

*À minha mãe,
pelas valiosas lições de vida
e pela eterna confiança
nas minhas escolhas.*

AGRADECIMENTOS

Quero expressar o meu sincero agradecimento:

Ao Professor Doutor Artur Cavaco-Paulo por todo o apoio prestado e pela sua disponibilidade.

Ao departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho pela disponibilidade de meios físicos e técnicos indispensáveis à elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Acabamentos do Departamento de Engenharia Têxtil da Universidade do Minho pela amizade e bom ambiente que me proporcionaram ao longo deste trabalho, em especial, à Andreia Vasconcelos, à Carla Joana Silva e à Carla Manuela Silva pelas sugestões efectuadas que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

À minha família e ao Nuno pela confiança e apoio que sempre demonstraram, pela companhia nas lutas diárias e pelos momentos de felicidade que me proporcionaram ao longo desta etapa.

A todos, muito obrigada.

RESUMO

A capacidade da lacase para promover reacções de polimerização a partir de compostos fenólicos tem sido investigada com o objectivo de criar processos de acabamento ambientalmente aceites. Um dos principais problemas da aplicação de enzimas em processos têxteis é o facto destes serem processos heterogéneos, nos quais as fibras estão no estado sólido e as enzimas se encontram no estado líquido. Consequentemente, os processos têxteis enzimáticos são lentos devido a problemas de transferência de massa. Sabe-se que a aplicação dos ultra-sons nestes processos é capaz de promover um aumento significativo na transferência de massa, aumentando deste modo a velocidade de catálise da enzima.

Neste trabalho estudou-se o efeito dos ultra-sons na polimerização oxidativa da lacase, a partir de um composto fenólico (catecol), com diferentes objectivos nas fibras de algodão e lã, assim como a polimerização deste mesmo composto sem qualquer tipo de substrato.

A polimerização do catecol foi efectuada na fibra de algodão (algodão branqueado, tingido e aminizado), estudando-se o efeito da concentração da lacase de *Trametes hirsuta* e de diferentes potências (W) de ultra-sons, otimizando as condições de tratamento.

A formação do poli(catecol) foi efectuada nas amostras de lã, com o objectivo de obter estampados definidos com coloração castanha.

Realizaram-se também estudos de polimerização do catecol sem substrato, verificando-se a influência da distância do transdutor na formação do polímero.

Nas fibras de algodão, o melhor tratamento foi obtido a uma temperatura de 50 °C com uma concentração de catecol de 2 mM, 0,067 U/mL de lacase de *Trametes hirsuta* e uma potência de 50 W durante 60 minutos de tratamento. Verificou-se um aumento de polimerização com o aumento da intensidade dos ultra-sons até uma concentração de 0,067 U/mL de lacase de *Trametes hirsuta*.

A obtenção de um estampado na fibra de lã foi conseguida com aplicação de uma potência elevada (50 W), com uma concentração de catecol de 10 mM e 0,67 U/mL de lacase de *Trametes hirsuta* durante 60 minutos de tratamento.

Os melhores resultados de polimerização enzimática sem qualquer tipo de material adsorvente foram conseguidos com 2 e 3,5 cm de distância do transdutor ao fundo do reactor, obtendo-se uma maior concentração de polímero formado.

ABSTRACT

The ability of enzymes, like laccase, to promote the polymerization of phenolic compounds has been studied with the objective of obtaining finishing processes environmentally accepted. One of the major problems of enzyme application in textiles processes are the fact that they are heterogeneous processes, since the fabrics are on the solid state and enzymes are in liquid state. Consequently, the textiles enzymatic processes are slow due to mass transfer limitations. It is known that the application of ultrasound in these processes is able to promote a significant increase on mass transfer thus, increases the rate of enzymes catalyzes.

In this work the effect of ultrasound on the oxidative polymerization of phenolic compounds in the presence of enzymes was studied. Two substrates, namely cotton and wool fibres, were used and the polymerization was also studied using the same phenolic compounds without any substrate.

It was also studied the effect of different intensities and laccase from *Trametes hirsuta* concentrations to optimize the treatment conditions.

The formation of poly(catechol) on the wool samples was performed with the objective to print with a brown colour.

Some studies of catechol polymerization without substrates were conducted to verify the influence of different distances of the transducer to the bottom of reactor, on the polymer obtained.

For cotton the best treatment was obtained when the following conditions were used: 50 °C of temperature, 2 mM of catechol, 0,067 U/mL of laccase from *Trametes hirsuta*, 50 W of intensity, for 60 minutes of treatment. The result was observed an increase in the degree of polymerization with an increase of intensity until 0,067 U/mL of laccase from *Trametes hirsuta*.

The best printing result on wool fibres was obtained with the application of a higher ultrasonic intensity (50 W), 10 mM of catechol and 0,67 U/mL of laccase from *Trametes hirsuta*, for 60 minutes of treatment.

Finally, the best results for the enzymatic polymerization of catechol without the use of an adsorbent substrate was obtained when the distances from the transducer to the bottom of the reactor were 2,0 and 3,5 cm, were an increase in the concentration of the polymer was attained.

SIGLAS E ABREVIATURAS

| | | |
|-------------------|---|--|
| ABTS | – | Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazonila-6-sulfônico) |
| AG | – | Agitação mecânica |
| ASS | – | Corante Reactivo Azul Sumifix Supra |
| ATR | – | Attenuation Total Reflection |
| C.I. | – | Colour Index |
| Cel. | – | Celulose |
| Co | – | Algodão Branqueado |
| Co funcionalizado | – | Algodão funcionalizado |
| ΔE^* | – | Diferença de Cor |
| DP | – | Grau de Polimerização |
| Eq. | – | Equação |
| FT-IR | – | Fourier Transform Infrared |
| GPC | – | Gel Permeation Chromatography |
| HBT | – | N-hidroxibenzotriazole |
| HPLC | – | High Performance Liquid Chromatography |
| HRP | – | Horseradish Peroxidase |
| HTA | – | 2-hidroxi-tereftalato |
| IF | – | Infrared |
| ISO | – | American Association Standardization Organisation |
| LC/MS | – | Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy |
| Mw | – | Molecular weight |
| PVA | – | Poli(álcool vinílico) |
| PEG | – | Poli(etilenoglicol) |
| RB5 | – | Corante Reactivo Black 5 |
| RBBR | – | Corante Reactivo Remazol Brilliant Blue R |
| RMN | – | Ressonância Magnética Nuclear |
| SEC | – | Size-Exclusion Chromatography |
| TA | – | Ácido tereftálico |
| UV | – | Ultravioleta |
| US | – | Ultra-sons |

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | iv |
| Abstract | v |
| Siglas e Abreviaturas | vi |
| Índice geral..... | vii |
| Índice de ilustrações..... | x |
| Índice de espectros | xii |
| Índice de gráficos | xiii |
| Índice de tabelas | xiv |
| 1. Apresentação do trabalho..... | 1 |
| 2. Revisão bibliográfica..... | 2 |
| 2.1. Substratos têxteis | 2 |
| 2.1.1. Algodão | 2 |
| 2.1.1.1. Estrutura morfológica da celulose..... | 2 |
| 2.1.1.2. Estrutura molecular da celulose..... | 4 |
| 2.1.2. Lã..... | 6 |
| 2.1.2.1. Estrutura morfológica da lã | 6 |
| 2.2. Tingimento de fibras têxteis..... | 10 |
| 2.2.1. Processos de tingimento | 10 |
| 2.2.2. Corantes utilizados para fibras têxteis..... | 10 |
| 2.2.2.1. Classificação de corantes | 11 |
| 2.3. Lacases | 14 |
| 2.3.1. Propriedades moleculares e centros activos da lacase..... | 15 |
| 2.3.2. Mecanismo catalítico das lacases | 17 |
| 2.3.3. Mediadores da lacase..... | 18 |
| 2.3.4. Imobilização da lacase | 19 |
| 2.3.5. Aplicações da lacase | 20 |
| 2.4. Ultra-sons | 22 |
| 2.4.1. Cavitação e formação de radicais | 22 |
| 2.4.2. Factores que afectam a cavitação química | 27 |
| 2.4.2.1. Intensidade Acústica..... | 27 |
| 2.4.2.2. Frequência | 28 |
| 2.4.2.3. Pressão externa..... | 29 |
| 2.4.2.4. Propriedades do líquido | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.4.2.5. Gases dissolvidos | 30 |
| 2.4.2.6. Efeito da temperatura | 30 |
| 2.4.3. Aplicação dos ultra-sons na indústria têxtil..... | 31 |
| 2.4.4. Efeito dos ultra-sons nas enzimas | 32 |
| 2.4.5. Aplicação dos ultra-sons e enzimas na indústria têxtil | 33 |
| 2.5. Polimerização enzimática..... | 34 |
| 2.5.1. Polimerização enzimática de fenóis | 34 |
| 2.5.2. Polimerização sono-enzimática | 39 |
| 3. Descrição do trabalho experimental | 42 |
| 3.1. Material..... | 42 |
| 3.1.1. Reagentes | 42 |
| 3.1.2. Enzima..... | 43 |
| 3.1.3. Substratos..... | 43 |
| 3.2. Equipamento | 44 |
| 3.2.1. Ultra-sons | 44 |
| 3.2.2. Linitest | 45 |
| 3.2.3. Espectrofotômetro de reflexão..... | 45 |
| 3.2.4. Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)..... | 45 |
| 3.2.5. Espectrofotômetro de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) com reflectância total atenuada (ATR)..... | 48 |
| 3.2.6. Outros equipamentos | 48 |
| 3.3. Metodologias | 48 |
| 3.3.1. Tingimento das amostras de algodão..... | 48 |
| 3.3.2. Funcionalização da celulose..... | 50 |
| 3.3.3. Polimerização enzimática | 50 |
| 3.3.4. Determinação da diferença de cor..... | 51 |
| 3.3.5. Avaliação da resistência da polimerização enzimática..... | 51 |
| 3.3.6. Análise por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)..... | 51 |
| 3.3.7. Análise por espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) com reflectância total atenuada (ATR) | 52 |
| 4. Apresentação e discussão dos resultados | 53 |
| 4.1. Polimerização do catecol em amostras de algodão | 53 |
| 4.1.1. Tratamento com algodão tingido | 53 |
| 4.1.2. Tratamento com algodão funcionalizado..... | 57 |
| 4.1.2.1. Efeito da concentração de lacase..... | 58 |
| 4.1.2.2. Estudo da influência da potência nos tratamentos efectuados com ultra-sons | 63 |

| | |
|--|----|
| 4.1.2.3. Estudo da velocidade de agitação nos tratamentos efectuados com agitação mecânica | 66 |
| 4.1.2.4. Estudo comparativo entre os tratamentos efectuados com ultra-sons e sob agitação mecânica | 68 |
| 4.1.2.5. Análise por espectroscopia de infravermelho | 70 |
| 4.2. Polimerização do catecol em amostras de lã | 73 |
| 4.3. Polimerização do catecol com lacase | 77 |
| 5. Conclusão | 81 |
| 6. Perspectivas futuras | 84 |
| 7. Bibliografia | 85 |

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 2-1: Estrutura morfológica da fibra do algodão (Nevell e Zeronian 1985) | 3 |
| Figura 2-2: Projecção da fórmula de celulose de Haworth, n= grau de polimerização (DP) (Shore 1995) | 4 |
| Figura 2-3: Estruturas do grupo terminal redutor (Shore 1995) | 5 |
| Figura 2-4: Possíveis ligações entre diferentes cadeias de proteínas da lã (Rippon 1992) | 7 |
| Figura 2-5: Diagrama da fibra de lã de merino, mostrando a estrutura e magnificações progressivas (Feughelman 1997)..... | 8 |
| Figura 2-6: Estrutura esquemática da cutícula e os seus principais componentes (Rippon 1992) | 9 |
| Figura 2-7: Cromóforos mais importantes..... | 12 |
| Figura 2-8: Centros de cobre da lacase (Claus 2004) | 16 |
| Figura 2-9: Ciclo catalítico da lacase, exibindo o mecanismo de redução e oxidação dos locais do cobre (Torres <i>et al.</i> 2003) | 18 |
| Figura 2-10: Ciclo catalítico da lacase (Banci <i>et al.</i> 1999) | 19 |
| Figura 2-11: Ciclos de compressão e rarefacção..... | 23 |
| Figura 2-12: A sonoquímica das "hot spots" (Suslick 1986)..... | 24 |
| Figura 2-13: Equações simplificadas de radicais produzidos por sonificação (Mason <i>et al.</i> 1994)..... | 25 |
| Figura 2-14: Determinação dos radicais formados pela sonificação através do método de Fricke (Fang 1996)..... | 25 |
| Figura 2-15: Mecanismo de formação do anião hidroxí-tereftalato (Mason <i>et al.</i> 1994) | 26 |
| Figura 2-16: Mecanismo de polimerização enzimática de compostos fenólicos (Shin <i>et al.</i> 2001) | 36 |
| Figura 2-17: Mecanismo de redução química para a celulose funcionalizada e identificação por espectroscopia de massa, após hidrólise com celulase através da análise por LC/MS (Su-Yeon <i>et al.</i> 2006)..... | 37 |
| Figura 2-18: Mecanismo da reacção de acoplamento entre a celulose aminizada e o poli(catecol), usando como catalizador a lacase. Identificação por espectroscopia de massa, após hidrólise com celulase através da análise por LC/MS (Su-Yeon <i>et al.</i> 2006) | 38 |
| Figura 2-19: Mecanismo químico proposto para a obtenção do poli(catecol) catalizado pela lacase (Aktas e Tanyolaç 2003)..... | 41 |
| Figura 3-1: Esquema experimental dos ultra-sons..... | 44 |
| Figura 3-2: Sistema de HPLC com os seus principais componentes (Rosen 1982)..... | 46 |
| Figura 3-3: Exemplo de uma curva obtida de um cromatograma (Rosen 1982) | 47 |
| Figura 3-4: Estrutura do corante Remazol Brilliant Blue R | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 3-5: Estrutura do corante reactivo Black 5 | 49 |
| Figura 3-6: Estrutura do corante reactivo Azul Sumifix Supra | 49 |
| Figura 4-1: Equação da Lei de Beer-Lambert | 80 |

ÍNDICE DE ESPECTROS

| | |
|---|----|
| Espectro 4-1: Espectros de infravermelho para as amostras de algodão sem tratamento..... | 70 |
| Espectro 4-2: Espectros de infravermelho das amostras de algodão funcionalizado..... | 71 |
| Espectro 4-3: Espectros de infravermelho das amostras de algodão branqueado..... | 72 |
| Espectro 4-4: Espectros de infravermelho das amostras de algodão tingido com RB5 | 73 |
| Espectro 4-5: Cromatogramas de HPLC das amostras obtidas por polimerização do catecol com lacase de <i>Trametes hirsuta</i> . Absorvância (mv) vs Massa molecular (kDa)..... | 79 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 4-1: Valores da diferença de cor para as diferentes amostras de algodão tingido e branqueado após tratamento com 2 mM de catecol e 0,67 U/mL de lacase a 50°C, durante 60 min. | 54 |
| Gráfico 4-2: Influência da lacase na polimerização com ultra-sons | 55 |
| Gráfico 4-3: Influência da lacase na polimerização com agitação mecânica..... | 56 |
| Gráfico 4-4: Variação da diferença de cor com as diferentes concentrações de lacase através da aplicação: a) ultra-sons (20 kHz de frequência, 50 W de potência, 2 mM de catecol a 50 °C durante 60 min.); e b) agitação mecânica (800rpm, 2 mM de catecol a 50 °C durante 60 min.)..... | 59 |
| Gráfico 4-5: Variação da diferença de cor com as diferentes potências após tratamento com ultra-sons (20 kHz de frequência, 0,067 U/mL de lacase, 2 mM catecol a 50 °C durante 60 min.) | 64 |
| Gráfico 4-6: Variação da diferença de cor com as diferentes velocidades de agitação após tratamento sob agitação (0,067 U/mL de lacase, 2 mM catecol a 50 °C durante 60 min.) | 67 |
| Gráfico 4-7: Valores da diferença de cor para as diferentes amostras de algodão tratadas com ultra-sons ou agitação mecânica..... | 69 |
| Gráfico 4-8: Variação da diferença de cor com o tempo de tratamento (20 kHz de frequência, 50 W de potência, 10 mM de catecol a 50 °C)..... | 75 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 2-1: Classes de Aplicação do Colour Índex (Christie 2001)..... | 12 |
| Tabela 3-1: Reagentes utilizados no trabalho experimental | 42 |
| Tabela 3-2: Corantes utilizados no trabalho experimental | 42 |
| Tabela 3-3: Propriedades da enzima utilizada | 43 |
| Tabela 3-4: Características dos substratos têxteis utilizados | 43 |
| Tabela 4-1: Condições dos tratamentos efectuados com ultra-sons para as amostras de algodão tingidas..... | 53 |
| Tabela 4-2: Imagem das amostras de algodão tingido antes e após tratamento | 55 |
| Tabela 4-3: Valores de alteração da cor após lavagem para os diferentes tratamentos | 56 |
| Tabela 4-4: Valores do manchamento após lavagem para os diferentes tratamentos | 57 |
| Tabela 4-5: Condições dos diferentes tratamentos efectuados com ultra-sons | 58 |
| Tabela 4-6: Condições dos diferentes tratamentos efectuados sob agitação mecânica. | 58 |
| Tabela 4-7: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes concentrações de lacase..... | 60 |
| Tabela 4-8: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes concentrações de lacase | 60 |
| Tabela 4-9: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes concentrações de lacase | 62 |
| Tabela 4-10: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes concentrações de lacase | 62 |
| Tabela 4-11: Condições dos diferentes tratamentos efectuados com ultra-sons | 63 |
| Tabela 4-12: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes potências | 65 |
| Tabela 4-13: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes potências | 66 |
| Tabela 4-14: Condições dos diferentes tratamentos efectuados sob agitação mecânica | 66 |
| Tabela 4-15: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes velocidades de agitação | 68 |
| Tabela 4-16: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes velocidades de agitação | 68 |
| Tabela 4-17: Condições optimizadas para tratamentos com ultra-sons ou agitação mecânica | 69 |
| Tabela 4-18: Resultados obtidos após tratamento com uma solução 2 mM de catecol, aplicando os ultra-sons | 74 |
| Tabela 4-19: Condições para os diferentes tratamentos efectuados com ultra-sons | 75 |
| Tabela 4-20: Amostra de lã antes do tratamento e após tratamento (1% de PVA) | 76 |

Tabela 4-21: Valores de alteração da cor após lavagem para os diferentes tratamentos76
Tabela 4-22: Valores de manchamento após lavagem para os diferentes tratamentos77
Tabela 4-23: Condições dos tratamentos com diferentes distâncias do transdutor.....78

1. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O interesse no uso de corantes menos poluentes para a obtenção de cor tem crescido nos últimos anos. Isto é o resultado das severas regras ambientais impostas por alguns países na resposta às reacções tóxicas e alérgicas associadas aos corantes sintéticos. Convencionalmente, é sensato acreditar que os corantes naturais possuem um impacto ambiental menor do que os corantes sintéticos.

O uso de polímeros corados sintetizados enzimaticamente, em condições apropriadas, formam uma molécula singular, não-poluente que exhibe uma melhor bio-degradabilidade e tem geralmente uma maior compatibilidade com o ambiente.

As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem à classe de enzimas oxi-redutases capazes de catalizar a transformação de vários compostos aromáticos, especificamente fenóis e anilinas. Os derivados fenólicos resultam na produção de agregados poliméricos que são usualmente menos solúveis e mais estáveis que os seus compostos semelhantes.

Para aumentar a polimerização enzimática é aplicado um sistema de ultra-sons que promove uma elevada quantidade de radicais, aumentando a polimerização enzimática do monómero em questão (catecol).

A intensidade dos ultra-sons favorece processos químicos e físicos, provavelmente devido ao fenómeno conhecido por cavitação em meio líquido com a formação de bolhas microscópicas que crescem e explodem. O súbito colapso destas bolhas pode provocar "hot spots", isto é, locais de alta temperatura, alta pressão, choque de ondas e forças severas, capazes de quebrar ligações químicas.

O objectivo deste trabalho consistiu na combinação da lacase de *Trametes hirsuta* com sistemas de ultra-sons para aumentar a coloração dos materiais adsorventes em estudo (algodão e lã), através da polimerização radicalar "in situ" do catecol.

A combinação da lacase de *Trametes hirsuta* com sistemas de ultra-sons foi também estudada na ausência de materiais adsorventes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica apresentada incide sobre aspectos fundamentais das fibras de algodão e lã, assim como na enzima aplicada nos diferentes tratamentos. Por último, mencionam-se as características essenciais dos ultra-sons e da polimerização enzimática de fenóis conjugada com a base experimental (ultra-sons) de todo o trabalho desenvolvido.

2.1. SUBSTRATOS TÊXTEIS

2.1.1. ALGODÃO

2.1.1.1. Estrutura morfológica da celulose

O algodão é uma forma pura de celulose encontrada na natureza, sendo uma fibra de origem vegetal proveniente da planta *Gossypium* (Araújo e Castro 1984).

Muitas espécies cresceram comercialmente mas podem ser convenientemente divididas em três tipos: tipo 1: fibras com um comprimento que varia entre 25 a 60 mm, incluindo alta qualidade de algodão fino, como por exemplo, o algodão proveniente do Egipto; tipo 2: são espécies vulgares com um comprimento usualmente pequeno num intervalo que se situa entre 13 a 33 mm, como o algodão oriundo da América; e por fim o tipo 3: espécies de algodão com um comprimento ainda mais pequeno num intervalo de 9 a 25 mm, sendo este produzido usualmente em vários países do Continente Asiático (Shore 1995).

A espessura da fibra de algodão varia entre 12 a 20 μm . O algodão apresenta "convulsões" que variam entre 4 a 6 por milímetro, sendo reversíveis em cada milímetro ou ao longo da fibra. Estas características permitem um rápido reconhecimento da fibra de algodão ao microscópio óptico e electrónico. As fibras de algodão têm uma estrutura fibrilar (Shore 1995). A sua estrutura morfológica encontra-se na Figura 2-1.

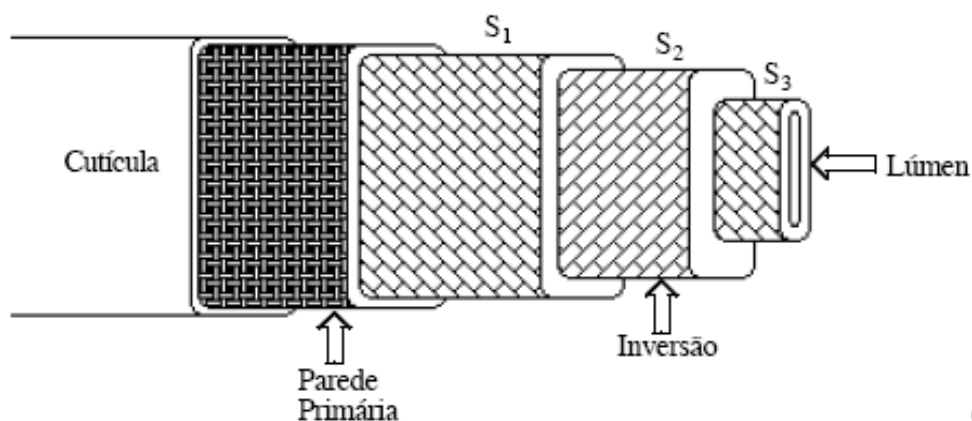


Figura 2-1: Estrutura morfológica da fibra do algodão (Nevell e Zeronian 1985).

A cutícula é a parte mais externa da fibra, não celulósica. É constituída por ceras, gorduras, proteínas e pectinas, sendo, por isso, responsável pelas propriedades hidrófobas das fibras de algodão no seu estado natural. Antes do algodão poder ser usado como fibra têxtil, é necessário remover a cutícula para assegurar a absorção das soluções de corante e dos outros reagentes durante os processos têxteis (Guillen *et al.* 1987).

A parede primária é constituída por celulose (>50%), mas contém também ceras, proteínas e pectinas. Esta parede está coberta pelos componentes da cutícula. As fibrilas exteriores desta camada estão paralelas ao eixo da fibra e formam com as interiores uma rede aproximadamente ortogonal (Guillen *et al.* 1987).

A parede secundária, a mais espessa e cristalina de todas, é maioritariamente celulósica. É constituída por uma camada exterior denominada S_1 e por uma interior denominada S_2 . Na camada S_1 as fibrilas estão dispostas em espiral em redor da fibra, formando com o seu eixo um ângulo de 20-35° (Guillen *et al.* 1987). O mesmo acontece na camada S_2 com a diferença que os feixes de fibrilas têm inversões no sentido do enrolamento, podendo formar um ângulo de 20-30°. A camada S_2 constitui cerca de 95% do peso da fibra, tem alta cristalinidade e é responsável pela resistência mecânica das fibras (Nevell e Zeronian 1985).

A parede do lúmen só se observa em fibras de algodão muito maduras e a disposição dos feixes de fibrilas é semelhante à camada S_1 . O lúmen é a parte mais interna da fibra, apresentando-se sob a forma de um canal central. É o que resta da célula inicial que originou a fibra e, por isso, contém restos de protoplasma, sais minerais e corantes responsáveis pela cor creme do algodão cru (Guillen *et al.* 1987).

2.1.1.2. Estrutura molecular da celulose

O algodão é uma fibra tradicional na manufactura de materiais têxteis, sendo composto quase exclusivamente por celulose. Este é um polissacarídeo que por hidrólise origina muitos monossacarídeos. Se as moléculas de monossacarídeo obtidas por hidrólise são hexoses, o polímero é designado por hexosano (Solomons 1984).

Na natureza existem dois hexanos importantes, os amidos, que representam o reservatório de energia dos organismos vivos, e a celulose, o material estrutural básico da maior parte dos vegetais.

A celulose é um polímero de β -D-glucose insolúvel em água. As propriedades físicas deste material resultam do peso molecular muito alto (cerca de 3000 unidades de glucose) e do facto de não ter ramificações. O aspecto estrutural mais importante da celulose é a ligação 1,4- β das unidades de glucose. O arranjo linear das unidades de glucose com a ligação β na celulose faz com que haja uma distribuição uniforme de grupos OH na extremidade de cada cadeia. Quando duas ou mais cadeias de celulose entram em contacto, os grupos hidróxilo estão em posição ideal para unir integralmente as cadeias, formando ligações de hidrogénio. A ligação de muitas cadeias de celulose, por esta razão, constitui um polímero rígido, fibroso e insolúvel (Solomons 1984).

Assim, a estrutura química da celulose deve ser descrita como 1,4- β -D-glucano, sendo um polímero de condensação de β -D-glucopiranoose com ligações 1,4-glucosídicas.

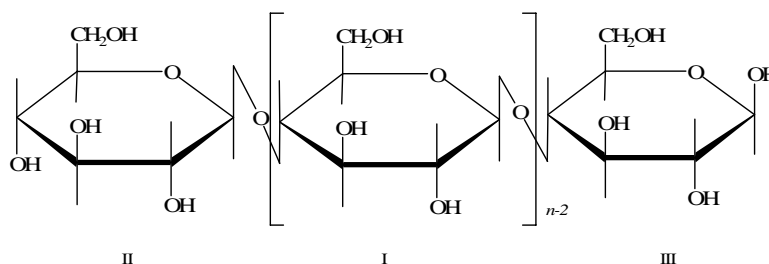


Figura 2-2: Projecção da fórmula de celulose de Haworth, n = grau de polimerização (DP) (Shore 1995).

As unidades fundamentais do polímero de celulose são essencialmente a sequência de grupos intermédios (I), o grupo terminal não-redutor (II), o grupo terminal redutor (III) e as ligações glucosídicas (Figura 2-2), (Shore 1995).

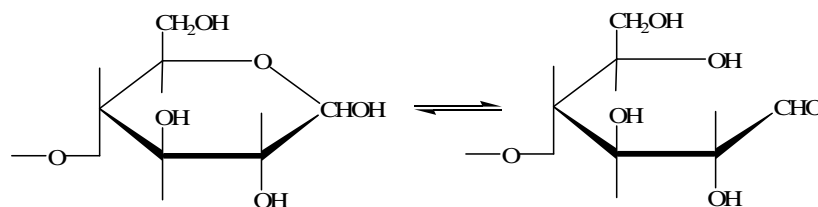


Figura 2-3 Estruturas do grupo terminal redutor (Shore 1995).

Cada unidade intermédia possui um grupo álcool primário e dois secundários. O grupo terminal não redutor possui mais um grupo álcool secundário na posição C₄, e o grupo terminal redutor (posição C₁), assim designado porque reduz a solução de Fehling, é um hemiacetal cíclico, e sob determinadas condições pode ter características de um álcool ou de um aldeído (Figura 2-3), (Shore 1995).

A cristalinidade corresponde ao arranjo regular das macromoléculas no espaço, formando microcristais. Foram encontradas cinco zonas aloamorfos, mas somente a celulose I e a celulose II são importantes para os processos têxteis. A celulose nativa ocorre na forma de celulose I e a celulose II é produzida por tratamento alcalino (mercerização) da celulose I e diferencia-se desta por ter as cadeias numa orientação anti-paralela. A conversão de celulose I em II, com inversão da polaridade das moléculas, tem lugar em fase sólida, de modo não totalmente compreendido. Admite-se que as microfibrilas da celulose I adjacentes na estrutura fibrilar apresentam estatisticamente uma disposição anti-paralela e, na presença de hidróxido de sódio, há cruzamento de moléculas intermicrofibrilares, de modo que a conversão teria lugar sem desagregação da estrutura das fibras (Gama 1996).

Muitos estudos sobre a hidrólise enzimática consideram simplesmente a existência da celulose nativa em duas formas extremas: amorfa e cristalina. Estudos de microdifracção, espectroscopia Raman e ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹³C indicam que a celulose I é constituída por dois tipos de malha cristalina. As duas formas ocorrem em proporções características em celulosas de diferentes origens e o ataque enzimático pode ser preferencial num dos tipos de estrutura.

A natureza das zonas amorfas da celulose é de difícil definição em termos estruturais. De forma geral, é considerada uma estrutura mais desorganizada com um arranjo irregular dos resíduos glicosil, pelo que, o índice de cristalinidade, determinado por difracção de raios-X ou RMN, é essencialmente uma propriedade relativa. Foram apresentados vários modelos esquematizando o carácter cristalino/amorfo das microfibrilas (Gama 1996).

2.1.2. LÃ

2.1.2.1. Estrutura morfológica da lã

A indústria têxtil usa quantidades substanciais de fibras obtidas de vários animais, sendo a lã de carneiro a mais importante comercialmente (Rippon 1992).

A lã é uma fibra proteica extremamente complexa, produzida no folículo da fibra na pele do carneiro. Devido à possibilidade de variações múltiplas, de dieta, de reprodução, do estado de saúde, do clima, etc., as fibras de lã variam muito nas suas propriedades físicas, tais como o diâmetro, comprimento, frisado, assim como nas suas propriedades químicas (Pailthorpe 1992).

Esta fibra consiste num dos membros do grupo de proteínas designadas por queratinas (Hughes *et al.* 2001; Fiadeiro *et al.* 2000; Hogg *et al.* 1994). As fibras de queratina não são quimicamente homogêneas, já que elas consistem numa mistura complexa de diferentes polipéptidos. Apesar da classificação da lã como queratina, de facto, a lã limpa contém apenas 82% de proteínas queratinosas, que são caracterizadas pela sua alta concentração de aminoácido cistina (Rippon 1992).

A lã é composta por aproximadamente 17% de proteínas que têm a designação de não-queratinosas, devido à sua baixa concentração relativa de cistina (Rippon 1992). A fibra de lã contém também aproximadamente 1% de massa de material não proteico, que consiste principalmente em ceras lípidicas e uma pequena quantidade de material polisacarídeo. As proteínas não queratinosas e os lípidos não estão distribuídos uniformemente pela fibra mas estão concentrados em regiões específicas da estrutura (Rippon 1992).

A significativa proporção de cadeias polipéptidicas na lã acredita-se que seja em forma de α -hélice, sendo este arranjo ordenado responsável pelas características de difracção padrão de raio-X da α -queratina (Hogg *et al.* 1994). As cadeias individuais de péptidos na lã estão ligadas entre si por vários tipos de ligações covalentes e interacções não covalentes (Figura 2-4). Em adição a estas ocorrências entre as cadeias polipéptidicas separadas (inter-cadeia), estas ligações podem também ocorrer entre diferentes partes da mesma cadeia (intra-cadeia). No que respeita às propriedades e performance da lã, as ligações inter-cadeias são as mais importantes (Rippon 1992).

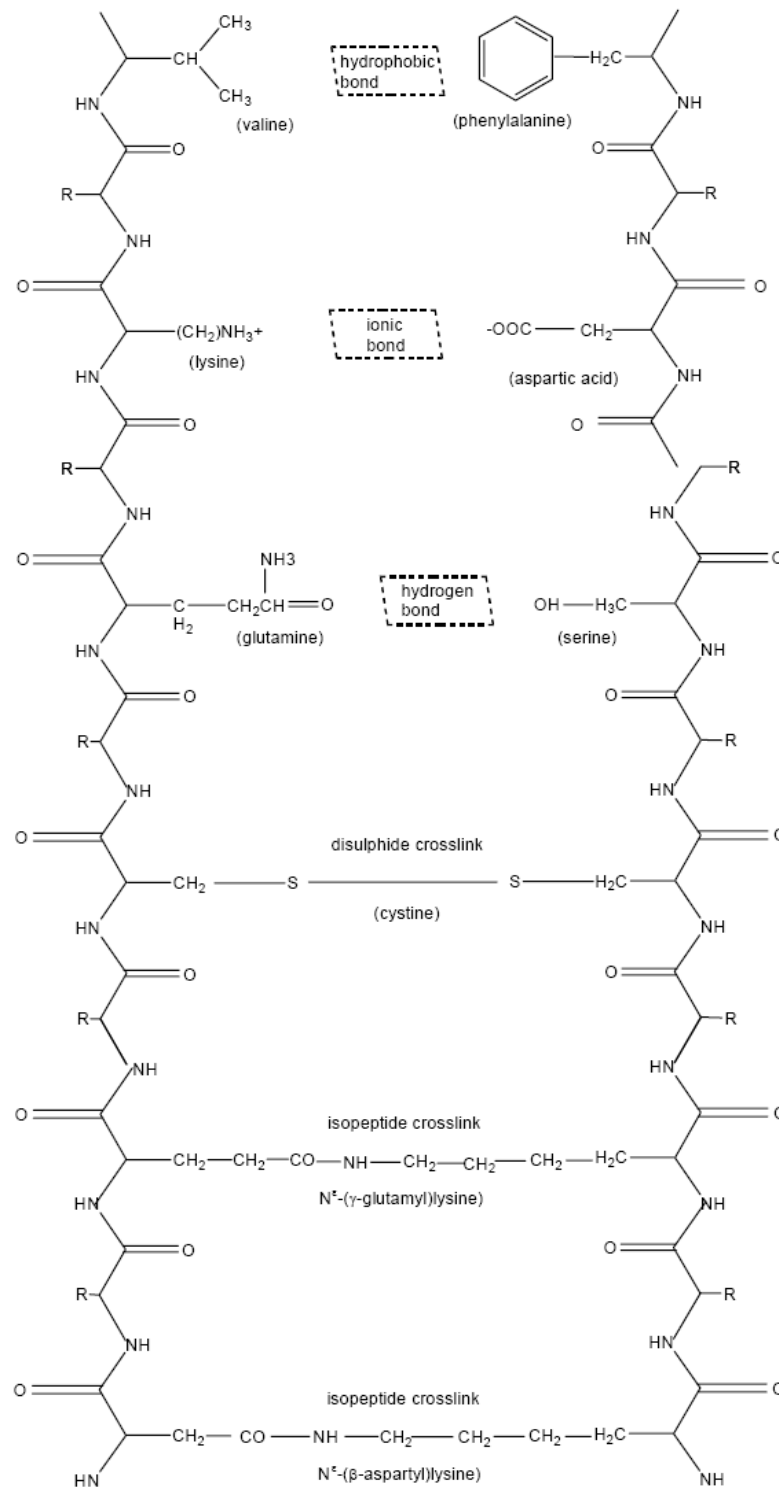


Figura 2-4: Possíveis ligações entre diferentes cadeias de proteínas da lã (Rippon 1992).

A lã é uma fibra natural complexa composta principalmente por proteínas (97%) e lípidos (1%), com uma estrutura morfológica heterogênea (Heine e Höcher 1995).

As fibras de lã têm uma forma aproximadamente elíptica cilíndrica com uma variação de diâmetro num intervalo de 15 µm a 50 µm e o comprimento é determinado pela velocidade de crescimento da lã e pela frequência da tosquia (Makinson 1979).

A lã e outras fibras de queratina são constituídas por duas partes morfológicas importantes: cutícula (usualmente referida como camada de escamas da lã) que é composta por células que encaixam à volta do córtex (parte interior da fibra), e o córtex que é formado por células fibrilares que se dispõem ao longo do eixo da fibra de uma forma espiralada, sendo estas células formadas por proteínas conhecidas pelo nome de queratinas (Figura 2-5), (Rippon 1992; Makinson 1979; Negri *et al.* 1993).

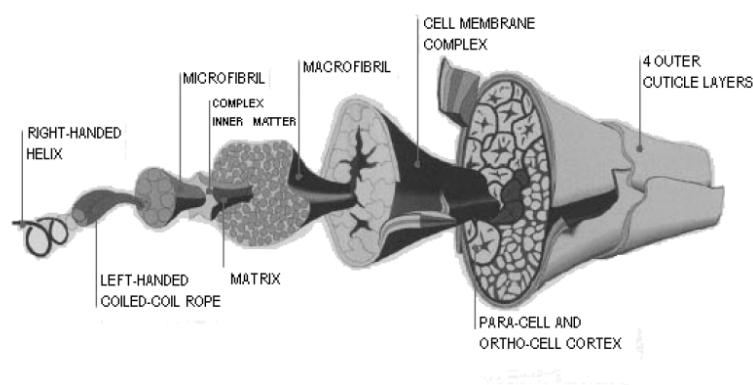


Figura 2-5: Diagrama da fibra de lã de merino, mostrando a estrutura e magnificações progressivas (Feughelman 1997).

As células da cutícula são laminares, com uma estrutura rectangular que forma um invólucro encaixando nas escamas que envolvem o córtex (Speakman 1985; Naik 1994; Negri *et al.* 1993). Estas compreendem 10% do peso total da fibra de lã (Naik e Speakman 1993). Estas células da cutícula são compostas por três camadas distintas, como se pode ver na Figura 2-6. A camada mais externa é designada epicutícula; a camada seguinte da superfície das células é a exocutícula, sendo esta dividida em duas subcamadas (camada A e B) que diferem essencialmente no seu conteúdo de cistina. Finalmente a endocutícula que é a camada cutilar mais próxima do córtex (Naik 1994; Heine e Höcher 1995; Rippon 1992; Feughleman 1997).

A sub-estrutura das células da cutícula está directamente relacionada com os processos de feltragem, fricção e permeabilização. A epicutícula, em que a sua constituição representa 0,25% da massa total da fibra, é muito inerte quimicamente, sendo resistente a agentes ácidos, oxidativos e redutores, enzimas e alcális (Makinson 1979; Negri *et al.*

1993). Esta membrana não forma uma camada contínua sobre a fibra, mas cobre a superfície externa de cada célula da cutícula (Naik 1994). A epicutícula é conhecida pela sua hidrofobicidade, provavelmente devido à sua componente lipídica que se encontra à volta da membrana (Negri *et al.* 1993). A resistência da superfície da membrana é provavelmente devida às ligações covalentes isopeptídicas que ocorrem naturalmente, assim como ao ataque covalente lipídico, predominante no ácido 18-metileicosanoico (Naik 1994; Negri *et al.* 1993; Brack *et al.* 1999; Heine e Höcher 1995). Este ácido gordo é covalentemente ligado à matriz da proteína através de resíduos cisteína, formando uma camada que pode ser removida com uma solução alcalina alcoólica ou clorada com o objectivo de melhorar as suas propriedades têxteis, como a sua hidrofiliidade, a sua capacidade de tingir e a adesão polimérica (Negri *et al.* 1993; Brack *et al.* 1999).

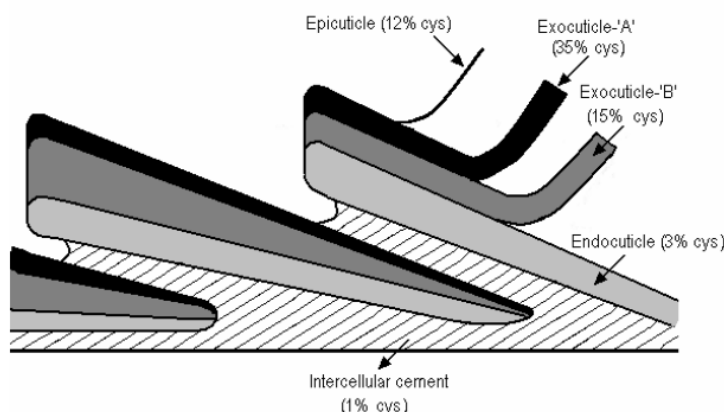


Figura 2-6: Estrutura esquemática da cutícula e os seus principais componentes (Rippon 1992).

As sub-camadas A e B são resistentes à ebulição em ácido hidrocloreto diluído e digestão com tripsina; contudo, podem ser solubilizadas por tratamento com tripsina após oxidação e redução. A endocutícula é preferencialmente atacada por enzimas proteolíticas e degradam rapidamente em ácido hidrocloreto diluído em ebulição (Naik 1994). A cutícula da lã forma uma barreira de difusão aos agentes químicos (Naik 1994; Schäfer 1994; Nolte *et al.* 1996). Esta barreira de difusão (por exemplo devido às moléculas de corante) deve-se principalmente à hidrofobicidade da sub-camada A da exocutícula, causada pela larga quantidade de "crosslinks" de ligações dissulfídicas e ligações do material lipídico. Consequentemente, os processos de pré-tratamento da lã modificam principalmente a composição e morfologia da sua superfície (Brack *et al.* 1999; Millington 1998; Pascual e Júlia 2001).

2.2. TINGIMENTO DE FIBRAS TÊXTEIS

O tingimento é um processo de coloração que depende essencialmente de dois factores: estrutura dos corantes utilizados e características das fibras intervenientes.

Este tema será abordado no ponto a seguir, mas de uma forma muito abrangente, uma vez que é uma área extremamente vasta no que se refere a corantes e seus processos de aplicação.

2.2.1. PROCESSOS DE TINGIMENTO

Existem dois processos distintos de tingimento: processos descontínuos ou por esgotamento; processos contínuos por fulardagem (Araújo e Castro 1984).

Nos processos descontínuos, o movimento do corante em direcção ao interior das fibras é provocado pela substantividade do corante. Podemos, nestes casos, distinguir as seguintes etapas: desagregação dos agregados do corante no banho; difusão no banho; absorção superficial na fibra; difusão na fibra; fixação. Para que se processem as etapas acima referidas é necessária agitação mecânica, temperatura adequada e produtos auxiliares adequados ao sistema corante/fibra (Araújo e Castro 1984).

Nos processos contínuos (e semi-contínuos) utiliza-se uma máquina designada por "foulard". O corante, neste processo, não poderá ser muito substantivo (ter afinidade) para com a fibra, devido ao risco da sua diminuição de concentração no banho, pois à medida que o tecido é espremido, e progressivamente menos corante é transferido para a fibra, com a consequência da tonalidade do material se tornar cada vez mais clara (Araújo e Castro 1984).

Numa operação destas, as etapas são as seguintes: impregnação das fibras com o banho de tingir; uniformização do banho nas fibras; tratamentos posteriores adequados que envolvem a difusão do corante no interior da fibra; e a sua posterior fixação.

2.2.2. CORANTES UTILIZADOS PARA FIBRAS TÊXTEIS

Os corantes podem ser substâncias naturais ou compostos sintéticos. Para o tingimento de fibras têxteis, os corantes são na sua grande maioria sintéticos, estando a utilização dos corantes naturais reservada essencialmente aos produtos alimentares.

As características que um composto deve ter para ter utilidade como corante têxtil podem resumir-se às seguintes: cor; afinidade para com as fibras a que se destina; solidez aos agentes a que o artigo têxtil irá ser submetido após o tingimento (luz, lavagem, etc.) (Rocha Gomes 2001).

O tingimento de fibras celulósicas foi melhorado com o desenvolvimento de corantes directos em finais do século XIX, os quais eliminaram a necessidade de recorrer a um tratamento prévio com mordente, podendo ser aplicados directamente no tingimento de artigos de algodão. Os corantes de cuba, sulfurosos e azoicos surgiram nas décadas seguintes à descoberta do primeiro corante directo.

Em 1954, Ratter e Stephen, descobriram que corantes com grupos diclorotriazina reagem com fibras celulósicas em condições alcalinas, assegurando dessa forma tingimentos com elevada solidez, mesmo em tratamentos a húmido, sem enfraquecimento significativo da fibra (Araújo e Castro 1984).

No ano de 1956, foi introduzida no mercado a gama de corantes Procion para tingimentos em contínuo. Esta gama de corantes sofreu um desenvolvimento muito rápido, com o constante aparecimento de novos corantes, como se permite verificar pela entrada de mais de 700 corantes para o Colour Índex no período de 1982-1987 (Araújo e Castro 1984).

As vantagens apresentadas por esta classe de corantes, ao conferirem cores brilhantes e boa solidez aos tratamentos a húmido, fazem deles uma das classes mais importantes para o tingimento de fibras celulósicas.

2.2.2.1. Classificação de corantes

Todas as moléculas absorvem radiação electromagnética, mas diferem entre si no comprimento de onda, específico para cada uma delas.

Algumas moléculas têm capacidade de absorver luz na zona visível do espectro (400-800 nm), e por isso, possuem cor.

Os corantes são moléculas com sistemas de electrões deslocalizados conjugados com ligações duplas, contendo dois grupos: cromóforo e auxocromo (Rocha Gomes 2001).

Os cromóforos são grupos de átomos responsáveis pela cor do corante com grupos que aceitam electrões. Os cromóforos mais importantes são os grupos $-C=C-$, $-C=N-$, $-N=N-$, $-NO_2$ e $-NO$. Os auxocromos são substituintes com dadores 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 (Rocha Gomes 2001).

Baseados na estrutura química dos cromóforos (azo (monoazo, diazo, triazo, poliazo), antraquinona, ftalocianina e os triarilmetano) é possível a identificação de 20-30 diferentes grupos de corantes.

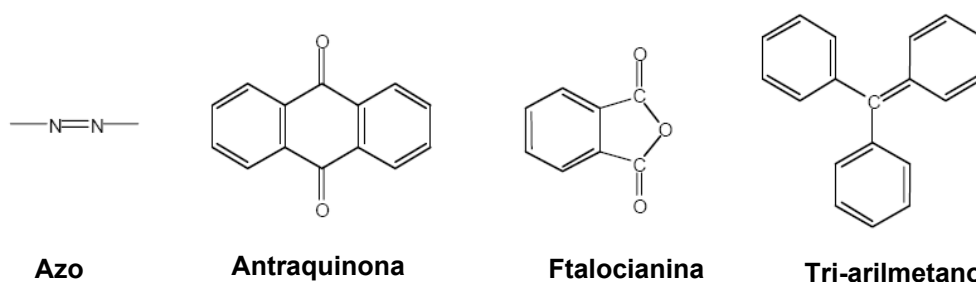


Figura 2-7: Cromóforos mais importantes.

Os corantes comerciais estão classificados pela sua cor, estrutura e método de aplicação do Colour Index (C.I.) que é editado pela "Society of Dyers and Colourists" e pela "American Association of Textile Chemists and Colorists" de três em três meses. Cada corante possui um nome C.I., determinado pela sua aplicação e cor (Rocha Gomes 2001). As quinze diferentes classes de aplicação do Colour Index estão referenciadas na tabela que se apresenta a seguir.

Tabela 2-1: Classes de Aplicação do Colour Index (Christie 2001)

| Classe de Aplicação | Características |
|---------------------|---|
| Corantes Ácidos | São solúveis devido à presença de grupos sulfónicos. Formam ligações iónicas entre os grupos funcionais protonados das fibras (-NH_3^+) e os grupos negativos dos corantes. As estruturas mais comuns são: azo, antraquinona e triarilmetano. |
| Corantes Reactivos | Formam ligações covalentes com os grupos -OH , -NH ou -SH presentes no algodão, lã, seda e nylon. O problema da utilização destes corantes está associado à hidrólise dos grupos reactivos que ocorre durante o processo de tingimento. As estruturas mais comuns são: azo, antraquinona e ftalocianina. |

Tabela: 2-1: Continuação

| Classe de Aplicação | Características |
|---------------------|--|
| Corantes Directos | A planaridade da molécula do corante favorece as ligações de Van-der-Waals, as ligações dipolo e as ligações de hidrogénio, com as moléculas de glucose. De 1600 estruturas apenas 30% continuam em produção, devido à sua baixa solidez à lavagem. As suas estruturas mais comuns são à base de corantes azo com grupos sulfónicos. |
| Corantes Básicos | Os corantes básicos são aplicados na fibra acrílica devido à forte interação iónica entre o grupo funcional do corante como $-NR_3^+$ ou $=NR_2^+$ e as cargas negativas do copolímero. As estruturas mais comuns são: azo, diarilmetano, triarilmetano, e antraquinona. |
| Corantes Mordente | Os mordentes são normalmente sais metálicos como o dicromato de sódio ou de potássio. Eles actuam como "agentes fixadores" para aumentar a solidez da cor. São usados na lã, no couro, seda e fibras de celulose modificada. As estruturas mais comuns são: azo, ou triarilmetano. |
| Corantes Dispersos | Estrutura não-iónica, com grupos funcionais polares como: $-NO_2$ e $-CN$ que aumentam a solubilidade em água, forças de Van der Waals, forças dipolo e a cor. São normalmente usadas com o poliéster. As estruturas mais comuns são: azo, nitro, antraquinona. |
| Corantes Pigmentos | Estes compostos insolúveis, não-iónicos ou sais, representam 25% dos nomes de todos os corantes comerciais, mantendo a sua cristalinidade ou estrutura particular durante a sua aplicação. As estruturas mais comuns são azo ou ftalocianinas. |
| Corantes de Cuba | Os corantes de cuba são insolúveis em água, mas tornam-se solúveis por redução alcalina (ditionito de sódio na presença de hidróxido de sódio). A forma leuco produzida é absorvida pela celulose (forças de Van der Waals), sendo posteriormente oxidada com o peróxido de hidrogénio, convertendo-se numa forma insolúvel. A estrutura comum é a antraquinona. |
| Corantes "Ingrain" | O termo "ingrain" é aplicado a todos os corantes que se formam " <i>in situ</i> ", dentro ou à superfície do substrato, pelo desenvolvimento do acoplamento de um ou mais compostos intermediários e aminas aromáticas diazotadas. |

Tabela: 2-1: Continuação

| Classe de Aplicação | Características |
|--------------------------|---|
| Corantes Sulfurosos | Os corantes sulfurosos são complexos poliméricos aromáticos contendo anéis heterocíclicos, representando 15% da produção global de corantes. O tingimento com corantes sulfurosos (principalmente em fibras celulósicas) envolve processos de redução e oxidação semelhantes aos processos utilizados com os corantes de cuba. |
| Corantes Solventes | Corantes não-iônicos que são usados nos substratos que podem dissolver plásticos, vernizes, tintas e ceras. Não são usados nos processos têxteis. As estruturas mais comuns são compostos diazo, triarilmetano, antraquinona e ftalocianina. |
| Outra classe de corantes | Os corantes alimentares não são usados como corantes têxteis. Os corantes naturais usados nos processos têxteis de tingimentos são muito limitados. Não estão listados separadamente na classe do Colour Index muitos corantes complexo-metálicos que podem ser encontrados com crómio, cobalto ou níquel. Os corantes complexo-metálicos são geralmente compostos azo. |

2.3. LACASES

As enzimas exibem um número de características que as tornam muito vantajosas quando comparadas com outros agentes catalíticos convencionais químicos, pelo seu alto nível de eficiência catalítica, alto grau de especificidade e ausência de locais reactivos.

Em adição, as enzimas são facilmente bio-degradáveis, facilmente removidas dos rios contaminados e facilmente padronizadas em preparações comerciais. Geralmente actuam em condições moderadas de temperatura, pressão e pH. Estas características promovem processos de pouca energia e com custos mais reduzidos (Zille 2005). Contudo, a instabilidade é natural nas enzimas, quando removidas do seu ambiente natural. O seu elevado custo de isolamento e purificação continuam a ser desencorajadores para o seu uso extensivo, especialmente em áreas que têm correntemente processos alternativos estabilizados. Para além destas desvantagens, o estudo de aplicações enzimáticas é de um interesse constante e os seus problemas tecnológicos são usualmente dominados (Chaplin e Bucke 1990).

Em contraste com a alta especificidade geral das enzimas, as lacases são preferencialmente não específicas. A lacase foi descoberta em plantas por Yoshida. Yoshida observou que o látex da laca das árvores (*Rhus sp.*) provenientes da China ou do Japão endurecia rapidamente na presença do ar. A enzima adquiriu o nome lacase dez anos depois da sua descoberta, após o seu isolamento e purificação (Bertrand 1894). Estas enzimas têm sido estudadas desde meados da época de setenta e os seus resultados foram revistos extensivamente (Mayer e Staples 2002; Claus 2004).

As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem ao grupo das oxidases que complexam o cobre e catalizam a oxidação de vários compostos, inorgânicos e orgânicos, particularmente fenóis, com concomitante redução do oxigénio com a formação de água (Xu *et al.* 1996).

As lacases não catalisam só a remoção do átomo de hidrogénio proveniente do grupo hidróxilo dos monofenóis substituídos por metoxis, ou os *orto* e *para* difenóis, mas oxidam também outras substâncias, como as aminas aromáticas e compostos não fenólicos, de modo a formar radicais livres. No suceder da reacção poderá haver reacções de acoplamento entre os produtos de reacção e até mesmo polimerização (Bourbonnais *et al.* 1997; Li *et al.* 1999).

As lacases, na sua forma livre ou imobilizada, têm imensas aplicações biotecnológicas e ambientais, como a análise com bio-sensores para fenóis, o desenvolvimento em cátodos de oxigénio em células de bio-combustíveis, a degradação de corantes têxteis e demetilação (Mayer e Staples 2002).

Esta enzima pode ser encontrada na natureza em eucariontes, como fungos, plantas superiores e insectos (Mayer e Staples 2002). Contudo, nos últimos anos foi confirmada a existência de proteínas procariontes com características de multi-cobre da família das oxidases (Claus 2003).

Muito recentemente, a actividade da enzima, como a lacase, foi encontrada em poros termoestáveis de *Bacillus* de diferentes origens (Hirose *et al.* 2003).

2.3.1. PROPRIEDADES MOLECULARES E CENTROS ACTIVOS DA LACASE

A molécula de lacase, na sua forma de haloenzima activa, é uma glicoproteína, contendo quatro átomos de cobre por monómero, ligados a três locais redox (pares do Cu: T1, T2, T3). A massa molecular dos monómeros varia num intervalo de 50 a 100 kDa. Uma característica importante é a ligação covalente com metade dos carboidratos (10-45%), o que poderá contribuir para a alta estabilidade da enzima (Durán *et al.* 2002).

Os quatro átomos de cobre diferem entre si, apresentando sinais de ressonância paramagnética electrónica (EPR) que os caracterizam. Para uma actividade catalítica mínima são necessários quatro átomos de cobre por cada unidade de proteína activa. Um pertence ao local cobre T1 "blue" paramagnético que tem uma forte absorvância electrónica a 610 nm; outro pertence ao local cobre T2 "non-blue" paramagnético; e os outros dois pertencem ao local tipo 3 par cobre-cobre spin-acoplado diamagnético que tem um pico no ultravioleta (UV) com uma absorvância máxima de 330 nm. Os átomos de cobre T2 e T3 formam um local aglomerado trinuclear. O cobre T2 é coordenado por duas histidinas e o par de cobre T3 por seis histidinas. O forte acoplamento anti-ferromagnético entre dois átomos de cobre T3 é mantido por ligações com grupos hidróxilo (Claus 2004). A função do local T1 neste tipo de enzima envolve a abstracção de um electrão do substrato redutor (doador de electrões) com a subsequente transferência do electrão ao aglomerado do cobre T2/T3 (Figura 2-8).

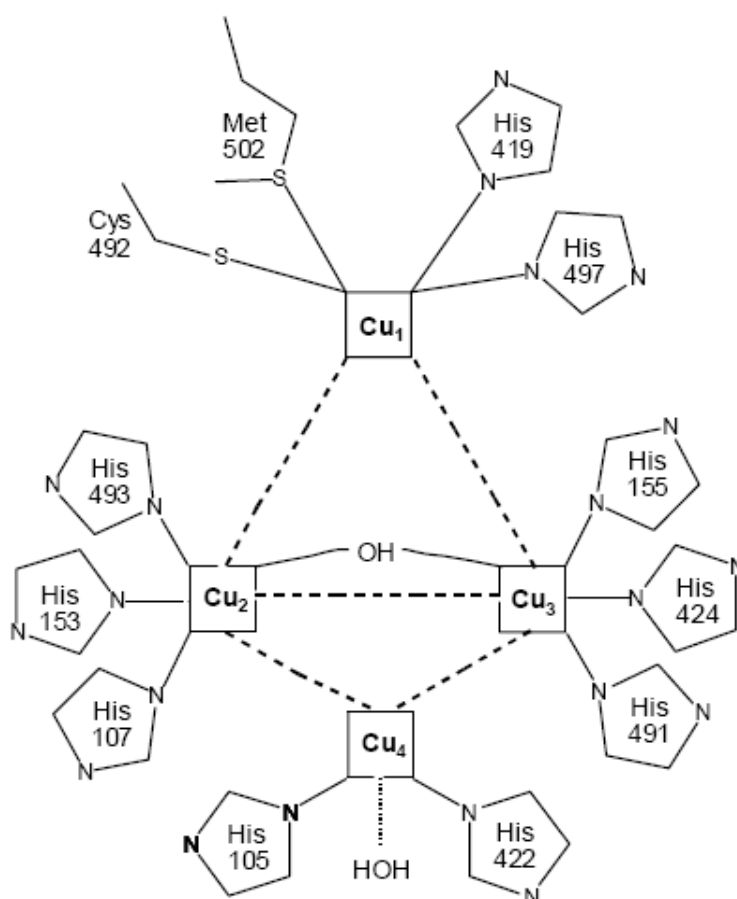


Figura 2-8: Centros de cobre da lacase (Claus 2004).

Independentemente da pesquisa, a lacase pode ser fortemente inibida por vários aniões, como, a azida, o cianeto, o tiocianeto e o fluoreto, que são capazes de interagirem com locais de cobre e impedirem a transferência electrónica interna de um electrão. Os agentes complexantes removem o cobre dos centros activos, exercendo uma actividade de inibição reversível (Christenson *et al.* 2004).

2.3.2. MECANISMO CATALÍTICO DAS LACASES

O mecanismo de transferência de electrões e o mecanismo de redução do oxigénio a água para a lacase ainda não estão bem compreendidos. Contudo, têm sido propostos esquemas de mecanismos (Figura 2-9) que se basearam na cinética e na estrutura apresentada até à data (Torres *et al.* 2003). A maior dúvida permanece na parte redutiva do ciclo, onde o mecanismo do agrupamento trinuclear é reduzido.

No ciclo catalítico da lacase, o substrato reduz o local T1, que por sua vez transfere o electrão ao agregado trinuclear. São possíveis dois mecanismos para a redução do agregado trinuclear. Numa das hipóteses (A na Figura 2-9) o local T1 transfere os seus electrões ao local T2, sendo aquele reduzido novamente por uma segunda molécula do substrato; os locais T1 e T2 transferem os seus electrões ao local T3. O local T1 é reduzido por uma terceira molécula de substrato e um electrão é outra vez transferido ao local T2. Este processo reoxida o local T1, que é então reduzido por uma quarta molécula do substrato. Como resultado, obtém-se uma forma completamente reduzida da lacase. Outra possibilidade (B na Figura 2-9) consiste na redução sequencial do agregado trinuclear pela transferência de um electrão do local T1 (Torres *et al.* 2003).

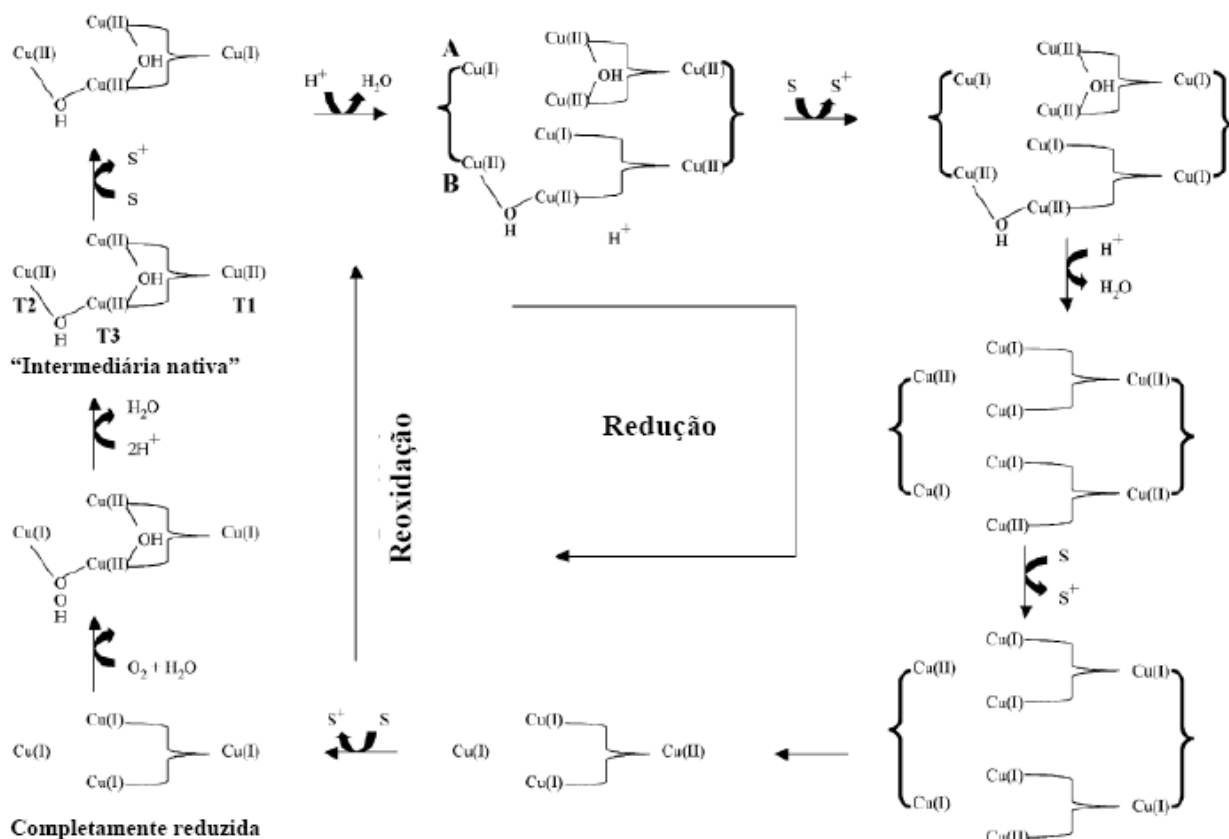


Figura 2-9: Ciclo catalítico da lacase, exibindo o mecanismo de redução e oxidação dos locais do cobre (Torres *et al.* 2003).

2.3.3. MEDIADORES DA LACASE

Os mediadores são moléculas de baixo peso molecular que estão envolvidas na reacção enzimática. Ao permitirem alargar o espectro de substratos em que a enzima actua, vieram dar um novo aspecto à acção das enzimas em geral e da lacase em particular (Majcherczyk *et al.* 1998).

A função dos mediadores numa oxidação enzimática da lacase é apresentada na Figura 2-10. Um mediador é uma pequena molécula que actua como uma espécie de "ponte de electrões". Assim, o mediador oxidado pode desenvolver um mecanismo de oxidação não disponível à enzima, alargando a oxidação a uma série de substratos inacessíveis às enzimas (Fabbrini *et al.* 2002).

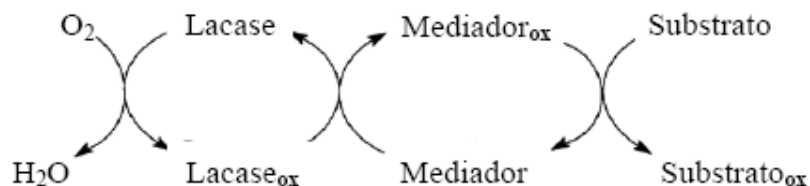


Figura 2-10: Ciclo catalítico da lacase (Banci *et al.* 1999).

Foram descritos mais de cem compostos mediadores, mas os mais utilizados são o ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) e o N-hidroxibenzotriazole (HBT).

Várias lacases oxidam rapidamente ABTS, por radicais livres, ao catião radicalar $ABTS^+$ e a concentração do catião radicalar de cor intensa verde-azul pode ser relacionada com a actividade da enzima (Bourbonnais *et al.* 1997).

O mediador N-hidroxibenzotriazole (HBT) pertence aos compostos N-heterocíclicos que produzem grupos mediadores N-OH. O consumo de oxigénio do HBT é convertido pela enzima num intermediário activo, que é oxidado a um radical reactivo ($R-NO^{\cdot}$) (Bourbonnais *et al.* 1997).

Em resumo, tanto o ABTS como o HBT formam radicais por reacção com a lacase. No primeiro caso, são radicais mais estáveis e selectivos; no caso do HBT são mais instáveis, por isso mais reactivos e têm a vantagem de ser mais inespecíficos. No processo com ABTS o mediador é reversível, o que não acontece sempre com o HBT, que pode ser transformado em BT (a ligação N-O é quebrada) e outros produtos (Li *et al.* 1999).

2.3.4. IMOBILIZAÇÃO DA LACASE

As enzimas exibem um número de características que fazem delas catalizadores vantajosos quando comparadas com os catalizadores químicos convencionais. Contudo, existe um número de problemas práticos que reduzem o seu tempo de vida operacional, assim como o seu elevado custo de purificação e isolamento, a sua não-reutilização, a instabilidade destas estruturas às condições do processo. Muitas destas limitações indesejáveis podem ser superadas pelo uso de enzimas imobilizadas (Taylor 1991).

A imobilização é conseguida fixando a enzima em suportes sólidos obtendo-se enzimas imobilizadas em sistemas heterogéneos.

As enzimas na sua forma imobilizada são mais resistentes às mudanças ambientais, permitindo a sua fácil recuperação e a sua reutilização múltipla.

Comparando com enzimas livres, a enzima imobilizada tem normalmente uma actividade mais baixa, mas a sua estabilidade aumenta (Durán *et al.* 2002).

As enzimas podem ser imobilizadas por vários métodos através de mecanismos químicos e/ou físicos. Os métodos para o procedimento de imobilização influenciam muito as propriedades da bio-catálise resultante e a estratégia da imobilização determina o processo de especificações para a catálise (Hartmeier 1998).

2.3.5. APLICAÇÕES DA LACASE

As lacases têm inúmeras aplicações na indústria têxtil, nomeadamente:

- **Degradação de corantes**

Os efluentes têxteis possuem uma composição extremamente variada, não contêm somente corantes, mas também sais e, por vezes com forças iónicas fortes e valores de pH extremos, agentes quelantes, precursores e surfactantes que podem inibir a actividade da enzima e a sua performance na degradação dos efluentes (Abadulla *et al.* 2000). Por consequência, a descolorização de efluentes têxteis requer escolhas apropriadas do tipo de enzimas (Wesenberg *et al.* 2003).

A lacase tem capacidade para actuar em compostos cromóforos, como os corantes azo, triarilmetano e antraquinona, podendo-se sugerir a sua aplicação em processos de descolorização industrial (Wesenberg *et al.* 2003).

Estudos recentes propõem alguns mecanismos de degradação para corantes azo fenólicos e não-fenólicos. No modelo proposto, os corantes azo são degradados sem clivagem directa das ligações azo, devido à não-especificidade dos radicais livres, havendo formação de compostos do tipo fenólicos, evitando desse modo a formação de aminas aromáticas tóxicas, o que poderá ser muito útil no controlo da poluição ambiental (Wong e Yu 1999). Contudo, alguns substratos específicos podem ser encontrados nas reacções com a lacase, o que limita o número de corantes azo que podem ser degradados. Para resolver este problema são normalmente utilizados sistemas lacases/mediadores para alargar o intervalo de corantes azo e aumentar a velocidade de descolorização (Bourbonnais *et al.* 1997).

No entanto, a capacidade para avaliar o potencial de degradação da lacase é incompleto, uma vez que não há um conhecimento completo do mecanismo de descolorização e mineralização de corantes e a possibilidade de formação de produtos intermediários potencialmente tóxicos, que limitam a aplicabilidade deste bio-catalizador no tratamento de efluentes têxteis. Pequenas diferenças na distribuição de um electrão no corante, densidade da carga e factores estéricos podem afectar a descolorização enzimática (Wesenberg *et al.* 2003).

- **Síntese orgânica**

Recentemente, houve um aumento crescente de interesse da aplicação da lacase como novo bio-catalizador orgânico (Mayer e Staples 2002).

A lacase fornece um processo de produção de polímeros na presença de O₂, sem o uso de peróxido de hidrogénio (Kobayashi e Higashimura 2003). Foi mencionado que a lacase promove a polimerização radicalar da acrilamida com ou sem mediador (Ikeda *et al.* 1998). O "graft" de copolímeros na síntese quimo-enzimática de lenhina foi também estudado (Gübitz e Cavaco-Paulo 2003).

As lacases são também conhecidas pela capacidade de polimerização de compostos amina e fenólicos (Aktas e Tanyolaç 2003). A capacidade da lacase gerar cor "*in situ*", a partir de substâncias não coloradas e com massa molecular baixa, faz do seu uso uma alternativa aos processos de tingimento convencionais. A capacidade da lacase para a síntese de novos compostos pode ser usada para modificações da fibra à superfície. A modificação enzimática e os processos de tingimento podem ser aplicados em vários substratos naturais como o algodão, o sisal, a lã, o linho e a madeira (Tzanov *et al.* 2003b).

- **Acabamentos têxteis**

O branqueio oxidativo convencional do algodão consiste num tratamento com peróxido de hidrogénio a temperaturas elevadas. Neste tratamento, são necessárias lavagens com água para remover o oxidante residual, aumentando consideravelmente a carga dos efluentes têxteis. O branqueio convencional poderá causar danos importantes nas fibras têxteis. A necessidade de minimização dos efeitos adversos sobre a fibra e a redução da quantidade de químicos e de efluentes levou ao estudo de novos processos onde se verificou uma importância acrescida das enzimas. As lacases são utilizadas num tratamento combinado, onde os tecidos de algodão pré-tratados com concentrações reduzidas de

lacase, durante intervalos de tempo curtos, são posteriormente sujeitos a um branqueio oxidativo convencional. Os resultados mostram que o grau de branco é maior para o tratamento combinado, comparativamente com o tratamento convencional (Tzanov *et al.* 2003a).

As lacases poderão ter outro tipo de aplicações, nomeadamente: bio-remediação (Ehlers e Rose 2005); delenhificação e branqueamento da polpa (Bourbonnais *et al.* 1997); estabilização do vinho e da cerveja (Minussi *et al.* 2002); aperfeiçoamento alimentar (Minussi *et al.* 2002); bio-sensores (Gomes *et al.* 2004) e aplicações médicas (Bauer *et al.* 1999).

2.4. ULTRA-SONS

O ultra-som pode ser definido como um som de uma frequência que está para além da resposta da audição humana, isto é, superior a 16 kHz (16000 ciclos por segundo). O limite superior da frequência de ultra-sons é de 5 MHz para gases e 500 MHz para os líquidos e sólidos. A aplicação dos ultra-sons de acordo com a frequência é dividida em duas áreas: alta frequência e baixa intensidade (1-10 MHz), normalmente usadas para fins de diagnóstico em medicina e engenharia; e baixa frequência e alta intensidade (20-100 kHz), usualmente aplicadas em limpezas e reactividade química (Shah *et al.* 1999).

Assim como as ondas electromagnéticas, as ondas ultra-sónicas podem ser reflectidas e refractadas. No entanto, as ondas electromagnéticas requerem um meio com propriedades elásticas para a sua propagação (Vajnhandl 2005).

A onda de ultra-som, como todas as ondas de som, consiste em ciclos de compressão e expansão (rarefacção). Os ciclos de compressão exercem uma pressão positiva no líquido, havendo uma aproximação entre as moléculas; por sua vez os ciclos de rarefacção exercem uma pressão negativa afastando as moléculas umas das outras. Durante o ciclo de expansão, a onda de som com intensidade suficiente pode provocar a formação de cavidades (Suslick 1989).

2.4.1. CAVITAÇÃO E FORMAÇÃO DE RADICAIS

A cavitação é definida como o fenómeno de formação, crescimento e subsequente colapso de microbolhas ou cavidades que ocorrem em intervalos de tempo muito reduzidos (milissegundos), libertando elevadas quantidades de energia (Suslick 1990).

A alternância dos ciclos da onda, a compressão e a rarefacção resultam em várias fases da cavitação, como a formação da bolha/cavidade, a fase de crescimento e a fase de colapso, libertando-se uma elevada quantidade de energia (Suslick 1990).

A formação da bolha ocorre na fase de rarefacção sob pressão negativa e reduz o seu tamanho durante o ciclo de compressão. O seu tamanho diminui e aumenta alternadamente de uma forma cíclica até atingir um tamanho crítico instável, verificando-se o colapso das bolhas no seguimento do ciclo de compressão (Figura 2-11). O crescimento da bolha e a implosão num líquido irradiado com ultra-sons é o fenómeno físico responsável pela maioria dos fenómenos sonoquímicos (Suslick 1989).

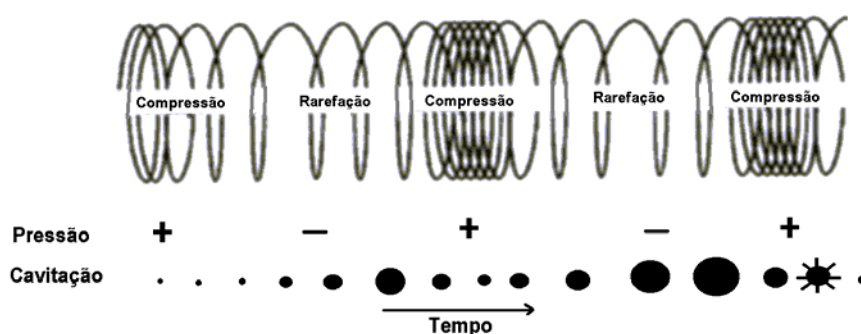


Figura 2-11: Ciclos de compressão e rarefacção.

A bolha pode crescer durante ciclos de pressão negativa. Quando atinge um tamanho crítico, há uma implosão da bolha, gerando altas temperaturas e pressões.

Os fenómenos da cavitação ocorrem simultaneamente em pequenas regiões do reactor, sendo difícil quantificar o número de cavidades que ocorrem num determinado período de tempo. Estas poderão ser estimadas pelas equações teóricas de dinâmica das bolhas desenvolvidas (Naidier *et al.* 1994).

A geração de "hot spots", a libertação de radicais livres muito reactivos, o aumento de transferência de massa, a limpeza de superfícies sólidas, são alguns dos efeitos da cavitação (Suslick 1990; Suslick *et al.* 1986; Pandit e Moholkar 1996).

A sonificação aumenta os movimentos moleculares, que promovem a eficiência da transferência de massa e a agitação. Estes fenómenos podem proporcionar o aumento do rendimento das reacções químicas, acelerando as mesmas e reduzindo o número de passos intermédios.

A implosão das cavidades concebe um ambiente pouco usual para as reacções químicas. O vapor e os gases dentro da cavidade são extremamente comprimidos durante o colapso cavitacional, gerando um grande aumento na temperatura e pressão. Para além disso, assume-se que o colapso cavitacional provoca drásticas condições locais: temperatura dentro da bolha é cerca de 5000 K com uma pressão de aproximadamente 1000 atmosferas e de 1900 K no líquido que rodeia a cavidade (Figura 2-12), (Suslick 1989).

Algumas condições são limitadas a regiões muito pequenas e o calor produzido durante a cavitação é dissipado muito rapidamente (Vajnhandl 2005).

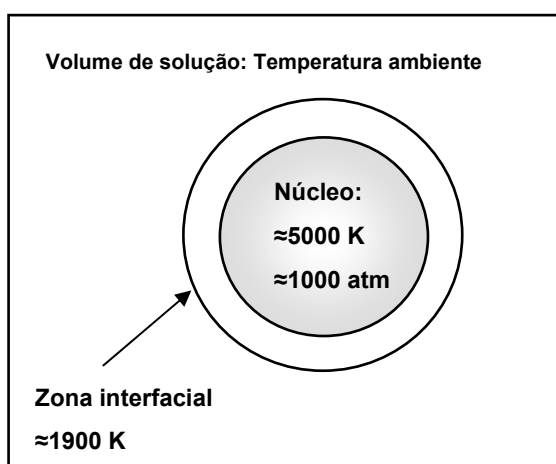


Figura 2-12: A sonoquímica das "hot spots" (Suslick 1986).

Os efeitos sonoquímicos dos líquidos dependem essencialmente dos efeitos físicos do rápido aquecimento e arrefecimento causados pela implosão da cavidade. Por exemplo, quando Peter Riesz e os seus colaboradores do "National Câncer Institute" irradiaram água com ultra-sons provaram que o calor proveniente da implosão da cavidade decompõe a água (H_2O) em átomos radicalares extremamente reactivos de hidrogénio ($\text{H}\cdot$) e hidróxilo ($\text{OH}\cdot$) (eq. 1 na Figura 2-13).

Durante a fase de arrefecimento rápido os átomos radicalares de hidrogénio e hidróxilo recombina-se para formar peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e hidrogénio molecular (H_2). Se outros componentes são adicionados à água irradiada com ultra-sons, poderá ocorrer um grande número de reacções secundárias. Os compostos orgânicos são facilmente degradados neste ambiente e os compostos inorgânicos podem ser oxidados ou reduzidos (Suslick 1989).

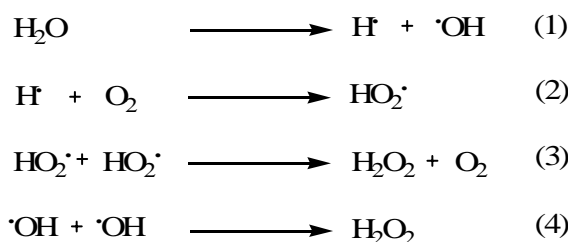


Figura 2-13: Equações simplificadas de radicais produzidos por sonificação (Mason *et al.* 1994).

O número de radicais formados depende da energia do sistema. A partir da monitorização dos radicais produzidos é possível prever uma estimativa da energia que entra no meio aquoso sonificado. Há diferentes métodos de monitorizar a produção destes radicais, aparecendo três como específicos na estimação das espécies radicalares, nomeadamente, a ressonância (Mason *et al.* 1994); o método de Fricke (Mason *et al.* 1994; Fang *et al.* 1996; Price e Lenz 1993) que consiste na oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} em meio ácido (eq. 5 na Figura 2-14). No entanto, esta oxidação não se deve somente aos radicais OH^\cdot , mas também aos radicais HO_2^\cdot (eq. 7 na Figura 2-14) e H^\cdot (eq. 6 na Figura 2-14) e ao peróxido de hidrogénio (eq. 8 na Figura 2-14). Deste modo, a estimativa da formação de radicais hidróxilo por ultra-sons não é fiável (Fang *et al.* 1996).

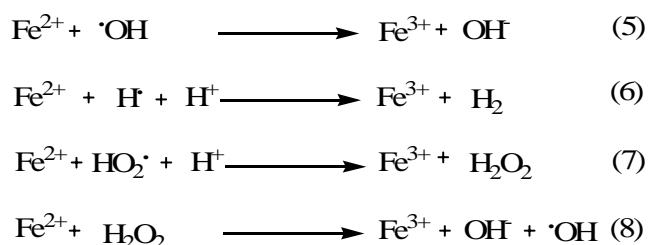


Figura 2-14: Determinação dos radicais formados pela sonificação através do método de Fricke (Fang *et al.* 1996).

Outro método possível é o método de quantificação fluorescente do ião hidroxitereftalato formado. O ácido tereftálico (TA) em meio alcalino dissocia-se em aniões tereftalatos, os quais reagem com os radicais OH^\cdot , formando iões 2-hidroxitereftalato (HTA) que apresentam fluorescência (Figura 2-15). Deste modo, a concentração de radicais pode ser estimada 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 (Fang *et al.* 1996) e é um método muito sensível para estimar a formação de radicais (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 comprimento de onda de emissão a 425 nm. (Mason *et al.* 1994; Price e Lenz 1993; Fang *et al.* 1996). A partir da curva de calibração da intensidade de fluorescência de soluções de concentração conhecida de 2-hidroxi-tereftalato, determina-se a concentração de radicais hidróxilo libertados aquando da cavitação.

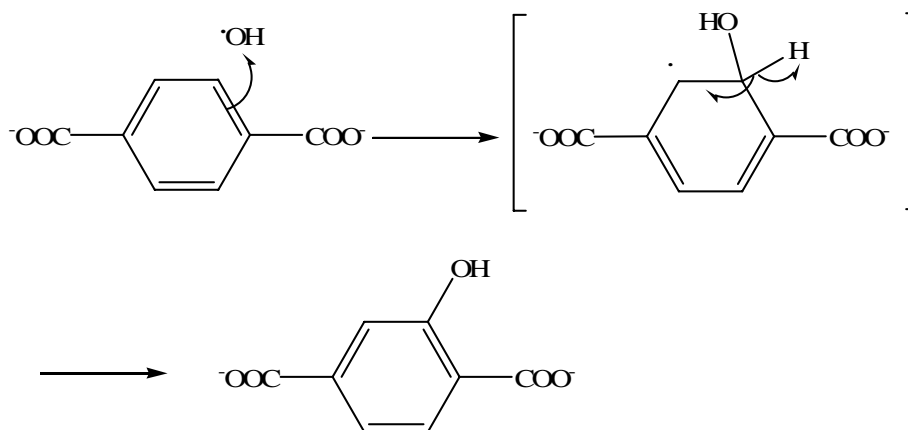


Figura 2-15: Mecanismo de formação do anião hidroxi-tereftalato (Mason *et al.* 1994).

Usando este método dosimétrico, é possível estudar vários parâmetros na eficiência da produção de radicais OH[·], nomeadamente, a intensidade, a frequência, a temperatura da reacção, a geometria do frasco onde ocorre a reacção, o tempo de sonificação e a concentração de ácido tereftálico usada.

- **Efeito do tempo de sonificação**

O tempo de sonificação é também evidente na determinação dos radicais pelo método fluorescente. Os valores de fluorescência obtidos, usando um frasco cónico (erlenmeyer) como recipiente para a reacção, aumentam com o aumento do tempo de sonificação (Mason *et al.* 1994).

- **Efeito da geometria do recipiente onde ocorre a reacção**

Foram realizados estudos do efeito das radiações de ultra-sons a 38 kHz em recipientes com diferentes geometrias: um frasco de fundo redondo e um erlenmeyer. Ao fim de uma hora foram efectuadas medidas de fluorescência, verificando-se que os valores obti-

dos eram mais altos para os ensaios realizados no frasco cónico (erlenmeyer) quando comparados com os recipientes de fundo redondo. Uma das explicações possíveis é o facto das bases de medição para energia e fluorescência serem diferentes. A energia absorvida é estabelecida calorimetricamente como a quantidade total de calor que entra na reacção, incluindo a transmitida como resultado do aquecimento das paredes de vidro de cada uma das geometrias. Por outro lado, a fluorescência é o resultado da geração de radicais HO \cdot que resultam do colapso da bolha. Enquanto a base do frasco cónico (erlenmeyer) permite uma transmissão directa da energia acústica na reacção, as curvas das paredes do frasco redondo desviam mais a energia acústica (Mason *et al.* 1994).

- **Efeito da concentração do ácido teraftálico (TA)**

A intensidade da fluorescência para uma determinada dosagem ultra-sónica é directamente proporcional à concentração de ácido tereftálico em solução. Segundo Mason e seus colaboradores, isto poderá ser relacionado com a grande probabilidade de reacção entre os radicais HO \cdot produzidos e o agente TA disponível em solução, e a reacção de colisão com outras espécies (Mason *et al.* 1994).

2.4.2. FACTORES QUE AFECTAM A CAVITAÇÃO QUÍMICA

A cavitação química é fortemente afectada por uma grande variedade de factores externos, incluindo a frequência acústica, a intensidade acústica, a temperatura do meio, a pressão estática, a escolha do gás, escolha do solvente, etc.. Estas são considerações importantes no uso efectivo de ultra-sons ou forças hidrodinâmicas que influenciam a reactividade química e são também facilmente entendidas em termos de mecanismos cavitacionais das "hot-spots" (Shah *et al.* 1999).

2.4.2.1. Intensidade Acústica

O aumento da intensidade acústica acarreta um aumento da pressão e da amplitude, provocando o rápido colapso da bolha. O aumento da amplitude da pressão torna instáveis as bolhas pequenas, contribuindo para a cavitação. O raio máximo da bolha aumenta proporcionalmente à amplitude da pressão e este é independente do tamanho inicial da bolha. Por isso, com o aumento da intensidade, aumenta também o número de bolhas de tamanho máximo, resultando num aumento da cavitação (Shah *et al.* 1999).

O método mais utilizado na determinação da intensidade (potência) introduzida no reactor sonoquímico é o método calorimétrico. Este consiste na medição do aumento da temperatura de um determinado volume (massa) de água conhecido, sujeito a sonificação, em intervalos de tempo regulares. Traça-se uma tangente à curva que representa o aumento da temperatura em função do tempo e obtém-se o declive (dT/dt) (Mason *et al.* 1994).

A potência (intensidade) é determinada pela seguinte equação $\text{potência} = (dT/dt)C_pM$, onde C_p é o calor específico da água ($J\ kg^{-1}\ K^{-1}$) e M é a massa da água (Kg) (Mason *et al.* 1994). A potência é expressa em Watts (W).

Mason e seus colaboradores mostraram a existência de uma proporcionalidade directa entre a formação de radicais hidróxilo e a intensidade (potência) introduzida no reactor, isto é, o aumento da intensidade está associado ao aumento da formação de radicais (Mason *et al.* 1994).

2.4.2.2. Frequência

A sonoquímica é dependente da frequência que se aplica, estando normalmente num intervalo de 20-100 kHz. Contudo, existe uma quantidade de informação considerável na sonoquímica que usa frequências mais altas (acima de 1 MHz) e que envolve também a cavitação (Suslick 1990).

Considerando, por exemplo, a geração de H_2O_2 durante a sonólise da água, o peróxido de hidrogénio é produzido como resultado de várias reacções radicalares (Figura 2-13) e pode ser estimado por vários métodos, mencionados anteriormente (Mason *et al.* 1994).

O valor óptimo da frequência depende das características do meio reaccional e das condições operativas do reactor. Petrier e seus colaboradores (1992) compararam a oxidação do iodeto de potássio (KI) a iodo e a formação de peróxido de hidrogénio em água, para 20 e 514 kHz às mesmas intensidades de ultra-sons (Petrier *et al.* 1992). A razão de formação de iodo num meio saturado de oxigénio ($KI\ 10^{-2}\ M$) foi cerca de seis vezes mais rápida e a formação de peróxido na água foi doze vezes mais rápida, para elevada frequência. Estes resultados são atribuídos à produção dos radicais $OH\cdot$ formados pela "quebra" da molécula de água aquando do colapso da bolha. Os radicais hidróxilo podem ser destruídos pelas reacções na bolha ou podem migrar para o líquido e originar peróxido de hidrogénio. Para a frequência alta, o tempo curto da bolha possibilita que mais radicais saiam da mesma. A eficiência de produção de radicais aumenta com o aumento da frequência (Shah *et al.* 1999).

Convém notar que a operacionalidade de um reactor é mais difícil quando este usa uma frequência acima dos 200 kHz. A operação contínua e em "grande escala" com elevadas frequências conduz a uma erosão da superfície do transdutor elevada, devido à ocorrência de um elevado número de eventos cavitacionais num intervalo de tempo muito reduzido (Colussi *et al.* 1999), quando comparada com a verificada para frequências mais baixas (Kumar *et al.* 2004). Além disso, a potência necessária para iniciar uma reacção aumenta com a frequência de irradiação e, conseqüentemente, determinado processo poderá não ser economicamente viável para elevadas frequências, devido ao facto de uma quantidade significativa de energia ser usada na formação de bolhas. A utilização de reactores com múltiplos transdutores de baixas frequências reduz a erosão da superfície dos transdutores, obtendo-se fenómenos de cavitação comparáveis para reactores que operam a uma frequência elevada (Tatake e Pandit 2002; Sivakumar *et al.* 2002).

2.4.2.3. Pressão externa

Quanto maior for a pressão externa, mais largo é o colapso da pressão e mais pequeno e menos violento é o colapso da bolha (Shah *et al.* 1999).

Um aumento na pressão estática: (1) diminui o conteúdo de gás na bolha; (2) aumenta a pressão máxima durante a fase final do colapso; (3) aumenta a temperatura durante a fase final do colapso; (4) provoca o aumento da erosão (erosão esta que depende da intensidade do choque da onda); (5) provoca o aumento possível da cavitação; (6) poderá ou não aumentar o rendimento das reacções químicas (Shah *et al.* 1999).

A velocidade das reacções químicas aumenta com o aumento da temperatura final e com a pressão associada à alta pressão estática (baixo conteúdo em gás). Contudo, o baixo conteúdo em gás também significa uma baixa concentração das moléculas de gás na bolha. Logo mais baixa é a velocidade de reacção, assim como o produto de reacção. Assim, dependendo da maior ou menor acção destes dois efeitos, a elevada pressão estática pode ou não aumentar o rendimento das reacções sonoquímicas (Shah *et al.* 1999). O rendimento sonoquímico como função de um aumento de pressão estática tem sido estudado por diferentes investigadores. Existem diferentes trabalhos efectuados, em que o aumento da pressão estática pode aumentar, diminuir, ou aumentar até um determinado valor e depois voltar a diminuir o rendimento das reacções sonoquímicas (Shah *et al.* 1999).

2.4.2.4. Propriedades do líquido

A água é um bom solvente para gases e outros solutos, uma vez que as moléculas de vapor de água dentro da cavitação da bolha são dissociadas em radicais atômicos de H e OH. Estes radicais servem muitas vezes como iniciadores para várias reacções químicas, como a formação de peróxido de hidrogénio, a libertação de dióxido de carbono da solução saturada de água-CO e ainda a oxidação do KI a iodo. Existem, contudo, outros exemplos ultra-sónicos que induzem a reacções químicas entre dois gases dissolvidos num meio aquoso (Shah *et al.* 1999).

A pressão de vapor do solvente tem uma profunda influência na cavitação química. Outras propriedades, como a tensão superficial e a viscosidade do líquido, influenciam também a cavitação, mas de uma forma menos intensa. A sonoquímica aquosa é dominada por reacções secundárias do OH[·] e H[·] formados na sonólise do vapor de água na zona de cavitação. Nenhum solvente é inerte a condições com altas temperaturas na cavitação (Shah *et al.* 1999).

2.4.2.5. Gases dissolvidos

As propriedades intrínsecas dos gases presentes no meio líquido, como a solubilidade, a condutividade térmica e o índice politrópico, influenciam os processos sonoquímicos. A temperatura máxima de reacção durante a cavitação depende da razão politrópica ($\gamma=C_p/C_v$, em que C_p é o calor específico a pressão constante, C_v é o calor específico a volume constante) dos gases, a qual define a quantidade de calor libertado durante a compressão adiabática desses gases. Os processos sonoquímicos são favorecidos na presença de gases com baixa condutividade térmica (Shah *et al.* 1999). Vários trabalhos mostram que a cavitação decresce com o aumento da solubilidade dos gases (Shah *et al.* 1999).

2.4.2.6. Efeito da temperatura

Na quantificação de radicais pelo método de fluorescência foi também efectuado o estudo da influência da temperatura. Os resultados mostram claramente que a sonificação a altas temperaturas diminui a emissão da fluorescência. O efeito da capacidade da temperatura em produzir radicais pode dever-se ao aumento da pressão de vapor do sistema. A temperatura máxima ($T_{max.}$) e a pressão máxima ($P_{max.}$) geradas no colapso da cavi-

ção acústica da bolha são reduzidas a altas temperaturas devido ao aumento da pressão de vapor no líquido (Mason *et al.* 1994).

As temperaturas baixas do meio reaccional favorecem a cavitação. As baixas temperaturas estão directamente relacionadas com a diminuição da tensão de vapor, aumentando a intensidade de cavitação (Shah *et al.* 1999).

2.4.3. APLICAÇÃO DOS ULTRA-SONS NA INDÚSTRIA TÊXTIL

Os processos industriais têxteis, como a lavagem, o tingimento, mercerização, branqueamento, etc., exigem grandes quantidades de energia e elevadas quantidades de água. Na maioria dos processos têxteis a molhado a difusão na amostra é dominada por mecanismos de transferência de massa.

A intensificação da transferência de massa é um parâmetro importante no aumento da eficiência de processos têxteis a molhado. Os métodos convencionais para intensificar a transferência de massa em têxteis, como, por exemplo, o aumento da temperatura, nem sempre são possíveis, devido à obtenção de alguns efeitos indesejados que danificam a amostra (Moholkar *et al.* 2003).

Nos últimos anos a intensidade ultra-sónica tem sido usada para aumentar a transferência de massa nos materiais têxteis. Imensas publicações surgiram com este objectivo, reportando o aumento da eficiência de energia e diminuição do tempo nos processos têxteis a molhado.

A sonificação do líquido origina dois efeitos, nomeadamente a cavitação e o aquecimento do líquido. Quando as bolhas microscópicas colapsam na superfície do substrato sólido, geram poderosas ondas de choque que provocam a agitação e a aproximação da "camada" de líquido ao substrato (Yachmanev 2004). Assim, o súbito colapso das bolhas origina um fenómeno de libertação de quantidades enormes de energia e formação de radicais livres que são capazes de aumentar um conjunto de processos físicos e químicos com um grande potencial nos processos industriais (Kamel 2005; Suslick e Grinstaff 1990).

Os vários estudos que abordam a aplicação de sistemas de ultra-sons nos processos a molhado na indústria têxtil apresentam benefícios consideráveis no que diz respeito ao consumo de químicos, de corantes e aceleração dos mesmos. Os ultra-sons permitem que os processos sejam realizados com menores quantidades de água, reduzindo desta forma a quantidade de efluentes (Vouters *et al.* 2004; Yachmanev *et al.* 2002).

2.4.4. EFEITO DOS ULTRA-SONS NAS ENZIMAS

Os processos enzimáticos, relativamente aos processos tradicionais, não necessitam de tanta energia nem de quantidades de água tão elevadas, reduzindo-se também o uso de produtos químicos. Em adição, as águas residuais provenientes dos tratamentos enzimáticos são bio-degradáveis. Assim, os processos enzimáticos oferecem muitas vantagens, existindo, no entanto, algumas desvantagens quando comparados com os métodos tradicionais, sendo normalmente mais caros e exibindo velocidades de reacção mais baixas. No entanto, a tecnologia ultra-sónica pode favorecer os processos enzimáticos, tornando-os mais curtos.

Suslick e seus colaboradores estudaram o efeito dos ultra-sons em proteínas como a albumina sérica de bovina (BSA) e hemoglobina, onde se formaram microesferas devido à ligação química dos “resíduos” de cisteína, oxidados pelos radicais produzidos durante a sonificação (Gong e Hart 1998; Suslick *et al.* 1995).

A formação de microesferas proteicas estáveis, por métodos sonoquímicos, foi também observada por Avivi e Gedanken obtendo-se óptimos resultados (Avivi e Gedanken 2002).

Os efeitos dos ultra-sons sobre as enzimas não são muito conhecidos e observam-se resultados contraditórios quando estas são tratadas a intensidades elevadas. Têm sido efectuados estudos referentes à influência das diferentes intensidades nas enzimas, verificando-se que as altas intensidades dos ultra-sons causam uma diminuição na actividade de muitas enzimas “*in vitro*”, sendo esta a possibilidade que se atribui à mudança na estrutura das moléculas biológicas. A baixa intensidade dos ultra-sons em alguns casos pode aumentar a actividade de enzimas livres (Entezari e Pétrier 2003).

De acordo com Guzey e seus colaboradores, somente algumas enzimas são desactivadas por aplicação de sistemas de ultra-sons a intensidades elevadas, visto que a sonificação não desnatura todas as proteínas, contrariamente à desnaturação pelo calor, podendo explicar as contradições no que diz respeito à desactivação das enzimas por sonificação (Guzey *et al.* 2005). Por exemplo, o tratamento a 20 kHz e várias potências (50, 100 e 120 W) não altera o “carácter” e a selectividade da protease alcalina da *B. Subtilis* no processo de transesterificação em solventes não aquosos (Xiao *et al.* 2005), mas, contrariamente, foi verificado um decréscimo significativo na actividade proteolítica após tratamento com ultra-sons a 26,4 kHz de frequência e 26 W/cm² de intensidade (Ovsianko *et al.* 2005). Por sua vez, De Gennaro verificou que a desactivação da “horseradish” pero-

xidase é muito pequena com o aumento da intensidade dos ultra-sons (De Gennaro *et al.* 1999).

A desactivação da dehidrogenase glucose-6-fosfato após uma longa exposição a ultra-sons foi verificada, contudo testes similares mostraram que fosfatase alcalina mantém-se totalmente activa (Özbek e Ülgen 2000). Observou-se também um aumento da actividade da invertase na hidrólise de açúcares e da fosfatase no solo com a sonificação (Barton *et al.* 1996; De Cesare *et al.* 2000).

A actividade da tripsina decresce com o aumento da intensidade de 100 para 500 W a 20 kHz, onde a adição de Tween 80 e manitol apresenta um efeito protector face à desactivação pelos ultra-sons (Tian *et al.* 2004). Mais recentemente, efectuaram-se estudos de estabilidade e capacidade de descolorização da lacase de *Trametes villosa* com a aplicação dos ultra-sons. Este estudo mostra que a descolorização com a enzima acima referida é mais eficaz com o uso de aditivos como o poli(álcool vinílico) (PVA), pois este tem um efeito estabilizador na enzima, aumentando consequentemente a eficiência na descolorização do corante em estudo (Basto *et al.* 2006).

2.4.5. APLICAÇÃO DOS ULTRA-SONS E ENZIMAS NA INDÚSTRIA TÊXTIL

A aplicação de enzimas na indústria têxtil conheceu um aumento nos últimos 20 anos (Sórup *et al.* 1998).

Os processos têxteis industriais são heterogéneos, onde o substrato são as fibras, que são insolúveis, e as enzimas que são solúveis, acarretando, por isso, um aumento considerável no tempo do processo devido às limitações do transporte de massa.

Quando as amostras são colocadas em solução enzimática, as moléculas de enzima, que são relativamente grandes, vão em direcção à amostra e são adsorvidas à superfície. Contudo, este processo poderá ser moroso devido ao tamanho da enzima. Esta volumosa molécula não se move em direcção à interface muito facilmente. A aplicação dos ultra-sons tem a capacidade de acelerar o transporte enzimático.

Os tratamentos enzimáticos utilizando enzimas, como as pectinases, as celulases, as proteases e as lipases, foram estudados (Tzanko *et al.* 2001) como alternativa à fervura alcalina convencional. Os melhores resultados foram obtidos com as pectinases, pois são capazes de despolimerizar as pectinas, quebrando-as em oligómeros solúveis em água, tornando o algodão mais hidrófilo sem o degradar. Por outro lado, as celulases acarretam perdas significativas de peso e tensão.

O branqueio é o passo seguinte à fervura alcalina. O peróxido de hidrogénio é o agente de branqueio mais utilizado, contudo este é doseado em excesso. Alternativamente, o peróxido poderá ser produzido "*in situ*" num sistema enzimático glucose oxidase/glucose (Tzanko *et al.* 2001).

As recentes aplicações dos ultra-sons na indústria têxtil são utilizados em conjunto com o tratamento enzimático. Os tratamentos enzimáticos são cada vez mais aplicados, devido à redução de utilização de químicos e pelo facto de se realizarem em condições "menos agressivas" (temperatura e pH). A combinação de sistemas de ultra-sons com tratamentos enzimáticos convencionais nos processos têxteis acarreta vantagens significativas, como a redução da quantidade de energia e de enzima (redução dos custos de operação), uniformidade no tratamento, redução dos tempos de tratamento, minimização dos danos na fibra (Yachmanev *et al.* 2002).

2.5. POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Recentemente a polimerização enzimática tem ganho uma importância considerável como um novo método de síntese polimérica. Os novos materiais poliméricos, que são difíceis de obter pelos métodos convencionais, podem ser preparados usando um método amigo do ambiente através da aplicação de enzimas. As condições das reacções e altos rendimentos são outras das vantagens da utilização de enzimas na polimerização.

Existe uma grande variedade de enzimas que, para além de se aplicarem na transformação de substratos naturais, podem também ser úteis na transformação de compostos não naturais, aumentando o uso e a variedade destes materiais.

2.5.1. POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE FENÓIS

O progresso na ciência polimérica tem sido evidente com a invenção de uma nova classe de polímeros. Os polímeros são produzidos através da modificação química de biopolímeros, ou através da polimerização de monómeros com novas sínteses via aplicação de novas catálises. A polimerização oxidativa de compostos aromáticos, via catálise enzimática, tem sido estudada devido às preocupações ambientais, como, por exemplo, a aplicação de enzimas peroxidase. Estas enzimas oxidam os compostos aromáticos, para formarem radicais aromáticos que, por sua vez, combinam-se entre si para formarem estruturas poliméricas que precipitam espontaneamente em solução, devido à sua baixa solubilidade (Aktas e Tanyolaç 2003).

Para a polimerização de monómeros fenólicos no tratamento de águas residuais, a "horseradish" peroxidase (HRP) foi extensamente utilizada na presença de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Estudos efectuados por Wu e seus colaboradores mostram que a presença do poli(etilenoglicol) (PEG) aumenta a estabilização desta. A presença destes compostos, para além de aumentar o tempo de vida de enzimas mais dispendiosas, aumenta também o potencial económico do processo enzimático (Entezari e Pétrier 2004). Contudo, torna-se vantajoso substituir a "horseradish" peroxidase pela lacase uma vez que substitui o peróxido de hidrogénio pelo oxigénio dissolvido (Aktas e Tanyolaç 2003).

A capacidade das lacases na polimerização, na ligação e na funcionalização de vários compostos foi extensivamente estudada e aumentou o interesse na aplicação destas enzimas como bio-catalizador na síntese orgânica (Gianfreda *et al.* 2003; Aktas e Tanyolaç 2003). As lacases (EC 1.10.3.2), como já foi mencionado no ponto 2.3., são enzimas da classe de oxi-redutases, capazes de catalisar a transformação de vários compostos aromáticos, especificamente fenóis e anilinas. Os derivados fenólicos originados na agregação polimérica são normalmente menos solúveis e mais estáveis que os compostos de origem (Mayer e Staples 2002). A capacidade que a lacase possui para sintetizar novos compostos também pode ser usada na obtenção de "coating" químico e modificação da superfície das fibras. Estas características são extremamente úteis na indústria têxtil, devido à possibilidade de novos métodos de coloração através da aplicação da tecnologia enzimática.

Como já foi referido anteriormente, as enzimas oxi-redutase HRP e a lacase são muito úteis na síntese de polímeros fenólicos. Um radical livre na posição hidróxilo nos compostos fenólicos é formado pela oxidação enzimática da HRP ou lacase. Este radical move-se ao longo do anel aromático, contribuindo para o acoplamento entre as unidades monoméricas.

A Figura 2-16 mostra um esquema simplificado do mecanismo de reacção da polimerização enzimática. Uma reacção similar é obtida usando como enzima a lacase (Shin *et al.* 2001).

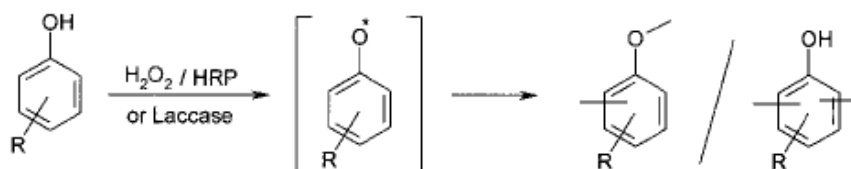


Figura 2-16: Mecanismo de polimerização enzimática de compostos fenólicos (Shin *et al.* 2001).

Muitas polimerizações enzimáticas de compostos fenólicos tendem a ter cor, pois o poli(fenol) forma grandes estruturas conjugadas ao longo da cadeia principal. A hidroquinona é também um composto fenólico que mostra a mudança de cor quando é oxidado com oxi-redutases. A lacase cataliza a oxidação da hidroquinona produzindo radicais livres oxidados nos intermediários oxidados. A coloração de produtos dímeros, oligómeros e polímeros resulta da reacção de acoplamento radicalar entre os intermediários. Este fenómeno é interessante, pois pode obter-se facilmente uma coloração a partir de reacções enzimáticas, substituindo o tingimento convencional de fibras têxteis (Shin *et al.* 2001).

Têm sido realizados vários estudos no que se refere ao "coating" de fibras têxteis com fenóis. Uma das fibras alvo é a lã, devido à possibilidade de formar ligações covalentes com os compostos fenólicos, promovendo assim uma maior durabilidade. No entanto, o algodão é uma das fibras têxteis mais utilizadas mundialmente. Daí um interesse acrescido de se obter "coating" desta fibra com compostos poliméricos sintetizados através de catálise enzimática.

É necessário, por vezes, funcionalizar a celulose de forma a obter grupos amina na superfície da fibra (Chhagani e Shenai 2000) para que seja possível formar uma ligação covalente. Estes grupos amina podem ser obtidos através de corantes com cromóforo azo. Efectuou-se recentemente um estudo de polimerização do catecol na superfície de fibras celulósicas modificadas. Para tal, foi utilizado o corante Reactive Black 5 (RB5) para a obtenção de fibras celulósicas funcionalizadas. Este é um corante reactivo, com cromóforo azo, barato, sendo um dos mais usados na indústria têxtil. Este corante é ligado covalentemente à fibra de celulose através de reacções de adição nucleofílicas, recorrendo-se em seguida a uma redução química de forma a obter os grupos amina funcionais, devido à quebra das ligações azo (Figura 2-17). Estes grupos amina presentes na celulose formam ligações covalentes com os anéis aromáticos do poli(catecol) (Figura 2-18).

Estas reacções foram confirmadas através da análise por Liquid Chromatography/Mass Spectroscopy (LC/MS), (Kim *et al.* 2006).

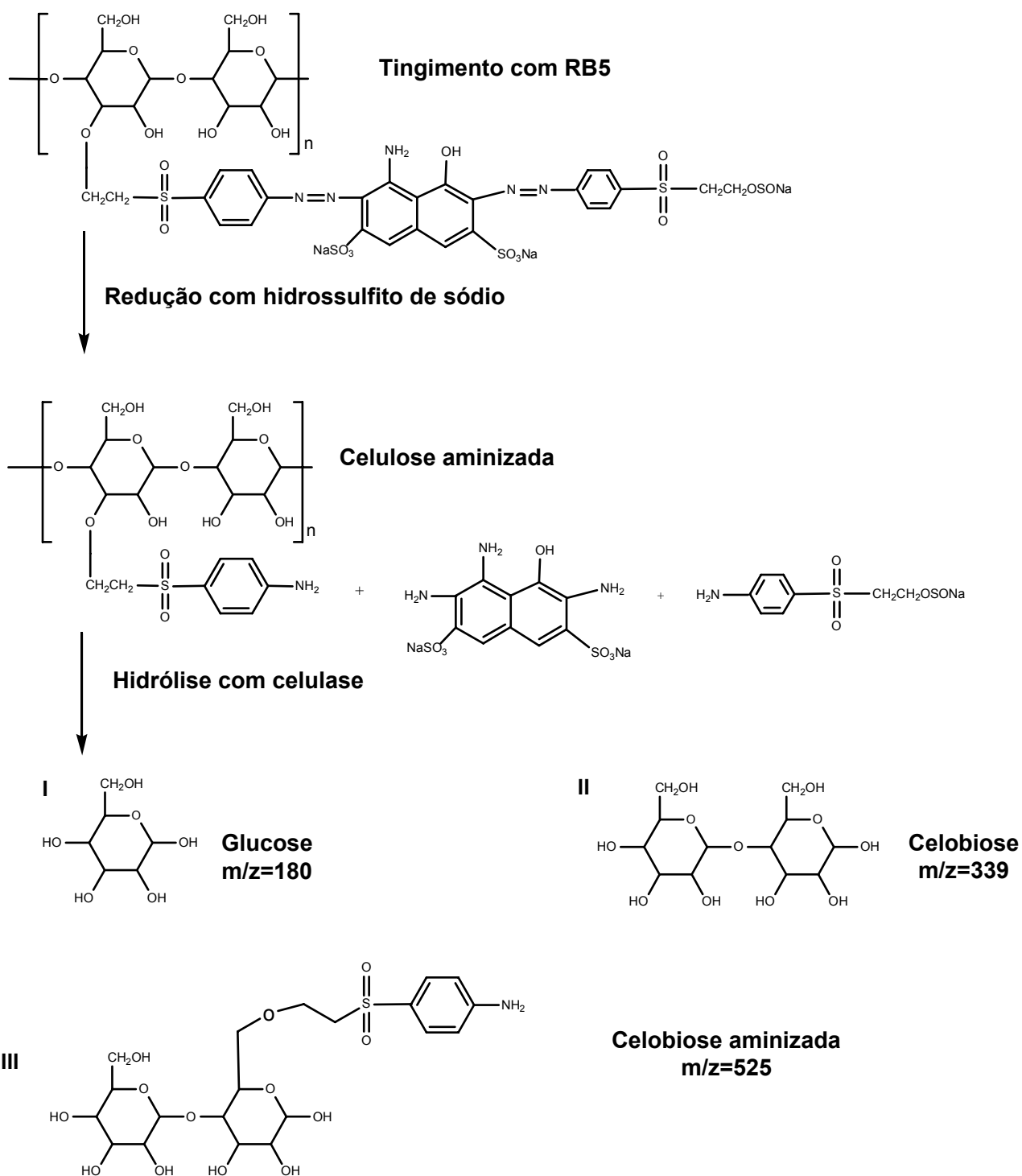


Figura 2-17: Mecanismo de redução química para a celulose funcionalizada e identificação por espectroscopia de massa, após hidrólise com celulase através da análise por LC/MS (Kim *et al.* 2006).

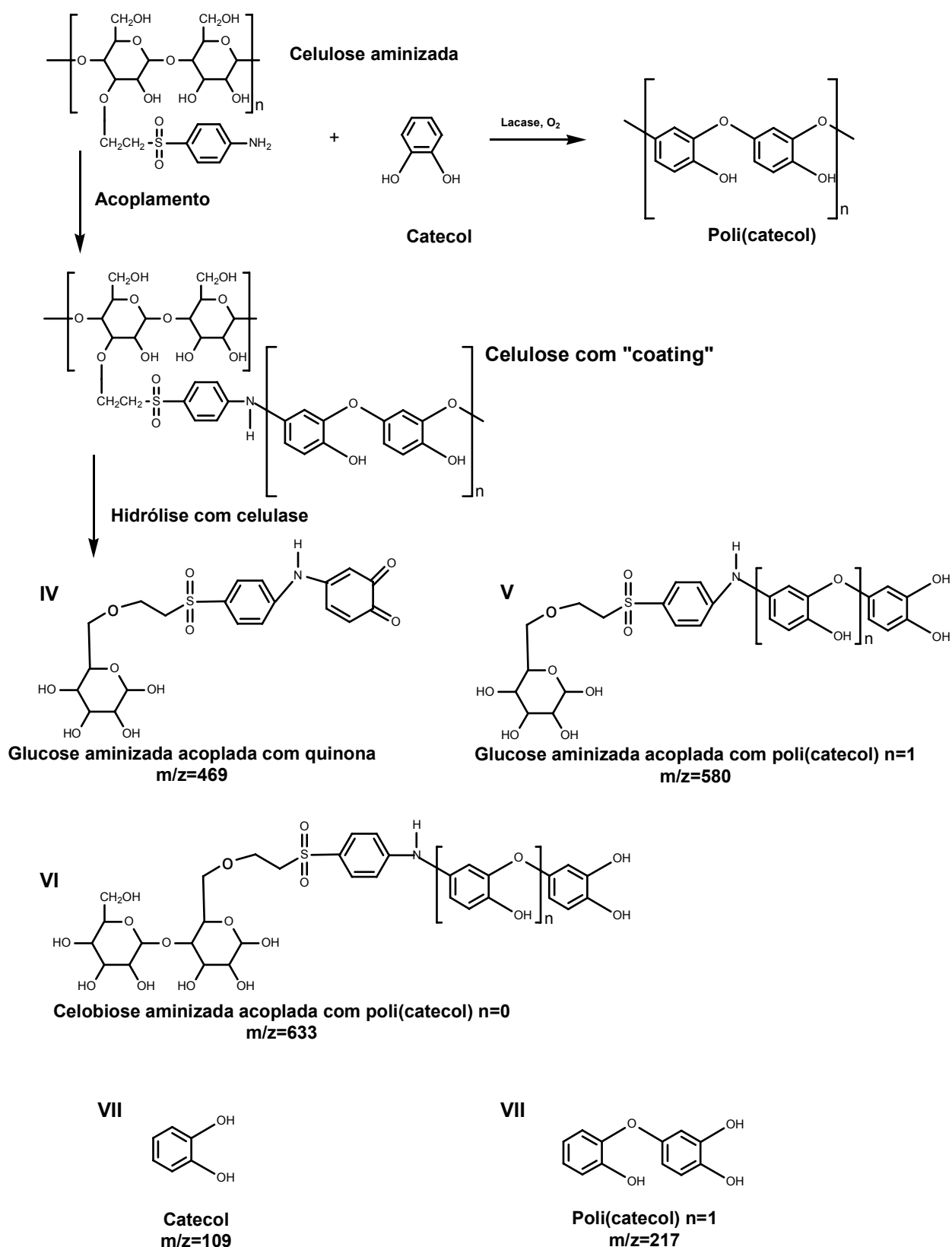


Figura 2-18: Mecanismo da reação de acoplamento entre a celulose aminizada e o poli(catecol), usando como catalizador a lacase. Identificação por espectroscopia de massa, após hidrólise com celulase através da análise por LC/MS (Kim *et al.* 2006).

A análise por LC/MS confirma a funcionalização das fibras de celulose e o acoplamento entre a síntese enzimática do poli(catecol) e a aminização das fibras de celulose.

O processo de "coating" enzimático, obtido a temperaturas relativamente baixas e com a utilização de uma menor quantidade de água, pode ser aplicado a imensos substratos naturais e parece ser uma tecnologia ambiental alternativa.

2.5.2. POLIMERIZAÇÃO SONO-ENZIMÁTICA

A maior parte de polímeros orgânicos são preparados a partir de monómeros, contendo ligações duplas reactivas (monómeros de α -olefinas e vinílicos), através de reacções de adição. O método preparativo mais importante é a iniciação radicalar. Como já foi referido, o fenómeno de cavitação pode produzir altas concentrações de radicais. Por exemplo, a aplicação de ultra-sons a monómeros vinílicos promovem uma alternativa de um método altamente controlável à iniciação (Suslick e Price 1999).

A água é susceptível à cavitação, gerando sonoquimicamente radicais $H\cdot$ e $HO\cdot$, sendo estes usados por Henglein na preparação do poli(acrilonitrilo) em solução aquosa (Suslick e Price 1999).

A "primeira regra" dos ultra-sons neste tipo de reacção (reacção de adição radicalar) é a produção de radicais que são necessários para iniciar a polimerização. A produção de radicais poderá ser de duas formas: sonificação de monómeros puros produzidos pela decomposição de radicais dentro da bolha ou à superfície, ou, alternativamente a decomposição pode ser acelerada através da adição de iniciadores como o peróxido ou os compostos azo. Controlando as condições, como a temperatura, a pressão de vapor do solvente e a intensidade ultra-sónica, poder-se-á controlar a velocidade de iniciação (Suslick e Price 1999).

Foram efectuados estudos no que se refere à medição das constantes envolvidas na velocidade de polimerização. A velocidade de iniciação é proporcional ao número de cavidades formadas, que dependem, por sua vez, da intensidade ultra-sónica (Suslick e Price 1999).

As reacções de terminação na polimerização, devido há existência de reacções biomoleculares radicalares, não dependem fortemente da temperatura. Aqui, a adição do monómero ao crescimento da cadeia é controlado por difusão onde será esperado um aumento de temperatura. Os resultados experimentais sugerem que os ultra-sons tenham um pequeno efeito relativo nas reacções de propagação e terminação, quando compara-

das com as reacções de iniciação (Suslick e Price 1999). Esta conclusão é também suportada por alguns trabalhos publicados em copolimerização, em que dois ou mais monómeros diferentes podem ser incorporados na mesma cadeia polimérica. Se os ultra-sons afectam a propagação, serão esperadas diferenças nas sequências dos dois monómeros ao longo da cadeia (Suslick e Price 1999).

Os polímeros vinílicos são uma importante classe de materiais, existindo também uma grande variedade de outros compostos que são polimerizados por outros mecanismos. Talvez um grupo maior que este que é a polimerização por condensação. Esta polimerização dá origem a um grande número de importantes polímeros e plásticos industriais (por exemplo: poli(ésteres) e poli(uretanos)) preparados por reacções de condensação (Suslick e Price 1999). Assim, podemos afirmar que a aplicação dos ultra-sons é extremamente importante e vantajosa na polimerização de compostos orgânicos, podendo também melhorar o rendimento da polimerização enzimática.

Como foi referido no ponto anterior, existe um enorme interesse na aplicação de enzimas oxi-redutases como bio-catalizadores de sínteses orgânicas, nomeadamente na polimerização de fenóis. No entanto, as enzimas mais utilizadas na catálise enzimática de fenóis são as lacases e as HRP. Contudo, torna-se vantajoso a aplicação da lacase em relação à HRP, uma vez que substitui o peróxido de hidrogénio pelo oxigénio dissolvido (Aktas e Tanyolaç 2003).

Infelizmente, o tempo catalítico relativamente curto da lacase nos processos de polimerização e a limitação na transferência de massa restringem essas aplicações. Para ultrapassar essas limitações, o uso de ultra-sons em condições adequadas mostra um aumento significativo na transferência de massa (Cruz *et al.* 2006).

O sistema de ultra-sons, sozinho ou em combinação, é usado para aumentar uma grande variedade de processos químicos e físicos, principalmente devido ao fenómeno tão conhecido da cavitação no meio líquido, que é o crescimento e colapso explosivo das bolhas microscópicas. Estas "hot spot" localizadas dão origem a locais de alta temperatura e pressão, capazes de decompor a água a radicais hidróxilo, quebrando imensas ligações químicas.

Um dos fenóis utilizados na polimerização enzimática para a obtenção de coloração de fibras é o catecol, obtendo-se como produto final da reacção o poli(catecol) (Figura 2-19).

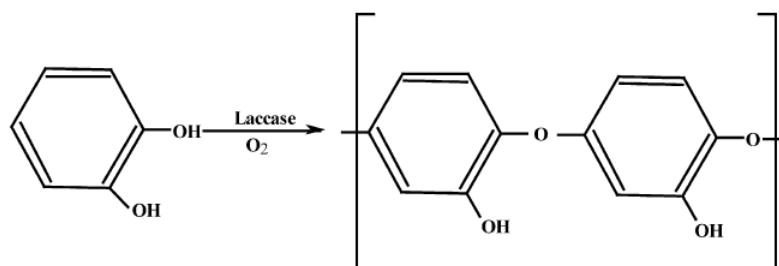


Figura 2-19: Mecanismo químico proposto para a obtenção do poli(catecol) catalizado pela lacase (Aktas e Tanyolaç 2003).

Esta coloração poderá ser obtida com um maior grau de fixação nas fibras têxteis através do uso dos ultra-sons.

3. DESCRIÇÃO DO TRABALHO EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAL

3.1.1. REAGENTES

Tabela 3-1: Reagentes utilizados no trabalho experimental

| Reagente | Formula química | Pureza (%) | Marca |
|---|---|------------|----------|
| Cloreto de sódio | NaCl | 99,5 | Merck |
| Carbonato de sódio | Na ₂ CO ₃ | 99,5 | Merck |
| Hidróxido de sódio | NaOH | 98 | Merck |
| Hostapal | - | - | Clariant |
| Ácido acético | CH ₃ COOH | 100 | Merck |
| Catecol | C ₆ H ₆ O ₂ | 99 | Sigma |
| Hidrossulfito de sódio | Na ₂ S ₂ O ₄ | 84,5 | Sigma |
| Poli(álcool vinílico) (PVA) MW=30,000- 70,000 | $\left(\begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} \right)_n$ | - | Sigma |

Tabela 3-2: Corantes utilizados no trabalho experimental

| Grupo reactivo | Nome Colour Índex (C.I.) | Nome comercial | Fornecedor |
|---|-----------------------------|-----------------------------|------------|
| Vinilsulfónico (monofuncional) | 61200 | Remazol Brilliant Blue R | Sigma |
| Vinilsulfónico (bifuncional) | 5 | Reactive Black 5 | Sigma |
| Monoclorotriazina e vinilsulfó- nico (bifuncional) | 221 | Azul Sumifix Supra | Aquitex |

3.1.2. ENZIMA

Tabela 3-3: Propriedades da enzima utilizada

| Enzima | pH óptimo | Temperatura óptima (°C) | Concentração de Proteína (mg/mL) | Fornecedor |
|-----------------------------------|-----------|-------------------------|----------------------------------|---|
| Lacase de <i>Trametes hirsuta</i> | 4,5 | 50 | 693 | Universidade Tecnológica de Graz, Áustria |

3.1.3. SUBSTRATOS

Nos tratamentos efectuados com ultra-sons utilizaram-se dois substratos diferentes, o algodão e a lã.

Tabela 3-4: Características dos substratos têxteis utilizados

| | Algodão | Lã |
|-------------------------------------|--------------|---------|
| Composição | 100% Algodão | 100% Lã |
| Debuxo | Tafetá | Cetim |
| Nº de fios/cm | 32 | 26 |
| Nº de passagens/cm | 34 | 20 |
| Peso específico (g/m ²) | 108 | 189 |

3.2. EQUIPAMENTO

3.2.1. ULTRA-SONS

O esquema experimental comporta o gerador eléctrico de frequência de 20 kHz, cuja potência de ultra-sons varia de 7 a 100 W promovida por um transdutor piezoeléctrico (Sonics & Materials, USA) com um diâmetro de 13 mm. As reacções foram efectuadas num reactor de vidro aberto (diâmetro de 60 mm e altura de 200 mm) que contém 150 mL de solução. O reactor sonoquímico foi termoestativado por arrefecimento com jacto de água de forma a obter a temperatura constante a 50 °C.

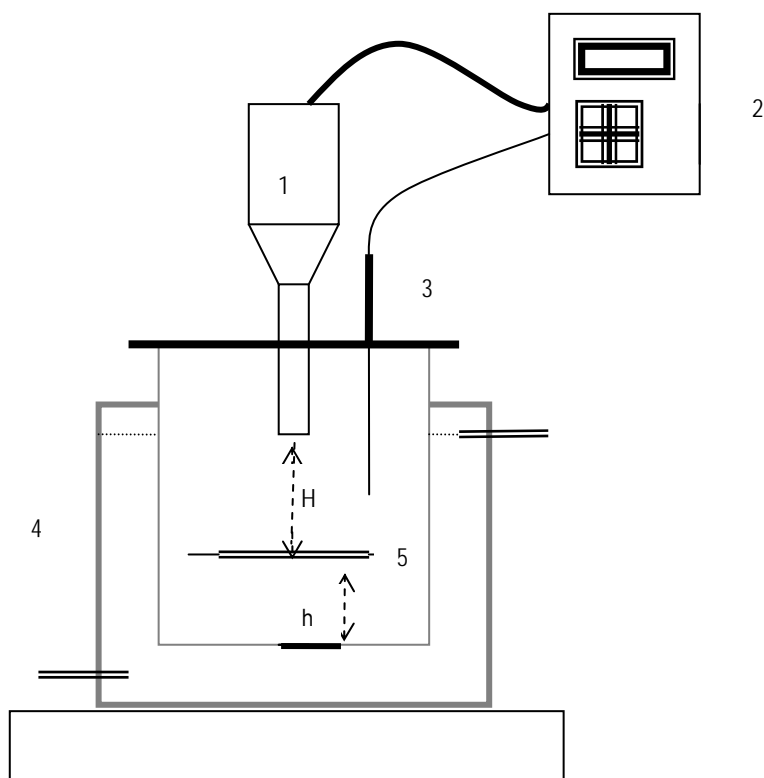


Figura 3-1: Esquema experimental dos ultra-sons.

(1) Transdutor; (2) Gerador ultra-sónico; (3) Sensor da temperatura; (4) Reactor termoestativado e hermeticamente selado; (5) Amostra; (H) Distância entre a amostra e o transdutor; (h) Distância da base do reactor de vidro à amostra.

3.2.2. LINITEST

É um equipamento que permite a realização de tingimentos por esgotamento, assim como de ensaios normalizados de lavagem. Este aparelho possui (Linitest Heraeus 1997):

- Controlador analógico de tempo e de temperatura;
- Frequência de rotação 40 rpm;
- Capacidade para 12 copos de aço inoxidável de 300 mL de volume;
- Temperatura máxima de 135 °C;
- Precisão de ± 1 °C.

3.2.3. ESPECTROFOTÓMETRO DE REFLEXÃO

O espectrofotómetro utilizado é da marca Data Color, modelo Spectra Flash 600 Plus. Este equipamento possui as seguintes características técnicas (Spectraflash 600 plus Data Color International 1997):

- Gamas de comprimentos de onda: 360 a 700 nm;
- Intervalo de medição: 10 nm;
- Fonte de luz: flash de xénon filtrada para aproximadamente D_{65} ;
- Reprodutibilidade: $\Delta E < 0,25$ (média); $\Delta E < 0,24$ (máximo);
- Repetibilidade $\Delta E = 0,01$.

3.2.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

A técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) é essencialmente um método de separação em que os componentes de uma mistura são desigualmente distribuídos por duas fases: uma estacionária (sólida ou líquida, neste caso aderente a um suporte sólido poroso), com grande área superficial, e outra móvel líquida que contacta com a primeira. A separação resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pelo solvente móvel devido às diferentes interações com a fase estacionária (Kats *et al.* 1998).

O sistema de HPLC utiliza a pressão gerada por uma bomba, para forçar a fase móvel a passar pelo sistema até ao detector, passando pela coluna cromatográfica que contém

um empacotamento específico, capaz de separar os diferentes componentes da amostra a diferentes velocidades de migração (Kats *et al.* 1998).

Os detectores usados com mais frequência para analisar a fase móvel que emerge da coluna são: o detector de absorção de radiação ultravioleta e visível, o detector de fluorescência, o detector de índice de refração e os detectores electroquímicos (Rosen 1982).

A Figura 3-2 mostra o diagrama de um sistema de HPLC que exhibe os seus principais componentes. O eluente atravessa a coluna sob pressão e este não é inerte relativamente à fase estacionária e à amostra, havendo interacção entre a fase móvel e os componentes da amostra. A separação dos componentes da amostra é influenciada pelas interacções entre a fase móvel e os vários solutos (Rosen 1982).

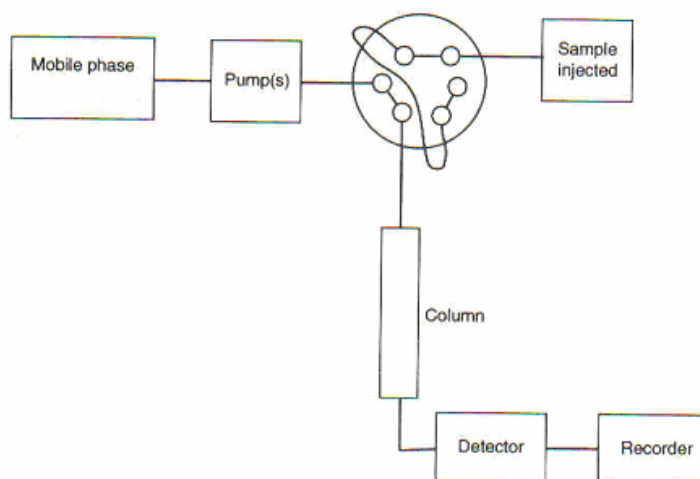


Figura 3-2: Sistema de HPLC com os seus principais componentes (Rosen 1982).

A informação obtida de um ensaio cromatográfico é dada num cromatograma, isto é, num registo da concentração ou da massa dos componentes da amostra em função do tempo ou do volume de fase móvel. Obtém-se uma informação qualitativa com base na posição dos picos, e uma informação quantitativa com base no valor do integral da variação da concentração do componente em função do tempo (área do pico ou intensidade da mancha) e ainda uma indicação do estado de conservação do sistema cromatográfico (Rosen 1982).

O cromatograma seguinte (Figura 3-3) ilustra os parâmetros mais importantes que caracterizam uma separação.

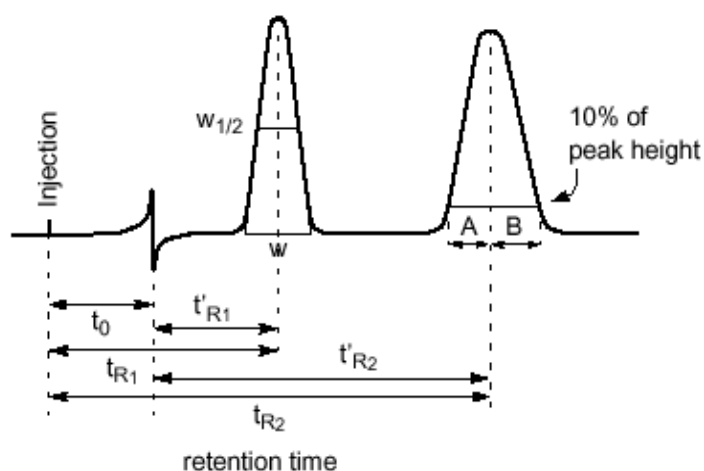


Figura 3-3: Exemplo de uma curva obtida de um cromatograma (Rosen 1982).

onde:

$w_{1/2}$ = largura do pico a metade da altura;

w = largura da banda do pico;

t_0 = tempo morto da coluna - tempo correspondente à eluição da fase móvel;

t_{R1}, t_{R2} = tempo de retenção dos compostos 1 e 2.

Existem portanto vários tipos de cromatografia que se distinguem quanto ao estado da sua fase móvel e da fase estacionária. Em HPLC a fase móvel é um líquido e a fase estacionária tanto pode ser líquida (Cromatografia Líquido-Líquido) como pode ser sólida, e neste caso podemos ter vários tipos de cromatografia:

- Cromatografia Sólido Líquido (adsorção);
- Cromatografia Troca Iónica;
- Cromatografia Permeação Gel (GPC- Gel Permeation Chromatography).

A Cromatografia Permeação Gel (GPC) foi a técnica utilizada neste estudo. As proteínas ou polímeros serão separados de acordo com as diferenças nos seus tamanhos, ou, mais precisamente, no seu volume hidrodinâmico. Quando se injecta uma solução de polímero, o solvente leva a amostra através da coluna. As moléculas mais pequenas na amostra têm fácil acesso aos poros da matriz polimérica. Entram e saem nos poros, seguindo um "circuito" à medida que passam através da coluna e ficam mais tempo retidas. As moléculas maiores simplesmente não cabem nos poros e passam directamente na coluna, ficando muito pouco tempo retidas (Kats *et al.* 1998).

Deste modo é obtida uma separação na qual as grandes moléculas são eluídas primeiro, seguidas das moléculas cada vez mais pequenas. Podemos, portanto, definir para as colunas de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) um limite de exclusão, um limite de permeação e ainda uma zona útil de separação, medidos em Dalton (Kats *et al.* 1998.).

3.2.5. ESPECTROFOTÓMETRO DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADAS DE FOURIER (FT-IR) COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)

Características técnicas do espectrofotómetro utilizado (Miranda 2001):

- Nicolet-Avatar 360;
- 32 Varrimentos min^{-1} ;
- Resolução 4 cm^{-1} ;
- Software OMNIC 5.2 da Nicolet.

3.2.6. OUTROS EQUIPAMENTOS

Na medição do pH utilizou-se um medidor de pH modelo pH 526 Multical. Foram também utilizadas placas de agitação com aquecimento e balança analítica.

3.3. METODOLOGIAS

3.3.1. TINGIMENTO DAS AMOSTRAS DE ALGODÃO

Tingiram-se as amostras de algodão com três corantes reactivos diferentes, de forma a verificar as diferenças nos tratamentos sono-enzimáticos posteriores.

Efectuaram-se diferentes tingimentos com corantes reactivos de acordo com as condições descritas nos respectivos catálogos.

- **Estrutura dos corantes utilizados**

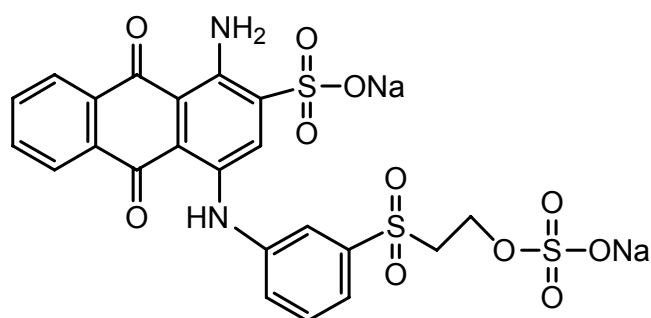


Figura 3-4: Estrutura do corante Remazol Brilliant Blue R.

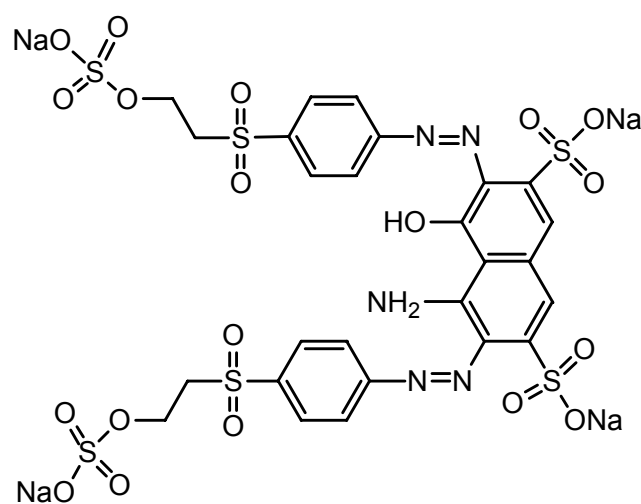


Figura 3-5: Estrutura do corante reactivo Black 5.

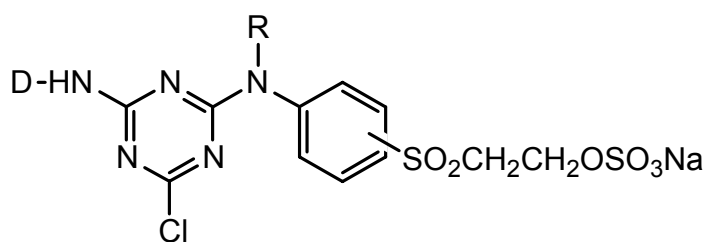


Figura 3-6: Estrutura do corante reactivo Azul Sumifix Supra.

3.3.2. FUNCIONALIZAÇÃO DA CELULOSE

A aminização da celulose pode ser preparada a partir da reacção da amostra de algodão com o corante diazo vinilsulfona, seguido por uma redução do grupo azo a grupo amina.

A celulose funcionalizada foi obtida através de um tratamento redutivo. O tratamento redutivo foi efectuado nas amostras de algodão tingido com o corante reactivo RB5. A escolha foi feita devido ao seu baixo custo e pelo facto de ser um dos corantes mais utilizados na indústria têxtil.

O tratamento redutivo foi efectuado com 8 g/L de hidrossulfito de sódio, a uma temperatura de 70 °C durante duas horas de forma a obter-se os grupos funcionais amina na superfície da celulose. Lavaram-se as fibras funcionalizadas com 2,5 g/L de detergente Hostapal durante 30 minutos à ebulição. O mecanismo da reacção de redução da celulose com hidrossulfito de sódio está representado na Figura 2-17 (Kim *et al.* 2006).

3.3.3. POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Obteve-se a polimerização enzimática através de tratamentos efectuados com ultra-sons e sob agitação mecânica, numa solução enzimática preparada em tampão apropriado com a adição de catecol (monómero), durante um determinado período de tempo.

Os tratamentos efectuaram-se a uma temperatura de 50 °C, pois esta é a temperatura óptima da lacase. Para a obtenção da polimerização utilizou-se uma solução tampão de acetato de sódio com uma concentração de 0,1 M a pH 5.

Nos ensaios efectuados com substratos, utilizaram-se amostras de celulose e de lã com o peso de 1 g. No tratamento com ultra-sons, a distância entre a amostra e o transdutor foi de 1 cm.

A dosagem enzimática, o tempo de tratamento, a intensidade (nos tratamentos com ultra-sons), a velocidade de agitação (nos tratamentos efectuados na placa de agitação) e a concentração de monómero são especificados para experiências individuais (capítulo 4).

No final de cada tratamento, enxaguaram-se as amostras em água corrente da torneira, sendo posteriormente lavadas com água destilada. Após o enxaguamento, colocaram-se as amostras a secar à temperatura ambiente.

3.3.4. DETERMINAÇÃO DA DIFERENÇA DE COR

A diferença de cor das amostras em estudo foi determinada através do espectrofotómetro de reflexão Spectraflash 600 (Data Color), de acordo com o conceito de diferença de cor da CIELab. Efectuaram-se as leituras com o iluminante D₆₅ a 10 °C e com especular incluída.

A medição da diferença de cor permite também avaliar a eficácia do tratamento, pois sumariza o valor total da diferença de cor (ΔE^*). Este valor pode ser uma forma de obter o grau qualitativo da polimerização enzimática.

3.3.5. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DA POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Para avaliação da resistência da polimerização obtida pelos diferentes métodos, realizaram-se ensaios de solidez à lavagem baseados na Norma Portuguesa NP EN ISO 105-C06: Solidez dos Tintos à Lavagem Doméstica e Industrial.

O teste de solidez à lavagem consiste na lavagem de um provete têxtil em contacto com o testemunho de multifibras sob agitação mecânica, numa solução de detergente normalizado e nas condições indicadas, seguindo-se o enxaguamento e a secagem. Posteriormente, é feita a avaliação da cor do provete e do manchamento. A alteração da cor do provete e do manchamento dos tecidos de testemunho pode ser avaliada em ambos os processos com o auxílio da escala de cinzentos. A escala de cinzentos na solidez à lavagem é escalonada de 1 (muito baixa) a 5 (muito alta). Neste estudo, procedeu-se à avaliação instrumental através do espectrofotómetro de reflexão (mencionado no ponto 3.2.3).

O banho de lavagem foi composto por uma solução de 4 g/L de detergente de referência ECE, sendo o valor de pH de $10,5 \pm 0,1$. Os testes foram realizados em copos individuais no equipamento Linitest, com 150 mL de solução à temperatura de 40 °C durante 30 minutos, parâmetros recomendados pela norma.

3.3.6. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

Preparou-se a curva de calibração para a análise por HPLC do poli(catecol) a partir dos seguintes padrões: amilase (200 kDa); álcool desidrogenase (150 kDa); albumina sérica de bovina (66 kDa); anidrase carbónica (29 kDa); aprotinina (6,5 kDa).

Na análise dos tratamentos de polimerização de catecol com lacase sem substrato, as amostras após tratamento com ultra-sons foram colocadas na estufa a 60 °C até uma total evaporação. Em seguida, dissolveu-se o sólido em água destilada e filtrou-se sob vácuo. Por fim, pesou-se 0,005 g do filtrado e dissolveu-se em 2,5 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,5 M (Guerra *et al.* 2003).

Determinou-se a distribuição do peso molecular por cromatografia de exclusão de tamanho numa coluna apropriada. Foi utilizada uma coluna SEC (Size-Exclusion Chromatography) Nucleogel GFC 300-8 (diâmetro interno de 7,7 mm, 300 mm de altura; volume de 14 mL). Esta coluna é considerada para a separação de polímeros e proteínas, para fins analíticos ou para purificação de proteínas ou polímeros hidrofílicos. Os diferentes tamanhos dos poros permitem separações de compostos com um peso molecular inferior a 10⁵ Dalton. Podem ser usados solventes orgânicos (modifiers) desde 0 a 100%. A separação óptima para polissacáridos/dextranos: 100-100000 Da. Valores de pH suportados: 1-13. Máximo de sal suportado: 8 M. Pressão máxima: 15 bar. Fluxo máximo: 10 mL/min.

A detecção dos picos no HPLC efectuou-se com um detector UV a um comprimento de onda de 280 nm através do espectrofotómetro Knauer K-2501. A distribuição dos pesos moleculares foi determinada através do método cromatográfico de exclusão de tamanho (GPC- Gel Permeation Chromatography), usando as colunas Nucleogel GFC eluída com tampão fosfato (50 mM KH₂PO₄, 100 mM KCl e pH 6,5) a um fluxo de 0,3 mL/min.

3.3.7. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADAS DE FOURIER (FT-IR) COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR)

O método FT-IR (Fourier Transform Infrared) com ATR (Attenuation Total Reflection) é uma poderosa ferramenta na caracterização e identificação de moléculas orgânicas. Usando o espectro de infravermelho, podem identificar-se as ligações químicas e a estrutura molecular dos compostos orgânicos. A interpretação dos resultados é feita com base em valores de absorção tabelados (Dias 2002).

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. POLIMERIZAÇÃO DO CATECOL EM AMOSTRAS DE ALGODÃO

4.1.1. TRATAMENTO COM ALGODÃO TINGIDO

Neste trabalho foi estudado o tratamento combinado da utilização da lacase de *Trametes hirsuta* com ultra-sons para promover a polimerização radicalar do catecol. Foram efectuados estudos em amostras de algodão tingidas com diferentes corantes reactivos, de forma a verificarmos a sua influência na polimerização do catecol, nomeadamente:

- Algodão tingido com corante Azul Sumifix Supra (ASS);
- Algodão tingido com corante Reactivo Black 5 (RB5);
- Algodão tingido com corante Remazol Brillant Blue R (RBBR);
- Algodão branqueado (Co).

Os ensaios foram realizados nas mesmas condições. Os resultados dos tratamentos com ultra-sons foram comparados com os tratamentos efectuados com agitação. Nos tratamentos efectuados com ultra-sons, foi aplicada uma potência de 50 W. Por sua vez, a velocidade de agitação utilizada foi de 800 rpm. Os restantes parâmetros mantiveram-se constantes e encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 4-1: Condições dos tratamentos efectuados com ultra-sons para as amostras de algodão tingidas

| Catecol (mM) | Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Temperatura (°C) | Tempo (min.) |
|--------------|---------------------------------------|------------------|--------------|
| 2 | 0,67 | 50 | 60 |

Nos gráficos que se seguem apresentam-se os valores de ΔE^* como grau de polimerização indirecto, em função das diferentes amostras de algodão tingido e algodão branqueado.

Pela análise do gráfico (Gráfico 4-1), verifica-se que a diferença de cor aumenta quando o tratamento é efectuado com ultra-sons.

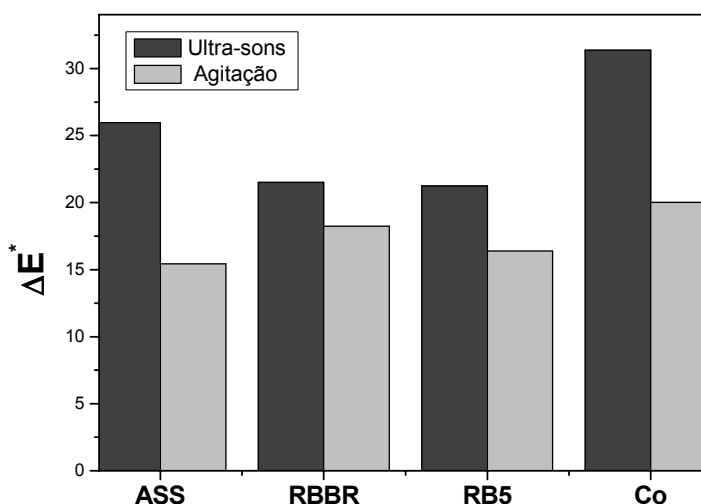






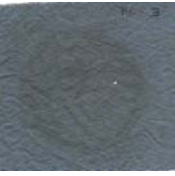







Gráfico 4-1: Valores da diferença de cor para as diferentes amostras de algodão tingido e branqueado após tratamento com 2 mM de catecol e 0,67 U/mL de lacase a 50°C, durante 60 min..

A amostra de algodão branqueado apresenta um valor de ΔE^* mais elevado quando comparada com as restantes amostras de algodão tingido. Este resultado poderá ser devido às moléculas de corante que provocam um efeito estérico. O corante é uma molécula relativamente grande que poderá diminuir a afinidade com o polímero formado.

Através da visualização das imagens (Tabela 4-2), verifica-se que as amostras apresentam uma coloração castanha. Esta coloração é devida ao tratamento enzimático com catecol.

No entanto, nas amostras tratadas com ultra-sons verifica-se uma coloração muito mais definida, quando comparadas com as amostras tratadas com agitação mecânica, comprovando os valores de diferença de cor obtidos. O resultado obtido deve-se principalmente pela capacidade que os ultra-sons possuem em provocar uma maior eficiência na polimerização do catecol em presença da lacase. Um dos principais problemas da aplicação de enzimas em processos têxteis é o facto de serem processos heterogéneos, em que as fibras estão no estado sólido e as enzimas se encontram no estado líquido. Consequentemente, os processos têxteis enzimáticos são lentos, devido principalmente a problemas de transferência de massa. A aplicação de ultra-sons nestes processos é capaz de promover um aumento significativo na transferência de massa, aumentando deste modo as velocidades de catálise das enzimas e, por consequência, a polimerização.

Tabela 4-2: Imagem das amostras de algodão tingido antes e após tratamento

| Corante | Grupo reactivo | Amostra antes do tratamento | Amostra após tratamento com ultra-sons | Amostra após tratamento com agitação |
|--------------------------|--|--|---|--|
| Azul Sumifix Supra | Bifuncional (monoclorotriazina e vinilsulfónico) |  |  |  |
| Reactive Black 5 | Bifuncional (dois grupos vinilsulfónico) |  |  |  |
| Remazol Brilliant Blue R | Monofuncional (vinilsulfónico) |  |  |  |
| Algodão branqueado | - |  |  |  |

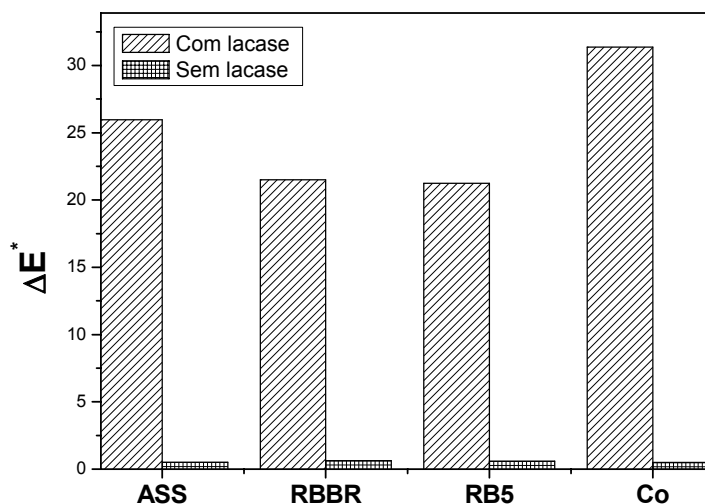


Gráfico 4-2: Influência da lacase na polimerização com ultra-sons.

Analisando o Gráfico 4-2, verifica-se a importância da lacase na polimerização, no tratamento efectuado com ultra-sons. Para as amostras de algodão tingido com diferentes

corantes, assim como para a amostra de algodão branqueado, verifica-se que sem lacase não ocorre polimerização, pois os ultra-sons só por si não conseguem promover a polimerização do catecol. A polimerização "in situ" promove uma coloração castanha nas amostras de algodão tingido, facto que não se verifica nos tratamentos realizados sem lacase. Resultados similares verificam-se nas amostras de algodão tingido com diferentes corantes, quando tratadas com agitação mecânica (Gráfico 4-3).

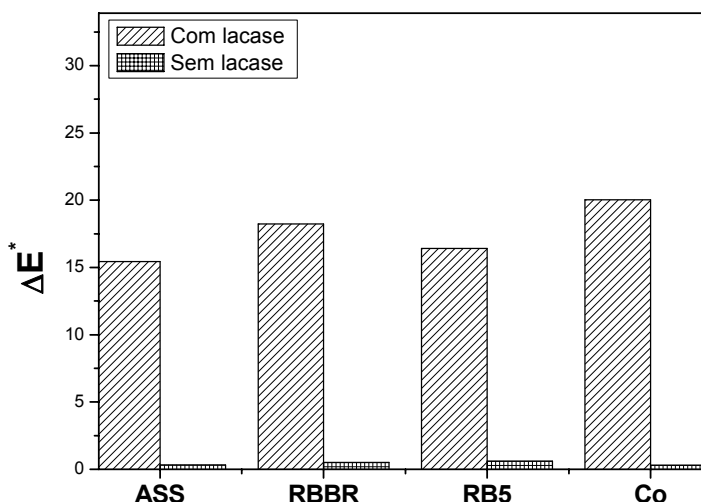


Gráfico 4-3: Influência da lacase na polimerização com agitação mecânica.

Posteriormente, as amostras polimerizadas foram submetidas ao teste de solidez à lavagem, de forma a verificar-se a sua resistência. O teste de solidez à lavagem foi efectuado de acordo com a norma internacional ISO 105:C06 A1S.

Tabela 4-3: Valores de alteração da cor após lavagem para os diferentes tratamentos

| Amostra | Alteração da cor (ultra-sons) | | Alteração da cor (agitação) | |
|---------|-------------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | ΔE* | ISOA05 | ΔE* | ISOA05 |
| ASS | 2,348 | 3-4 | 4,29 | 2-3 |
| RBBR | 2,901 | 3-4 | 4,11 | 2-3 |
| RB5 | 2,393 | 3-4 | 4,18 | 2-3 |
| Co | 10,874 | 1-2 | 12,603 | 1 |

A partir da Tabela 4-3 verifica-se que as amostras polimerizadas com ultra-sons apresentam uma maior resistência à lavagem, quando comparadas com a solidez das amostras tratadas com agitação mecânica.

Este resultado é provavelmente devido ao efeito dos ultra-sons que promovem uma maior transferência de massa, aumentando assim a polimerização do poli(catecol).

Verifica-se também que a amostra de algodão branqueado, em ambos os tratamentos, apresenta uma menor resistência à lavagem do que as amostras de algodão tingido.

Tabela 4-4: Valores do manchamento após lavagem para os diferentes tratamentos

| Amostra | Manchamento (ultra-sons) | | Manchamento (agitação) | |
|---------|--------------------------|--------|------------------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 |
| ASS | 1,421 | 4-5 | 1,543 | 4-5 |
| RBBR | 0,883 | 5 | 1,322 | 4-5 |
| RB5 | 1,521 | 4-5 | 1,575 | 4-5 |
| Co | 1,687 | 4-5 | 2,004 | 4-5 |

Os valores de manchamento apresentam uma baixa variância, no que se refere aos tratamentos efectuados com ultra-sons e agitação (Tabela 4-4). A diferença mais significativa é visível na amostra de algodão branqueado.

4.1.2. TRATAMENTO COM ALGODÃO FUNCIONALIZADO

Após o estudo nas amostras de algodão tingido com diferentes corantes, foram efectuados estudos em amostras de algodão funcionalizado. A funcionalização do algodão foi obtida de acordo com as condições descritas previamente. Como controlo foram efectuados tratamentos em amostras de algodão tingido com o corante reactivo black 5 e em amostras de algodão branqueado. Nos gráficos que se seguem apresentam-se os valores de ΔE^* como grau de polimerização indirecto, em função das diferentes amostras de algodão tingido e algodão branqueado.

Neste estudo, o corante RB5 foi ligado covalentemente às fibras celulósicas por uma reacção de adição nucleofílica, sendo depois quimicamente reduzido para obter grupos amina na superfície da fibra, obtendo-se então o algodão funcionalizado. Durante o pro-

cesso de redução foi verificada a descolorização das fibras, devido à ruptura das ligações azo e a consequente formação de grupos amina.

Nos gráficos, para os diferentes estudos, que se apresentam a seguir, encontram-se as amostras de algodão funcionalizado (Co funcionalizado), algodão tingido com corante reactivo black 5 (RB5) e algodão branqueado (Co).

4.1.2.1. Efeito da concentração de lacase

Este estudo consistiu na determinação da concentração de lacase adequada para a obtenção da polimerização "in situ" nas diferentes amostras de algodão. Para tal, foram efectuados vários tratamentos com diferentes concentrações de lacase, através da aplicação de ultra-sons ou sob agitação mecânica.

As condições para os diferentes estudos da concentração de lacase com aplicação de ultra-sons e sob agitação mecânica estão sumarizados nas tabelas que se encontram a seguir (Tabelas 4-5 e 4-6).

Tabela 4-5: Condições dos diferentes tratamentos efectuados com ultra-sons

| Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Frequência (KHz) | Potência (W) | Catecol (mM) | Temperatura (°C) | Tempo (min.) |
|---------------------------------------|------------------|--------------|--------------|------------------|--------------|
| 0,033 | 20 | 50 | 2 | 50 | 60 |
| 0,067 | | | | | |
| 0,20 | | | | | |
| 0,40 | | | | | |
| 0,67 | | | | | |

Tabela 4-6: Condições dos diferentes tratamentos efectuados sob agitação mecânica.

| Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Velocidade de Agitação (rpm) | Catecol (mM) | Temperatura (°C) | Tempo (min.) |
|---------------------------------------|------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| 0,033 | 800 | 2 | 50 | 60 |
| 0,067 | | | | |
| 0,20 | | | | |
| 0,40 | | | | |
| 0,67 | | | | |

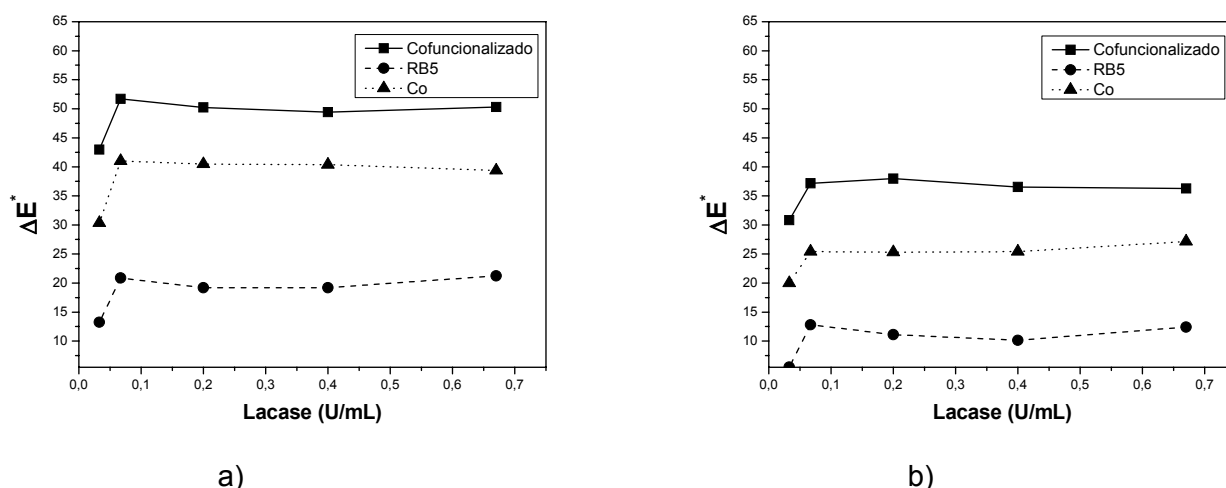


Gráfico 4-4: Variação da diferença de cor com as diferentes concentrações de lacase através da aplicação: a) ultra-sons (20 kHz de frequência, 50 W de potência, 2 mM de catecol a 50 °C durante 60 min.); e b) agitação mecânica (800 rpm, 2 mM de catecol a 50 °C durante 60 min.).

A partir do Gráfico 4-4 verifica-se que a diferença de cor é mais acentuada para as amostras de algodão funcionalizado (Co funcionalizado). Este facto deve-se à presença de grupos amina na superfície da fibra, possibilitando uma maior eficiência na polimerização. Consequentemente, verifica-se um aumento no grau de polimerização. Estes grupos amina possibilitam a formação de ligações covalentes com os anéis aromáticos do polímero de catecol.

As amostras de algodão branqueado (Co) também apresentam valores de diferença de cor elevados, sendo estes inferiores às amostras de algodão funcionalizado, mas superior às amostras de algodão tingido com RB5. Este resultado poderá ser devido ao efeito estérico que o corante provoca, o que diminui a sua capacidade de polimerização na amostra de algodão tingido.

Verifica-se também que com 0,033 U/mL de lacase a polimerização não é tão acentuada, resultado que se observa nas diferentes amostras de algodão, o que indica que esta concentração de enzima poderá não ser suficiente para promover a polimerização radical sonoenzimática. Assim, para uma polimerização "in situ" a quantidade de lacase deverá ser superior a 0,033 U/mL.

Analisando o Gráfico 4-4 b), verifica-se também uma diminuição dos valores da diferença de cor, quando comparados com os tratamentos efectuados com ultra-sons (a) do Gráfico 4-4). Este resultado deve-se ao aumento de transferência de massa nos processos realizados com ultra-sons.

Após os tratamentos com diferentes concentrações de lacase com sistemas de ultra-sons ou sob agitação mecânica, realizaram-se testes de solidez à lavagem, de acordo com as condições previamente descritas.

Tabela 4-7: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes concentrações de lacase

| Lacase <i>Trametes</i> <i>hirsuta</i> (U/mL) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|---|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 |
| 0,033 | 2,117 | 4-3 | 2,687 | 3-4 | 10,674 | 1-2 |
| 0,067 | 2,152 | 4-3 | 2,818 | 3-4 | 10,682 | 1-2 |
| 0,20 | 2,144 | 4-3 | 2,821 | 3-4 | 10,212 | 1-2 |
| 0,40 | 2,491 | 4-3 | 2,630 | 3-4 | 10,087 | 1-2 |
| 0,67 | 2,396 | 4-3 | 2,793 | 3-4 | 10,874 | 1-2 |

Tabela 4-8: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes concentrações de lacase

| Lacase <i>Trametes</i> <i>hirsuta</i> (U/mL) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|---|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 |
| 0,033 | 4,085 | 3 | 4,761 | 2-3 | 12,299 | 1 |
| 0,067 | 4,103 | 3 | 4,621 | 2-3 | 11,674 | 1 |
| 0,20 | 4,112 | 3 | 4,669 | 2-3 | 12,001 | 1 |
| 0,40 | 4,002 | 3 | 4,598 | 2-3 | 12,733 | 1 |
| 0,67 | 3,003 | 3 | 4,180 | 2-3 | 12,603 | 1 |

A partir das tabelas (Tabelas 4-7 e 4-8), verifica-se que a resistência da polimerização à lavagem depende do tipo de tratamento e do material adsorvente. A partir dos resultados obtidos para a alteração da cor após lavagem (Tabelas 4-7 e 4-8), verificam-se diferenças significativas nas diferentes amostras de algodão.

Os resultados de alteração da cor para as amostras de algodão branqueado, tratado com ultra-sons ou sob agitação mecânica, apresentam uma solidez à lavagem bastante fraca, atingindo mesmo a escala mais baixa (1). No entanto, como foi possível verificar no Gráfico 4-4, as amostras de algodão branqueado tratado apresentam uma diferença de cor (diferença entre a amostra submetida a tratamento e a amostra sem tratamento) bastante significativa. Conclui-se, portanto, que a cor obtida a partir da reação do catecol com lacase não tem durabilidade suficiente para resistir à lavagem, perdendo grande parte da sua coloração castanha. Este resultado deve-se provavelmente às fracas ligações que se estabelecem entre o polímero formado e o algodão branqueado, que não conseguem resistir às condições de lavagem.

As amostras de algodão funcionalizado são as que apresentam índices de solidez à lavagem mais elevados, devido às possíveis ligações covalentes entre os grupos amina e os anéis aromáticos do polímero.

As amostras de algodão tingido com RB5 apresentam valores de alteração de cor médios. No entanto, é de salientar que estas amostras após tratamento com ultra-sons ou sob agitação mecânica não apresentavam uma coloração castanha tão intensa como as amostras de algodão funcionalizado ou algodão branqueado. A coloração que estas amostras possuíam era pouco atenuada, o que se pode verificar pelos valores de ΔE^* do Gráfico 4-4. O polímero de catecol estabeleceu provavelmente ligações fracas com a fibra, pelo que no ensaio de solidez à lavagem perderam a maior parte da cor castanha que possuíam. Mas como a cor castanha antes da lavagem não era muito intensa, o valor de alteração de cor após lavagem não foi muito elevado porque havia pouco polímero de catecol para lhe resistir o que explica os resultados obtidos.

Analisando estes resultados, verifica-se que os tratamentos efectuados com ultra-sons (a) do Gráfico 4-4) apresentam uma maior resistência à lavagem. Estes resultados comprovam uma maior fixação do poli(catecol) nas amostras e, como consequência, uma cor castanha mais intensa.

Nas tabelas que se seguem encontram-se os valores de manchamento para os tratamentos efectuados com ultra-sons e sob agitação mecânica (Tabelas 4-9 e 4-10).

Tabela 4-9: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes concentrações de lacase

| Lacase <i>Trametes</i> <i>hirsuta</i> (U/mL) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|---|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 |
| 0,033 | 1,121 | 5 | 1,294 | 5 | 1,283 | 5 |
| 0,067 | 1,094 | 5 | 1,098 | 5 | 1,258 | 5 |
| 0,20 | 1,084 | 5 | 0,992 | 5 | 1,139 | 5 |
| 0,40 | 1,056 | 5 | 1,230 | 5 | 1,226 | 5 |
| 0,67 | 1,205 | 5 | 1,321 | 5 | 1,387 | 5 |

Tabela 4-10: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes concentrações de lacase

| Lacase <i>Trametes</i> <i>hirsuta</i> (U/mL) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|---|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 |
| 0,033 | 1,248 | 5 | 1,394 | 5 | 1,290 | 5 |
| 0,067 | 1,217 | 5 | 1,243 | 5 | 1,116 | 5 |
| 0,20 | 1,148 | 5 | 1,167 | 5 | 1,725 | 4-5 |
| 0,40 | 1,284 | 5 | 1,031 | 5 | 1,859 | 4-5 |
| 0,67 | 1,145 | 5 | 1,575 | 4-5 | 2,004 | 4-5 |

No que se refere aos valores de manchamento (Tabelas 4-9 e 4-10), a amostra de algodão funcionalizado é a que apresenta valores mais elevados, não se verificando diferenças após lavagem. As restantes amostras de algodão apresentam também boa solidez à lavagem, no que diz respeito ao manchamento. As diferentes amostras de algodão tratado após lavagem não apresentam grandes diferenças entre si. No entanto, os tratamentos efectuados sob agitação mecânica apresentam índices de manchamento ligeiramente mais baixos.

4.1.2.2. Estudo da influência da potência nos tratamentos efectuados com ultra-sons

A sonificação de líquidos causa normalmente dois efeitos primários: a cavitação e o aquecimento. Quando as bolhas macroscópicas da cavitação colapsam à superfície do substrato sólido, criam uma onda de choque forte, causando um efeito efectivo de agitação/mistura que se adapta à camada do líquido. Contudo, o súbito colapso destas bolhas induz a elevados fenómenos energéticos e produz radicais livres reactivos que são capazes de incrementar uma grande variedade de processos químicos e físicos, com bastantes potencialidades.

Desta forma, foi efectuado um estudo com ultra-sons aplicando diferentes potências, para ser possível estabelecer uma relação entre a polimerização e a potência aplicada (W).

Tabela 4-11: Condições dos diferentes tratamentos efectuados com ultra-sons

| Potência (W) | Frequência (kHz) | Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Catecol (mM) | Temperatura (°C) | Tempo (min.) |
|--------------|------------------|---------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| 10 | 20 | 0,067 | 2 | 50 | 60 |
| 20 | | | | | |
| 30 | | | | | |
| 50 | | | | | |

Os resultados dos diferentes tratamentos apresentam-se no gráfico que se segue (Gráfico 4-5).

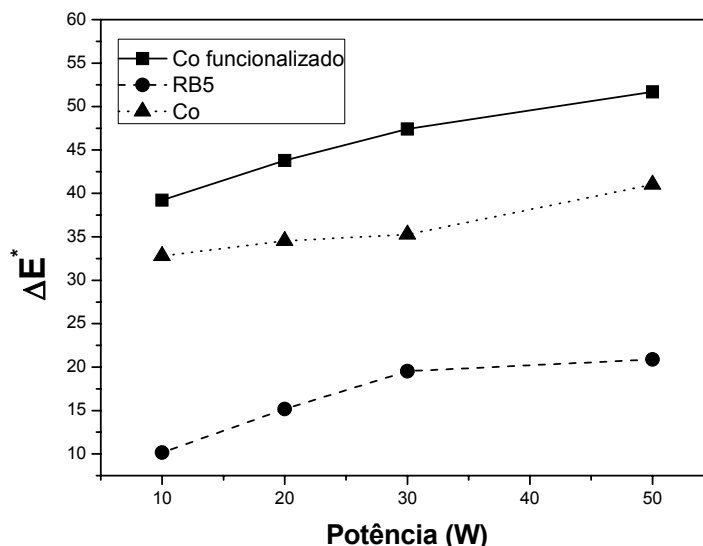


Gráfico 4-5: Variação da diferença de cor com as diferentes potências após tratamento com ultra-sons (20 kHz de frequência, 0,067 U/mL de lacase, 2 mM catecol a 50 °C durante 60 min.).

Analisando os resultados obtidos (Gráfico 4-5), verifica-se um aumento dos valores de ΔE^* com o aumento da intensidade (potência) de ultra-sons. Tal resultado deve-se, provavelmente, ao aumento do número de bolhas com maior tamanho, resultando num aumento do fenómeno de cavitação. O aumento do fenómeno de cavitação provoca um maior número de radicais formados.

Neste tipo de reacção de polimerização é essencial a produção de radicais, que são necessários para iniciar a polimerização. Logo, se a intensidade aumenta, aumenta o fenómeno de cavitação que, por sua vez, aumenta a produção de radicais, aumentando assim a polimerização do catecol na presença da lacase.

Na presença da lacase, a polimerização do catecol pode ser aumentada até um máximo de 50 W, pois para altas intensidades (potências) a actividade da lacase diminui tão rapidamente que os produtos enzimáticos podem não ser formados eficientemente, limitando a acção dos radicais hidróxilo (Basto *et al.* 2006).

Comparando os valores de ΔE^* para as diferentes amostras de algodão (Gráfico 4-5), verifica-se que o algodão funcionalizado apresenta valores bastante mais altos que as restantes amostras. Como já foi referido anteriormente, esta diferença deve-se à presença de grupos amina no algodão e à possibilidade desses mesmos grupos formarem ligações covalentes com o polímero de catecol.

Realizaram-se também testes de solidez à lavagem para as diferentes amostras de algodão, tratadas com diferentes potências.

Na Tabela 4-12 apresentam-se os valores de alteração da cor obtidos após o teste de solidez à lavagem. Analisando os resultados obtidos, verifica-se que o algodão branqueado e o algodão tingido com RB5 apresentam níveis de solidez à lavagem mais baixos do que o algodão funcionalizado.

No caso do algodão funcionalizado, estes níveis de solidez devem-se, como já foi referido, à obtenção de uma polimerização mais eficiente, devido à presença de grupos funcionais que facilitam a ligação covalente do polímero à fibra de algodão, sendo assim mais resistente às lavagens.

Tabela 4-12: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes potências

| Potência (W) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|-----------------|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 |
| 10 | 2,883 | 3-4 | 3,612 | 3 | 9,228 | 1-2 |
| 20 | 3,248 | 3-4 | 3,600 | 3 | 9,367 | 1-2 |
| 30 | 3,116 | 3-4 | 3,865 | 3 | 9,945 | 1-2 |
| 50 | 2,152 | 4-3 | 2,818 | 3-4 | 10,682 | 1-2 |

Os valores de manchamento (Tabela 4-13) que se obtiveram para este tipo de tratamento apresentam uma grande solidez.

Tabela 4-13: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos com ultra-sons com diferentes potências

| Potência (W) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|--------------|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 |
| 10 | 1,030 | 5 | 1,105 | 5 | 1,793 | 4-5 |
| 20 | 1,073 | 5 | 1,175 | 5 | 1,408 | 4-5 |
| 30 | 1,002 | 5 | 1,219 | 5 | 1,370 | 4-5 |
| 50 | 1,094 | 5 | 1,098 | 5 | 1,258 | 5 |

4.1.2.3. Estudo da velocidade de agitação nos tratamentos efectuados com agitação mecânica

É conhecido o potencial das lacases para a obtenção de polímeros. Foi realizado um estudo com diferentes velocidades de agitação para verificar a importância da velocidade de agitação no fenómeno de polimerização.

Na Tabela 4-14 apresentam-se as diferentes condições de tratamento aplicadas neste estudo.

Tabela 4-14: Condições dos diferentes tratamentos efectuados sob agitação mecânica

| Velocidade de Agitação (rpm) | Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Catecol (mM) | Temperatura (°C) | Tempo (min.) |
|------------------------------|---------------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| 400 | 0,067 | 2 | 50 | 60 |
| 800 | | | | |
| 1600 | | | | |

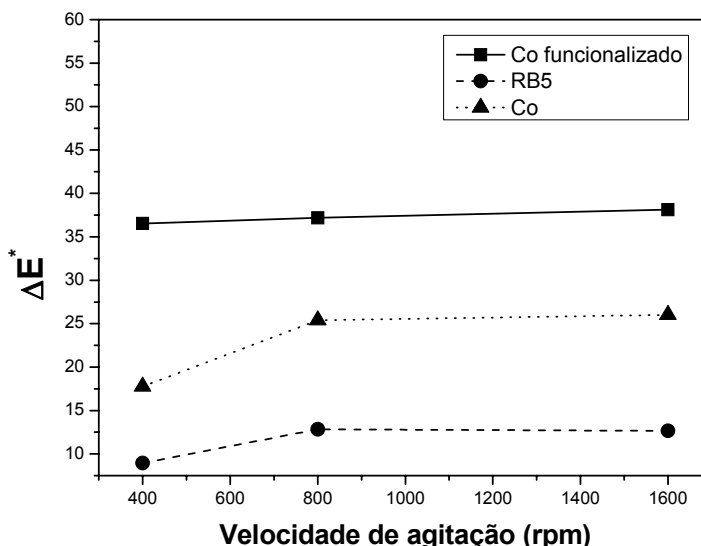


Gráfico 4-6: Variação da diferença de cor com as diferentes velocidades de agitação após tratamento sob agitação (0,067 U/mL de lacase, 2 mM catecol a 50 °C durante 60 min.).

A partir dos resultados obtidos para a diferença de cor (Gráfico 4-6), verifica-se que não há um aumento de polimerização a partir dos 800 rpm, uma vez que os valores de diferença de cor para todas as amostras de algodão mantêm-se constantes quando são efectuados à velocidade de 800 ou 1600 rpm.

A solidez à lavagem efectuou-se de acordo com a norma previamente mencionada.

Nas tabelas que constam a seguir, encontram-se os valores de alteração de cor (Tabela 4-15) e manchamento (Tabela 4-16).

Na tabela referente aos valores de alteração da cor após lavagem (Tabela 4-15), verifica-se que as amostras de algodão branqueado apresentam uma fraca solidez à lavagem, pois os seus valores de diferença de cor são muito altos, o que demonstra a saída da coloração castanha obtida no tratamento.

O algodão funcionalizado é o que apresenta melhores níveis de solidez à lavagem, pelas razões mencionadas anteriormente.

Tabela 4-15: Valores de alteração da cor após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes velocidades de agitação

| Velocidade de agitação (rpm) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|------------------------------|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 |
| 400 | 4,209 | 3 | 4,031 | 3 | 11,228 | 1 |
| 800 | 4,103 | 3 | 4,621 | 2-3 | 11,674 | 1 |
| 1600 | 3,943 | 3 | 3,976 | 3 | 11,231 | 1 |

Os valores de manchamento encontram-se na Tabela 4-16, sendo possível verificar que as alterações em relação ao manchamento foram pouco significativas para os tratamentos efectuados com diferentes amostras de algodão.

Tabela 4-16: Valores de manchamento após lavagem para os tratamentos sob agitação mecânica com diferentes velocidades de agitação

| Velocidade de agitação (rpm) | Co funcionalizado | | RB5 | | Co | |
|------------------------------|-------------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 |
| 400 | 1,092 | 5 | 1,069 | 5 | 0,883 | 5 |
| 800 | 1,217 | 5 | 1,243 | 5 | 1,116 | 5 |
| 1600 | 1,193 | 5 | 1,394 | 4-5 | 1,389 | 4-5 |

4.1.2.4. Estudo comparativo entre os tratamentos efectuados com ultra-sons e sob agitação mecânica

Foram seleccionadas as melhores condições nos tratamentos efectuados com ultra-sons e sob agitação mecânica, para uma melhor comparação dos resultados. No que se refere à concentração de lacase aplicada, a concentração em que se obtiveram melhores resultados foi 0,067 U/mL, em ambos os tratamentos (ultra-sons e agitação). Na tabela que se encontra a seguir (Tabela 4-17), estão as condições optimizadas dos tratamentos com ultra-sons e sob agitação mecânica.

Tabela 4-17: Condições otimizadas para tratamentos com ultra-sons ou agitação mecânica

| Parâmetros | Ultra-sons | Agitação mecânica |
|------------------------------|------------|-------------------|
| Frequência (kHz) | 20 | - |
| Potência (W) | 50 | - |
| Velocidade de agitação (rpm) | - | 800 |
| Catecol (mM) | 2 | |
| Lacase (U/mL) | 0,067 | |
| Temperatura (°C) | 50 | |
| Tempo (min.) | 60 | |

A seguir, apresenta-se o gráfico dos valores de diferença de cor (Gráfico 4-7) para os tratamentos com ultra-sons e sob agitação mecânica nas diferentes amostras de algodão.

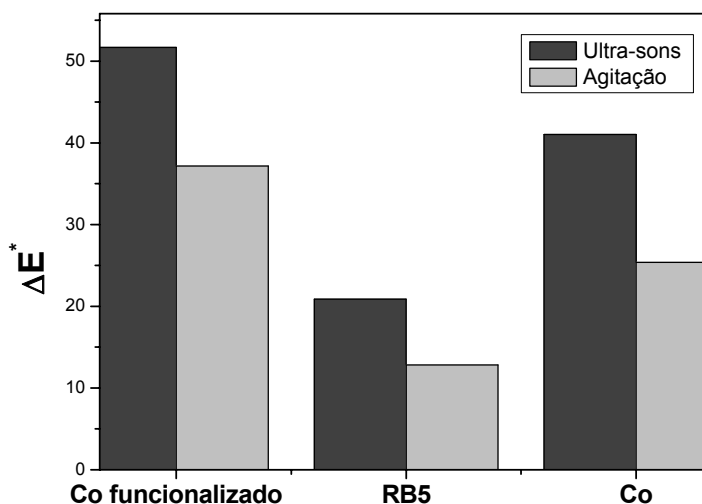


Gráfico 4-7: Valores da diferença de cor para as diferentes amostras de algodão tratadas com ultra-sons ou agitação mecânica.

Analisando o gráfico (Gráfico 4-7), verifica-se que os tratamentos efectuados com ultra-sons são mais eficientes na polimerização do catecol em presença de lacase, quando comparados com os tratamentos efectuados sob agitação.

Como já foi referido anteriormente, os ultra-sons aumentam os processos de transferência de massa, principalmente em sistemas heterogêneos, aumentando assim a eficiência da polimerização.

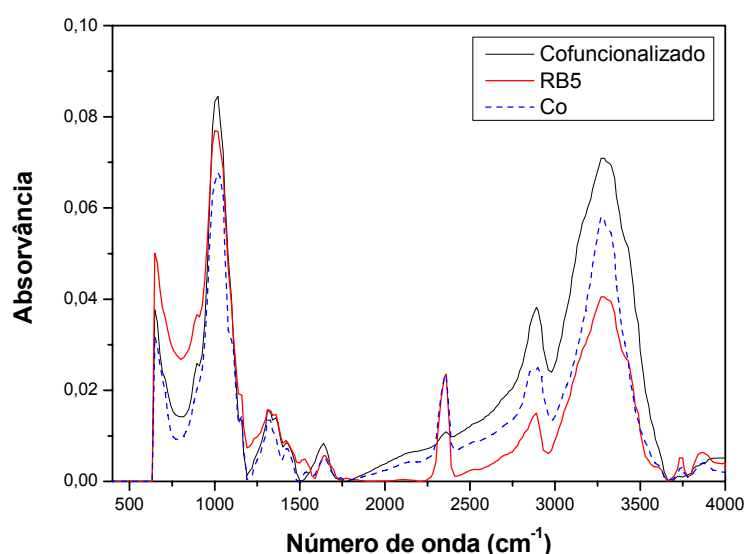
É de salientar o aumento da polimerização do catecol nas amostras de algodão funcionalizado, devido à modificação química efectuada na celulose de forma a aumentar a coloração castanha promovida pela polimerização enzimática.

4.1.2.5. Análise por espectroscopia de infravermelho

Outra das técnicas aplicadas na identificação de polímero nas diferentes amostras de algodão foi o FT-IR com ATR.

Ainda que a interpretação de espectros de infravermelho de fibras têxteis como algodão seja muitas vezes difícil, devido ao facto de se tratar de uma estrutura heterogênea onde qualquer alteração configuracional das cadeias celulósicas pode apresentar efeitos nos espectros obtidos (Lewis 1999), foi analisada a eficiência dos tratamentos efectuados no algodão por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada. Compararam-se as principais bandas características dos grupos funcionais nas diferentes amostras de algodão com e sem tratamento (controlo).

Nos espectros que se seguem, é possível verificar as diferenças existentes nas amostras de algodão.



Espectro 4-1: Espectros de infravermelho para as amostras de algodão sem tratamento.

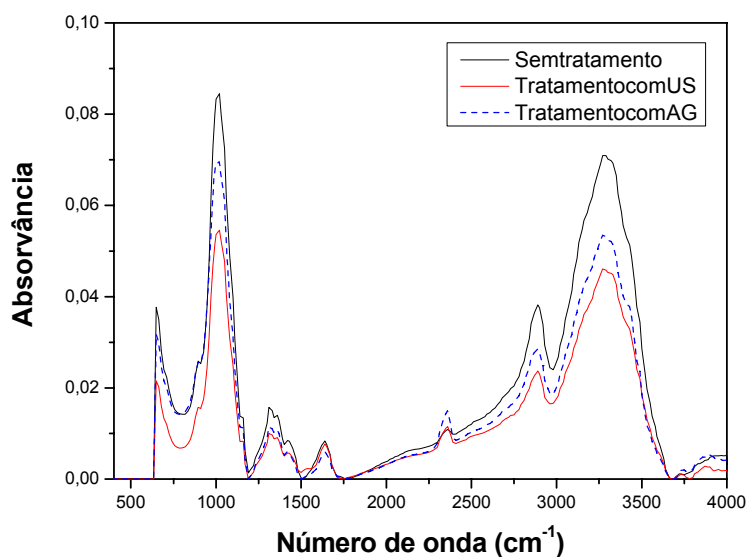
Através dos espectros de controlo obtidos (Espectro 4-1), podemos verificar que a banda com uma frequência de vibração por volta dos 3300 cm^{-1} aproximadamente é característica do estiramento da ligação O-H e está presente nas três amostras.

No entanto, comparando a amostra de controlo de algodão branqueado (Co) com algodão tingido (RB5), verifica-se uma diminuição da intensidade da banda, provavelmente devido à presença do corante.

Comparando o algodão funcionalizado (Co funcionalizado) com o algodão branqueado (Co) verifica-se um alargamento da banda por volta dos 3280 cm^{-1} .

O algodão funcionalizado possui grupos amina ($-\text{NH}_2$) que apresentam uma banda nesta região do espectro (3280 cm^{-1}). Há então uma sobreposição de bandas, podendo provocar um alargamento do pico e um aumento da intensidade. Este pico poderá indicar, assim, a funcionalização do algodão.

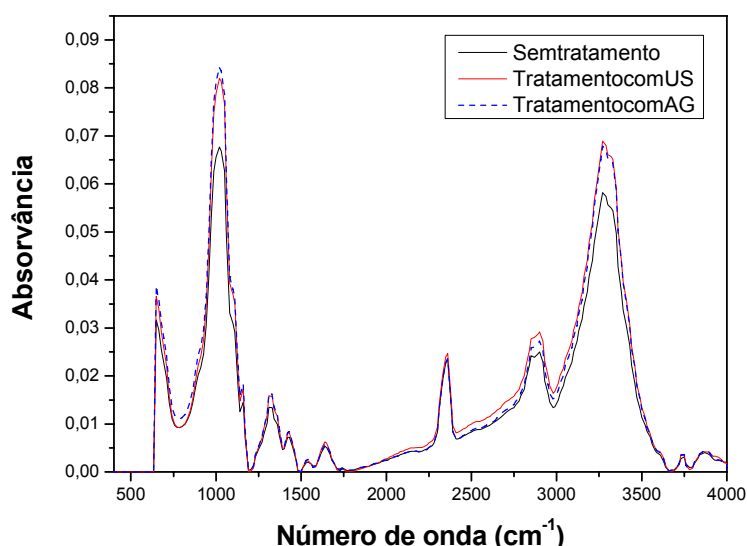
A banda a $1010\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ é característica do estiramento das ligações C-H presentes na celulose, logo presentes em todas as amostras de algodão.



Espectro 4-2: Espectros de infravermelho das amostras de algodão funcionalizado.

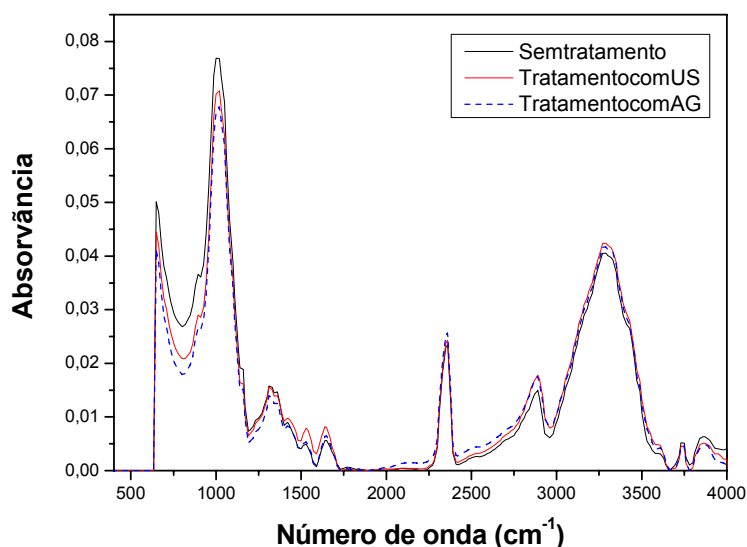
Comparando as amostras de algodão funcionalizado (Espectro 4-2), verifica-se que a amostra tratada com ultra-sons ou agitação mecânica apresenta uma diminuição da banda por volta dos 3280 cm^{-1} (banda característica dos grupos O-H e N-H) e na banda a 1020 cm^{-1} . Esta diminuição poderá ser devida ao polímero (poli(catecol)) que reagiu com

a superfície de algodão aminizado, provocando uma diminuição da intensidade da banda na região dos 3280 cm^{-1} (Celulose-NHR, R=poli(catecol)). A intensidade das bandas nas regiões acima mencionadas é mais baixa na amostra de algodão funcionalizado tratado com ultra-sons (Tratamento com US), o que poderá indicar a eficiência na polimerização com ultra-sons.



Espectro 4-3: Espectros de infravermelho das amostras de algodão branqueado.

Nestes espectros (Espectro 4-3), verifica-se que o controlo tem intensidade mais baixa que as amostras tratadas, tanto na região dos 3300cm^{-1} (característica do estiramento da ligação O-H) como na banda na região dos 1020cm^{-1} (característica do estiramento da ligação C-H). O polímero formado (poli(catecol)) possui, tal como as amostras de algodão branqueado, grupos O-H. Assim, as amostras que contêm polímero de catecol apresentam uma intensidade mais elevada, provavelmente devido ao aumento de grupos O-H (grupos O-H presentes no poli(catecol) e na celulose).



Espectro 4-4: Espectros de infravermelho das amostras de algodão tingido com RB5.

Os espectros de infravermelhos obtidos (Espectro 4-4) para as amostras de algodão tingido com RB5 não apresentam diferenças significativas, o que está de acordo com os resultados previamente obtidos. Nestas amostras de algodão tingido, a coloração castanha promovida pela polimerização enzimática do catecol não foi tão evidente.

4.2. POLIMERIZAÇÃO DO CATECOL EM AMOSTRAS DE LÃ

Foram realizadas algumas experiências de polimerização do catecol na presença de amostras de lã e observou-se que o produto de polimerização era adsorvido pela lã. Estes resultados foram comprovados pela coloração castanha escura na lã.

A lã é uma fibra animal que contém grupos amina. Estes grupos possibilitam a ligação do polímero de poli(catecol) à fibra, tal como no algodão funcionalizado.

O objectivo principal deste estudo em amostras de lã foi essencialmente a obtenção de estampados através da polimerização oxidativa do catecol promovida pelos ultra-sons.


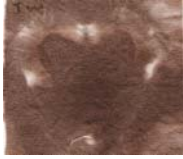


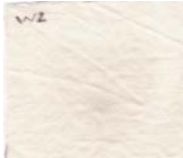
Para tal, foram utilizadas diferentes condições de tratamento, que se encontram na Tabela 4-18 que se segue.

Quando se realizou o tratamento numa solução de catecol, a definição da forma desejada não ficou bem delineada, uma vez que houve propagação da polimerização ao longo

da amostra em questão. Assim, para a obtenção dum estampado foi necessário "pincelar" a área pretendida com uma solução de catecol, para uma melhor definição.

Os tratamentos foram realizados com ultra-sons, aplicando-se uma frequência de 20 kHz e uma potência de 50 W.

Tabela 4-18: Resultados obtidos após tratamento com uma solução 2 mM de catecol, aplicando os ultra-sons

| Catecol (mM) | Laccase (<i>Trametes hirsuta</i>) (U/mL) | Tempo (min.) | Amostra antes do tratamento | Amostra após tratamento | Forma |
|--|--|--------------|--|--|--|
| 2 | 0,67 | 60 |  |  |  |
| 2 (pincelado na área pretendida a obter o estampado) | 0,67 | 60 |  |  | |

Após o ensaio numa solução de catecol de 2 mM de concentração, tentou-se então obter o estampado, "pincelando" a área pretendida com uma solução de catecol com a mesma concentração. No entanto, a forma não ficou bem definida, pois a concentração de monómero não foi suficiente para que se obtivesse a polimerização. Assim, tentou-se obter o efeito desejado, aplicando, com a ajuda de um pequeno pincel, uma concentração de catecol mais elevada. O uso de aditivos como surfactantes, polímeros ou polióis de elevado peso molecular, para aumentar a estabilidade da enzima para condições ambientais extremas, é uma prática comum. Neste tratamento, a adição de PVA foi estudada. Estas moléculas de PVA em presença de água agregam instantaneamente, formando uma camada hidrofóbica à volta da enzima, que a protege das condições ambientais.

Tabela 4-19: Condições para os diferentes tratamentos efectuados com ultra-sons

| Catecol (mM) | Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Tempo (min.) |
|--------------|---------------------------------------|--------------|
| 10 | 0,33 | 30 |
| | | 60 |
| | 0,67 | 30 |
| | | 60 |

Estes tratamentos realizaram-se sem e com 1% de PVA, para verificar a influência que este polímero tem na polimerização enzimática do catecol.

No gráfico que se segue, apresentam-se os valores de ΔE^* como grau de polimerização indirecto, em função das diferentes amostras de lã.

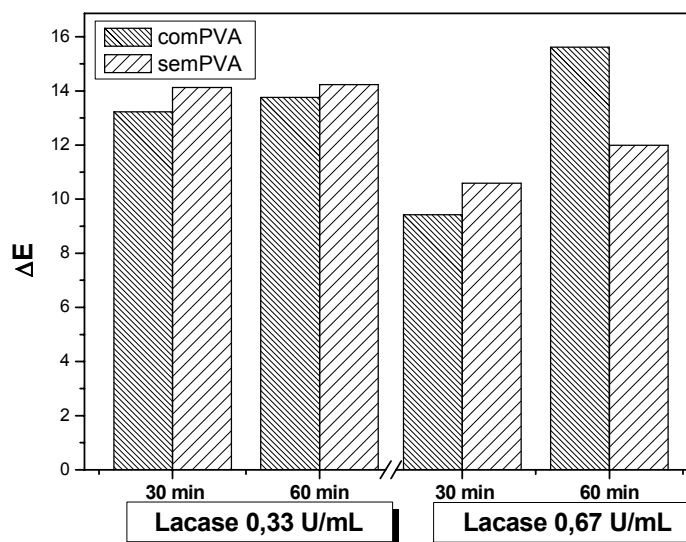




Gráfico 4-8: Variação da diferença de cor com o tempo de tratamento (20 kHz de frequência, 50 W de potência, 10 mM de catecol a 50 °C).

Analisando o Gráfico 4-8, verifica-se que o melhor valor de ΔE^* foi obtido para sessenta minutos de tratamento, utilizando 0,67 U/mL de lacase com PVA. No entanto, o tratamento efectuado durante sessenta minutos, com menor quantidade de lacase e sem PVA, tem um valor de ΔE^* próximo.

É também visível que a adição de PVA durante o tratamento só é significativa quando se adiciona uma maior quantidade de enzima e durante sessenta minutos de tratamento. Nos restantes tratamentos não houve nenhum incremento com a adição de PVA, verificando-se então que a adição de PVA só é significativa em condições extremas. Outro factor poderá ser a concentração de PVA. Vários estudos mostram que este poliol exerce um efeito protector na actividade de várias enzimas, nomeadamente lacases, mas para concentrações elevadas, por exemplo de 10% (Basto *et al.* 2006).

Na Tabela 4-20 encontram-se as condições de tratamento optimizadas para a obtenção do estampado, assim como a imagem da amostra de lã após tratamento com ultra-sons.

Tabela 4-20: Amostra de lã antes do tratamento e após tratamento (1% de PVA)

| Catecol (mM) | Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Tempo (min.) | Antes do tratamento | Após tratamento |
|--------------|---------------------------------------|--------------|---|--|
| 10 | 0,67 | 60 |  |  |

Após os tratamentos, realizaram-se testes de solidez à lavagem, segundo a norma previamente descrita.

Tabela 4-21: Valores de alteração da cor após lavagem para os diferentes tratamentos

| Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Tempo (min.) | Com PVA | | Sem PVA | |
|---------------------------------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|
| | | ΔE^* | ISOA05 | ΔE^* | ISOA05 |
| 0,33 | 30 | 4,305 | 2-3 | 4,790 | 2-3 |
| | 60 | 3,695 | 3 | 4,661 | 2-3 |
| 0,67 | 30 | 4,295 | 2-3 | 4,700 | 2-3 |
| | 60 | 3,290 | 3 | 3,555 | 3 |

Através dos valores obtidos (Tabela 4-21), verifica-se que os tratamentos mais longos (sessenta minutos) favorecem a polimerização do catecol, pois a sua solidez é mais elevada. No entanto, os seus valores de ISOA05 não diferem muito entre si.

Os valores de manchamento (Tabela 4-22) também não diferem muito entre si, apresentando o mesmo valor de ISOA04, e tendo apenas algumas diferenças no que diz respeito ao valor de diferença de cor.

Tabela 4-22: Valores de manchamento após lavagem para os diferentes tratamentos

| Lacase <i>Trametes hirsuta</i> (U/mL) | Tempo (min.) | Com PVA | | Sem PVA | |
|---------------------------------------|--------------|--------------|--------|--------------|--------|
| | | ΔE^* | ISOA04 | ΔE^* | ISOA04 |
| 0,33 | 30 | 3,099 | 4-5 | 3,694 | 4-5 |
| | 60 | 3,433 | 4-5 | 3,872 | 4-5 |
| 0,67 | 30 | 3,057 | 4-5 | 3,046 | 4-5 |
| | 60 | 3,655 | 4-5 | 3,472 | 4-5 |

4.3. POLIMERIZAÇÃO DO CATECOL COM LACASE

A capacidade das lacases na polimerização, na ligação e na funcionalização de vários compostos foi extensivamente estudada e aumentou o interesse na aplicação destas enzimas como bio-catalizador na síntese orgânica.

Nos trabalhos anteriores, utilizaram-se os ultra-sons e a enzima (lacase) e verificou-se que o processo enzimático depende de substrato para substrato.

Neste trabalho foi testada a capacidade da lacase de *Trametes hirsuta* em combinação com ultra-sons, para aumentar a polimerização radicalar do catecol. Foi avaliada a síntese sono-enzimática do poli(catecol) por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), com as especificações referidas anteriormente.

Foram preparadas soluções de 1 mM de catecol em tampão acetato de concentração 0,1 M e pH 5, sendo tratadas num reactor de ultra-sons, cuja frequência do gerador foi de 20 kHz.

As soluções de catecol foram tratadas com a lacase de *Trametes hirsuta* na presença ou não dos ultra-sons. A concentração de lacase usada foi de 0,036 U/mL.

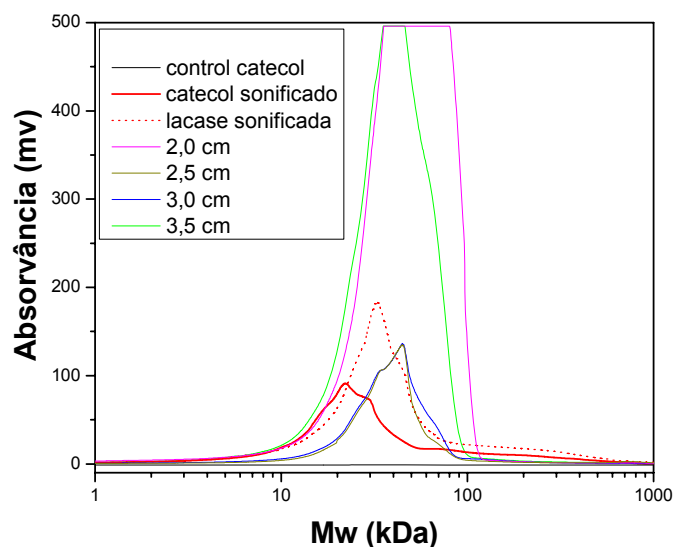
Este estudo da polimerização sono-enzimática do catecol incidiu na influência da distância do transdutor ao fundo do reactor. Para tal, realizaram-se tratamentos com diferentes distâncias, medidas em centímetros (cm).

Tabela 4-23: Condições dos tratamentos com diferentes distâncias do transdutor

| Distância do transdutor (cm) | Potência (W) | Temperatura (°C) | Tempo (min.) |
|------------------------------|--------------|------------------|--------------|
| 2,0 | | | |
| 2,5 | | | |
| 3,0 | 50 | 50 | 120 |
| 3,5 | | | |

O polímero obtido foi analisado por HPLC, de forma a obter-se o seu peso molecular. Os resultados fornecidos pelo HPLC são da absorvância (mv) em função da massa molecular (kDa).

Mais uma vez, se utilizou, neste estudo, a lacase de *Trametes hirsuta* como biocatalizador para produzir poli(catecol). O espectro de HPLC dos polímeros obtidos num sistema sonificado, a 20 kHz, a 50 W e à temperatura de 50 °C, mostram diferenças entre si, principalmente no que se refere à intensidade de absorvância obtida.



Espectro 4-5: Cromatogramas de HPLC das amostras obtidas por polimerização do catecol com lacase de *Trametes hirsuta*. Absorvância (mv) vs Massa molecular (kDa).

Verifica-se que os polímeros obtidos após tratamento com ultra-sons com diferentes distâncias do transdutor apresentam elevada massa molecular.

A formação de polímeros de tão elevado peso molecular pode ser explicada pela acção sinergista da enzima e dos ultra-sons, uma vez que os ultra-sons sozinhos não são capazes de polimerizar o catecol.

O aumento de processos de difusão física, devido à acção dos ultra-sons, pode promover a acessibilidade enzimática. Ao mesmo tempo, os radicais hidróxilo produzidos pelos ultra-sons podem reagir com as moléculas de catecol da oxidação enzimática, promovendo a propagação da cadeia polimérica, o que possibilita obter polímeros com elevado peso molecular.

Observando o cromatograma da absorvância (mv) em função da massa molecular (kDa), verifica-se que as distâncias mínima e máxima aplicadas apresentam picos de maior intensidade e com massa molecular ligeiramente maior.

O aumento da intensidade está relacionado com um aumento de concentração de polímero, uma vez que, pela lei de Beer-Lambert, a concentração do polímero é directamente proporcional à absorvância (Figura 4-1).

$$A = \varepsilon lc$$

Figura 4-1: Equação da Lei de Beer-Lambert.

Onde:

A – Absorvância;

ε - Absortividade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

l – caminho percorrido pelo feixe luminoso (cm);

c – Concentração de corante na solução (mol L^{-1}).

Estes resultados poderão estar relacionados com uma maior produção de radicais nas distâncias extremas (2,0 cm e 3,5 cm), promovendo a formação de um polímero mais concentrado e, conseqüentemente, mais escuro.

O ensaio foi realizado num copo de vidro, o que poderá ter influência, uma vez que o vidro reflecte as ondas ultra-sónicas. A reflexão das ondas poderá anular o fenómeno de cavitação e, conseqüentemente, menor será a produção de radicais hidróxilo.

À distância de 2,0 cm e 3,5 cm a reflexão da onda não é tão intensa, logo a produção de radicais é maior.

Nas distâncias intermédias (2,0; 2,5; 3,0 cm), poderá ter havido uma maior reflexão da onda, diminuindo a produção de radicais hidróxilo, o que provocará uma diminuição na concentração do polímero obtido.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, a lacase de *Trametes hirsuta* foi usada como bio-catalizador para produzir poli(catecol) em conjunto com sistemas de ultra-sons.

O catecol é um bom substrato para a lacase que o polimeriza formando polímeros pouco solúveis. O catecol é oxidado pela lacase a radicais ariloxil, o que pode dever-se a reacções não enzimáticas, originando dímeros e oligómeros coloridos e produtos poliméricos. Os radicais livres de alquoxi formados podem também acopular na posição *orto* e *para* com grupos hidróxilo e formar extensas quininas (Shin *et al.* 2001).

No presente estudo foi possível verificar que a polimerização enzimática do catecol pode ser aumentada modulando as condições de tratamento, como a intensidade (potência), a concentração de lacase e o tempo de tratamento.

Os primeiros tratamentos efectuados com algodão tingido com diferentes corantes reactivos e o algodão branqueado evidenciam uma coloração acastanhada, mas mais definida com o tratamento efectuado com ultra-sons. Estas amostras mostram diferenças de cor (ΔE^*) significativas, confirmando a polimerização do catecol "*in situ*". Verificou-se também que a polimerização do catecol não era possível sem a presença da lacase. Nestas amostras, os ensaios de solidez à lavagem evidenciam que a polimerização é pouco resistente, uma vez que houve uma perda de cor significativa, facto revelado pelas diferenças de cor obtidas entre as amostras tratadas antes e após lavagem.

Após a obtenção destes resultados, recorreu-se à funcionalização da celulose através de um tratamento redutivo, de forma a criar grupos amina que podem formar ligações covalentes com o catecol, efectuando-se estudos da concentração de lacase, da intensidade aplicada e da influência da velocidade de agitação mecânica. Estes estudos efectuaram-se também nas amostras de algodão tingido com o corante RB5 e nas amostras de algodão branqueado, de forma a compararmos o grau de polimerização obtido nas diferentes amostras. A obtenção de celulose funcionalizada é evidente após a visualização dos espectros de infravermelho obtidos. A partir dos estudos efectuados, relativamente à concentração de lacase, intensidade de ultra-sons aplicados e velocidade de agitação mecânica, foi possível optimizar as condições de polimerização do catecol. Verificou-se que, a partir de uma concentração de 0,067 U/mL de lacase, não havia aumento na polimerização de catecol, ou seja, com concentrações mais elevadas não se verificou nenhum incremento, resultado obtido para as três amostras em estudo. Relativamente à potência aplicada, verificou-se que havia um aumento no grau de polimerização com um

aumento de potência (50 W), devido a uma maior produção de radicais hidróxilo que fazem com que haja um aumento de polimerização radicalar do catecol. No entanto, quando se confrontaram as diferentes amostras de algodão, verificou-se que a amostra de algodão funcionalizado apresentava diferenças de cor ($\Delta E^* = 52$) bastante mais significativas que as restantes amostras de algodão (algodão tingido com RB5 e algodão branqueado). Estes resultados evidenciam então o elevado nível dos locais de acoplamento na superfície de celulose funcionalizada. Após estes estudos, verificou-se que o melhor sinergismo entre a lacase e o catecol era conseguido utilizando 0,067 U/mL de lacase e uma potência de ultra-sons de 50 W. No que se refere aos resultados de alteração da cor e manchamento após lavagem, pode concluir-se que as amostras de algodão funcionalizado eram mais resistentes à lavagem, pois conseguiu-se preservar a coloração castanha obtida na polimerização, não havendo diferenças de cor significativas entre a amostra tratada e a amostra tratada após lavagem. Quando se compararam os resultados obtidos com as condições optimizadas para os ultra-sons e as condições optimizadas para a agitação mecânica, verificou-se que os tratamentos efectuados com ultra-sons aumentavam a polimerização do catecol. Estes resultados foram também comprovados com a análise que se efectuou com infravermelho, verificando-se as diferenças entre os diferentes tratamentos, através das bandas características para estes compostos. Pode concluir-se então que a polimerização enzimática foi efectuada usando aminas aromáticas imobilizadas covalentemente nas fibras celulósicas, promovendo um novo caminho para a geração de materiais bio-compósitos.

A polimerização do catecol foi também efectuada nas amostras de lã, pois, tal como a celulose funcionalizada, esta apresenta grupos amina à superfície que podem reagir com o poli(catecol). O objectivo desta polimerização foi a obtenção de um estampado, com a ajuda dos ultra-sons. A área pretendida a estampar foi "pincelada" com uma solução mais concentrada de catecol (10 mM), aplicando-se diferentes concentrações de lacase, assim como diferentes tempos de tratamento. A optimização deste tratamento foi conseguida com sessenta minutos de tratamento, 0,67 U/mL de lacase, com uma potência de 50 W e 1% de PVA. O poliálcool (poli(álcool vinílico)) foi adicionada ao meio reaccional, para aumentar a estabilidade da enzima, minimizando o potencial efeito negativo dos ultra-sons no centro activo da enzima. Quanto aos resultados de solidez à lavagem, foi possível verificar que a perda de cor não era muito significativa. Assim, pode concluir-se que é possível obter diferentes estampados, aplicando materiais poliméricos sintetizados, através de uma polimerização sono-enzimática, amigos do ambiente, promovendo deste modo um bom exemplo para a "química verde".

Por último, realizaram-se tratamentos de polimerização de catecol sem a presença de material adsorvente, estudando-se a influência das diferentes distâncias do transdutor ao fundo do reactor. Após este tratamento verificou-se que o polímero de catecol obtido era de elevada massa molecular (kDa). A aplicação de diferentes distâncias do transdutor não interferiu de uma forma significativa na massa molecular do polímero obtido, mas sim na concentração, uma vez que se verificaram diferenças acentuadas de intensidade. Nas distâncias extremas de 2,0 cm e de 3,5 cm, verificou-se um aumento bastante acentuado na intensidade, logo, pela lei de Beer-Lambert, pode concluir-se que houve um aumento na concentração de polímero obtido. Este aumento de concentração está provavelmente relacionado com um aumento de produção de radicais hidróxilo, aumentando, consequentemente, a polimerização radicalar do catecol.

Analisando todos os resultados obtidos, pode concluir-se que os ultra-sons aumentam a formação do poli(catecol). Os efeitos dos ultra-sons podem ser explicados física ou quimicamente. Quimicamente, os radicais hidróxilo produzidos por ultra-sons podem reagir com moléculas intermediárias produzidas pela enzima; fisicamente, as ondas ultra-sónicas podem reduzir os impedimentos alostéricos da enzima, devido ao aumento do processo de difusão (Entezari e Pétrier 2004).

Após todos os tratamentos efectuados, pode concluir-se, que é possível produzir uma nova classe de polímeros sintetizados enzimaticamente e novas técnicas de "coating" provenientes dos fenóis, utilizando condições de temperatura e pH moderados.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo evidenciou que o uso de polímeros corados, sintetizados enzimaticamente em condições apropriadas, formam uma molécula singular não-poluente que exhibe uma melhor bio-degradabilidade e tem geralmente uma maior compatibilidade com o meio ambiente.

Neste trabalho estudou-se a combinação da lacase de *Trametes hirsuta* com sistemas de ultra-sons para aumentar a polimerização radicalar "in situ" do catecol. Assim, poderão efectuar-se outros estudos, aproveitando a mais valia do uso de ultra-sons, nomeadamente:

- Estudar a influência da intensidade dos ultra-sons com as duas distâncias do transdutor em que se obtiveram melhores índices de coloração;
- Estudar o uso de outros monómeros na polimerização sono-enzimática;
- Estudar a aplicação da polimerização sono-enzimática em substratos diferentes;
- Estudar a possibilidade de obtenção de estampados através da aplicação de um novo transdutor com um diâmetro de dimensões mais pequenas, numa tentativa da sua melhor definição.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra K H, Cavaco-Paulo A, Gübitz G M (2000).** Decolourisation and detoxification of textiles dyes with laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3357-3362.
- Aktas N, Tanyolaç A (2003).** Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol. *J. Molecul. Catal. B: Enz.* 22: 61-69.
- Araújo M, Melo e Castro E M (1984).** Manual de Engenharia têxtil. Fundação Calouste Gulbenkian, Volume II, Lisboa, p. 744-745.
- Avivi, Gedanken (2002).** S-S bonds are not required for the sonochemical formation of proteinaceous microspheres the case of streptavidin. *Biochem. J.* 366: 705-707.
- Banci L, Ciofi-Baffoni, Tien M (1999).** Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. *Biochemistry* 38: 3205-3210.
- Barton S, Bullock C, Weir D (1996).** The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 190-194.
- Basto C, Silva C J, Gübitz G, Cavaco-Paulo A.** Stability and Decolourization ability of *Trametes villosa* lacase in liquid ultrasonic fields. *Ultrasonics Sonochemistry*. In press (doi: 10.1016/j.ultsonch.2006.07.05).
- Basto C, Zille A, Fernandes M, Munteanu FD, Cavaco-Paulo A (2006).** Sono-enzymatic polymerization of catechol. Submetido.
- Bauer C G, Kunh 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. *Fresenius J. Anal. Chem.* 364: 179-183.
- Bertrand G (1894).** Sur le latex de l'arbre à laque. *C. R. Hebd. Acad. Sci. (Paris)* 118: 1215-1218.
- Bourbonnais R, Paice M, Freirmuth 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 and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects* 146: 405-415.
- Chhagani R R, Lyer U, Shenai V A (2000).** Modifying cotton for dyeing. *Colourage* 47:27-32.
- Chaplin M, Bucke C (1990).** *Enzyme Technology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Christenson A, Dimcheva N, Ferapontova E E, Gorton L, Ruzgas T, Stoica L, Shleev S, Yaropolov A I, Haltrich D, Thorneley R N F, Aust S D (2004).** Direct electron transfer between ligninolytic redox enzymes and electrodes. *Electroanalysis* 16: 1074-1092.
- Christie R M (2001).** *Colour Chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Claus H (2003).** Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179: 145-150.
- Claus H (2004).** Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron.* 35: 93-96.
- Colussi A J, Hung H, Hoffman M R (1999).** Sonochemical degradation rates of volatile solutes. *Journal of Physical Chemistry* 103: 2696-2699.
- De Cesare F, Garzillo A M V, Buononcon V, Badalluco L (2000).** Use of sonication for measuring acid phosphatase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 825-832.
- De Peppo F, Lacobelli B D, De Gennaro M, Colojacomo M (1999).** Percutaneous endoscopic cecostomy for antegrade colonic irrigation in fecally incontinent children. *Endoscopy* 31: 501-503.
- Dias A (2002).** Apontamentos da disciplina de Estrutura Molecular, da Licenciatura em Química Aplicada, Departamento de Química, Universidade do Minho.
- Durán N, Esposito E (2000).** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Cat. B: Environ.* 28:83-99.
- Durán N, Rosa M A, D'Annibale A, Gianfreda L (2002).** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enz. Microbial Technol.* 31: 907-931.
- 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.
- Entezari M H, Pétrier C (2003).** A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of substituted phenols. *Ultrasonics Sonochemistry* 10: 241-246.
- Entezari M H, Pétrier C (2004).** A combination of ultrasound and oxidative enzyme: sono-biodegradation of phenol. *Applied Catalysis B: Environmental* 53: 257-263.
- Fabbrini M, Galli C, Gentili P (2002).** Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 16: 231-240.
- Fang X, Mark G, Sonntag C (1996).** OH radical formation by ultrasound in aqueous solutions. Part I: the chemistry underlying the terephthalate dosimeter. *Ultrasonics Sonochemistry* 3: 57-63.
- Feughelman M (1997).** Introduction to the physical properties of wool, hair & other α -keratin fibres. In: *Mechanical properties and structure of alpha-keratin fibres: wool, human hair and related fibres*, UNSW Press, 1-14.

- Fiadeiro JM, Roldan L, Stevens C, Franco F (2000).** Stretch wool fabrics. Oral communication at the Spring 2000 Meeting of the fiber society, Guimarães, 17-19 Maio.
- Gama P F M (1996).** Mecanismo bioquímico da acção de celulases de *Trichoderma reesei*. Dissertação de doutoramento. Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia, Universidade do Minho.
- Gianfreda A, Makower A, Bauer C, Bier F, Scheller F (1995).** Laccases: a useful group of oxireductive enzymes. *Bioremed. J.* 3: 1-25.
- Gomes S A S S, Nogueira J M F, Rebelo M J F (2004).** An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics* 20: 1211-1216.
- Gong C, Hart D P (1998).** Ultrasound induced cavitation and sonochemical yields. *Journal of the Acoustical Society of America* 104: 2675-2682.
- Gübitz G M, Cavaco Paulo A (2003).** New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 577-582.
- Guerra A, Mendonça R, Ferraz A (2003).** Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme and Microbial. Technology* 33: 12-18.
- Guillen J G, Garrido J M (1987).** Algodon y celulosa: estructura e propiedades. Universidade Politécnica da Catalunha, Terrassa.
- Guzey D, Kim H J, McClements D J (2005).** Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin membranes. *Food Hydrocolloids* 18: 967-975.
- Hartmeier W (1988).** Immobilized biocatalysts: An introduction. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Heine E, Höcker H (1995).** Enzyme treatments for wool and cotton. *Rev Prog Coloration* 25: 57-63.
- Hirose J, Nasu M, Yokoi H (2003).** Reaction of substituted phenols with thermostable laccase bound to *Bacillus subtilis* spores. *Biotchnolo. Lett.* 25: 1609-1612.
- Hogg LJ, Edwards HGM, Farwell DW, Peters AT (1994).** FT Raman spectroscopic studies of wool. *J.S.D.C.* 110: 196-199.
- Hughes VL, Nelson G, East G (2001).** Surface modification of cashmere fibres by reverse proteolysis. *AATCC review*, 39-43.
- Ikeda R, Tanaka H, Uyama H, Kobayashi S (1998).** Laccase-catalyzed polymerization of acrylamide. *Macromol. Rapid. Commun.* 19: 423-425.
- Johannes C, Majcherczyck A (2000).** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 524-528.
- Kamel M M, El-Shishtawy Reda M, Yusef B M, Mashaly H (2005).** Ultrasonic assisted dyeing III. Dyeing of wool with lac as a natural dye. *Dyes and Pigments* 65: 103-110.

- Kats E, Eksteen R, Scoenmakers P, Miller N (1998).** Handbook of HPLC; Chromatographic Science Series. Volume 78.
- Kim S-Y, Zille A, Murkovic M, Güebitz G, Cavaco-Paulo A (2006).** Enzymatic polymerization on the surface of functionalized cellulose fibers. Polymer Science. Submetido.
- Kobayashi S, Higashimura H (2003).** Oxidative polymerization of phenols revisited. Prog. Polym. Sci. 28: 1015-1048.
- Kumar A, Gogate P R, Pandit A B, Delmas H, Wilhelm AM (2004).** Gas-liquid mass transfer studies in sonochemical reactors. Ind. Eng. Res. 43: 1812-1819.
- Lewis D M, Tapley K N (1999)** Periodate oxidized cellulose for dyeing with alkylamino dyes, Textile Chemist and Colorist. 31(5):20-26.
- Li K, Xu F, Erikssen K E L (1999).** Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of non-phenolic lignin model compound. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2654-2660.
- Makinson KR (1979).** Shrinkproofing of wool. Marcel Dekker Inc., New York, Basel, p 373.
- Manual de Instruções (1997).** Linitest Heraeus. Alemanha.
- Manual de Instruções (1997).** Spectraflash 600 plus Dta Color International.
- Mason T, Lorimer J P, Bates D M, Zhao Y (1994).** Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. Ultrasonics Sonochemistry 2 (1): 91-95.
- Mayer A M, Staples R C (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry. 60: 551-565.
- Millington K (1998).** Using ultraviolet radiation to reduce pilling of knitted wool and cotton. Textile Res. J. 68 (6): 413-421.
- Minussi S C, Pastore G M, Durán N (2002).** Potential applications of laccase in the food industry. Trends in Food Science & Technology 13: 205-216.
- Miranda T M (2001).** Modificação do poli(álcool de vinilo) via fotoquímica. Dissertação de doutoramento. Escola de Engenharia, Universidade do Minho.
- Moholkar V S, Nierstrasz V A, Warmeskerken M M C G (2003).** Intensification of mass transfer in wet textile process by power ultrasound. Autex Research Journal 3:129-138.
- Naider Prased D V, Rajan R, Kunar R, Gandhi K S, Arakeri V H (1994).** Modelling of a batch sonochemical reactor. Chemical Engineering Science 49:877-888.
- Naik S, Speakman PT (1993).** Associations between intermediate filament and intermediate filament associated protein and membrane protein, in wool. Biochemical Society Transactions 21: 279-283.
- Naik S (1994).** Study of naturally crosslinked protein from wool, including membrane protein. Ph.D. Thesis, University of Leeds.

- Negri AP, Cornell HJ, Rivett DE (1993).** A model for the structure of keratin fibers. *Textile Research Journal* 63 (2): 109-115.
- Nevell T P, Zeronian S H (1985).** *Cellulose Chemistry and its Applications*. Ed. Nevell e Zeronian, John Wiley & Sons 1, 15-29.
- Neves J (2000).** *Manual de Estamparia Têxtil*. Gráficas Gamelas, Guimarães, Portugal. p.147-159.
- Nolte H, Bishop DP, Höcker H (1996).** Effects of Proteolytic and Lipolytic Enzymes on Untreated and Shrink-resist-treated wool. *Wool J. Text. Inst.* 87 (1): 212-226.
- Norma Portuguesa NP EN ISO 105-C06:1999.** Solidez dos Tintos à Lavagem Doméstica e Industrial.
- Ovsianko S L, Chernyavsky E A, Minchenya U T, Adzerikho I E, Shkumatov V M (2005).** Effect of ultrasound on activation of serine protease precursors. *Ultrasonics Sonochemistry* 12: 219-223.
- Özbek B, Ülgen Ö K (2000).** The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry* 35: 1037-1043.
- Pailtrophe MT (1992).** The theoretical basis for wool dyeing. In: *Wool Dyeing*, Lewis, DM. Bradford: Society of Dyers and Colourists 52-87.
- Pandit A B, Moholkar V S (1996).** Harness cavitation to improve processing. *Chemical Engineering Progress* 92: 57-67.
- Pascual E, Julia MR (2001).** The role of chitosan in wool finishing. *Journal of Biotechnology* 89: 289-296.
- Pétrier C, Micolle M, Merlin G, Lucke J L (1992).** Characteristics of pentachlorophenate degradation in aqueous solution by means ultrasound. *Environmental Science and Technology* 26: 1639-1642.
- Price G J, Lenz E J (1993).** The use of dosimeters to measure radical production in aqueous sonochemical systems. *Ultrasonics* (31) 6: 451-455.
- Ribeiro M M, Gonçalves C, Requeiras P F, Guimarães M M L, Cruz Pinto J J C (2006).** Measurements of toluene-water dispersions hold-up using a non-invasive ultrasonic technique. *Chemical Engineering Journal* 118: 47-54.
- Rippon JA (1992).** The structure of wool. In: *Wool Dyeing*, Ed. Lewis, DM. Bradford: Society of Dyers and Colourists, 1-51.
- Rocha Gomes J (2002).** *Estrutura e propriedades dos corantes*. Barbosa e Xavier Lda., Braga, Portugal. p. 12-16.
- Rosen S L (1982).** *Fundamental Principles of Polymeric Materials*. A Wiley-Interscience Publication; John Wiley & Sons, Inc.
- Schäfer K (1994).** Microscopical Investigation of the Diffusion of Dyestuffs into Keratin Fibres. *Wool Tech Sheep Breed.* 42 (1): 59-82.

- Shah Y T, Pandit A B, Moholkar V S (1999).** Cavitation reaction engineering. Kluwer Academic/Plenum Publishers , New York, United States of America. p. 8-10, 72, 96-106.
- Shin H, Guebitz G, Cavaco-Paulo A (2001).** "In situ" enzymatically prepared polymers for wool coloration. *Macromol. Mater. Eng.* 286: 691-694.
- Shleev S, Tkac J, Christenson A, Ruzgas T, Yaropolov A I, Whittaker J W, Gorton L (2005).** Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. *Biosens. Bioelectr.* 20: 2517-2554.
- Shore John (1995).** Cellulosics Dyeing. Society of Dyers and Colourists.p. 2-5, 14-24.
- Sivakumar M, Tatake P, Pandit A (2002).** Kinetics of *p*-nitrophenol degradation: effect of reaction conditions and cavitation parameters for multiple frequency system. *Chemical Engineering Journal* 85: 327-338.
- Solomons T W Graham (1996).** Química Orgânica - 6ª Edição, Editora Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, Brasil. Vol. 2, p. 388-393.
- Sórup P, Tils C, Wolf O (1998).** IPTS study:" Biocatalysis state of the art in Europe", Institute for prospective technological studies (IPTS), Sórup P (IPTS), Tils C (IPTS), Wolf O (IPTS), Editors, Sevilla, Spain. p. 61.
- Speakman PT (1985).** In: "fibre chemistry-handbook of fibre science and technology", edited by Lewin M and Pearce EM, M. Dekker, New York, vol.4, 589-646.
- Suslick K S, Hammerton David A (1986).** Site of sonochemical reactions. *IEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control* 33: 143-147.
- Suslick K S (1989).** The chemical effects of ultrasound. *Scientific American* 80-86.
- Suslick K S (1990).** Sonochemistry. *Science* 247: 1439-1446.
- Suslick K S, Grinstaff M W (1990).** Protein microencapsulation of nonaqueous liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 7807-7809.
- Suslick K S (1995).** Applications of ultrasound to materials chemistry. *MRS BULLETIN* 29-34.
- Suslick K S, Price G J (1999).** Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annu. Rev. Mater.Sci.* 29: 295-326.
- Tatake P A, Pandit A B (2002).** Modelling and experimental investigation into cavity dynamics and cavitation yield: Influence of dual frequency ultrasound sonics. *Chemical Engineering Science* 57: 4987-4995.
- Tian M Z, Wan X M, Wang P S, Kang J Q (2004).** Effects of ultrasound and additives on the function and structure of trypsin. *Ultrasonics Sonochemistry* 11: 399-404.
- Taylor R F (1991).** Protein immobilization: Fundamental and applications. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Torres E, Bustos-Jaimes I, Borgne S L (2003).** Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46:1-15.

- Tzanov T, Calafell M, Gübitz G M, Cavaco-Paulo A (2001).** Bio-preparation of cotton fabrics. *Enzyme and Microbial Technology* 29: 357-362.
- Tzanov T, Basto C, Gübitz G M, Cavaco-Paulo A (2003a).** Laccases to improve whiteness in a conventional bleaching of cotton. *Macromol. Mater. Eng.* 288: 807-810.
- Tzanov T, Basto C, Gübitz G M, Cavaco-Paulo A (2003b).** Effect of Some Process Parameters in Enzymatic Dyeing of Wool. *App. Biochem. Biotechnol.* 111 (1): 1-14.
- Vajnhandl S, Marechal A M (2005).** Ultrasound in textile dyeing and the decolouration/mineralization of textile dyes. *Dyes and Pigments* 65: 89-101.
- 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: 33-38.
- 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.
- Wong Y, Yu J (1999).** Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* 33: 3512-3520.
- Xiao Y M, Wu Q, Cai Y, Liu X F (2005).** Ultrasound-accelerated enzymatic synthesis of sugar esters in nonaqueous solvents. *Carbohydrate Research* 340: 2097-2103.
- Xu F, Shin W, Brown S H, Wahleithner J A, Sundaram U M, Solomon E I (1996).** A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim. Biophys. Acta.* 1292: 303-311.
- Yachmanev V G, Bertoniere R N, Blanchard E J (2002).** Intensification of the bio-processing of cotton textiles by combined enzyme/ultrasound treatment. *J. Chem. Tecno. Biotechnol.* 77: 559-567.
- Yachmanev V G, Blanchard E J, Lambert A L (2004).** Use of ultrasonics energy for intensification for the bio-preparation of greige cotton. *Ultrasonics* 42: 87-91.
- Zille A (2005).** Laccase for Textile Applications. Dissertação de doutoramento. Departamento de Engenharia Têxtil, Escola de Engenharia, Universidade do Minho.