol como substrato padrão. A temperatura do meio reacional foi mantida em 20°C e a quantidade de cápsulas foi de 5, 10 e 15 cápsulas. O ajuste M.M. refere-se ao modelo de Michaelis e Menten. .	67
Figura 5.25 – Resultados obtidos para os experimentos utilizando o 2,6-dimetoxifenol como substrato padrão. A temperatura do meio reacional foi mantida em 30°C e a quantidade de cápsulas foi de 5, 10 e 15 cápsulas. O ajuste M.M. refere-se ao modelo de Michaelis e Menten. .	68
Figura 5.26 – Resultados obtidos para os experimentos utilizando o 2,6-dimetoxifenol como substrato padrão. A temperatura do meio reacional foi mantida em 40°C e a quantidade de cápsulas foi de 5, 10 e 15 cápsulas. O ajuste M.M. refere-se ao modelo de Michaelis e Menten. .	68
Figura 5.27 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 5 cápsulas e temperatura de 20 °C.	72
Figura 5.28 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 10 cápsulas e temperatura de 20 °C.....	72
Figura 5.29 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 15 cápsulas e temperatura de 20 °C.	73
Figura 5.30 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 5 cápsulas e temperatura de 30 °C.	73
Figura 5.31 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 10 cápsulas e temperatura de 30 °C.....	74
Figura 5.32 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 15 cápsulas e temperatura de 30 °C.	74
Figura 5.33 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 5 cápsulas e temperatura de 40 °C.	75

Figura 5.34 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 10 cápsulas e temperatura de 40 °C.	75
Figura 5.35 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 15 cápsulas e temperatura de 40 °C.	76
Figura 5.36 – Valores de concentração de produto medidas em 525 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h ⁻¹ , concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg.L ⁻¹ e temperatura de 20 °C.	77
Figura 5.37 – Valores de concentração de produto medidas em 525 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h ⁻¹ , concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg.L ⁻¹ e temperatura de 30 °C.	78
Figura 5.38 – Valores de concentração de produto nas amostras coletadas na saída do reator e acompanhadas em 525 nm. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h ⁻¹ , concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg.L ⁻¹ e temperatura de 40 °C.	78
Figura 5.39 – Imagem da cápsula de quitosana antes de ser aplicada no reator.	79
Figura 5.40 – Imagem da cápsula de quitosana em operação no reator contínuo. Detalhe para o escurecimento da cápsula durante o seu uso.	80
Figura 5.41 – Valores de concentração de produto medidas em 470 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h ⁻¹ , concentração de 2,6-DMP na solução de alimentação igual a 10 mg.L ⁻¹ e temperatura de 20 °C.	81
Figura 5.42 – Valores de concentração de produto medidas em 470 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h ⁻¹ , concentração de 2,6-DMP na solução de alimentação igual a 10 mg.L ⁻¹ e temperatura de 30 °C.	82
Figura 5.43 – Valores de concentração de produto medidas em 470 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h ⁻¹ , concentração de 2,6-DMP na solução de alimentação igual a 10 mg.L ⁻¹ e temperatura de 40 °C.	83
Figura 5.44 – Produto de oxidação obtido durante a bioconversão do 2,6-DMP, mediado pela lacase imobilizada em quitosna.	84

Figura 5.45 – O produto de conversão do 2,6 dimetoxifenol apresenta cor amarelada e se mantém estável por aproximadamente 3 horas. Após esse período ele se transforma no precipitado apresentado na Figura...	84
Figura 5.46 – Cápsula de quitosana com enzima imobilizada no início do processo.....	85
Figura 5.47 – Aspecto do biocatalisador após o contato com o 2,6-DMP, durante um intervalo de tempo igual a 720 minutos.....	85
Figura 5.48 – Ajuste do modelo de Sadana aos dados experimentais obtidos na temperatura de 20 °C.	86
Figura 5.49 – Ajuste do modelo de Sadana aos dados experimentais obtidos na temperatura de 30 °C.	87
Figura 5.50 – Ajuste do modelo de Sadana aos dados experimentais obtidos na temperatura de 40 °C.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Exemplos de trabalhos realizados, aplicando lacases na remediação de contaminantes diversos.	15
Tabela 3.2 - Principais grupos funcionais responsáveis pela formação de ligação covalente entre enzima e suporte.....	18
Tabela 4.1- Lista de equipamentos utilizados no trabalho.	21
Tabela 4.2 – Tabela apresentando os experimentos delineados pela combinação entre os níveis dos diversos fatores envolvidos no processo de imobilização da Lacase em quitosana.	24
Tabela 4.3 – Condições de temperatura e pH aplicadas para avaliação da estabilidade da enzima. Em cada condição foram adicionadas 50 cápsulas em 50 mL de meio líquido.....	27
Tabela 4.4- Compostos utilizados para avaliação da capacidade de bioconversão de compostos fenólicos de baixa massa molecular.	30
Tabela 5.1– Respostas obtidas após a realização dos ensaios determinados pelo planejamento experimental.	40
Tabela 5.2 – Valores dos coeficientes do modelo matemático obtidos. Valores com $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.	44
Tabela 5.3 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados sem a adição de meio líquido.	51
Tabela 5.4 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados com a adição de água deionizada.	51
Tabela 5.5 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados com a adição de solução tampão pH 4,0.....	51
Tabela 5.6 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados com a adição de solução tampão pH 8,0.....	52
Tabela 5.7 – Resultados obtidos para a bioconversão de derivados fenólicos utilizando a lacase imobilizada. O tempo de incubação foi de 24 horas e o pH do meio foi ajustado em 4,0 com tampão tartarato.	54

Tabela 5.8 – Valores dos parâmetros do modelo de Michaelis e Menten ajustados aos dados experimentais.	69
Tabela 5.9 – Parâmetros do modelo de Sadana ajustados aos dados experimentais.	88

ABREVIATURAS

ABTS	2,22 -azinobis(3-etillbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
APTS	3-aminopropiltriétoxissilano
CONAMA	Conselho nacional do Meio Ambiente
DCCR	Delineamento experimental central composto com adição de ponto rotacional.
DMP	Dimetoxifenol
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EDC	Carbodimina
EPR	Espectroscopia eletroparamagnética de ressonância
FATMA	Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina
FTIR	Espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier
HPA	Hidrocarbonetos poliaromáticos
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
kDa	Quilo Daltons
NPI	<i>National Pollutant Inventory</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PVP	Polivinilpirrolidona
UV	Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

A contaminação causada por compostos fenólicos merece destaque, visto a elevada toxicidade observada para animais e plantas. Mesmo em concentrações muito baixas ($< 1 \text{ mg.L}^{-1}$), sua presença é capaz de alterar o gosto e o odor de corpos receptores aquáticos. Além disso, estes compostos são considerados bioacumulativos no ambiente (RUSSELL; BURTON, 1999).

Os compostos fenólicos são encontrados em diversos efluentes industriais como os da indústria têxtil, papel e celulose, petroquímica, plástico, resinas, farmacêutica e de fabricação de pesticidas (GONZÁLEZ, 2006). Em geral apresentam-se em concentrações que variam entre 100 e 1000 mg.L^{-1} (LÓPEZ - MOLINA et al., 2003). Devido à sua elevada toxicidade, os diversos processos biológicos aplicados para a remediação destes compostos apresentam baixa eficiência quando se apresentam na água em concentrações acima de 100 mg.L^{-1} , devido à elevada inibição conferida aos micro-organismos responsáveis pelo tratamento (HOSSEINI et al., 2005). Assim, processos físico-químicos empregando adsorção em carvão ativado e processos oxidativos avançados são utilizados como uma alternativa na remoção de derivados fenólicos em águas residuárias (FERNANDES, 2005). Entretanto, o elevado custo desses processos aliado à falta de iniciativa de construção de unidades em escala real estimula a pesquisa por novos processos de remoção de fenol, sendo o processo enzimático um deles.

A oxidação de fenol catalisada por enzimas oxidativas vem apresentando resultados promissores com relação à remoção do fenol em águas residuais (DURÁN et al., 2000). Peroxidasas e polifenoloxidasas são enzimas oxidativas encontradas em uma série de recursos naturais como tomate, café, algodão, moluscos e camarão. Dentre as várias aplicações que essas enzimas podem apresentar o seu emprego catalítico em reatores oxidativos merece destaque. O processo pode envolver o uso de duas subclasses de enzimas. A primeira subclasse refere-se às peroxidasas que realizam a oxidação dos compostos aromáticos utilizando o peróxido de hidrogênio dissolvido no meio, comoceptor final de elétrons.

A outra subclasse, polifenoloxidasas, realiza a hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois e em seguida, na presença de oxigênio molecular, realiza a oxidação até *o*-quinonas. Esses últimos compostos,

em água, são polimerizados e precipitam podendo ser facilmente removidos por processos de coagulação/floculação (WHITELEY et al., 2006). Desta forma, além do tratamento enzimático proposto é necessário ainda incluir um processo físico-químico para remoção dos compostos gerados na bioconversão enzimática.

As lacases (EC 1.10.3.2) são polifenoloxidasas que catalisam a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos incluindo mono e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas com concomitante redução de oxigênio para água. Utilizam oxigênio dissolvido na água como aceptor final de elétrons no processo de oxidação, tornando o processo mais atrativo em comparação a enzimas peroxidases que utilizam peróxido de hidrogênio como agente oxidante. Essas enzimas vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como: biodegradação de xenobióticos e efluentes industriais, descoloração de corantes, biorremediação de solos contaminados, produção de etanol, clarificação de vinhos e chás e utilização em biossensores, tanto em seu estado livre, quanto imobilizada em um suporte (MAYER et al., 2002). A aplicação dessas enzimas em processos industriais torna-se mais atrativa quando elas podem ser imobilizadas em um suporte inerte ao meio reacional, possibilitando sua fácil separação após a reação. Além desse fator, a imobilização enzimática confere maior estabilidade ao catalisador, permitindo também que ela possa ser reutilizada em vários ciclos experimentais ou de forma contínua. Entre as principais técnicas desenvolvidas até o momento citam-se a imobilização por ligação química cruzada ou a adsorção da enzima no suporte e a encapsulação em uma matriz polimérica. A imobilização por ligação cruzada apresenta grandes vantagens frente a outras técnicas de imobilização uma vez que a enzima fica ligada ao suporte por ligação química covalente, dificultando seu arraste do suporte por mecanismos de difusão ou advecção do meio reagente (SCRIBAN, 1985).

Após a imobilização, a enzima pode ser aplicada em reatores contínuos, que normalmente são empregados para processos que envolvam alta produção. Os principais reatores empregados são os de mistura completa (*continuous stirred tank reactor* – CSTR) e o de leito fixo empacotado (*packed bed reactor* – PBR). A imobilização das enzimas para aplicação nesses reatores apresenta uma vantagem operacional bastante atrativa, uma vez que o catalisador permanece no reator após o ciclo reacional, diminuindo dessa forma os custos com separação da enzima dos produtos obtidos da reação. Além disso, os processos de separação da enzima do meio, além de dispendiosos,

acabam afetando a sua atividade, dificultando a reutilização. Diante dessas vantagens, é de se esperar que reatores contínuos com enzimas imobilizadas recebam maior atenção para aplicação em processos tecnológicos frente a tecnologias que envolvam enzimas livres (SHULER et al., 2002).

Diante deste cenário, o presente trabalho buscou avaliar a aplicação de enzimas lacases na bioconversão de compostos fenólicos em reatores batelada e contínuo. Para este estudo foi realizada a otimização do processo de imobilização da lacase em cápsulas de quitosana bem como a caracterização física do biocatalisador obtido. Além disso, foi avaliada a estabilidade do biocatalisador na estocagem e seu uso em processos batelada e contínuo e o seu desempenho na bioconversão de compostos fenólicos.

O estudo da imobilização das enzimas, em cápsulas de quitosana apresenta elevada importância ao desenvolvimento sustentável de Santa Catarina. A produção catarinense de camarão cresceu muito nos últimos tempos, aproximando-se de 2 mil toneladas em meados de 2002 (SOUZA e COSTA, 2003). Dessa forma a realização de estudos referentes à utilização de quitosana, que pode ser obtida a partir de resíduos da carcinicultura como material suporte para imobilização de enzimas pode contribuir para a redução do lançamento desses resíduos ao meio ambiente, favorecendo a sua reutilização, além de agregar valor a esse material. Com isso estaremos contribuindo com a geração de processos baseados em tecnologias limpas, diminuindo o lançamento de resíduos da carcinicultura, substituindo suportes para enzimas inorgânicos e nocivos ao meio ambiente por materiais naturais e recicláveis e contribuindo para a remediação do lançamento de efluentes carregados de fenol ao meio ambiente.

Além disso, a busca por novas alternativas mais eficientes e economicamente viáveis para o tratamento de efluentes de indústrias contendo elevadas concentrações de fenol apresenta grande relevância sob os pontos de vista científico, técnico, econômico e social. Desta forma, o estudo apresentou um grande campo de aplicação para o estado de Santa Catarina, que se destaca nas áreas de produção de papel e celulose e de produção de tecidos, sendo esses processos grandes geradores de efluentes contaminados por compostos fenólicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar a remoção de compostos fenólicos em reatores batelada e contínuo, utilizando enzimas lacase de *Aspergillus sp* imobilizadas em quitosana.

2.2. Específicos

- Otimizar o processo de imobilização da lacase de *Aspergillus sp* em quitosana através do processo de ligação cruzada;
- realizar a caracterização física e química dos reagentes e do biocatalisador obtido em termos de massa específica, diâmetro e grau de desacetilação da quitosana;
- estudar a influência de fatores como meio de acondicionamento, temperatura e pH na estocagem da enzima livre e imobilizada;
- determinar os parâmetros cinéticos (constante de perda de atividade e tempo de meia-vida) do processo de perda de atividade da enzima imobilizada ao longo do tempo de estocagem;
- avaliar a atividade catalítica da enzima imobilizada aplicada na oxidação de diversos derivados fenólicos;
- estudar a influência do grupo substituinte na estrutura do fenol sobre a atividade catalítica da enzima imobilizada;
- realizar ensaios de oxidação em batelada, variando a massa de biocatalisador adicionado ao meio, temperatura e concentração de substratos para medida da velocidade inicial da reação;
- ajustar modelos matemáticos cinéticos para relacionar o efeito da concentração de substratos sobre a velocidade inicial da reação;

2. Objetivos

- verificar o efeito do tipo de substrato, neste caso, siringaldazina e 2,6-dimetoxifenol, na capacidade de reutilização da enzima em vários ciclos de reação;
- avaliar a estabilidade do biocatalisador na oxidação de compostos fenólicos como siringaldazina e 2,6-dimetoxifenol aplicados em reatores contínuos;
- aplicar modelos matemáticos para avaliar a influência de parâmetros como temperatura e massa de enzima adicionada ao reator, em relação ao tempo de estabilidade operacional do sistema.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Impactos ambientais de estruturas fenólicas

O fenol e seus derivados podem ser encontrados em diversos setores da sociedade, tanto no ambiente industrial quanto doméstico ou comercial (BLANCO, 2001). Entre as diversas aplicações, pode-se citar seu uso como reagente químico em análises, matéria-prima para fabricação de resinas, compostos orgânicos de interesse, corantes, fármacos e como insumo das indústrias têxtil, alimentícia e papel e celulose (MORRISON; BOYD, 1992). Em função da sua elevada aplicabilidade, o seu lançamento ao meio ambiente se torna um fator preocupante, motivando a busca por métodos eficazes e mais econômicos de controle de lançamentos desse poluente.

De acordo com o *National Pollutant Inventory* (NPI), um órgão australiano do meio ambiente, o fenol apresenta um nível de impacto por volta de 0,8 em uma faixa de 0 a 3 (AUSTRALIAN GOVERNMENT, 2009). Seu impacto ao meio ambiente pode acontecer pelo ar, água e solo.

No ar, o fenol encontrado pode estar associado a sua evaporação a partir de tanques de armazenamento ou durante seu transporte. Sua presença pode também estar associada à queima de madeira e combustíveis fósseis. Em cigarros também ocorre o seu lançamento no ar. Devido à alta solubilidade em água, grande parte do fenol é removida da atmosfera devido à chuva. Entretanto, em função da elevada capacidade de degradação na atmosfera, o fenol é removido desta, em grande parte, quimicamente, ao invés de ser transportado (TRAPP et al., 1998).

De acordo com o *International Programme on Chemical Safety*, (1994), a presença do fenol na água se deve principalmente a despejos industriais, apresentando um grande destaque as indústrias de papel e celulose. Em esgotos domésticos pode ser encontrado devido à utilização de desinfetantes e drogas medicinais. No ambiente líquido, nem a volatilização nem a adsorção por sedimentos ou particulados é relevante para o seu transporte. O fenol é rapidamente biodegradável em águas naturais, sendo que sua velocidade de degradação aumenta com a concentração até aproximadamente 50 mg.L^{-1} , onde, a partir desse valor, ocorre inibição da atividade catalítica pelo substrato, sendo que a presença de contaminantes inorgânicos na água também pode contribuir

para redução na velocidade de biodegradação dos compostos fenólicos. Para uma temperatura de 20 °C a degradação ocorre em um tempo de meia-vida de 2 dias e a 4 °C com um tempo de meia-vida de 4 dias. A degradação em águas salinas é considerada lenta (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1994).

No solo é encontrado devido a acidentes de carregamento ou transporte e através da lixiviação de efluentes carregados. São considerados tóxicos aos organismos aquáticos, em concentrações baixas, e afetam o sabor dos peixes e a aceitabilidade das águas. Nesse meio, a maior parte do fenol encontrado, pode estar ligada à sua lixiviação. O mecanismo de adsorção por sedimentos é considerado desprezível, frente à sua elevada velocidade de biodegradação.

Em resíduos sólidos a biodegradação ocorre de forma aeróbia e anaeróbia, sendo que em meio ácido a velocidade de biodegradação é menor. Em plantas, o fenol é absorvido instantaneamente e não é bioacumulativo devido à sua rápida degradação por respiração (BACCI, 1994; TRAPP; MATTHIES, 1998; PARAÍBA et al., 2005).

Os padrões para lançamento de fenol de acordo com o decreto 14.675 a Fundação do Meio Ambiente (FATMA) são 0,2 ppm para descarte de efluentes líquidos, 0,001 ppm para presença em águas de classe 1, 1 ppm para águas de classe 3 e 0,047 ppm (v/v) para descarte de efluentes gasosos (SANTA CATARINA, 2009). Segundo a resolução 396 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) a concentração de fenol para descarte de efluentes líquidos deve apresentar um valor máximo de 0,5 ppm, enquanto que os corpos receptores líquidos devem apresentar para as classes 1, 2 e 3 concentrações de 0,003, 0,01 e 1 ppm, respectivamente (BRASIL, 2009).

3.2. Métodos tradicionais de remediação de compostos fenólicos

3.2.1. Adsorção em carvão ativado

O carvão ativado é um dos principais adsorventes empregados na remoção de poluentes tanto de natureza orgânica quanto inorgânica. A sua capacidade de saturação varia de acordo com a temperatura, sendo que a redução da temperatura favorece a adsorção uma vez que em muitos casos esse é um processo exotérmico. Para temperatura de 23 °C há um carregamento de 2,5 mmol de fenol por grama de carvão para concentrações de fenol no meio acima de 1,5 mmol.L⁻¹ e pH 10.

Verifica-se também que o aumento do pH do meio favorece a adsorção do fenol em meio aquoso (BLANCO, 2001; FERNANDES, 2005).

Apesar de apresentar uma boa atividade na remoção de fenol, o custo dos carvões ativados comerciais é ainda um fator que impede seu uso em larga escala industrial. Dessa forma, além do carvão ativado, estudos com a utilização de adsorventes alternativos que envolvem quitosana, bambu e casca de eucalipto vêm sendo explorados (KUNZ et al., 2002).

3.2.2. Oxidação química

O método de oxidação química mais comum para oxidação de fenol envolve a fotodegradação utilizando luz ultravioleta artificial e TiO_2 como fotocatalisador (CESCONETTO, 2002). Além disso, o fenol pode ser também removido com eficiência utilizando processos que envolvem a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) e de foto-Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$) (KUNZ et al., 2002).

3.2.3. Biodegradação

Os fenóis podem também ser oxidados biologicamente. Entretanto, devido à elevada toxicidade do fenol aos micro-organismos, esse tipo de tratamento apenas é possível a baixas concentrações (HOSSEINI, ET AL., 2005). É comum observar a degradação biológica de fenóis em sistemas de lodos ativados implantados em siderurgia, onde os despejos fenólicos se originam da coqueria. Os fenóis são tóxicos ao homem, aos organismos aquáticos e aos micro-organismos que tomam parte nos sistemas de tratamento de esgotos sanitários e de efluentes industriais (HIDALGO, 2002).

Em sistemas de lodos ativados, concentrações de fenóis na faixa de 50 a 200 mg/L trazem inibição, sendo que 40 mg/L são suficientes para a inibição da nitrificação. Na digestão anaeróbia, 100 a 200 mg/L de fenóis também provocam inibição (CHEREMISSINOFF, 1996). Em um trabalho onde o reator biológico foi alimentado com cargas decrescentes de esgoto sanitário e com carga constante de efluente sintético em que o único tipo de substrato orgânico era o fenol puro, conseguiu-se ao final a estabilidade do reator alimentado somente com o efluente sintético contendo 1000 mg/L de fenol (VILLAS BÔAS, 1999). Além disso, as plantas biológicas demandam grandes valores de área devido à baixa velocidade de oxidação do fenol (LEE et al., 1996). A viabilidade desse processo pode ser atingida, aplicando-se reatores com

alta velocidade de degradação como os reatores aeróbios de biofilme (HOSSEINI et al., 2005).

3.3. Aplicação de enzimas oxidativas na remediação de estruturas fenólicas

3.3.1. Peroxidases

A *horseradisch peroxidase* (HRP) é uma peroxidase que catalisa a reação de oxidação de fenol e apresenta uma boa aplicação no tratamento de efluentes por manter sua atividade sob uma elevada faixa de valores de pH e temperatura (RUBIO et al., 2000). Enzimas peroxidases foram extraídas da raiz de tomateiros para a remoção de fenol em meio aquoso. As enzimas foram extraídas com tampão de ácido acético e a atividade foi avaliada com relação à oxidação do fenol por H₂O₂. Os resultados demonstram que a enzima atua com máximo de eficiência em uma faixa de pH variando de 5 a 9. A temperatura ótima de atividade se situou por volta de 40 °C (GONZÁLEZ et al., 2006).

Métodos que envolvem a utilização da enzima imobilizada e eletrodos foram também investigados como apresenta o trabalho de Kim e Moon, (2005). Em outros trabalhos, buscou-se estabelecer a relação entre a atividade da enzima livre e imobilizada. Os resultados obtidos demonstram que a enzima livre remove 20 % da cor de efluentes carregados com corantes aromáticos, enquanto imobilizada em CNBr-Sepharose a atividade aumenta em 2,7 vezes (FERRER et al., 1991). Em outro estudo, a combinação da enzima a quitosana, juntamente com o uso de peróxido de hidrogênio, apresentou resultados acima de 95 % com relação à remoção de clorofenóis (GANJIDUST, 1996).

3.3.2. Polifenoloxidasas

Polifenoloxidasas são enzimas oxi-redutases que catalisam a oxidação de compostos fenólicos. Extratos enzimáticos de brácteas de alcachofra apresentaram um elevado teor de polifenoloxidasas, também conhecidas como tirosinase. Os resultados demonstraram que é possível remover 90% de clorofenol em duas horas de reação. Além disso, o extrato enzimático apresentou uma boa estabilidade em uma faixa de pH de 3 a 9, sendo que a atividade máxima foi observada em pH 7 (LÓPEZ-MOLINA et al., 2003).

A enzima termoestável β -tirosinase, produzida a partir de *Symbiobacterium* sp., apresenta atividade máxima em condições de pH

por volta de 7,5 e temperatura de 55 °C. Para concentrações de fenol acima de 120 mmol.L⁻¹ foi observada inibição da enzima pelo substrato (LEE et al., 1996).

Uma remoção de 40% de fenol em solução aquosa foi obtida utilizando-se enzimas extraídas de *Pseudomonas* sp. e imobilizadas em membranas de ultrafiltração (BOHDZIEWSCZ, 1998).

3.3.3. Obtenção de peroxidases e fenoloxidasas

As enzimas fenoloxidase e peroxidase são encontradas em diversas fontes naturais como frutas, insetos, frutos do mar e em resíduos de celulose. Fenoloxidase foi obtida a partir da larva de *Pieris rapae*, o qual apresentou-se estável em pH entre 6,5 e 7,4 e temperatura abaixo de 37 °C. A partir de *Penaeus japonicus*, a enzima apresentou atividade máxima em pH 6,5 e temperatura de 35 °C (XUE et al., 2006). Mazzafera et al., (2002), extraíram polifenoloxidase do café. Robles e colaboradores, (2000), isolaram fenoloxidase produzida por *Chalara paradoxa* obtida de efluentes líquidos do processamento de oliva. Os resultados demonstram que o extrato enzimático apresenta atividade máxima em pH 6,5 e temperatura de 37 °C, sendo que em valores maiores que 50 °C a enzima perde atividade.

Alba et al., (1999), isolaram e caracterizaram fenoloxidasas e peroxidases do endocarpo de pêssegos. Foi observado que algumas substâncias como PVP inibem totalmente a atividade da enzima. Pérez, et al. (1993), purificaram e caracterizaram fenoloxidasas de Basidiomicetos PM1, micro-organismos que degradam lignina. Foi observado que a enzima perde rapidamente a atividade em temperaturas superiores a 60 °C. Cianeto de potássio inibe totalmente a atividade enzimática em concentrações acima de 10 mol.L⁻¹.

Bai e colaboradores, (1997), isolaram e caracterizaram fenoloxidasas da massa de ovos de moluscos *Biomphalaria glabrata*. O método de extração envolveu a homogenização dos ovos em tampão tris-HCl (pH 7,5), centrifugação a 4 °C e extração com sulfato de amônio. A purificação foi executada através de cromatografia, utilizando fenil-agarose como fase fixa e tampão tris-HCl como eluente.

Wichers e colaboradores, (1984), purificaram e determinaram as propriedades de fenoloxidase obtida de culturas de *Muconia pruriens*. O extrato enzimático foi purificado por cromatografia em coluna de Celite 535, eluída com tampão fosfato de sódio (pH 6,0). O pH de atividade máxima para essa enzima se situou por volta de 7,5.

No camarão, as enzimas fenoloxidasas são responsáveis pelo aparecimento da cor marrom no crustáceo. Essa enzima está relacionada com a biosíntese de melanina, que é um mecanismo de defesa contra micro-organismos invasores (LAMELA, 2005).

Marshall e colaboradores, 1987, investigaram as enzimas fenoloxidasas presentes no camarão branco (*Penaeus setiferus*). Foi observado que os maiores valores de atividade são obtidos em condições de pH e temperatura iguais a 7,5 e 40 °C, respectivamente. Acima de 50 °C as enzimas perdem totalmente sua atividade catalítica. Verifica-se que a extração de fenoloxidase com o uso de butanol seguido por cromatografia em coluna de fenil-sefaroze mostrou melhores resultados frente à extração com sulfato de amônio seguida de cromatografia.

Além disso, o camarão branco apresenta enzimas mais susceptíveis a inativação durante a purificação do que aquelas extraídas a partir do camarão rosado (MARSHAL, 1999).

3.4. Aplicação de lacases

3.4.1. Considerações gerais

Lacases (E.C. 1.10.3.2) são enzimas oxiredutases (pertencente ao grupo de polifenoloxidasas) capazes de oxidar compostos orgânicos (especialmente fenol, *o*-difenois, *p*-difenois, aminofenois, polifenois, poliaminas, ligninas e arildiaminas) e inorgânicos, utilizando oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, sendo esse composto reduzido e convertido em água (YAROLOV, 1994; DUCROS, et al., 1998). Podem ser conhecidas como benzenodiol oxigênio-oxiredutases ou *p*-difenol oxidasas (THURSTON, 1994; GIANFREDA et al., 1999).

Em função da grande variedade de substratos ao qual a mesma pode apresentar atividade catalítica, existe uma dificuldade em diferenciá-la de outras enzimas do grupo das polifenoloxidasas como tirosinases. Entretanto apenas as lacases possuem a habilidade de catalisar a oxidação da siringaldazina (THURSTON, 1994).

São encontradas na natureza em uma grande variedade de plantas, mais de 40 espécies de fungos e em algumas bactérias, sendo purificada e identificada em mais de 20 organismos diferentes. Em plantas podem ser identificadas em vegetais como maçã, batata, pêra (LEVINE, 1965). Em fungos, é encontrada com maior expressão em fungos Basidiomycetes do tipo podridão branca, sendo que a função das enzimas lacases para o fungo é contribuir para as diversas reações responsáveis pela degradação da madeira (THAKKER et al., 1992). Em

nível molecular, as lacases são glicoproteínas diméricas ou tetraméricas, que normalmente possuem quatro átomos de cobre por unidade monomérica, distribuída em três sítios de redução (GIANFREDA et al., 1999).

A maioria das lacases possui massa molecular na ordem de 60 a 80 kDa, com exceção de algumas enzimas produzidas por *Monocillium indicum*, *Agaricus bisporus* e *Aspergillus nidulans* que apresentam valores por volta de 100 kDa (THAKKER et al., 1992; LUISA et al., 1996). A maioria das lacases são proteínas extracelulares e normalmente as enzimas extraídas de fungos apresentam o ponto isoelétrico entre 3 e 7, enquanto as lacases de plantas apresentam esse parâmetro na vizinhança de 9.

O sítio catalítico das lacases (Figura 3.1) é formado por quatro átomos de cobre por unidade monomérica que podem ser distinguidos em três espécies por espectroscopia de ressonância eletroparamagnética (EPR) e UV/Visível (THURSTON, 1994; SUNDARAN, 1997). As três espécies de cobre envolvem:

- *tipo 1*: responsável pela cor azul da enzima e pela absorvância na região de 600 nm;
- *tipo 2*: não confere a coloração azul da molécula mas pode ser detectado por espectrofotometria; e
- *tipo 3*: que consiste em um par de átomos de cobre que apresenta uma fraca absorção na região do UV mas não pode ser detectado por EPR.

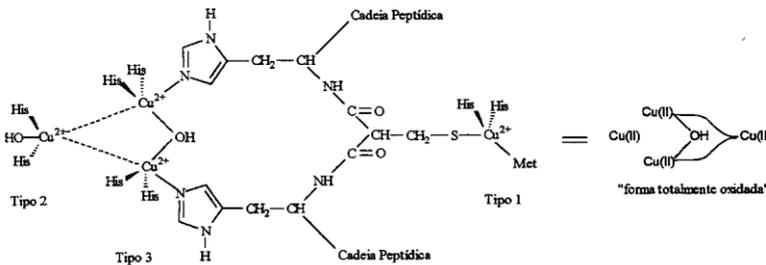


Figura 3.1 – Representação esquemática do sítio ativo da lacase (ROSA, 2004).

Os átomos de cobre do tipo 2 e 3 formam uma estrutura tri nuclear responsável pela ligação com o átomo de oxigênio, sendo essa estrutura coordenada por oito resíduos de histidina, enquanto que o cobre tipo 1 é responsável pela captura de elétrons e está coordenado por dois resíduos de histidina através de átomos de nitrogênio e um de

cisteína através de átomo de enxofre (COLE et al., 1990; DUCROS et al., 1998).

O ciclo catalítico das lacases envolve a participação de quatro compostos fenólicos (que serão os substratos a serem oxidados), quatro átomos de cobre ligados à enzima, com estado de oxidação +2 e uma molécula de oxigênio. As reações ocorrem de forma que o cobre tipo 1 recebe um elétron proveniente da oxidação de um composto fenólico. Ocorre um rearranjo interno onde elétrons são transferidos para outros átomos de cobre de maneira a manter o cobre tipo 1 com valência +2. Esse processo ocorre até que todos os átomos de cobre sofram redução, sendo necessária a transferência dos quatro elétrons recebidos para o oxigênio molecular se reduzir até água, recondicionando assim os átomos de cobre para um novo ciclo de reações (Figura 3.2).

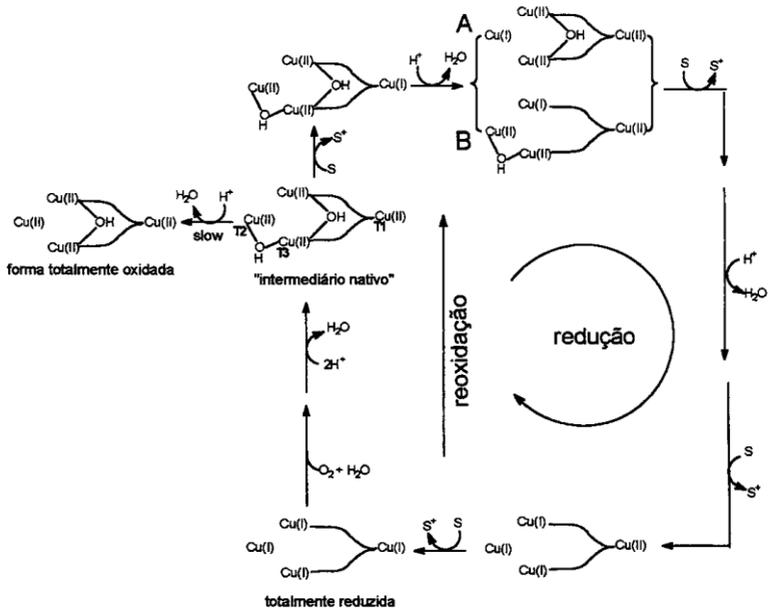


Figura 3.2 - Ciclo catalítico da lacase. Na Figura, S é um substrato na sua forma reduzida e S⁺ é um substrato na sua forma oxidada; T1, T2 e T3 representam as espécies de cobre tipo 1, 2 e 3, respectivamente (ROSA, 2004).

Em geral o pH ótimo para a atividade das lacases é baixo, muito embora algumas lacases apresentem atividade máxima em pH próximo de 9 quando são extraídas de plantas e atuam em reações que envolvem fenol como substrato. Com relação à inibição, alguns grupos como azida, tiocianida e fluoreto podem interagir com os centros ativos da enzima e prejudicar a sua atividade. Além disso, agentes complexantes podem remover íons cobre, fundamentais para a estrutura e atividade da enzima. Compostos como ácidos graxos, detergentes catiônicos de amônia quaternária, íons metálicos e hidroxiglicina podem atuar como inibidores de lacases (DUCROS et al., 1998).

As aplicações das lacases na indústria são variadas, recebendo destaque o seu uso em atividades ligadas às áreas: têxtil, alimentos, síntese orgânica, papel e celulose, biosensores e remediação de solos contaminados. Na indústria têxtil sua aplicação é relacionada ao alvejamento de tecidos, de forma que em 1996 a Novozymes lançou a primeira lacase de uso industrial destinada a essa finalidade recebendo o nome comercial de DeniLite® (SETTI et al., 1999).

No processamento de alimentos as lacases são utilizadas para melhorar ou modificar a aparência de alimentos ou bebidas. Alguns trabalhos demonstraram que compostos fenólicos indesejáveis que causam cor marrom podem ser eliminados por ação oxidativa de enzimas lacases (MINUSSI et al., 2002).

Em se tratando de processos de papel e celulose, a aplicação de tecnologia enzimática na separação e degradação da lignina da polpa da madeira torna o processo mais atrativo sob o ponto de vista ambiental, reduzindo o uso de substâncias tóxicas baseadas em compostos com cloro (KUHAD et al., 1997). O alvejamento biológico da polpa de madeira tem sido estudado em trabalhos realizados com lacases e manganês-peroxidases em conjunto (BOURBONNAIS et al., 1997).

Existem, ainda, estudos envolvendo a sua utilização na construção de biosensores para aplicações em análises clínicas e análises ambientais. Devido ao seu mecanismo de catálise, pode ser aplicada na detecção de vários compostos fenólicos, oxigênio ou azidas (HAGHIGHI et al., 2003; KUZNETSOV et al., 2001).

Por fim, outras aplicações para essa enzima estão relacionadas à remediação de solos contaminados por HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), oriundos do impacto ambiental causado pelo derramamento de óleo e o transporte de combustíveis fósseis (DURÁN et al., 2000).

3.4.2. Aplicação de lacases no tratamento de efluentes

As aplicações de lacases no tratamento de efluentes envolvem a sua participação na remoção de compostos xenobióticos aromáticos de difícil biodegradação, descoloração de clorofenóis, clivagem de anéis aromáticos, mineralização de HPAs, descoloração de efluentes têxteis e de papel e celulose (DURÁN et al., 2000) e a polimerização de compostos fenólicos em substâncias insolúveis que possam ser removidas por processos de floculação/sedimentação ou filtração (ROPER et al., 1995). Na Tabela 2.1 encontram-se listados alguns exemplos de trabalhos desenvolvidos com a aplicação de lacases.

Tabela 3.1 - Exemplos de trabalhos realizados, aplicando lacases na remediação de contaminantes diversos.

(continua)

Fonte de lacase	Natureza do contaminante	Tipo de efluente	Referências
<i>Aspergillus sp.</i>	Polifenóis	Papel e celulose	(VILLELA; SOARES, 2005)
<i>Cerrena unicolor</i>	Pigmentos	Têxtil	(MICHNIEWICZ et al., 2003)
<i>Lentinula edodes</i>	2,4,5-triclorofenol Fenóis totais	Sintético Oliva	(CHO et al., 1999) (D'ANNIBALE et al., 1999)
<i>Panus tigrinus</i>	Fenol, cor e DQO	Oliva	(D'ANNIBALE et al., 2004)
	Fenóis totais	Oliva	(AGGELIS et al., 2003)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Remazol blue	Têxtil	(PALMIERI et al., 2005)
	Fenóis totais	Sintético	(HUBLIK e SCHINNER,2000)
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Fenóis totais	Papel e celulose	(MUNARI et al., 2003)
	Pigmentos	Têxtil	(CHAGAS e DURRANTE, 2001)
<i>Pleurotus spp.</i>	Fenóis totais	Oliva	(TSIOUPLAS et al., 2002)
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Compostos aromáticos	Oliva	(JAOUANI et al., 2005)

3. Revisão Bibliográfica

Tabela 3.1 - Exemplos de trabalhos realizados, aplicando lacases na remediação de contaminantes diversos.

(concluído)

Fonte de lacase	Natureza do contaminante	Tipo de efluente	Referências
<i>Trametes hirsuta</i>	Pigmentos	Couro	(RODRÍGUEZ et al., 2004)
<i>Trametes versicolor</i>	Compostos aromáticos	Oliva	(LUCAS et al., 2003)
	Antraceno e benopireno	Sintético	(COLLINS et al., 1996)
	PAH's	Sintético	(MAJCHERCZY et al., 1998)
	Pigmentos	Têxtil	(PERALTA-ZAMORA et al., 2003)
<i>Thichophyton sp.</i>	pentaclorofenol	Sintético	(JUNG et al., 2003)

Pelo considerável número de trabalhos apresentados é possível perceber que os estudos envolvendo a aplicação de lacases no tratamento de efluentes com elevados teores de compostos fenólicos, bem como o estudo de novas fontes de obtenção e metodologias de extração e imobilização da enzima são objetos de estudo bastante relevantes.

3.4.3. Imobilização de lacases

As enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante o uso. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de protegê-las da interação com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, novas técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer a estabilidade das enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização, através de métodos de inclusão e ligação química (SCHMIDELL et al., 2001).

O custo elevado dos processos de extração e purificação das macromoléculas enzimáticas e sua grande instabilidade em solução são obstáculos à recuperação do biocatalisador, após a utilização. Por isso, a

maioria das operações industriais é feita de maneira descontínua, por bateladas, com a renovação da enzima no início de cada ciclo. A imobilização sobre suporte insolúvel que é acompanhado, frequentemente, de um aumento da estabilidade da enzima, facilita o emprego de reatores contínuos, funcionando por longos períodos, sem renovação do catalisador (SCRIBAN, 1985; WISEMAN, 1985).

Os principais métodos para imobilização de enzimas encontram-se destacados na Figura 3.3. O método adequado deve ser tal que as propriedades do catalisador não sejam prejudicadas devido à imobilização. Essas propriedades se referem à estrutura terciária, em particular, com relação ao seu sítio ativo. Além disso, para ser efetivo na imobilização o suporte deve deixar a enzima acessível aos substratos, manter sua atividade por um longo período e permitir que o sistema (suporte/enzima) seja regenerado ao final do processo, sem que ocorram perdas na atividade enzimática (SCRIBAN, 1985; FABER, 2000).

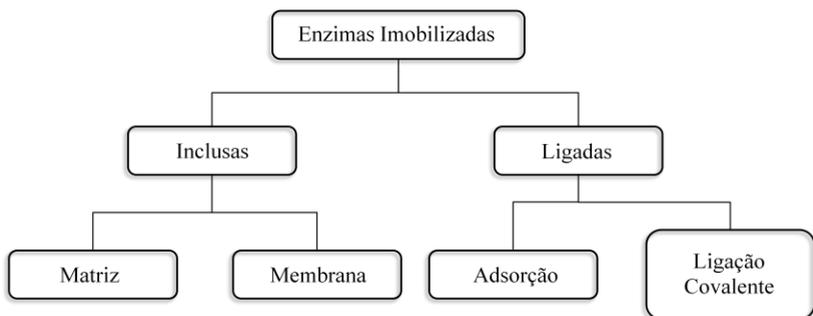


Figura 3.3 - Principais métodos de imobilização de enzimas (SCRIBAN, 1985).

A imobilização de uma enzima por meio de ligação química entre o suporte e a enzima pode ocorrer por ligação covalente. Nesse método, uma reação química cria uma ligação irreversível entre a molécula enzimática e os grupos reativos do suporte (SCRIBAN, 1985). Esse método, embora apresente uma tendência em reduzir a atividade da enzima de maneira a modificar a sua estrutura tridimensional nativa, confere uma elevada estabilidade ao sistema enzima-suporte. Em alguns casos é possível ocorrer uma modificação na estabilidade da enzima em função da sua imobilização. Embora ocorra uma diminuição na atividade da enzima em função da sua imobilização por ligação covalente, a significativa estabilidade conferida ao biocatalisador torna

esse método bastante atrativo (SHULER, et al., 2002). A Tabela 3.2 apresenta os principais grupos funcionais responsáveis pela fixação da enzima em suportes.

Tabela 3.2 - Principais grupos funcionais responsáveis pela formação de ligação covalente entre enzima e suporte.

Função Orgânica	Grupamento Funcional
Função Amida	N terminal
	NH ₂ (Lisina)
Função carboxílica	COOH (ácido aspártico)
	COOH (ácido glutâmico)
	COOH terminal
Função Tiol	SH (cisteína)
Núcleo fenólico	Tirosina
Núcleo imidazol	Histidina
Função hidroxila	OH serina, treonina

Fonte: Scriban (1985)

Os agentes multifuncionais mais empregados para a formação da ligação covalente (cruzada) entre enzima e suporte são: glutaraldeído, alginato, carbodiimida (EDC) e g-aminopropiltriétoxissilano (g-APTS). Com relação à imobilização de lacases, diversos suportes vêm sendo empregados para imobilização, recebendo destaque: vidro poroso, gel de alginato, gel de poliacrilamida, vitro-cerâmicos, grafite, alumina, membrana de nylon, membrana de teflon, poliuretano, platina, quitina, quitosana, entre outros (DURÁN et al., 2002).

A quitosana é um polissacarídeo que pode ser obtido por desacetilação da quitina, biopolímero que perde apenas para a celulose em termos de disponibilidade na natureza (PETER, 1995). Em termos de estrutura, a quitosana pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2desoxi-D-glicopiranoose (Figura 3.4) de composição variável em função do grau residual de acetilação e polimerização. Em geral, denomina-se quitosana o biopolímero obtido por desacetilação de pelo menos 60% dos grupos encontrados na quitina. Em função disso, quitosana e quitina apresentam solubilidades diferentes, sendo a quitosana solúvel em soluções aquosas de ácidos (orgânicos e inorgânicos), enquanto a quitina apresenta-se como insolúvel em uma ampla variedade de solventes (GOY et al., 2004) .

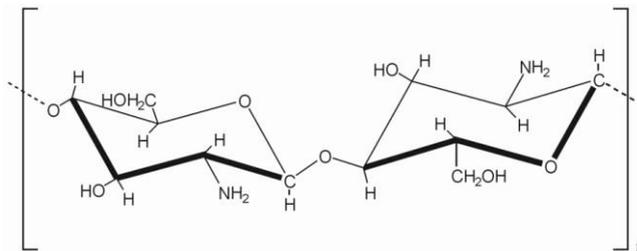


Figura 3.4 - Representação da fórmula estrutural da quitosana (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

A produção industrial de quitosana é crescente, sendo que alguns fatores contribuem para esse fato como a abundância de matéria-prima, principalmente o aproveitamento de resíduos de baixo custo e o volume de trabalhos acadêmicos e aplicados que evidenciam as possibilidades de uso da quitosana para diversos fins.

Alguns trabalhos envolvem a aplicação de quitosana na imobilização de enzimas lacases por ligação cruzada. Villela e Soares (2005), estudaram a imobilização de lacases de *Aspergillus* sp. e sua aplicação no tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose, obtendo remoção por volta de 65 % de compostos fenólicos presentes no efluente. Lacases de *Lentinula edodes* também foram imobilizadas em quitosana e apresentaram remoção de até 100 % de algumas espécies fenólicas após um tempo de incubação de 24 horas (D'ANNIBALE et al., 1999). Lacase de *Coriolus versicolor* imobilizada foi aplicada na remoção de 2,4-diclorofenol em solução aquosa. Os resultados demonstram que após a imobilização as condições otimizadas de atividade enzimática foram de pH próximo a 5,5 e temperatura na faixa de 35 a 45 °C. Após seis ciclos de reação em batelada o catalisador manteve por volta de 50 % da atividade observada inicialmente (ZHANG et al., 2009).

Araújo e colaboradores (2005), estudaram a imobilização de lacases obtidas de diversas fontes: *Pleurotus ostreatus*, *Botryosphaeria* sp., e *Aspergillus* sp.. Os resultados apontaram que a lacase proveniente de *Botryosphaeria* sp. apresentou a maior atividade entre todas as enzimas testadas. Lu, et al. (2007), imobilizaram lacases em sistema alginato-quitosana para remoção de cor em efluente têxtil. A melhor condição para imobilização envolveu a seguinte composição: (2% alginato de sódio, 2 % CaCl₂, 0,3 % quitosana e razão volumétrica de enzima em relação ao alginato 1:8. Após três ciclos de batelada o

3. Revisão Bibliográfica

sistema enzima suporte apresentava um residual de atividade de 35,73 % em relação ao valor observado inicialmente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Enzima

A enzima utilizada neste trabalho foi a lacase de *Aspergillus* sp., comercializada em sua forma livre pela Novozymes com o nome de DeniliteTM.

4.2. Reagentes

Além da enzima, foram utilizados os seguintes reagentes: quitosana, siringaldazina, 4 – aminoantipirina e persulfato de sódio (Sigma – aldrich); 2,6 – dimetoxifenol, *o* – cresol, *m* – cresol, *p* – cresol, *o* – etilfenol, *p* – etilfenol, 2 – isopropilfenol, 2,3,5 – trimetilfenol, ácido *p*-hidroxibenzoico, 4 – nitrofenol, 2,3-xilenol, 2,4-xilenol, 2,5 – xilenol, 2,6 – xilenol, 3,4 – xilenol, 3,5-xilenol e cloreto de amônio (Merck); fosfato de potássio, tartarato de sódio, ácido tartárico e ácido acético (Vetec); hidróxido de amônio, solução de glutaraldeído 25%, fenol e hidróxido de sódio (Nuclear).

4.3. Material

Os equipamentos empregados encontram-se listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Lista de equipamentos utilizados no trabalho.

Equipamentos	Marca/Modelo
pHmetro	Hanna
Banho-maria tipo Dubnoff	Nova Técnica
Banho-maria com recirculação externa	Fanem
Espectrofotômetro UV-Vis	Varian/Carry 300
Espectrofotômetro UV-Vis	Femto
Bomba peristáltica	Digimed

Todos os equipamentos apresentados foram calibrados segundo metodologias específicas sugerida pelos fabricantes.

4.4. Otimização do processo de imobilização

4.4.1. Caracterização da quitosana

A quitosana utilizada neste estudo foi caracterizada em termos de grau de desacetilação. Para este estudo foi realizada a quantificação dos grupamentos amino presentes na estrutura da quitosana utilizando a técnica de titulação potenciométrica. Para isso foi utilizada uma solução de 0,2 g de quitosana diluída em 20 mL de ácido clorídrico 0,3 mol.L⁻¹ e 200 mL de água destilada. Essa solução foi titulada com outra solução contendo NaOH 0,2 mol.L⁻¹. Foram adicionadas alíquotas de 0,5 mL da solução titulante até seu volume final de 80 mL. A conversão dos grupamentos amino foi calculada de acordo com a Equação 4.1:

$$X = \frac{[NaOH] \cdot (V' - V) \cdot MM}{W} \quad (4.1)$$

onde:

X = grau de desacetilação,

V = volume de NaOH correspondente à neutralização do excesso de HCl na solução (mL),

V' = volume de NaOH correspondente à neutralização dos grupamentos amino presentes no polímero (mL),

$[NaOH]$ = concentração da solução de NaOH (mol.L⁻¹),

W = massa da amostra de quitosana em mg,

MM = 161 g.mol⁻¹ corresponde à massa equivalente a um monômero do polímero (BROUSSIGNAC, 1972).

4.4.2. Obtenção das cápsulas de quitosana

As cápsulas de quitosana foram preparadas dissolvendo a quitosana (0,50g) em 40 mL de solução de ácido acético 5% (m/v). O gel formado foi gotejado com bomba peristáltica em solução de NaOH 2 mol.L⁻¹, utilizado como banho para precipitação das cápsulas (Figura 4.1). Essas permaneceram em solução por 12 horas (VILLELA, 2006). Em seguida as cápsulas foram separadas e lavadas com água deionizada até a água de lavagem apresentar pH próximo de 8 e posteriormente foram colocadas em solução de glutaraldeído (0,5 a 5 %) para entrecruzamento.

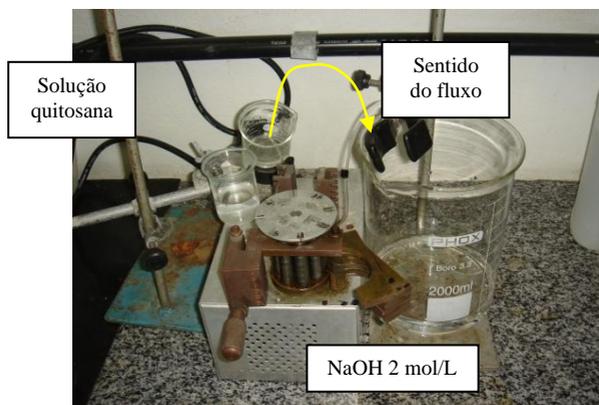


Figura 4.1 - Processo de gotejamento da solução de quitosana em solução de hidróxido de sódio 2 mol.L^{-1} , através de uma bomba peristáltica.

4.4.3. Imobilização da lacase nas cápsulas de quitosana

As cápsulas de quitosana foram lavadas com água deionizada para remoção total do aldeído em excesso. Esse processo foi conduzido até a água de lavagem apresentar teste negativo com aplicação de reagente de Feder (MORITA; ASSUMPCÃO, 1995), que avalia qualitativamente a presença de aldeído em solução aquosa.

Após essa etapa, as cápsulas foram mergulhadas em solução enzimática em diferentes concentrações de enzima (de 1 a 10 g.L^{-1}) e condições de pH (de $3,5$ a $8,0$). Os fatores concentração de glutaraldeído utilizado para promover o entrecruzamento, tempo, pH e concentração de enzima no processo de imobilização foram avaliados em relação à sua influência sobre a atividade enzimática total conferida ao biocatalisador obtido. A combinação dos fatores foi definida através de um planejamento de experimentos do tipo delineamento central composto rotacional, com repetição do ponto central (DCCR). O resultado do planejamento está apresentado na Tabela 4.2. As diversas etapas apresentadas até então podem ser visualizadas de forma esquemática na Figura 4.2.

4. Material e Métodos

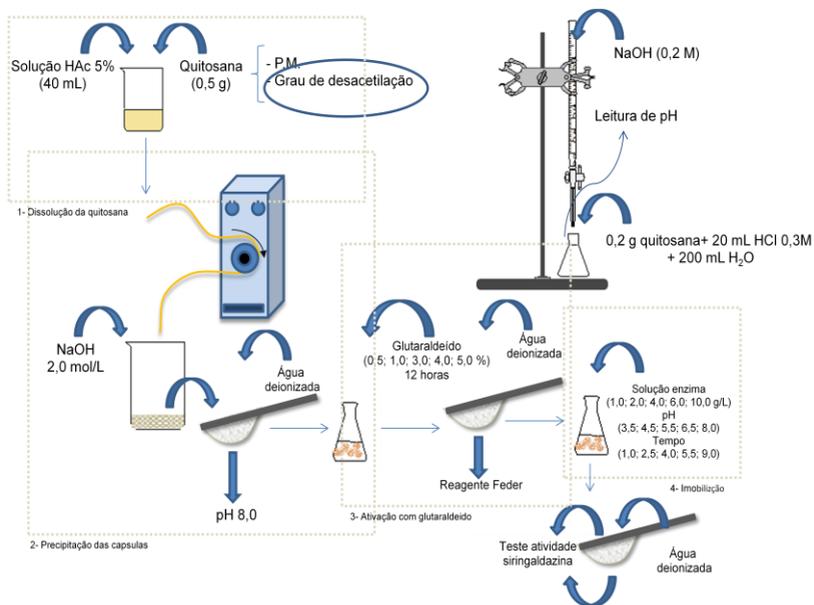


Figura 4.2 – Etapas envolvidas no processo de formação das cápsulas do biocatalisador: 1- dissolução da quitosana, 2-precipitação, 3-ativação com glutaraldeído e 4-imobilização.

Tabela 4.2 – Tabela apresentando os experimentos delineados pela combinação entre os níveis dos diversos fatores envolvidos no processo de imobilização da Lacase em quitosana.

(continua)

Teste	pH	Concentração de glutaraldeído.(%)	Tempo (h)	Concentração de enzimas (g.L ⁻¹)
1	4	1	2,5	2
2	4	1	2,5	6
3	4	1	5,5	2
4	4	1	5,5	6
5	6,5	1	2,5	2
6	6,5	1	2,5	6
7	6,5	1	5,5	2
8	6,5	1	5,5	6

4. Material e Métodos

Tabela 4.2 – Tabela apresentando os experimentos delineados pela combinação entre os níveis dos diversos fatores envolvidos no processo de imobilização da Lacase em quitosana.

(concluído)

Teste	pH	Concentração de glutaraldeído (%)	Tempo (h)	Concentração de enzimas (g.L ⁻¹)
9	4	4	2,5	2
10	4	4	2,5	6
11	4	4	5,5	2
12	4	4	5,5	6
13	6,5	4	2,5	2
14	6,5	4	2,5	6
15	6,5	4	5,5	2
16	6,5	4	5,5	6
17	5,5	0,5	4	4
18	5,5	5	4	4
19	3,5	3	4	4
20	8	3	4	4
21	5,5	3	1	4
22	5,5	3	9	4
23	5,5	3	4	1
24	5,5	3	4	10
25	5,5	3	4	4
*36	5,5	3	4	4

*Do experimento 25 ao 36, os níveis dos fatores foram mantidos constantes.

4.4.4. Medida da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada a partir da reação característica com reagente siringaldazina. Este método se baseia na oxidação de siringaldazina para sua forma quinona, que apresenta absorção a 525 nm ($\epsilon = 65 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os dados foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro UV-Vis da VARIAN, modelo Carry 300. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima imobilizada/livre necessária para oxidar $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de substrato por minuto.

4.4.5. Caracterização do biocatalisador obtido

Para caracterização das cápsulas de quitosana contendo a enzima imobilizada foi determinada a sua massa específica e o diâmetro médio.

A massa específica foi medida com o auxílio de um picnômetro de 25 mL, apresentando uma massa m_1 . Para esse ensaio foram utilizadas 10 cápsulas contendo a enzima imobilizada, que foram previamente pesadas (m_2). Ao picnômetro foram adicionadas as cápsulas e em seguida água em quantidade até ocupar o volume total do dispositivo. A massa total do conjunto picnômetro, cápsulas e água foram medidas (m_3). O experimento foi realizado em triplicata. Dessa forma a massa específica das cápsulas de quitosana pode ser determinada pela Equação 4.2. Para este estudo foi utilizada uma balança com precisão de 0,0001 g.

$$\rho = \frac{m_2}{[V - (m_3 - m_1 - m_2)\rho_{H_2O}]} \quad (4.2)$$

onde:

- ρ : massa específica da cápsula com enzima em $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$,
- m_1 : massa do picnômetro (g),
- m_2 : massa das cápsulas de quitosana com enzima (g),
- m_3 : massa total do conjunto picnômetro, cápsulas e água (g),
- V : volume do sistema 25 mL.
- ρ_{H_2O} : massa específica da água em $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$

Com relação ao diâmetro médio, foi utilizado um paquímetro para medida do diâmetro de 10 cápsulas obtidas após o processo de

imobilização. O valor médio foi determinado com base nas 10 medições.

4.5. Avaliação da influência do tempo de estocagem do biocatalisador

Para avaliação do tempo de estocagem do biocatalisador foram realizadas medidas da sua atividade enzimática total ao longo do tempo (1 a 30 dias). Os resultados obtidos representam a cinética de perda de atividade da enzima, devido à sua exposição sob diferentes condições de pH (4,0, 7,0 e 8,0) e temperatura (8, 23 e 40 °C).

Experimentalmente, 50 cápsulas com enzimas imobilizadas foram adicionadas em 50 mL de água deionizada/solução tampão, produzidas de acordo com a condição otimizada selecionada após a realização das etapas descritas na seção 4.2.3. As condições de estocagem aplicadas no estudo estão apresentadas na Tabela 4.3. Os sistemas foram mantidos em repouso.

Tabela 4.3 – Condições de temperatura e pH aplicadas para avaliação da estabilidade da enzima. Em cada condição foram adicionadas 50 cápsulas em 50 mL de meio líquido.

(continua)

Condições		Temperatura média (°C)
Estocagem a seco	Ambiente	23
	Geladeira	8
Água deionizada	Ambiente	23
	Geladeira	8,5
	Banho	40
Solução tampão tartarato pH = 4,0	Ambiente	23
	Geladeira	8
	Banho	40

4. Material e Métodos

Tabela 4.3 – Condições de temperatura e pH aplicadas para avaliação da estabilidade da enzima. Em cada condição foram adicionadas 50 cápsulas em 50 mL de meio líquido.

(concluído)

Condições		Temperatura média (°C)
Solução tampão fosfato pH = 8,0	Ambiente	23
	Geladeira	8,5
	Banho	40

O acompanhamento da atividade enzimática total do biocatalisador foi realizado por até 30 dias, enquanto o mesmo ainda apresentava atividade enzimática. Para a primeira semana a avaliação foi diária e após esse período o ensaio foi efetuado a cada dois dias.

Os dados obtidos foram transformados em curvas de atividade enzimática total ao longo do tempo. Em outras palavras, foi expressa a concentração de enzima nativa restante no sistema enzima-suporte após determinado tempo de estocagem. Foi ajustado um modelo cinético de 1ª ordem, conforme Equação 4.3, para relacionar a atividade enzimática residual no biocatalisador em função do tempo de estocagem.



$$\frac{d[N]}{dt} = -K_d([N] - [N_{min}]) \quad (4.3)$$

Onde:

N = enzima nativa,

D = enzima desnaturada,

$[N]$ = concentração de enzima nativa (U.g⁻¹),

$[N_{min}]$ = concentração de enzima nativa no equilíbrio (U.g⁻¹),

K_d = constantes de desnaturação (h⁻¹).

Através do valor da constante cinética, foi possível ainda determinar o tempo de meia-vida da atividade do biocatalisador, avaliada pela Equação 4.4.

$$t_{1/2} = -\frac{0,693}{K_d} \quad (4.4)$$

Onde:

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida (dia).

4.6. Aplicações na bioconversão de diferentes derivados fenólicos em regime batelada.

4.6.1. Experimentos de bioconversão de derivados fenólicos mediados pela lacase imobilizada

Diferentes derivados fenólicos de baixa massa molecular foram submetidos à bioconversão enzimática utilizando a lacase imobilizada em quitosana. Para esses ensaios foram incubadas 15 cápsulas (com atividade enzimática total de aproximadamente 30 U) em 5 mL de solução contendo 10 mg.L⁻¹ de cada substrato apresentado na Tabela 4.4. As reações foram realizadas em banho-Maria nas temperaturas de 20, 30 e 40 °C. A eficiência de bioconversão foi avaliada em função da relação entre concentração de fenóis de baixa massa molecular na solução original e após 24 horas de incubação. Para verificar o efeito de adsorção do substrato pelas cápsulas de quitosana, foram misturados 15 cápsulas de quitosana entrecruzada, sem a ligação de enzimas a sua superfície com 5 mL de solução 10 ppm dos derivados fenólicos apresentados na Tabela 4.6. Dessa forma, a eficiência de remoção de compostos fenólicos por adsorção (%) foi avaliada em função da quantidade de derivado fenólico adsorvido ($C_{final} - C_{inicial}$) em relação à quantidade inicial submetida ao processo de adsorção ($C_{inicial}$). Esse experimento foi realizado para as várias temperaturas estudadas.

$$\% = \frac{C_{final} - C_{inicial}}{C_{inicial}} \cdot 100$$

4. Material e Métodos

Tabela 4.4- Compostos utilizados para avaliação da capacidade de bioconversão de compostos fenólicos de baixa massa molecular.

(continua)

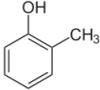
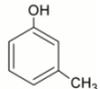
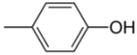
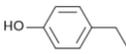
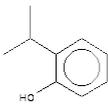
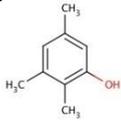
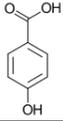
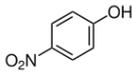
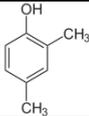
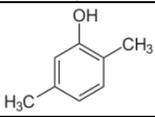
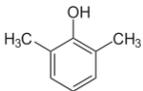
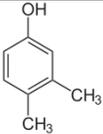
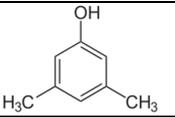
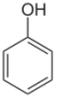
Nome	Fórmula
o-cresol	
m-cresol	
p-cresol	
o-etilfenol	
p-etilfenol	
2-isopropilfenol	
2,3,5 - trimetilfenol	
Ácido p-hidroxibenzóico	
4-nitrofenol	

Tabela 4.4 - Compostos utilizados para avaliação da capacidade de bioconversão de compostos fenólicos de baixa massa molecular.
(concluído)

Nome	Fórmula
2,3-xilenol	
2,4-xilenol	
2,5 - xilenol	
2,6 - xilenol	
3,4 - xilenol	
3,5-xilenol	
Fenol	

4.6.2. Determinação da concentração de fenóis de baixa massa molecular.

Para determinação da concentração de fenóis de baixa massa molecular foi aplicado o método colorimétrico com 4-aminoantipirina, (APHA, 2005). Para análise, foram tomados 1000 µL de amostra e

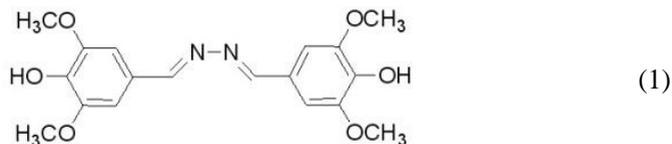
adicionados 200 μL de solução tampão amônia pH 10,0, 200 μL de solução persulfato de sódio (5% m/v) e 200 μL de solução de 4-aminoantipirina (2% m/v). O acompanhamento da reação da 4-aminoantipirina com estruturas fenólicas oxidadas com persulfato de sódio foi realizado a 504 nm.

4.7. Estudo cinético da bioconversão de compostos fenólicos em reator batelada.

Para avaliação cinética da bioconversão de compostos fenólicos utilizando a lacase imobilizada em quitosana, foram utilizados dois substratos padrão, a siringaldazina e o 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP). Esses compostos, quando oxidados, liberam produtos que podem ter suas concentrações medidas por espectroscopia na região do visível (525 nm e 470 nm, respectivamente). Alguns trabalhos citam a utilização desses compostos para medida da atividade catalítica de enzimas lacases (HARKIN; OBST, 1973; JOHANNES; MAJCHEREZCYK, 2000).

4.7.1. Avaliação da cinética de bioconversão utilizando siringaldazina.

A lacase imobilizada foi aplicada na oxidação da siringaldazina (1). Foi medida a velocidade inicial da reação, sob diferentes condições de temperatura (20, 30 e 40 $^{\circ}\text{C}$), concentração de enzima de (1,6, 3,2 e 4,8 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), equivalente a 4, 8 e 16 cápsulas em 5 mL, e de concentração de substrato (1,6; 3,2; 6,5; 13,0; 20,0; 25,0 e 38 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).



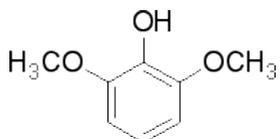
O acompanhamento da reação foi realizado através de espectrofotometria UV-Vis, na região de 525 nm. Para os ensaios foram utilizados vials de 10,0 mL, no qual foram adicionados 5,0 mL de solução tampão de tartarato pH 4,0, o sistema enzima-suporte e um volume equivalente de solução alcoólica contendo o substrato, em valor conforme as concentrações citadas anteriormente. O sistema ficou em

agitação orbital constante em banho-Maria do tipo Dubnoff. Ao final de 5,0 minutos, 1,0 mL de amostra foi coletada para análise. A variação da absorvância neste intervalo de tempo representou a velocidade inicial da reação, que foi convertida em variação da quantidade de substrato/tempo aplicando-se o fator de extinção, ϵ , 65 mmol.L^{-1} para a siringaldazina (HARKIN; OBST, 1973).

A seleção do pH 4,0 foi definida em função de estudos anteriores (VILLELA, 2006), nos quais se verificou que para esse valor de pH ocorre a maior velocidade da reação de oxidação utilizando a siringaldazina como substrato da enzima lacase imobilizada em quitosana como catalisador.

4.7.2. Avaliação da cinética de bioconversão utilizando 2,6 – dimetoxifenol (2,6 – DMP).

Para as reações utilizando o 2,6 – DMP (2), as concentrações de substratos aplicadas foram: 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 15,0 mg.L^{-1} , o equivalente a 6,2; 15,6; 31,2; 62,5 e 93,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Para os ensaios foram utilizados vials de 10,0 mL, no qual foram adicionados 5,0 mL de solução tampão tartarato pH 5,0, o sistema enzima-suporte e um volume equivalente de solução alcoólica contendo o substrato, em valor conforme as concentrações citadas anteriormente. Esse valor de pH foi determinado em função da maior atividade da enzima imobilizada, utilizando este composto como substrato. O sistema ficou em agitação orbital constante em banho-Maria do tipo Dubnoff. Ao final de 5,0 minutos, 1,0 mL de amostra foi coletada para análise. As concentrações de enzima utilizadas foram 2, 4 e 6 U.mL^{-1} , equivalentes a 5, 10 e 15 cápsulas adicionadas em 5,0 mL de meio reacional. O acompanhamento do produto gerado foi realizado em 470 nm. Para expressão dos dados em concentração molar, foi utilizado um fator de extinção igual a 49,6 mmol.L^{-1} (JOHANNES; MAJCHEREZCYK, 2000).



(2)

4.7.3. Ajuste de modelos cinéticos.

Para correlacionar matematicamente a influência da concentração de substratos na velocidade inicial da reação, foi utilizada o modelo cinético para enzimas de Michaelis e Menten (Equação 4.5).

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S] + K_M} \quad (4.5)$$

Onde:

- v : Velocidade da reação em $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.
- v_{max} : Velocidade da reação em condição de saturação de substrato $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.
- K_M : Constante de Michaelis e Menten em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.
- $[S]$: Concentração de substrato em $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

O ajuste do modelo foi realizado através do Software STATISTICA 7, utilizando a função de ajuste de modelos não lineares do tipo Gauss-Newton através do método dos mínimos quadrados.

4.7.4. Avaliação da estabilidade operacional frente a vários ciclos oxidativos

Para avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador obtido, foram realizadas repetidas bateladas com as condições apresentadas no item anterior. Entre cada reação, as cápsulas foram lavadas com água deionizada e novamente incubadas em solução reagente. Foi realizado um número de oito ciclos oxidativos. A capacidade de reutilização do biocatalisador foi avaliada pela medida da velocidade inicial da reação ao final de cada batelada.

4.8. Estudo da estabilidade do biocatalisador aplicado em reator contínuo de leito fixo.

4.8.1. Experimentos em reator contínuo

Para avaliação da estabilidade operacional da enzima em fluxo contínuo, foi montado um reator de vidro com diâmetro de 8 mm e altura de 200 mm. O mesmo foi empacotado com três quantidades diferentes de biocatalisadores (sistema enzima+suporte), 0,5, 1,0 e 2,0 g,

4. Material e Métodos

equivalente a atividades enzimáticas medidas com siringaldazina, de aproximadamente 50, 100 e 200 U, respectivamente. O reator possui uma camisa por onde foi circulada água para aquecimento, condicionando o processo em três temperaturas de trabalho diferentes: 20, 30 e 40 °C (Figura 4.3).



Figura 4.3- Imagem do sistema empregado para estudo da aplicação da lacase imobilizada em reator contínuo de leito fixo.

Foram utilizados dois substratos padrões para o estudo, siringaldazina e 2,6-DMP. O primeiro substrato foi alimentado juntamente com solução tampão tartarato pH 4,0 e o segundo com tampão tartarato pH 5,0. Em ambos os casos na alimentação a concentração de substrato foi mantida em 10 ppm. A solução de alimentação foi mantida constante e igual a 50 mL.h⁻¹. A formação de produto de oxidação foi acompanhada em 525 nm, no caso da siringaldazina, e em 470 nm, para o 2,6-DMP. Um diagrama esquemático representando o sistema apresentado pode ser visualizado na Figura 4.4.

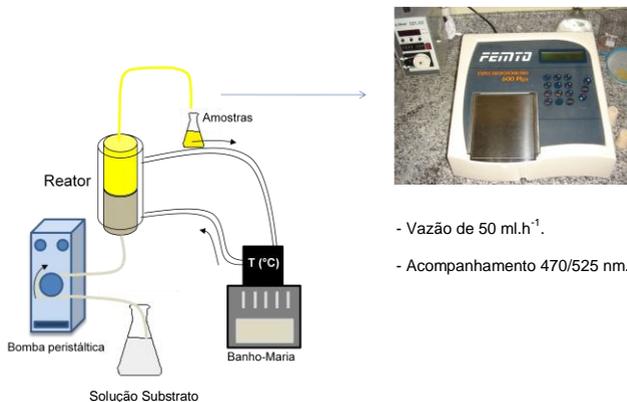


Figura 4.4 - Diagrama esquemático apresentando os dispositivos empregados na avaliação da bioconversão de compostos fenólicos em reator contínuo com lacase imobilizada.

4.8.2. Ajuste de modelo de perda de atividade do biocatalisador

Com o objetivo de representar matematicamente o comportamento da perda de atividade da enzima com o tempo, foi ajustado o modelo proposto por Sadana (1980), que descreve a desativação de enzimas imobilizadas ao longo do tempo. Segundo esse modelo, devido à complexidade da molécula de enzima a constante de perda de atividade apresentada na seção 4.3 assume vários valores durante o curso da reação, podendo diminuir ou aumentar ao longo do tempo. Dessa forma, para enzimas imobilizadas ela tende a diminuir com o tempo. O modelo proposto se encontra ilustrado a seguir (Equação 4.6).

$$a = 1 - \frac{1}{2} k_d t^2 \quad (4.6)$$

Onde:

a = fração de enzima nativa.

k_d = constante de desativação do modelo de Sadana (h⁻¹).

Sendo o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do biocatalisador representado pela Equação 4.7.

$$t_{1/2} = \sqrt{\frac{1}{k_d}} \quad (4.7)$$

O ajuste do modelo foi realizado através do Software STATISTICA 7, utilizando a função de ajuste de modelos não lineares do tipo Gauss-Newton através do método dos mínimos quadrados.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização da quitosana

A quitosana utilizada no estudo foi caracterizada através da medida do grau de desacetilação. Visando maximizar a reprodutibilidade das medidas a serem realizadas, foi utilizada nesse estudo uma quitosana comercial de boa qualidade (Sigma-Aldrich), que apresenta características homogêneas e determinadas.

Com relação ao primeiro item, a curva de titulação potenciométrica obtida encontra-se ilustrada na Figura 5.1. Optou-se por esse método por sua simplicidade e precisão, embora outros métodos pudessem ter sido selecionados como espectroscopia UV-Vis (TAN et al., 1998), FTIR (Shigemasa et al., 1996), espectrometria de massa (DUARTE et al., 2001) e espectrometria de ressonância magnética nuclear (LAVERTU et al., 2003).

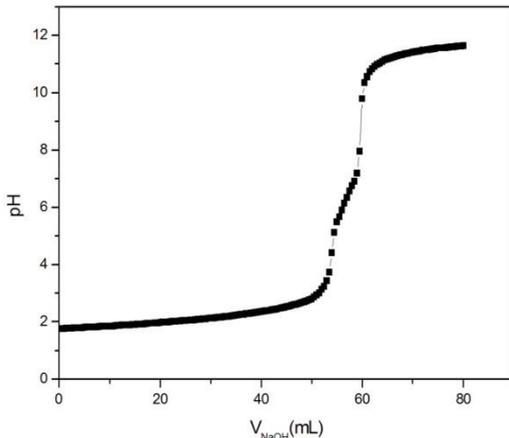


Figura 5.1 – Curva de titulação potenciométrica para determinação do grau de desacetilação da quitosana utilizada no estudo.

A curva apresentada apresenta dois pontos de inflexão, o primeiro relacionado à neutralização do excesso de HCl na solução, e o segundo referente à neutralização dos grupos amino protonados. Para facilitar a

determinação dos dois pontos de inflexão foi construído o gráfico da derivada de primeira ordem (Figura 5.2) da curva apresentada na Figura 5.1.

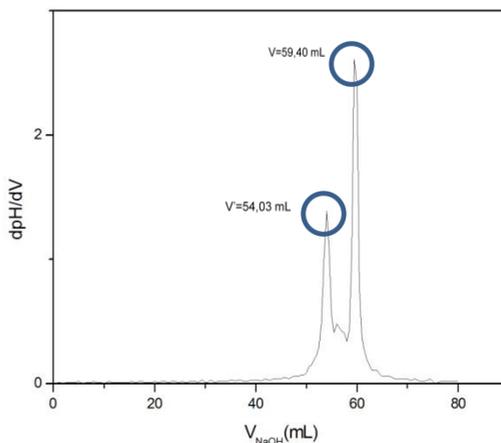


Figura 5.2 – Apresentação da primeira derivada da curva de titulação potenciométrica. Os dois picos assinalados se referem às duas inflexões apresentadas pela curva da Figura 5.1.

O grau de desacetilação calculado através da Equação 4.1 foi igual a 86,94 %. Diversos trabalhos envolvendo a utilização da quitosana como suporte para imobilização de enzimas foram publicados, sendo que o grau de desacetilação variou entre 50 e 92,5 % (MARTINO et al., 1996; LIN et al., 2002; ADAMIEC; MODRZEJEWAKA, 2004). Assim, a quitosana aplicada apresentou esse parâmetro dentro da faixa de valores aplicado. Esse parâmetro é um fator positivo para o processo de imobilização, pois indica que existe um bom número de grupos amino para realização de ligação com o glutaraldeído. Este efeito garante uma maior estabilidade para o sistema enzima-suporte, além de assegurar um maior rendimento de imobilização por potencializar um maior número de ligações com as moléculas de enzima (RODRIGUES et al., 2005).

5.2. Otimização do processo de imobilização

A otimização do processo de imobilização teve como objetivo definir a condição para obtenção de um biocatalisador que apresentasse a maior atividade enzimática total possível. Dessa forma, foi selecionado o método DCCR (Delineamento fatorial central composto com adição de ponto rotacional). Esse método foi selecionado por permitir verificar a influência de diversas variáveis sobre uma variável resposta, com o menor número de experimentos possíveis. Além disso, permite verificar a reprodutibilidade dos experimentos, avaliando a repetição dos valores obtidos para o ponto central.

Com a realização dos experimentos delineados pelo planejamento experimental apresentado na Tabela 4.2, foi possível definir a condição otimizada para promover a imobilização da lacase em quitosana através de ligação cruzada. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1– Respostas obtidas após a realização dos ensaios determinados pelo planejamento experimental.

(continua)

Teste	pH	Conc. de Glut. (%)	Tempo (h)	Conc. de enzima (g.L ⁻¹)	Atividade (U.g ⁻¹)
1	4	1	2,5	2	15,19
2	4	1	2,5	6	46,85
3	4	1	5,5	2	35,20
4	4	1	5,5	6	85,01
5	6,5	1	2,5	2	10,89
6	6,5	1	2,5	6	29,60
7	6,5	1	5,5	2	23,48
8	6,5	1	5,5	6	103,38
9	4	4	2,5	2	20,27
10	4	4	2,5	6	46,68
11	4	4	5,5	2	34,52
12	4	4	5,5	6	80,30
13	6,5	4	2,5	2	15,30
14	6,5	4	2,5	6	36,28

5. Resultados e Discussão

Tabela 5.1– Respostas obtidas após a realização dos ensaios determinados pelo planejamento experimental.

(concluído)

Teste	pH	Conc. de Glut. (%)	Tempo (h)	Conc. de enzima (g.L ⁻¹)	Atividade (U.g ⁻¹)
15	6,5	4	5,5	2	29,13
16	6,5	4	5,5	6	68,40
17	5,5	0,5	4	4	21,47
18	5,5	5	4	4	48,59
19	3,5	3	4	4	63,85
20	8	3	4	4	54,68
21	5,5	3	1	4	31,93
22	5,5	3	9	4	51,08
23	5,5	3	4	1	20,27
24	5,5	3	4	10	15,62
25	5,5	3	4	4	32,22
26	5,5	3	4	4	41,90
27	5,5	3	4	4	46,33
28	5,5	3	4	4	40,21
29	5,5	3	4	4	40,75
30	5,5	3	4	4	38,43
31	5,5	3	4	4	32,22
32	5,5	3	4	4	40,34
33	5,5	3	4	4	46,56
34	5,5	3	4	4	40,33
35	5,5	3	4	4	40,75
36	5,5	3	4	4	39,43

Através dos resultados obtidos pode-se observar que existem faixas de valores para os fatores analisados, que exercem significativa influência sobre a atividade da lacase após sua imobilização. O processo de imobilização envolve a ligação de resíduos de aminoácidos ao suporte, sendo que a enzima precisa conservar suas distâncias intermoleculares, tornando a sua estrutura mais rígida. Assim, a enzima

se torna mais resistente à adição de agentes desnaturantes. Entretanto, quando o número de ligações cruzadas é elevado, devido à alta concentração de glutaraldeído, concentração de enzimas no meio ou tempo de imobilização, ocorre um aumento na rigidez da enzima ligada, trazendo como consequência uma limitação nos possíveis modos de sua conformação e, portanto, diminuição da atividade enzimática. Para baixos valores de concentração de enzima e tempo de imobilização, ocorre um menor número de ligações entre a enzima e o suporte, gerando um sistema com menor atividade enzimática.

Estes efeitos demonstram a importância do experimento de otimização da condição de imobilização, possibilitando a obtenção de um sistema com a maior atividade catalítica possível.

A melhor condição de trabalho, ou seja, a combinação de fatores que possibilitou a obtenção de um sistema com a maior atividade enzimática total observada, envolveu o experimento 8. Nesse ensaio, o entrecruzamento das cápsulas de quitosana ocorreu com concentração de glutaraldeído igual a 1%, pH do meio de imobilização de 6,5, com um concentração de enzimas de $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ e tempo de imobilização igual a 5,5 horas.

Foi observado um aumento na atividade enzimática do sistema enzima-suporte para maiores valores de concentração de enzimas no meio e tempo de imobilização. Por exemplo, se observarmos os experimentos 7 e 8, ao aumentarmos a concentração de enzima do meio de 2 para 6 g.L^{-1} , temos como resultado um aumento na atividade enzimática de 23,48 para $103,38 \text{ U.g}^{-1}$. Com relação ao tempo, quando realizamos o processo de imobilização em um tempo de 2,5 horas (experimento 6) o sistema enzima-suporte resultante apresenta uma atividade enzimática de $10,80 \text{ U.g}^{-1}$, muito menor do que aquela observada no experimento 8, onde o tempo de reação é 5,5 horas e a atividade enzimática obtida é $103,38 \text{ U.g}^{-1}$.

Com relação ao pH de imobilização e a concentração de glutaraldeído aplicada no processo de entrecruzamento, podemos observar que eles exercem menor influência sobre a atividade enzimática resultante em relação aos dois fatores analisados anteriormente (experimento 4 e 8, por exemplo). Tal observação pode ser constatada por inspeção ao diagrama de Pareto conforme mostra a Figura 5.3.

5. Resultados e Discussão

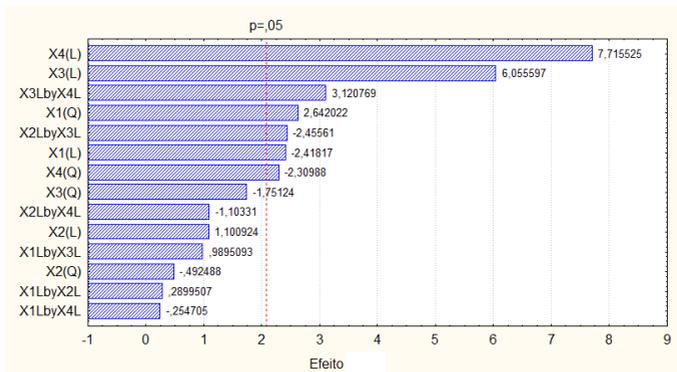


Figura 5.3– Diagrama de Pareto demonstrando o nível de influência dos fatores pH (X_1), concentração de glutaraldeído (X_2), tempo de imobilização (X_3), e concentração de enzimas (X_4) sobre a atividade enzimática resultante do processo de imobilização.

Com relação à reprodutibilidade do experimento, podemos observar uma boa concordância entre os valores obtidos para os experimentos repetidos (experimentos 25 a 36) conforme apresentado na Tabela 5.1.

Um modelo matemático (Equação 5.1) combinando efeitos lineares e quadráticos e a interação linear dos efeitos foi ajustado aos dados obtidos experimentalmente. O coeficiente de correlação (R^2) apresentado foi de 0,85511. Os valores dos coeficientes estão apresentados na Tabela 5.2.

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_1^2 + A_3X_2 + A_4X_2^2 + A_5X_3 + A_6X_3^2 + A_7X_4 + A_8X_4^2 + A_9X_1X_2 + A_{10}X_1X_3 + A_{11}X_1X_4 + A_{12}X_2X_3 + A_{13}X_2X_4 + A_{14}X_3X_4 \quad (5.1)$$

Onde:

X_1 – pH de imobilização;

X_2 – Concentração de glutaraldeído (% v/v);

X_3 – Tempo de imobilização (h);

X_4 – Concentração de enzima (g.L^{-1});

5. Resultados e Discussão

Tabela 5.2 – Valores dos coeficientes do modelo matemático obtidos. Valores com $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

Coef.	Efeito	p	-95%	95%
			Coef.	Coef.
A ₀	41,63	0,000	35,19	48,06
A ₁	-10,68	0,025	-19,87	-1,50
A ₂	10,63	0,015	2,26	19,01
A ₃	4,91	0,283	-4,36	14,17
A ₄	-2,85	0,627	-14,88	9,18
A ₅	25,17	0,000	16,53	33,82
A ₆	-3,57	0,094	-7,82	0,67
A ₇	34,76	0,000	25,39	44,13
A ₈	-6,07	0,031	-11,54	-0,61
A ₉	1,46	0,775	-9,00	11,92
A ₁₀	5,03	0,334	-5,55	15,61
A ₁₁	-1,30	0,801	-11,90	9,30
A ₁₂	-12,34	0,023	-22,78	-1,89
A ₁₃	-5,58	0,282	-16,10	4,94
A ₁₄	15,98	0,005	5,33	26,63

Os coeficientes que são estatisticamente significativos são o A₀, A₁, A₂, A₅, A₇, A₈, A₁₂ e A₁₄.

A Figura 5.4 apresenta a correlação existente entre os dados previstos pelo modelo matemático e os valores observados experimentalmente.

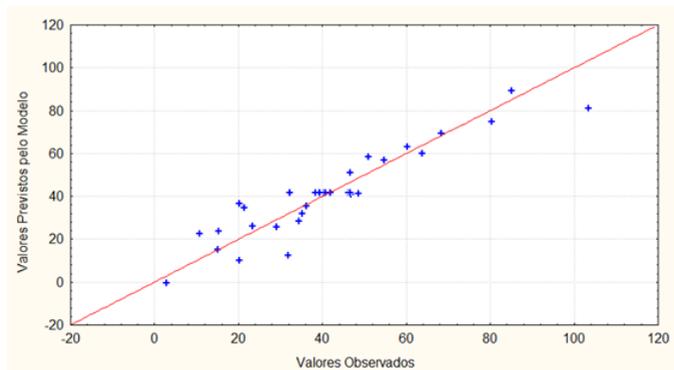


Figura 5.4 – Diagrama apresentando a correlação entre os valores previstos pelo modelo matemático e os dados obtidos experimentalmente ($R^2 = 0,85511$).

5.3. Caracterização do biocatalisador obtido.

As cápsulas de quitosana contendo a enzima imobilizada segundo a condição definida na seção 5.2 apresentaram uma massa média igual a $19,7 \pm 0,09$ mg. Além disso, o diâmetro médio foi igual a $0,306 \pm 0,0102$ cm e sua massa específica real de $1,35 \pm 0,034$ g.cm⁻³. As Figuras 5.5 e 5.6 apresentam uma imagem da cápsula de quitosana obtida após o processo de gotejamento e outra após o processo de imobilização, respectivamente.



Figura 5.5 – Imagem da cápsula de quitosana obtida após o processo de gotejamento e precipitação em hidróxido de sódio 2 mol.L⁻¹.



Figura 5.6 – Imagem da cápsula de quitosana imobilizada em pH 6,5, em solução 6 g.L^{-1} de enzima lacase. A cápsula foi previamente ativada em solução 1% de glutaraldeído (v/v).

5.4. Avaliação da atividade do catalisador na estocagem

A determinação da cinética de redução na atividade do biocatalisador é uma informação fundamental para previsão do seu tempo de estocagem. Além disso, com esses dados é possível avaliar se o processo de imobilização apresenta influência sobre a estabilidade da enzima, com relação à manutenção da sua atividade por um maior tempo. Dessa forma, foram avaliadas diversas formas de acondicionamento do biocatalisador, com o objetivo de verificar a influência de parâmetros como temperatura e meio de incubação sobre a velocidade de redução na capacidade catalítica da enzima imobilizada.

Em um primeiro experimento, as cápsulas de quitosana com a enzima imobilizada foram mantidas em placas de Petri, sem a presença de um meio líquido adicional, em temperatura ambiente (média de $23 \pm 2,24 \text{ }^\circ\text{C}$) e em ambiente refrigerado (média de $8 \pm 1,12 \text{ }^\circ\text{C}$). Os resultados são apresentados na Figura 5.7. Pode-se observar que em condições ambientes, o biocatalisador leva apenas 4 dias para perder totalmente a sua atividade enquanto que em ambiente refrigerado esse tempo é estendido para 14 dias, conservando por volta de 35 % da atividade enzimática original em 4 dias.

Este comportamento pode ser atribuído a necessidade de a enzima apresentar água em sua composição, para organizar a sua estrutura tridimensional, de forma a configurar os sítios ativos necessários para a catálise.

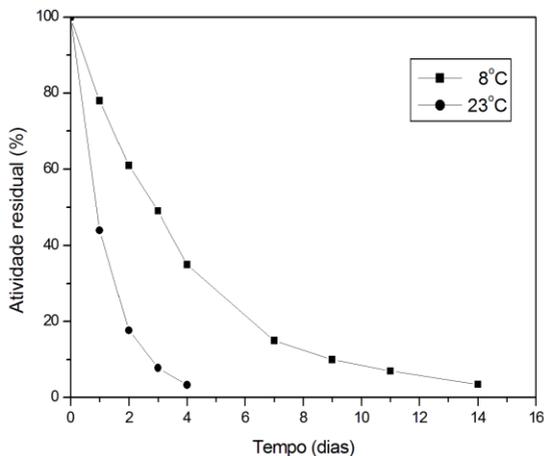


Figura 5.7 – Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos foram realizados sem adição de meio líquido e mantidos em repouso nas temperaturas de 8 e 23 °C.

Para os experimentos onde foram adicionados meios líquidos para o acondicionamento das cápsulas, os tempos de incubação necessários para o sistema enzima-suporte perder a atividade, foram maiores do que os anteriores, nas mesmas temperaturas consideradas. As Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 apresentam as cinéticas de redução na atividade do biocatalisador para os experimentos realizados com água deionizada, solução tampão tartarato pH 4,0 e solução tampão fosfato pH 8,0, respectivamente.

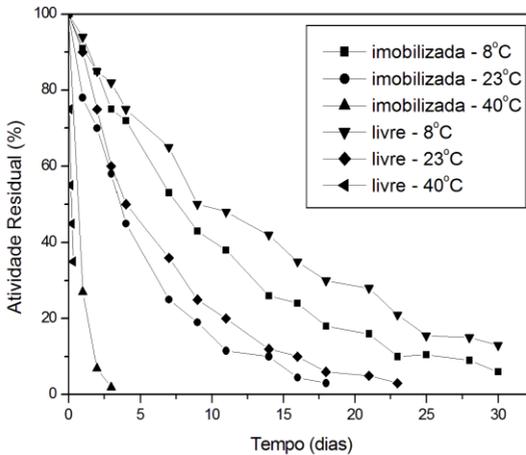


Figura 5.8 - Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos tiveram a adição de água deionizada como meio para incubação. As temperaturas foram mantidas em 8, 23 e 40°C. Os experimentos foram realizados com enzima livre e imobilizada.

No experimento onde foi aplicada água deionizada como meio para incubação do biocatalisador, pode-se observar que a enzima livre apresenta maior estabilidade com relação à perda de atividade em relação à enzima imobilizada, nas temperaturas mais baixas aplicadas (8 e 23°C). Entretanto essa situação se modifica a 40°C, quando é visualizada uma maior estabilidade por conta do biocatalisador imobilizado. A temperatura é um fator determinante da cinética de redução da atividade. Observa-se que a 8 °C, leva-se em média 8 dias para redução de metade da atividade enzimática original, enquanto que para 23 °C esse tempo se reduz para um valor em torno de 3 dias e a 40 °C em menos de 1 dia. Esse efeito é esperado em função da desnaturação da enzima em valores elevados de temperatura.

Para os experimentos realizados com a utilização da solução tampão fosfato pH 8,0, a imobilização da enzima favoreceu um ganho na estabilidade do biocatalisador independente da temperatura aplicada. Para a enzima imobilizada e mantida a 8°C, em 30 dias de incubação o sistema ainda apresentava uma atividade enzimática igual a aproximadamente 20% daquela observada originalmente, enquanto que a enzima livre detinha apenas algo em torno de 5%. Esses valores são

mais satisfatórios do que os observados nas temperaturas de 23 °C e 40 °C, onde com um tempo por volta de 18 e 3 dias, respectivamente, a atividade enzimática praticamente foi extinta.

Por fim, o sistema de estocagem do biocatalisador aplicando meio líquido que apresentou os piores resultados em termos de estabilidade da atividade enzimática envolveu a aplicação do tampão tartarato pH 4,0. Como nos outros casos, existe um aumento na velocidade de redução da atividade do biocatalisador em função do aumento da temperatura de incubação. Observa-se ainda que os sistemas com enzimas imobilizadas apresentem uma maior estabilidade frente aqueles com enzimas livres, como por exemplo, a 8 °C, onde a enzima imobilizada reduz a metade a sua atividade original em 7,96 dias e na forma livre, esse tempo passa para apenas 4,25 dias (Tabela 5.5).

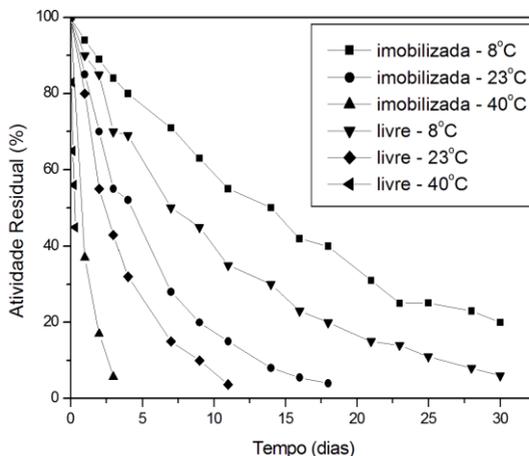


Figura 5.9 - Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos receberam a adição de solução tampão fosfato pH 8,0 como meio para incubação. As temperaturas foram mantidas em 8, 23 e 40°C e os experimentos foram realizados com enzima livre e imobilizada.

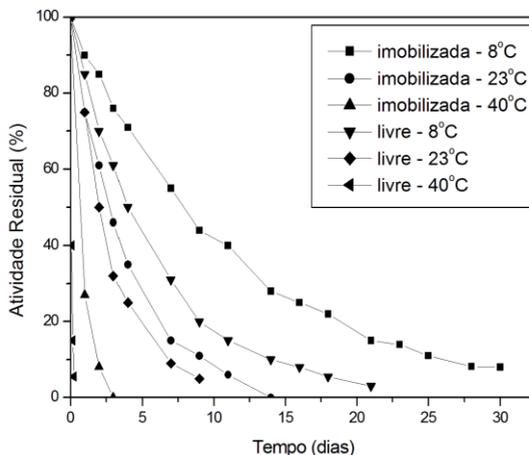


Figura 5.10 - Cinéticas de redução na atividade do biocatalisador. Os experimentos foram com a adição de solução tampão tartarato pH 4,0 como meio para incubação. As temperaturas utilizadas foram 8, 23 e 40°C e os experimentos realizados com enzima livre e imobilizada.

Aos dados apresentados (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10) foram ajustados por modelos cinéticos de 1° ordem, conforme apresentado na seção 4.3. A constante cinética obtida devido ao ajuste do modelo aos dados experimentais possibilitou uma melhor visualização da diferença entre a velocidade de redução na atividade enzimática dos vários sistemas estudados.

Na Tabela 5.3, são apresentadas as constantes de velocidade obtidas para os experimentos sem a adição de líquido. Observa-se que existe um aumento por volta de 3,5 vezes no valor da constante quando a temperatura do meio é modificada de 8 para 23 °C. Esses valores são maiores do que aqueles obtidos nas mesmas condições, independente de a enzima estar livre ou imobilizada. Esse fato evidencia que a manutenção das cápsulas em um meio líquido é fundamental para aumentar a estabilidade do biocatalisador na estocagem.

Os valores das constantes de velocidade aumentam com a temperatura, independente da condição. Quando as cápsulas são estocadas em solução tampão pH 4,0, por exemplo, na temperatura de 8 °C, a constante cinética vale $0,087 \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 5.5), subindo para 0,256

5. Resultados e Discussão

dia⁻¹ a 23 °C e alcançando um valor de 1,267 dia⁻¹ na temperatura de 40°C.

Além disso, a melhor condição que apresenta uma menor velocidade de redução na atividade enzimática é utilizando solução tampão fosfato pH 8,0 como meio de acondicionamento, onde o valor da constante obtido foi de 0,054 dia⁻¹ (Tabela 5.6)

Tabela 5.3 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados sem a adição de meio líquido.

Temperatura (°C)	K_d (dia ⁻¹)	$t_{1/2}$ (dia)	R^2
8	0,247	2,80	0,9952
23	0,863	0,80	0,9990

Tabela 5.4 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados com a adição de água deionizada.

Temperatura (°C)	livre			imobilizada		
	K_d (dia ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (dia)	K_d (dia ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (dia)
8	0,068	0,9805	10,19	0,092	0,9930	7,53
23	1,151	0,9957	0,60	0,188	0,9892	3,68
40	3,289	0,9932	0,21	1,325	0,9999	0,52

Tabela 5.5 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados com a adição de solução tampão pH 4,0.

Temperatura (°C)	livre			imobilizada		
	K_d (dia ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (dia)	K_d (dia ⁻¹)	R^2	$t_{1/2}$ (dia)
8	0,163	0,9971	4,25	0,087	0,9976	7,96
23	0,345	0,9968	2,00	0,256	0,9968	2,70
40	11,513	0,9994	0,06	1,267	0,9993	0,54

Tabela 5.6 – Valores das constantes cinéticas de perda de atividade do biocatalisador, para os experimentos realizados com a adição de solução tampão pH 8,0.

Temperatura (°C)	livre			imobilizada		
	K_d (dia ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (dia)	K_d (dia ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (dia)
8	0,091	0,9963	7,61	0,054	0,9926	12,38
23	0,280	0,9884	2,47	0,179	0,9988	3,87
40	2,302	0,9961	0,30	0,938	0,9962	0,73

Por fim, observa-se um bom ajuste do modelo de 1ª ordem aos dados experimentais, em função dos valores de R² obtidos, que variaram de 0,9805 a 0,9999. Dessa forma, o modelo se apresenta como uma ferramenta eficiente para previsão da variação do valor da atividade enzimática do biocatalisador ao longo do tempo.

Os efeitos observados encontram-se de acordo com as observações da literatura referente à conservação de enzimas em meio líquido. As moléculas de água, que se encontram ao redor da molécula de enzima, exercem um papel importante na estabilidade e conformação estrutural devido, principalmente, a sua influência nas interações hidrofóbicas, além das forças de Van der Waals, pontes salinas e ligações de hidrogênio (FABER, 2000).

Assim, em meio líquido, as reações que levam à modificação da estrutura da enzima, em especial o seu sítio ativo, são mais lentas. Além disto, a imobilização dificulta estas reações de degradação, pois a temperaturas mais elevadas o efeito de conservação é mais pronunciado. Também o efeito de pH pode ser observado. O sítio ativo da lacase é constituído por 4 átomos de cobre, os quais se modificam para valores de pH mais baixos, mais drasticamente do que a pH 8,0, por exemplo.

5.5. Aplicação da enzima imobilizada na bioconversão de derivados fenólicos de baixa massa molecular

Os efluentes industriais apresentam uma grande variedade de compostos fenólicos presentes em sua composição. Dessa forma, o conhecimento da composição dos derivados fenólicos presentes no meio possibilita o projeto de sistemas de tratamento aplicando lacases, desde que se conheça a afinidade dessa enzima com relação aos vários substratos. Nesse sentido, diversos trabalhos estudaram a aplicação de

enzimas lacases na oxidação de diferentes derivados de fenol (LEONOWICZ et al., 1984; KERSTEN et al., 1990; XU, 1996)

Diversos derivados fenólicos foram submetidos à oxidação utilizando lacase imobilizada em quitosana como catalisador. Por motivos relacionados ao controle das condições de reação, os experimentos foram realizados com soluções tampão, contendo o composto fenólico. Esses resultados podem ser aplicados futuramente na discussão de dados obtidos com a aplicação da lacase imobilizada em efluentes reais. Desta forma, o objetivo dos experimentos foi avaliar a influência do grupo funcional e sua posição no anel aromático com relação à afinidade da enzima pelo substrato.

Com relação ao processo de adsorção, foi observado que a percentagem de remoção de fenol do meio variou entre 0 e 1,2 % para os diversos compostos, sendo o fenol o composto que apresentou o maior percentual de remoção. A partir desses dados, foram determinadas as percentagens de bioconversão utilizando a lacase (Equação 5.2). Os resultados apresentados na Tabela 5.7 apresentam a percentagem de bioconversão, ou seja, a remoção total de fenol menos a percentagem de remoção devido à adsorção.

$$X = \frac{(C_i - C_f)_{total} - (C_i - C_f)_{adsorção}}{C_i} \quad (5.2)$$

Onde:

- X - Conversão do composto fenólico
- C_i - Concentração inicial de composto fenólico (mg.L^{-1})
- C_f - Concentração final de composto fenólico (mg.L^{-1})

5. Resultados e Discussão

Tabela 5.7 – Resultados obtidos para a bioconversão de derivados fenólicos utilizando a lacase imobilizada. O tempo de incubação foi de 24 horas e o pH do meio foi ajustado em 4,0 com tampão tartarato.

(continua)

Nome	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	Conversão (%)		
		20°C	30°C	40°C
o-cresol	108	12	18	45
m-cresol		15	14	17
p-cresol		5	43	24
o-etilfenol	122	15	34	7
p-etilfenol		39	51	100
2-isopropilfenol	136	29	35	64
2,3,5 – trimetilfenol		82	89	90
Ácido 4- hidroxibenzóico	138	27	32	35
4-nitrofenol	139	n.d.	n.d.	n.d.

5. Resultados e Discussão

Tabela 5.7 – Resultados obtidos para a bioconversão de derivados fenólicos utilizando a lacase imobilizada. O tempo de incubação foi de 24 horas e o pH do meio foi ajustado em 4,0 com tampão tartarato.

(concluído)

Nome	Massa Molecular (g.mol ⁻¹)	Rendimentos (%)		
		20°C	30°C	40°C
2,3-xilenol	122	22	47	83
2,4-xilenol		25	49	65
2,5 – xilenol		40	70	94
2,6 - xilenol		65	92	97
3,4 – xilenol		70	85	42
3,5-xilenol		16	27	30
Fenol	94	5	5	7
Siringaldazina	360	100	100	100
2,6-DMP	154,16	100	100	100

Os resultados demonstram que o grupo funcional presente na estrutura do derivado fenólico é fundamental para definir a afinidade do substrato com a enzima lacase imobilizada. Dentre os resultados apresentados, os compostos 2,6-xilenol e 2,3,5-trimetilfenol apresentaram as maiores percentagens de bioconversão, para as várias temperaturas estudadas.

Para alguns compostos as conversões foram baixas, como no caso do fenol, que não passou de 7 % e o 4-nitrofenol que não apresentou conversão alguma. Os resultados obtidos corroboram as observações realizadas por Felici e colaboradores (1985) e Xu (1995). Os primeiros autores realizaram o estudo da atividade de lacases de *Agaricus bisporus* aplicando diversos derivados fenólicos. As análises foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados mostraram que o 4-nitrofenol não se apresentou como um substrato ideal para medida da atividade catalítica da lacase, uma vez que foi observada uma conversão de apenas 2 % após 30 minutos de incubação. Da mesma forma, o fenol apresentou uma fração de 90 % de substrato não convertido após o mesmo tempo de incubação. As reações foram conduzidas em pH 6,0.

O segundo autor citou realizou o estudo da bioconversão de diversos derivados fenólicos, mediado por lacases e relacionou a afinidade da enzima pelo substrato com seu potencial redox. De forma geral, o trabalho demonstrou que esta correlação está associada a transferência do primeiro elétron do fenol para o cobre do tipo 1, presente no sítio ativo da lacase, sendo esta a etapa limitante do processo de bioconversão. Essa observação está relacionada ao potencial redox do substrato. Desta forma, diferentes grupos substituintes irão conferir diferentes potenciais redox para o composto fenólico, que terá uma afinidade diferente com a enzima lacase, quando submetido a oxidação. Com relação ao 4-nitrofenol, a explicação para os resultados observados está ligada ao fato de que esse composto apresenta um grupamento retirante de elétrons, o qual diminui a densidade eletrônica do grupo fenóxi, dificultando a sua oxidação por reduzir a disponibilidade de doação de elétrons para o cobre T1 da lacase.

No caso do ácido 4-hidroxibenzoico, embora possua um grupo retirador de elétrons, a maior acidez deste composto ($pK_a = 4,48$) comparada a do 4-nitrofenol ($pK_a = 7,2$) (MORRISON; BOYD, 1992) pode justificar o rendimento de reação por volta de 30 %.

Além disso, a posição do grupo funcional influencia diretamente na capacidade catalítica da enzima. Para o *m*-cresol não foi observada

conversão acima de 17 % em qualquer temperatura estudada. Entretanto, os isômeros *o*-cresol e *p*-cresol apresentaram conversões iguais a 45 % (40 °C) e 44 % (30 °C), respectivamente. Esse efeito também é observado considerando os compostos *o*-etilfenol e *p*-etilfenol. Verifica-se desta forma, que a simetria estrutural do composto fenólico está relacionada à formação do complexo enzima-substrato, uma vez que estruturas mais simétricas como as observadas para os compostos com substituintes na posição *para* tendem a ser mais oxidadas.

Os resultados apresentados demonstraram a redução na concentração de fenóis de baixa massa molecular da solução. Entretanto, vale lembrar que alguns produtos de oxidação de fenol podem gerar outros compostos fenólicos que podem reagir com a 4-aminoantipirina, mascarando o efeito de bioconversão. Para superar esse efeito, os produtos gerados na reação poderiam ser separados por cromatografia líquida de alta eficiência e analisado via espectroscopia UV-Vis.

5.6. Estudo cinético em reator batelada

Para avaliar a influência de fatores como temperatura, concentração de enzima e concentração de substrato sobre a capacidade de bioconversão de compostos fenólicos mediada por lacases imobilizadas, foram realizados experimentos bateladas sob diversas condições dos parâmetros citados. Nos estudos foram aplicados dois substratos que foram utilizados como padrões, a siringaldazina e o 2,6-dimetoxifenol.

5.6.1. Obtenção das curvas cinéticas de bioconversão da siringaldazina.

Para as reações envolvendo a siringaldazina como substrato padrão, foi possível observar que a velocidade da reação aumenta até um determinado valor de concentração de substratos, sendo que acima dessa concentração a velocidade do processo tende a sofrer um decréscimo até se tornar nula. Na Figura 5.11 esse efeito pode ser observado para as reações efetuadas a 20 °C. Para uma quantidade de enzimas no meio igual a 1,6 U.mL⁻¹, a velocidade da reação possui um valor máximo (2,5 μmol.s⁻¹.L⁻¹) quando é aplicada uma concentração de substrato igual a 6,5 μmol.L⁻¹.

É possível observar também que à medida que a concentração de enzimas aumenta no meio, a velocidade da reação tende a sofrer um acréscimo. Para a temperatura de 20 °C, as velocidades máximas da reação são aproximadamente 2,5, 7,5 e 25 μmol.s⁻¹.L⁻¹ para quantidades

de enzima adicionadas de 1,6, 3,2 e 4,8 U.mL⁻¹, respectivamente. Além disso, a concentração pela qual é atingida a velocidade máxima também aumenta com um incremento no valor da concentração de enzimas. Para uma atividade enzimática no meio igual a 1,6 U.mL⁻¹ a concentração onde é observada a velocidade máxima da reação é 6,5 μmol.L⁻¹, enquanto que para 3,2 e 4,8 U.mL⁻¹ o decréscimo na velocidade da reação se observa a partir de 13,0 e 20,0 μmol.L⁻¹, respectivamente.

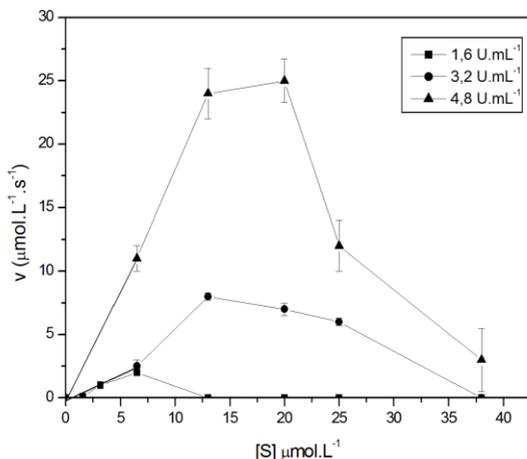


Figura 5.11– Valores de velocidades iniciais em função da concentração de substrato obtidas para os experimentos realizados a 20 °C.

Para as outras temperaturas (30 e 40 °C), também foi possível observar uma redução na velocidade da reação em função do aumento na concentração de substratos (Figuras 5.12 e 5.13). Além disso, o valor referente à concentração a partir da qual a velocidade da reação diminuiu, apresentaram valores próximos aqueles observados a 20°C.

Observou-se, ainda, um aumento na velocidade da reação com o aumento da temperatura. Para uma quantidade de enzima imobilizada adicionada igual a 4,8 U.mL⁻¹, por exemplo, a velocidade máxima assume os seguintes valores aproximados: 25,0, 42,5 e 62,5 μmol.L⁻¹.s⁻¹, para as temperaturas de 20, 30 e 40 °C, respectivamente.

Dessa forma, a concentração de siringaldazina no meio influencia de forma direta a velocidade da reação, sendo que para

5. Resultados e Discussão

valores elevados de concentração, a enzima não apresenta boa atividade catalítica. Uma das possíveis explicações para o fato pode, hipoteticamente, ser atribuída a possibilidade de que um intermediário de reação seja gerado e que este esteja interagindo deletoriamente com a enzima. Esta suposição é coerente com o fato de que o tempo de vida médio da quinona resultante é reduzido. Pouco se conhece sobre este fato, em relatos na literatura.

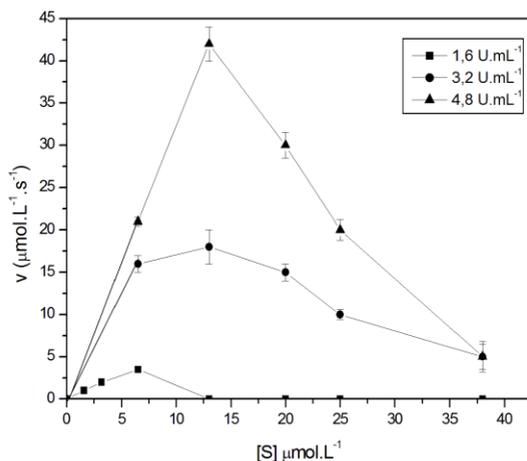


Figura 5.12 – Valores de velocidades iniciais em função da concentração de substrato obtidas para os experimentos realizados a 30 °C.

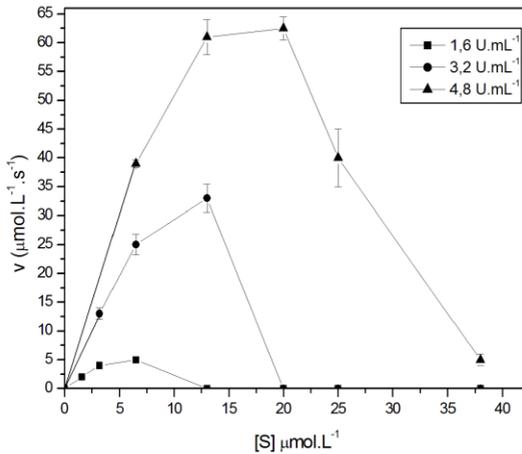


Figura 5.13 – Valores de velocidades iniciais em função da concentração de substrato obtidas para os experimentos realizados a 40 °C.

A siringaldazina tem sido utilizada como substrato padrão para determinação da atividade catalítica de lacases desde o trabalho pioneiro de Harkin e Obst (1973). Entretanto, observa-se com esse experimento que a relação entre a concentração de enzima aplicada no meio e a concentração de substrato é de fundamental importância para que seja detectada atividade enzimática utilizando a siringaldazina como substrato padrão.

Uma vez que foi verificado o efeito de inibição da enzima em condições de excesso de substrato, não foi aplicado o modelo de Michaelis e Menten, pelo sistema proposto não seguir esse modelo, apresentando, conforme observado, efeito de inibição por excesso de substrato.

5.6.2. Avaliação da capacidade de reutilização do biocatalisador na bioconversão da siringaldazina.

Com relação à capacidade de reutilização da enzima após vários ciclos oxidativos utilizando siringaldazina como substrato, não foram obtidos resultados satisfatórios. Em todas as condições estudadas, observou-se uma perda de atividade elevada já no segundo ciclo de bateladas. A 40 °C, por exemplo, observa-se que na segunda utilização

5. Resultados e Discussão

da enzima, a mesma apresenta apenas valores entre 10 e 20 % da atividade catalítica inicial.

Para temperaturas de 20 e 30°C esse valor passa para valores que variam entre 30 e 60 %. Mesmo assim, ainda é uma condição que inviabiliza a reutilização da enzima e não justifica a metodologia de imobilização empregada, quando a siringaldazina é o substrato a ser oxidado. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.14 a 5.22.

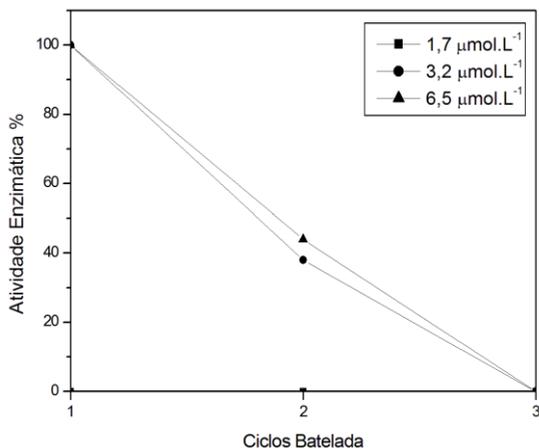


Figura 5.14 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 5 cápsulas e a temperatura foi mantida a 20 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

5. Resultados e Discussão

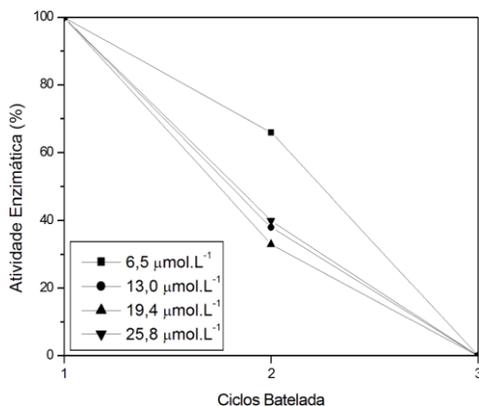


Figura 5.15 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 10 cápsulas e a temperatura foi mantida a 20 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

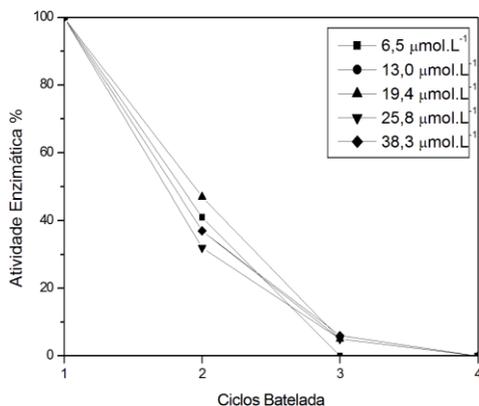


Figura 5.16 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 15 cápsulas e a temperatura foi mantida a 20 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

5. Resultados e Discussão

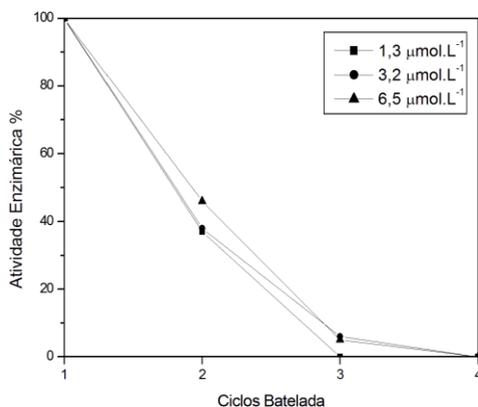


Figura 5.17 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 5 cápsulas e a temperatura foi mantida a 30 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

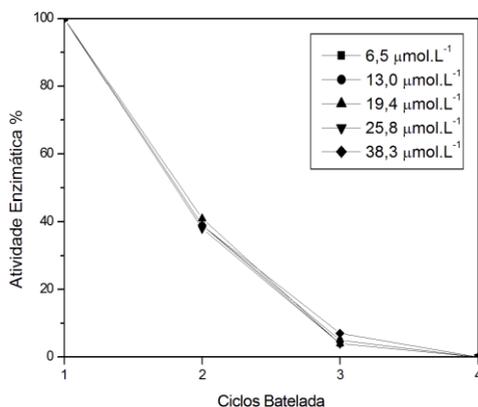


Figura 5.18 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 10 cápsulas e a temperatura foi mantida a 30 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

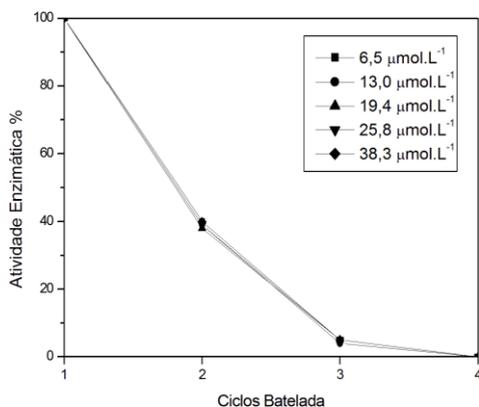


Figura 5.19 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 15 cápsulas e a temperatura foi mantida a 30 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

Tanto a 20, quanto a 30 °C, no segundo ciclo batelada a atividade enzimática residual no biocatalisador era de aproximadamente 40%. Essa observação pode estar ligada ao fato de na temperatura de 20 °C existir uma maior adsorção de produtos, devido à temperatura mais baixa, embora ocorra uma menor geração de produtos. Por outro lado, a 30 °C foi gerado uma maior quantidade de quinona conforme apresentado na Figura 5.20, mas a fração adsorvida pela cápsula foi menor, devido ao aumento da temperatura (adsorção exotérmica).

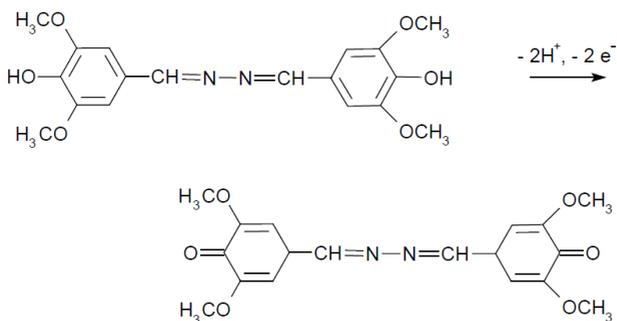


Figura 5.20 – Reação de oxidação da siringaldazina em sua quinona equivalente (tetrametoxi-azo-bis-metilenocinona).

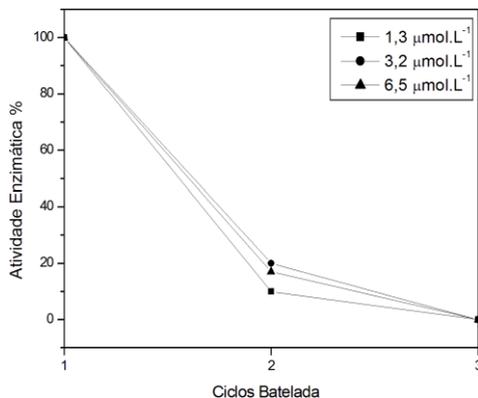


Figura 5.21 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 5 cápsulas e a temperatura foi mantida a 40 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

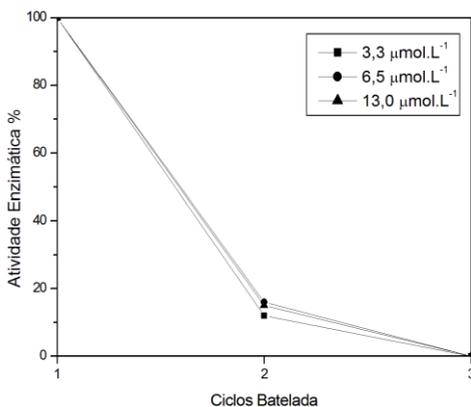


Figura 5.22 – Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 10 cápsulas e a temperatura foi mantida a 40 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

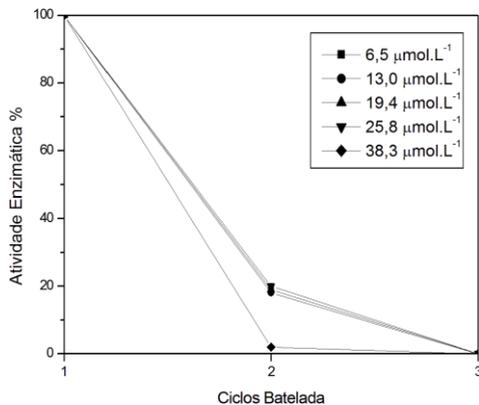


Figura 5.23– Redução na atividade enzimática do biocatalisador após vários ciclos batelada. A quantidade de enzima adicionada ao meio foi de 15 cápsulas e a temperatura foi mantida a 40 °C. Os testes foram realizados para várias concentrações de siringaldazina, conforme indicado na legenda.

A redução na atividade da enzima é maior na temperatura de 40 °C em relação às outras temperaturas. Essa observação pode estar ligada ao fato de existir uma maior geração de produtos e esses prejudicar de forma mais acentuada a possibilidade de reutilização da enzima nesta temperatura.

Alguns autores verificaram a possibilidade de reuso da lacase imobilizada na oxidação de compostos fenólicos, entretanto aplicaram substratos que não foram a siringaldazina. Jiang e colaboradores (2005) aplicaram lacase imobilizada em microesferas de quitosana ativadas com glutaraldeído na oxidação de ABTS e obtiveram valores acima de 80% de atividade residual após 10 ciclos bateladas.

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

Rosa (2004) estudou a imobilização de lacases em Eupergit C na oxidação de efluentes da indústria papelreira. Em seu trabalho cita que a siringaldazina é um substrato eficiente para a medida de atividade da enzima livre, mas é ineficaz para medida de atividade depois que está imobilizada. Dessa forma, o autor aplicou o 2,6-DMP como substrato padrão.

Com base nessas informações, o estudo cinético descrito foi repetido com o 2,6-DMP, uma vez que não foram obtidos resultados satisfatórios com a utilização da siringaldazina como substrato, não justificando o processo de imobilização da enzima, pela baixa estabilidade operacional observada.

5.6.3. Avaliação das curvas cinéticas de bioconversão do 2,6 - DMP.

Com relação às reações empregando o 2,6-DMP como substrato padrão, não foi observada uma redução na velocidade da reação em função do aumento da concentração de substrato, dentro da faixa de valores aplicados, independente da temperatura utilizada. Os resultados são apresentados nas Figuras 5.24, 5.25 e 5.26.

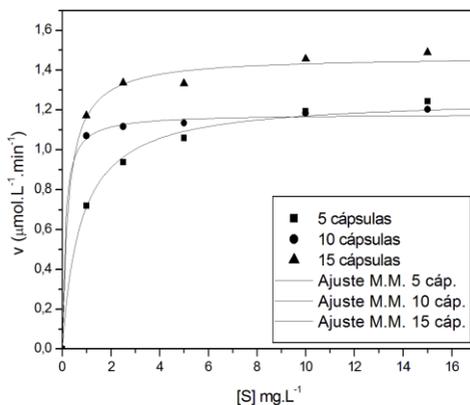


Figura 5.24 - Resultados obtidos para os experimentos utilizando o 2,6-dimetoxifenol como substrato padrão. A temperatura do meio reacional foi mantida em 20°C e a quantidade de cápsulas foi de 5, 10 e 15 cápsulas. O ajuste M.M. refere-se ao modelo de Michaelis e Menten.

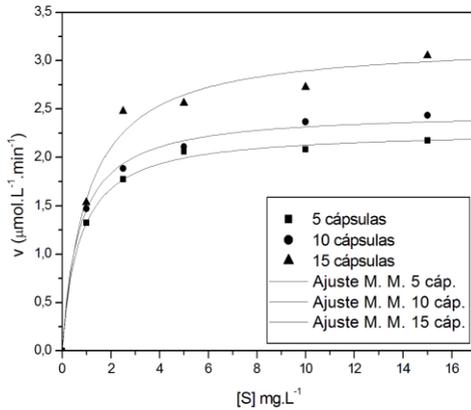


Figura 5.25 – Resultados obtidos para os experimentos utilizando o 2,6-dimetoxifenol como substrato padrão. A temperatura do meio reacional foi mantida em 30°C e a quantidade de cápsulas foi de 5, 10 e 15 cápsulas. O ajuste M.M. refere-se ao modelo de Michaelis e Menten.

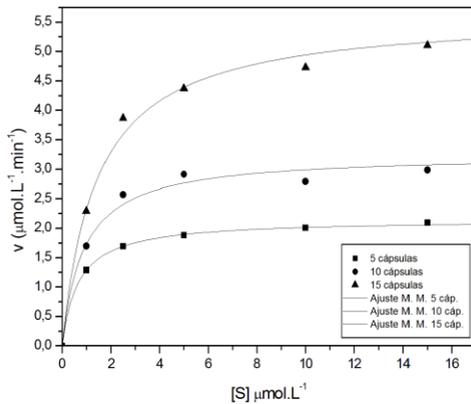


Figura 5.26 – Resultados obtidos para os experimentos utilizando o 2,6-dimetoxifenol como substrato padrão. A temperatura do meio reacional foi mantida em 40°C e a quantidade de cápsulas foi de 5, 10 e 15 cápsulas. O ajuste M.M. refere-se ao modelo de Michaelis e Menten.

Através dos resultados apresentados nos Figuras 5.24, 5.25 e 5.26, observa-se que a temperatura apresenta-se como um fator positivo para o aumento na velocidade da reação, independente da condição de

reação aplicada. Para os sistemas incubados com 15 cápsulas, as velocidades máximas atingidas foram iguais a 1,5, 3,0 e 5,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, para as temperaturas de 20, 30 e 40 °C, respectivamente.

Além disso, verifica-se que um aumento na quantidade de cápsulas adicionada ao meio reacional contribui para um aumento na velocidade da reação. A 40 °C, a velocidade da reação não ultrapassa 2,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para uma quantidade de 5 cápsulas, enquanto que com 15 cápsulas o valor da velocidade inicial atinge as vizinhanças de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Isso ocorre devido a uma maior quantidade de complexo enzima-substrato formado, favorecendo o aumento na velocidade da reação.

5.6.4. Ajuste de modelos matemáticos às curvas cinéticas de bioconversão do 2,6 - dimetoxifenol.

Aos dados obtidos dos experimentos cinéticos, foi ajustado o modelo de Michaelis e Menten. Esse ajuste tem por função representar a relação entre a concentração de substrato no meio e a velocidade da reação.

Os valores obtidos para os parâmetros cinéticos do modelo de Michaelis e Menten ajustados aos dados experimentais são apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Valores dos parâmetros do modelo de Michaelis e Menten ajustados aos dados experimentais.

Temp. (°C)	Cáp.	v_{max} ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	K_s (mg.L^{-1})	R^2
20	5	1,18	0,117	0,9859
	10	1,26	0,768	0,8569
	15	1,47	0,263	0,9146
30	5	2,15	0,671	0,9939
	10	2,47	0,700	0,9864
	15	3,19	1,042	0,9636
40	5	2,28	0,722	0,9984
	10	3,25	0,880	0,9590
	15	5,65	1,430	0,9864

Observa-se um bom ajuste do modelo proposto aos dados experimentais. De uma forma geral a correlação com os dados experimentais ficou acima de 0,900, com exceção do experimento onde foram aplicadas 10 cápsulas na temperatura de 20 °C, que apresentou um valor de 0,8569, provavelmente por erros ocorridos durante a execução dos experimentos.

O parâmetro v_{max} está relacionado à cinética da reação, que depende da temperatura e também da concentração de enzima aplicada. Em relação à dependência com a temperatura, os valores desse parâmetro variam de 1,18 a 2,28 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, entre 20 e 40 °C, nas reações onde foram aplicadas 5 cápsulas. Para os experimentos com 10 cápsulas, os valores de v_{max} variam entre 1,26 a 3,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$. Por fim, quando foram aplicadas 15 cápsulas, as velocidades da reação observadas foram 1,47, 2,47 e 5,65 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$, em ordem crescente de temperatura aplicada nos experimentos.

Com relação ao parâmetro K_s , devemos considerar que esse valor não representa a constante de saturação intrínseca da enzima, e sim um valor aparente que depende do sistema de imobilização (SHULER, 2002). Dessa forma, considere K_m como sendo a constante de saturação da enzima livre. A relação entre as duas constantes é dada pela Equação 5.3.

$$K_s = K_m \left\{ 1 + \frac{v_{max}}{K_L([S] + K_m)} \right\} \quad (5.3)$$

Onde K_L representa o coeficiente de transferência de massa do substrato no meio reacional. Desta forma, observa-se que o parâmetro K_s é função da velocidade máxima da reação. Com o aumento no valor de v_{max} provoca uma alteração no valor da constante de saturação. Esse efeito pode ser observado para os dados obtidos. À medida que o v_{max} aumenta na temperatura de 30 °C, por exemplo, variando de 3,28 a 5,65 ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$), o valor da constante de saturação varia de 0,722 a 1,042 mg.L^{-1} . Para temperatura de 20 °C, esse efeito não foi observado uma vez que o coeficiente de correlação entre os dados, principalmente para quantidades de cápsulas adicionadas iguais a 10 e 15 unidades, apresentaram valores reduzidos (0,8569 e 0,9146), o que sugere a realização de um maior número de experimentos.

5.6.5. Avaliação da capacidade de reutilização do biocatalisador na bioconversão de 2,6-dimetoxifenol.

Os experimentos demonstraram que a lacase imobilizada apresenta boa estabilidade com relação à sua reutilização após vários ciclos reacionais, quando aplicada na oxidação do 2,6-dimetoxifenol.

Para os experimentos realizados a 20 °C, após oito ciclos reacionais, a cápsula ainda apresentava atividade catalítica acima de 80 %, para as várias concentrações de enzima aplicadas nos estudos.

Com o aumento na temperatura, a estabilidade operacional diminui após a realização de sucessivas utilizações da enzima imobilizada. Para 30 °C, a atividade enzimática chegou a ser reduzida em 40 % do valor observado na primeira utilização. Para a temperatura de 40 °C, essa redução foi ainda maior, atingindo um residual de 30% da atividade enzimática observada inicialmente.

Com relação à influência da concentração de substratos na estabilidade operacional da enzima imobilizada, observa-se que existe uma tendência a diminuir a atividade da enzima após um ciclo reacional, com o aumento da concentração inicial de reagentes. Esse fator pode ser explicado da seguinte maneira: em elevadas concentrações iniciais de substrato, existe uma maior liberação de produto que é adsorvido pela cápsula e dessa forma prejudica a sua atividade catalítica em uma nova utilização.

5. Resultados e Discussão

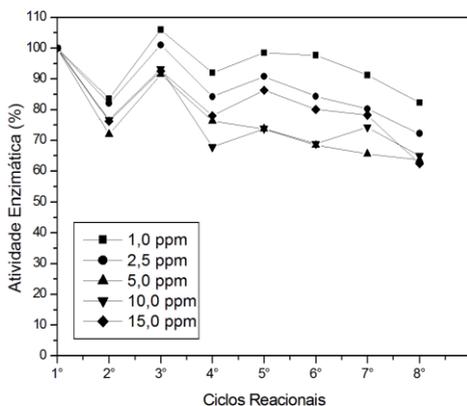


Figura 5.27 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 5 cápsulas e temperatura de 20 °C.

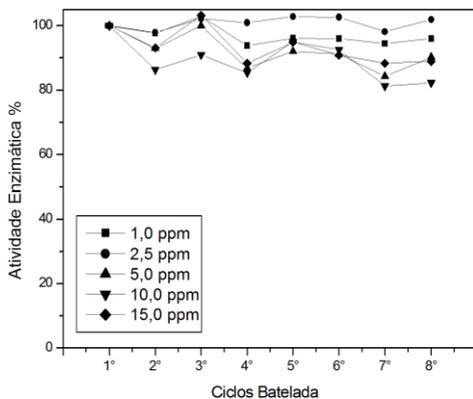


Figura 5.28 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 10 cápsulas e temperatura de 20 °C

5. Resultados e Discussão

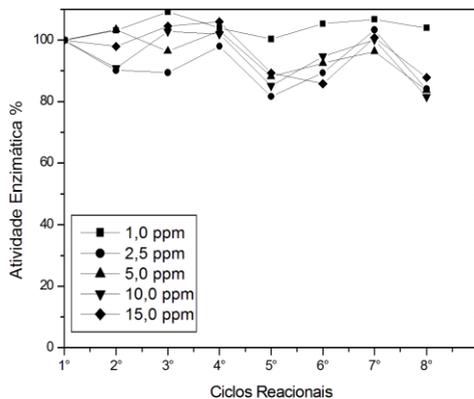


Figura 5.29 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 15 cápsulas e temperatura de 20 °C.

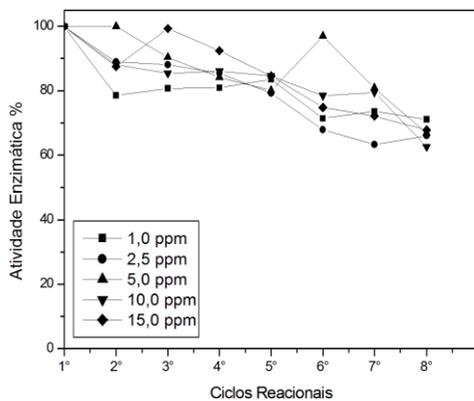


Figura 5.30 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 5 cápsulas e temperatura de 30 °C.

5. Resultados e Discussão

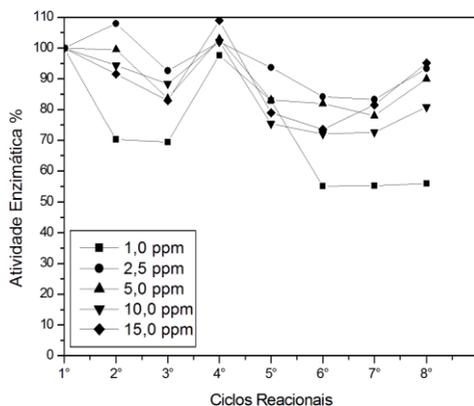


Figura 5.31 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 10 cápsulas e temperatura de 30 °C

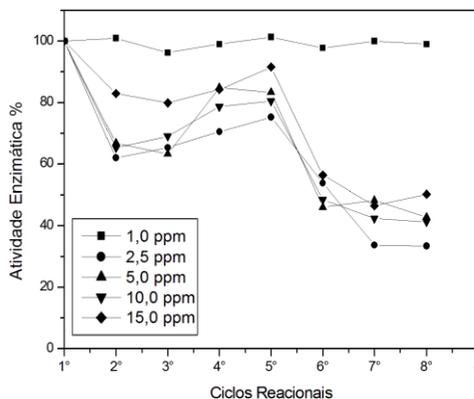


Figura 5.32 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 15 cápsulas e temperatura de 30 °C.

5. Resultados e Discussão

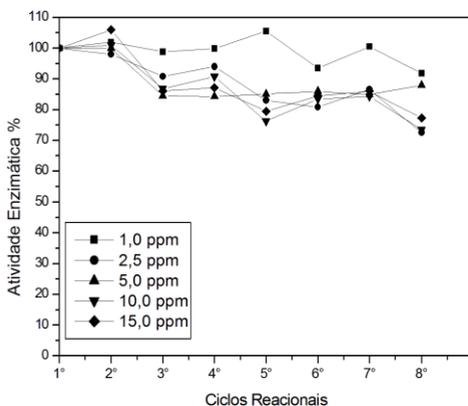


Figura 5.33 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 5 cápsulas e temperatura de 40 °C.

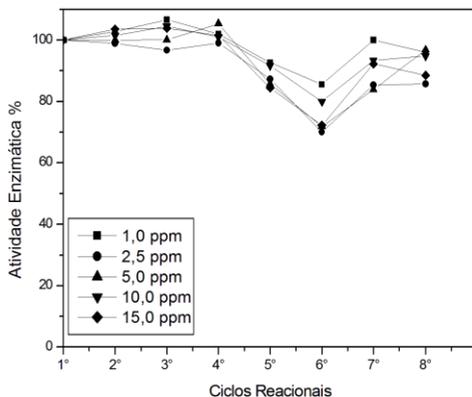


Figura 5.34 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 10 cápsulas e temperatura de 40 °C.

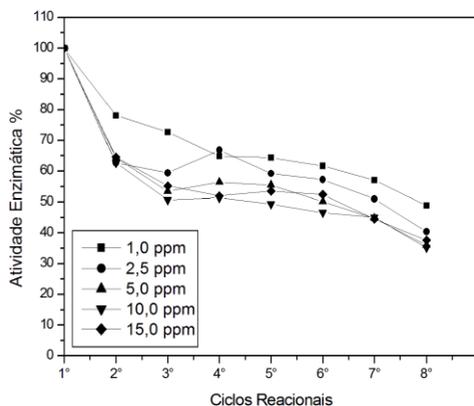


Figura 5.35 – Atividade enzimática do biocatalisador após a sua utilização em vários ciclos batelada. Os experimentos foram realizados com a aplicação de 15 cápsulas e temperatura de 40 °C.

Observa-se que com uma quantidade de 15 cápsulas na temperatura de 40 °C, a estabilidade operacional do biocatalisador é a menor observada. Isso pode estar ligado à maior quantidade de produto de oxidação gerado, que provavelmente é adsorvido na superfície da cápsula, prejudicando a sua atividade enzimática em um novo ciclo reacional.

Os resultados obtidos corroboram com as observações feitas por Rosa (2004). Em seus experimentos o autor realizou a oxidação de 2,6-DMP com lacases imobilizadas em Eupergit C. Após a realização de 10 ciclos reacionais, não foi observada redução significativa na atividade da enzima imobilizada, realizando o processo em temperatura ambiente e com concentração de 10 mmol.L⁻¹.

5.7. Avaliação da estabilidade do biocatalisador aplicado em reatores contínuos de leito fixo.

A viabilização de processos catalíticos se torna facilitada quando podem ser operados em forma de fluxo contínuo. Além disso, é necessário que a enzima mantenha sua estabilidade pelo maior tempo possível.

Nesse estudo foram avaliadas também a estabilidade da enzima imobilizada frente a dois substratos padrão, a siringaldazina e o 2,6-dimetoxifenol.

5.7.1. Avaliação da estabilidade do biocatalisador na bioconversão de siringaldazina.

Nas Figuras 5.36 a 5.38, estão apresentados os resultados obtidos para o acompanhamento do produto de bioconversão da siringaldazina, mediada pela enzima lacase imobilizada em quitosana.

Um aumento na massa de biocatalisador promove uma maior formação de produtos, em todas as temperaturas utilizadas. Para a temperatura de 20 °C, a concentração máxima de produto observada foi em média igual a 4,0 e 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para 2,0 e 1,0 g de cápsulas empregadas no reator, respectivamente. A 30 °C, os valores de concentração determinados pela leitura da absorvância a 525 nm observados foram de 2,52, 5,96 e 7,41 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para quantidades crescentes de cápsulas empregadas no reator (0,5, 1,0 e 2,0 g). Por fim, para a maior temperatura empregada no processo (40 °C), os valores de concentração de produtos foram os maiores obtidos, sendo iguais a 5,51, 7,02 e 10,05 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, para as temperaturas de 20, 30 e 40 °C, respectivamente.

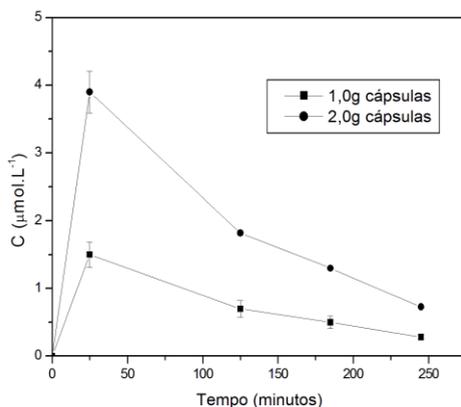


Figura 5.36 – Valores de concentração de produto medidas em 525 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h^{-1} , concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg.L^{-1} e temperatura de 20 °C.

5. Resultados e Discussão

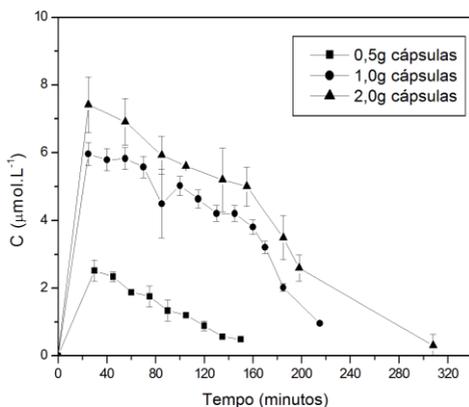


Figura 5.37 – Valores de concentração de produto medidas em 525 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h^{-1} , concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg.L^{-1} e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

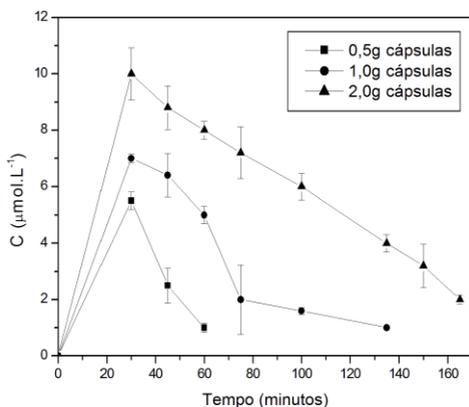


Figura 5.38 – Valores de concentração de produto nas amostras coletadas na saída do reator e acompanhadas em 525 nm. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h^{-1} , concentração de siringaldazina na solução de alimentação igual a 10 mg.L^{-1} e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

Novamente, foi observado que o catalisador sofreu uma rápida desativação em função do tempo de processo, independente da condição utilizada. Essa desativação tende a ser mais intensa com o aumento da temperatura.

Analisando visualmente o aspecto das cápsulas de quitosana antes da aplicação no reator e após a sua utilização no processo de oxidação, foi constatado que as cápsulas sofreram escurecimento. Esse efeito pode estar ligado à adsorção do produto de oxidação da siringaldazina nas cápsulas de quitosana. Esse produto adsorvido provavelmente age de forma a prejudicar a capacidade catalítica da enzima. Nas Figuras 5.39 e 5.40, pode-se observar a coloração do biocatalisador antes e após o seu uso na bioconversão da siringaldazina. O efeito de arraste da enzima pela solução é considerado desprezível, uma vez que foi circulada solução tampão na mesma vazão, isenta de substrato. Foi analisada a atividade enzimática na solução de saída do reator ao longo do tempo e o teste foi negativo. Esse fato era esperado, uma vez que no preparo do biocatalisador, as cápsulas são lavadas exaustivamente até a atividade enzimática não ser detectável na água de lavagem.



Figura 5.39 – Imagem da cápsula de quitosana antes de ser aplicada no reator.



Figura 5.40 – Imagem da cápsula de quitosana em operação no reator contínuo. Detalhe para o escurecimento da cápsula durante o seu uso.

5.7.2. Avaliação da estabilidade do biocatalisador na bioconversão do 2,6-dimetoxifenol.

Para o processo utilizando 2,6-dimetoxifenol como substrato padrão, foi observada uma maior estabilidade do biocatalisador em relação à sua capacidade de bioconversão ao longo do tempo. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.41 a 5.43.

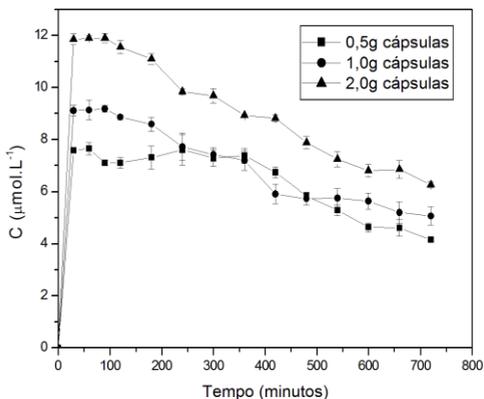


Figura 5.41 – Valores de concent Tempo (min) luto medidas em 470 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h⁻¹, concentração de 2,6-DMP na solução de alimentação igual a 10 mg.L⁻¹ e temperatura de 20 °C.

Na temperatura de 20 °C observa-se que um aumento na quantidade de cápsulas empacotada no reator promove um aumento na bioconversão do substrato. Para uma massa igual a 2,0 g, a concentração média de produto detectada na saída, medida em 470 nm foi igual a 11,84 µmol.L⁻¹. Para massas menores, iguais a 1,0 e 0,5 g, os valores de absorvância foram iguais a 9,10 e 7,58 µmol.L⁻¹, respectivamente.

Com relação à queda na capacidade de bioconversão ao longo do tempo, para um empacotamento de enzimas igual a 2,0 g, a concentração de produto na saída diminuiu de 11,84 para 6,25 em um tempo igual a 720 minutos. Isso representa uma queda por volta de 41% da atividade catalítica do biocatalisador, em relação à mesma atividade observada nos primeiros instantes do estado estacionário. Para as outras massas, a diminuição percentual na atividade foi igual a 38 e 45 %, para as massas de 1,0 e 0,5 g de cápsulas, respectivamente. Esses valores são calculados para uma redução na concentração de produto medida na saída do reator de 4,04 (9,10 para 5,06 µmol.L⁻¹) para massa de 1,0 g e 3,43 (7,58 para 4,15 µmol.L⁻¹). Dessa forma, uma menor massa de biocatalisador no reator, quando submetido à mesma carga de substrato sofre uma maior redução na atividade em relação as massas maiores.

5. Resultados e Discussão

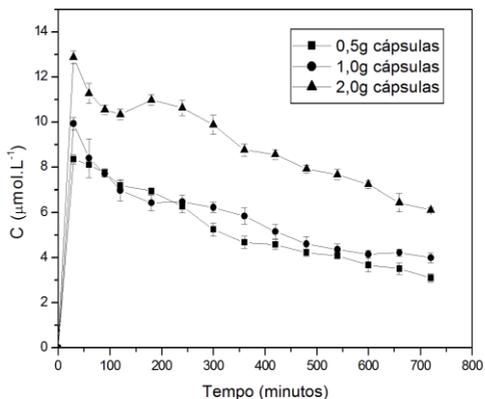


Figura 5.42 – Valores de concentração de produto medidas em 470 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h^{-1} , concentração de 2,6-DMP na solução de alimentação igual a 10 mg.L^{-1} e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para os experimentos conduzidos na temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, as reduções na atividade foram maiores do que na temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e atingiram valores iguais a aproximadamente 50, 50 e 58 %, para as massas de 2,0, 1,0 e 0,5 g, respectivamente. Observa-se novamente que o percentual de perda de atividade é semelhante para as massas empacotadas de 2,0 e 1,0 g, porém menores do que a observada para a massa de 0,5 g.

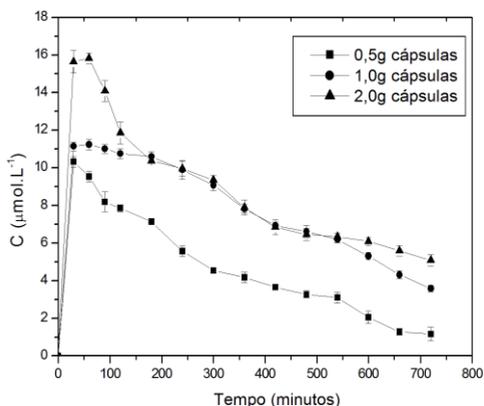


Figura 5.43 – Valores de concentração de produto medidas em 470 nm nas amostras coletadas na saída do reator. A vazão de alimentação do reator foi 5 mL.h^{-1} , concentração de 2,6-DMP na solução de alimentação igual a 10 mg.L^{-1} e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

A $40 \text{ }^\circ\text{C}$, as reduções na atividade foram as maiores observadas em todos os experimentos. Para as massas de 2,0 e 1,0 g, houve uma diminuição de 60 e 68 %, respectivamente na capacidade de bioconversão do catalisador. Para a massa de 0,5 g, a redução atingiu 86 %.

Dessa forma, é possível perceber que a temperatura é decisiva na estabilidade operacional do biocatalisador. Embora um aumento na temperatura de operação, dentro da faixa de valores estudada (20 a $40 \text{ }^\circ\text{C}$), promova um aumento na capacidade de bioconversão, ocorre um aumento na perda de atividade do biocatalisador com a temperatura. Isto pode ser ocasionado pela maior geração de produtos de oxidação adsorvidos pelo biocatalisador ou elevada temperatura que compromete a conformação espacial da enzima, diminuindo a sua atividade.

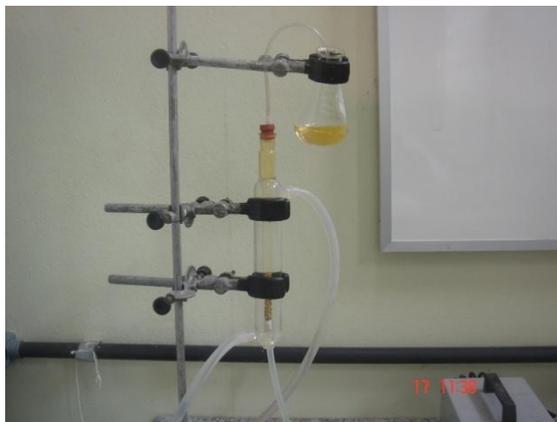


Figura 5.44 – Produto de oxidação obtido durante a bioconversão do 2,6-DMP, mediado pela lacase imobilizada em quitosna.

O produto de oxidação do 2,6-dimetoxifenol apresentou uma coloração amarelada, que permitiu o acompanhamento de sua formação por espectroscopia UV-vis na região de 470 nm. Entretanto, esse composto gerado é instável e após 3,0 horas, se transforma em um composto com coloração marrom, que se apresenta insolúvel em água.



Figura 5.45 – O produto de conversão do 2,6 dimetoxifenol apresenta cor amarelada e se mantém estável por aproximadamente 3 horas. Após esse período ele se transforma no precipitado apresentado na Figura.

5. Resultados e Discussão

O composto gerado na bioconversão é sem dúvida o responsável pela redução na capacidade catalítica do biocatalisador. Provavelmente o mesmo é adsorvido na superfície do catalisador e com o tempo se transforma no composto marrom apresentado na Figura 5.47. A adsorção do composto em questão pode ser constatada visualmente, observando o aspecto da cápsula no início na reação e após as 720 horas de aplicação no reator.

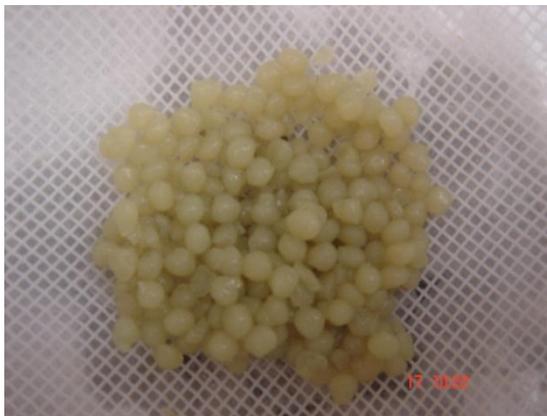


Figura 5.46 – Cápsula de quitosana com enzima imobilizada no início do processo.



Figura 5.47 – Aspecto do biocatalisador após o contato com o 2,6- DMP, durante um intervalo de tempo igual a 720 minutos.

Outro fator que deveria ser levado em conta é a concentração de oxigênio disponível ao longo do reator, que é consumido ao passo que o substrato é oxidado. Desta forma, outros experimentos deveriam ser conduzidos com o objetivo de verificar o perfil da concentração de oxigênio ao longo do reator e também realizar a alimentação em diversos pontos de forma a manter constante a concentração do aceptor final de elétrons.

5.7.3. Ajuste do modelo de desativação de Sadana

Para descrição matemática da desativação do biocatalisador ao longo do tempo de operação, foi ajustado o modelo de Sadana (SADANA, 1980), conforme apresentado nas Figuras 5.48, 5.49 e 5.50.

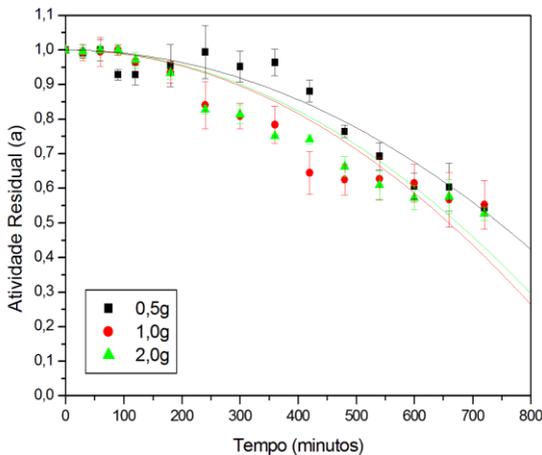


Figura 5.48 – Ajuste do modelo de Sadana aos dados experimentais obtidos na temperatura de 20 °C.

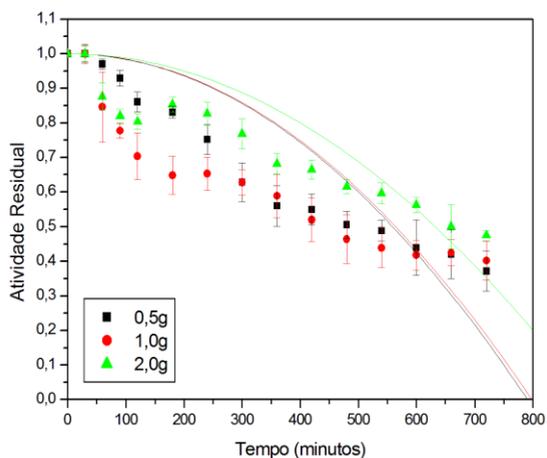


Figura 5.49 – Ajuste do modelo de Sadana aos dados experimentais obtidos na temperatura de 30 °C.

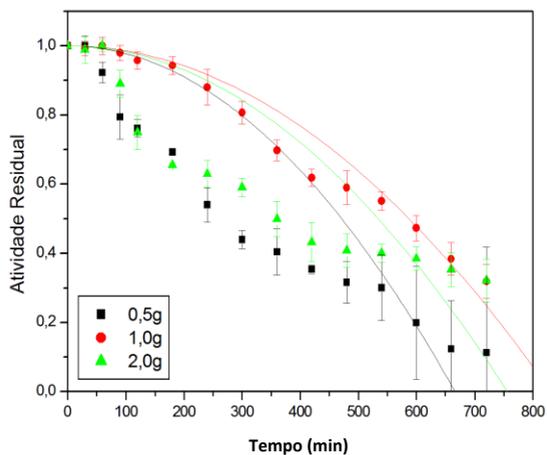


Figura 5.50 – Ajuste do modelo de Sadana aos dados experimentais obtidos na temperatura de 40 °C.

Os parâmetros dos modelos ajustados aos dados experimentais são apresentados na Tabela 5.9.

5. Resultados e Discussão

Tabela 5.9 – Parâmetros do modelo de Sadana ajustados aos dados experimentais.

Temperatura (°C)	Massa de catalisador (g)	k_d (h ⁻²)	$t_{1/2}$ (h)	R ²
20	0,5	$1,80 \cdot 10^{-6}$	745,35	0,964
	1,0	$2,22 \cdot 10^{-6}$	671,15	0,897
	2,0	$2,31 \cdot 10^{-6}$	657,95	0,928
30	0,5	$3,14 \cdot 10^{-6}$	564,33	0,801
	1,0	$3,20 \cdot 10^{-6}$	559,01	0,230
	2,0	$2,50 \cdot 10^{-6}$	632,45	0,737
40	0,5	$4,54 \cdot 10^{-6}$	469,32	0,720
	1,0	$2,90 \cdot 10^{-6}$	587,22	0,971
	2,0	$3,52 \cdot 10^{-6}$	533,00	0,627

Os resultados obtidos demonstram que para algumas condições de estudo, o ajuste do modelo não foi satisfatório, como por exemplo, na temperatura de 30 °C, com a aplicação de 1,0 g, onde o coeficiente de correlação foi igual a 0,230. Através da Tabela 5.9, pode ser observado que a perda de atividade tende a ser maior no início no processo, ao contrário do que o modelo de Sadana propõe. Entretanto, para outros experimentos o modelo se adaptou bem e seus parâmetros podem apresentar informações importantes a respeito do comportamento do biocatalisador aplicado na bioconversão de 2,6-DMP.

Observa-se que com o aumento da temperatura, existe uma tendência aumentar o valor da constante de desativação, indicando que a estabilidade do biocatalisador tende a ser menor em temperaturas mais elevadas. Para massa de biocatalisador aplicada igual a 0,5 g e a 20 °C o valor da constante é $1,80 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-2}$, enquanto que nas temperaturas de 30 e 40 °C, com a mesma massa aplicada no reator, o valor da constante atinge os valores de $3,14 \cdot 10^{-6}$ e $4,50 \cdot 10^{-6} \text{ h}^{-2}$, respectivamente.

Por fim, devido ao baixo ajuste observado devem ser realizados mais experimentos com o objetivo de confirmar os resultados experimentais obtidos. Além disto, é possível aplicar outros modelos que descrevam melhor o comportamento da desativação do biocatalisador estudado, como por exemplo, modelos de perda de atividade ao longo do tempo de forma exponencial.

6. CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado foi possível concluir que a imobilização da enzima lacase em quitosana apresenta-se como uma metodologia viável, sob o ponto de vista técnico, destacando-se os seguintes aspectos:

- A otimização do processo de imobilização foi importante para definir as condições para obtenção do biocatalisador com a maior atividade enzimática possível. Desta forma, a melhor condição de imobilização da enzima lacase em quitosana envolveu o entrecruzamento com solução de glutaraldeído com concentração de 1 %, tempo de imobilização de 5,5 horas, pH do meio e concentração de enzima no processo de imobilização igual a 6,5 e 6,0 g.L⁻¹, respectivamente. O biocatalisador obtido nestas condições apresentou atividade de 103,38 U.g⁻¹. Entretanto, outros fatores devem ser considerados como parâmetros para avaliar o processo de imobilização.

- A quitosana utilizada no trabalho apresentou grau de desacetilação igual a 86,94 %, sendo que este dado se encontra dentro da faixa de valores utilizados em diversos trabalhos. Além disso, as cápsulas contendo enzimas imobilizadas apresentaram um diâmetro médio de 3,06 mm, massa média de 19,7 mg e massa específica de 1,35 g.cm⁻³.

- Com relação à manutenção da atividade enzimática devido à estocagem da enzima, foi verificado que a manutenção em solução tampão pH 8,0 e em temperatura de 8 °C, otimiza a redução da perda de atividade da enzima. Esta informação é fundamental para definir a metodologia que irá conservar a atividade enzimática pelo maior tempo possível, garantindo a sua estocagem prolongada.

- Na aplicação da lacase imobilizada na bioconversão dos derivados fenólicos estudados neste trabalho, foi verificado que a estrutura química é um fator essencial para avaliação da atividade catalítica da enzima. Para o 4-nitrofenol não foi observada bioconversão em 24 horas de reação. Para compostos como o 2,5-xilenol e 2,6-xilenol, 2,3,5-trimetilfenol e o *p*-etilfenol, as conversões ultrapassam 90%. A temperatura também apresenta um efeito importante com relação à bioconversão, sendo que, de uma forma geral, os melhores resultados

foram obtidos para a temperatura de 40 °C. Desta forma, para bioconversão de compostos fenólicos em efluentes industriais, é necessário conhecer os compostos que estão presentes, de forma a prever quais serão as taxas de remoção individuais de cada um dos diversos componentes da mistura. Caso contrário, não será possível reproduzir os ensaios de remoção a não ser que a variedade dos compostos fenólicos presentes na mistura seja alterada.

- O estudo da aplicação da lacase imobilizada na bioconversão da siringaldazina demonstrou que um aumento na concentração de substratos aumenta a velocidade inicial da reação até um determinado valor de concentração. Acima deste valor, a enzima sofre inibição, sendo que a velocidade se reduz à zero em elevadas concentrações iniciais. Entretanto, o valor da concentração de substrato necessário para se observar a inibição é proporcional à relação entre a quantidade de substrato e a quantidade de cápsulas com enzima imobilizadas adicionadas ao reator. Esse efeito de inibição é observado para todas as temperaturas estudadas neste trabalho.

- Com relação à estabilidade operacional da enzima imobilizada em vários ciclos de bioconversão da siringaldazina, observou-se que não é possível reutilizar a enzima por vários ciclos, sendo que em muitos casos já na segunda utilização a enzima apresenta uma atividade igual a 40 % da inicial. Este efeito está ligado ao fato de o produto de reação se ligar à cápsula, reduzindo a sua atividade, o que inviabiliza o seu uso em ciclos subsequentes. Quando a enzima lacase foi aplicada na bioconversão do 2,6-dimetoxifenol, não foi observada inibição pelo substrato dentro da faixa de valores aplicados no estudo, sendo que a relação entre a velocidade inicial da reação e a concentração de substratos pode ser ajustada pelo modelo de Michaelis e Menten.

- Para avaliação da estabilidade da enzima em vários ciclos de biotransformação do 2,6-dimetoxifenol, os resultados demonstraram que a atividade da enzima se mantém estável por até 8 ciclos de batelada. Entretanto, com o aumento da temperatura a estabilidade operacional é prejudicada.

- Foi observado que para avaliação da estabilidade operacional de lacases, o 2,6-DMP é o substrato mais indicado para este estudo, em função da sua simplicidade de aplicação enquanto que a siringaldazina, embora seja o substrato mais divulgado para medida de atividade de

6. Conclusões

lacases, não pode ser utilizado para avaliação da capacidade de reutilização do biocatalisador pelos efeitos de inibição observados.

- De forma geral, o processo de imobilização permitiu o uso da enzima em vários ciclos de reação (usando o 2,6-DMP), sem perda considerada da atividade enzimática, potencializando seu uso em processos industriais, especialmente na bioconversão de derivados fenólicos em efluentes industriais.

- Na aplicação das enzimas imobilizadas em reatores de leito fixo, foi verificado também que a siringaldazina apresenta problemas operacionais para o reator com relação à estabilidade operacional da enzima. Para o 2,6-DMP este efeito foi menor, demonstrando que a siringaldazina gera produtos que afetam o desempenho do biocatalisador durante o processo de biotransformação. Foi ajustado o modelo de Sadana para relacionar a perda de atividade do biocatalisador ao longo do tempo. Entretanto não se pode concluir que este modelo se adaptou bem aos dados experimentais pois em alguns casos o ajuste não foi satisfatório.

- Por fim, além de garantir o uso da enzima em vários ciclos de oxidação, o processo de imobilização viabilizou a aplicação da enzima em reatores contínuos de leito fixo (*packed bed reactors*), devido ao fato de a enzima se manter estável no reator por um tempo prolongado.

7. SUGESTÕES

Alguns experimentos podem ser realizados para ajudar a esclarecer alguns efeitos e enriquecer o trabalho realizado, entre os quais:

- Avaliar a otimização do processo de imobilização em termos de atividade específica e capacidade de reutilização do biocatalisador obtido.
- Realizar os experimentos com outros diâmetros de cápsulas e determinar a etapa limitante do processo.
- Verificar a capacidade de reutilização do biocatalisador na biotransformação dos compostos estudados.
- Estudar a influência de outros fatores na operação em reatores de leito fixo, como a concentração de substratos na entrada do reator e a adição de mediadores de reação.
- Aplicar o estudo na bioconversão de efluentes industriais.

8. REFERÊNCIAS

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

Aggelis, G., et al., Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleuritus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*. 2003, p. 3897-3904.

Alba, P., Forchetti, M. e Tigier, H., Characterization of a phenoloxidase and its distinction from peroxidases in peach endocarp. *Plant Peroxidase Newsletter*. 1999, p. 87-91.

American Public Health Association; American Water Works Association; American Water Works Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21. ed. Washington, DC: APHA, 2005.

Ander, P. e Eriksson, K., The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*. 1976, p. 1-8.

Araújo, J. H. B., et al., A comparative study on fungal laccases immobilized on chitosan. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2005, Vol. 48, p. 1-6.

Australian Government. National Pollutant Inventory. www.npi.au. [Online] [Citado em: 20 de Março de 2009.]

Bacci, E., *Ecotoxicology of organic contaminants*. Boca Ranton : Lewis Publishers, 1994.

Bai, Guangxingl, et al., Isolation and characterization of phenoloxidase from egg masses of the gastropod mollusc, *biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol*. 1997, p. 463-469.

Blanco, S. F. M. M., Remoção de fenol em solução aquosa com carvão mineral. *Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química*. Florianópolis : Universidade Federal de Santa Catarina, 2001. Dissertação de Mestrado.

Bohdziewscz, J., Biodegradation of phenol by enzymes from *Pseudomonas* sp. immobilized onto ultrafiltration membrane. *Process Biochemistry*. 1998, p. 811-818.

Bourbonnais, R., et al., Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied Environmental Microbiology*. 1997, p. 4627-4632.

Broussignac, J., Un hault polymere naturel per connum dans l'industrie le chitosan, *Chimie et Industrie-Genie Chimique*, 1972, v.99, p.1241-1249.

Cesconetto, N., Decomposição de fenol e efluente da indústria de papel e celulose por fotocatalise heterogênea. *Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química*. Florianópolis : Universidade Federal de Santa Catarina, 2002. Dissertação de Mestrado.

Chagas, E. P. e Durrant, L. R., Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzymes and Microbiol Technology*. 2001, p. 473-477.

Cheremissinoff, Nicholas P., *Biotechnology for waste and wastewater treatment*. New Jersey : Noyes Publications, 1996.

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

Cole, J. L., et al., Reactivity of the laccase trinuclear cooper active site with dioxygen: an X-Ray absorption edge study. *Journal American Chemical Society*. 1990, p. 2243-2249.

Collins, P. J., et al., Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied Environmental Microbiology*. 1996, p. 4563-4567.

Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA N° 396. Brasília : s.n., 2005.

D'Annibale, A., et al., Characterization of immobilized laccase from *lentini* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*. 1999, p. 697-706.

D' Annibale, A., *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Research Microbiology*. 2004, p. 596-603.

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

Ducros, V., et al., Crystal structure of the type-2 Copper depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Structural Biology*. 1998, p. 310-316.

Durán, N. e Espósito, E., Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis*. 2000, p. 83-99.

Durán, N., et al., Applications of laccases and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, p. 907-931.

Faber, K., *Biotransformations in organic chemistry*. Berlin : Springer-Verlag, 2000.

Felici, M., Artemi, F. e Luna, M., Determination of laccase activity with various aromatic substrates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1985, p. 435-439.

Fernandes, Roseli., Adsorventes alternativos para remoção de fenol em solução aquosa. *Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química*. Florianópolis : Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. Dissertação de Mestrado.

Ferrer, I., Dezotti, M. e Durán, N., Decolorization of kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase. *Biotechnology Letters*. 1991, p. 577-582.

Fundação do Meio Ambiente. Decreto Nº 14.675. Florianópolis : 2009.
Ganjidoust, H., et al., Role of peroxidase and chitosan in removing chlorophenols from aqueous solution. *Water Science Technology*. 1996, p. 151-154.

Gianfreda, L., Xu, F. e Bollag, J. M., Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*. 1999, p. 1-25.

González, P. S., et al., Phytoremediation of phenol from wastewater, by peroxidases os tomato hairy root cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, p. 647-653.

Goosen, M. E. A., Application of chitin and chitosan. Lancaster : Technology Publishing Company, 1996.

Goy, R. C., Assis, O. B. G. e Campana Filho, S. P., Produção de esferas de quitosana. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 33. 2004, p. 30-33.

Harkin, J. M., Obst, J. R., Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, 29, 1973, p. 381-508.

Haghighi, B., et al., Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*. 2003, p. 3-14.

Harkin, J. M. e Obst, J. R., Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experimentia*. 1973, Vol. 29, p. 381-387.

Hidalgo, A., et al., Biological treatment of phenolic industrial wastewaters by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, p. 221-226.

- Hosseini, S. H e Borghei, S. M., The treatment of phenolic wastewater using a moving bed bio-reactor. *Process Biochemistry*. 2005, p. 1027-1031.
- Hublik, G. e Schinner, F., Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, p. 330-336.
- International Programme on Chemical Safety. Environmental health criteria 161, Phenol. [Online] 1994. [Citado em: 12 de Agosto de 2007.]
- Jaouani, A., et al., Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, p. 478-486.
- Jiang, D. et al., Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal*, v.25, 2005, p.15-23.
- Jung, H., Hyun, K. e Park, C., Production of laccase and bioremediation of pentachlorophenol by wood-degradation fungus *Trichophyton* sp. LKY-7 immobilized in Ca-alginate beads. *Polpu. Chongi. Gisul*. 2003, p. 80-86.
- Kersten, P. J., et al., Comparisom of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochemistry Journal*. 1990, Vol. 268, p. 475-480.
- Khor, E. e Lim, L. Y., Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*. 2003, p. 2339-2349.
- Kim, G. Y. e Moon, S. H., Degradation of pentachlorophenol by an electroenzymatic method using immobilized enzyme. *Korean Journal oh Chemical Engineering*. 2005, p. 52-60.
- Kuhad, R. C., Singh, A. e Eriksson, K. E. L., Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell wall. *Biotechnology in the pulp and paper insdutry. Advances in biochemical engineering biotechnology*. Berlin : Springer-Verlag, 1997.

Kunz, A., et al., Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*. 2002, p. 78-82.

Kuznetsov, B. A., et al., On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosens. Bioelectron*. 2001, p. 73-84.

Lamela, R., Phenoloxidase and peroxidase activity in the shrimp exposed to low salinity. *Aquaculture Research*. 2005, p. 1293-1297.

Laranjeira, M. C. M. e Fávere, V. T., Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*. 2009, p. 672-678.

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

Lee, S, Hong, S. e Sung, M., Removal and bioconversion of phenol in wastewater by a thermostable Trosinase. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996, p. 374-377.

Leonowicz, A., Edgehill, R. U. e Bollang, J.-M., The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Archives of Microbiology*. 1984, Vol. 137, p. 89-96.

Levine, W. G., Laccase, a review. *The Biochemistry of copper*. New York : Academic Press Inc., 1965.

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

López-Molina, D., et al., Enzimatic removal of phenol from aqueous solution by artichoke extracts. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, p. 738-742.

Lu, L., Zhao, M. e Wang, Y., Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2007, p. 159-166.

- Lucas, M., De La Rubia, T. e Martinez, J., Oxidation of low molecular weight aromatic components of olive-mill wastewater by a *Trametes versicolor* laccase. *Polyphenols Actual*. 2003, p. 36-37.
- Luisa, M., Gonçalves, F. C. e Steiner, W., Purification and characterisation of laccase from a newly isolated wood-decaying fungus. *American Chemical Society*. 1996, p. 258-263.
- Lundquist, K. e Kristersson, P., Exhaustive laccase-catalysed oxidation of a lignin model compound (vanillyl glycol) produces methanol and polymeric quinoid products. *Biochemistry Journal*. 1985, Vol. 229, p. 277-279.
- Majcherczyk, A. e Johannes, C., Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*. 2000, p. 193-199.
- Majcherczyk, A., Johannes, C. e Hüttermann, A., Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, p. 335-341.
- Marangoni, A. G., *Enzymes Kinetics a Modern Approach*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2003.
- Marshal, M., Comparison of two treatment methods on the purification of shrimp polyphenol oxydase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1999, p. 12-18.
- Marshal, M. R., Simpson, B. K. e Otwell, W. S., Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. *J. Agric. Food Chemi.* 1987, p. 918-921.
- Martino, A. et al., Immobilization of beta-glucosidase from a comercial preparation. Part 1. A comparative study of natural supports. *Process Biochemistry*, v.31, 1996, p.281-285.
- Mayer, A. M. e Staples, R. C., Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 2002, p. 551-565.
- Mazzafera, P., Gonçalves, K. V. e Shimizu, M. M., Extração e dosagem da atividade da polifenoloxidase do café. *Scientia Agricola*. 2002, p. 695-700.

Michniewicz, A., et al., Decolorization of aqueous solution of dyes by the laccase in the food *Cerrena unicolor*. *Biotechnology*. 2003, p. 194-203.

Minussi, R. C., Pastore, G. G. e Durán, N., Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Science Technology*. 2002, p. 205-216.

Morita, T. e Assumpção, R. W. V. *Manual de soluções, reagentes e solventes*. São Paulo : Edgard Blüchner, 1995.

Morrison, R. T. e Boyd, R. N., *Organic chemistry*. Englewood Cliffs : Prentice-Hall, 1992.

Munari, F. M., Gaio, T. A. e Dillon, A. P. J., Cinética da secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papelreira. Florianópolis : XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003.

Palmieri, G., Cennamo, G. e Sannia, G., Remazol brilliant blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, p. 17-24.

Palmieri, G., et al., Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. s.l. : Springer-Verlag, 1993, Vol. 39, p. 632-636.

Palmieri, G., Giardina, P. e Sannia, G. Laccase-mediated remazol brilliant blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor. *Biotechnology Progress*. 2008, p. 1436-1441.

Paraíba, L. C. e Saito, M. L., Distribuição ambiental de poluentes orgânicos. *Pesq. Agrop. Bras*. 2005, p. 853-860.

Peralta Zamora, P., et al., Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Appl. Catal. B. Environ*. 2003, p. 131-144.

Pérez, P., et al., Purification and Characterization of a Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, p. 2607-2613.

Peter, M. G., Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science*. 1995, p. 629-640.

Robles, A., et al., Phenol-oxidase activity in strains of the hypomicete isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, p. 484-490.

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

Rodríguez, C. S., et al., Production of laccase by *Trametes hirsuta* grow in an immersion bioreactor. Application to decolourisation of dyes from a leather factory. *Engineering Life Science*. 2004, p. 233-238.

Roper, J., Sarkar, J. M. e Bollag, J. M., Enhanced enzymatic removal of chlorophenols in the presence of co-substrates. *Water Research*. 1995, p. 2720-2724.

Rosa, M. A., *Tratamento de efluente de indústria papeleira por processo combinado químico (ozonização) e enzimático (lacase)*. Instituto de Química, Universidade de Campinas. Campinas : s.n., 2004. Tese de Doutorado.

Rubio, J., Wilberg, K. e Nunes, D. G., Removal of phenol by enzymatic oxidation and flotation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2000, p. 4-7.

Russel, I. M., Burton, S. G., Development and determination of an immobilized-polyphenoloxidase bioprobe for the determination of phenolic pollutants in water, *Anal. Chim. Acta*, 389, 1999, p.161-170.

Sadana, A., A deactivation model for immobilized and soluble enzymes. *Biotechnology letters*, 2, 1980, p. 279-284.

Scriban, R., *Biotecnologia*. São Paulo : Manole, 1985.

Schmidell, W., et al., *Biotecnologia Industrial*. São Paulo : Edgard Blücher, 2001, Vol. I.

Setti, L., et al., Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999, p. 285-289.

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

Shuler, M. e Kargi, F., *Bioprocess Engineering*. New Jersey : Prentice Hall, 1992.

Skorosnki, E., Estudo cinético da síntese do octanoato de n-pentila catalisada pela enzima Lipozyme TL IM. *Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química*. Florianópolis : Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. Dissertação de Mestrado.

Souza, J. e Costa, S. W., Custo de produção de camarão marinho. Florianópolis : Instituto Cepa/SC/Epagri, 2003.

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

Tan, C. S., Khor, E., Tan, T. K, Wong, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination, *Talanta*, v.45, 1998, p.713-719.

Tatsumi, K., Wada, S. e Ichikawa, H., Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, p. 126-129.

Thakker, G. D., Evans, C. S. e Rao, K. K., Purification and characterisation of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992, p. 321-323.

Thurston, C. F., The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 1994, p. 19-26.

Trapp, S. e Matthies, M., *Chemodynamics and environmental modelling*. Hidelberg : Springer, 1998.

Tsioulpas, A., et al., Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* sp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresourse Technology*. 2002, p. 251-257.

Villas Bôas, D. M. F., Estudo microbiológico de sistemas de lodos ativados com ênfase nas bactérias degradadoras de fenol. *Escola Politécnica*. São Paulo : Universidade de São Paulo, 1999. Tese de Doutorado.

Villela, S. M. e Soares, C. H. L., Uso de enzimas lignolíticas na biodegradação de efluentes de indústrias de papel e celulose. Recife : Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2005.

Villela, S. M., Imobilização de lacases e seu uso na biotransformação de efluentes da indústria papeleira. *Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia*. Florianópolis : Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. Dissertação de Mestrado.

Whiteley, C. G. e Lee, D. J., Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, p. 291-316.

Wichers, H. J., et al., Purification and properties of a phenol oxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta*. 1984, p. 334-341.

Wiseman, A., *Handbook of Enzyme Biotechnology*. West Sussex : Ellis Horwood, 1985.

Xu, F., Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. 1996, p. 7608-7614.

Xue, C., et al., Enzymatic properties of phenoloxidase from *Pieris rapae* larvae. *Insect Science*. 2006, p. 13-17.

Yaropolov, A. G., Laccase: Properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 1994, p. 257-280.

Yu, J., Li, Q. e Delanoy, G., Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2005, p. 89-95.

Zhang, J., et al., Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, p. 54-59.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)