
A investigação descrita nesta tese foi efectuada no Departamento Têxtil da Universidade do Minho, Campus de Azurém e foi financiada pela *Fundação para a Ciência e Tecnologia* através de uma bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/8651/2002) e por fundos comunitários do projecto *ULTRATEC project* NMP2-CT-2003-505892.

À minha família,

AGRADECIMENTOS

Quero expressar o agradecimento sincero a todas as pessoas que me apoiaram e encorajaram tornando esta tese possível. Gostaria de expressar a minha gratidão ao meu supervisor, o Doutor Artur Cavaco-Paulo, pelo acompanhamento e apoio nos momentos difíceis e por me ter proporcionado a participação em inúmeros congressos científicos.

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos aos meus antigos e actuais colegas do Laboratório de Investigação em Acabamentos Têxteis, a Carla Joana, a Carla Manuela, o Zille, o Alexandre, a Rita, a Teresa, a Ereia, a Raquel, a Margarida, a Cristina, o Diego, a Su, a Ana Félix, a Marisa, a Patrícia, o Tzanko, a Florentina e a Filipa. Obrigado a todos pela amizade, compreensão e apoio nos momentos mais difíceis. Gostaria de agradecer particularmente à Carla Joana, à Carla Manuela, ao Zille, ao Tzanko, à Raquel pela ajuda e sugestões que em muito contribuíram para a realização desta tese.

Agradeço ao Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho pela disponibilidade de meios físicos e técnicos indispensáveis à realização dos trabalhos que suportam esta tese. Gostaria de agradecer à Fundação para a Ciência e Tecnologia o financiamento da minha bolsa.

À minha família e amigos pela confiança e apoio que sempre demonstraram, pela companhia nas lutas diárias e pelos momentos de felicidade que me proporcionaram ao longo deste percurso. Finalmente, gostaria de agradecer à minha esposa, Luísa e à nossa filha Margarida por me mostrarem que a vida faz mais sentido com as duas ao meu lado. Obrigado à Luísa por ser um grande pilar da família, pela compreensão e partilha das minhas angústias e pelo apoio através de palavras e actos que permitem ultrapassar muitas dificuldades. À minha filha, a flor mais querida e simpática do mundo, despertando para o novo dia sempre com um sorriso no rosto.

A todos, muito obrigado.

ABSTRACT

Ultrasound is sound with a frequency greater than the upper limit of human hearing. The application of ultrasound to liquid media is characterized by the occurrence of cavitation phenomena that results from the formation, growth and collapse of gas bubbles, subjected to alternating cycles of rarefaction and compression of waves. Cavitation promotes a number of physical and chemical processes, resulting from the release of high amounts of energy. These include local extremes of temperature and pressure and the formation and release of extremely reactive free radicals. In addition to this, the migration of the wave in the media and the formation of microjets due to bubble collapse, increase the mass transfer within the process.

The textile industry is responsible for producing large amounts of effluents with a high pollutant charge. Consequently, the development and introduction of technologies that make textile processes more environmental friendly is the goal of many studies, namely by the application of enzymatic treatments to process textile fibres. Therefore, this PhD thesis is aimed mainly at the study of the interaction of ultrasound with enzymatic systems for textile applications.

The enzyme used in the work was laccase (EC 1.10.3.2) from *Trametes villosa*. All the research was conducted at the best catalytic conditions for the enzyme, namely pH 5 and temperatures between 50 and 60°C. It was observed that the laccase half-life time was reduced by 80% for the conditions of intensity/frequencies tested: 50 W/20 kHz, 72 W/150 kHz e 47 W/500 kHz. Enzyme deactivation might be explained by the exposure of cystine residues that might further react with free radicals formed, driving to protein aggregation, which in turn can hinder completely the enzyme active site while at the same time decreasing enzyme stability.

The known deactivation of enzyme subjected to ultrasound would limit their simultaneous application. To mitigate that, the addition of polyethylene glycol (PEG) or polyvinyl alcohol (PVA) to the enzymatic solutions was studied. Polyols made the enzyme more stable, and a considerable increase in half-life time was attained, in comparison with the enzyme without additives, for all the conditions tested. The combination of enzymatic processes with ultrasound in several textile applications was evaluated, namely in the decolourization of indigo carmin dye, in the pre-treatment to

cotton bleaching and in wool coloration with polycatechol polymers.

When combining ultrasound and laccase stabilized with PVA, it was verified that the decolourization of indigo carmin, in one hour of treatment, varied between 65% and 77%, values that are high when comparing with the decolourization degree attained with laccase alone (20%). It was also observed that the highest decolourization degree was attained for a power input of 72 W and frequency of 150 kHz, a fact that was explained by two antagonist phenomena: the production and the release of free radicals to the reaction media.

Another application was studied with the intention of minimization of environmental problems arising from cotton fabric bleaching with hydrogen peroxide. When a pre-treatment step with laccase was included, a significant reduction in hydrogen peroxide concentration was achieved in the following bleaching stage. The transformation of cotton coloured matter into other compounds, due to enzymatic action, which might be more susceptible to peroxide oxidation and hence, easily degraded, is one possible explanation for this observation. Additionally, the pre-treatment enzyme/ultrasound performed increased fabric white index after peroxide bleaching. This could be due to the increased rate of the heterogeneous enzyme/fibre reaction or by the action of free radicals formed in cavitation.

When studying the sono-enzymatic synthesis of polycatechol, low frequency ultrasound (20 kHz) applied until a maximum power input of 50 W, increased the diffusion process and could have a positive effect in enzyme active centre, in the case of catechol polymerization. The hydroxyl radicals produced by ultrasound can react with the molecules produced by enzyme, increasing the degree of polymerization. Using chromatography techniques, it was concluded that the polymers formed by enzymatic reaction in the presence of ultrasound have higher molecular weight. Additionally, the efficient coloration of wool fabrics anticipates the possibility to develop coating techniques from the oxidation of phenolic compounds in moderate conditions of pressure and temperature.

In face of what is stated above, it is possible to conclude that sono-biotechnological processes might be a way of studying and developing more environmentally friendly processes, as an alternative or complementing the conventional textile processes.

RESUMO

Os sons de frequência acima da resposta da audição humana designam-se por ultra-sons. A aplicação de ultra-sons a meios líquidos caracteriza-se pela ocorrência de fenómenos de cavitação acústica, que resultam da formação, do crescimento e do colapso de bolhas gasosas, sujeitas à alternância dos ciclos de rarefacção e de compressão da onda. As condições verificadas na zona de cavitação favorecem um número considerável de fenómenos físicos e químicos, resultantes da libertação de elevadas quantidades de energia, do aumento da pressão e da formação e libertação de radicais livres, extremamente reactivos. Por outro lado, a propagação da onda no meio e a formação de microjactos, resultantes do colapso da bolha, propicia o aumento da transferência de massa. A indústria têxtil é responsável por gerar grandes quantidades de efluentes com elevada carga poluente. Consequentemente, o desenvolvimento e a introdução de tecnologias que tornem os processos têxteis ambientalmente mais favoráveis têm sido o âmbito de muitos estudos, nomeadamente na aplicação de tratamentos enzimáticos para o processamento de fibras têxteis. Assim sendo, este trabalho de doutoramento teve como principal objectivo a interacção dos ultra-sons com sistemas enzimáticos para aplicações têxteis.

A enzima utilizada nos trabalhos desenvolvidos nesta tese foi a lacase (EC 1.10.3.2) de *Trametes villosa*. Os estudos foram efectuados nas melhores condições de eficiência catalítica da enzima, nomeadamente pH 5 e temperaturas de 50 a 60°C. Verificou-se que a sonificação de soluções de lacase reduziu em cerca de 80 % o tempo de meia vida da enzima, para as condições de intensidade/frequência testadas: 50 W/20 kHz, 72 W/150 kHz e 47 W/500 kHz. A desactivação da enzima pode ser explicada pela exposição dos resíduos cisteína que poderão reagir com os radicais livres formados, levando à agregação da proteína, podendo bloquear completamente o centro activo, e ao mesmo tempo, diminuir a estabilidade da enzima.

A desactivação de enzimas sujeitas a ultra-sons limitaria a sua aplicação simultânea. Para obviar este facto, testou-se o efeito da adição de polietilenoglicol (PEG) ou poliálcool vinílico (PVA) às soluções enzimáticas. Os polióis tornaram a enzima mais estável, verificando-se um aumento considerável no tempo de meia vida, comparando com a enzima sem estabilizador, para todas as condições de ultra-sons testadas. A combinação de processos enzimáticos com ultra-sons em várias aplicações têxteis foi

avaliada posteriormente, nomeadamente na descolorização do corante índigo carmim, no pré-tratamento ao branqueio de tecidos de algodão e na coloração de tecidos de lã com polímeros de policatecol.

Combinando ultra-sons e lacase estabilizada com PVA, verificou-se que a percentagem de descolorização do corante índigo carmim, numa hora de tratamento, variou entre 65% e 77%, valores elevados comparativamente a descolorização só com lacase, que foi de 20%. Verificou-se ainda que a percentagem de descolorização mais significativa foi para a intensidade de 72 W e frequência de 150 kHz, explicada por dois fenómenos antagónicos: a produção e a libertação de radicais livres para o meio reaccional.

Outra aplicação estudada visava minimizar os problemas ambientais que advém do branqueio de tecidos de algodão com peróxido de hidrogénio. A realização de um pré-tratamento do tecido com lacase mostrou uma redução significativa na concentração de peróxido de hidrogénio a utilizar no branqueio subsequente. A transformação da matéria colorada do algodão noutros compostos, devido à acção da enzima, sendo estes mais susceptíveis à oxidação com peróxido e mais facilmente degradados, é uma hipótese possível para explicar este fenómeno. Por outro lado, o pré-tratamento enzima/ultra-sons aumentou o grau de branco do tecido após o branqueio com peróxido. Tal facto poderá ser explicado pela aceleração da reacção heterogénea enzima-fibra e pela acção dos radicais livres formados quando da cavitação.

Verificou-se no estudo da síntese sono-enzimática do policatecol que os ultra-sons de baixa frequência (20 kHz), aplicados até à intensidade máxima de 50 W, aumentam os processos de difusão e podem apresentar efeitos positivos no centro activo da lacase no caso da polimerização do catecol. Além disso, os radicais hidróxido produzidos por ultra-sons poderão reagir com as moléculas produzidas pela enzima, aumentando o grau de polimerização. Por cromatografia foi possível concluir que os polímeros formados pela reacção enzimática e na presença de ultra-sons apresentam maior peso molecular. Adicionalmente, a eficaz coloração de tecidos de lã antevê a possibilidade de desenvolver técnicas de revestimento a partir da oxidação de compostos fenólicos, em condições moderadas de temperatura e pH.

Face aos trabalhos realizados pode-se concluir que os processos sonobioteclógicos poderão ser uma via para o estudo e desenvolvimento de processos ambientalmente mais favoráveis, alternativos ou complementares aos processos têxteis convencionais.

ÍNDICE

ABSTRACT	VI
RESUMO	VIII
INDÍCE	X
INDÍCE DE FIGURAS	XIII
INDÍCE DE TABELAS	XV
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
1.1. Objectivos do estudo e linhas gerais da tese	3
1.2. Ultra-sons e a cavitação	5
1.2.1. Determinação da energia introduzida no reactor – Método calorimétrico	7
1.2.2. Parâmetros que afectam a cavitação	8
1.2.2.1. Frequência	8
1.2.2.2. Intensidade acústica	9
1.2.2.3. Pressão exterior	10
1.2.2.4. Temperatura do meio reacional	10
1.2.2.5. Propriedades do meio reacional	10
1.2.2.6. Propriedade dos gases	11
1.2.2.7. Catalisadores	11
1.3. Processos convencionais aplicados às fibras têxteis	12
1.3.1. Processamento de fibras de algodão	12
1.3.1.1. Desencolagem	13
1.3.1.2. Fervura alcalina	13
1.3.1.3. Branqueio	14
1.3.1.4. Mercerização	14
1.3.2. Processamento de fibras proteicas	15
1.3.3. Processamento de fibras sintéticas (poliéster, acrílica, poliamida)	15
1.3.4. Tingimento	15
1.3.5. Tratamento dos efluentes têxteis	16
1.4. Aplicação de tratamentos enzimáticos na indústria têxtil	18
1.4.1. Aplicação de enzimas no processamento de fibras de algodão	18
1.4.2. Aplicação de enzimas no processamento de fibras proteicas	19
1.4.3. Aplicação de enzimas no processamento de fibras sintéticas (poliéster, acrílica, poliamida)	20
1.4.4. Aplicação de enzimas no tratamento de efluentes têxteis	20
1.5. Aplicação dos ultra-sons na indústria têxtil	22
1.5.1. Tingimento de fibras têxteis	22
1.5.2. Lavagem	23
1.5.3. Descolorização de efluentes têxteis	23
1.5.4. Aplicações enzimáticas	23
1.6. Efeito dos ultra-sons sobre as enzimas	25

2. CARACTERIZAÇÃO DA LACASE EM ESTUDO	27
2.1. Introdução	27
2.2. Parte Experimental	28
2.2.1. Estabilidade da enzima a 50 e 60 °C	28
2.2.2. Concentração de proteína total	28
2.2.3. Medição da concentração de oxigénio	28
2.3. Resultados e Discussão	29
2.3.1. Monitorização da catálise heterogénea através da medição do consumo de oxigénio	30
2.4. Conclusão	32
3. BRANQUEIO DO ALGODÃO COM LACASES	34
3.1. Introdução	34
3.2. Parte Experimental	35
3.2.1. Enzimas e substrato têxtil	35
3.2.2. Preparação das amostras de tecido de algodão	35
3.2.3. Pré-tratamento das amostras com lacase de <i>Trametes villosa</i> a 60 °C	35
3.2.4. Pré-tratamento das amostras com lacase de <i>Trametes hirsuta</i>	35
3.2.5. Lavagem das amostras pré-tratadas	36
3.2.6. Branqueio convencional com peróxido de hidrogénio	36
3.2.7. Grau de branco do material têxtil	36
3.2.8. Descolorização de corantes têxteis com lacase	36
3.3. Resultados e Discussão	37
3.3.1. Efeito do pré-tratamento com lacases no branqueio de tecido de algodão	37
3.3.2. Descolorização de corantes têxteis com lacase	39
3.4. Conclusão	41
4. ESTABILIZAÇÃO E CAPACIDADE DE DESCOLORIZAÇÃO DA LACASE DE <i>TRAMETES VILLOSA</i> NUM MEIO SUJEITO A ULTRA-SONS	43
4.1. Introdução	43
4.2. Parte Experimental	44
4.2.1. Reagentes	44
4.2.2. Concentração de proteína	44
4.2.3. Actividade enzimática da lacase	44
4.2.4. Determinação dos radicais hidróxido produzidos por cavitação acústica	44
4.2.5. Sonificação de soluções de proteína (BSA e lacase)	45
4.2.6. Electroforese SDS-PAGE	45
4.2.7. Cromatografia por exclusão de tamanhos	46
4.2.8. Intensidade acústica - método calorimétrico	46
4.2.9. Equipamento de ultra-sons de 150 kHz e 500 kHz	46
4.2.10. Equipamento de ultra-sons de 20 kHz	47
4.2.11. Descolorização do indigo carmim com ultra-sons e/ou enzima	47
4.3. Resultados e Discussão	47
4.3.1. Sonificação de soluções de lacase	48
4.3.2. Efeito dos ultra-sons na formação de agregados	50
4.3.3. Descolorização do corante indigo carmim	53
4.4. Conclusão	57

5. BRANQUEIO DE ALGODÃO COMBINANDO ULTRA-SONS E LACASE	59
5.1. Introdução	59
5.2. Parte experimental	60
5.2.1. Actividade enzimática da lacase	60
5.2.2. Equipamento de ultra-sons	60
5.2.3. Estabilidade da lacase na presença de ultra-sons	60
5.2.4. Combinação de lacases e ultra-sons no branqueio de algodão	61
5.3. Resultados e discussão	62
5.3.1. Branqueio de tecido de algodão	63
5.4. Conclusão	66
6. POLIMERIZAÇÃO SONO-ENZIMÁTICA DO CATECOL	68
6.1. Introdução	68
6.2. Parte experimental	69
6.2.1. Reagentes	69
6.2.2. Polimerização do catecol com ultra-sons e enzima	69
6.2.3. Tratamento prévio do tecido de lã	69
6.2.4. Coloração de tecido de lã com polímero de catecol	69
6.2.5. Cromatografia por exclusão de tamanhos	70
6.3. Resultados e discussão	71
6.4. Conclusão	75
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	77
REFERÊNCIAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Formação, crescimento e colapso da bolha formada por ultra-sons	5
Figura 1.2 - Equação simplificada da formação do ião 2-hidroxitereftalato a partir do ácido tereftálico sujeito ao ataque dos radicais hidróxido (Mason et al. 1994)	6
Figura 1.3 - Estrutura morfológica da fibra do algodão (Nevell e Zeronian 1985).	12
Figura 1.4 - Estrutura química dos principais cromóforos.	16
Figura 2.1 - Estabilização da lacase às temperaturas de 50 e 60 °C.	29
Figura 2.2 - Consumo de oxigénio para tecidos de algodão tratados com lacase.	30
Figura 3.1 - Efeito da lacase de <i>Trametes villosa</i> no branqueio conjunto com peróxido de hidrogénio de tecido de algodão.	36
Figura 3.2 - Aumento do grau de branco do algodão após pré-tratamento com a lacase (60,7 kDa) da <i>Trametes hirsuta</i> durante 1 hora a 50 °C e a condições diferentes de incubação.	37
Figura 4.1 - Formação de radicais hidróxido, OH [•] (μmol/L) em função da energia introduzida no sistema (reactor) para as frequências de 20 kHz (■), 150 kHz (●) e 500 kHz (▲).	47
Figura 4.2 - Electroforese SADS-PAGE da solução de lacase e BSA tratada com ultra-sons, a 150 kHz e 72 W. Poços: Std – marcadores de massa molecular conhecida, 0 a 6 h – Amostras de soluções tratadas com ultra-sons de 0 a 6 horas, respectivamente.	50
Figura 4.3 - Perfil de eluição por HPLC da lacase nativa (linha escura) e lacase tratada com ultra-sons a 150 kHz por 6 h (linha clara).	51
Figura 4.4 - Descolorização do indigo carmim após tratamento com ultra-sons. US – tratamento só com ultra-sons; Lacase – tratamento só com lacase; Lacase+US – tratamento com ultra-sons e lacase; Lac/PVA+US – tratamento com ultra-sons e lacase estabilizada com PVA.	53
Figura 4.5 - Efeito sinérgico do tratamento com ultra-sons e a lacase estabilizada com PVA.	55
Figura 5.1 - Esquema experimental: (1) sonda de ultra-sons; (2) gerador; (3) medidor de oxigénio; (4) sonda de oxigénio; (5) sonda de temperatura; (6) reactor termostaticado e hermeticamente fechado; (7) amostra; (8) equipamento de agitação; (H) distância entre a amostra e a sonda; (h) distância da amostra ao fundo do reactor.	60

Figura 5.2 - Actividade da lacase depois da aplicação de ultra-sons de frequência de 20 kHz e intensidades de 7, 30 e 50 W em tampão acetato pH 5, a 50 °C. A actividade a 100 % corresponde a 1000 U **62**

Figura 5.3 - Efeito da lacase (360 U) e/ou ultra-sons (7W, 20 kHz) no pré-tratamento do algodão a pH 5 a 50 °C, durante 30 minutos. Os graus de branco dos tecidos de algodão foram determinados antes e depois do branqueio com peróxido de hidrogénio. A linha de base ($\Delta W^*=0$) representa o tratamento com tampão, sem enzima, nas mesmas condições de agitação e ultra-sons. **63**

Figura 5.4 - Consumo de oxigénio no tratamento de tecido de algodão com apenas lacase ou combinando lacase e ultra-sons de 7 W, a 20 kHz, a pH 5, e à temperatura de 50 °C. A enzima foi estabilizada com 10 % p/v de PVA. **64**

Figura 6.1 - Polimerização sono-enzimática do catecol com a lacase, a 50°C no sistema de ultra-sons de 20 kHz, a várias intensidades: 7 W (○), 30 W (●), 50 W (Δ), sistema com agitação (controlo) O. **73**

Figura 6.2 - Cromatogramas de HPLC da polimerização do catecol com a lacase de *Trametes villosa*, a 50 °C no sistema de agitação (linha contínua) e no sistema de ultra-sons a 20 kHz e 50 W (linha tracejada). **74**

Figura 6.3 - Coloração sono-enzimática da lã com polímero de catecol a diferentes intensidades de ultra-sons, com (▲) e sem (●) lacase. **76**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Efeito do pré-tratamento com lacase na redução da quantidade de peróxido de hidrogénio.	38
Tabela 3.2 - Efeito do pré-tratamento com lacase na descolorização oxidativa de tecidos, colorados com os corantes reactivos: Yellow 160, Granden 19, Orange 16.	39
Tabela 4.1 - Tempo de meia vida (estimados) ($t_{1/2}^*$) para a lacase nativa e lacase estabilizada com 10% de poli(etileno glicol) (PEG) e poli(álcool vinílico) (PVA), após tratamento com ultra-sons.	48
Tabela 4.2 - Quantidade de resíduos cisteína para as proteínas estudadas.	52
Tabela 5.1 - Actividade relativa da lacase após tratamento com ultra-sons.	65
Tabela 6.1 - Pesos moleculares médios (M_{wp}) e grau médio de polimerização (Dp_p) dos polímeros de catecol. Os valores dos pesos moleculares foram estimados recorrendo à recta de calibração de equação: $\log Mw = (-2,2 \pm 0,2) (\text{tempo de retenção} \times \text{caudal} / V_0 + (5,4 \pm 0,3))$.	75

1

Introdução Geral

1. Introdução Geral

A indústria têxtil é conhecida por gerar efluentes com características muito nefastas para o ambiente. A cor é a característica mais visível, em muitos recursos hídricos, que recebem os efluentes depois de um tratamento deficitário ou sem qualquer tratamento. O despertar para o problema e o surgimento de uma nova consciência assente no sinergismo entre o processo industrial e o ambiente, poderá mudar a situação de uma indústria com elevado peso socio-económico.

Os efluentes têxteis caracterizam-se por apresentarem uma elevada carência química de oxigénio (CQO) e carência bioquímica de oxigénio (CBO), uma condutividade elevada, pH elevado e uma forte coloração (Laing 1991, Barclay e Buckley 2000). Vários processos físicos, químicos e biológicos são actualmente utilizados na remediação dos efluentes têxteis (Gogate e Pandit 2004). O tratamento de efluentes têxteis é por vezes muito difícil e dispendioso, deste modo deve-se privilegiar a introdução de novos processos que permitam reduzir a quantidade de efluentes gerados e a sua carga poluente.

O carácter hidrofóbico, das fibras sintéticas e das fibras naturais como o algodão e a lã é limitativo para o sucesso do tingimento e dos acabamentos finais. Os tratamentos prévios como a fervura alcalina, o branqueio e a mercerização são maioria realizados em condições extremas de pH e temperatura, onde os produtos químicos são adicionados em excesso, necessitando posteriormente de ser removidos por lavagem com água e em alguns casos com surfactantes, aumentando o volume de efluente a ser tratado.

A obtenção de um produto de qualidade com a introdução de novas tecnologias no processamento de fibras têxteis, que visa a redução do tempo de tratamento, do consumo de água, de químicos e de energia, é uma necessidade premente. Os tratamentos enzimáticos, como alternativa aos convencionais têm sido muito estudados. A especificidade das fibras e das enzimas no tratamento enzimático, poderá acarretar dois problemas distintos. A enzima poderá actuar numa parte da fibra indesejável, por exemplo, as proteases utilizadas no tratamento de fibras de lã poderão afectar a

estrutura mais interna da fibra, traduzindo-se na perda de peso e de resistência à tensão (Silva CJS *et al.* 2005). Os tratamentos a molhado apresentam problemas de transferência de massa do meio aquoso para o interior da fibra e do tecido, pelo que os tratamentos enzimáticos não são excepção

Os efeitos dos ultra-sons resultantes do fenómeno de cavitação, promovem a transferência de massa em tratamentos a molhado. Estes efeitos serão descritos em maior detalhe no subcapítulo 1.1.

Vários estudos mostraram ser possível a “coexistência” das enzimas com os ultra-sons no entanto, outros mostraram uma perda significativa da capacidade catalítica da enzima com ultra-sons. A introdução no meio reacional de polialcoois como o poli(álcool vinílico) (PVA) e o poli(etileno glicol) (PEG) poderá trazer benefícios, nomeadamente na estabilização da enzima, minimizando os efeitos adversos dos ultra-sons.

1.1. Objectivos do estudo e linhas gerais da tese

O objectivo desta tese é estudar a aplicação simultânea dos ultra-sons e enzimas nos processos da indústria têxtil, visando o aproveitamento das particularidades e vantagens de cada tecnologia. Os efeitos de cavitação dos ultra-sons e o aumento da transferência de massa nos sistemas heterogénicos, promovendo o contacto da enzima com a fibra facilitará a acção da enzima. Por outro lado, a adição de polialcoois à solução permite contornar a perda de actividade enzimática devido à formação de agregados proteicos. Pretende-se com a aplicação combinada de ultra-sons/lacase desenvolver processos que permitam reduzir a quantidade e a carga poluente dos efluentes têxteis.

Na primeira parte da tese far-se-á uma abordagem geral e sucinta do suporte teórico de apoio ao trabalho. No Capítulo 1, serão reportadas referências aos principais parâmetros que afectam a cavitação e a formação de radicais livres. Abordar-se-ão os principais processos têxteis convencionais associados às principais fibras têxteis. No mesmo capítulo são apresentados sucintamente os tratamentos enzimáticos actualmente aplicados e estudados. Dar-se-á a conhecer as aplicações dos ultra-sons

estudadas e desenvolvidas para a aplicação na indústria têxtil como o tingimento, a lavagem, a degradação de efluentes. Por último, aborda-se-á os efeitos dos ultra-sons sobre as enzimas.

No Capítulo 2 caracteriza-se-á a enzima, estudando-se as condições óptimas de pH e temperatura. As substâncias presentes no tecido de algodão poderão ser substratos da enzima uma vez que, a concentração de oxigénio em solução decresce quando as amostras de tecido são tratadas com uma solução de lacase.

No capítulo 3 estudar-se-ão os benefícios do pré-tratamento enzimático dos tecidos de algodão, onde se verificará uma redução na quantidade de peróxido de hidrogénio no branqueio químico subsequente.

No Capítulo 4 investigar-se-ão os efeitos dos ultra-sons na lacase. A actividade da enzima é seriamente afectada na presença dos ultra-sons. As temperaturas elevadas e os radicais livres formados pelo colapso das bolhas são responsáveis pelo decréscimo da actividade. No entanto, a adição de estabilizadores como o PVA e o PEG minimiza os efeitos dos ultra-sons para intensidades elevadas.

No Capítulo 5, dando seguimento ao estudo mencionado no capítulo 3, estudar-se-ão os benefícios dos ultra-sons no pré-tratamento com lacase no branqueio de tecidos de algodão.

No Capítulo 6 investigar-se-á a coloração de tecidos de lã com polímeros de policatecol obtidos por reacção enzimática com a lacase. A formação de polímero e a coloração são incrementados com a aplicação dos ultra-sons.

Finalmente, no Capítulo 7, serão apresentadas as conclusões gerais e as sugestões e perspectivas para trabalhos futuros.

interface gás-líquido e o líquido circundante (Tuulmets 1997, Vajnhndl e Le Marechal 2005, Leighton 1995). Consequentemente, os fenómenos físicos e químicos podem ocorrer no interior da bolha, no líquido circundante ou simultâneamente em ambos (Tuulmets 1997).

A temperatura no interior e na zona de cavitação poderá ser superior a 5000°C e a 2000°C respectivamente e a pressão poderá atingir os 100 MPa aquando do colapso da bolha, originando microjactos muito intensos (Suslick 1990, Suslick 1989, Vajhel e Le Marechal 2005). Por outro lado, a libertação de radicais livres, extremamente reactivos, participam e promovem enúmeras reacções químicas (Suslick 1990, Suslick *et al.* 1986, Pestman *et al.* 1994, Shah *et al.* 1999, Pandit e Moholkar 1996, Thompson e Doraiswamy 1999, Adewuyi *et al.* 2001).

Os principais radicais formados em meio aquoso são os radicais hidróxido (OH^\bullet) e os radicais hidrogénio (H^\bullet) segundo a equação: $\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{US}} \text{OH}^\bullet + \text{H}^\bullet$. Os radicais hidróxido poderão formar o peróxido de hidrogénio, segundo a equação: $\text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. Por outro lado, na presença de oxigénio poderão formar-se o radical peróxido e posteriormente o peróxido de hidrogénio segundo seguintes equações: $\text{H}^\bullet + \text{O}_2 \longrightarrow \text{HO}_2^\bullet$ e $\text{HO}_2^\bullet + \text{HO}_2^\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ respectivamente (Margulis 1990, Mason *et al.* 1990).

A quantificação dos radicais hidróxido (OH^\bullet) originados e sua libertação para o meio reacional é muito importante para a caracterização dos processos sonoquímicos. Para o efeito, foram desenvolvidas várias técnicas, nomeadamente a determinação por ressonância (Mason *et al.* 1994) e o método de Fricke (Mason *et al.* 1994, Fang *et al.* 1996, Price e Lenz 1993). Este último consiste na oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} em meio ácido segundo a equação: $\text{Fe}^{2+} + \text{OH}^\bullet \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$ (Fang *et al.* 1996). No entanto, a oxidação poder-se-à não se dever exclusivamente ao radical hidróxido, mas também ao radical peróxido, ao radical hidrogénio e ao peróxido de hidrogénio (Price e Lenz 1993). Assim sendo, para minimizar os erros associados à determinação dos radicais hidróxido foi desenvolvido o método do ácido tereftálico. O ácido tereftálico em meio alcalino dissocia-se em aniões tereftalatos, os quais reagem com os radicais OH^\bullet , formando iões 2-hidroxitereftalatos, segundo a equação simplificada apresentada na figura 1.2.

Por outro lado, os iões 2-hidroxitereftalatos apresentam fluorescência, podendo-se estimar os radicais hidróxido por espectrofluorescência (Mason *et al.* 1994, Fang *et al.* 1996, Price e Lenz 1993). Ao contrário do método de Fricke, este descarta a acção dos outros radicais e é um método muito sensível para estimar a formação dos radicais hidróxido (Mason *et al.* 1994, Fang *et al.* 1996).

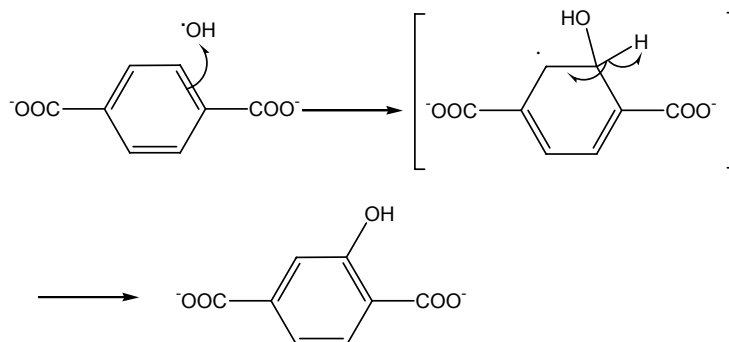


Figura 1. 2 - Equação simplificada da formação do ião 2-hidroxitereftalato a partir do ácido tereftálico sujeito ao ataque dos radicais hidróxido (Mason *et al.* 1994).

O método consiste na sonificação de uma solução de ácido tereftálico, medindo a fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 315 nm ou de 345 nm e analisando o comprimento de onda de emissão a 425 nm. (Mason *et al.* 1994, Price e Lenz 1993, Fang *et al.* 1996). Posteriormente, traça-se a recta de calibração da intensidade de fluorescência de soluções de concentração conhecida de 2-hidroxitereftalato. Finalmente, conhecendo-se o valor da intensidade, determina-se a concentração de radicais hidróxido libertados (Mason *et al.* 1994).

1.2.1. Determinação da energia introduzida no reactor – Método calorimétrico

A energia introduzida no reactor é outro parâmetro importante na caracterização do processo sonoquímico. O método calorimétrico é o mais utilizado e consiste na medição da temperatura em intervalos de tempo regulares de um determinado volume de água conhecido, sujeito aos ultra-sons. Posteriormente, traça-se uma tangente à curva que representa o aumento da temperatura em função do tempo (dT/dt) (Mason *et al.* 1994).

A intensidade é determinada pela equação: intensidade = $(dT/dt)C_pM$, onde C_p é o

calor específico da água ($\text{J kg}^{-1}\text{K}^{-1}$) e M é a massa da água (Kg) (Mason *et al.* 1994). A intensidade poderá ser expressa em watts (W), watts por área de transdutor (Wcm^{-2}) ou watts por volume de líquido sonificado (Wcm^{-3}).

1.2.2. Parâmetros que afectam a cavitação

Os fenómenos da cavitação verificam-se simultaneamente em pequenas regiões do reactor. No entanto, a performance de um reactor, do ponto de vista sonoquímico, está relacionada com vários parâmetros como a frequência, a intensidade, a temperatura do líquido, as propriedades físico-químicas do meio reacional, a natureza dos gases dissolvidos, entre outros. A optimização de todos estes parâmetros permitirá tirar o máximo proveito do reactor.

1.2.2.1. Frequência

A cavitação é muito dependente da frequência, contudo o valor óptimo desta poderá depender de outros factores como: a intensidade, as características do meio reacional, os gases presentes no meio reacional, as condições operativas do reactor, etc.. Segundo vários autores, a operacionalidade de um reactor é mais difícil quando este utiliza frequências acima dos 200 kHz (Mason 1992, Berlan e Mason 1992). A operação contínua e em grande escala com elevadas frequências conduz a uma considerável erosão da superfície do transdutor, devido à ocorrência de um elevado número de eventos cavitacionais num intervalo de tempo muito reduzido e numa região muito próxima do transdutor (Hung e Hoffmann 1999, Crum 1995), comparando com as frequências mais baixas (Gogate e Pandit 2004). A utilização de reactores com múltiplos transdutores de baixas frequências reduz deste modo a erosão da superfície dos transdutores, obtendo-se fenómenos de cavitação comparáveis aos que acontecem em reactores que operam a uma frequência elevada (Tatake e Pandit 2002, Sivakumar *et al.* 2002). Como referido anteriormente, os radicais hidróxido são responsáveis por inúmeras reacções e a formação destes é influenciada pela frequência. Pétrier e colaboradores, estudaram o efeito da frequência de 20 e de 514 kHz na formação de peróxido de hidrogenio e na oxidação do iodeto de potássio. Os resultados mostraram que a formação do peróxido de hidrogénio e a formação de iodo foram superiores para a frequência de 514 kHz na presença de oxigénio. No entanto, o meio saturado com árgon favorece a produção de peróxido e a formação de iodo para a frequência de 20 kHz (Petrier *et al.* 1992). A

presença de ar na solução de iodeto de potássio aumentou cerca de três vezes a formação de iodo comparada com a solução saturada com argon para a frequência de 900 kHz. No entanto, para a frequência de 20 kHz a formação de iodo praticamente não foi influenciada pela alteração da atmosfera gasosa (Enterazi e Kruus 1994). A formação de iodo na presença de ar foi aproximadamente trinta vezes superior para a frequência de 900 kHz comparada com a frequência de 20 kHz (Entezari e Kruus 1994).

1.2.2.2. Intensidade acústica

O aumento da intensidade acústica acarretará um aumento da amplitude acústica e da pressão de colapso. Deste modo, mais rápido e violento será o colapso das mesmas. No entanto, deverá verificar-se uma amplitude da pressão acústica mínima que permita o início da cavitação.

O aumento da intensidade acústica, aumenta o número e o tamanho das bolhas, tornando a cavitação independente do tamanho inicial das mesmas. No entanto, a intensidade não poderá aumentar indefinidamente, isto é, perante intensidades acústicas elevadas, a bolha cresce demasiado e esta poderá não ter tempo suficiente para colapsar no ciclo de rarefacção seguinte. Estudos realizados por Mason e colaboradores, mostraram a existência de uma proporcionalidade directa entre a formação de radicais hidróxido e a intensidade introduzida no reactor, isto é, um aumento da intensidade está associada a um aumento na formação de radicais (Mason *et al.* 1994). No entanto, tal como para a frequência, é necessário encontrar a intensidade que optimize o processo sonoquímico (Mason 2000).

Henglein e Guitierrez monitorizaram a formação do iodo a partir da oxidação do iodeto de potássio por espectrofotometria. Nestes estudos, foi utilizada a frequência de 1 MHz e foram aplicadas várias intensidades acústicas à solução de iodeto de potássio em contínuo ou em pulsos com vários intervalos de tempo e para várias razões on/off. Os resultados mostraram que a formação de iodo apresentou um máximo para a intensidade de 80 W, verificando-se um aumento praticamente linear na formação do iodo para o intervalo de intensidades de 10 a 50 W, a partir da intensidade de 80 W verificou-se uma diminuição e a partir dos 100 W a formação de iodo decresce para valores próximos do zero (Gutiérrez e Henglein 1990). No caso das soluções sonificadas

por pulsos, a formação de iodo apresenta um comportamento idêntico à aplicação de ultra-sons em contínuo. No entanto, a diminuição abrupta na formação de iodo verificou-se para intensidades mais baixas, efeito mais pronunciado com o aumento da razão de pulso (Gutiérrez e Henglein 1990).

Kimura e colaboradores, mostraram que para frequências de 19, 20 e 48 kHz, a formação de iodo (reação do KI com CCl₄) aumenta com o aumento da intensidade introduzida no reactor (Kimura *et al.* 1996). No entanto, a intensidade máxima aplicada no estudo foi de 80 W. Todavia, comparando as curvas obtidas por Kimura e Gutiérrez é visível um comportamento similar para as intensidades de ultra-sons mais baixas (Kimura *et al.* 1996, Gutiérrez e Henglein 1990).

1.2.2.3. Pressão exterior

A influência do aumento pressão externa sobre a cavitação, nomeadamente na sonoquímica não tem sido consensual. É de se esperar um aumento da intensidade do colapso com o aumento da pressão externa. No entanto, o início da cavitação, isto é, a formação das microbolhas poderá ser afectada pela pressão exterior elevada (Gogate e Pandit 2004).

1.2.2.4. Temperatura do meio reacional

A temperatura do meio reacional é o parâmetro que mais facilmente poderá ser manipulado e controlado. A intensidade da cavitação, é favorecida pelas temperaturas baixas. O aumento da temperatura reduz a intensidade de colapso, tal facto poderá dever-se ao aumento da pressão de vapor e à difusão de vapor para o interior da bolha (Peters 1996, Ince *et al.* 2001, Mason 1999). Estudos realizados por Didenko e colaboradores mostraram uma diminuição da intensidade da sonoluminescência com o aumento da temperatura para as frequências de 22 kHz, 337 kHz, 1,1 MHz (Didenko *et al.* 1994). Podendo a diminuição da sonoluminescência dever-se à diminuição da violência do colapso das bolhas (Didenko *et al.* 1994).

1.2.2.5. Propriedades do meio reacional

As propriedades do meio poderão influenciar a cavitação, desde a formação da bolha até ao colapso, por outro lado, poderão afectar outros parâmetros abordados como a

energia, a frequência e a temperatura. A energia necessária para iniciar a cavitação diminui em meios com baixa viscosidade e tensão superficial. Por outro lado, a pressão de vapor moderada favorece a intensidade do colapso da bolha (Suslick 1986, Mason 1990, Gogate e Pandit 2004, Gogate 2002).

1.2.2.6. Propriedade dos gases

A alteração da atmosfera gasosa do meio reacional poderá influir positiva ou negativamente na performance dos processos sonoquímicos (Petrier *et al.* 1992, Enterazi e Kruus 1994). A escolha dos gases a injectar no meio reacional terá que ter em conta as propriedades intrínsecas dos mesmos como a solubilidade, a condutividade térmica, o calor específico, a razão politrópica, ou seja a quantidade de calor libertado durante a compressão adiabática (Gogate e Pandit 2004).

A presença de gases monoatômicos como o hélio, o néon e o argon favorecem a intensidade de colapso das bolhas. Por outro lado, os gases diatômicos como o azoto e o oxigénio e os poliatômicos como o dióxido de carbono, reduzem a intensidade do colapso. Os gases solúveis beneficiam a formação de bolhas mas, com o aumento da solubilidade do gás, maior é a difusão para o interior da bolha, reduzindo a intensidade do colapso (Mason 1999, Peters 1996, Adewuyi 2001, Mason 1990, Gogate e Pandit 2004).

1.2.2.7. Catalisadores

A adição de catalisadores como, o TiO_2 , o NiSO_4 , o CCl_4 , o $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, o CuSO_4 e sais como o NaCl ao meio reacional poderão favorecer os processos sonoquímicos (Mason *et al.* 1996, Seymore e Gupta 1997, Shirgaonkar e Pandit 1997, Hung e Hoffmann 1998, Nagata *et al.* 2000, Pandit *et al.* 2001, Sivakumar *et al.* 2002). A concentração de catalisador terá que ser avaliada tendo em consideração as propriedades e o efeito barreira à propagação da onda, podendo limitar a dissipação efectiva da energia (Gogate *et al.* 2002).

1.3. Processos convencionais aplicados às fibras têxteis

Os tratamentos a que as fibras, os fios e os tecidos são tradicionalmente sujeitos são realizados em condições muito severas, resultando efluentes com características muito adversas para o meio ambiente. A composição dos efluentes é muito variada e complexa, contendo corantes, impurezas naturais extraídas das fibras e outros produtos como dispersantes, surfactantes, ácidos, álcalis, sais e alguns metais pesados (Laing 1991). Os efluentes têxteis caracterizam-se por apresentarem uma elevada carência química e bioquímica de oxigênio, uma condutividade, pH elevado e forte coloração (Barclay e Buckley 2000).

1.3.1. Processamento de fibras de algodão

O algodão é a fibra celulósica natural com maior aplicação na indústria têxtil. Na estrutura da fibra de algodão distingue-se: a cutícula externa, a parede primária, a parede secundária e o lúmen (Hardin e Kim 1998). A cutícula e parede primária são constituídas por cerca de 55-60 % polissacáridos (celulose, xiloglucanos, hemiceluloses e pectinas), 8-10% de glicoproteínas e 8-15 % de ceras. A parede secundária é constituída por mais de 90 % de celulose, com um grau de polimerização e cristalinidade superior à celulose da parede primária. Os polímeros de celulose estabelecem um grande número de ligações hidrogénio e formam microfibrilas muito estáveis. Por outro lado, o lúmen é composto por compostos azotados (Galante e Formantici 2003, Cellulosic Dyeing, ed. John Shore pag. 4 e 5). Os lípidos, as ceras e os ácidos gordos da cutícula e da parede primária são responsáveis pelas características hidrofóbicas do algodão (Freytag e Dize 1983). A aderência destas substâncias à celulose deve-se em grande parte às pectinas (Galante e Formantici 2003).

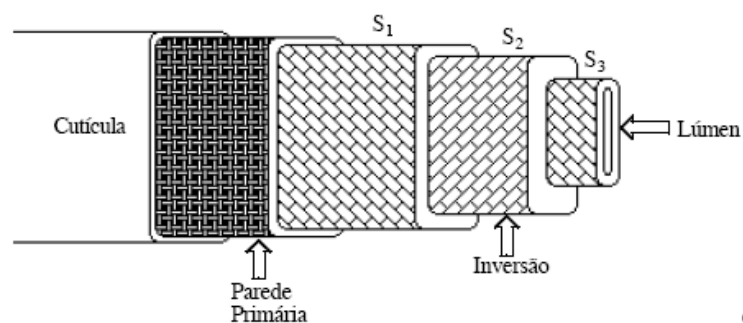


Figura 1.3 - Estrutura morfológica da fibra do algodão (Nevell e Zeronian 1985).

A hidrofobicidade dos tecidos de algodão deve-se também a produtos encolantes utilizados durante o processo de fiação, de tecelagem ou tricotagem. O encolante mais utilizado é o amido, podendo-se também utilizar em conjunto outros encolantes naturais como a goma, os dextrans e a gelatina ou sintéticos como o PVA, a carboximetilcelulose (CMC), os poliacrilatos e hidroxietilcelulose.

De forma a conferir ao tecido características adequadas para o tingimento, para a estapagem e acabamentos finais, este é sujeito a conjunto de tratamentos dos quais se destacam, a descolagem, a fervura alcalina e o branqueio.

1.3.1.1. Descolagem

O processo de descolagem mais antigo, mais simples e mais barato é a fermentação bacteriana. Actualmente, não é muito utilizado uma vez que o tratamento não é uniforme e com a impossibilidade de controlar rigorosamente o processo, poder-se-á verificar a degradação da celulose. Os processos actualmente usados, designam-se por hidrólise ácida e descolagem oxidativa. A descolagem poderá ser realizada em condições ácidas, utilizando-se ácido clorídrico ou sulfúrico ou soluções alcalinas tais como o peróxido de hidrogénio, perdisulfato de amónio ou o bromito de sódio. A lavagem posterior dos tecidos para a remoção do ácido ou da base e a degradação da fibra são desvantagens a apontar aos processos químicos mencionados. No entanto, mediante condições controladas poderão apresentar um efeito branqueador.

A descolagem enzimática é um método no que concerne à degradação da fibra mais seguro que os anteriores, no entanto implicam custos mais elevados. As enzimas degradam o amido, originando moléculas menores de carboidratos solúveis em água, sendo facilmente removidos por lavagem.

1.3.1.2. Fervura alcalina

A fervura alcalina permite remover gorduras, ceras, pectinas e proteínas do tecido de algodão, tendo como objectivo aumentar a hidrofiliade e o branco do tecido. (Batra 1985, Hsieh *et al.* 1996, Ethers *et al.* 1999, Tzanko *et al.* 2001, Galante e Formantici 2003). Este processo gera elevadas quantidades de efluentes com características muito alcalinas. Por outro lado, acarreta danos na celulose resultando num decréscimo da resistência à

tracção dos tecidos (Buschle-Diller *et al.* 1998). A utilização de solventes não polares em sistemas fechados são utilizados como alternativa, contudo somente as ceras são removidas (Buschle-Diller *et al.* 1998, Hull 1980). As lavagens posteriores originam grandes quantidades de efluentes com um pH elevado, uma carência química de oxigénio (CQO) elevada, sólidos dissolvidos e uma coloração escura (Barclay e Buckley 2000).

1.3.1.3. Branqueio

O branqueio é o tratamento posterior à fervura alcalina, onde os corantes naturais que permanecem na fibra são eliminados. O branqueio tradicional é químico, utilizando-se oxidantes como o hipoclorito de sódio, o clorito de sódio, o peróxido de hidrogénio, o ácido peracético (Prabaharan *et al.* 2000, Krizman e Kovac 2005) e redutores como o hidrossulfito de sódio e o dióxido de sódio (Cellulosic Dyeing, ed. John Shore pag. 117). O peróxido de hidrogénio apresenta vantagens do ponto de vista técnico e ecológico quando comparado com os outros agentes de branqueio, como o hipoclorito de sódio e clorito de sódio (Hebeish *et al.* 2001). Tecnicamente, poderá ser aplicado a quente e a frio, podendo ser activado de várias formas (alcális, ácido sulfúrico, radiação ultra-violeta, metais de transição). O mais usado é o hidróxido de sódio, onde o peróxido de hidrogénio na presença de hidróxido de sódio é decomposto em iões peróxido ($H_2O_2 + OH^- \longrightarrow HO_2^- + H_2O$). (Cellulosic Dyeing, ed. John Shore pag. 125). O branqueio origina efluentes com um pH elevado e sólidos suspensos (Barclay e Buckley 2000).

1.3.1.4. Mercerização

A mercerização é o conjunto de procedimentos que originam nas fibras celulósicas uma alteração na sua estrutura interna e morfológica, traduzindo-se externamente no aumento do brilho e alteração das suas dimensões, e internamente num aumento da reactividade para com determinados produtos químicos e corantes. A mercerização consiste no tratamento de tecidos com hidróxido sódio de concentração elevada. A mercerização origina efluentes com um pH elevado e sólidos suspensos (Barclay e Buckley 2000). O desenvolvimento tecnológico proporcionou novas técnicas de mercerização, como a utilização de amoníaco líquido a (-35 °C), processo menos poluidor, pois permite a recuperação do amoníaco. (Cellulosic Dyeing, ed. John Shore pag. 115 e 116).

1.3.2. Processamento de fibras proteicas

A lã é uma fibra natural complexa composta principalmente por proteínas (97%) e lípidos (1%), com uma estrutura morfológica heterogénea (Heine e Höcher 1995) Na fibra de lã distinguem-se duas partes principais: a cutícula e o córtex. O córtex contém células fusiformes, separadas umas das outras por uma membrana. As células da cutícula que cobrem o córtex são subdividas em três camadas, a camada mais próxima do córtex que se designa por endocutícula, a camada intermédia por exocutícula e a camada mais externa por epicutícula (Plowman 2003, Feuhelman 1997). A cutícula é conhecida pela hidrofobicidade, pela resistência aos ácidos, aos alcalis, aos oxidantes, aos redutores e às enzimas (Negri *et al.* 1993). Consequentemente, os tecidos de lã são tratados quimicamente com o objectivo de alterar as propriedades da superfície da fibra, reduzindo a sua natureza hidrofóbica e melhorando as suas propriedades têxteis como a fixação de corantes, a aderência de polímeros resistentes ao enrugamento e à condutividade eléctrica (Brack *et al.* 1999, Tomasino 1992, Dominguez *et al.* 2003, Gacén e Cayuela 2000).

1.3.3. Processamento de fibras sintéticas (poliéster, acrílica, poliamida)

As fibras sintéticas como a poliamida, acrílica e poliéster são muito hidrofóbicas, deste modo, os tratamentos a molhado como o tingimento e a estampagem são dificultados. A hidrólise alcalina aumenta a hidrofilidade das fibras, mas é responsável pelo dano das mesmas e consequentemente originam efluentes com pH muito elevado (Silva e Cavaco-Paulo 2004).

1.3.4. Tingimento

O tingimento é um processo de coloração que depende essencialmente de dois factores: estrutura dos corantes utilizados e características das fibras intervenientes. Existem dois processos distintos de tingimento: processos descontínuos ou por esgotamento e os processos contínuos ou por fulardagem (Araújo e Castro 1984). Nos influenciado pela substantividade do corante. Nos processos contínuos (e semi-contínuos) o corante não poderá ser muito substantivo para com a fibra. O corante após a difusão para o interior da fibra é fixado de forma a se obter um tingimento uniforme (Araújo e Castro 1984).

Os corantes podem ser substâncias naturais ou compostos sintéticos. As características que um composto deve ter para ter utilidade como corante têxtil podem

resumir-se às seguintes: a cor; a afinidade para com as fibras e a solidez aos agentes a que o artigo têxtil irá ser submetido após o tingimento (luz, lavagem, etc.) (Gomes 2001).

Os corantes são moléculas com sistemas de electrões deslocalizados conjugados com ligações duplas, contendo dois grupos: cromóforo e auxocromo. Os cromóforos são grupos de átomos responsáveis pela cor do corante com grupos que aceitam electrões. Os cromóforos mais importantes são o azo, a antraquinona, a ftalocianina e os triarilmetano. A figura 1.4 mostra a estrutura química dos principais cromóforos. Os auxocromos são substituintes com dadores de electrões que intensificam a cor do cromóforo, através da alteração da energia total de electrões do sistema e promovem a solubilidade e fixação do corante à fibra. Os auxocromos mais importantes são os grupos NH_2 , -NR_2 , -NHR , -COOH , $\text{-SO}_3\text{H}$, -OH e -OCH_3 (Gomes 2001).

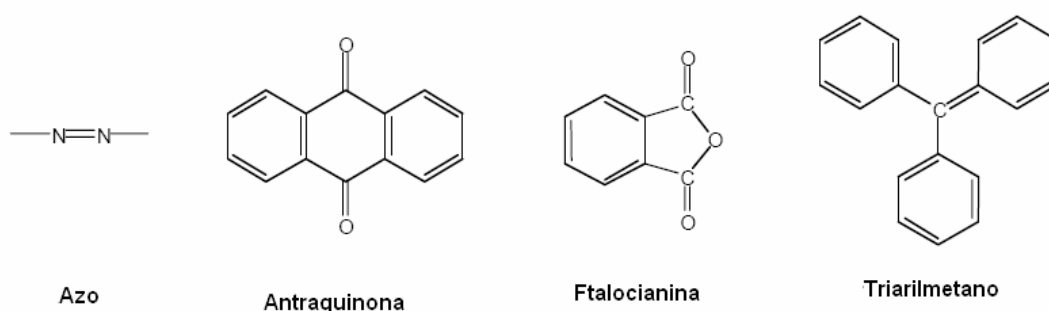


Figura 1.4 - Estrutura química dos principais cromóforos (Gomes 2001).

Os efluentes gerados pelo tingimento e estampagem de artigos têxteis caracterizam-se por serem extremamente corados, com CQO elevado, com sólidos dissolvidos e suspensos e com metais pesados (Barclay e Buckley 2000)

1.3.5. Tratamento dos efluentes têxteis

Os efluentes têxteis gerados pelo tratamento e tingimento das diversas fibras têxteis, são actualmente tratados por processos físicos e/ou químicos e biológicos. Os tratamentos físico-químicos incluem filtração com membranas (koyuncu et al. 2004, Kim et al. 2005), a coagulação/floculação (Peres et al. 2004, Aguilar et al. 2005, Golob et al. 2005, Zouboulis et al. 2004), a precipitação, a adsorção (Robinson et al. 2001, Jovic et al. 2004, Cestari et al. 2005), a permutação iónica, os ultra-sons (Gogate e Pandit 2004a), a electrólise, a

redução química e os processos oxidativos avançados, como a ozonização (Gogate e Pandit 2004a, Özbelge *et al.* 2003, Pera-Titus *et al.* 2004, Muthukumar *et al.* 2005), a oxidação com o reagente de Fenton (Fernee *et al.* 1999, Ince e Tezcanli 1999, Park *et al.* 1999, Nesheiwat e Swanson 2000), a oxidação fotocatalítica (Kusvuran *et al.* 2004, Alaton e Ferry 2003, Gogate Pandit 2004b) e a cloração (Robinson *et al.* 2001, Pizzolato *et al.* 2002).

Os tratamentos biológicos incluem a biosorção e a biodegradação aeróbia, anaeróbia e anóxica (Stolz 2001, Blümel *et al.* 2002, Fontenot *et al.* 2001, Van der Zee 2002), a biodegradação com fungos (Abadula *et al.* 2000, Martins *et al.* 2002, Martins *et al.* 2003, Tetsch *et al.* 2005, Libra *et al.* 2003, Ambrósio e Campos-Takaki 2004), com leveduras (Ramalho *et al.* 2002, 2004), com plantas (Aubert e Schwitzguebel 2004, Mbuligwe 2005) e com algas (Semple *et al.* 1999, Mohan *et al.* 2002, Acuner e Dilek 2004).

1. 4. Aplicação de tratamentos enzimáticos na indústria têxtil

Os tratamentos convencionais que as fibras e artigos têxteis sofrem foram nomeados no capítulo 1.3. Pretende-se neste capítulo, apresentar sucintamente os tratamentos enzimáticos aplicados e estudados na indústria têxtil.

Na indústria têxtil, o tratamento de fibras, fios e tecidos são tradicionalmente realizados em condições muito severas, resultando efluentes com características muito adversas para o ambiente. Os tratamentos enzimáticos têm vindo a ser introduzidos em várias etapas dos processos têxteis de forma a satisfazer as necessidades de qualidade do material têxtil, reduzindo a carga poluente dos efluentes têxteis.

A aplicação de enzimas na indústria têxtil conheceu um aumento significativo nos últimos 20 anos (Sorup *et al.* 1998, Cegarra 1996). A substituição e/ou complemento de processos têxteis convencionais pelos enzimáticos, utilizando enzimas como as celulases, as amilases, as proteases, as catalases, as pectinases, as peroxidases, as cutinases e as lacases têm sido o âmbito de vários estudos. No entanto, a difusão da enzima no interior do tecido é possivelmente a maior limitação operacional dos tratamentos enzimáticos. Por isso, os tratamentos enzimáticos cuja acção das enzimas se pretenda na superfície do material têxtil, como é o caso da utilização das celulases no tratamento superficial de tecidos de fibras celulósicas, têm tido maior aceitação a nível industrial.

1.4.1. Aplicação de enzimas no processamento de fibras de algodão

A aplicação de enzimas, como as α -amilases, as hemicelulases, as pectinases, as celulases, as proteases e as lipases assim como as combinações destas, tem sido estudada como alternativa à fervura alcalina convencional (Freytag e Dinze 1983, Mcneil e Darvill 1984, Hsieh *et al.* 1996, Yonnghua e Hardin 1997, Mori *et al.* 1997, Robner 1993, Hartzell-Lawson e Durrant 1998, Buchert *et al.* 1998, Calafell 1998, Tzanko *et al.* 2001, Shen e Dai 2003, Opwis *et al.* 2006, Leting e Warmoeskerken 2004, Buschle-Diller *et al.* 2005, Calafell e Garriga 2004, del Valle *et al.* 2006, Calafel *et al.* 2005, Canal *et al.* 2004, Yachmenev *et al.* 1998, 1999, 2001, 2004).

O branqueio de tecidos de algodão com peróxido de hidrogénio produzido “in situ” num sistema enzimático, glucose oxidase/glucose, onde a glucose oxidase em solução aquosa gera o peróxido de hidrogénio usando como substrato a glucose na presença do oxigénio tem sido estudado (Schacht *et al.* 1995, Cegarra 1999, Buschle-Diller *et al.* 2001, Tzanko *et al.* 2001). Sistemas similares de produção controlada de peróxido de hidrogénio foram usados em detergentes para branqueio (Van der Helm 1998, Promad 1994).

O acabamento de tecidos de algodão com celulases, permite eliminar da superfície dos tecidos, fibras imaturas, fibrilas e prevenir a fibrilação e a formação de borboto. O acabamento é mais homogéneo e permite melhoramento das características do tecido no que diz respeito ao tacto. O efeito de stone-wash nos artigos de ganga é tradicionalmente conseguido através da lavagem com pedra-pomes. No entanto, o tratamento dos artigos de ganga com celulases permite uma redução de tempo de tratamento, uma elevada flexibilidade e reprodutibilidade (Galante e Formantici 2003).

1.4.2. Aplicação de enzimas no processamento de fibras proteicas

O tratamento enzimático de artigos de lã com proteases tem sido estudado. No entanto, a acção da enzima poderá penetrar facilmente no interior interior da fibra, causando danos consideráveis, traduzindo-se numa redução da resistência à tracção (Riva *et al.* 2006, Zhang *et al.* 2006, Silva CJSJM *et al.* 2004, Nolte *et al.* 1996, Cortez *et al.* 2004, Silva CJSJM e Cavaco-Paulo 2003). Estudos realizados por Silva e colaboradores mostraram que a acção hidrolítica da subtilisina-PEG (enzima com uma massa molecular elevada) ocorre unicamente na cutícula, facto confirmado com uma reduzida libertação de aminoácidos, baixa perda de resistência à tracção e baixa feltragem da fibra (Silva CJSJM *et al.* 2005). Estudos efectuados em tecidos de lã tratados com esperase (protease) ligada covalentemente ao Eudragit S-100, apresentaram uma perda de peso menor e uma maior resistência à tracção quando comparado com o tratamento realizado com a esperase nativa (Silva CJSJM *et al.* 2006).

Um estudo realizado por Vasconcelos e colaboradores mostrou ser possível a inclusão de proteases como a esperase imobilizada em eudragit S-100 em detergentes para lavagem doméstica, com resultados de remoção de nódoas similares aos contendo a enzima nativa, sem contudo correr o risco de danificar o tecido (Vasconcelos *et al.* 2006).

1.4.3. Aplicação de enzimas no processamento de fibras sintéticas (poliéster, acrílica, poliamida)

A aplicação da cutinase (*Fusarium solani pisi*) na modificação da superfície de fibras sintéticas como a poliamida 6,6 e o poliéster foi estudada por Silva e colaboradores (Silva *et al.* 2004). O uso de enzimas hidrolíticas, como a cutinase, aumenta a hidrofiliidade da fibra e consequentemente a reactividade da mesma ou produtos de acabamento, sem causar danos significativos na estrutura do polímero (Silva e Cavaco-Paulo 2004, Silva *et al.* 2004). A aplicação de esterases na hidrólise do poliéster tem sido estudada (Huskic e Zigon 2003, Marten *et al.* 2003, Walter *et al.* 1995, O'Neill e Cavaco-Paulo 2004), sendo que hidrólise superficial desta fibra aumenta os grupos hidróxilo acessíveis aos corantes e a produtos de acabamento (O'Neill e Cavaco-Paulo 2004).

1.4.4. Aplicação de enzimas no tratamento de efluentes têxteis

Os efluentes originados pelo branqueio com peróxido de hidrogénio podem ser tratados com catalases para eliminação do peróxido de hidrogénio. As catalases catalizam a transformação do peróxido hidrogénio em produtos como a água e oxigénio. Vários estudos mostraram que é possível utilizar os efluentes de branqueio tratados com a enzima livre ou imobilizada no tingimento de tecidos de algodão (Costa *et al.* 2002, Tzanko *et al.* 2001b, Tzanko *et al.* 2001c).

A aplicação de enzimas na remediação de efluentes têxteis tem vindo a ser estudada (Dass e Reddy 1990, Spadaro e Renganathan 1994, Heinfling *et al.* 1998, Raffie Coleman 1999, Nyanhongo *et al.* 2002, Pearce *et al.* 2003, Blümel e Stolz 2003, Forgacs *et al.* 2004, Christian *et al.* 2005, Mohan *et al.* 2005, Shrivastava *et al.* 2005, Zille *et al.* 2003, Zille *et al.* 2004, Zille *et al.* 2005). A performance das enzimas e do processo de remediação poderá ser muito afectada, uma vez que a actividade catalítica das enzimas poderá diminuir consideravelmente devido às características do efluente, como o pH e a elevada força iónica (Abadulla *et al.* 2000). A falta de conhecimento do mecanismo da mineralização, da degradação dos corantes e a possibilidade de formação de produtos intermédios potencialmente tóxicos, limita a aplicabilidade das enzimas no tratamento de efluentes têxteis.

As enzimas mais estudadas no tratamento de efluentes têxteis são as lacases, na sua maioria de origem fúngica, estas enzimas foram também identificadas em alguns esporos de vários bacilos bacteriológicos (Hullo *et al.* 2001, Martins *et al.* 2002, Hirose *et al.*

2003). As lacases são oxireductases que catalisam a oxidação de vários compostos aromáticos, particularmente os fenólicos, com a redução do oxigénio a água (Bollag 1992, Karam e Nicell 1997, Thurston 1994, Durán *et al.* 2002). Na reacção típica da lacase, o substrato é sujeito a uma oxidação originando ariloxiradical, espécies reactivas que podem originar quinonas numa segunda fase da reacção (Durán *et al.* 2002).

A acção catalítica da lacase sobre o cromoforo azo, antraquinoide, indiginoide e triarilmetano dos corantes, mostra a capacidade desta ser aplicada na descolorização de efluentes têxteis (Wesenberg *et al.* 2003). Estudos recentes propõem vários mecanismos de degradação para corantes azo (Chivukula e Renganathan 1995; Soares *et al.* 2002). Contudo a especificidade da lacase no que diz respeito ao substrato, limita o número de corantes que poderão ser degradados pela enzima. No entanto, a utilização de mediadores poderá solucionar alguns problemas de “afinidade” e deste modo, aumentar a performance da descolorização (Bourbonnais *et al.* 1997, Srebotnik e Hammel 2000, Fabbrini *et al.* 2002, Rodríguez Couto *et al.* 2005, Camarero *et al.* 2005, Zille *et al.* 2003, 2004, 2005).

1.5. Aplicação dos ultra-sons na indústria têxtil

Os estudos que abordam a aplicação de ultra-sons nos processos a molhado na indústria têxtil apresentam benefícios consideráveis no que diz respeito ao consumo de químicos, de corantes e à aceleração dos processos. Deste modo, é possível a realização dos processos têxteis utilizando menores quantidades de água, reduzindo desta forma a quantidade de efluentes (Vouters *et al.* 2004, Yachmanev *et al.* 2001, Yachmanev 2004, Moholkar 2003), e sem afectar a qualidade das fibras e dos tecidos (Vouters *et al.* 2004, Yachmanev *et al.* 2001, Yachmanev 2004, Vajhel e le Marechal 2005, Sivakumar e Rao 2003, Kamel 2005, McCall *et al.* 1998, Rathi *et al.* 1997, Moholkar 2003).

1.5.1. Tingimento de fibras têxteis

O tingimento de fibras têxteis auxiliado por sistemas de ultra-sons tem sido amplamente estudado (Shukla e Mathur 1995, Öner *et al.* 1995, Mock *et al.* 1995, Kamel *et al.* 2003, El-Shishtawy *et al.* 2003). O tingimento da seda com corantes catiónicos, ácidos e decomplexo-metálico, na presença de ultra-sons de frequência de 26 kHz, mostrou-se eficaz para temperaturas mais baixas (45 e 50 °C) e para um tempo de tingimento mais reduzido (15 minutos) comparativamente com o processo convencional (85 °C e 60 minutos) (Shukla e Mathur 1995). Öner e colaboradores mostraram um aumento na fixação dos corantes reactivos Black 5 e Red 120 no tingimento de tecidos celulósicos na presença de ultra-sons (Öner *et al.* 1995). Outro estudo mostrou bons resultados no tingimento de algodão com corantes directos, a baixas temperaturas e menor quantidade de sais comparativamente com o tingimento convencional (Mock *et al.* 1995). A eficiência do tingimento da fibra de nylon-6 com corantes dispersos, ácidos e reactivos aumenta quando o tingimento é auxiliado com ultra-sons de baixas frequências de 27 e 38,5 kHz (Kamel *et al.* 2003, El-Shishtawy *et al.* 2003).

Os benefícios no tingimento são geralmente atribuídos aos fenómenos característicos da cavitação e aos efeitos mecânicos como: a dispersão (quebra de agregados de peso molecular elevado), a desgasificação (expulsão dos gases dissolvidos no banho ou presos nas fibras), a difusão (aumento da difusão do corante no interior da fibra) e a agitação do líquido (Vajnhndl e Majcen le Marechal 2005, Lee e Kim 2001, Kamel *et al.* 2003, El-Shishtawy *et al.* 2003, Mock *et al.* 1995, Shukla e Mathur 1995).

1.5.2. Lavagem de tecidos de algodão

Moholkar e Warmoeskerken estudaram a relação entre a eficiência da lavagem de tecidos de algodão (100 g/m^2) sujos com carvão e azeite. O procedimento desenvolvido consistiu na lavagem do tecido com uma solução aquosa de $1,75 \text{ g/L}$ de Dodecil benzeno sulforato de sódio num reactor de ultra-sons de 30 kHz e potência máxima de 300 W , à temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. No estudo foi analisada a influência de parâmetros como a distância do tecido ao transdutor, a desgasificação do tecido e/ou da solução de lavagem e a pressão na eficiência de lavagem (Moholkar e Warmoeskerken 2002, 2003b). A eficiência de lavagem melhorou em cerca de 10% com a desgasificação do tecido e do líquido de lavagem. Por outro lado, as lavagens realizadas à pressão estática de 1 bar mostraram uma eficiência de lavagem superior, a $75 \text{ }^\circ\text{C}$ sendo que, com o aumento da pressão a eficiência decresce significativamente. Os microjatos originados pela cavitação acústica foram responsáveis pelo aumento da eficiência de lavagem na presença de ultra-sons (Warmoeskerken *et al.* 2003, Moholkar e Warmoeskerken 2002, 2003b).

1.5.3. Descolorização de efluentes têxteis

Uma das potenciais aplicações dos ultra-sons é a descolorização de efluentes têxteis. Vários estudos, mostraram benefícios do uso dos ultra-sons na descolorização de vários corantes têxteis. A mais valia da aplicação dos ultra-sons deve-se à acção dos radicais hidróxido, hidrogénio, peróxido e o peróxido de hidrogénio, as elevadas temperaturas e pressões originadas pela cavitação. No entanto, a complexidade dos corantes poderá não permitir que sejam totalmente mineralizados só com o tratamento ultra-sónico. A combinação com outros processos de oxidação como, a ozonização, a irradiação ultra-violeta, a electrólise e a fotooxidação foi apresentada em vários estudos como a solução para mineralização dos corantes (Ince e Tezcanli-Güyer 2001, Tezcanli-Güyer e Ince 2003a, Lorimer e Mason 2001, Lorimer e Mason 2000, Poon *et al.* 1999, Mrowetz *et al.* 2003, Tezcanli-Güyer e Ince 2004, Rehorek *et al.* 2004, Tezcanli-Güyer e Ince 2003b, Sivakumar e Pandit 2001, Mason 2003, Gogate e Pandit 2004).

1.5.4. Aplicações enzimáticas

Uma das aplicações mais recentes dos ultra-sons na indústria têxtil foi a sua conjugação com tratamentos enzimáticos, onde se verificam vantagens significativas,

como a redução da quantidade de energia e de catalisador, uniformidade no tratamento, redução dos tempos de tratamento e a minimização dos danos na fibra (Yachmenev *et al* 1998, 1999, 2001, 2004, Mistik e Yükseloglou 2005). Os trabalhos realizados por Yachmenev e colaboradores, no tratamento do algodão com pectinase na presença de ultra-sons, mostraram resultados comparáveis com o da fervura alcalina convencional. Por outro lado, o tecido de algodão não sofreu alterações significativas e verificou-se uma redução significativa no tempo de tratamento, conseguindo-se bons tratamentos com baixas concentrações de enzima (Yachmenev *et al.* 1998, 1999, 2001, 2004).

1.6. Efeito dos ultra-sons sobre as enzimas

Os efeitos dos ultra-sons sobre as proteínas em geral não são muito conhecidos e observam-se resultados contraditórios. Suslick e colaboradores estudaram o efeito dos ultra-sons nas proteínas albumina sérica bovina (BSA) e hemoglobina e verificaram a formação de microesferas devido à ligação química dos grupos cisteína oxidados pelos radicais produzidos durante a sonificação (Suslick *et al.* 1995). A formação de microesferas proteicas estáveis, por métodos sonoquímicos, foi também observada por Avivi e Gedanken (Avivi e Gedanken, 2002, 2005). A sonificação a 20 kHz e a várias intensidades (50, 100 e 120 W) não altera o carácter e a selectividade da protease alcalina de *B. Subtilis* no processo de transesterificação em solventes não aquosos (Xiao *et al.* 2005). Contrariamente, verificou-se um decréscimo significativo na actividade proteolítica da protease alcalina de *B. Subtilis* após tratamento com ultra-sons a 26,4 kHz e à intensidade de 26 W/cm² (Ovsianko *et al.* 2005). Por outro lado, De Gennaro verificou que a desactivação da peroxidase é muito baixa com o aumento da intensidade de ultra-sons (De Gennaro *et al.* 1999). A desactivação da glucose-6-fosfato dehidrogenase após uma longa exposição a ultra-sons ocorre, contudo testes similiares mostraram que a fosfatase alcalina se mantém totalmente activa nas mesmas condições (Özbek e Ülgen, 2000). Foi também observado um aumento da actividade da invertase e da fosfatase com a sonificação (Barton *et al.* 1996; De Cesare *et al.* 2000). De acordo com o trabalho de Güzey e colaboradores, somente algumas enzimas são desactivadas por aplicação de ultra-sons a intensidades elevadas (Güzey *et al.* 2005).

O comportamento das enzimas na presença dos ultra-sons é muito importante quando se pretende aplicar tratamentos simultâneos de enzimas e ultra-sons. No capítulo 4, será apresentado o estudo de comportamento da enzima de *Trametes villosa* e da BSA, sujeitas a ultra-sons de 20, 150 e 500 kHz.

2

Caracterização da lacase em estudo

2. Caracterização da lacase em estudo

2.1. Introdução

A enzima utilizada nos trabalhos desenvolvidos nesta tese foi a lacase (EC 1.10.3.2) de *Trametes villosa* com peso molecular aproximado de 66 KDa. Antes de se iniciar o estudo subjacente a esta tese, é necessário definir as melhores condições de trabalho, em termos de eficiência catalítica, estudando-se o comportamento da enzima nas várias condições de temperatura e de pH. O comportamento da lacase para o intervalo de pH entre 2 e 9 e para temperaturas entre 30 e 70 °C, para uma hora de incubação foi estudado por Zille e colaboradores (Zille 2005). O intervalo de temperatura para a aplicação da lacase em tampão acetato de pH 5 seria entre 40 e 55 °C, obtendo-se o máximo de actividade para a temperatura de 45 °C. O intervalo de pH óptimo para aplicação da enzima seria de 4 a 6 (Zille 2005). A lacase livre ou imobilizada em alumina mostrou ser capaz de catalizar reacções de descolorização de corantes e de efluentes têxteis (Zille *et al.* 2003, 2004, 2005). A eficiência catalítica da lacase na descolorização de corantes aumentou consideravelmente com a adição de mediadores (Zille *et al.* 2004). A polimerização entre produtos de degradação de corantes (aminas aromáticas) e o catecol foi catalisada pela lacase e o mediador HBT aumentou consideravelmente a eficiência catalítica (Zille *et al.* 2004; 2005). Foram usadas duas técnicas para acompanhar a biocatálise, no que concerne à descolorização e à polimerização, a medição da concentração de oxigénio em solução e medições electroquímicas (Zille *et al.* 2004; 2005).

2.2. Parte Experimental

2.2.1. Estabilidade da enzima a 50 e 60 °C

A enzima utilizada foi a lacase (EC 1.10.3.2) de *Trametes villosa*, gentilmente fornecida pela Novo Nordisk. A actividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente, utilizando o espectrofotómetro (Helyos γ da Unicam), medindo-se o aumento da absorvância a 420 nm ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) devida à oxidação enzimática de uma solução de concentração $0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ de 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) preparada em tampão acetato de concentração 0,1 M e pH 5 (Childs 1975). A actividade enzimática (U) foi definida em μmol de substrato oxidado por minuto. A actividade da lacase à temperatura de 50 e 60 °C, foi determinada de cinco em cinco minutos até 30 minutos de incubação em tampão acetato 0,1 M e pH 5.

2.2.2. Concentração de proteína total

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford, usando a BSA como proteína padrão (Bradford 1976).

2.2.3. Medição da concentração de oxigénio

Amostras de tecido de 100 % algodão com $120 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$, com 0,1 e 0,2 g foram mergulhadas em 30 mL de tampão acetato pH 5 e a 35 °C, foram tratadas com lacase (360 U) durante 1 hora. A monitorização da reacção fez-se, medindo a concentração de oxigénio no líquido com o medidor de oxigénio, inoLab Oxi Level 2 e com a sonda de oxigénio Cellox 325 (WTW GmH & Co. KG) num reactor termoestabilizado e hermeticamente fechado. A aquisição dos dados foi efectuada de 30 em 30 segundos. Durante as medições injectou-se azoto gasoso no reactor para libertar o oxigénio presente na fase gasosa, impedindo a sua transferência para a fase líquida.

2.3. Resultados e Discussão

Os estudos realizados mostraram que a actividade catalítica é máxima para a temperatura de 45 °C, para uma hora de incubação. A actividade aumenta com o aumento da temperatura até aos 45 °C, diminuindo para temperaturas superiores a 45 °C, sendo a perda de actividade mais evidente para temperaturas superiores a 55 °C (Zille 2005). A influência do pH na actividade da enzima foi estudada por Zille, utilizando o tampão universal Britton-Robinson com força iónica constante ($\mu = 0,3 \text{ M}$) abrangendo um intervalo de pH entre 2 e 9, contudo os sais presentes no tampão poderão inibir a enzima. Para eliminar esse efeito foram utilizados vários tampões de 0,1 M abrangendo vários intervalos de pH, o tampão tartárico (pH 2-3), o acético (4-5), o fosfórico (pH 6-7) e o Tris-HCL (pH 8-9). A actividade enzimática é máxima para pH 5, no entanto, a redução de actividade não é significativa para um intervalo entre 4 e 6 (Zille 2005). A concentração total de proteína determinada segundo o método de Bradford foi de 5,3 mgproteína/mL.

A produção de têxteis de elevada qualidade está associada a processos efectuados em volumes de banho reduzidos e tempos curtos de processamento. O intervalo de tempo óptimo do processo enzimático é influenciado pela estabilidade da enzima durante o mesmo, uma vez conhecidas as condições óptimas de pH e temperatura. A figura 2.1, mostra a estabilidade da lacase a 50 e 60 °C, para um tempo de incubação máximo de 30 minutos. A determinação da actividade da lacase foi realizada como descrito no ponto 2.2.1.

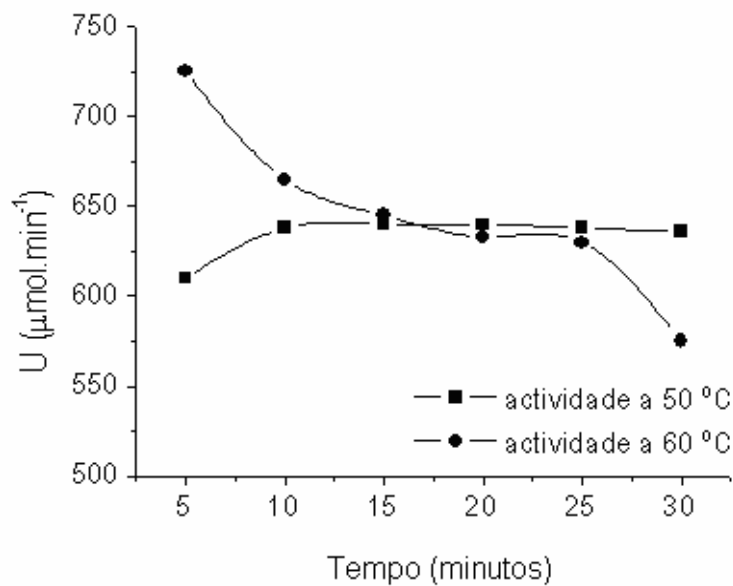


Figura 2.1 - Estabilização da lacase às temperaturas de 50 e 60 °C.

Os resultados mostram que a lacase é mais estável a 50 °C, sendo que a partir dos 10 minutos de incubação a actividade não sofre alterações significativas, possibilitando a utilização da enzima para um intervalo de tempo mais longo sem que as condições catalíticas do processo se alterem significativamente. Os resultados referentes a 60 °C, mostram que nos 10 minutos de incubação iniciais a actividade da lacase é superior comparada com a incubação a 50 °C, decrescendo significativamente após 30 minutos. Deste modo, é aconselhável operar à temperatura de 50 °C quando o processo catalítico é superior a 30 minutos ou quando estão envolvidos processos em contínuo.

2.3.1. Monitorização da catálise heterogénea através da medição do consumo de oxigénio

No método descrito em 2.2.1, a actividade da enzima é determinada utilizando-se um substrato solúvel. Na indústria têxtil, a catálise poderá ser heterogénea, onde o substrato poderá ser insolúvel (fibras, fios, tecidos). A lacase utiliza o oxigénio no seu ciclo catalítico, pelo que, a diminuição da concentração de oxigénio é um indicador da eficiência catalítica da enzima sobre o substrato têxtil. A figura 2.2. mostra o consumo de oxigénio medido segundo o procedimento descrito no ponto 2.2.2.

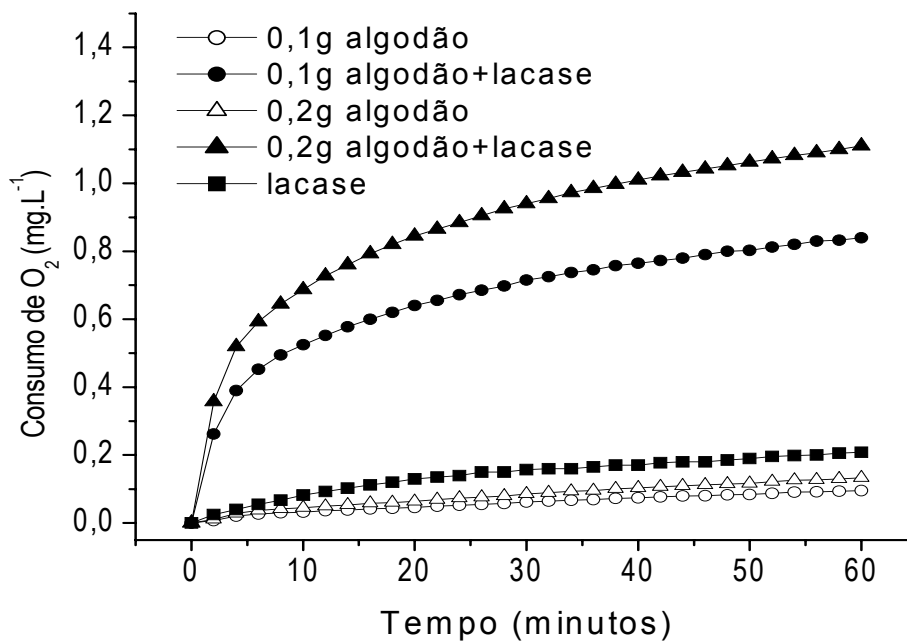


Figura 2.2 - Consumo de oxigênio para tecidos de algodão tratados com lacase.

A evidência da reacção catalítica da lacase sobre o substrato têxtil foi a redução da concentração de oxigênio em solução. Obtiveram-se valores mais elevados de consumo de oxigênio quando se duplicou a quantidade de substrato têxtil.

2.4. Conclusão

A temperatura ideal para processos em contínuo é de 50 °C, isto é, a lacase é mais estável por períodos de tempo mais longos, comparativamente com a temperatura de 60 °C. No entanto, poderá ser possível utilizar a lacase em processos operados a temperaturas de 60 °C, reduzindo consideravelmente o tempo de operação, mas com a perda de actividade da enzima significativa.

A monitorização da catálise heterogénea enzima-tecido, foi possível medindo-se o consumo de oxigénio ao longo da acção da lacase sobre o tecido. No capítulo seguinte, demonstrar-se-á a redução da quantidade de peróxido de hidrogénio no branqueio de algodão é possível quando o mesmo é precedido de um pré-tratamento enzimático com lacases.

3

Branqueio do algodão com lacases

3. Branqueio do algodão com lacases

3.1. Introdução

A aplicação das lacases na delignificação, na dimetilação e no branqueio de polpa de papel tem sido extensivamente estudada (Bourbonnais *et al.* 1997; Bourbonnais e Paice 1992; Bourbonnais *et al.* 1995; Li *et al.* 1999). No branqueio convencional de fibras celulósicas são usados vários agentes oxidativos, sendo o mais comum o peróxido de hidrogénio. Os efluentes resultantes no branqueio apresentam características muito ácidas, pelo que a introdução de um processo enzimático apropriado irá permitir reduzir o consumo de químicos, de energia, de água e minimizar os danos nas fibras.

No capítulo anterior estudaram-se as condições de temperatura para as quais se obteria o máximo rendimento do tratamento enzimático. A capacidade de branqueio das lacases de *Trametes villosa* e de *Trametes hirsuta* como alternativa ao tratamento oxidativo convencional, foi avaliada neste capítulo.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Enzimas e substrato têxtil

As enzimas utilizadas neste estudo foram: a lacase com origem no fungo *Trametes villosa*, estudada no capítulo anterior e a lacase com origem no fungo *Trametes hirsuta*, com peso molecular de 60,7 kDa (Pereira et al. 2005), gentilmente fornecida pela Universidade de Tecnologia de Graz. O substrato têxtil foi um tecido 100 % algodão com 120 g.m⁻².

3.2.2. Preparação das amostras de tecido de algodão

O tecido de algodão foi sujeito a fervura alcalina com uma concentração de hidróxido de sódio de 4g/L, à temperatura de 50 °C, durante 60 minutos no rotawash com agitação de 40 rpm. Posteriormente, foram lavadas numa solução de lutensol ON 30 à fervera durante 15 minutos. O surfactante foi removido com água da torneira e as amostras foram secas ao ar. Foram então preparadas amostras de 1 g, com as seguintes dimensões aproximadas de 90 mm x 90 mm.

3.2.3. Pré-tratamento das amostras com lacase de *Trametes villosa* a 60 °C

As amostras de tecido foram sujeitas a pré-tratamento enzimático com a lacase de *Trametes villosa*. Os tratamentos foram realizados no Ahiba Spectradye-Datacolor (Datacolor International, Luzern, Suíça), em reactor fechado, com uma razão de banho de 20:1, à temperatura de 60 °C, durante 10 minutos. Foram utilizadas as seguintes concentrações de enzima: 360, 660, 1020, 1320, 1680, 2040, 2340 unidades (U). Foram realizados testes controlo com 0,1 M tampão acetato e pH 5.

3.2.4. Pré-tratamento das amostras com lacase de *Trametes hirsuta*

Amostras de tecido foram sujeitas a pré-tratamento enzimático com a lacase de *Trametes hirsuta*. Os tratamentos foram realizados no Ahiba Spectradye-Datacolor, em reactor fechado, à temperatura de 50 °C, durante 60 minutos, para duas concentrações de enzima (60 e 380 U), com a razão de banho de 40:1, 60:1 e 80:1 e agitação de 40 e 70 rpm.

3.2.5. Lavagem das amostras pré-tratadas

Após o pré-tratamento com lacase, as amostras foram lavadas à fervura com uma solução de Lutensol ON 30 durante 10 minutos, posteriormente com água da torneira e água destilada e secas ao ar.

3.2.6. Branqueio convencional com peróxido de hidrogénio

As amostras pré-tratadas com lacase e o controlo foram posteriormente branqueadas utilizando uma solução de branqueio constituída por 1,75 g. L⁻¹ de silicato de sódio, 0,5 g. L⁻¹ carbonato de sódio, 1 g. L⁻¹ de hidróxido de sódio e 2 g. L⁻¹ de peróxido de hidrogénio 35 %. Os ensaios de branqueamento foram realizados a 95 °C durante 1 hora, no Ahiba Spectradye-Datacolor, em reactor fechado, com uma razão de banho de 20:1. Posteriormente, as amostras foram lavadas com água da torneira e água destilada e secas ao ar.

3.2.7. Grau de branco do material têxtil

O grau de branco (W^*) do tecido foi determinado antes e depois do pré-tratamento com lacase e após o branqueio, usando o Spectraflash da Datacolor International (Luzern, Suíça) com o programa DataMatch 3.5, usando a iluminação padrão D₆₅ (LAV/Spec. Excl., d/8, D65/10°).

3.2.8. Descoloração de amostras de tecido coloradas com corantes reactivos

As amostras de tecido, previamente coloradas com os corantes reactivos Yellow 160, Orange 16 e Granden 19 (Everlight Chem. Ind.), foram sujeitas a um pré-tratamento com lacase (3080 U), à temperatura de 50 °C, durante 60 minutos. Posteriormente, foram sujeitas a um branqueio com uma solução de branqueio com a composição e demais condições experimentais descritas no capítulo 3.2.6.

A força da cor dos tecidos foi avaliada em termos de valores de K/S e estes foram calculados usando a equação de Kubelca-Munk's $K/S = \frac{(1-R)^2}{2R}$, onde K é o coeficiente de adsorção, o S é o coeficiente de difusão e o R é a reflectância. Esta relação é aplicada aos têxteis assumindo que a difusão da luz é devida às fibras e a adsorção é devido ao corante. As determinações de K/S foram realizadas em cinco lugares

diferentes do tecido para ensaios experimentais em triplicado e o erro determinado foi sempre inferior a 2%. O equipamento utilizado foi o espectrofotómetro de reflexão descrito no ponto 3.2.7.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Efeito do pré-tratamento com lacases no branqueio de tecido de algodão

A influência da lacase no branqueio de tecido de algodão foi testada para intervalos curtos de tempo, 10 minutos. Os resultados são apresentados na figura 3.1, onde os valores ΔW^* foram calculados como sendo a diferença entre o grau de branco das amostras tratadas com lacase e o respectivo controlo. O efeito da lacase sobre o tecido traduz-se na redução do grau de branco em relação ao controlo em solução tampão. Os valores de ΔW^* obtidos após o branqueio com peróxido de hidrogénio, mostram que o grau de branco das amostras pré-tratadas com lacase aumenta consideravelmente.

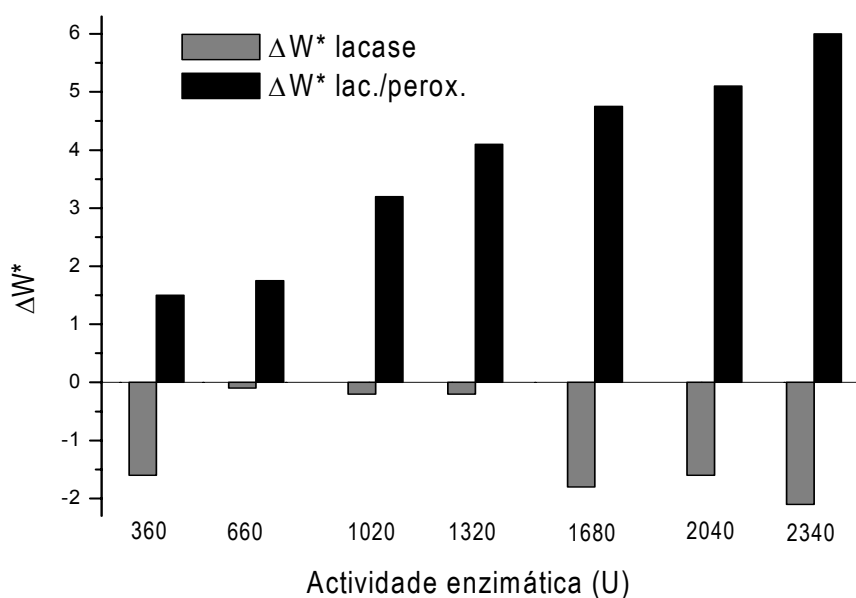
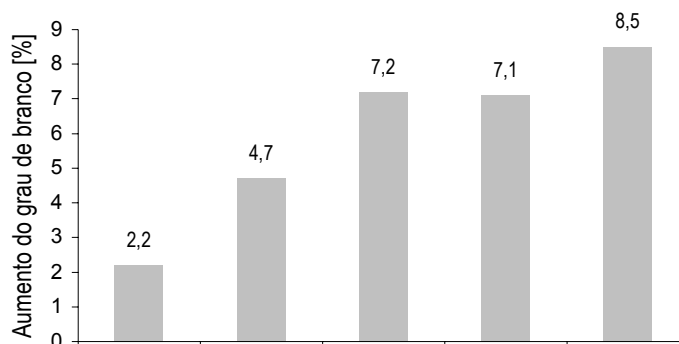


Figura 3.1 - Efeito da lacase de *Trametes villosa* no branqueio conjunto com peróxido de hidrogénio de tecido de algodão.

Ensaio realizado com a lacase de *Trametes hirsuta*, apresentados na figura 3.2,

mostram um aumento do grau branco após branqueio oxidativo, sendo este mais significativo para a concentração de enzima de 380 U e para a agitação de 70 rpm. Por outro lado, a razão de banho não tem uma importância acrescida no grau de branco final.



Agitação (r.p.m.)	40	70	70	70	70
Actividade da lacase (U)	60	60	380	380	380
Razão de banho	40:1	40:1	40:1	60:1	80:1

Figura 3.2 - Aumento do grau de branco do algodão após pré-tratamento com a lacase de *Trametes hirsuta* durante 1 hora a 50 °C.

A aparente formação de cor nos tecidos dever-se-á às substâncias que não foram removidas por fervura alcalina. É sabido que a lacase pode originar substâncias coradas na presença de substratos específicos. No caso do algodão a natureza da matéria corada presente não é totalmente conhecida, mas é possível que se deva aos flavonoides. Na literatura não se encontra informação acerca da oxidação dos flavonoides, presentes no algodão, pela lacase. No entanto, o escurecimento de alimentos devido à oxidação de flavonoides (quercetin, morin e rutin) com a fenoloxidase de cogumelos e a peroxidase de rábano foi estudado por Makris e Rossiter. Os autores verificaram, recorrendo à cromatografia (HPLC), que os produtos de oxidação são os mesmos, mostrando que o mecanismo de reação é similar para ambas as enzimas (Makris e Rossiter 2002). As peroxidases catalisaram a oxidação do rutin quando se usou o peróxido de hidrogénio como oxidante (Kurisawa *et al.* 2003). A polimerização do rutin pela lacase e as propriedades antioxidantes do polímero foram demonstradas (Kurisawa *et al.* 2003). O mecanismo de oxidação enzimática dos flavonoides

é pouco conhecido. Contudo, a disposição dos grupos hidróxido na estrutura dos flavonoides poderá influenciar a extensão da oxidação e os produtos de reacção (Makris e Rossiter 2002, Mejias *et al.* 2002). A lacase do fungo *Trametes hirsuta* é capaz de oxidar vários flavonoides, no entanto a eficiência catalítica é muito menor quando comparada com os substratos como o ABTS, o DMP e a Syringaldazide (Pereira *et al.* 2005).

O pré-tratamento enzimático antecedendo o branqueio oxidativo acarretou um aumento considerável no grau de branco. Os resultados da tabela 3.1 mostram que a quantidade de peróxido de hidrogénio necessário para obter um grau de branco de um tecido com uma solução de 2 g L⁻¹ de peróxido poderá ser reduzido duas vezes quando este foi sujeito a pré-tratamento com lacase da *Trametes villosa* de actividade de 660 U.

Tabela 3.1 - Efeito do pré-tratamento com lacase na redução da quantidade de peróxido de hidrogénio

	H ₂ O ₂ (g/L)				
	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
W [*] _{perox.}	-	-	-	-	76,3
W [*] _{lac./perox.}	72,8	76,2	76,4	76,9	77,8

3.3.2. Descoloração de amostras de tecido coloradas com corantes reactivos

Os resultados anteriores mostraram que a lacase tem um papel preponderante no sucesso do branqueio, no entanto o mecanismo de actuação da mesma não é bem conhecido. Sabe-se que a lacase actua sobre compostos fenólicos, desenvolvendo ou alterando a sua cor. Para confirmar que a matéria colorada presente no algodão oxidada pela lacase é mais facilmente removida após branqueio com peróxido. Assim sendo, branqueou-se com peróxido de hidrogénio tecidos de algodão corados, previamente tratados com lacase. A tabela 3.2, mostra o efeito do pré-tratamento com lacase na descolorização oxidativa de tecidos, corados com corantes reactivos.

Tabela 3.2 - Efeito do pré-tratamento com lacase na descolorização oxidativa de tecidos, colorados com os corantes reactivos: Yellow 160, Granden 19, Orange 16

Corantes (c.d.o)		<i>K/S do tecido</i>			Descolorização (%)
		Início	Pré- tratamento	Branqueio	
R. Yellow 160 430 nm	Controlo	9,17	8,75	3,01	67
	Lacase	9,34	11,45	2,22	76
R. Granden 19 640 nm	Controlo	17,40	17,13	9,69	44
	Lacase	17,34	17,21	4,83	72
R. Orange 16 530 nm	Controlo	4,95	4,46	0,94	81
	Lacase	5,08	4,79	0,51	90

A descolorização dos tecidos tratados com lacase aumenta após o branqueio com peróxido de hidrogénio, comparado com o controlo, o tecido tratado com tampão. Os resultados mostram uma evidência indirecta de ocorrência de um processo biocatalítico, onde o cromóforo do corante é afectado pela acção da lacase que consequentemente facilita a remoção do corante. O mecanismo que envolve o branqueio de algodão com peróxido hidrogénio precedido de um tratamento enzimático, é muito mais complexo que a oxidação simples dos flavonoides e os efeitos sobre os tecidos corados não estão ainda suficientemente fundamentados. Os produtos de oxidação dos corantes (o-quinonas) poderão reagir com outros compostos fenólicos presentes no algodão, como a lignina residual, sendo estes mais susceptíveis de ser removidos por branqueio oxidativo.

3.4. Conclusão

No presente estudo demonstrou-se, que o aumento do grau de branco dos tecidos de algodão sujeitos a um pré-tratamento enzimático antecedendo o branqueio oxidativo é significativo. Por outro lado, o pré-tratamento enzimático permite uma redução de peróxido de hidrogénio. O tempo curto do tratamento enzimático capacita este bioprocessamento para operações em contínuo. O mecanismo da actuação da lacase não é completamente entendido, contudo os testes suportam a hipótese que a enzima transforma a matéria corada do algodão noutros compostos corados, os quais são mais susceptíveis de oxidação com peróxido e mais facilmente degradados. Os processos a molhado apresentam problemas de difusão do meio líquido para o tecido, pelo que, o processo desenvolvido poderá apresentar performances mais elevadas com o aumento da difusão da enzima no interior do tecido.

Os ultra-sons são conhecidos por aumentarem a transferência de massa, deste modo, a utilização simultânea de ultra-sons e biocatalisadores, poderá beneficiar a difusão da solução enzimática para o interior do tecido e conseqüentemente poderá beneficiar a eficiência do bioprocessamento estudado neste capítulo. Contudo, vários estudos reportam alterações no comportamento catalítico das enzimas, nomeadamente na perda significativa da actividade enzimática na presença de ultra-sons.

No capítulo seguinte estudar-se-á os efeitos dos ultra-sons sobre a lacase e a albumina serica bovina.

4

Estabilização e capacidade de descolorização da lacase da *Trametes villosa* num meio sujeito a ultra-sons

4. Estabilização e capacidade de descolorização da lacase da *Trametes villosa* num meio sujeito a ultra-sons

4.1. Introdução

Os processos com biocatalisadores têm tido cada vez mais aplicação na indústria têxtil. No ponto 1.5, foram apresentadas algumas dessas aplicações mais estudadas. Nos capítulos anteriores mostrou-se que o tratamento enzimático de tecido de algodão é um processo com impacte ambiental menor, quando comparado com o tradicional por ser realizado em condições de temperatura e pH mais suaves.

A difusão da enzima no interior do tecido poderá ser melhorada, combinando-se os ultra-sons com os tratamentos enzimáticos convencionais nos processos têxteis (Yachmenev *et al.* 1998, 1999, 2001, 2004, Mistik e Yükseloglou 2005).

Neste capítulo estudar-se-á o efeito dos ultra-sons na estabilidade da lacase de *Trametes villosa*, determinando-se a actividade residual em função da energia de sonificação e analisando-se as soluções enzimáticas por electroforese e cromatografia. Devido ao facto de os efluentes da indústria de tinturaria serem altamente poluentes, a aplicação de um processo biocatalítico pode ser vantajosa, Pelo que, neste capítulo, foi estudado o desempenho da lacase num processo de descolorização do corante têxtil, índigo carmim.

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Reagentes

A enzima utilizada no estudo foi a laccase (EC 1.10.3.2) de *Trametes villosa*, cujas principais características foram referenciadas no capítulo 2. Os compostos, albumina sérica bovina (BSA), o ácido tereftálico (TA), o 2.2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS), o poli(álcool vínic) (PVA) com massa molecular média de 30,000-70,000 g/mol, o poli(etileno glicol) (PEG) com massa molecular média de 10,000 g/mol e o corante indigo carmim (IC), CI Acid Blue 74, foram adquiridos à Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico.

4.2.2. Concentração de proteína

A concentração de proteína total foi determinada conforme descrito em 2.2.2.

4.2.3. Actividade enzimática da lacase

A actividade enzimática foi determinada conforme descrito no ponto 2.2.1. A interferência do PVA na determinação da actividade enzimática foi verificada e esta contribuição foi negligenciado.

4.2.4. Determinação dos radicais hidróxido produzidos por cavitação acústica

A estimativa de radicais hidróxido produzidos quando uma determinada massa de água é sujeita a sonificação foi efectuada segundo o método descrito no trabalho de Mason e colaboradores (Mason *et al.* 1994) e descrito no ponto 1.2. O método baseia-se na medição da fluorescência emitida pelos iões hidroxitereftalato (HTA) originados pela reacção dos radicais hidróxido formados por cavitação com aniões tereftalatos, originados pelo ácido tereftálico (TA) em solução aquosa (Mason *et al.* 1994). Soluções de 500 µmol/L de TA foram preparadas em tampão acetato de 0,1 M a pH 5 e tratadas com ultra-sons, a três frequências e várias intensidades, nomeadamente a 25, 62 e 100 W para 20 kHz, 26 e 32 W para 150 kHz e 20 e 35 W para 500 kHz, à temperatura de 50±2°C e variando o tempo de tratamento de 0 a 30 minutos.

A solução do ácido 2-hidróxidotereftálico (HTA) foi preparada seguindo as orientações descritas no trabalho de Mason e colaboradores (Mason *et al.* 1994). A solução padrão de

HTA foi preparada em tampão acetato 0,1 M a pH 5, com uma concentração aproximada de 2000 $\mu\text{mol/L}$. A partir desta solução mãe foram preparadas várias soluções de concentração conhecida, permitindo traçar uma curva de calibração da intensidade de fluorescência em função da concentração de HTA. Estimou-se a formação de HTA, usando o espectrofluorímetro (RF-1501, Shimadzu), com o comprimento de onda de excitação de 315 nm e analisando-se o comprimento de onda de emissão a 425 nm (Mason *et al.* 1994). Pode ser assumido que a intensidade de fluorescência gerada por sonificação é proporcional à concentração de HTA nas amostras e desta forma foi possível quantificar os radicais $\text{HO}\cdot$ originados por cavitação.

4.2.5. Sonificação de soluções de proteína (BSA e lacase)

As soluções de proteína foram preparadas em tampão acetato 0,1 M a pH 5 com uma concentração total de proteína de cerca de 125 mg/L, determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976). As soluções foram tratadas com ultra-sons com intensidade de 50 W para 20 kHz, 72 W para 150 kHz e 47 W para 500 kHz, à temperatura de $50\pm 2^\circ\text{C}$. As amostras tratadas foram depois analisadas por electroforese SDS-PAGE. A estabilidade da lacase após o tratamento com ultra-sons foi estudada, determinando-se para as soluções enzimáticas o tempo de meia vida ($t^*_{1/2}$), ou seja, o tempo no qual a actividade da enzima é reduzida para metade do valor inicial. A actividade enzimática foi medida no início e ao longo do tratamento. Os resultados da perda da actividade foram ajustados ao modelo de Michaelis-Menten de primeira ordem usando o software Origin 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). O efeito da adição de 10 % de poli(etilenoglicol) e de poli(álcool vínilico) na estabilidade da enzima foi estudado. Como controlo utilizou-se uma solução de lacase tratada à mesma temperatura, com agitação de 400 rpm.

4.2.6. Electroforese SDS-PAGE

A electroforese (SDS-PAGE) usando o sistema Hoefer miniVe (Amersham Pharmacia Biotech) foi efectuada para determinar o peso molecular das proteínas. Os gels separadores foram preparados de acordo com o método descrito por Laemmli (Laemmli 1970), com 10% de acrilamida e com cerca de 1,5 mm de espessura. A corrida foi efectuada a uma voltagem constante de 120 V, sendo interrompida quando o marcador

azul de bromofenol se encontrava a cerca de 1 cm do fundo do gel. A coloração com nitrato de prata foi o método utilizado na revelação das beas das proteínas no gel. Para a calibração foi usada uma mistura de padrões com os seguintes pesos moleculares: Fosforilase b (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbonica (30 kDa), Inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α - lactoalbumina (14,4 kDa).

4.2.7. Cromatografia por exclusão de tamanhos

A distribuição dos pesos moleculares foi determinada por cromatografia de filtração em gel, utilizando as seguintes condições: coluna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden), volume de amostra de 200 μ L, eluente tampão fosfato de concentração 0,1 M e pH 7 com 0,1 M NaCl, caudal de 0,5 mL/min e os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. A identificação dos picos após a separação cromatográfica foi feita com espectrofotómetro de detecção UV a 280 nm. Os padrões, apoferritin (443 kDa), β -amilase (200 kDa), alcool desidrogenase (150 kDa), albumina bovina (66 kDa) e anidrase carbonica (29 kDa), da Sigma, foram utilizados para calibração.

4.2.8. Intensidade acústica - método calorimétrico

Mediu-se o aumento da temperatura de, 150 mL de água destilada sujeita a sonificação durante 10 minutos. Os intervalos de medição foram de 30 segundos e a temperatura inicial foi de 25 °C. Determinou-se o valor de dT/dt traçando uma tangente à curva obtida pelos valores da temperatura em função do tempo. A intensidade (W) foi determinada pela seguinte equação $P = (dT/dt)C_pM$, onde o C_p é a capacidade calorífica da água (4200 J/Kg.K) e M a massa de água sujeita a ultra-sons expressa em Kg.

4.2.9. Equipamento de ultra-sons de 150 kHz e 500 kHz

O equipamento experimental para estas frequências comporta um o gerador eléctrico de multifrequências de 150 kHz e 500 kHz e o reactor de vidro, aberto e termoestabilizado, com um diâmetro interno de 60 mm e de altura total de 300 mm. O transdutor utilizado foi um transdutor piezoeléctrico da STIMIN (Itália), com diâmetro interno de 60 mm que foi colocado no fundo do reactor.

4.2.10. Equipamento de ultra-sons de 20 kHz

O equipamento utilizado comporta o gerador eléctrico de frequência de 20 kHz. A energia ultrasónica é fornecida por um transdutor piezoeléctrico (Sonics & Materials, USA), com um diâmetro de 13 mm. O reactor de vidro termoestatizado tem as seguintes características: diâmetro interno de 60 mm e altura de 200 mm.

4.2.11. Descolorização do indigo carmim com ultra-sons e/ou enzima

Para observar a descolorização de uma solução a 10 mg/L de indigo carmim, monitorizou-se o decréscimo da absorbância ao comprimento de onda de absorbância máxima previamente determinado para este corante (598 nm). As soluções de corante foram preparadas em tampão acetato 0,1 M e pH 5. Foi também realizado um estudo em soluções preparadas com a adição de 1% de PVA. As soluções foram então sujeitas a um tratamento com ultra-sons com ou sem lacase. Por sua vez, o controlo dos respectivos tratamentos com os ultra-sons foram os tratamentos sujeitos a agitação a 200 rpm. A concentração de proteína das soluções enzimáticas foi de 7 mg/L. A temperatura e o tempo de tratamento foram de $50\pm 2^\circ\text{C}$ e 60 minutos respectivamente. As soluções tratadas com ultra-sons realizaram-se nas seguintes condições de intensidade e frequência: 50 W para 20 kHz, 72 W para 150 kHz e 47 W para 500 kHz.

4.3. Resultados e Discussão

Neste estudo foram previamente caracterizados os reactores em termos de radicais produzidos e a energia introduzida no reactor. Estas relações são apresentadas na figura 4.1 para as frequências testadas neste estudo (20, 150 e 500 kHz). A energia introduzida foi determinada através da intensidade de ultra-sons e o tempo de sonificação da solução de ácido tereftálico, usando os métodos desenvolvidos pelo Mason e colaboradores (Mason *et al.* 1994). A intensidade de ultra-sons máxima determinada pelo método calorimétrico foi de 72 W para o gerador de 150 kHz e de 47 W para 500 kHz e para o gerador de frequência de 20 kHz a intensidade de ultra-sons varia de 7 a 100 W.

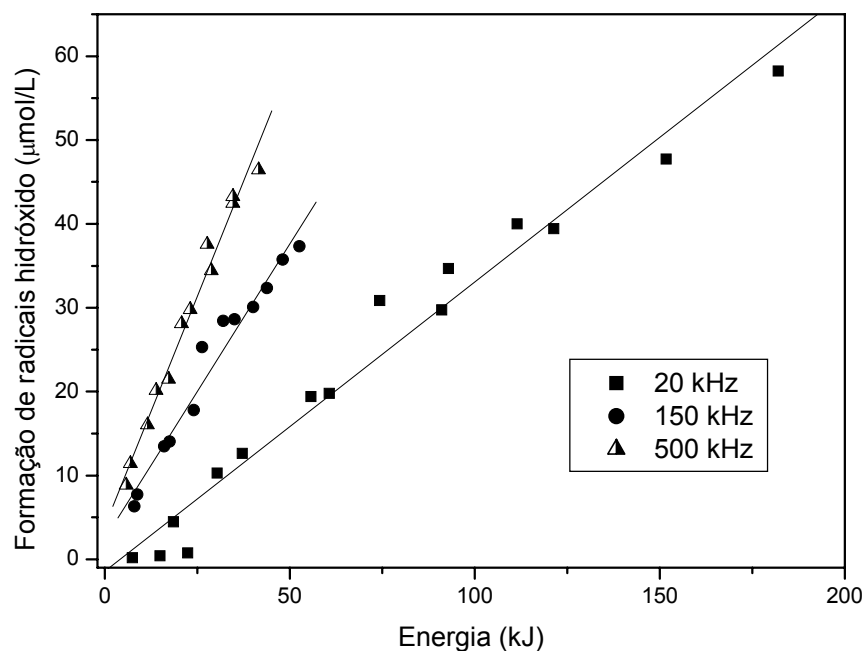


Figura 4.1 - Formação de radicais hidróxido, OH^\bullet ($\mu\text{mol/L}$) em função da energia introduzida no sistema para as frequências de 20 kHz (■), 150 kHz (●) e 500 kHz (▲).

A relação linear verificada entre a quantidade de radicais formados e a energia introduzida no reactor e atendendo que para a mesma frequência, o aumento da energia introduzida traduz-se no aumento da concentração de radicais. Os resultados verificados eram esperados e com base nos resultados obtidos por Pétrier e colaboradores (Francony e Pétrier 1996, Pétrier e Francony 1997, Pétrier et al. 1997, Jiang *et al.* 1996), a máxima eficiência na produção de radicais OH^\bullet foi obtida para as altas frequências.

4.3.1. Sonificação de soluções de lacase

Os radicais formados por cavitação são muito reactivos e promovem várias reacções físicas e químicas. As reacções promovidas por estes, conjuntamente com o calor gerado, interferem seriamente com a actividade e estabilidade da enzima. Para analisar esse efeito, foi determinado o tempo de meia vida ($t^*_{1/2}$) de várias soluções de lacase tratada com ultra-sons (Tabela 4.1). O tempo de meia vida estimado para a lacase nativa a 50°C foi de aproximadamente 36 horas, decrescendo consideravelmente após o tratamento com ultra-sons. O tempo de meia-vida decresceu cerca de 80 % para a

solução de lacase tratada com ultra-sons a 20 kHz/50 W e 500 kHz/47 W. Quando se alterou a frequência e a intensidade para 150 kHz/72 W, a perda em $t^*_{1/2}$ foi similar, nomeadamente de 82 %.

Tabela 4.1 - Tempo de meia vida ($t^*_{1/2}$) para a lacase nativa e lacase estabilizada com 10 % de PEG e PVA, após tratamento com ultra-sons

Tempo de meia vida $t^*_{1/2}$ (h)	Lacase	Lacase + PEG	Lacase + PVA
Controlo	36 ± 1	30 ± 1	39 ± 2
20 kHz – 50 W	7,0 ± 0,2	14,8 ± 0,2	17,4 ± 0,7
150 kHz – 72 W	6,5 ± 0,2	9,8 ± 0,5	14,4 ± 0,7
500 kHz – 47 W	7,2 ± 0,1	14,4 ± 0,7	30 ± 2

O uso de aditivos, como os surfactantes e os políeis de baixo peso molecular ou polímeros, é uma prática comum para aumentar a estabilidade das enzimas em condições ambientais extremas. Estudou-se portanto o efeito da adição de PEG ou PVA às soluções enzimáticas com o objectivo de as estabilizar. O tempo de meia vida da lacase, a 50 °C, alterou-se ligeiramente com a adição de PEG ou de PVA, verificou-se uma redução de 6 horas e um aumento de 3 horas quando se adicionou PEG e PVA respectivamente. No entanto, quando as soluções enzimáticas foram sujeitas a irradiação ultrasónica, o tempo de meia vida aumentou consideravelmente quando comparado com a enzima sem estabilizador, para todas as condições de ultra-sons testadas. Verificando-se um aumento maior para as soluções estabilizadas com PVA.

Os polímeros utilizados apresentam composição similar, mas a estrutura química é diferente (Takada e Hirai 2006). A capacidade do PEG em reduzir a inactivação da cloroperoxidase e da peroxidase de soja foi efectivamente demonstrada por vários autores (Spreti et al. 2004, Kinsley e Nicell 2000, Caza *et al.* 1999). No que diz respeito à lacase, o PEG tem um efeito significativo na protecção da enzima, repercutindo-se na actividade da mesma (Modaressi *et al.* 2005). Apesar do PVA ser um estabilizador enzimático conhecido, não existem muitos estudos que reportem o seu efeito na actividade da lacase. No trabalho realizado por Kulys e colaboradores, a inactivação da lacase foi evitada com a adição de PVA, devido à estrutura globular do PVA em

solução (Kulys et al. 2003). Foi também reportado que a adição de PVA aumenta a actividade de algumas enzimas (Takada e Hirai 2004), cuja actividade permanece inalterada com a adição de PEG. Os autores apontam como explicação para estas diferenças, o carácter hidrofóbico dos dois polímeros em solução. As moléculas de PEG não se agregam, mas as moléculas de PVA agregam-se instantaneamente quando dissolvidas em água, criando uma barreira hidrofóbica em volta da enzima. Neste estudo, pensa-se que o aumento do efeito estabilizador do PVA, comparado com o PEG, talvez se deva ao seu comportamento em solução, criando um ambiente mais protector no tratamento com ultra-sons para a lacase estabilizada com PVA.

Assume-se que a desactivação da lacase na presença de ultra-sons seja devida à reacção da proteína com os radicais (hidróxido, peróxido e superóxido) produzidos durante a cavitação, que são capazes de promover a agregação de proteínas (Suslick e Grinstaff 1990; Wong e Suslick 1995). A formação de agregados da lacase é considerada na secção seguinte.

4.3.2. Efeito dos ultra-sons na formação de agregados

A formação de um precipitado insolúvel nas amostras após o tratamento com ultra-sons, confirma a formação de agregados macromoleculares. A fracção solúvel das amostras foi analisada por cromatografia de exclusão por tamanhos e por electroforese desnaturante (SDS-PAGE) cujos resultados corroboraram a hipótese mencionada anteriormente. Como controlo utilizaram-se soluções de BSA sujeitas ao mesmo tratamento ultra-sónico. Utilizou-se como controlo esta proteína, pois esta possui um peso molecular semelhante à enzima (66 kDa) e apresenta na sua constituição uma significativa quantidade de resíduos cisteína (Tabela 4.2).

As amostras proteicas foram tratadas com ultra-sons à frequência de 150 kHz e foram depois analisadas por electroforese (SDS-PAGE). O gel resultante das proteínas de lacase e BSA tratadas com ultra-sons é apresentado na figura 4.2.

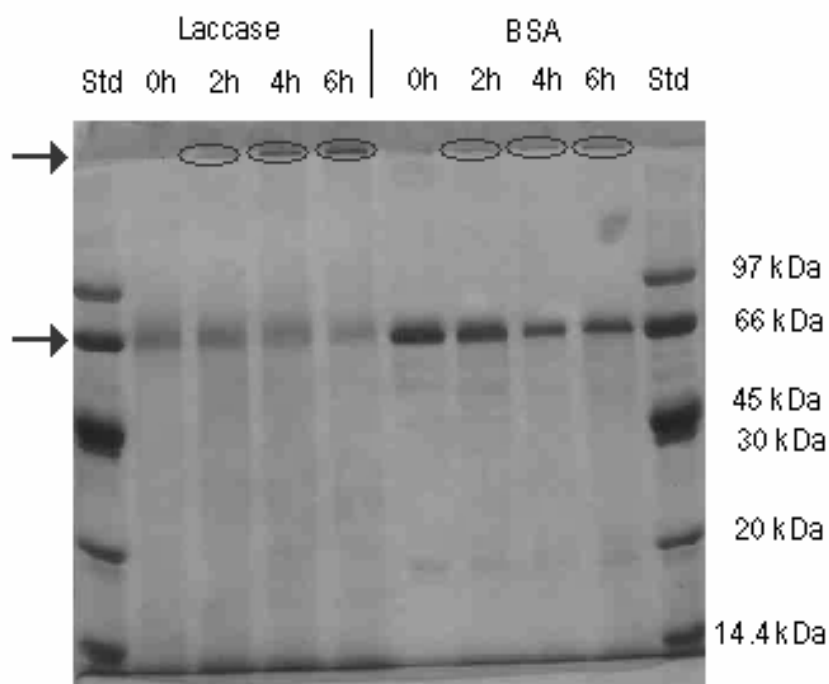


Figura 4.2 - Electroforese SADS-PAGE da solução de lacase e BSA tratada com ultra-sons, a 150 kHz e 72 W. Poços: Std – marcadores de massa molecular conhecida, 0 a 6 h – Amostras de soluções tratadas com ultra-sons de 0 a 6 horas, respectivamente.

A formação dos agregados de elevado peso molecular nas amostras tratadas com ultra-sons é visível nas beas entre o gel concentrador e do gel separador (Figura 4.2). A bea torna-se mais evidente quando o tempo de tratamento aumenta para mais de quatro horas. Simultaneamente, observa-se o progressivo esbatimento da bea característica das proteínas nativas da lacase e da BSA, esbatimento esse que aumenta com o tempo de tratamento. Este facto reforça a ideia que os agregados proteicos são formados a partir da proteína nativa, os quais ficam retidos na interface entre o gel concentrador e o gel separador devido às suas grandes dimensões, que impossibilitam que os agregados penetrem no gel de 10% de acrilamida.

Estes resultados foram também confirmados por HPLC, analisando-se a lacase nativa e a lacase tratada com ultra-sons durante seis horas às mesmas condições. A figura 4.3 mostra o padrão de eluição de ambas as soluções.

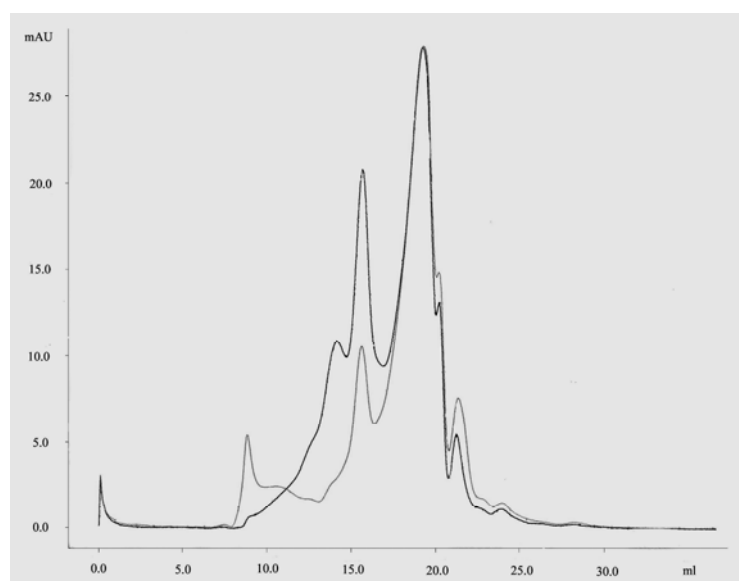


Figura 4.3 - Perfil de eluição por HPLC da lacase nativa (linha escura) e lacase tratada com ultra-sons a 150 kHz por 6 h (linha clara).

A formação do pico de elevado peso molecular é observada no início do volume de eluição (cerca de 9 mL), enquanto que o pico da lacase nativa é consideravelmente menor. Este resultado corrobora a ideia de que os agregados são formados aquando do tratamento das proteínas com ultra-sons.

A formação de agregados em proteínas depois de tratadas com ultra-sons foi observada por vários autores. De acordo com Suslick, Gedanken e os respectivos colaboradores, estes agregados podem ser formados pela exposição dos resíduos de cisteína das proteínas aos radicais reactivos superóxido, produzidos pela sonificação da água na presença do ar, formando-se ligações disulfídicas entre as proteínas (Suslick e Grinstaff 1990, Wong e Suslick 1995, Avivi e Gedanken 2002, 2005).

As proteínas estudadas contêm vários resíduos cisteína (Tabela 4.2). É sabido que em certas condições a estrutura terciária das proteínas pode-se alterar, expondo os grupos sulfídricos e as cistinas, tornando-as quimicamente mais reactivas. A formação de ligações disulfídicas da maioria das proteínas nativas é baixa, mas pode ser incrementada ao desenrolar a estrutura nativa, com a aplicação de altas pressões, temperaturas elevadas. Os resíduos de cisteína e as ligações disulfídicas que são inacessíveis na conformação nativa podem tornar-se mais acessíveis e podem reagir

formando ligações intermoleculares (Visschers 2005).

Tabela 4.2 - Quantidade de resíduos cisteína para as proteínas estudadas

Proteína	Mw (kDa)	Nº de resíduos cisteína
Lacase de <i>Trametes villosa</i> (<i>Swiss-prot</i> nº Q99044)	63	5
Albumina Bovina (<i>Swiss-prot</i> nº PO2769)	66	35

A formação de agregados, em enzimas sujeitas a ultra-sons, foi também verificada por outros investigadores. A enzima fumarase de porco foi induzida à agregação, perdendo a actividade enzimática, pela exposição ao peróxido de hidrogénio e aos radicais livres de hidróxido produzidos por irradiação ultra-sónica de soluções aquosas (Barteri *et al.* 2004). A desactivação da enzima ocorreu devido à formação de agregados disulfídicos. A maior consequência da agregação, de acordo com os autores, foi a rápida diminuição da solubilidade da proteína, formando um precipitado visível. Noutro trabalho, a inibição da agregação da BSA foi estudada adicionando um quelante de radicais livre OH[•] (Perricone *et al.* 1999). Nesse trabalho, a BSA, sendo uma proteína completamente solúvel em água, foi polimerizada pelos radicais livres OH[•], resultando na perda de solubilidade. Quando o L-Ascorbyl-6-palmitat, um quelante de radicais livres OH[•] foi adicionado ao sistema, verificou-se a redução da polimerização da fracção de proteína insolúvel em água.

4.3.3. Descolorização do corante indigo carmim

O grau de descolorização de uma solução de corante de indigo carmim, quando tratada com ultra-sons e/ou lacase, estabilizada ou não com 1% de PVA é apresentado na figura 4.4.

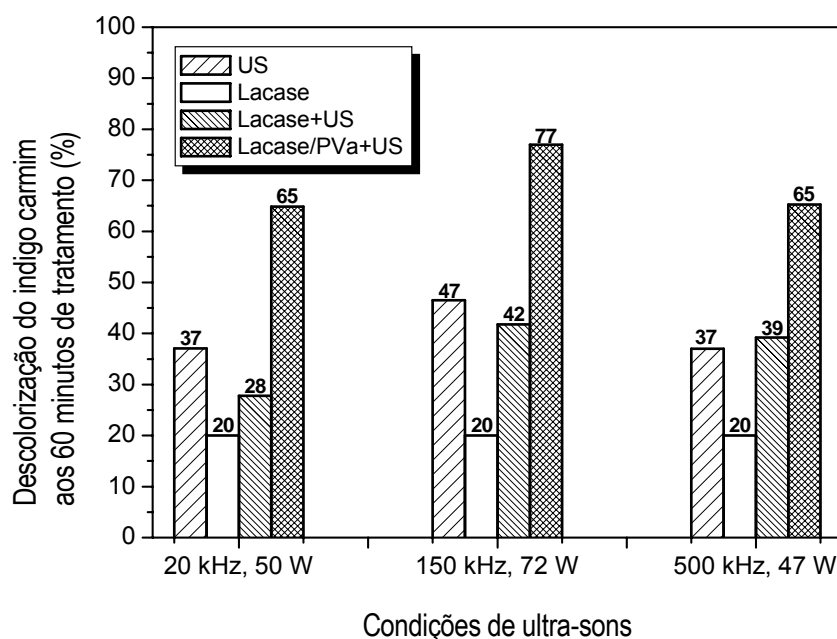


Figura 4.4 - Descolorização do indigo carmin após tratamento com ultra-sons. US – tratamento só com ultra-sons; Lacase – tratamento só com lacase; Lacase+US – tratamento com ultra-sons e lacase; Lacase/PVA+US – tratamento com ultra-sons e lacase estabilizada com PVA.

A descolorização do corante pela lacase sem tratamento de ultra-sons foi de aproximadamente 20 %. A baixa eficiência de descolorização mostra que a lacase não foi capaz de descolorizar completamente a solução de corante no período de uma hora de tratamento. Este resultado está em consonância com outros estudos efectuados. A descolorização completa do indigo carmin pela lacase de *T. hirsuta* foi conseguida apenas após 30 horas de tratamento com a enzima imobilizada em esferas de alginato (Dominguez *et al.* 2005). Quando a mesma lacase foi imobilizada em espuma de aço inoxidável a descolorização demorou aproximadamente 3 dias (Couto *et al.* 2004). Estudos recentes mostram que a descolorização do corante indigo carmin pela lacase de *Trametes villosa* foi de 50 % para 6 horas de tratamento, aumentando para 100 % em menos de uma hora quando foram usados mediadores (Camarero *et al.* 2005). A vantagem do uso do PVA no incremento da descolorização é a sua baixa toxicidade, quando comparada com outros mediadores.

O tratamento efectuado só com ultra-sons permitiu obter um grau de descolorização superior ao obtido pelo tratamento só com lacase, apesar dos seus valores estarem muito próximos aos da descolorização do indigo carmim pela lacase com o PVA (dados não mostrados). O mecanismo da sono-degradação de corantes envolve o fenómeno da cavitação e a concentração de radicais hidróxido no meio aquoso (Okitsu *et al.* 2005). De acordo com Okitsu e colaboradores, a decomposição oxidativa dos corantes ocorre rapidamente, pela sua reacção com os radicais OH• na região da interface do colapso das bolhas (Okitsu *et al.* 2005). O pressuposto, da degradação dos corantes pelos radicais formados durante a cavitação, é confirmado pelo facto de que o grau de descolorização ser acelerado pelo aumento da energia introduzida a determinada frequência (Tezcanli-Güyer e Ince 2004, Rehorek *et al.* 2004).

Neste estudo, o grau máximo de descolorização foi obtido para a frequência de 150 kHz, quer para a solução de indigo carmim tratada só com ultra-sons, quer para a solução de indigo tratada com lacase e ultra-sons ou para a solução de indigo carmim tratada com lacase/PVA e ultra-sons. Para as outras duas frequências estudadas (20 e 500 kHz), os graus de descolorização obtidos em todas as situações foram inferiores e bastante similares. A observação de uma frequência óptima para a degradação de compostos orgânicos, que está relacionada com as suas propriedades químicas e físicas, foi previamente reportada por Pétrier e colaboradores (Francony e Pétrier 1996, Pétrier e Francony 1997, Pétrier *et al.* 1996, Jiang e Pétrier 2006) De acordo com estes autores, a frequência deverá ser otimizada para a reacção induzida pelos radicais OH• para cada composto particular, por forma a conseguir-se o máximo desempenho das reacções sonoquímicas (Francony e Pétrier 1996, Pétrier *et al.* 1996, Jiang e Pétrier 2006). Esta optimização pode ser explicada considerando um processo de dois passos: no primeiro a H₂O e o O₂ são sonolisados no interior da bolha de cavitação produzindo radicais e no segundo, os radicais HO• e HOO• movem-se para a interface liquido-bolha para reagir com o substrato ou recombina-se entre si formando H₂O₂. A velocidade da reacção depende por isso do número de radicais formados dentro da bolha e da extensão da libertação dos radicais para a solução. Com o aumento da frequência, a pulsação e o colapso da bolha ocorrem mais rapidamente e mais radicais escapam da bolha. No entanto, para frequências elevadas, o período da onda acústica é curto e o tamanho da bolha de cavitação diminui. Como consequência, o limiar da cavitação

torna-se superior e a intensidade da cavitação decresce, reduzindo a quantidade de radicais que podem ser libertados para a solução. O valor verificado a 150 kHz é consequência destes dois fenómenos antagónicos. Por outras palavras, para se obter o máximo da velocidade das reacções sonoquímicas induzidas pelos radicais OH• é necessário encontrar a frequência de ultra-sons óptima (Jiang e Pétrier 2006).

A figura 4.5, mostra o efeito sinérgico do PVA na descolorização do indigo carmim em função das condições de ultra-sons. Como mencionado anteriormente a capacidade de descolorização da lacase foi de 20 %, ao passo que o efeito sinérgico do PVA foi de cerca de 9 % para todos os casos. O elevado grau de descolorização obtido para a frequência de 150 kHz pode ser atribuído ao elevado número de radicais formados a esta frequência e consequentemente, ao maior potencial destes para a descolorização do corante

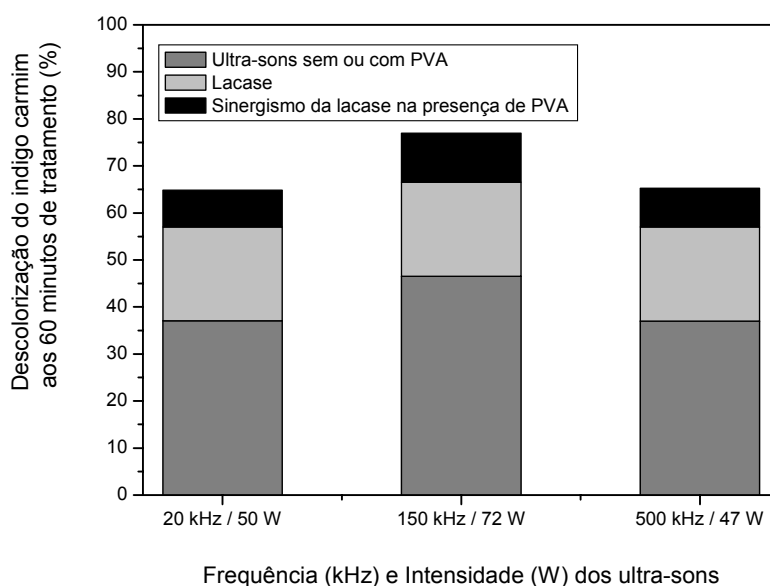


Figura 4.5 - Efeito sinérgico do tratamento com ultra-sons e a lacase estabilizada com PVA.

Estes resultados confirmam o potencial da aplicação de tecnologias ultrasónicas em sistemas de descolorização, com a vantagem de não ser necessário o uso de mediadores para aumentar a descolorização de vários corantes, como o indigo carmim pela lacase.

4.4. Conclusão

Os estudos mostram que a actividade enzimática da lacase de *Trametes villosa* é muito afectada após o tratamento com ultra-sons. A desactivação da enzima poderá ser explicada pela exposição dos resíduos de cisteína e a reacção destes com os radicais formados por cavitação acústica. Este fenómeno leva à agregação da proteína, que pode bloquear completamente o centro activo, e ao mesmo tempo, diminui a estabilidade da proteína.

A adição de PVA e PEG ao meio, aumenta a estabilidade e a eficiência catalítica da enzima, minimizando os efeitos dos ultra-sons. Deste modo, a combinação de processos enzimáticos com ultra-sons pode ser explorada com sucesso. A descolorização do indigo carmim foi consideravelmente elevada para o tratamento combinado de ultra-sons e lacase estabilizada com PVA, onde o grau de descolorização variou entre 65 % e 77 % para uma hora de tratamento. Também se verificou que a descolorização do indigo carmim é dependente da frequência de ultra-sons, tendo-se obtido uma maior eficiência de descolorização a 150 kHz, podendo ser explicada por dois fenómenos antagónicos: a produção e a libertação de radicais livres para o meio reacional.

5

Branqueio de algodão combinando ultrasons e lacase

5. Branqueio de algodão combinando ultra-sons e lacase

5.1. Introdução

A extensão do branqueio do algodão depende do fim a que se destina o material têxtil. As etapas posteriores ao branqueio tais como o tingimento, a estamparia e outros tratamentos finais do algodão, estão relacionadas com o sucesso do mesmo. Os oxidantes químicos utilizados no branqueio, são normalmente doseados em excesso, o que aumenta consideravelmente o nível de poluição dos efluentes têxteis. Nos trabalhos abordados no capítulo 3, demonstrou-se que o pré-tratamento com lacases aumenta o grau de branco do tecido de algodão e reduz significativamente a quantidade de peróxido de hidrogénio no branqueio oxidativo subsequente.

O tratamento enzimático do algodão envolve a transferência de massa da solução enzimática para o interior do substrato têxtil, mas geralmente a difusão é baixa e o efeito é localizado no exterior das fibras. Os ultra-sons permitem aumentar a difusão da enzima para o interior das fibras. O tratamento combinado de ultra-sons com enzimas hidrolíticas (celulases, pectinases, amilases) possibilita uma redução no consumo de enzimas, processos de tratamento mais curtos, menor dano nas fibras e maior uniformidade do tratamento (Yachmenev *et al.* 2001, 2004). No capítulo 4, estudou-se a estabilidade da lacase na presença de ultra-sons, verificando-se que a actividade decresce significativamente. No entanto, a utilização de estabilizadores como o PVA e o PEG, permite aumentar a estabilidade da enzima. Conciliando as particularidades dos ultra-sons e dos biocatalizadores, procurar-se-á neste capítulo demonstrar a capacidade da lacase estabilizada com PVA no branqueio de algodão na presença de ultra-sons.

5.2. Parte experimental

5.2.1. Actividade enzimática da lacase

A actividade enzimática foi determinada conforme descrito no ponto 2.2.1. Tal como descrito em 2.2.5, a actividade da lacase ao longo do branqueio foi seguida, pelo consumo de oxigénio, utilizando a sonda de oxigénio CellOx 325 (WTW GMH & Co. KG) em reactor hermeticamente fechado e termostatizado

5.2.2. Equipamento de ultra-sons

O equipamento utilizado nestes ensaios foi o descrito em 4.2.10. A intensidade dos ultra-sons usada e a distância entre o transdutor e a amostra foram seleccionados de acordo com estudos preliminares. Nesses estudos, intensidades de 7, 30 e 50 W foram aplicadas a amostras de folha de alumínio (90 mm x 90 mm) fixas perpendicularmente a uma distância de 0,5 a 2 cm do transdutor em tampão acetato pH 5, à temperatura de 50 °C, durante 30 minutos. A distância óptima encontrada entre o transdutor e material foi de 0,5 cm, tendo sido aquela que afectou o máximo de área (cerca de 35%) da folha de alumínio. A posição perpendicular da amostra em relação ao transdutor foi escolhida para esta aplicação específica de forma a aumentar a difusão da enzima e a penetração deste nos poros do material têxtil. Sabe-se que o tecido colocado paralelamente favorece a remoção de impurezas da superfície devido aos efeitos dos microjatos (Moholkar e Warmoeskerken 2004).

5.2.3. Estabilidade da lacase na presença de ultra-sons

Soluções de lacase (1000 U) preparadas em tampão acetato 0,1 M e pH 5 foram sujeitas durante 40 minutos a ultra-sons de frequência de 20 kHz e intensidades de 7, 30 e 50 W e à temperatura de 50 ± 2 °C. A actividade inicial e final da enzima foi determinada conforme descrito em 2.2.1. A enzima foi posteriormente estabilizada com PVA com massa molecular média de 30,000-70,000 g/mol, tendo-se testado as concentrações de 1, 5 e 10 % p/v.

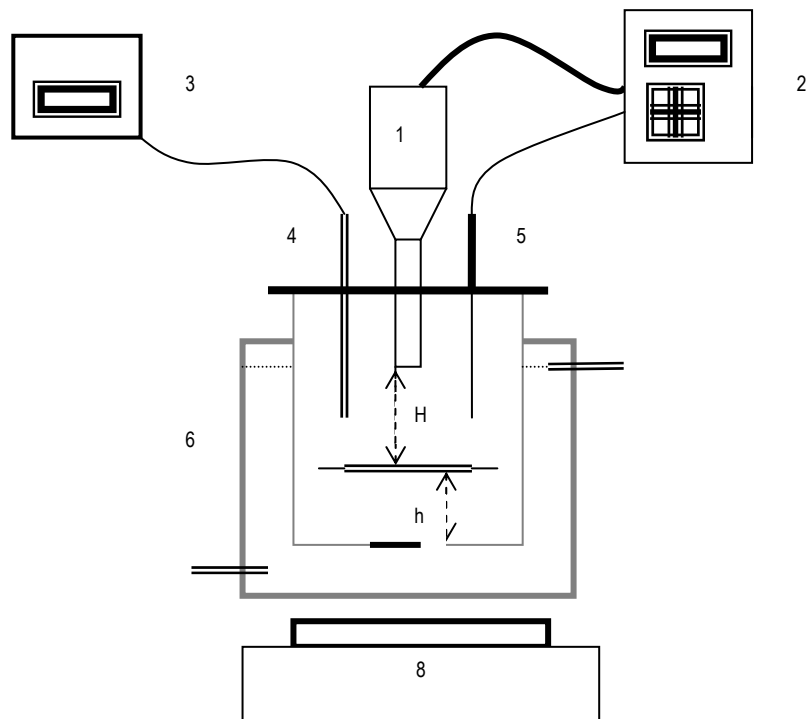


Figura 5.1 - Esquema experimental: (1) sonda de ultra-sons; (2) gerador; (3) medidor de oxigênio; (4) sonda de oxigênio; (5) sonda de temperatura; (6) reator termostático e hermeticamente fechado; (7) amostra; (8) equipamento de agitação; (H) distância entre a amostra e a sonda; (h) distância da amostra ao fundo do reator.

5.2.4. Combinação de lacases e ultra-sons no branqueio de algodão

O substrato têxtil utilizado neste estudo foi tecido de algodão com as características definidas em 3.2.1 e sujeito à fervura alcalina conforme o procedimento descrito em 3.2.2. As amostras de tecido de 1 g (90 mm x 90 mm) foram fixas perpendicularmente ao transdutor a uma distância de 0,5 cm e tratadas simultaneamente com lacase e ultra-sons (20 kHz e 7 W) em tampão acetato, à temperatura de 50 ± 2 °C durante 30 minutos. O consumo de oxigênio durante o tratamento foi seguido continuamente, segundo o mesmo procedimento descrito em 2.2.3. Posteriormente, as amostras foram branqueadas, segundo o protocolo de branqueio com peróxido descrito em 3.2.6 e o grau de branco das amostras foi determinado, conforme descrito em 3.2.7.

5.3. Resultados e discussão

A maioria dos efeitos físicos e químicos dos ultra-sons são devidos aos fenómenos de cavitação. A formação, crescimento e colapso de bolhas aquando da sonificação da água gera localmente temperaturas elevadas e altas pressões. Se o colapso das bolhas ocorre na vizinhança da superfície sólida, como o tecido de algodão, as bolhas sofrem uma deformação, resultando na formação de microjactos de alta velocidade em direcção à superfície do tecido. Estes microjactos aceleram o transporte do biocatalizador do meio aquoso para o substrato têxtil e subsequentemente por toda a sua estrutura. Contudo, a formação dos microjactos, conjuntamente com a produção de radicais hidróxido e a geração de calor durante o colapso das bolhas, afectam também a estabilidade da enzima, sendo este um factor limitante da aplicação conjunto de ultra-sons e enzimas. As enzimas são facilmente desnaturadas por pequenas alterações das condições ambientais como a temperatura, a pressão, o pH e a força iónica. Neste estudo verificou-se que a actividade da lacase diminuiu com o aumento da intensidade de ultra-sons de 7 a 50 W e esta tendência foi mais pronunciada para tempos de tratamento acima de 10 minutos (Figura 5.2). Um ligeiro decréscimo da actividade foi também observado para a agitação da solução enzimática 400 rpm.

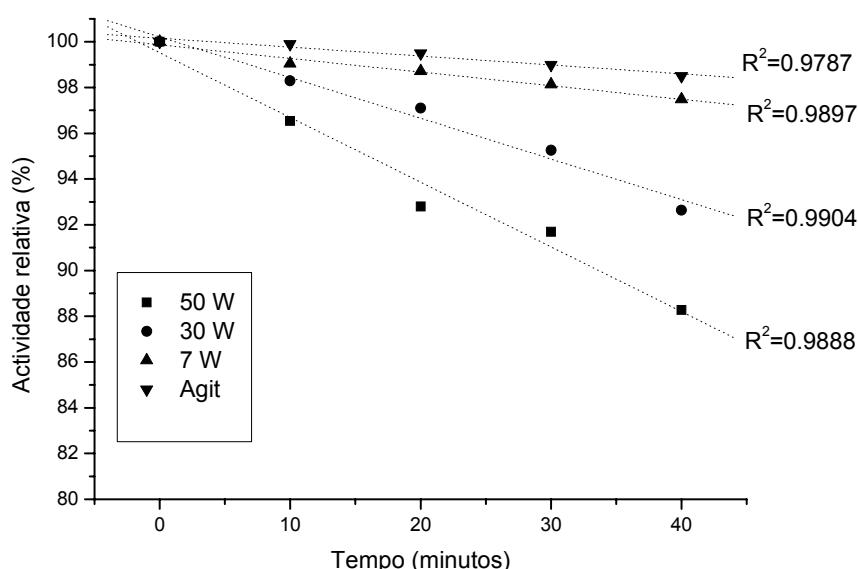


Figura 5.2 - Actividade da lacase depois da aplicação de ultra-sons de frequência de 20 kHz e intensidades de 7, 30 e 50 W em tampão acetato pH 5, a 50 °C. A actividade a 100 % corresponde a 1000 U.

A perda da actividade catalítica da enzima com a aplicação dos ultra-sons implica o uso de estabilizadores para a enzima. A estabilidade enzimática de soluções aquosas de lacase e 1, 5 e 10 % p/v de PVA foi testada após sonificação, durante 40 minutos a 50 ± 2 °C (Tabela 5.1). Verificou-se que o aumento da concentração de PVA não afecta significativamente a actividade da lacase nestas condições. Por outro lado, a maior estabilidade enzimática encontrada para todas as intensidades, foi obtida para 10 % de PVA. O papel dos polióis na estabilização das enzimas deve-se à formação de uma barreira que as envolve, prevenindo o crosslinking e a agregação das proteínas promovida pelos radicais formados no processo de sonificação, conforme demonstrado no capítulo anterior.

Tabela 5.1 - Actividade relativa da lacase após tratamento com ultra-sons

Intensidade de ultra-sons	Actividade relativa da lacase (%)		
	(1 % p/v PVA)	(5 % p/v PVA)	(10 % p/v PVA)
20 kHz			
7 W	98,56 ± 0,39	98,78 ± 0,20	99,67 ± 0,66
30 W	96,65 ± 0,68	98,14 ± 0,51	98,34 ± 0,33
50 W	92,36 ± 1,11	93,94 ± 0,69	97,90 ± 0,82

5.3.1. Branqueio de tecido de algodão

O tratamento de tecido de algodão com lacase (360 U), antes do branqueio convencional com peróxido de hidrogénio, foi realizado durante 30 minutos à temperatura de 50 ± 2 °C e pH 5. O grau de branco (ΔW^*) da lacase, foi calculado como a diferença entre o grau de branco das amostras tratadas com ultra-sons e/ou enzima e o das amostras tratadas só com tampão (Figura 5.3). Os resultados obtidos neste estudo vão de encontro aos apresentados no capítulo 3, onde a aplicação da enzima sem a adição de PVA, diminui o grau de branco do tecido. A matéria corada do algodão, composta na sua maioria por pigmentos, sofre oxidação e escurecem com a aplicação da lacase (Makris e Rossiter 2002, Mejias *et al.* 2002).

O branqueio com peróxido de hidrogénio das amostras pré-tratadas enzimaticamente conduz a um aumento no grau de branco de 1,67 unidades, obtido comparando o grau de branco dos tecidos não tratados e posteriormente branqueados com peróxido. Por

outro lado, combinando o pré-tratamento enzimático com ultra-sons, possibilita o aumento do grau de branco em cerca de 0,60 unidades. A redução do consumo de oxigénio no pré-tratamento enzimático com ultra-sons, foi a evidência clara para o decréscimo da actividade enzimática durante a sonificação, também suportados pelos resultados da figura 5.2. No entanto, o decréscimo da actividade da lacase terá sido compensado pela eficiência de limpeza dos ultra-sons, devida aos microjactos formados aquando da cavitação, os quais promovem a adsorção e a inclusão da enzima na estrutura do tecido, contribuindo para o escurecimento do tecido

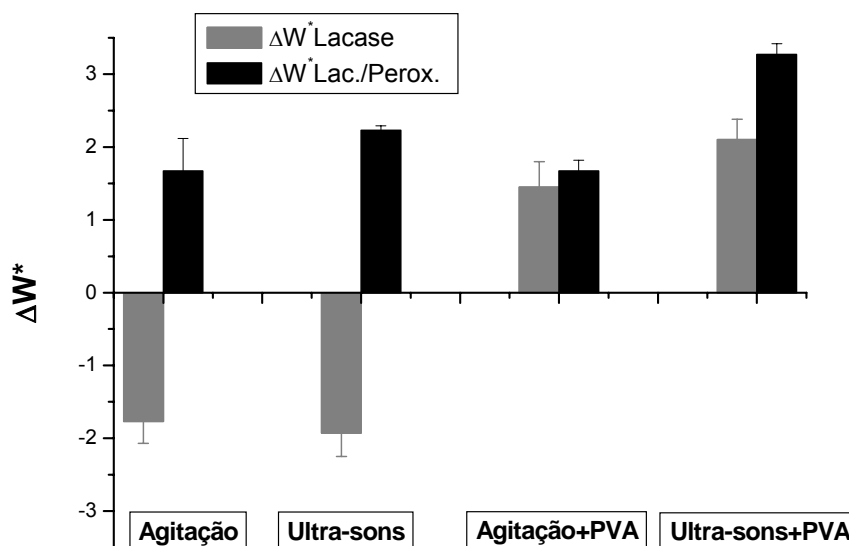


Figura 5.3 - Efeito da lacase (360 U) e/ou ultra-sons (7W, 20 kHz) no pré-tratamento do algodão a pH 5 a 50 °C, durante 30 minutos. A linha de base ($\Delta W^*=0$) representa o tratamento com tampão, sem enzima, nas mesmas condições de agitação e ultra-sons.

No caso da utilização do PVA dever-se-ão considerar os seus efeitos sobre o biocatalizador, nomeadamente o efeito da estabilização e o efeito da viscosidade do meio e a adesão do PVA às fibras, dificultando desta forma a oxidação dos pigmentos presentes no tecido. As soluções aquosas de PVA de elevado grau de hidrólise, com concentração de cerca de 10 % p/v (D.P. 1200-2000) tendem a formar uma rede de moléculas ligadas por ligações de hidrogénio. Contudo, a aplicação continua tensões, promovida pela agitação ou pelas ondas ultrasónicas terão sido capaz de quebrar as ligações das moléculas de PVA e a viscosidade da solução decresce aparentemente

depois de 10-15 minutos de tratamento. Este facto propicia a penetração da enzima dentro da estrutura porosa do material têxtil. Contudo, o escurecimento do tecido não foi observado (Figura 5.3), sugerindo que, exceptuando os pigmentos do algodão, só o PVA poderá ser um possível substrato da lacase. As oxidases foram identificadas como capazes de degradar o PVA (Shimao 2001, Chiellini *et al.* 2003). A degradação do PVA consiste em dois tipos de reacção nomeadamente, a oxidação dos grupos OH (C=O) e a ruptura das ligações C-C, com produção de peróxido de hidrogénio. A degradação oxidativa do PVA pode também diminuir a viscosidade da solução. Então o aumento do branqueio obtido com a aplicação da enzima estabilizada com PVA e ultra-sons pode ser atribuído à activação por ultra-sons do peróxido formado (Naffrechoux *et al.* 2000, Périer *et al.* 1996) e não à oxidação enzimática da matéria corada do algodão.

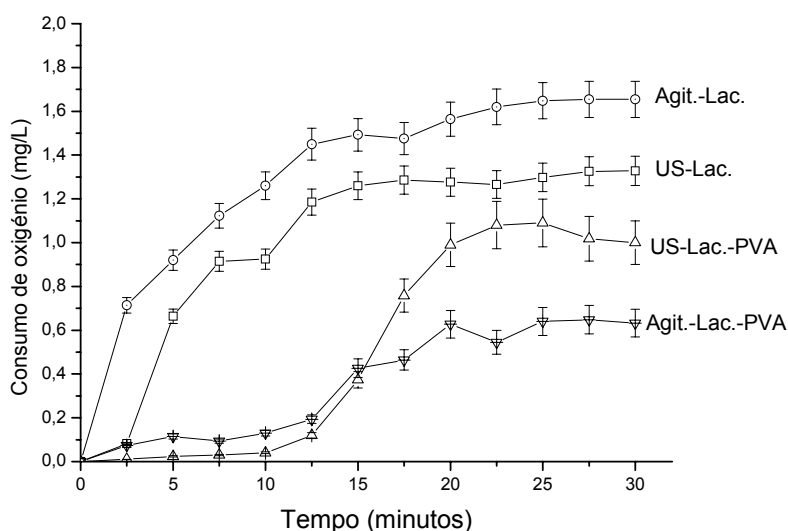


Figura 5.4 - Consumo de oxigénio no tratamento de tecido de algodão com apenas lacase ou combinando lacase e ultra-sons de 7 W, a 20 kHz, a pH 5, e à temperatura de 50 °C. A enzima foi estabilizada com 10 % p/v de PVA.

5.4. Conclusão

Mostrou-se no capítulo 3, a capacidade da lacase no melhoramento do branqueio do algodão. No presente trabalho tentou-se melhorar o processo enzimático com a introdução de ultra-sons. O fornecimento de energia ultra-sónica de baixa intensidade (7W) ao pré-tratamento enzimático do tecido conduziu a um aumento no grau de branco, após o branqueio convencional com peróxido. O efeito sinérgico entre o biocatalisador e os ultra-sons parece contribuir para os resultados observados, tendo-se observado no entanto, a inactivação da lacase durante o processo. A enzima foi posteriormente estabilizada com 10% p/v de PVA. Contudo, para além do efeito estabilizador do PVA, a oxidação do substrato têxtil foi também evitada, quer devido a restrições de viscosidade para a difusão da enzima para o interior da fibra, quer devido à elevada afinidade do PVA relativamente à celulose e à formação de um filme protector nas fibras. O PVA parece também poder ser um substrato para a lacase e, o peróxido gerado durante a sua oxidação/degradação, poderá contribuir, juntamente com os ultra-sons, para os efeitos de branqueio não enzimáticos. O aumento do branqueio combinando enzima/ultra-sons pode ser explicado pela aceleração da reacção heterogénea enzima-fibra e pela formação de espécies reactivas.

A estabilização da enzima com PVA talvez não seja necessária para tempos de aplicação curtos e quando a intensidade de ultra-sons aplicada não seja muito elevada, no caso do pré-tratamento com a lacase de *Trametes villosa* de tecidos de algodão. No capítulo seguinte estudar-se-á a polimerização enzimática do catecol auxiliado pelos ultra-sons, sem estabilização com polióis.

6

Polimerização sono-enzimática do catecol

6. Polimerização sono-enzimática do catecol

6.1. Introdução

A capacidade das lacases, expressa na polimerização, na ligação e na funcionalização de vários compostos, foi extensivamente estudada e aumentou o interesse na aplicação destas enzimas como biocatalizadores na síntese orgânica (Gianfreda *et al.* 2003, Aktas e Tanyolac 2003, Mita *et al.* 2003, Aktas *et al.* 2001, Karamyshev *et al.* 2003, Tzanko *et al.* 2003, Guresir *et al.* 2005). As lacases são capazes de catalisar a transformação de vários compostos aromáticos, especificamente fenois e anilinas, através da formação de radicais livres. O radical pode reagir com vários halogénios e fenois (Johannes e Majacherczyk 2000, Soares *et al.* 2002). Os derivados fenólicos originados na agregação polimérica são normalmente menos solúveis e mais estáveis que os compostos de origem (Grönqvist *et al.* 2003, Mayer e Staples 2002). O tempo de vida catalítico relativamente curto da lacase nos processos de polimerização e a limitação na transferência de massa restringem a sua aplicação. Esta desvantagem pode ser atribuída à inactivação do centro activo da enzima devido ao radical fenóxido e aos polímeros produzidos durante o tratamento enzimático (Nakamoto e Machida 1992). Para ultrapassar essas limitações, o uso de ultra-sons em condições adequadas mostrou-se eficaz de modo a aumentar significativamente a transferência de massa, assim como a estabilidade estrutural, a ligação ao substrato e a actividade da enzima (Cruz *et al.* 2006, López *et al.* 1994).

Nos capítulos anteriores estudaram-se os processos enzimáticos auxiliados por ultra-sons. A eficiência da aplicação simultânea destes aumenta, para alguns estudos com a estabilização da enzima com polióis. Neste capítulo pretende-se estudar a capacidade da lacase de *Trametes villosa* em combinação com ultra-sons no aumento da polimerização radicalar do catecol. Será avaliada a síntese sono-enzimática do policatecol e a coloração de tecido de lã com o polímero formado.

6.2. Parte experimental

6.2.1. Reagentes

A enzima utilizada neste trabalho foi a lacase de *Trametes villosa*, com as características descritas no capítulo 2. O tecido 100 % lã foi gentilmente fornecido pela empresa Albano Antunes Morgado Lda (Castanheira de Pera, Portugal). Todos os outros reagentes foram fornecidos pela Sigma-Aldrich.

6.2.2. Polimerização do catecol com ultra-sons e enzima

Várias soluções de 1 mM de catecol em tampão acetato 0,1 M e pH 5 foram tratadas num reactor de ultra-sons, cuja frequência foi de 20 kHz, com as especificações descritas em 4.2.10. As intensidades de ultra-sons foram de 7, 30 e 50 W, determinadas pelo método calorimétrico descrito em 1.2.2. As soluções de catecol foram tratadas com lacase na presença ou ausência dos ultra-sons. A concentração de lacase usada foi de 56 U. A temperatura e o tempo de tratamento foram de 50 °C e de 120 minutos, respectivamente. A amostra de controlo sofreu o mesmo tratamento com agitação, mas sem ultra-sons.

6.2.3. Tratamento prévio do tecido de lã

O tecido de lã foi previamente lavado com 1 g/L de surfactante não iónico, Lutensol AT-25 (BASF, Ludwigshafen, Germany), com uma razão de banho de 20:1, em tampão de carbonato de sódio 0,1 M e pH 9, durante 30 minutos, à temperatura de 40° C, no Rotawash (MKII Series 7227, da Shirley Developments Limited, Stockport, Inglaterra). O surfactante presente no tecido foi removido lavando abundantemente com água da torneira e água destilada e as amostras foram secas ao ar..

6.2.4. Coloração de tecido de lã com polímero de catecol

Foram efectuados testes de polimerização do catecol com e sem ultra-sons em tecidos de lã imersos na solução de catecol, previamente descrita, a 50 °C durante 30 minutos. A força da cor foi avaliada em termos de valor de K/S e estes foram calculados usando a equação de Kubelca-Munk's, usando o equipamento mencionado no ponto 3.2.7. Antes da medição dos valores de K/S, as amostras foram lavadas com água da torneira

e destilada e secas ao ar.

6.2.5. Cromatografia por exclusão de tamanhos

A distribuição dos pesos moleculares foi determinada por cromatografia por exclusão de tamanhos utilizando a coluna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech). O eluente utilizado foi o tampão fosfato a pH 6,5 (50 mM KH_2PO_4 , 100 mM KCl) e o caudal foi de 0,5 mL/min. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. A identificação dos picos após a separação cromatográfica foi feita com espectrofotómetro de detecção UV a 280 nm (K-2501 KNAUER). A curva de calibração para a determinação por HPLC de policatecol foi preparada com os padrões, de pesos moleculares 6,5; 12,4; 29, 66; 150; 200; 430 e 669 kDa. Da solução de catecol tratada com ultra-sons (20 kHz a 50 W durante 120 minutos) foi retirada uma amostra com 2 mL e dissolvida num mililitro de NaOH de concentração 0,5 M e injectada na coluna. Foi preparada uma solução de controlo (sem tratamento com US) seguindo o mesmo procedimento.

6.3. Resultados e discussão

A relação entre a polimerização em solução, do catecol com a lacase, e a intensidade de ultra-sons foi avaliada neste trabalho. O catecol foi escolhido como substrato da lacase, pois este polimeriza, formando produtos pouco solúveis. O catecol é oxidado pela lacase originando radicais arilóxi, que podem sofrer adicionalmente reacções não enzimáticas, originando dímeros corados, oligomeros e polímeros. Os radicais livres alquoxi podem-se ligar na posição orto e para com os grupos hidróxido e podem formar quininas (Zille *et al.* 2005, Aktas e Tanyolac 2003). Como demonstrado anteriormente, a actividade da enzima decresce significativamente na presença de ultra-sons com elevadas intensidades (Potapovich *et al.* 2005, Rachinskaya *et al.* 2004). Contudo, os resultados mostram que a polimerização enzimática do catecol pode ser incrementada com os ultra-sons, ajustando o tempo de aplicação e a intensidade (Figura 6.1). Contudo, nas mesmas condições de tratamento, sem lacase, e utilizando apenas a sonificação da solução não foi observada formação de polímero. A figura 6.1 mostra a relação linear entre a oxidação do catecol sujeita a diferentes intensidades: 7, 30 e 50 W de ultra-sons para a frequência de 20 kHz, para um tempo de tratamento de 120 minutos.

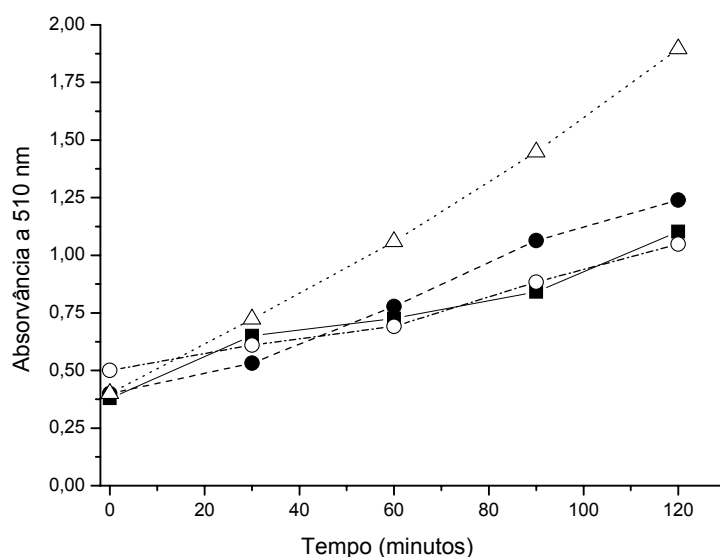


Figura 6.1 - Polimerização sono-enzimática do catecol com a lacase, a 50 °C no sistema de ultra-sons de 20 kHz, a várias intensidades: 7 W ■, 30 W ●, 50 W △, sistema com agitação (controle) ○.

Os resultados podem ser atribuídos aos radicais hidróxido produzidos pela sonificação da água, que reagem com os produtos intermédios, previamente originados pela enzima, aumentando a polimerização do catecol (Mita *et al.* 2003, Mahamuni e Pandit 2006, Enterazi e Pétrier 2004). É evidente que a intensidade de ultra-sons é o factor limitante para a eficiência da bio-polimerização do catecol. Na presença da lacase a polimerização do catecol pode ser incrementada até ao máximo de 50 W. Para intensidades elevadas, a actividade da lacase decresce tão rapidamente, que não se formam eficazmente os produtos intermédios, limitando a acção dos radicais hidróxido.

Os cromatogramas dos polímeros obtidos a 50 °C para as reacções conduzidas num reactor com agitação e num reactor com ultra-sons (20 kHz e 50 W) mostram diferenças inesperadas. O cromatograma do sistema sono-enzimático apresenta mais dois picos (U2 e U4) que o sistema de agitação (Figura 6.2).

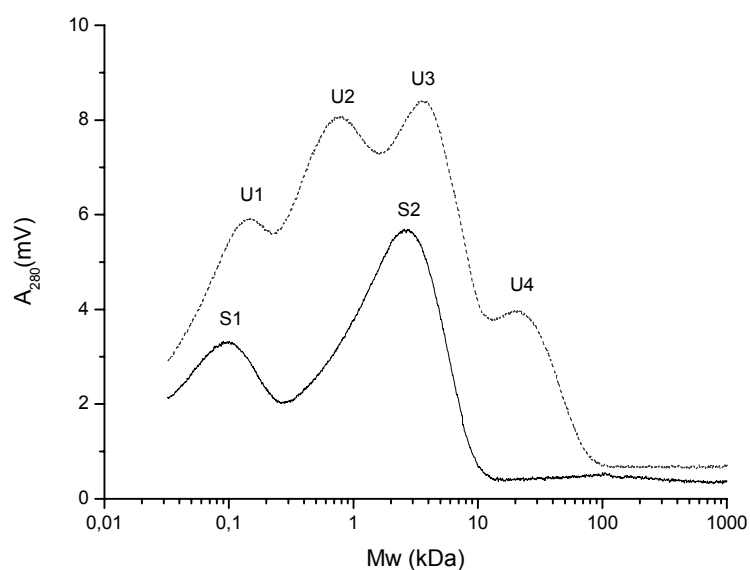


Figura 6.2 - Cromatogramas de HPLC da polimerização do catecol com a lacase de *Trametes villosa*, a 50 °C no sistema de agitação (linha contínua) e no sistema de ultra-sons a 20 kHz e 50 W (linha tracejada).

Os polímeros formados na presença de ultra-sons apresentam valores de peso molecular médio (M_{Wp}) e grau de polimerização médio (Dp_p) superiores aos do sistema de agitação (tabela 6.1). Os picos U1 e U3 no sistema de sonificação são comparáveis

com os picos S1 e S2 no sistema de agitação, respectivamente. Estes picos têm valores similares de peso molecular. Contudo, no sistema de sonificação os valores elevados de grau de polimerização médio confirmam os efeitos positivos dos ultra-sons no aumento do grau de polimerização. Os picos U2 e U4 não são visíveis no cromatograma característico do sistema de agitação. O pico U4 apresenta valores elevados de M_{Wp} e Dp_p , 22,3 kDa e 206,2 respectivamente. A formação de polímeros de elevado peso molecular pode ser explicada devido ao sinergismo entre a acção da enzima e dos ultra-sons, uma vez que não ocorre polimerização do catecol só com o tratamento com ultra-sons.

A polimerização enzimática do catecol sem ultra-sons foi prévia e extensivamente estudada (Aktas 2005, Aktas e Tanyolac 2003). Tendo-se obtido polímeros de baixo peso molecular (0,8 kDa), usando solventes orgânicos para aumentar a cadeia, o que pode limitar a sua aplicação (Aktas *et al.* 2003).

Tabela 6.1 - Pesos moleculares médios (M_{Wp}) e grau médio de polimerização (Dp_p) dos polímeros de catecol. Os valores dos pesos moleculares foram estimados recorrendo à recta de calibração de equação:

$$\log Mw = (- 2,2 \pm 0,2) (\text{tempo de retenção} \times \text{caudal} / V_0 + (5,4 \pm 0,3))$$

Picos	Sistema de Ultra-sons				Sistema de agitação	
	U1	U2	U3	U4	S1	S2
M_{Wp} (kDa)	0,1894	0,8664	4,0193	22,2660	0,1208	3,0937
Dp_p	1,75	8,02	37,21	206,17	1,11	28,65

Para testar a polimerização em fase sólida foram colocadas no meio líquido amostras de tecido de lã, nas mesmas condições operacionais descritas anteriormente. O polímero sintetizado sono-enzimaticamente foi adsorvido pelo tecido de lã, conferindo ao mesmo uma coloração castanha escura.

Os mecanismos da polimerização sono-enzimática do catecol não são muito conhecidos. Na figura 6.3 é apresentada a força da cor dos tecidos em termos de valores de K/S, como medida do grau de polimerização, em função de diferentes intensidades de ultra-sons. A coloração das amostras é mais acentuada quando a

intensidade de ultra-sons é superior a 10 W. Para intensidades mais baixas, o valor de K/S do tecido é menor, devendo-se à diminuição da cavitação, traduzindo-se na redução de radicais livres formados e na diminuição da transferência de massa, devida aos microjactos

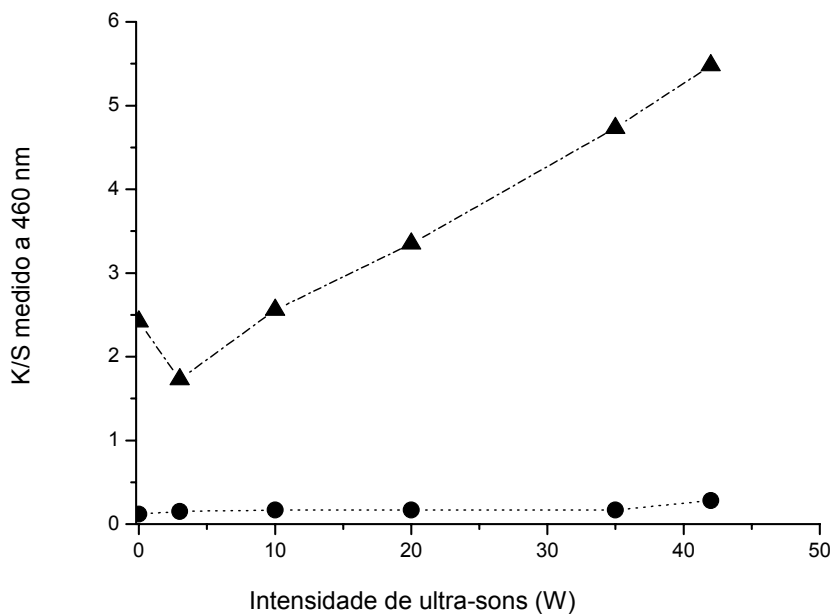


Figura 6.3 - Coloração sono-enzimática da lã com polímero de catecol a diferentes intensidades de ultra-sons, com (▲) e sem (●) lacase.

Conforme apresentado no ponto 4.3 (Figura 4.1), a formação de radicais hidróxido aumenta com a intensidade introduzida no sistema. O aumento do processo de difusão, devido à acção dos ultra-sons, pode promover a acessibilidade da enzima e poderá afectar o centro activo da mesma. Ao mesmo tempo os radicais hidróxido, originados por ultra-sons, podem reagir com as moléculas de catecol oxidado enzimaticamente, promovendo a formação de cadeias poliméricas (Enterazi *et al.* 2006).

6.4. Conclusão

Os ultra-sons de baixa frequência (20 kHz), aplicados até à intensidade máxima de 50 W, aumentam os processos de difusão e podem apresentar efeitos positivos no centro activo da lacase, no caso da polimerização do catecol. Além disso, os radicais hidróxido, produzidos por ultra-sons podem reagir com as moléculas produzidas pela enzima, aumentando a polimerização enzimática do catecol. A polimerização sono-enzimática origina polímeros de maior peso molecular (~22 kDa) que a polimerização enzimática convencional (~1 kDa), sendo uma oportunidade de produzir uma nova classe de polímeros sintetizados enzimaticamente e desenvolver técnicas de revestimento a partir da oxidação de compostos fenólicos em condições moderadas de temperatura e pH.

7

Conclusões e perspectivas futuras

7. Conclusões e perspectivas futuras

As características do meio reacional sonificado, em particular na zona da cavitação, são propícias ao desenvolvimento inúmeros fenómenos físicos e químicos, resultantes da libertação de elevadas quantidades de energia, do aumento da pressão e da formação e libertação de radicais livres. Por outro lado, a propagação da onda no meio e a formação de microjactos, resultantes do colapso da bolha, propicia o aumento da transferência de massa em sistemas heterogéneos. A sonificação de soluções enzimáticas, com intensidades elevadas, reduz significativamente a actividade da mesma. Assim sendo, a aplicação dos processos sonobiotecnológicos estaria comprometida mas, a protecção da enzima com a adicção de polióis como o PVA, tornou possível a sua aplicação em vários processos têxteis, com aspectos positivos acrescidos. O acréscimo de 50 % na eficiência de descolorização do corante índigo carmim, comparativamente a descolorização só com lacase, a redução da concentração de peróxido de hidrogénio a utilizar no branqueio de tecido de algodão quando precedido de um pré-tratamento sonoenzimático e os efeitos positivos dos radicais livres no centro activo da lacase no caso da polimerização do catecol

O consumo de energia eléctrica, dos equipamentos ultra-ónicos e o custo das enzimas, são factores que condicionam a aplicação dos processos sonobiotecnológicos na indústria têxtil. Contudo, dever-se-á incluir no balanço global, os benefícios resultantes da redução de água, de químicos, de enzima.

Face aos resultados apresentados nesta tese, pode-se concluir que os processos sonobiotecnológicos poderão ser uma via para o estudo e desenvolvimento de processos ambientalmente mais favoráveis, alternativos ou complementares aos processos têxteis convencionais.

Referências

- Abadula E, Tzanov T, Costa S, Robra K H, Cavaco-Paulo A, Gübitz G M (2000)** Decolorisation and detoxification of textile dyes with laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3357-3362.
- Adewuyi Y G (2001)** Sonochemistry: environmental science and engineering applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40, 4681.
- Aggelis G, Iconomou D, Christou M, Bokas D, Kotzaillas S, Christou G, Tsagou V, Papanikolau S (2003)** Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res.* 37:3897-3904.
- Aktas N, Kibarar G, Tanyolaç A (2000)** Effects of reaction conditions on laccase-catalysed 1-naphthol polymerisation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:840-846.
- Aktas N, Tanyolaç A (2003)** Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol. *J. Molecul. Catal. B: Enz.* 22:61-69.
- Aktas N, Tanyolaç A (2003)** Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol, *Bioresour Technol.* 87:209–214.
- Aktas N (2005)** Optimization of biopolymerization rate by response surface methodology (RSM) *Enz. Microb. Technol.* 37(4):441-447.
- Aktas N, Cicek H, Unal A T, Kibarar G, Kolankaya N, Tanyolac A (2001)** Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol *Bioresour. Technol.* 80 : 29-36.
- Avivi S, Gedanken A (2002)** S-S bonds are not required for the sonochemical formation of proteinaceous microspheres: the case of streptavidin. *Biochem J.* 366:705-

707.

Avivi S, Gedanken A (2005) The preparation of avidin microspheres using the sonochemical method and the interaction of the microspheres with biotin, *Ultrasonics Sonochemistry* 12:405-409.

Balakshin M, Chen C L, Gratzl J S, Kirkman A G, Jakob H (2001) Biobleaching of pulp with dioxygen in laccase-mediator system-effect of variables on the reaction kinetics. *J. Molecul. Catal. B: Enz.* 16:205-215.

Barreca A M, Fabbrini G, Galli C, Gentili P, Ljunggren S (2003) Laccase/mediated oxidation of lignin model for improved delignification procedures. *J. Molecul. Catal. B: Enz.* 26:105-110.

Barteri M, Diociaiuti M, Pala A, Rotella S (2004) Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production. *Biophysical Chemistry.* 111:35-42.

Batra SH (1985) *Handbook of Fiber Science and Technology*, vol. IV, M.Lewin and E.M. Pearce, Eds. Marcel Dekker NY.

Bauer C G, Kuhn A, Gajovic N, Skorobogatko O, Holt P J, Bruce N C, Makower A, Lowe C R, Scheller F W (1999) New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Presenius J. Anal. Chem.* 364:179-183.

Berlan M J, Mason T J (1992). Sonochemistry from research laboratories to industrial plants. *Ultrasonics* 30:203.

Bollag J-M (1992) Decontaminating soil with enzymes. *Environmental Science and Technology.* 26:1876-1881.

Bollag J-M, Shuttleworth K L, Anderson D H (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Applied Environmental Microbiology.* 54:3086-3091.

Bourbonnais R, Paice M G (1996) Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi J.* 79:199-204.

Bourbonnais R, Paice M G, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:4627-4632.

Brack N, Lamb R, Pham D, Turner P (1999) Nonionic surfactants and the wool fibre surface. *Colloids surf Physochem Eng Aspects.* 146:405-415.

Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry.* 72:248-254.

Bressler D C, Fedorak P M, Pickard M A (2000) Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Coriolopsis gallica*. *Biotech. Lett.* 22:1119-1125.

Buchert J, Pere J, Puolakka A, Nousiainen P (2000) Enzymatic scouring of cotton with pectinases, proteases and lipases. *Textile Chemist and Colorist and American Dyestuff.* 32 (5):48-52.

Burton S G (2003) Laccases and phenol oxidases in organic synthesis – a Review. *Current Organic Chemistry.* 7:1317-1331.

Buschle-Diller G, El Mogahzy Y, Inglesby M K, Zeronian S H (1998) Effects of scouring with enzymes, organic solvents, and caustic soda on the properties of hydrogen peroxide bleached cotton yarn. *Textile Res J.* 68:920–929.

Buschle-Diller G, Inglesby M K, Wu Y (2005) Physicochemical properties of chemically and enzymatically modified cellulosic surfaces, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 260:63–70.

Calafell M, Garriga P (2004) Effect of some process parameters in the enzymatic scouring of cotton using an acid pectinase. *Enzyme and Microbial Technology*. 34(3-4):326-331.

Calafell M, Klug-Santner B, Guebitz G M Garriga P (2005) Dyeing behaviour of cotton fabric bioscoured with pectate lyase and polygalacturonase. *Coloration Technology*. 121(6):291-297.

Calafell M, Torrades F, Rodo J, Cayuela D, Blanco A, Pastor F I J, Puig A, Gacén J (1998) Enzymatic scouring of cotton - an approach to cleaning technologies (Descrudado enzimático del algodón - Una aproximación a las tecnologías limpias. *Revista de Química Textil*. 139:83-89.

Call H P, Mücke I (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *J. Biotechnol.* 53:163-2002.

Camarero S, Garcia O, Vidal T, Colomb J, del Rio J C, Gutiérrez A, Gras J M, Monjea R, Martínez M J, Martínez A T (2004) Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enz. Microbial Technol.* 35:113-120.

Camarero S, Ibarra D, Martínez M J, Martínez A T (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes, *Applied and Environmental Microbiology*. 71(4):1775-1784.

Campos R, Kandelbauer A, Robra K H, Cavaco-Paulo A, Gübitz G M (2001) Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J. Biotechnology*. 89:131-139.

Canal J M, Navarro A, Calafell M, Rodríguez C, Caballero G, Vega B, Canal C, Paul R (2004) Effect of various bioscouring systems on the accessibility of dyes into cotton. *Coloration Technology*. 120(6):311-315.

Caza N, Bewtra J K, Biswas N, Taylor K E (1999) Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase, *Water Research* 33(13):3012-3018.

Chiellini E, Corti A, D'Antone S, Solaro R (2003) Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Prog. Polym. Sci.* 28(6):963-1014.

Claus H, Filip Z (1997) The evidence of a laccase-like activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiol. Res.* 152:209-215.

Cole J L, Clarke P A, Solomon E I (1990) Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an X-ray absorption edge study. *J. Am. Chem. Soc.* 112 (6):2243-2249.

Cortez J, Bonner P L R, Griffin M (2004) Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. *Enzyme Microbial Technol.* 34:64-72.

Costa S A, Tzanov T, Carneiro F, Gübitz G M, Cavaco-Paulo A (2002) Recycling of textile bleaching effluents for dyeing using immobilized catalase, *Biotechnology Letters* 24:173–176.

Couto S R, Sanromán M, Gübitz G M (2005) Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere.* 58:417-422.

Couto S R, Sanromán M A, Hofer D, Gübitz G M (2004) Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes, *Bioresource Technology* 95:67-72.

Crestini C L, Argyropoulos D S (1998) The early oxidative biodegradation steps of residual kraft lignin models with laccase. *Bioprg. Med. Chem.* 6:2161-2169.

Crum L A (1995) Comments on the evolving field of sonochemistry by a cavitation

physicist. *Ultrason. Sonochem.* 2, S147.

Cruz R M S, Vieira M C, Silva C L M (2006) Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). *J. Food Eng.* 72:8-15.

Datar G V, Banks-Lee P, Grady P L (1996) Acoustical characteristics of fabrics in high-intensity ultrasound. *Applied Acoustics.* 48(1):33-45.

Datar G V, Banks-Lee P, Grady P L (1996) Acoustical characteristics of fabrics in low-intensity ultrasound. *Applied Acoustics* 47(4):345-350.

Dawel G, Kästner M, Michels j, Poppitz W, Günther W, Fritsche W (1997) Structure of a laccase-mediated product of coupling of 2,4-diamino-6 nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. *Appl. Environmen. Microbiol.* 63:2560-2565.

Del valle L J, Oños M, Garriga P, Calafell M, Schnitzhofer W, Guebitz G M (2006) Bioscouring of cotton fiber with polygalacturonase induced in *Sclerotium rolfsii* using cellulose and glucose-pectin. *Textile Research Journal.* 76(5):400-405.

Dewulf J, Van Langenhove H, De Visscher A, Sabbe S (2001) Ultrasonic degradation of trichloroethylene and chlorobenzene at micromolar concentrations: kinetics and modelling. *Ultrason. Sonochem.* 8(2):143-150.

Diamantidis G, Effosse A, Potier P, Bally R (2000) Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biol. Biochem.* 32:919-927.

Dominguez A, Couto S R, Sanromán M A (2005) Dye decolourization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology&Biotechnology* 21:405-409.

Drijvers D, van Langenhove H, Beckers M (1999) Decomposition of phenol and trichloroethylene by ultrasound/H₂O₂/CuO process. *Water Res.* 33:1187-1194.

Ehlers G A, Rose P D (2005) Immobilized white-rot fungal biodegradation of phenol and chlorinated phenol in trickling packed-bed reactors by employing sequencing batch operation. *Bioresource Technology.* 96:1264-1275.

El-Shishtawy R M, Kamel M M, Hanna H L, Ahmed N S E (2003) Ultrasonic-assisted dyeing: II. Nylon fibre structure and comparative dyeing rate with reactive dyes. *Polymer International.* 52(3):381-388.

Endo K, Hosono K, Beppu T, Ueda K (2002) A novel extracytoplasmatic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology.* 148:1767-1776.

Entezari M H, Mostafai M, Sarafraz-yazdi A (2006) A combination of ultrasound and a bio-catalyst: removal of 2-chlorophenol from aqueous solution. *Ultrason. Sonochem.* 13:37-41.

Entezari M H, Pétrier C (2004) A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of phenol *App. Catal. B: Environ.* 53:257-263.

Entezari M H, Pétrier C, Devidal P (2003) Sonochemical degradation of phenol in water: a comparison of classical equipment with a new cylindrical reactor *Ultrason. Sonochem.* 10:103-108.

Entezari M H, Kruus P (1994) Effect of frequency on sonochemical reactions. I: Oxidation of iodide *Ultrason. Sonochem.* 1(2):S75-S79.

Entezari M H, Kruus P, Otonari R (1997) The effect of frequency on sonochemical reactions III: dissociation of carbon disulfide *Ultrason. Sonochem.* 4:49-54.

Etters J N (1999) Cotton preparation with alkaline pectinase: An environmental advance. *Textile Chemist and Colorist and American Dyestuff Reporter* 1(3):33-36.

Etters J N, Husain P A, Lange N K (1999) Alkaline Pectinase: An eco-friendly approach to cotton preparation. *Textile Asia*. 5:83–85.

Fabbrini M, Galli C, Gentili P (2002) Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *J. Molecul. Catal. B: Enz.* 16:231-240.

Fang, X., Mark, G., Sonntag, C., (1996). OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions. Parte I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter. *Ultrason. Sonochem.* 3, 57-63.

Feughelman M (1997) Introduction to the physical properties of wool, hair and other α -keratin fibres. In: *Mechanical properties and structure of alpha-keratin fibres: wool, human hair and related fibres.* UNSW Press. 1-14.

Francony A, Pétrier C (1996) Sonochemical degradation of carbon tetrachloride in aqueous solution at two frequencies: 20 kHz and 500 kHz. *Ultrasonics Sonochemistry* 3:77-82.

Freeman J C, Nayar P G, Begley T P, Vilafranca J J (1993) Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazinone synthase: a new addition to the blue copper oxidase family. *Biochemistry.* 32:4826-4830.

Freire R S, Durán N, Wang J, Kubota L T (2002) Laccase-based screen printed electrode for amperometric detection of phenolic compounds. *Analytical Letters.* 35:29-38.

Freytag R, Dinze J J (1983) Fundamentals and preparation part A, *Handbook of Fiber Science and technology:Vol I, Chemical Processing of Fibers and Fabrics*, edited by Menachem Lewin and Stephan B. Sello, Marcel Dekker, N. 111.

Galante Y M, Formantici C (2003) Enzyme applications in detergency and in manufacturing industries. *Current Organic Chemistry*. 7(13):1399-1422.

Gamelas J A F, Tavares A PM, Evtuguin D V, Xavier A M B (2005) Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. *J. Molecul. Catal. B: Enz.* 33:57-64.

Ghindilis A (2000) Direct electron transfer catalysed by enzymes: application for biosensor development. *Biochemical Society Transactions*. 28:84-89.

Gogate P R, Pandit A B (2004) A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Advances in Environmental Research*. 8:553-597.

Gogate, P.R., (2002) Cavitation: an auxiliary technique in wastewater treatment schemes. *Adv. Environ. Res.* 6:335-.

Gogate P R, Mujundar S, Pandit A B (2002) A sonophotochemical reactor for the removal of formic acid from wastewater. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41(14):3370.

Gogate P R, Pandit A B (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research* 8 :501-551.

Gogate P R, Shirgaonkar I Z, Sivakumar M, Senthikumar P, Vichare NP, Pandit A B (2001) Cavitation reactors efficiency analysis using a model reaction 47 (11), 2326.

Gomes J M (2001) Estrutura e propriedades dos corantes, Braga, Portugal.

Gomes S A SS, Nogueira J M F, Rebelo M J F (2004) An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics*. 20:1211-1216.

Grönqvist S, Buchert J, Rantanen K, Viikari L, Suurnäkki A (2003) Activity of laccase

on unbleached and bleached thermomechanical pulp. *Enz. Microbial Technol.* 32:439-445.

Gübtiz G M, Cavaco-Paulo A (2003) New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. *Current Opinion in Biotechnology.* 14:577-582.

Guerra A, Ferraz A (2001) Molecular weight distribution and structural characteristics of polymers obtained from acid soluble lignin treated by oxidative enzymes. *Enz. Microbial. Technol.* 28:308-313.

Guresir M, Akatas N, Tanyolac A (2005) Influence of reaction conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase. *Process Biochem.* 40:1175-1182.

Hardin I R, Li Y, Akin D (1998) Cotton wall structure and enzymatic treatments. *ACS Symposium.* 687:190-203.

Hartzell M M, Hsieh Y-L (1998) Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. *Textile Research Journal.* 68(4):233-241.

Hartzell-Lawson M, Durrant S K (2000) Improving the efficiency of pectinase scouring with agitation to improve cotton fabric wettability. *Textile Chemist and Colorist and American Dyestuff.* 32 (8):86-90.

Hsieh Y L, Thompson J, Miller A (1996) Water wetting and retention properties of cotton assemblies as affected by alkaline and bleaching treatments. *Textile Res J.* 66:456-464.

Hsieh Y, Cram L (1999) Proteases as scouring agents for cotton. *Textile Res J.* 69:590-597.

Huang T, Warsinke A, Koroljova-Skorobogat'ko O V, Makower A, Kuwana T, Scheller F W (1999) A bienzyme carbon paste electrode for the sensitive detection of NADPH and the measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Electroanalysis.* 11:295-300.

Hublik G, Schinner F (2000) Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enz. Microb. Technol.* 27:330-336.

Hung H M, Hoffmann M R (1998) Kinetics and mechanism of the enhanced reductive degradation of CCl_4 by elemental iron in the presence of ultrasound. *Environ. Sci. Technol.* 32:3011.

Hung H M, Hoffmann M R (1999) Kinetics and mechanism of the sonolytic degradation of chlorinated hydrocarbons: frequency effects. *J. Phys. Chem. A.* 103:2734.

Huskic M, Zigon M (2003) Side-chain polyesters and polyesters hydrochlorides based on terephthalic acid. *Polymer.* 44:6187-6193.

Ikeda R, Tanaka H, Oyabu H, Uyama H, Kobayashi S (2001) Preparation of artificial urushi via an environmentally benign process. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 74:1067-1073.

Ikeda R, Tanaka H, Uyama H, Kobayashi S (1998) Laccase-catalyzed polymerization of acrylamide. *Macromol. Rapid. Commun.* 19:423-425.

Ikeda R, Uyama H, Kobayashi S (1996) Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide): laccase catalysed oxidative polymerisation of syringic acid. *Macromolecules* 29:3053-3054.

Ince N H, Tezcanli-Guyer G (2001) Reactive dyestuff degradation by combined sonolysis and ozonation. *Dyes and pigments.* 49:145-153.

Jiang Y, Pétrier C, Waite T D (2006) Sonolysis of 4-chlorophenol in aqueous solution: Effects of substrate concentration, aqueous temperature and ultrasonic frequency, *Ultrasonics Sonochemistry* 13(5):415-422.

Kamel M M, El-Shishtawy R M, Hanna H L, Ahmed N S E (2003) Ultrasonic-assisted

dyeing: I. Nylon dyeability with reactive dyes. *Polymer International*. 52(3):373-380.

Karam J, Nicell J A (1997) Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69:141-153.

Karamyshev A V, Shleev S V, Koroleva O V, Yaropolov A I, Sakharov I Y (2003) Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enz. Microb. Technol.* 33:556-564.

Kinsley C, Nicell J A (2000) Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Bioresource Technology*. 73:139-146.

Kruus P, Burk R C, Entezari MH, Otson R (1997) Sonication of aqueous solutions of chlorobenzene Ultrason. *Sonochem.* 4:229-233.

Kulys J, Vidziunaite R, Schneider P (2003) Laccase-catalysed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:455-463.

Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227:680-685.

Lee K W, Kim J P (2001) Effect of ultrasound on disperse dye particle size. *Textile Research Journal*. 71(5):395-398.

Li K, Xu F, Erikssen K E L (1999) Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of non-phenolic lign model compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2654-2660.

Li Y, Hardin I R (1998) Treating cotton with cellulases and pectinases: effects on cuticle and fiber properties. *Textile Research Journal*. 68(9):671-679.

Lorimer J P, Mason T J, Plattes M, Phull S S (2000) Dye effluent decolourisation using ultrasonically assisted electro-oxidation. *Ultrasonics Sonochemistry*. 7:237-242.

Lorimer J P, Mason T J, Plattes M, Phull S S, Walton D J (2001) Degradation of dye effluent. *Pure and Applied Chemistry*. 73(12):1957-1968.

Lorimer J P, Mason TJ (1987) Sonochemistry part 1 – the physical aspects. *Chem. Soc. Rev.* 16:239.

Lugaro G, Carrea G, Cremonesi M, Caselhato M, Antonini E (1973) The oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* 159:1-6

Scherer M, Fischer R (2001) Molecular characterization of blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. *FEMS microbial. Lett.* 199(2):207-213

Mahamuni N N, Pandit A B (2006) Effect of additives on ultrasonic degradation of phenol. *Ultrason. Sonochem.* 13(2):165-174.

Makris D.P., J.T. Rossiter (2002) An investigation on structural aspects influencing product formation in enzymic and chemical oxidation of quercetin and related flavonols. *Food Chem.* 77(2):177-185

Marten E, Müller R-J, Deckwer W D (2003) Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters: I low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degrad. Stab.* 80:485-501.

Mason T J (2003) Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultrasonics Sonochemistry.* 10:175-179.

Mason T J, Lorimer JP (1988) *Sonochemistry: Theory, Applications and Uses of ultrasound in chemistry.* John Wiley, New York.

Mason T J, Lorimer JP, Bates DM, Zhao Y (1994) *Dosimetry in sonochemistry: the*

use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry* 1 (2):91-95.

Mason T J, Lorimer J P, Bates D M, Zhao Y (1994) Dosimetry in sonochemistry : the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrason. Sonochem.* 1 (2): S91-S95.

Mayer A M, Staples R C (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 60:551-565.

Mayer A M, Staples R C (2002) Laccase: new functions for an old enzyme *Phytochemistry.* 60:551-565

McNeil M, Darvill A G, Fry S C, Albertsheim P (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann Rev Biochem.* 53:625–663.

Mistik S I, Yükselöglu S M (2005) Hydrogen peroxide bleaching of cotton in ultrasonic energy. *Ultrasonics* 43:811-814.

Mock G N, Klutz D S, Smith C B, Grady P L, McCall R E, Cato M J (1995) Reducing salt and energy needs in direct dyeing of cotton through use of ultrasound. *The American Association of Textile and Colourists.* 55-64.

Modaressi K, Taylor K E, Bewtra J K, Biswas N (2005) Laccase-catalysed removal of bisphenol-A from water: protective effect of PEG on enzyme activity, *Water Research* 39:4309-4316.

Moholkar V S, Warmoeskerken M M C G (2002) Mechanistic aspects and optimization of ultrasonic washing. *The American Association of Textile and Colourists Review.* 2(2):34-37.

Moholkar V S, Warmoeskerken M M C G (2003a) Acoustical characteristics of textile materials. *Textile Research Journal.* 73(9):827-837.

Moholkar V S, Warmoeskerken M M C G (2003b) Investigations in mass transfer enhancement in textiles with ultrasound. *Chemical Engineering Science*. 59:299-311.

Moholkar V S, Warmoeskerken M M C G (2004) Investigations in mass transfer enhancement in textiles with ultrasound. *Chem. Eng. Science*. 59 (2):299-311.

Mori R, Haga T, Takagishi T (1997) Changes in dyeability and morphology of cotton fiber subjected to cellulase treatment. *Journal of Applied Polymer Science*. 65(1):155-164

Mougin C, Boyer F D, Caminade E, Rama R (2000) Cleavage of the diketonitile derivate of the herbicide isoxaflutole by extracellular fungal oxidases. *J. Agric. Food Chem*. 48:4529-4534.

Mrowetz M, Pirola C, Selli E (2003) Degradation of organic water pollutants through sonophotocatalysis in the presence of TiO₂. *Ultrasonics Sonochemistry*. 10:247-254.

Naffrechoux E, Chanoux S, Petrier C., Suptil J (2000) Sonochemical and photochemical oxidation of organic matter *Ultrason. Sonochem*. 7:255-259.

Nagata Y, Nagakawa M, Okumo H, mizukoshi Y, Yim B, Maeda Y (2000) Sonochemical degradation of chlorophenols in water. *Ultrason. Sonochem*. 7(3):115-120.

Naidu D V, Rajan R, Kumar R, Gandhi K S, Arakeri V H, Chandrasekaran S (1994) Modelling of a batch sonochemical reactor. *Chem. Eng. Sci*. 49(6):377-388.

Nakamoto S, Machida N (1992) Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. *Water Res*. 26:49-54

Niku P M L, Viikari L (2000) Enzymatic oxidation of alkenes. *J. Molecul. Catal. B: Enz*. 10:435-444.

Nolte H, Bishop D P, Höcker H (1996) Effects of proteolytic and lipolytic enzymes on

untreated and shrink resist treated. *Wool J. Text Inst*, 87(1):212-226.

O'Neill A, Cavaco-Paulo A (2004) Monitoring biotransformations in polyesters. *Biocatalysis and Biotransformation*. 22(5-6):353-356.

Okitsu K, Iwasaki K, Yobiko Y, Bandow H, Nishimura R, Maeda Y (2005) Sonochemical degradation of azo dyes in aqueous solution: a new heterogeneous kinetics model taking into account the local concentration of OH radicals and azo dyes. *Ultrasonics Sonochemistry* 12:255-262.

Öner E, Baser I, Acar K (1995) Use of ultrasonic energy in reactive dyeing of cellulosic fabrics. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 111:279-281.

Pandit A B, Gogate P R, Mujumdar S (2001) Ultrasonic degradation of 2,4,6-trichlorophenol in presence of TiO₂ catalyst. *Ultrason. Sonochem.* 8(3):227-231.

Pandit A B, Moholkar V S (1996) Harness cavitation to improve processing. *Chem. Eng. Prog.* 96:57.

Pazarlioglu N K, Sariisik M, Telefoncu A (2005) Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Proc. Biochem.* 40:1673-1678.

Perricone N, Nagy K, Horváth F, Dajkó G, Uray I, Nagy I Z (1999) The hydroxyl free radical reactions of ascorbyl palmitate as measured in various in vitro models. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 262:661-665.

Pétrier C, David B, Laguian S (1996) Ultrasonic degradation at 20 kHz and 500 kHz of atrazine and pentachlorophenol in aqueous solution: preliminary results. *Chemosphere*. 32 (9):1709-1718.

Pétrier C, Francony A (1997) Ultrasonic waste-water treatment: incidence of ultrasonic frequency on the rate of phenol and carbon tetrachloride degradation. *Ultrasonics Sonochemistry* 4:295-300.

Plowman J E (2003) Proteomic database of wool components. *J. Chromatogr B.* 787:63-76.

Poon C S, Huang Q, Fung P C (1999) Degradation kinetics of cuprophenyl yellow R L by UV/H₂O₂/ultrasonication (US) process in aqueous solution. *Chemosphere.* 38(5):1005-1014.

Pramod K (1994). Liquid laundry detergents containing stabilized glucose/glucose oxidase as H₂O₂ generation system. US Patent 52 1994:88746.

Price G J, Lenz E J (1993) The use of dosimeters to measure radical production in aqueous sonochemical systems. *Ultrasonics* 6(31):451-455.

Rehorek A, Tauber M, Gübitz G (2004) Application of power ultrasound for azo dye degradation. *Ultrasonics Sonochemistry* 11:177-182.

Riva A, Algaba I, Prieto R (2006) Enzymatic finishing of wool fabrics: Effects of different treatments with a protease on physical and chemical parameters of the fabric. *Journal of natural fibers.* 3(2-3):209-226.

Saligram A N, Shukla SR, Mathur M (1993) Dyeing of polyester fibres using ultrasound. *Journal of the Society of Dyers and Colourists.* 109:263-266.

Sanchez-Amat A, Lucas-Elio P, Fernandez E, Garcia-borron J C, Solano F (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biocim. Biophys. Acta.* 1547:104-116.

Sanchez-Amat A, Solano F (1997) A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas sp.* Shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 240:787-792.

Sawada K, Tokino S, Ueda M (1998b) Bioscouring of cotton with pectinase enzyme in

a non-aqueous system. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 114(12):355-359.

Sawada K, Tokino S, Ueda M, Wang X Y (1998a) Bioscouring of cotton with pectinase enzyme. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 114(11):333-336.

Schacht H, Kesting W, Schollmeyer E (1995) Perspectives on enzymatic processes in textile finishing. I. New methods for bleaching cotton using enzymes. *Textilveredlung*. 30:237–243.

Sealey J, Ragauskas A J (1998) Residual lignin studies of laccase-delignified kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.* 23:422-426.

Shah Y T, Pandit A B, Moholkar VS (1999) *Cavitation Reaction Engineering*. Plenum Publishers, USA.

Shimao M (2001) Biodegradation of plastics *Current Opinion in Biotechnology*. 12:242-247.

Shirgaonkar I Z, Pandit AB (1997) Degradation of aqueous solution of potassium iodide and sodium cyanide in the presence of carbon tetrachloride. *Ultrason. Sonochem.* 4(3):245-253.

Shukla S R, Mathur M R (1995) Low-temperature ultrasonic dyeing of silk. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 111:342-345.

Sigoillot C, Camarero S, Vidal T, Record E, Asther M, Pérez-Boada M, Martínez M J, Sigoillot J C, Asther m, Colom J F, Martínez A T (2005) Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J. Biotechnol.* 115:333-343.

Silva C J S M, Prabakaran M, Gübitz G, Cavaco-Paulo A (2005) Treatment of wool fibres with subtilisin and subtilisin-PEG. *Enzyme and Microbial Technology*. 36:917-922.

Silva C J S M, Sousa F, Gübitz G, Cavaco-Paulo A (2005) Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. *Food Technol. Biotechnol.* 42(1):51-56.

Silva C M, Carneiro F, O'Neill A, Fonseca L P, Cabral J S M, Gübitz G, Cavaco-Paulo A (2005) Cutinase – A new tool for biomodification of synthetic fibers. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 43:2448-2450.

Simkus R A, Laurinavicius V, Boguslavsky L, Skotheim T, Tanenbaum S, Nakas J P, Slomczynski D J (1996) Laccase containing sol-gel based optical biosensors. *Analytical Letters.* 29:1907-1919.

Sivakumar M, Pandit A B (2001) Ultrasound enhanced degradation of Rhodamine B: optimization with power density. *Ultrasonics Sonochemistry.* 8:233-240.

Sivakumar, M., Tatake, P.A., Pandit, A.B., (2002) Kinetics of p-nitrophenol degradation: effect of reaction conditions and cavitation parameters for multiple frequency system. *Chem. Eng. J.* 85, 327.

Soares M B., Pessoa Amorim M T, Oliveira A M, Hrdina R, Ferreira M (2002) Specificity of phenolic disazo dyes in relation to transformation by laccase Enzyme *Microb. Technol.* 30(5):607-612.

Solomon E I, Baldwin M J, Lowery M D (1992) Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity. *Chem. Rev.* 92(4):521-542.

Solomon E I, Sundaram U M, Machonkim T E (1996) Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* 96:2563-2605.

Spreti N, Germani R, Incani A, Savelli G (2004) Stabilization of chloroperoxidase by polyethylene glycols in aqueous media: kinetic studies and synthetic applications, *Biotechnology Progress* 20(1):96-101.

Srebotnik E, Hammel K E (2000) Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/ 1-hydroxybenzotriazole system. *J. Biotechnol.* 81:179-188.

Suslick K S, Grinstaff M W (1990) Protein microencapsulation of nonaqueous liquids. J Am Chem Soc. 112: 7807-7809.

Suslick K S (1990) The chemical effects of ultrasound. Science 247, 1439.

Suslick KS, Hammerton D A, Cline RE (1986) The sonochemical hotspot. J. Am. Chem. Soc. 106:6856.

Suslick K S, Mdeleeni K M, Reis J T (1997) Chemistry induced by hydrodynamic cavitation. J. Am. Chem. Soc. 119, 9303.

Suzuki T, Endo K, Iro m, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y (2003) A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, chracterization, nucleotide sequence, and expression. Biosci. Biochem. 67:2167-2175.

Takada T, Hirai T (2004) The PVA solution structure-change effect for α -amylase specific activation: Polymer Bulletin. 53:63-71.

Tezcanli-Guyer G, Ince N H (2003) Degradation and toxicity reduction of textile dyestuff by ultrasound. Ultrasonics Sonochemistry. 10:235-240.

Tezcanli-Guyer G, Ince N H (2004) Individual and combined effects of ultrasound, ozone and UV irradiation: a case study with textile dyes. Ultrasonics. 42(1-9):603-609.

Tezcanli-Güyer G, Ince NH (2004) Individual and combined effects of ultrasound, ozone and UV irradiation: a case study with textile dyes, Ultrasonics 42:603-609.

Thurston C F (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiology, 140:19-26.

Traore M K, Buschle-Diller G (2000) Environmentally friendly scouring processes. Textile Chemist and Colorist and American Dyestuff Reporter. 32(12): 40-43.

Tzanov T, Costa S, Gübitz G M, Cavaco-Paulo A (2001b) Dyeing in catalase-treated bleaching baths. *Coloration Technology*. 117(1):1-5.

Tzanov T, Costa S, Gübitz G M, Cavaco-Paulo A (2001c) Effect of temperature and bath composition on the dyeing of cotton with catalase-treated bleaching effluent, *Coloration Technology*. 117(3):166-170

Barfoed M, Kirk O, Salmon S (2001) Patent US 2001037532 Novozymes A/S

Aaslyng D, Sørensen N H, Rørbæk K (1999) Patent US. 5948121 Novo Nordisk A/S

Van der Helm (1998) Enzymatic bleach Composition. Patent WO 98/28400.

Vasconcelos A, Silva C J S M, Schroeder M, Güebitz G M, Cavaco-Paulo A (2006) Detergent formulations for wool domestic washings containing immobilized enzymes, *Biotechnol Lett*. 28:725–731.

Visschers R W, De Jongh H H J (2005) Disulphide bond formation in food protein aggregation and gelation. *Biotechnology Advances*. 23:75-80.

Vouters M, Rumeau P, Tierce P, Costes S (2004) Ultrasounds: an industrial solution to optimise costs, environmental requests and quality for textile finishing. *Ultrasonics Sonochemistry* 11(1):33-38.

Walter T, Augusta J, Müller R-J, Widdecke H, Klein J (1995) Enzymatic degradation of a model polyester by lipase from *Rhizopus delemar*. *Enz. Microb. Tech*. 17:218-224.

Wang C J, Thiele S, Bollag J M (2002) Interaction of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and 4-Amino-2,6-Dinitrotoluene with humin monomers in the presence of oxidative enzymes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 42:1-8.

Warmoeskerken M M C G, Van der Vlist P, Moholkar V S, Nierstrasz V A (2002)

Laundry process intensification by ultrasound. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*. 210:277-285.

Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos S N (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22:161-187.

Sørensen N.H (1999) Patent WO9915137 Novo Nordisk A/S

Wong M, Suslick KS (1995) Sonochemically produced hemoglobin microbubbles, *Materials Research Society Symposium*. 372:89-94.

www.expasy.org/sprot

Xu F (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. 35:7608-7614.

Xu F (1997) Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biological. Chem.* 272(2):924-928.

Xu F, Kulys J J, Duke K, Li KC, Krikstopaitis K, Deussen H J W (2000) Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2052-2056.

Yachmenev V G, Blanchard E J, Lambert A H (2004) Use of ultrasonic energy for intensification of the bio-preparation of greige cotton *Ultrasonics* 42(1-9):87-91.

Yaropolov A I, Skorobogat'ko O V, Vartov S S, Varfolomeyev S D (1994) Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biotechnol.* 49:257-280.

Yonghua Li, Hardin I (1997) Enzymatic scouring of cotton: effect on structure and properties. *Text Chem Color*. 29:71-76.

Yonghua Li, Hardin I (1998) Enzymatic scouring of cotton – surfactants, agitation and selection of enzymes. *Text Chem Color*. 30:23–29.

Zhang Q, Smith E, Shen J, Bishop D (2006) An ethoxylated alkyl phosphate (anionic surfactant) for the promotion of activities of proteases and its potential use in the enzymatic processing of wool. *Biotechnol Lett*. 28:717–723.

Zille A (2005) Laccase reactions for textile applications. PhD Thesis. University of Minho, Guimarães, Portugal.

Zille A, Górnacka B, Rehorek A, Cavaco-Paulo A (2005) Degradation of Azo Dyes by *Trametes villosa* Laccase over Long Periods of Oxidative Conditions. *Applied and environmental microbiology*. 71(11):6711–6718.

Zille A, Ramalho P, Tzanov T, Millward R, Aires V, Cardoso M H, Ramalho M T, Gubitz G M, Cavaco-Paulo A (2004) Predicting Dye Biodegradation from Redox Potentials. *Biotechnol. Prog.* 20:1588-1592

Zille A, Tzanov T, Gubitz G M, Cavaco-Paulo A (2003) Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent; *Biotechnology Letters* 25:1473–1477