



Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel

Nelson Durán*
Elisa Esposito*
Julio Silva Araujo Neto*

Até o final dos anos 80, o uso de enzimas era totalmente ausente da tecnologia de produção da celulose e insignificante na produção de papéis. Nos primeiros anos da primeira década, várias utilizações começaram a ser sugeridas na literatura especializada, em geral voltadas para minimização dos impactos ambientais.

Em verdade, as crescentes exigências de diferentes agências de diversos países do Primeiro Mundo com a qualidade dos resíduos das indústrias de polpa de celulose e papel abriram espaço para a busca de alternativas no processo de produção e para reformulações na área de tratamento de efluentes (Durán e Esposito, 1993). Há algum tempo, foi visto que a minimização dos problemas causados pelos efluentes originados dos processos de branqueamento pode ser abordada com ajuda de vários métodos alternativos. Entre eles, se destacam os pré-tratamentos biológicos dos cavacos antes da polpação e das polpas antes do branqueamento, as novas técnicas de purificação dos efluentes e as pesquisas para alteração da quantidade e da estrutura das ligninas nas árvores facilitando, dessa forma, tanto a polpação quanto o branqueamento das matérias-primas (Eriksson, 1992).

Tais abordagens estão dentro dos novos conceitos de biorremediação ambien-

tal (Madsen, 1991; Thayer, 1991; Durán e Espósito, 1993) e podem ser concretizadas em diferentes etapas do processamento industrial da madeira nas usinas papelarias (figura 1): utilização de pectinases no descascamento da madeira, biodeslignificação dos cavacos por fungos ligninolíticos, biobranqueamento das polpas por xilanases, ligninases e lacases, tratamento dos efluentes por enzimas ligninolíticas ou pelos fungos produtores e utilização de diferentes técnicas voltadas para alterações na biossíntese das ligninas.

Este quadro permitiu que, particularmente depois de 1990, uma série de avanços - alguns já em pleno uso industrial no Primeiro Mundo - começasse a criar fortes ligações entre enzimas e a indústria papelaria. Um dos indícios do grande interesse que o tema vem despertando foi a divulgação, em 1992, de uma associação entre a Ciba-Geigy (Basel, Suíça) e a Genencor (Rochester, NY) com vistas ao desenvolvimento de preparações enzimáticas de utilidade em várias sub-áreas da indústria papelaria (Anônimo, 1992). Segundo tais notícias, os parceiros investirão cem milhões de dólares até o final da década. Em paralelo, sabe-se que a associação da Sandoz suíça com a Repligen dos Estados Unidos gerou, como se verá, bioprodutos para a indústria papelaria que já estão em plena comercialização.

A presente revisão aborda a literatura referente ao uso de enzimas no descascamento das madeiras, na remoção de resinas, na deslignificação biológica de cavacos, nas alterações do processo de branqueamento, na melhoria da qualidade das fibras secundárias e das técnicas de tratamento dos efluentes.

Enzimas no descascamento das madeiras

A remoção das cascas é o primeiro passo no processamento da madeira e é exigida em função do escurecimento que esta fração da matéria-prima causa nos produtos finais. O limite entre a madeira e a casca é o câmbio. As características do câmbio incluem elevados teores de proteínas e de pectinas e a ausência ou baixos teores de ligninas (Ratto e col. 1993). O tecido cambial também possui polissacarídeos (celuloses, pectinas, xiloglucanos e arabinogalactanas) e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Os conteúdos de pectina nas células cambiais variam em função das diferentes espécies de madeiras. Enquanto exemplares de *Pinus ponderosa* apresentam cerca de 8,5%, o material oriundo da espécie *Pinus silvestris* é majoritariamente composto por pectinas. Enzimas específicas para a hidrólise das camadas do câmbio e do floema se demonstraram capazes de facilitar a remoção da casca (Viikari e col. 1989). Em um estudo com *spruce* (*Picea abies*, Ratto e col., 1993), foram determinados os gastos de energia na presença e na ausência de poligalacturonase, poli (metoxi-galacturonídeo) liase, xilanase e endoglucanase, tendo sido o melhor resultado obtido com *Pectinex Ultra SPL*. O efeito do pré-tratamento enzimático sobre o consumo de energia para descascamento da madeira mostrou que é possível obter até 80% de decréscimo com as enzimas pectinolíticas. Além da poligalacturonase, as enzimas lectinliase e xilanase estavam também presentes na maioria das preparações mais eficientes. Devido à complexa composição do câmbio e do floema, é de se supor que estas outras enzimas que hidrolisam os vários

* Nelson Durán, Elisa Esposito, Julio Silva Araujo Neto, Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, Universidade Estadual de Campinas e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
Trabalho apresentado no minissimpósio da Indústria Papelaria e Universidade Biotecnologia de Enzimas, junho de 1994.

componentes da casca interna contribuam significativamente para um descascamento mais econômico.

Branqueamento de polpas

É na etapa de branqueamento da polpa que aparecem as substâncias mais nocivas ao meio ambiente. A luta por efluentes menos tóxicos é quase inteiramente a luta por técnicas de branqueamento isentas de cloro e derivados.

A substituição do cloro no branqueamento tem se expandido muito ultimamente e tem gerado ganhos no contexto do impacto ambiental. A eliminação do cloro elementar melhora a cor do efluente, diminui a quantidade de organoclorados e, particularmente, a quantidade de dioxinas presentes (Pryke, 1989). Com todas as vantagens da introdução do dióxido de cloro, não pode ser esquecido que a formação de cloratos é proporcional à quantidade de dióxido de cloro utilizado (Boman e col. 1991) e que o clorato é um potente herbicida e um algicida poderoso, particularmente para as algas pardas. Assim, mesmo efluentes derivados de plantas que não usam cloro elementar, e que o tenham substituído inteiramente pelo dióxido, também têm de ser tratados antes de sua eliminação no meio ambiente (Worster e Bugajer, 1990; Bryant e col. 1987).

A busca de oxidantes que minimizam a toxicidade dos efluentes

Até os anos 70, o branqueamento com oxigênio não tinha sido implementado, em grande escala, em função dos danos ocasionados às fibras celulósicas. A adição de sais de magnésio, com consequente proteção daquele polissacarídeo, permitiu uma grande ampliação de seu uso. Combinações com peróxido de hidrogênio e ozônio têm criado seqüências de branqueamento de grande aceitação (Basta e col., 1992). Entretanto, o uso de oxigênio (Bowen e Shu, 1990) e do ozônio (Joensu, 1991; Byrd e col. 1992) ainda apresentam limitações quando usados em escala industrial (Bowen e Shu, 1990). Tais limitações são, provavelmente, a causa da manutenção do dióxido de cloro na grande maioria das plantas de branqueamento em todo o mundo.

O uso de enzimas em um pré-tratamento biológico

Muitas tentativas foram feitas para que fungos ligninolíticos se inserissem em

uma etapa precoce do branqueamento para a obtenção de celulose. Em 1979, Kirk e Yang demonstraram que o fungo *Phanerochaete chrysosporium* deslignificava polpa kraft de *Pinus*. Uma redução de 50 a 70% do valor *kappa* foi obtido após um período de seis a oito dias. Embora a viscosidade da polpa diminuísse, suas novas propriedades permitiam melhores resultados no branqueamento por métodos convencionais (Kirk e Yang, 1979). Em condições similares, Tram e Chambers (1987) foram capazes de remover 34% do conteúdo de lignina em 10 dias de tratamento com *P. Chrysosporium* sem nenhuma extração alcalina. Com um cultivo líquido do mesmo fungo, foi possível diminuir o valor *kappa* de 33 para 10 em duas semanas (Pellinen e col., 1989). *Trametes (Coriolus) versicolor* aumentou a alvura da polpa kraft de madeiras duras de 36 a 55%, com uma diminuição correspondente do valor *kappa* de 12 para 8,5 (Kirkpatrick e col., 1989). Usando o mesmo organismo, Paice e col. (1989a) demonstraram uma melhor resistência da polpa e uma diminuição da viscosidade (Paice e col., 1989b; Paice e col., 1990; Bourbonnais e Paice, 1992). Os efeitos da lignina residual nas polpas branqueadas com *T. versicolor* foram estudados recentemente (Reid e Paice, 1994). Polpas de *Eucalyptus* tratadas com *P. chrysosporium* mostraram uma redução de 55% do valor *kappa*, sem perda significativa da resistência da polpa (Mehta e Gupta, 1991). Ensaio com fungos ligninolíticos imobilizados têm levado a resultados bastantes positivos na deslignificação (Kirkpatrick e col. 1990). Entre as muitas patentes que foram depositadas nesta área do conhecimento nos últimos anos, aquela originada dos estudos de Nishida e col. (1991) descreveu a eliminação de 75% de lignina em polpa kraft, de 35 a 71% em polpas semiquímicas e de 2-35% em polpas mecânicas. Trabalhos recentes têm mostrado que, em condições adequadas, resultados bastante promissores podem ser obtidos (Fujita e col. 1991; Dawson-Andoh e col. 1991).

O tratamento de polpa kraft branqueada com oxigênio e com ajuda do fungo IZU-154 mostrou que a alvura aumentava de 17 a 22 pontos percentuais, ao mesmo tempo em que o valor *kappa* diminuía de 10,1 para 6,4, após um tratamento fúngico com duração de cinco dias. A combinação de Fungos-E-P (OFEP) forneceu uma polpa de 86,3% ISO. As propriedades da

polpa OFEP foram similares àquelas oriundas de um branqueamento com uma seqüência convencional OCED (Murata e col. 1992).

O tratamento de pastas kraft de madeiras macias com o fungo IZU-154 por cinco dias aumentou a alvura de 23% ISO a 27% ISO. As propriedades óticas, os níveis de estiramento e os rendimentos de uma polpa FCED foram comparáveis àquelas obtidas convencionalmente (CEDED), restando a vantagem de um consumo de cloro significativamente menor (Fujita e col., 1993).

No entanto, todas as promessas oriundas de todos estes ensaios com diferentes fungos ligninolíticos, com diferentes tipos de madeiras e variadas condições de processo, se tornam mais ou menos inúteis quando se considera o longo tempo de processo para obtenção dos desejáveis níveis de deslignificação. A lentidão destes processos fúngicos os inviabiliza totalmente na indústria papelera (Reid e col. 1990; Reid e Paice, 1994). Estudos de otimização e de seleção de novas cepas devem ser feitos de maneira a encurtar esses períodos de ação e, conseqüentemente, trazer a viabilidade técnica e econômica.

Para superar tal dificuldade, a estratégia lógica é o uso da tecnologia enzimática. Desta forma, não se esperariam nem o tempo necessário para os fenômenos de transporte de nutrientes, nem a entrada de cada fração micelial no devido metabolismo secundário produtor das enzimas adequadas.

As enzimas que degradam a lignina foram as primeiras a serem experimentadas com vistas à diminuição do uso de produtos químicos e de energia na produção de polpas de celulose. Com preparações, ainda não obtidas em larga escala, alcançou-se redução significativa do valor *kappa* de algumas polpas kraft (Egan e Miserlis, 1986), enquanto resultados de Viikari e col. (1986) mostraram reduções pouco significantes em outras (Kantelin e col. 1993; Buchert e col. 1993; Viikari e col. 1994). Com polpas kraft de *Eucalyptus* foi obtida uma redução de 14% do valor *kappa* (Milagres e Durán, 1992). Resultados similares foram obtidos com polpa organosolv (ácido fórmico) (Milagres e col. 1992). Reduções do valor *kappa* e aumentos da alvura em solventes orgânicos também foram observados (Pettersson e col. 1988a, b). Especificamente voltadas para este tipo de branqueamento, também têm sido solicitadas

algumas patentes (Farrel, 1987a, b; Olsen e col. 1989). Um estudo sobre degradação de ligninas por ligninases, com vistas ao melhoramento das propriedades mecânicas de polpas termomecânicas (*Pinus pinaster*) e para melhorar o branqueamento de polpas *kraft* (madeiras macias e duras), mostrou que nas polpas termomecânicas decresce a alvura, mas não tem efeito sobre as propriedades mecânicas ou sobre o conteúdo de lignina; ao contrário, o tratamento enzimático, antes do branqueamento químico, aumenta a alvura e diminui o conteúdo de lignina na pasta *kraft* (Arbeloa e col. 1992).

O branqueamento de polpas *kraft* de madeiras duras por *T. versicolor* foi acompanhado de liberação de metanol, que é produzido juntamente com a desmetilação da polpa. Foi observada também uma desmetilação parcial com a lacase isolada do fungo. Quando era adicionado o 2-2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline)-6-sulfonato (ABTS), uma rápida desmetilação foi observada, seguida da diminuição do valor *kappa*. A viscosidade da polpa diminuiu levemente no tratamento com lacase (Bourbonnais e Paice, 1992). Uma preparação com atividade lacásica obtida com cultivos de *Phlebia radiata* diminuiu levemente os pesos moleculares das ligninas. A branqueabilidade da polpa *kraft* de pinho, aparentemente, só é melhorada de forma significativa pela utilização de lacase antes do tratamento com xilanases (Kantelinen e col. 1993). No branqueamento das pastas com *T. versicolor*, a desmetilação foi mais eficiente com manganês peroxidase e não por lacase (Paice e col. 1993). Viikari e col (1987) encontraram resultados similares com uma mistura de ligninases e hemicelulases (estas últimas provenientes de *Aspergillus awamori* e *Streptomyces olivochromogenes*). Recentemente, esta metodologia foi aplicada à polpa *kraft* de *Eucalyptus*, obtendo-se uma diminuição do valor *kappa* de 16% (14,1 para 11,9) (Milagres e col. 1992).

Branqueamentos biomiméticos têm dado excelentes resultados (hemina, hemoglobina, porfirinas, etc.) (Paszczynski e col. 1988; Pettersson e col. 1988; Durán, 1989; Shimada e col. 1989; Erismann e col. 1989; Erismann e col. 1990; Labat e col. 1990).

Bem depois de todos os estudos realizados com ligninases e com outras enzimas envolvidas na ligninólise, começaram a aparecer na literatura muitos trabalhos focalizando o uso de xilanases

como bases para um tratamento enzimático anterior ao branqueamento químico. (Biely, 1991; Viikari e col. 1991a, b; Esposito, 1993). Polpas de pinho não branqueadas, quando tratadas com xilanases de bactérias, permitiram um marcante aumento na deslignificação, com uma redução concomitante do uso de cloro (Viikari e col. 1986). O branqueamento com peróxido, após o biotratamento da polpa *kraft* de *abedul* (*birch*), foi duas vezes mais eficiente na remoção da lignina do que o tratamento feito exclusivamente por peroxidação (Kantelinen e col. 1988). Este processo tem sido otimizado devido à produção de xilanases preparadas com clones selecionados de *E. coli* (Jurasek e Paice, 1988). As endoxilanases parecem ser as enzimas mais importantes, particularmente para o tratamento de polpas *kraft* de madeiras duras, e podem remover até 20-30% dos xilanos da polpa (Clark e col. 1991). As perdas da viscosidade foram evitadas pelo ajuste da concentração de enzima, por tempos de reação mais adequados e também por mudanças no processo de produção da preparação enzimática (Kantelinen e col. 1991). Em madeiras macias (*Pinus radiata*), a adição de mananase melhorou os resultados (Clark e col. 1991). O uso de *Cartazyme HT* pelos mesmos autores levou a resultados similares: polpas *kraft* e *kraft* pré-branqueadas com oxigênio atingiram níveis similares após tratamento com a enzima, mas o pré-tratamento enzimático removeu cerca de duas vezes mais polissacarídeos da polpa *kraft* pré-branqueada com oxigênio do que da polpa que não sofreu o pré-branqueamento (Allison e col. 1993).

O tratamento de polpa *kraft* (madeira dura) com xilanases (*Streptomyces lividans*) permite diminuir os produtos químicos necessários a qualquer seqüência posterior de branqueamento (Daneault e col. 1994). Uma polpa tratada previamente com xilanase e branqueada a 10% de substituição requer quase 80% menos de cloro e cerca de 5% a menos de dióxido de cloro do que as polpas controles, atingindo-se valores de alvura de 90% e grande melhoria da viscosidade (Du Manoir e col., 1991; Senior e col. 1992; Senior e Hamilton, 1992; 1993). Resultados similares foram obtidos por Eriksson (1992) utilizando xilanases de *Aureobasidium pollulans* para madeiras moles e duras em seqüências de branqueamento oxigênio-xilanase-dióxido de cloro-peróxido-dióxido de cloro (seqüência

OXDPD). Deste mesmo fungo, foram isoladas enzimas de pesos moleculares altos e baixos. As enzimas de baixo peso molecular apresentaram atividades sobre xilanas (de *abedul* ou *birch*), sobre mananas e sobre uma amostra de carboximetilcelulose. Ao contrário, as enzimas de alto peso molecular exerciam somente atividade endoxilanásica. As polpas tratadas por 90 minutos permitiram uma considerável liberação do complexo lignina-polissacarídeo, particularmente quando a fração de baixo peso molecular foi utilizada (Yang e Eriksson, 1992; Yang e col. 1992). Quando o tratamento com estas xilanases foi combinado com tratamentos com oxigênio, ozônio e peróxido (método *EnZone*) sobre madeira dura (*Eucalyptus grandis*), obtiveram-se resultados interessantes (Yang e col. 1993). A polpa *kraft* de *Eucalyptus* deslignificada vis OXZ (oxigênio-xilanase-ozônio) tinha, consistentemente, valores de *kappa* mais baixos e alvura mais alta do que a mesma polpa processada com a seqüência OZ (oxigênio-ozônio). As polpas deslignificadas pela seqüência OXZP (oxigênio-xilanase-ozônio-peróxido) apresentaram uma alvura de 85,0-90,0% ISO, enquanto foi medida uma alvura de 78,0 a 84,7% ISO após o uso da seqüência OZP. A polpa *EnZone* tem maior estabilidade na alvura, índice de tração inalterado, índice de rasgo levemente menor e viscosidade significativamente menor (10 mPa.s contra 24,6 mPa.s no controle ODEDED). Estudos similares com *Pulpzyme HA* com pinho foram feitos na seqüência XZED e X(DC)ED. As efetividades de branqueio foram boas, mas não a seletividade (Allison e Clark, 1994). O tratamento de polpas *kraft* de *Eucalyptus* com 0,1% de *Pulpzyme HA*, por uma hora, reduz em 31% o uso de cloro ativo na etapa de cloração e possibilita 30% de redução do cloro orgânico total (TOC) no efluente de extração. As alvuras se mostraram semelhantes e as propriedades de tração não foram afetadas; notou-se, entretanto, uma pequena diminuição do rendimento (Baipai e col. 1993).

Uma experiência em uma planta industrial foi realizada com *Cartazyme HS* (Turner e col. 1992). A cloração na seqüência CD(EO)D(EP)D foi eliminada e substituída pelo tratamento com enzima, gerando-se a seqüência (EOP)D(EP)D. Uma polpa de 88% ISO foi obtida usando-se altas dosagens de dióxido de cloro e de peróxido de hidrogênio. Sem pré-

tratamento enzimático, esta seqüência atinge 82,5% ISO, comparáveis à alvura obtida com o uso de produtos químicos. Outra experiência foi realizada no Canadá (Scott e col. 1993). A enzima utilizada nesta experiência em planta industrial foi a *Albazyme 10* (Gencor, Finlândia) obtida do fungo *Trichoderma longibrachiatum*. A enzima, atuando sobre a polpa acidificada, reduz o cloro ativo em 28% para uma seqüência XD(100) EopDED, em madeiras macias. O nível de halogênios combinados organicamente e absorvíveis (AOX) dos efluentes também decresceram 15%.

Interações de xilanases com polpas comerciais indicam uma grande sensibilidade à inativação, bem como variações nos resultados em função da fonte de obtenção das enzimas (Senior e col. 1991). Supõe-se que o tratamento enzimático se baseia, fundamentalmente, na ação das endoxilanases que eliminam os xilanos reprecipitados e aumentam a permeabilidade das fibras e, em decorrência, a extração da lignina (Kanteline e col. 1991; Viikari e col. 1991b).

Tanto no simpósio sobre xilanos e xilanases, realizado na Holanda (Visser e col. 1992), quanto na Conferência de Polpação e Branqueamento na Suécia (Fleming, 1991), ambos em 1991, tudo corroborado pela revisão de Grant (1993), alguns dos aspectos sobre a utilização em escala industrial das xilanases ficaram bem esclarecidos. A *metsa-Sellu* da Finlândia (Koponen, 1991) completou estudos com o uso de xilanases que geraram 38.500 ton de polpa em cinco dias de experimentação: o uso de cloro foi diminuído em 21% na fase-C. A ICI do Canadá relatou o uso de uma preparação xilanásica (*Ecopulp*) que foi efetiva no tratamento de polpas de madeiras duras, atingindo-se 40% de redução da carga de cloro e obtendo-se uma alvura de 91% no branqueamento final. Duas enzimas produzidas pela *Novo-Nordiski* foram testadas em condições alcalinas, atingindo-se entre 10 a 20% de redução do cloro. A *Cartazyma* da *Sandoz* foi testada em madeiras duras e moles. A enzima foi efetiva em polpa com valor $kappa$ 13,5, o que significa que o cloro poderia ser completamente substituído. A empresa *Logen* de Ottawa, Canadá, tem posto a prova sua própria xilanase e demonstrado reduções da ordem de 15 Kg de cloro/ton de polpa e de 7 Kg de dióxido de cloro/ton de polpa (Tolan e Canovas, 1992). A *Cellulose du Pin*, utilizando

xilanases em polpas de madeira dura, obteve uma redução de 84% do consumo de dióxido de cloro para o mesmo valor final de alvura (Pommier, 1991). A *VAI-Alpine*, na Áustria, publicou recentemente que as xilanases desta empresa podem substituir até 40% do cloro. O custo da enzima parece ser igual ou menor do que os custos dos compostos químicos para cloração ou oxigenação (Sinner, 1991; Sinner e Preselmayr, 1992). De acordo com mini-revisão recentemente publicada (Grant, 1993), a indústria químico-farmacêutica *Sandoz* estima que, no início de 1993, cerca de 20 plantas industriais em todo o mundo estavam usando preparações com atividade xilanásica em suas operações rotineiras e que este número deveria ter chegado a 40 no final do mesmo ano.

Mecanismo de ação das xilanases

O mecanismo através do qual as xilanases atuam sobre as polpas ainda não está totalmente esclarecido. Existem algumas teorias que tentam explicar a redução dos níveis de cloro usados no branqueamento através da hidrólise da xilana. Uma delas sustenta que a hidrólise da xilana dentro da parede celular resultaria na formação de microporos, promovendo-se um aumento da área específica da polpa e, conseqüentemente, maior acessibilidade aos agentes de branqueamento (Noe e col. 1986). Segundo outra teoria, as xilanases teriam a função de remover a xilana reprecipitada na superfície da polpa, em razão da redução da alcalinidade no cozimento e da obtenções de valores de pH abaixo de 13. A remoção desta xilana aumentaria a permeabilidade da fibra e a acessibilidade dos reagentes às ligninas (Viikari e col. 1991b; Kantelinen e col. 1993 (Fig. 2A). Entretanto, em trabalho recente com polpas de madeiras duras e moles, mostrou-se que, com xilanases de *Trichoderma reesei* (não valendo a generalização para outras xilanases), a concentração de enzimas, acima de certos valores, não afeta a deslignificação, chegando-se sempre a um limite de 20%. Aparentemente, com estas xilanases, o fato se dá devido a uma limitação de acessibilidade aos substratos (Viikari et al. 1994). Uma terceira teoria se baseia em estudos estruturais. Sugere-se que, estando a lignina ligada a polisacarídeos através dos complexos lignina-carboidratos e que algumas das ligações em tais complexos são alcali-resistentes, não se daria a hidrólise destas últimas

durante o cozimento *kraft*. Conseqüentemente, algumas ligninas residuais permaneceriam ligadas à hemicelulose após o cozimento (Buchert e col. 1992; 1993). Nesta teoria, o tratamento enzimático hidrolisaria a xilana a pequenos fragmentos, permitindo que a lignina associada a essas pequenas cadeias de hemicelulose fosse mais facilmente removida nas extrações subseqüentes (Paice e col. 1992) (Figura 2B).

Estudos importantes foram realizados sobre a liberação de cromóforos em polpas *kraft* após o tratamento com xilanases de *Streptomyces roseiscleroticus* (Patel e col. 1993).

Mais recentemente, estudos com xilanases termoestáveis de bactérias mostraram novos caminhos de pesquisa na indústria papelreira. Foi demonstrado que (i) xilanases de *Thermomonospora fusca* diminuem o valor de $kappa$ de madeira dura significativamente a pH 9,0 e a 79°C (Davis e col. 1992); (ii) que xilanases de *Bacillus stearothermophilus* Y-6 eliminaram, parcialmente, as ligninas de madeira mole a 65°C e a pH 9,0, sem perdas na viscosidade da polpa (Shoham e col. 1992) e (iii) que as xilanases de *Diclyoglomus sp. cepa B1* mostraram-se eficientes no branqueamento de polpa *kraft* de pinho a 90°C e pH 7; esta enzima também se mostrou eficiente a pH 9,0 (Ratto e col. 1994).

Enzimas na redução do teor de resinas (*pitch*) das matérias-primas ou das polpas

O termo *pitch* refere-se a uma variedade de resinas orgânicas de baixo e médio peso molecular e aos depósitos que estas resinas originam (Dreisbach e Michalopoulos, 1989). *Pitch* inclui ácidos graxos, resinas ácidas e seus sais solúveis e ésteres de ácidos graxos com glicerol e esteróis, como também as graxas e ceras. Em madeiras não-tratadas, o *pitch* encontra-se localizado nas células parenquimais e sobre a superfície das fibras. Estes depósitos podem ser encontrados nas polpas, nos moinhos da empresa papelreira e podem alterar fortemente a qualidade do produto, a velocidade da produção, diminuir a eficiência da lavagem da polpa, a centrifugação e o refino. Podem também interromper a operação das máquinas de fabricação de papel, gerar sujidades, causar o aparecimento de buracos, picotes e crostas na folha de papel final.

O tratamento com lipases (*resinases*) leva a um aumento considerável da

produtividade, mantendo a qualidade do produto final (Bjorkling e col. 1991). A redução da concentração das resinas com ajuda da preparação comercial *Resinase A* atingiu uso industrial rotineiro na *Jujo Paper's Ishinomaki* (Grant, 1991; 1992). Esta empresa utiliza 10 a 30% de serragem de pinho vermelho para produzir papel e jornais e para confecção de listas telefônicas. Nos ensaios-controles com 50% de madeira não tratada, a *Resinase A* foi adicionada anteriormente aos discos refinadores, localizados antes dos misturadores. Acredita-se que a maioria dos efeitos ocorre no primeiro dos dois misturadores intermediários localizado entre os refinadores e os misturadores, onde as condições foram controladas a 4% de consistência, temperatura na faixa de 40 a 50° C e pH entre 6,5 e 7,0.

Uma redução de *pitch* foi conseguida em pilhas de cavacos no *Repligen Sandoz Research*, utilizando-se o produto fúngico *Cartapip 58*. O fungo produz lipases e hemicelulases, com ausência de celulases e ligninas. Os ensaios foram realizados na *Bear Island Paper's Ashland*, Virginia Mill, nos Estados Unidos. Esta indústria utiliza pinho amarelo (*loblolly*) para a produção de polpa termomecânica e posterior obtenção de papel para jornais. Os cavacos foram molhados com *Cartapip 58* imediatamente após o corte. Em 12 dias, ocorreu uma redução de 46% na concentração de resinas no material biotratado, enquanto o lote-controle diminuiu somente 29%. As alvuras diminuíram diferentemente no lote-controle, 23%, no lote biotratado, 8%. O uso de produtos químicos no branqueamento posterior também foi reduzido no lote tratado com a preparação fúngica.

Recentemente, uma comparação entre a cepa de *Ophiostoma piliferum* e a cepa incolor (*Cartapip 58*) foi realizada. Este trabalho mostra que ambas colonizam por igual a madeira de *Pinus taeda* e os resultados em escala industrial sobre a polpa são iguais (Blanchette e col. 1992; Farrell e col. 1993). O efeito de *O. piliferum* sobre o pinho amarelo do Sul (*Southern Yellow pine*) foi estudado e excelentes resultados na eliminação das resinas foram obtidos (Brush e col. 1994).

Ensaio com polpas obtidas pelo processo sulfito e não branqueadas foram realizados. As polpas foram tratadas com *Resinase A* para reduzir o conteúdo dos triglicerídeos clorados, reconhecidamente a principal causa dos depósitos de *pitch* durante a fabricação do papel. A enzima

hidrolisou 86% dos triglicerídeos em duas horas e os ácidos graxos liberados do *pitch* foram extraídos com solução de hidróxido de sódio. O material resinoso clorado sem triglicerídeos e sem ácidos graxos livres foi menos adesivo do que o sistema original. Os resultados demonstraram que o conteúdo de triglicerídeos na polpa é o maior contribuinte para a adesão do *pitch* e o tratamento enzimático seguido por extração com hidróxido de sódio reduz a adesividade do *pitch* e pode ser usado para diminuir os depósitos formados durante a manufatura do papel (Fischer e Messner, 1992). Estudos com a mesma polpa e em escala piloto levaram às mesmas conclusões (Fujita e col. 1992; Fischer e col. 1993).

Várias patentes neste campo têm sido solicitadas (Held-Hansen, 1993; Pederzen, 1993; Fujita, 1994).

Por fim, trabalhos divulgados por pesquisadores do grupo *Repligen-Sandoz* nos informam que a preparação resinolítica *Cartapip 58* está no mercado desde o outono de 1990 (Farrell e col., 1993), não tendo sido encontradas estimativas sobre o número de usinas papeleiras que já estão fazendo uso continuado desta ou de outras preparações resinolíticas.

Enzimas na reciclagem do papel

No ano de 1986, ao redor de 600 milhões de toneladas de papel foram produzidos por mais de 1.500 indústrias papeleiras. Nos últimos anos, a evolução da tecnologia dos tratamentos em si, mas também das máquinas de papel, permitem aos produtores melhorar a qualidade dos papéis tanto na aparência, quanto em suas propriedades mecânicas.

A reciclagem do papel, atividade de grande relevância, quer em termos econômicos, quer ambientais, sofre várias limitações para atingir níveis de recuperação mais significante (Pommier e col., 1989).

Uma mistura de enzimas composta de celulases e hemicelulases apresenta um efeito notável sobre o processamento das fibras secundárias. Em baixas concentrações de enzimas, o escoamento (*freeness*) aumenta rapidamente após o contato, sem perdas das propriedades mecânicas do papel. Neste processo, pode ser utilizado papel de baixa qualidade para atingir boas propriedades mecânicas no produto final reciclado. Ensaio laboratoriais com papel industrial submetido à ação de enzimas levaram a uma sensível melhoria da drenabilidade e, em algumas das se-

quências, das propriedades mecânicas. O ponto chave nestas experiências é o controle do progresso da reação enzimática. As enzimas atuam sobre a superfície das fibras produzindo o efeito de descascamento (*peeling*). Se este descascamento é limitado e controlado, as enzimas fazem uma remoção adequada dos componentes superficiais; removem aqueles com grande afinidade pela água mas que contribuem pouco para a formação de pontes de hidrogênio entre as fibras e o dipolo água. Esta redução das interações polpa-água permitem melhor drenagem da suspensão de fibras secundárias, sem afetar as propriedades finais do papel.

Um estudo com a *Liftase A40* (mistura de celulases e hemicelulases), buscando avaliar o aumento da drenagem da suspensão de fibras secundárias, mostrou, na planta piloto, que se dá uma sensível diminuição do número de pontos superficiais capazes de formar pontes de hidrogênio. Como consequência, se dava um acentuado aumento do escoamento (*freeness*) (Pommier e col. 1990; Pommier, 1991).

Recentemente, foram estudadas modificações das fibras secundárias com celulases, hemicelulases e com a mistura de ambas sobre o papel de madeiras macias (Jackson e col. 1993). Os resultados são similares àqueles obtidos com *Liftases A40*, mas os finos com grande área superficial são atacados preferencialmente, resultando em um grande ganho no escoamento. Estudos microscópicos mostram que a superfície da fibra tratada é mais limpa do que aquela que não o foi.

De fato, o uso de enzimas para melhorar o processamento de papel industrial vem se mostrando muito promissor. O tratamento enzimático aumenta a alvura e a limpeza da polpa reciclada e, de acordo com patentes depositadas (Baret e col. 1991; Pommier e col., 1991), um benefício adicional é a melhor operação dos espessadores devido à melhor drenagem da polpa (Baret e col. 1991; Pommier e col. 1991).

A destintagem (*deinking*) nas indústrias de reciclagem é uma etapa complexa que dificulta a obtenção de papéis reciclados de baixa coloração (Ferguson, 1992a, 1992b). Por outro lado, o impacto ambiental deste processo é enorme, de vez que metais pesados, dioxinas, dibenzofuranos e clorofenóis surgem nos efluentes das plantas industriais. Alguns estu-

dos já foram iniciados nesta área (Richardson e col. 1992) e patentes relacionadas com o uso de enzimas na destintagem foram depositadas (Hagiwara, 1990; Fukunaga, 1990). Os trabalhos experimentais, que fundamentaram os pedidos das patentes, utilizaram papel de jornal usado e papéis impressos em *off-set* com tintas de diferentes cores. Em todos estes trabalhos, o tratamento enzimático foi adicionado aos métodos de repolpação alcalinos e, em geral, com o uso de celulases capazes de atuar em meio ácido.

Em 1993, Prasad (1993) divulgou resultados de destintagem enzimática operando com celulases alcalinas e com papéis de tratamento muito difícil, a saber: impressões xerográficas e a *laser*. As conclusões destes trabalhos são as seguintes: a) sem nenhum tratamento químico e após a flotação, a alvura da polpa tratada enzimaticamente era melhor em quatro unidades ISO, quando comparada à alvura da polpa não tratada; b) a alvura não apresenta correlação com a remoção de sujeiras, observando-se que o tratamento enzimático condicionou um nível de limpeza e um rendimento compatíveis com a produção de papéis finos; c) o processo de destintagem por flotação, modificado, oferece uma alternativa viável para a flotação alcalina clássica com a utilização de silicato de sódio, soda cáustica, coletores químicos e peróxido de hidrogênio; d) as condições enzimáticas utilizadas (polpa com 3% de consistência, pH 9,0, temperatura de processo de 40°C e tempo de reação de 30 min) podem facilmente ser adaptadas para uma operação normal de uma indústria papelreira; e) o tratamento enzimático pode reduzir significativamente os finos e melhorar as propriedades de escoamento e de resistência e f) não ocorre amarelamento das fibras em função de não utilizar etapas alcalinas do processo. Recentemente, outro estudo sobre o tema fala a favor da maior eficiência do uso de preparações celulolíticas e/ou xilanolíticas, quando comparado com os métodos químicos clássicos de destintagem (Jeffries e col. 1994).

Enzimas no tratamento biológico dos efluentes

As técnicas, atualmente empregadas, são aquelas conhecidas como lagoas aeróbicas e lodos ativados (Durán e Esposito, 1993). Pouco uso se faz dos tratamentos anaeróbicos. Algumas revisões sobre este tema já foram publicadas (Lee

e col. 1989; Rintala e Puhakka, 1994). Embora, normalmente, a toxicidade aguda seja eliminada nas lagoas anaeróbicas, Eriksson e Kolar (1985) demonstraram que ligninas cloradas de alto peso molecular não podem ser degradadas por consórcios de bactérias isoladas destas lagoas. Estes aspectos foram discutidos por Roy-Arcand e Archibald (1993). O tratamento poderia ser efetivo se a biomassa pudesse ser separada do efluente e recirculada (Ek e Kolar, 1990).

Os lodos ativados proporcionam maior redução dos compostos clorados (40%) em comparação com as lagoas aeróbicas (25%) (Eriksson, 1992). O processo consiste, basicamente, na agitação dos efluentes na presença de organismos e de oxigênio atmosférico, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. Embora mais eficiente, o lodo ativado apresenta uma séria desvantagem representada pela formação exagerada de resíduos sólidos. Atualmente, já existem programas que consideram a biorremediação destes lodos através de seu uso como fertilizantes (por exemplo, Riocell Celulose, Porto Alegre, Brasil).

A ultrafiltração do efluente da extração alcalina, associada a outro método de tratamento, parece ser uma alternativa de custo razoável (US\$ 3 a 4/ton de polpa) e de grande significado (Boman e col. 1991). Após a ultrafiltração, o efluente permanece com toxicidade aguda, tendo necessariamente que passar por um tratamento biológico como complemento do processo de ultrafiltração.

Os tratamentos que usam sequencialmente uma fase anaeróbica e outra aeróbica representam a tendência atual em todo o mundo, já que aumenta consideravelmente a eficiência do processo global, reduzindo o tamanho das estações e os tempos de residência (Fairbanks, 1992; Eriksson, 1992; Ek e Eriksson, 1989). Na Finlândia, está sendo aplicado o tratamento combinado anaeróbico-aeróbico chamado *Enso-Fenox*. A redução dos halogênios orgânicos adsorvíveis (AOX), embora semelhante àquela obtida nas lagoas aeróbicas, é obtida em apenas sete horas, enquanto nas lagoas a mesma redução exige até sete dias de processo.

Infelizmente, nestes procedimentos, a porção de compostos de alta massa molecular dos AOX não é degradada (Ek e Eriksson, 1989). Uma alternativa que está sendo analisada é a utilização dos biorreatores com fungos. Num estudo rea-

lizado por Fahmy e col. (1991; 1994 ab), foram comparados um reator aeróbico de leito fluidizado com reatores anaeróbicos-aeróbicos em série e com um outro reator anaeróbico-aeróbico, com recirculação. Haggblom e Salkinoja-Salonen (1991) estudaram um tratamento seqüencial de reatores aeróbicos de leito fluidizado e aeróbico de leito fixo. Outro modelo que tem sido empregado com êxito é aquele que se baseia em um reator biológico rotatório de contato (RBC), onde fungos são imobilizados na superfície de discos (Prouty, 1990). Comparações entre os reatores RBC e outros têm sido realizadas (Prasad e Joyce, 1991). Reatores de leito fixo com madeira balsa para a imobilização dos fungos e um outro, de mistura perfeita com os fungos imobilizados em esferas de alginato, mostraram-se eficientes na degradação de clorofenóis (Lawandowski e col. 1990). Outros ensaios foram realizados com outros biorreatores de mistura perfeita que utilizaram materiais plásticos para a imobilização dos fungos ligninolíticos (Lankinen e col. 1991; Anselmo e Novais, 1992a, 1992b).

A combinação de um método físico (ultrafiltração) com o tratamento biológico foi estudada por Boman e col. (1991). Primeiro o efluente E1 foi passado em uma membrana de ultrafiltração e, depois, por três sistemas biológicos sucessivos: lagoa aerada, reator fúngico e filtro anaeróbico. A combinação dos tratamentos (físico e biológico) demonstrou-se ser uma excelente alternativa, já que reduz os valores de DQO (72%), de DBO (95%) e dos AOX (66%) (Eriksson, 1992).

Embora tenham surgido resultados sobre a eficiência das lacases, das peroxidases e das ligninases no tratamento dos efluentes das plantas de produção de celulose e papel, parece ser necessário que as enzimas estejam imobilizadas para que as técnicas sejam economicamente viáveis. Bons resultados têm sido obtidos na imobilização de peroxidases e de ligninases de *Chrysonilia sitophila* em *Sepharose* (Ferrer e col. 1991), em parte porque se observa maior estabilidade, dado fundamental para a devida utilização (Ferrer e col. 1992). A lacase e a peroxidase de rábano (sem nenhuma imobilização) foram eficientes na descoloração de efluentes fenólicos, mas a lacase imobilizada em alginato e por copolimerização com gel foi extremamente mais eficiente (Davis e Burns,

1990). A peroxidase imobilizada (Siddique e col. 1993) e livre (Nicell e col. 1993); (Nakamoto e Machida, 1992) se mostraram eficientes na biodegradação de fenóis e de clorofenóis. Estudos mecanísticos com cloroperoxidasas, peroxidase de rábano, lignina peroxidase, Mn-peroxidase e lacases também foram realizados (Aitken, 1993; Aitken e col. 1994).

Recentemente, Camarota e Sant'Anna (1992) publicaram um modelo de reator de leito fixo (*packed bed*) combinado com uma alça de ar (*air-lift*) (Sant'Anna, 1992). Neste biorreator, foram feitas comparações do fungo *P. chrysosporium* no tratamento de efluente *kraft*, com os resultados obtidos em um biorreator giratório (RBC, método MyCor) (Chang e col. 1987; Prouty, 1990). Os tempos de residência no reator mais recente são de aproximadamente cinco dias com cerca de 70% de descoloração, 64% de remoção de fenóis e 50% de redução de DQO.

Utilizando cepas selecionadas de *Leptinula edodes* (Esposito e col. 1991), no mesmo tipo de biorreator, foram obtidos resultados similares na descoloração e na eliminação de fenóis, com maior eficiência na redução de DQO (67%) (Durán e col. 1992). Um método combinado que tem dado resultados de grande potencial é o pré-tratamento fotoquímico do efluente seguido por um tratamento fúngico (Esposito e col. 1992; 1993; Durán, 1992; Durán e col. 1991; Durán e col. 1993, 1994) *Aspergillus niger* apresentou-se como uma cepa importante no tratamento de efluentes (Duarte e Costa-Ferreira, 1994).

Biodeslignificação de cavacos

Poucos estudos sistemáticos foram publicados sobre a deslignificação biológica com o uso de fungos (Durán e col. 1990; Speranza e col. 1993; Messner e Srebotnik, 1994). Por exemplo, cavacos tratados por duas semanas com *P. chrysosporium* requerem 25% a menos de energia do que os cavacos não tratados, na etapa de refinação para atingir as mesmas propriedades mecânicas. Madeira de álamo (*asperi*) e de abedul (*birch*) tratadas por 12 dias com *Phlebia tremellosus*, apresentaram uma perda de peso de 30% e de 31%, respectivamente, e uma perda de lignina de 70%. Por fermentação sólida de madeira de álamo com *Merulius tremellosus*, por oito semanas, 52% das ligninas foram eliminadas, mas houve perda de apenas 12% do peso total. Pré-tratamentos de cavacos com fungos me-

lhoraram as propriedades das polpas mecânicas não branqueadas (Myers e col. 1988). A biodeslignificação dos cavacos de *Pinus radiata* por *Chrysonilia sitophila* mostrou uma lignina modificada e mudanças morfológicas dos tecidos da madeira. Após este pré-tratamento, com polpação acetosolv, observou-se um de aumento de 4% no rendimento da polpa e um aumento na velocidade de deslignificação (Ferraz e col. 1989; Ferraz e col. 1991; Ferraz e Durán, 1992; 1994).

Nos últimos anos, foi relatado que um pré-tratamento fúngico de cavacos. Logo seguido de uma polpação mecânica (polpa biomecânica), melhorou as propriedades de resistência do papel obtido, possibilitou melhor consumo de energia elétrica e reduziu os impactos ambientais (Leatham e col. 1990; Setliff e col. 1990). Recentemente (Ahtar e col. 1992; 1993), cavacos de pinho (*loblolly*) foram tratados com várias cepas de *Ceriporiopsis subvermisporea* por quatro semanas, antes da polpação mecânica. As perdas de peso dos cavacos durante o tratamento fúngico atingiram níveis de 4 a 7% e a economia de energia elétrica ficou na faixa de 21 a 37%, em relação aos controles não tratados. Algumas das propriedades físico-químicas do papel melhoraram significativamente. Ensaio de biodeslignificação com *Punctularia artropurascens* (Speranza e col. 1993) mostraram que o máximo de perda de lignina foi obtido com *Eucalyptus grandis*, após oito semanas (40,7%) e com perda de peso da ordem de 5,5%. Neste caso, encontraram-se níveis de atividades lacase, peroxidase, B-glucosidase, lignina peroxidase e manganês peroxidase iguais a 19, 10, 17, 6 e 150 U/L, respectivamente.

Alterações qualitativas ou quantitativas no conteúdo lignínico das árvores

A lignina vem da polimerização desidrogenativa iniciada enzimaticamente a partir de três precursores: o álcool coniferílico (unidade guaiacila), o álcool p-cumarílico (unidade hidroxifenólica) e o álcool sinapílico (unidade siringílica). Tipicamente, as ligninas das madeiras macias contém, principalmente, resíduos de guaiacilas, com poucos resíduos siringílicos. Entretanto, as ligninas de madeiras duras possuem quantidades aproximadamente iguais das duas unidades formadoras. Nos dois tipos de ligninas se encontram baixos teores de resíduos p-hidroxifenólicos (Hwang e col. 1991;

Eriksson, 1992).

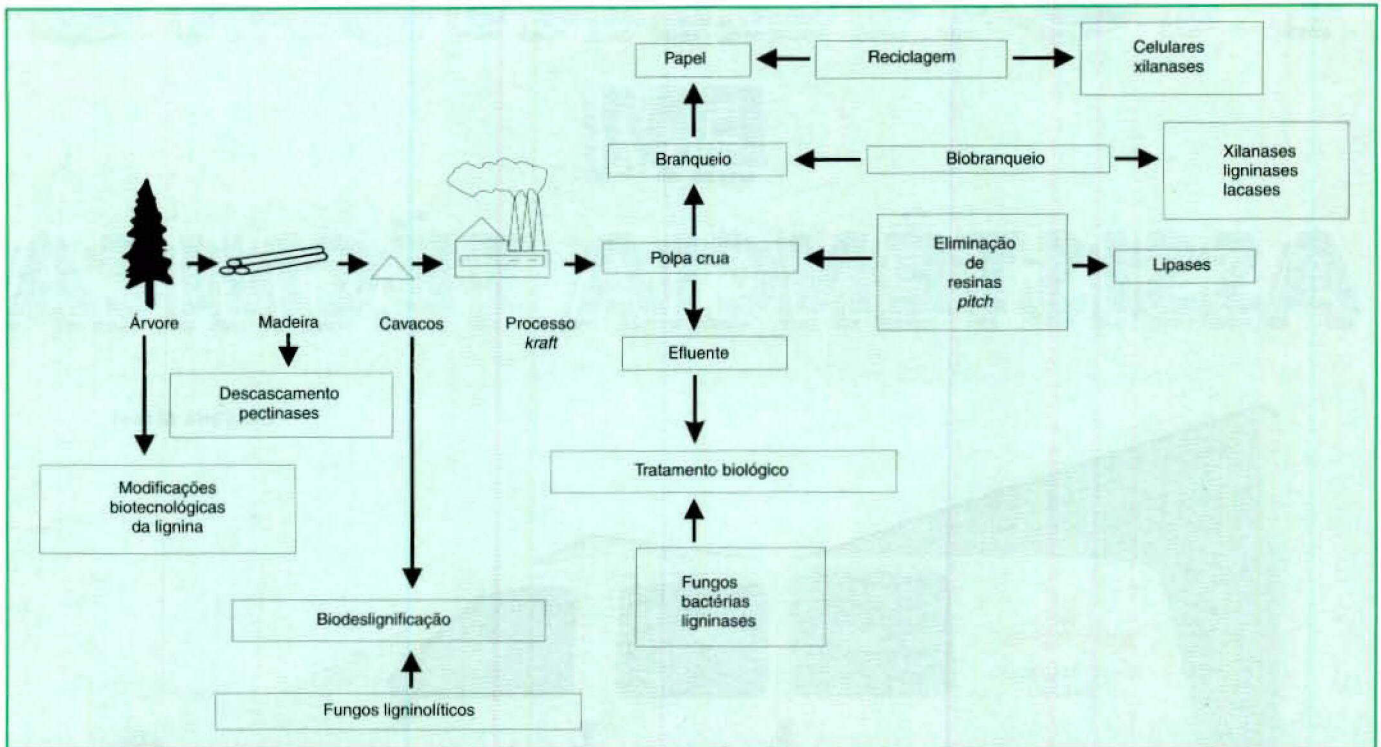
Embora existam várias técnicas para investigar a distribuição de ligninas em paredes celulares de plantas (Saka e Goring, 1985; Mlynar e col. 1990), não se conhecem técnicas confiáveis para determinar a composição e as diferenças espaciais das ligninas em nível subcelular *in situ*. Há informações suficientes para sustentar que as relações guaiacil: siringil mudam de uma a outra região morfológica, mas diferenças inaceitáveis são obtidas quando diferentes métodos de estimacão são empregados. Uma compreensão melhor sobre a localização das ligninas poderia fazer avançar enormemente o conhecimento sobre a biossíntese das ligninas. Isto ajudaria no desenvolvimento de estratégias moleculares para alterar geneticamente a produção das enzimas chaves, responsáveis pela estrutura da lignina e por sua abundância (Higuchi, 1990; Lewis e Tamamoto, 1990).

Neste sentido, se tem avançado na produção de anticorpos monoclonais para ligninas poliméricas produzidas a partir de diferentes álcoois (Pettersson e col. 1988b). Dois alvos são objetivados: o primeiro, a obtenção de árvores com baixos teores de lignina ou com ligninas mais livres de metoxilas modificadas, até porque é sabido que a desmetilação é um passo importante na deslignificação por dióxido de cloro e peróxido de hidrogênio (Bourbonais e Paice, 1992); o segundo, a obtenção de tecidos com reduzidos níveis de associação entre ligninas e hemiceluloses. (Eriksson e Dinus, 1990).

As enzimas chaves na biossíntese da lignina, particularmente aquelas envolvidas com a polimerização (Dean e Eriksson, 1991), já foram caracterizadas e purificadas. Lacases e peroxidases já foram produzidas em culturas de células de *sycamore* e, deste modo, já se fizeram alguns estudos sobre a polimerização dos monolignóis (Bligny e col. 1986; Eriksson, 1992; Sterjiades e col. 1992). Experiências com *Thermoascus aurantiacus* mostraram boas perspectivas nesta área (Machuca e Durán, 1989; 1992; 1993).

Recentemente, foram discutidos aspectos interessantes do melhoramento de árvores utilizando a moderna biotecnologia (Chalupa, 1990). Tem sido focalizado o possível papel de enzimas extracelulares específicas no controle das quantidades e da estrutura das ligninas. As lacases (polifenoloxidasas) atuam, possivelmente, nas regiões onde houvesse

Figura 1: Biotecnologia na indústria de polpa e papel



ausência de peróxido de hidrogênio e onde o oxigênio fosse o único oxidante capaz de se difundir para pontos previamente possuidores de depósitos de lignina. Slocum e Furey (1990) documentaram uma forte associação entre o diamino oxidase (DAO) e a poliaminooxidase (PAO) e a existência de tecidos em processo de lignificação; determinando também a localização daquelas enzimas na lamela média da parede celular, onde a concentração de lignina é maior.

O peróxido de hidrogênio pode ser secretado na célula e tem sido encontrado nos tecidos em processo de lignificação. Nas regiões onde os monolignóis livres ou glicosilados são transportados para as vesículas próprias para a biossíntese das ligninas, é encontrado o peróxido de hidrogênio, supostamente de importância para aquele tipo de transporte. Uma alternativa para a produção de peróxido de hidrogênio envolve a oxidação de putrecinas ou poliaminas por DAO ou PAO. As reações catalisadas por estas enzimas requerem as respectivas aminas ou poliaminas e oxigênio como substrato (Dean e Eriksson, 1992).

A aril-beta-glucosidase precisa estar presente nos tecidos de lignificação, se essas formas de transporte e de armazenamento de monolignóis são mobilizadas para a biossíntese das ligninas. Formas glicosiladas dos monolignóis foram iden-

tificadas e localizadas em tecidos lignificados (Dean e Eriksson, 1992).

As peroxidases (PO) das plantas podem formar polímeros de desidrogenção (DHPs) a partir de álcool coníferico e em presença de peróxido de hidrogênio gerado no apoplásma (APO). Siegel e col. (1962) mostraram que plantas de feijão que cresceram sob baixa tensão de oxigênio continham menores teores de ligninas, menor quantidade de tecidos vasculares fibrosos e sofriam mais rapidamente a dissecação; essas plantas apresentavam teores de peroxidases menores do que aquelas cultivadas normalmente.

A ascorbato oxidase é uma enzima relacionada à lacase e se encontra primariamente nas paredes da célula. Foi demonstrado que os níveis de associação das enzimas nas paredes celulares é maior nas células alongadas, sugerindo que estas enzimas seriam importantes na maturação das paredes celulares. Embora não se tenha encontrado ainda uma função biológica para estas enzimas, sabe-se que o ascorbato é um substrato da lacase, o que poderia estar influenciando a síntese da lignina.

Possibilidades de alteração das ligninas das árvores

O principal impedimento, para determinar o papel das enzimas específicas na biossíntese das ligninas, tem sido a ca-

rência de sistemas biológicos nos quais o desenvolvimento de paredes secundárias e a subsequentemente deposição de ligninas (xilogênese) possam ser controlados ou induzidos em células individuais. Tem sido estudado o efeito de fenilalanina amônio-liase (PAL) como inibidor do sistema de biossíntese de lignina. Talvez a melhor correlação entre a atividade específica de isoenzimas das peroxidases e a biossíntese de lignina venha a ser obtida com este sistema.

Biologia molecular

O uso da engenharia genética pode envolver técnicas de redução do conteúdo de lignina através de: (i) uma superexpressão do sistema que produz as substâncias que sequestram radicais livres extracelulares e (ii) uma baixa expressão de produtos no gene que levam os monolignóis a se polimerizarem. Pode também levar a modificações de genes que modifiquem as estruturas dos monolignóis (por exemplo, a transformação de um radical coníferil para sinapil em gimnospermas). As transformações de superexpressão de enzimas associadas à lignina têm sido bem-sucedidas com peroxidases (Lagrimini e col. 1990), bem como com a sintetase do ácido 5-enol-piruvanil-3-fosfato shiquímico (ESPS), substância de importância aplicada por conferir resistência a herbicidas.

O grande impedimento para a produção de árvores através de técnicas de engenharia genética é a falta de efetividade nas transformações e a grande tendência de regeneração dos sistemas, particularmente para espécies de madeiras macias comercialmente importantes.

Notas finais

Esta revisão mostrou os avanços no uso de enzimas nos processos de produção de celulose e de reciclagem de papéis nos últimos três anos. Os dados nos levam a acreditar que o problema dos efluentes na indústria papelreira deve ser resolvido

com processos que associem, essencialmente, etapas aeróbica e anaeróbica e, acessoriamente, uma etapa física de ultrafiltração. A biorremediação envolverá não somente os problemas dos efluentes, mas considerará aspectos ligados à tecnologia de produção de modo a obter drásticas reduções dos impactos ambientais. No médio prazo, será possível a obtenção de matérias-primas com menores concentrações de ligninas ou com ligninas de mais fácil remoção. O descascamento pode ser auxiliado por pectinases e os cavacos podem ser previamente deslignificados com auxílio de

ligninases e lacases. Tudo isto levaria ao menor consumo de energia no processo global e ao menor uso de produtos químicos potencialmente poluentes. As polpas já podem ser tratadas com lipases e xilanases com a dupla finalidade de eliminar as resinas e os complexos xilanas-ligninas, de modo a evitar o uso excessivo de compostos clorados no branqueamento. Obviamente, nestas condições de biorremediação, os efluentes seriam menos contaminados e mais fáceis de serem tratados. Por fim, foi visto que as celulases e as xilanases podem ser auxílios poderosos na reciclagem de papel.

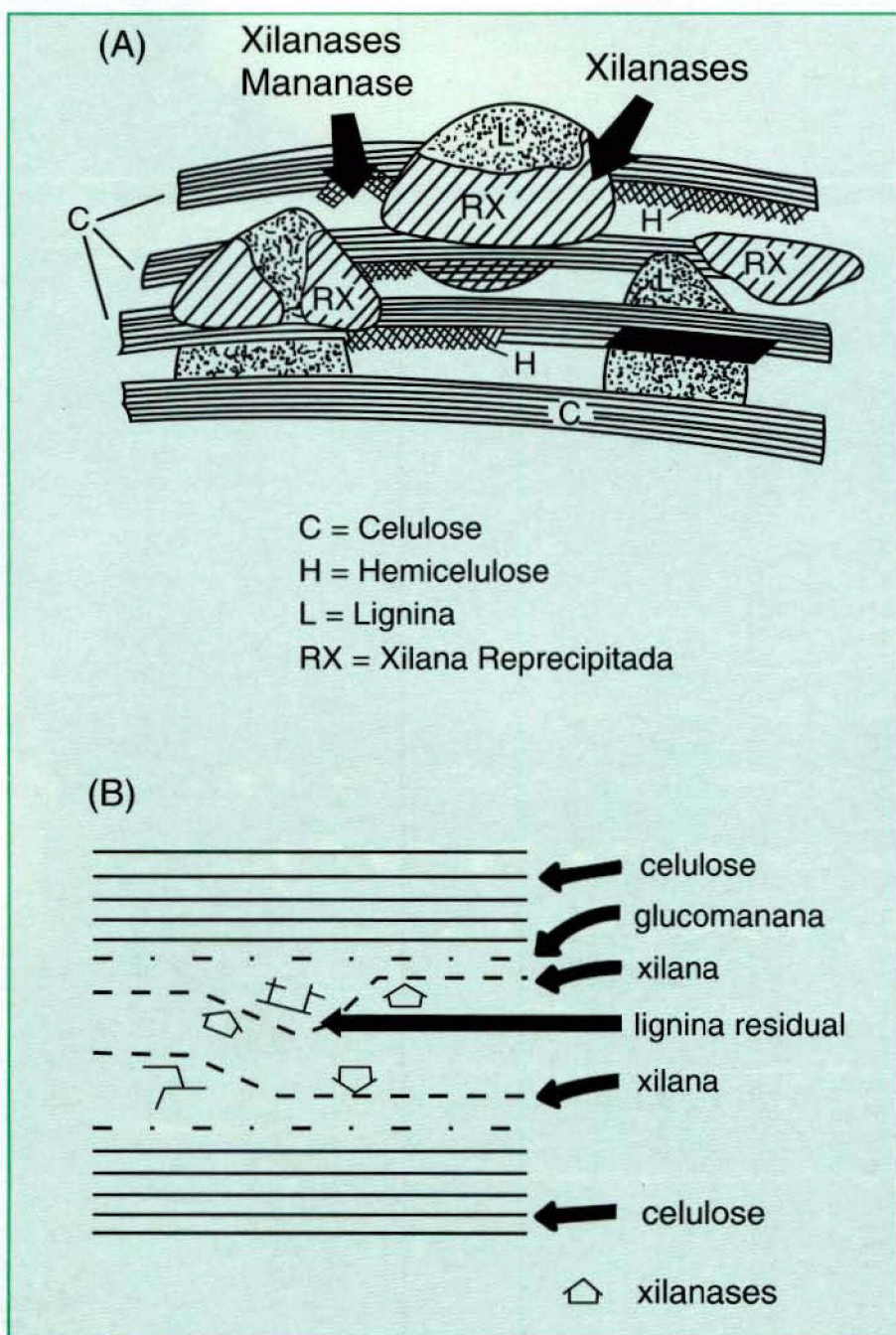
Indubitavelmente, a biotecnologia, em geral, as enzimas, em particular, ganharam um lugar importante na tecnologia da produção de celulose e na reciclagem de papel e, se utilizadas de maneira ágil e fundamentada, muito deverão contribuir para a indústria papelreira em nosso país.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio da Fapesp, do CNPq, da Finep e do PADCT aos nossos projetos.

Referências bibliográficas

- Ahtar, M., Attridge, M.C., Myers, G.C., Kirk, T.K. e Blanchette, R.A. *Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus Ceriporiopsis Subvernispora*. TAPPI J. 75: 105, 1992.
- Ahtar, M., Attridge, M.C., Myers, G.C. e Blanchette, R.A. *Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi*. Holzforschung, 47: 36, 1993.
- Allison, R.W. e Clark, T.A. *Effect of enzyme pre-treatment on ozone bleaching*. TAPPI J. 77: 127, 1994.
- Allison, R.W. e Clark, T.A. e Wrathall, S.H. *Pretreatment of radiata pine Kraft pulp with a thermophilic enzyme. Part 1. Effect on conventional bleaching*. APPITA 46: 269, 1993.
- Allison, R.W. e Clark, T.A. e Wrathall, S.H. *Pretreatment of radiata pine Kraft pulp with a thermophilic enzyme. Part 2. Effect on oxygen, ozone and chlorine dioxide bleaching*. APPITA 47: 125, 1994.
- Aitken, M.D., Massey, I.J., Chen, T. e Heck, P.E. *Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants*. Wat. Res. 28: 1879, 1994.
- Aitken, M.D. *Waste treatment application of enzymes: opportunities and obs-*



- tacles. *Chem. Engng. J.* 52: B49, 1993.
- Anselmo, A.M. e Novais, J.M. Degradation of phenol by immobilized mycelium of *Fusarium Flocciferum* in continuous culture. *Wat. Sci. Tech.* 25: 161, 1992a.
- Anselmo, A.M. e Novais, J.M. Biological treatment of phenolic wastes: Comparison between free and immobilized cell system. *Biotechnol. Lett.* 14: 239, 1992b.
- Arbeloa, M., De Leseleuc, J., Goma, G. e Pommier, J.-C. An evaluation of the potential of lignin peroxidases to improve pulps. *TAPPI J.* 75: 215, 1992.
- Basta, J., Andersson, L., Blom, C., Holtinger, L. e Hook, J. Reduction of AOX levels. Part 2. Chlorine-free bleaching. *APPITA*, 45: 29, 1992.
- Bajpai, P., Bhardwaj, N.K., Maheshwari, S. e Bajpai, P.K. Use of xylanase in bleaching of eucalyptus Karfi pulp. *APPITA* 46: 274, 1993.
- Baret, J.L., Leclerc, M. e Lamort, J.P. Enzymic de-inking process. Patent WO 9114819, 1991; *Chem. Abstr.* 115, P282401g, 1991.
- Biely, P. Use of xylanolytic enzymes in wood process and paper industries. *Pap. Cel.* 45: 149, 1991.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E. e Kirk, O. The future impact of industrial lipases. *TIBTECH*, October, 9, 1991.
- Blanchette, R.A., Farrel, R.L., Burnes, T.A., Wendler, P.A., Zimmerman, W., Brush, T.S. e Snyder, R.A. Biological control of pitch in pulp and paper production by *Ophiostoma piliferum*. *TAPPI J.* 75: 102, 1992.
- Bligny, R., Gaillard, J. e Douce, R. Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) dells. Effect of a copper deficiency. *Biochem. J.* 237: 583, 1986.
- Borman, B., Ek, M., Heyman, W. e Frostell, B. Membrane filtration combined with biological treatment of purification of bleach plant effluents. *Wat. Sci. Technol.* 24: 219, 1991.
- Bourbonnais, R. e Paice, M.G. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microb. Biotechnol.* 36: 1823, 1992.
- Bowen, I.J. e Shu, J.C.L. Overview of emerging technologies in pulp and cleaching *TAPPI J.* 73: 205, 1990.
- Buchert, J., Ranua, M., Katelinen, A. e Viikari, L. The role of two *Trichoderma reesei* xylanase in the bleaching of pine kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 825, 1992.
- Buchert, J., Salminen, J., Siika-aho, M., Ranua, M. e Viikari, L. The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to bleaching *Holzforschung.* 47: 473, 1993.
- Brush, T.S., Farrell, R.L. e Ho, C. Biodegradation of wood extractives from southern yellow pine by *Ophiostoma piliferum*. *TAPPI J.* 77: 155, 1994.
- Bryant, C.W., Amy, G.L. e Alleman, B.C. Organic halide and organic carbon distribution and removal in a pulp and paper wastewater lagoon *J. Water Pollut. Control Fed.* 59, 890, 1987.
- Byrd, M.V., Gratze, J.S. e Singh, R.P. Delignification and bleaching of chemical pulps with ozone A literature review. *TAPPI J.* 75: 207, 1992.
- Cammarota, M.C. e Sant'Anna, G. L. Decolorization of kraft bleach plant E1 stage effluent in a fungal bioreactor. *Environ. Technol.* 13: 65, 1992.
- Castro e Silva, A., Esposito, E., Ferraz, A. Durán, N. Decay of *Parkia oppositifolia* in Amazonia by *Pycnoporus sanguineus* and potential use for effluent decolorization. *Holzforschung.* 47: 361, 1993.
- Chalupa, V. Biotechnology in forest tree improvement. *Trees of the future.* Plant Aging, Plenum Press, N.Y. 311, 1990.
- Chang, H.M., Joyce, T.W. e Kirk, T.K. Process of treating effluent from a pulp and proper making operation. *US Patent* 655, 296, 1987.
- Clark, T.A., Steward, D., Bruce, M.E., McDonald, A.J., Singh, A.P. e Senior, D.J. Improved bleacability of radiata pine Kraft pulp following treatment with hemicellulytic enzymes. *APPITA* 44: 389, 1991.
- Davis S. e Burns, R.G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 721, 1990.
- Davis, S., Gysin, B., Casimir, J. e Zimmerman, W. Thermostable xylanases from actinomycete por pulp bleaching. *Progress Biotechnol.* 7: 551, 1992.
- Dawson-Andoh, C.J. e Hull, J.L. Effect of fungal pre-treatment on strength and optical properties of softwood and hardwood kraft pulp. *TAPPI J.* 74: 187, 1991.
- Dean, J.F. e Eriksson, K.-E.L. Monoclonal antibodies to probe lignin structure and composition. *Proc. Intern. Symp. on Application of Biotechnology to Tree Culture, Protection and utilization.* U.S. Forest Ser. Gen. Techn. Report NE-152, pp. 100, 1991.
- Dean, J.F.D. e Eriksson, K.-E.L. Biotechnological modifications of lignin structure and composition in forest trees. *Holzforschung.* 45: 135, 1992.
- Deneault, C., Leduc, C. e Valade, J.L. The use of xylanases in kraft pulp bleaching: a review *TAPPI J.* 77: 125, 1994.
- Dreisbach, D.D. e Michalopoulos, D.L. Understanding the behavior of pitch in pulp and paper mills. *TAPPI J.* 72: 129, 1989.
- Duart, J.C. e Costa-Ferreira, M. Aspergilli and lignocellulosics: Enzymology and biotrhological application *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 373, 1994.
- Du Manoir, J.R., Hamilton, J., Senior, D.J., Bernier, R.L., Grant, J.-E., Moser, L.E. e Dubelstein, P. Biobleaching of kraft pulps with cellulase-free xylanase *Intern. Pulp Bleaching Conf., Stockholm, Sweden,* 123, 1991.
- Durán, N. Lignin degrading enzyme from *Chrysonilia sitophila*. Production, mechanism and utilization. *Proc. First Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp. (R.A.M.C. De Groote and A.A.S.Curvelo, Eds.), São Carlos, SP, Brazil,* 1: 21, 1989.
- Durán, N. Reduction of chemical oxygen demand in bleaching plant effluent by a combination of photochemical and biological method. *Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp. (N. Durán e E. Esposito, Eds.), Campinas, SP, Brazil* 3: 323, 1992.
- Durán, N. e Esposito, E. Nuevas técnicas para la reducción de l impacto ambiental de la industria de celulosa. *Quim. & Ind. (Chile)* (2) 17, 1993.
- Durán, N. e Esposito, E., Innocentini-Mei, L.H. e Canhos, V.P. A new alternative process for kraft E1 effluent treatment, A combination of photochemical and biological methods. *Biodegradation* 5: 13, 1994.
- Durán, N. e Esposito, E. Baeza, J., Freer, J. e Rodriguez, J. Tratamiento frugal de efluentes kraft. *Proc. I Taller de Biotecnologia Ambiental, Facultad Ingenieria, Universidad de Concepcion. Outubro 1992, Chile (M. Roechel, Ed.), Chile.*
- Durán, N. e Esposito, E. e Canhos, V.P. Kraft mill effluent: Biological treatment. *In Cellulosics: Pulp, Fibre and Environmental Aspects (j.F. Kennedy, G.O. Pillips and P.A. Williams, Eds.) Ellis Horwood Ser. In Polymer Sci. and technol., N.Y. Chaper* 73: 493, 1993.

- Durán, N., Dezotti, M. e Rodriguez, J. Biomass photochemistry-XV: Photobleaching and biobleaching of kraft effluent. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 62: 269, 1991.
- Durán, N., Ferraz, A. e Mansanilla, H. Biopulping: A new view on wood delignification. *Arq. Biol. Tecnol. (Brazil)* 33: 295, 1990.
- Egan, E.M. e Miserlis, C.D. Biological enhancement of pulping processes. *AIChE. Natl. Mtg. (Boston)*, paper 54a, 1986.
- Ek, M., Eriksson, K.-E. External reduction of AOX in Bleached Pulp Effluent. *proc. VVT Symp. 102, Non-Wate Technol. (M. Korhonen Ed.)*, Technic. Res. Centre Finland, Espoo, 1: 435, 1989.
- Ek, M. e Kolar, M.C. Reduction of AOX in bleach plant effluent by combination of filtration and biological methods, In *Biotechnology in Pulp and paper Manufacture Applications and Fundamental Investigations. Proc 4th Intern. Conf. Biotechnol. Pulp and Paper Ind. (T.K. Kirk and H.-M. Chang, Eds.) Butterworth-Heinemann Chapter 25: 271, 1990.*
- Eriksson, K.-E.L. Development of new techniques to reduce environmental impact of pulp bleaching. *Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp. (N. Durán e E. Esposito, Eds.)*, Campinas, SP, Brazil 3: 274, 1992.
- Eriksson, K.-E.L. e Dinus, R.J. Progress towards making trees easier to pulp and bleach. *Pulp Paper Mag.* 5/6: 40, 1990.
- Eriksson, K.-E.L. e Kolar, M.C. Microbial degradation of chlorolignins. *Environ. Sci. Technol.* 19: 1086, 1985.
- Erismann, N. de M., Baeza, J., Freer, J., Mansanilla, H., Fernandez, A.M. e Durán, N. Wood delignification by ligninase-mimetic reactions: Hemin/hydrogen peroxide system. *Proc. First Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp. (R.A.M.C. De Grootte and A.A.S. Curvelo, Eds.) São Carlos, SP, Brazil, 2: 205, 1989.*
- Erismann, N. de M., Fernandez, A.M., Baeza, J., Freer, J., Mansanilla, H. e Durán, N. Non polluting wood and pulp delignification. *Biomimetic ligninase system. Biotechnol. Lett.* 12: 905, 1990.
- Esposito, E. Seleção de fungos produtores de xilanases: Aplicação na indústria papelreira. I Seminário Nacional de Tecnologia Enzimática - ENZITEC-93, Rio de Janeiro, Brasil (E. Bonn, Ed.) 30, 1993.
- Esposito, E., Canhos, V.P. e Durán, N. Photochemical pre-treatment of kraft effluents: Biobleaching with *Lentinus edodes*. *Proc 2nd. Braz. Symp. Chem. and Other Wood Comp. (N. Durán and Esposito, Eds.)*, Campinas, SP, Brazil, 3: 356, 1992.
- Esposito, E., Canhos, V.P. e Durán, N. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbon source. *Biotechnol. Lett.* 13: 571, 1991.
- Esposito, E., Durán, N., Freer, J., Baeza, J. Innocentini-Mei, L.H. Performance of a modified packed-bed reactor to evaluate immobilized *Lentinus edodes* acting on kraft effluent. *Proc. Intern. Chem. Eng. Conf. CHEMPOR-93, Porto, Portugal*, 201, 1993.
- Esposito, E., Innocentini-Mei, L.H., Ferraz, A., Canhos, V.P. e Durán, N. Phenoloxidasas and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): Applications. *J. Biotechnol.* 29: 219, 1993.
- Fahmy, M., Heinzle, E. e Kut, O.M. Treatment of bleaching effluent in aerobic/anaerobic biofilm systems. *Wat. Sci. Tech.* 24: 179, 1991.
- Fahmy, M., Kut, O.M. e Heinzle, E. Anaerobic-aerobic fluidized bed biotreatment of sulphite pulp bleaching effluents-I. Global parameters. *Wat. Res.* 28: 1987, 1994.
- Fahmy, M., Kut, O.M. e Heinzle, E. Anaerobic-aerobic fluidized bed biotreatment of sulphite pulp bleaching effluents-II. Fate of individual chlorophenolic compounds. *Wat. Res.* 28: 1997, 1994.
- Fairbanks, M. Plano de tratamento vai limpar o Tietê. *Quim. Derivados (Brazil)*, 291: 16, 1992.
- Farrell, R. Use of rLDM 1-6 and other ligninolytic enzymes in the bleaching of kraft pulp. *US Patent 4,690,895*, 1987.
- Farrell, R. Use of rLDM (TM) 1-6 and other ligninolytic enzymes in the treatment of mechanical pulps. *US Patent 4,687,745*, 1987.
- Farrell, R.L., Blanchette, R.A., Brush, T.S., Hader, Y., Iverson, S., Krisa, K., Wendler, P.A. e Zimmermann, W. Cartapip a biopulping product for control of pitch and problem in pulp mills. *J. Biotechnol.* 30: 115, 1993.
- Ferguson, L.D. Deinking chemistry: Part 1. *TAPPI J.* 75: 75, 1992a.
- Ferguson, L.D. Deinking chemistry: Part 2. *TAPPI J.* 75: 49, 1992b.
- Ferraz, A., Baeza, J. e Durán, N. Organosolv Process: Pre-treatment of *Pinus radiata* D Don wood with ligninolytic fungus *Chrysonilia sitophilia*. *Proc. First Braz. Symp. Chem. Lignin and Other Wood Comp. (R.A.M.C. De Grootte and A.A.S. Curvelo, Eds.) São Carlos, SP, Brazil, 2: 216, 1989.*
- Ferraz, A., Baeza, J. e Durán, N. Softwood biodegradation by an ascomycete *Chrysonilia sitophilia* (TFB-27441 strain). *Letts. Appl. Microbiol.* 13: 82, 1991.
- Ferraz, A. e Durán, N. Lignin biodegradation products from *Pinus radiata* decayed by *Chrysonilia sitophilia*. *Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignin and Other Wood Comp. (N. Durán e E. Esposito, Eds.) Campinas, SP, Brazil, 3: 362, 1992.*
- Ferraz, A. e Durán, N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophilia*. *Biodegradation*, in press, 1994.
- Ferrer, I., Dezotti, M. e Durán, N. Decolorization of kraft effluent by free and immobilized lignin peroxidase and horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 13: 577, 1991.
- Ferrer, I., Esposito, E. e Durán, N. Lignin peroxidase from *Chrysonilia sitophilia*: Heat-deactivation kinetics and pH stability. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 402, 1992.
- Fleming, B. The Stockholm Conference. An ozone Zone with TOOZRPZRP. *Pulp Paper Can* 92: 13, 1991.
- Fischer, K. e Messner, K. Reducing troublesome pitch in pulp mills lipolytic enzymes. *TAPPI J.* 75: 130, 1992.
- Fischer, K., Puchinger, L., Schoffer, K., Kreiner, W. e Messner, K. Enzymic pitch control of sulfite pulps on pilot scale. *J. Biotechnol.* 27: 341, 1993.
- Fujita, Y., Awaji, H., Taneda, H., Matsukura, M., Hata, K., Shimoto, H., Sharyo, M., Sakaguchi, H. e Gibson, K. Recent advances in enzymatic pitch control. *TAPPI J.* 75: 117, 1992.
- Fujita, K., Kondo, R., Sakai, K., Kashima, Y., T. Nishida, T. e Takahara, Y. Biobleaching of kraft pulp using white-rot fungus IZU-154. *TAPPI J.* 74: 123, 1991.
- Fujita, K., Kondo, R., Sakai, K., Kashima, Y., T. Nishida, T. e Takahara, Y. Biobleaching of softwood kraft pulp using white-rot fungus IZU-154. *TAPPI J.* 76: 81, 1993.
- Fujita, Y. Lipase-catalyzed ester hydrolysis in dealing with pitch trouble in papermaking. *PCP Intern. Appl. WO 9219808. Chem. Abstr.* 119, 98319j, 1994.
- Kukunaga, N. e Kita, Y. Deinking of waste

- paper using enzyme. *Jpn. Patent* 2-80683, 1990; *Chem. Abstr.* 113, P193757k, 1990.
- Grant, R.R. & D. Optimizes enzyme applications *Pulp Paper Intern.* September, 35: 56, 1993.
- Grant, R. First mill-scale trials get underway. *Pulp Paper Intern.* 33: 61, 1991.
- Grant, R. Enzymes reveal plenty more potential. *Pulp Paper Intern.* 34: 75, 1992.
- Hagblom, M. e Salkinoja-Salonen, M. Biodegradability of chlorinated organic compounds in pulp bleaching effluents *Wat. Sci. Tech.* 24: 161, 1991.
- Hagiwara, M. e Yutaka, O. *Jpn. Patent* 2-80684, 1990; *Chem. Abstr.* 113, 193758 y, 1990.
- Hammatt, N. Progress in the biotechnology of trees *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 369, 1992.
- Held-Hansen, H.P. Lipase catalyzed ester hydrolysis as means for pitch control in paper manufacture. *Can Patent Appl. CA 2, 040, 329, 1993*; *Chem. Abstr.* 118, P171359h, 1993.
- Higuchi, T. Lignin biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23, 1990.
- Hwang, R.H., Kennedy, J.F. e Melo E.H.M. A mechanism for lignification in plants. *Carbohydr. Polym.* 14: 77, 1991.
- Jackson, L.S., Heitmann, J.A. e Joyce, T.W. Enzymatic modifications of secondary fiber. *TAPPI J.* 76: 147, 1993.
- Jeffries, T.W., Klungness, J.H., Sykes, M.S. e Rutledge-Cropey, K.R. Comparison of enzyme-enhanced with conventional deinking of xerographic and laser-printed paper. *TAPPI J.* 77: 173, 1994.
- Koensu, E. Environmental focus of pulp bleaching. *Tech. Finland.* (1): 26, 1991.
- Jurasek, L. e Paice, M.G. Biological treatment of pulps *Biomass* 15: 103, 1988.
- Kantelinen, A. Ratto, M., Sundquist, J., Ranua, M. Viikari, L. e Linko, M. Hemicellulases and their potential role in bleaching. *Intern. Pap. Bleaching Conf.*, TAPPI, June, Orlando, FL, USA, 1, 1988.
- Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M. e Viikari, L. The role of reprecipitated xylan in the enzymatic bleaching of pulp. 6th, *Intern. Symp. on Wood and Pulping Chem.* Melbourne, April, Australia, 1991.
- Kantelinen, A., Hortling, B., Ranua, M. Viikari, L. Effects of fungal and enzymatic treatments on isolated lignins and on pulp bleachability. *Holzforschung*, 47: 29, 1993.
- Kirk, T.K. e Yang, H.H. Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnol. Lett.* 1: 347, 1979.
- Kirkpatrick, N., Reid, I.C., Ziomek, E., Ho, C. e Paice, M.G. Relation between fungal biomass production and the brightening of hardwood kraft pulp by *Coriolus versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1.147, 1989.
- Kirkpatrick, N., Reid, I.C., Ziomek, E. e Paice, M.G. Biological bleaching of hardwood kraft pulp using *Trametes (Coriolus) versicolor* immobilized in polyurethane foam. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 105, 1990.
- Koponen, R. Enzyme systems prove their potential. *Pulp Paper Intern.* November, 33: 20, 1991.
- Labat, G., Seris, J.-L. e Meurnier, B. Oxidative degradation of aromatic pollutants by chemical model of ligninase based on porphyrins complexes. *Angew Chem. Intern.* 29: 1471, 1990.
- Lagrimini, L.M., Burkhard, Moyer, M. e Rothstein, S. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell.* 2: 7, 1990.
- Lankinen, V.P., Inkeroinen, M.M., Pellinen, J. e Hatakka, A.I. The onset of lignin-modifying enzymes, decrease of AOX and color removal by white rot fungi grown on bleach plant effluents. *Wat. Sci. Tech.* 24: 189, 1991.
- Lee, J.W., Peterson, D.L. e Stickney, A.R. Anaerobic treatment of pulp and paper mill wastewater. *Environ. Progress* 8: 73, 1989.
- Latham, G.F., Myers, G.C., Wegner, T.H. e Blanchette, R.A. Energy saving in biomechanical pulping in Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture. (T.K. Kirk e H.-M. Chang, Eds.) Butterworth Heinemann, Stoneham, MA., USA, 1990.
- Lewandowski, G.A., Armenante, P.M. e Pak, D. Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus. *Water Res.* 24: 75, 1990.
- Lewis, N.G. e Yamamoto, E. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 41: 455, 1990.
- Machuca, A. e Durán, N. Production of cellulases and phenoloxidases by *Thermoascus aurantiacus* induced by *Eucalyptus grandis* wood *Proc. First Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp.* (R.A.M.C. De Groote and Curvelo, Eds.), São Paulo, SP, Brazil, 2: 262, 1989.
- Machuca, A. e Durán, N. Growth optimization of *Thermoascus aurantiacus*: An efficient fungus acting on extractable phenols. *Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp.* (N. Durán and E. Esposito, Eds.), Campinas, S.P., Brazil, 3: 377, 1992.
- Machuca, A. e Durán, N. Phenol oxidases production and wood degradation by thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 43: 37, 1993.
- Madsen, E.L. Determining in situ biodegradation. *Facts and challenges Environ. Sci. Technol.* 25: 1663, 1991.
- Mehta, V. e Gupta, J.K. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Res. Ind.* 36, 161, 1991.
- Messner, K. e Srebotnik, E. Biopulping: An overview of developments in an environmental safe paper-making technology. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 351, 1994.
- Milagres, A.M.F. e Durán, N. Xylanolytic enzymes from *Penicillium janthinellum* and its application in bleaching of pulp. *Progress Biotechnol.* 7: 539, 1992.
- Milagres, A.M.F., Erismann, N. de M. e Durán, N. Xylanase-ligninase bleaching sequency on kraft and Organosolv (formic acid) pulps. *Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp.* (N. Durán e E. Esposito, Eds.)Campinas, S.P., Brazil, 3: 372, 1992.
- Mylnar, J., Kosikova, B., Zakutna, L., Micko, M. e Pazner, L. Ultrastructure and macromolecular properties of lignins of different genetic origins. *Cellulose Chem. Technol.* 24: 472, 1990.
- Murata, S., Kondo, R., Sakai, K., Kashino, Y., Nishida, T. e Takahara, Y. Chlorine-free bleaching process of kraft pulp using treatment with the fungus IZU-154. *TAPPI J.* 75: 91, 1992.
- Myers, G.C., Latham, G.F.M., Wegner, T.H. e Blanchette, R.A. Fungal pretreatment of aspen chips improves strength of refiner mechanical pulps. *TAPPI J.* 71: 105, 1988.
- Nakamoto, S. e Machida, N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. *Wat. Res.* 26: 49, 1992.
- Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Biswas, N. e Taylor, E. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation from wastewater. *Wat. Res.* 27: 1629, 1993.
- Nishida, T., Kashino, Y., Takahara, Y. e Sakai, K. Manufacture of pulp by treatment with microorganism. *Jpn. Pat.*

- Kokai, 250, 180/90, 1991.
- Noe, P., Chevalier, J., Mora, F. e Comtat, J. 1986. Action of xylanases on chemical pulp fibers. Part-II. Enzymatic beating J. Wood Chem. Technol. 6: 167, 1986.
- Olsen, W.L.m Slocomb, J.P. Gallagher, H.P. e Burris, A.K. Enzymic delignification of lignocellulosic materials. Eur. Patent EPO, 34, 5715, 1989.
- Paice, M.G., Jurasek, L. Ho, C., Bourbonnais, R. e Archibald, F.S. Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. TAPPI J. 72: 217, 1989a.
- Paice, M.G., Archibald, F.S., Jurasek, L. Bourbonnais, R. e Ho, C. Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. US Patent 4,830,708, 1989b.
- Paice, M.G., Archibald, F.S., Jurasek, L. Bourbonnais, R. e Ho, C. Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. Can. Patent. 12, 66014, 1990.
- Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F.S. e Jurasek, L. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. Appl. Environ. Microbiol. 59: 260, 1993.
- Paice, M.G., Gurnagul, N. Page, D.H. e Jurasek, L. Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. Enzyme Microb Technol. 14: 272, 1992.
- Patel, R.N., Grabski, A.C. e Jeffries, T.W. Chromophore release from kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 405, 1993.
- Paszczynski, A. Crawford, R.A. e Blanchette, R.A. Delignification of wood chips and pulp by using natural and synthetic porphyrins. Model of fungal decay. Appl. Environ. Microbiol. 54: 62, 1988.
- Pedersen, L.S. Resin pulps during reductive bleaching PCP Intern. Appl. WO 9207, 138; Chem. Abstr. 117, P71943e, 1993.
- Pellinen, J., Abuhasan, J., Joyce, T.W. e Chang, H.M. Biological delignification of pulp by *Phanerochaete chrysosporium* J. Biotechnol. 10: 161, 1989.
- Pettersson, B., Yang, J.-L. e Eriksson, K.-E. Biotechnological approach to pulp bleaching. Nordic Pulp Paper Res. J. 4: 198, 1988.
- Pettersson, B., Yang, J.-L. e Eriksson, K.-E. Characterization of pulp fiber surfaces by lignin specific antibodies. Nordic Pulp Paper res. J. 3: 152, 1988.
- Pommier, J.-C. The use of enzymes in paper and board making. Paper Technol. October, 50, 1991.
- pommier, J.-C., Fuentes, J.-C. e Goma, G. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 1: The basic laboratory work. TAPPI J. 72: 187, 1989.
- Pommier, J.-C., goma, G., Fuentes, J.-C. e Rousset, C. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 2: Industrial applications TAPPI J. 73: 197, 1990.
- Pommier, J.C., Rousset, C., Fuentesm J.L. r Goma, G. Patent EP 451031, 1991.
- Prasad, D.Y. Enzymatic deinking of laser and xerographic office waste. APPITA 46: 289, 1993.
- Prasad, D.Y. e Joyce, T.W. Color removal from kraft bleach plant effluent by *Trichoderma* sp. TAPPI J. 74: 165, 1991.
- Prouty, A.L. Bench scale development and evaluation of a fungal bioreactor for color removal from bleach effluents. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 490, 1990.
- Pryke, D.C. Substituting chlorine dioxide for chlorine. TAPPI J. 72: 147, 1989.
- Ratto, M., Kantelinen, A., Bailey, M. e Viikari, L. Potential of enzymes for wood debarking. TAPPI J. 76: 125, 1993.
- Ratto, M., Methaoni, I.M., Ahring, B. e Viikari, L. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of Kraft pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:130, 1994.
- Reid, I.D. e Paice, M.G. Effect of residual lignin type e amount on bleaching of Kraft pulps by *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1395, 1994.
- Reid, I.D. e Paice, M.G. Biological of Kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. FEMS Microbiol. Rev. 13: 369, 1994.
- Reid, I.D., Paice, M.G., Ho, C., Jurasek, L. Biological bleaching of softwood Kraft pulp with fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. TAPPI J. 73: 149, 1990.
- Richardson, D.E., Minnelly, P.J., Pettit, P.R., Ash, G.H., Harden, D.E. e Parson, T. The environmental impact of deinking. A pilot study. APPITA 45: 314, 1992.
- Rintala, J. A. e Puhakka, J.A. Anaerobic treatment in pulp and paper mill waste management: A review. Bioresource Technol. 47: 1, 1994.
- Roy-Arcand, L. e Archibald, F.S. Effecte of time, daylight and settling pond microorganisms on the high molecular weight fraction of Kraft ble4acery affluens. Wat. Res. 27: 873, 1993.
- Saka, S. e Goring, D.A.I. Localization of lignin in wood cell wall. In Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components (T. Higuchi, Ed.) Orlando, Academic Press, 51, 1985.
- Sant'Anna, G.L. Biological treatment of pulp and paper industrial wastewaters: processes and bioreactors. Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignins and Other Wood Comp (N. Durán and E. Esposito, Eds.), Campinas, S.P., Brazil, 3: 297, 1992.
- Scott, B.P., Young, F. e Paice. M.G. Mill-scale enzyme treatment of a softwood kraft pulp prior to bleaching. Pulp Paper Can. 94: 57, 1993.
- Senior, D.J., Mayers, P.R. e Saddler, J.N. The interaction of xylanases with commercial pulps. Biotechnol. Bioeng. 37: 274, 1991.
- Senior, D.J., Hamilton, J., Berneir, R.L. e Du manoir, J.R. Reduction in chlorine use during bleaching ok kraft pulp following xylanase treatment TAPPI J. 75: 125, 1992.
- Senior, D.J. e Hamilton, J. Use of xylanases to decrease rthe formation of AOX in kraft pulp bleaching J. Pulp Paper Sci. 18: J165, 1992.
- Senior, D.J. e Hamilton, J. Xylanase treatment for the bleaching of softwood kraft pulps: the effect of chlorine dioxide substitution. TAPPI J. 76: 200, 1993.
- Setliff, E.C., Marton, R., Granzow, S.G. e Eriksson, K.L. Biomechanical pulping with white-rot fungi. TAPPI J. 73: 141, 1990.
- Shimada, M., Nakagawa, M., Hattori, T. e Higuchi, T. A new biomimetic lignin degradation system developed with Mn/Co catalyst and its application to the chlorine free bleaching of kraft pulp. Mokuzaï Gakkaishi. 35: 859, 19889.
- Shoham, Y., Schwartz, Z., Khasin, A., Gat, O., Zosim, Z. e Rosenberg, E. Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus streothermophilus* strain T-6. Biodegradation 3: 207, 1992.
- Siegel, S.M., Rosen, L.A. e Rewick, G. Effects of reduced oxygen tension on vascular plants. Growth and composition of red kidney bean planta in 5 percent oxygen Phisiol. Plant. 15: 304, 1962.
- Siddique, M.H., Pierre, C.C.St., Biswas, N., Bewtra, J.K. e Taylor, K.E. Immobilized enzyme catalyzed removal of 4-chlorophenol in aqueous solution. Wat. Res. 27: 883, 1993.

- Sinner, M. *Biobleaching* Dtsch. Papier Wistch. 2: T-6, 1991.
- Sinner, M. e Preselmayr, W. Chlorine is out, bring in the enzymes. *Pulp Paper Intern. September*, 34: 87, 1992.
- Slocum, R.D. e Furey, M.J. Electron microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in plant tissues. *Planta* 183: 443, 1990.
- Speranza, M., Esposito, E., Bettucci, L. e Durán, N. Biodegradation of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus globulus* wood by *Punctularia artropurporescens*. A preliminary report *Proc. 9th. Biodegradation and Biodegradation Symp., Leeds, UK, 1993.*
- Sterjiades, R., Dean, J.F.D. e Eriksson, K.-E.L. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignins. *Plant Physiol.* 99: 1162, 1992.
- Thayer, A.M. Bioremediation: Innovative technology for cleaning up hazardous waste *Chem. Eng. News August*, 26: 23, 1991.
- Tolan, J.S. e Canovas, R.V. The use of enzymes to decrease the chlorine requirement in pulp bleaching *Pulp Paper Can.* 93, 39, 1992.
- Tram, A.V. e Chamber, R.P. Delignification of an unbleached hardwood kraft by *Phanaerochaete chrysosporium* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 485, 1987.
- Turner, J.C., Skerker, P.S., Burns, B.J., Howard, J.C., Alonso, M.A. e Andres, J.L. Bleaching with enzymes instead of chlorine-mill trials. *TAPPI J.* 75: 83, 1992.
- Viikari, L., Ratto, M. e Kantelinen, A. Use of enzyme for debarling. *Finnish Patent Appl.* 8962291, 1989.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J. e Linko, M. Bleaching with enzymes. *Biotechnology in the pulp and paper industry. 3th. Intern. Conf. STFI/SPCI, Stockholm, Sweden, June, 67, 1986.*
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M. e Sundquist, J. Application of enzymes in bleaching *4th. Intern. Symp. Wood and Pulping Chem. EUCEPA, April, Paris, 1: 151, 1987.*
- Viikari, L., Sundquist, J. e Kettunen, J. Xylanases enzymes promote pulp bleaching *Pappaeri ja Puu, Paper and Timber*, 73: 385, 1991a.
- Viikari, L., Kantelinen, A. e Ratto, M. Enzyme in pulp and paper processing *ACS Symp. Ser.* 460: 12, 1991b.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. e Linko, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 335, 1994.
- Visser, J., Beldman, G., M.A.K.-Van Someren, A.G.J. Voragen (Eds). *Proc. Intern. Symp. on Xylans and Xylanases, Wageningen, The Netherland, 1991. Progress Biotechnol.* 7 (Elsevier, N. York), 1992.
- Worster, H.E. e Bugajer, S. Clorato resultante do branqueamento com dióxido de cloro. *Uma revisão bibliográfica. O Papel*, (1): 49, 1990.
- Yang, J.L. e Eriksson, K.-E. Use of Hemicellulolytic enzymes as one stage in bleaching of kraft pulps. *Hozforschung*, 46: 481, 1992.
- Yang, J.L., Lou, G. e Eriksson, K.-E.L. The impact of xylanase on bleaching of kraft pulps. *TAPPI J.* 75: 95, 1992.
- Yang, J.L., Sacon, V.M. Law, S.E. e Eriksson, K.-E.L. Bleaching of eucalyptus kraft pulp with the EnZone process. *TAPPI J.* 76: 91, 1993 ▲



REPRESENTAÇÕES MAXPEL LTDA. E SUAS REPRESENTADAS NO SETOR DE CELULOSE E PAPEL

Desejam a todos os seus amigos e clientes
um feliz Natal
e Próspero Ano Novo.

Rua Salto, 110 • CEP: 04001-130 • São Paulo • SP
Fone: (011) 884-3891 • Fax: (011) 885-2753/1843