

## II-154 - ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS DE *Trametes* sp. NA REMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS GERADOS DURANTE TRATAMENTO DE EFLUENTE KRAFT EM LAGOAS AERADAS FACULTATIVAS

**Eliane P. Machado**<sup>(1)</sup>

Engenheira Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA/UTFPR).

**Gustavo Henrique Couto**<sup>(2)</sup>

Prof. Dr. do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA/UTFPR).

**Aline Cristine Hermann Bonato**<sup>(3)</sup>

Tecnóloga em Processos Ambientais pela UTFPR, mestranda do PPGCTA/UTFPR.

**Camila Peitz**<sup>(4)</sup>

Bacharel em química, mestranda do PPGCTA/UTFPR.

**Claudia Regina Xavier**<sup>(5)</sup>

Prof<sup>a</sup>. Dra. do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA/UTFPR).

**Endereço**<sup>(1)</sup>: Rua Deputado Heitor Alencar Furtado, 5000 - Ecoville CEP 81280-340 - Curitiba - PR - Brasil  
Telefone Geral +55 (41) 3279-4500 - e-mail: [elianepmachadov@gmail.com](mailto:elianepmachadov@gmail.com).

### RESUMO

O sistema de Lagoa Aerada Facultativa (LAF) é eficiente na remoção da matéria orgânica biodegradável do efluente de papel e celulose *kraft*, no entanto não consegue remover com eficiência os compostos lignínicos e fenólicos, que persistem no meio devido à sua recalcitrância, atribuindo cor e toxicidade ao efluente mesmo após o tratamento. Nesse sentido este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de enzimas ligninolíticas na remediação dos compostos fenólicos presentes neste efluente, durante tratamento em LAF em escala de bancada, assistida com extrato enzimático de um Fungo da Podridão Branca (*Trametes* sp.). O sistema foi alimentado por 60 dias com Carga Orgânica Volumétrica de 0,2 kg DQO m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> e aplicação diária de Extrato Fúngico (EF) contendo 0,02 U mL<sup>-1</sup> de Lacase. Os resultados mostraram incremento médio de aproximadamente 1 % dos CFT, na LAF com aplicação de EF, enquanto que uma LAF controle (operada paralelamente, nas mesmas condições, mas sem aplicação de EF) apresentou incremento de CFT significativamente maior (23 %), mostrando que o EF auxiliou na remediação da geração de compostos fenólicos dentro do sistema de tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lacase, manganês peroxidase, fungos da podridão branca, setor de celulose e papel.

### INTRODUÇÃO

A decomposição da matéria orgânica é um processo que ocorre de forma natural pela ação de microrganismos, entretanto, quando se trata de materiais lignocelulósicos, são poucos os organismos capazes de degradá-los<sup>1</sup>. Os Fungos da Podridão Branca (FPB) cumprem uma função primordial na decomposição destes materiais em ambientes naturais, e só o fazem porque secretam enzimas capazes de, por meio da catálise enzimática, facilitar a digestão destes materiais nutritivos de difícil degradação<sup>2</sup>.

Estas enzimas envolvidas na degradação da lignina são genericamente denominadas de enzimas ligninolíticas, e as mais conhecidas são: Lignina Peroxidases (LiPs), Manganês Peroxidases (MnPs) e as polifenoloxidasas (Lacases)<sup>2</sup>. Enzimas ligninolíticas isoladas de fungos têm atraído atenção considerável da ciência e da indústria, em especial na biorremediação de efluentes da indústria de papel e celulose<sup>3</sup>.

As águas residuárias do processo de polpação de celulose são tipicamente caracterizadas por altas concentrações de matéria orgânica, compostos lignínicos e seus derivados fenólicos, além de cor. O tratamento mais utilizado no Brasil é o sistema de Lagoas Aeradas Facultativas (LAF), mas este tratamento, apesar de ser eficiente na remoção da matéria orgânica biodegradável, não consegue remover com eficiência os compostos lignínicos e fenólicos que persistem no meio, devido à sua recalcitrância, atribuindo cor e toxicidade ao efluente mesmo após o tratamento<sup>4</sup>.

No esforço para encontrar tecnologias alternativas e economicamente viáveis, processos de biorremediação deste efluente por enzimas ligninolíticas tem sido bastante explorados<sup>3, 5</sup>. Mas, embora tenham sido publicados muitos trabalhos envolvendo a aplicação de enzimas ligninolíticas na biodegradação de compostos individuais, em sistemas de batelada, são poucos os estudos que descrevem a aplicação destas enzimas em sistemas de fluxo contínuo, usando uma matriz de efluente.

Considerando que a associação de processos enzimáticos com sistemas de Lagoas Aeradas Facultativas (LAF) é uma alternativa para aumentar a eficiência destes sistemas sem implicar em grandes mudanças nas plantas mais antigas de tratamento, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de enzimas ligninolíticas (em especial a Lacase) na remediação dos compostos fenólicos presentes no efluente *kraft*, durante tratamento em Lagoa Aerada Facultativa (LAF), assistida com extrato enzimático de um Fungo da Podridão Branca (*Trametes* sp.).

## METODOLOGIA

O efluente industrial utilizado foi obtido de uma indústria de papel e celulose *kraft* não branqueada, localizada na região metropolitana de Curitiba - PR, Brasil. O efluente foi coletado na entrada do sistema de lagoas de estabilização, transportado em galões de 10 L, e preservado a 4°C, na ausência de luz<sup>6</sup>. O Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET), foi produzido no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR – Campus Curitiba, por fermentação líquida<sup>7</sup>.

Tanto o efluente *kraft* quanto o EET foram caracterizados mediante análises de DQO, DBO<sub>5,20</sub>, Cor, Compostos Lignínicos (CL), Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Área Espectral (AE), em amostra filtradas em 0,45 µm<sup>8,9,10</sup>, além de medições de pH (pHmetro CienlaB mPA-210) e Turbidez (Turbidímetro Policontrol AP2000) em amostras não filtradas. Por conta da possibilidade da presença das enzimas ligninolíticas Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase no EET, também foram determinadas as atividades destas enzimas<sup>11,12,13</sup>.

Para o experimento em fluxo contínuo, foi montado um sistema composto por 2 Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) em escala de bancada, uma para aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET) e outra como controle (nas mesmas condições de tratamento, mas sem aplicação de enzimas), ambas com volume útil de 1 L e separadas em duas zonas: zona de aeração (entrada do afluente) e zona de sedimentação (saída do efluente). A alimentação deu-se por meio de bombas peristálticas (Milan - Mod.BP 600) e a aeração por compressores de ar (Boyu - U 3800). Durante todo o experimento manteve-se a oxigenação para uma concentração maior que 5 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, mediante medições de Oxigênio Dissolvido (OD) na zona de aeração (Oxímetro Lutron DO-5519).

Antes da entrada nas LAFs adicionou-se no efluente da indústria solução de NH<sub>4</sub>Cl e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, para uma proporção de 100:5:1 de DBO:N:P, e corrigiu-se o pH do efluente para 7,0. A Carga Orgânica Volumétrica (COV) foi de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> (COV média da indústria) e foi mantida variando o Tempo de Detenção Hidráulica (TDH), levando em conta a concentração de matéria orgânica do efluente *kraft* da indústria. Utilizou-se biomassa proveniente do fundo da LAF da indústria para inoculação das lagoas (controle e com EET), para uma concentração de 2 g SSV L<sup>-1</sup> em cada uma delas.

As LAFs operaram por 60 dias e os parâmetros de controle - OD e pH - foram medidos diariamente. Para fins de monitoramento da eficiência do sistema, foram realizadas análises de DQO, DBO<sub>5,20</sub>, Cor, Compostos Lignínicos (CL), Compostos Fenólicos Totais (CFT), Área Espectral (AE) e Turbidez, duas vezes por semana, seguindo a metodologia usada na caracterização. Também foram realizadas análises de toxicidade aguda em *Daphnia magna*, nas amostras do afluente (efluente *kraft* industrial) e do efluente das LAFs após estas atingirem o estado estacionário<sup>14</sup>. Ao longo deste estudo, todas as análises laboratoriais foram realizadas em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de análise da atividade enzimática encontrada no Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET) produzidos no Laboratório de Biotecnologia do campus universitário, mostraram uma atividade de 5,725 ± 0,320 U mL<sup>-1</sup> para Lacase e 0,005 ± 0,003 U mL<sup>-1</sup> para Manganês Peroxidase (MnP). Já para Lignina

Peroxidase (LiP) não foi detectada atividade. A aplicação diária de EET dentro da LAF foi equivalente a 0,02 U mL<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> de Lacase. Na Tabela 1 são apresentados os valores de caracterização do efluente comparado às características do EET na proporção utilizada na LAF (0,02 U mL<sup>-1</sup> de Lacase).

**Tabela 1: Caracterização do efluente *kraft* e do Extrato Enzimático de *Trametes sp.***

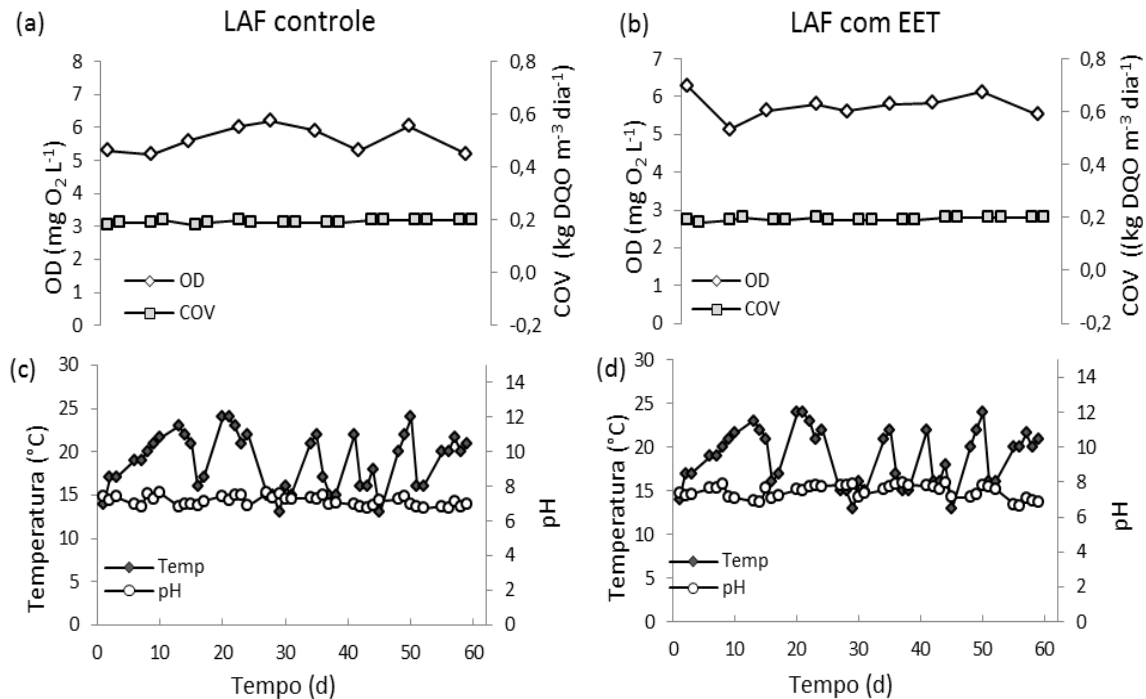
Parâmetros	Efluente <i>kraft</i> *	Extrato Enzimático**
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	655,57 ± 215,80	39,39 ± 0,54
DBO <sub>5,20</sub>	214,93 ± 41,43	-
DBO <sub>5,20</sub> /DQO	0,34 ± 0,05	-
Cor (VIS <sub>440</sub> ) (1×1cm)	0,52 ± 0,12	0,0022 ± 0,0001
CFT (UV <sub>215</sub> ) (mg L <sup>-1</sup> )	255,14 ± 69,88	1,66 ± 0,28
CL (UV <sub>280</sub> ) (1×1cm)	4,26 ± 1,59	0,0011 ± 0,0001
Área espectral (cm <sup>2</sup> )	72,34 ± 0,8	4,50 ± 0,02
pH	8,64 ± 0,28	7,12 ± 0,2
Turbidez (UNT)	51,9 ± 6,6	0,60 ± 0,08

**Nota:** \* Média de três coletas. \*\*Diluição em água deionizada para uma concentração de 0,02 U mL<sup>-1</sup> de Lacase.

Como pode-se observar na Tabela 1, o efluente usado no estudo é predominantemente alcalino, um vestígio da polpação com sulfeto e hidróxido de sódio. O efluente também apresenta uma relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO superior a 0,25, o que viabiliza o tratamento biológico, entretanto possui também altos níveis de compostos lignínicos e fenólicos, além da cor. Processos biológicos convencionais apresentam baixa eficiência quando aplicados para a remediação de compostos fenólicos em concentrações acima de 100 mg L<sup>-1</sup>, devido a elevada toxicidade conferida por esses compostos<sup>15</sup>, por esse motivo há necessidade de testar tratamentos alternativos.

Ainda na Tabela 1 observa-se que na concentração de 0,02 U mL<sup>-1</sup> de Lacase bruta, o EET proporciona um incremento inicial nos parâmetros de análise da eficiência das LAFs, mas estes valores de incremento podem ser desconsiderados, já que representam uma fração mínima da concentração inicial do efluente e também por ser de composição biodegradável.

Na Figura 2 são apresentados os parâmetros de controle das duas LAFs, controle e com Extrato Enzimático de *Trametes sp.* durante os 60 dias da Fase I.

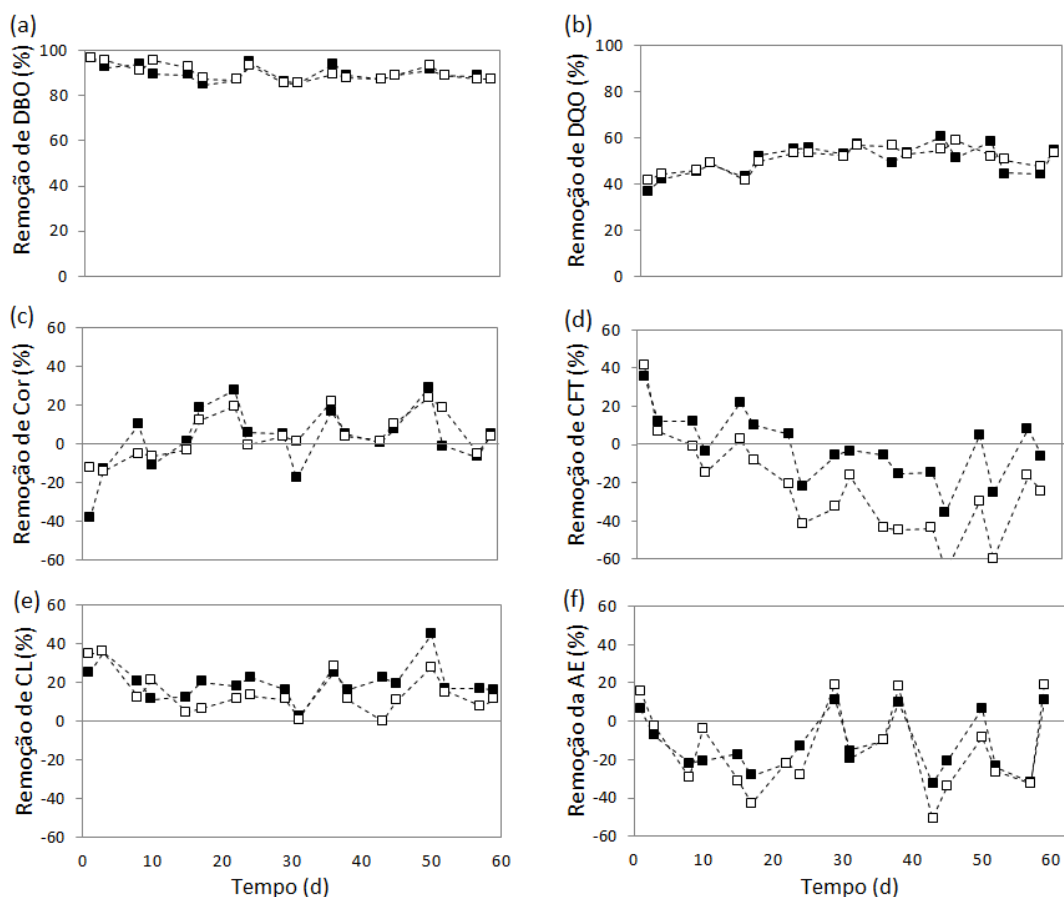


**Figura 2: Parâmetros de controle medidos nas Lagoa Aerada Facultativa controle (a e c) e com aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (b e d), durante a Fase I.**

Como se pode observar na Figura 2, a temperatura ambiente teve uma média de  $18,87 \pm 3,23$  °C, o pH variou de  $7,26 \pm 0,77$ , a COV se manteve em  $0,2 \pm 0,03$  kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e o Oxigênio Dissolvido (OD) foi de  $6,33 \pm 0,40$  mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>, entretanto, os valores de OD mostrados pela Figura 2 representam os valores mais altos, medidos próximo ao difusor de ar dentro das lagoas, sendo que a quantidade de O<sub>2</sub> diminuía nas extremidades mais distantes do ponto de aplicação, propiciando o surgimento de zonas de sedimentação nessas regiões, onde obteve-se medições de até 0,04 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. As medidas da zona de sedimentação não foram incluídas na média da Figura 2.

De acordo com a literatura uma aeração eficiente proporciona Potencial de Oxirredução (E<sub>H</sub>) > 100 mV<sup>16</sup>. A medição dentro de ambas as lagoas, após correção com o valor de referência do eletrodo usado<sup>17</sup>, indicou valores de E<sub>H</sub> que variaram de 206 a 238 mV no meio do efluente. Já no sedimento, o E<sub>H</sub> foi de  $-40 \pm 06$  mV, configurando uma região anóxica. Condições anaeróbicas não foram detectadas no sedimento, possivelmente pela impossibilidade de fazer a medida no centro da biomassa sedimentada.

Na Figura 3 apresentam-se os valores de eficiência das Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs), controle e com aplicação de EET, obtidos semanalmente, durante o período de 60 dias de funcionamento do sistema.



**Figura 3: Valores de eficiência das Lagoas Aerada Facultativas (LAFs), controle (□) e com aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes sp.* (■), durante 60 dias de experimento.**

Como pode ser visto na Figura 3, os valores de remoção dos parâmetros de DBO<sub>5,20</sub>, DQO, Cor, CL e AE obtidos na LAF com aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes sp.* (EET) foram muito próximos dos valores obtidos na LAF controle. A LAF com EET apresentou remoção média de aproximadamente 90 % da DBO<sub>5,20</sub>, 50 % da DQO, 2 % da Cor, 20 % dos CL e -12 % da AE, e estes valores não apresentaram diferença significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ) dos valores obtidos da LAF controle.

Os valores de remoção de DBO<sub>5,20</sub>, DQO, Cor e Compostos Lignínicos obtidos em ambas as LAFs, controle e com EET, foram compatíveis com os resultados de Lagoas apresentados na literatura<sup>18,19</sup>. As variações obtidas nos resultados de remoção dos CFTs, CL, Cor e Área Espectral, mostram a instabilidade das condições de degradação dos compostos específicos, também verificada por outros autores<sup>18,19,20</sup>.

O aumento de Compostos Fenólicos Totais (CFTs) observado na Figura 1 d, é um comportamento típico de sistemas biológicos bem aerados, resultante da remoção biológica de grupos metoxi e da auto oxidação de Compostos Fenólicos de alta Massa Molecular (MM) gerando compostos de menor MM, que permanecem com o grupamento OH em ligações aromáticas<sup>18, 19</sup>. Porém, enquanto na LAF controle se observou um incremento médio de aproximadamente 23 % dos CFT, na LAF com EET, o incremento foi significativamente menor (ANOVA,  $p < 0,05$ ) apresentando uma média de aproximadamente 1%.

Uma vez que a reação catalítica de degradação de compostos lignínicos pela Lacase se inicia com a extração de um elétron de um substrato fenólico gerando um radical fenoxila, que torna a molécula instável e portanto mais favorável ao processo de degradação<sup>21</sup>, os resultados indicam que a presença do EET com atividade enzimática de Lacase favoreceu a degradação, de modo a reduzir a geração de compostos fenólicos.

Estudos sobre degradação de fenóis totais do efluente de uma indústria papelreira em meios submersos com FPB, observaram redução de fenóis de até 59%, sendo que esta redução foi associada à presença de enzimas Lacases e Peroxidases produzidas pelo fungo<sup>22</sup>. No caso do presente estudo, a presença, mesmo que pequena, de atividade de MnP no EET (0,005 U mL<sup>-1</sup>), indica atuação desta enzima em colaboração com a Lacase, além disso, já foi demonstrado que o íon Mn<sup>2+</sup> atua como mediador ativo para MnP e Lacase, facilitando a catálise enzimática<sup>23</sup>.

Mas o efeito da Lacase, claramente observado nos valores de remoção dos CFT, não refletiu da mesma forma nos CL e na AE. Isso porque, após desestabilização do polímero da lignina, ocasionada pela atividade catalítica da Lacase nos CFT, também pode ocorrer a repolimerização da estrutura da lignina, em que esta assume uma nova forma, pouco diferente da estrutura original, e conseqüentemente não se tem redução dos CL ou da AE do efluente<sup>21</sup>.

Para descartar a possibilidade da reorganização da estrutura polimérica da lignina ter formado estruturas com maior toxicidade aguda, foram realizados testes de ecotoxicidade aguda em *Daphnia magna* no estado estacionário das LAFs (96 % de remoção da DBO para ambas as lagoas, controle e com EET), e os resultados mostraram efeito agudo para o afluente do tratamento com Fator de Toxicidade FT = 2 e remoção da ecotoxicidade aguda na LAF controle e na LAF com EET (ambas com FT=1), indicando que a aplicação de EET na LAF não proporcionou geração de subprodutos tóxicos durante a degradação biológica.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de Lagoa Aerada Facultativa (LAF) assistida com Extrato Enzimático de *Trametes* sp. apresentou valores de remoção típicos de LAFs para os parâmetros de DBO<sub>5,20</sub>, DQO, Cor, CL e AE, apresentando diferença da LAF controle apenas nos resultados de remoção dos CFT. A redução do incremento dos CFT na LAF com EET mostrou que a Lacase fúngica pode catalisar a oxidação de compostos fenólicos, mas nem sempre essa oxidação desencadeia a completa despolimerização das moléculas de lignina, podendo também proporcionar a repolimerização sob novas formas de estruturas cromóforas com MM menor. Como os CFT são os principais agentes da toxicidade presente no efluente, a redução destes compostos já é de grande valia para o sistema de lagoas, considerando que os resultados positivos na remediação da geração de CFT poderiam ser potencializados fazendo uso de um extrato fúngico mais concentrado em termos de atividade enzimática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OKADA, W.S. Otimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB 444 para biorremediação de solos. Dissertação de Mestrado-Universidade de São Paulo, Departamento de Biotecnologia, 2010.
2. SOUZA, A.F., ROSADO, F.R. Utilização de fungos Basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, v.2, n.1, p.121-139, 2009.
3. KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. Current Opinion in Biotechnology, v.33, p.268-278, 2015.
4. RABELO, M.D. Avaliação da aplicação combinada dos processos foto-fenton e biológico no tratamento de efluentes de indústria de celulose kraft branqueada. Dissertação de mestrado-Programa de Pós-Graduação em Agroquímica da Universidade Federal de Viçosa, 2005.
5. SKORONSKI, E., FERNANDES, M., FURIGO JÚNIOR, A., SOARES, C.H.L., JUAREZ, J.J. Imobilização de lacase de *Aspergillus* sp. em quitosana e sua aplicação na bioconversão de fenóis em reatores de leito fixo. Química Nova, v.37, n.2, p. 215-220, 2014.
6. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 9898: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, 1987.
7. HERMANN, A.C. Biodegradação dos Antimicrobianos Sulfametoxazol e Trimetoprima por Enzimas Ligninolíticas de Basidiomicetos. Trabalho de Conclusão de Curso-Departamento Acadêmico de Química e Biologia-Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.
8. APHA - American Public Health Association. Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater. 21 ed. Washington, USA, 2005.

9. ÇEÇEN, F. The use of UV-VIS measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents. In Conference Proceedings – 7th International Water Association Symposium on Forest Industry Wastewaters, Seattle- Washington, USA, 2003.
10. SALVADOR, T., MARCOLINO, L.H., PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de corantes têxteis e remediação de resíduos de tingimento por processos fenton, foto-fenton e eletro-fenton. *Quimica Nova*, v.35, p. 932-938, 2012.
11. HOU, H.M., ZHOU, J.T., WANG, J., DU, C., YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, v.39, p.1415-1419, 2004.
12. WARIISHI, H., VALLI, K., GOLD, M.H. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* – kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, n.33, p.23688-23695, 1992.
13. ARCHIBALD, F.S. A New Assay for Lignin-Type Peroxidases Employing the Dye Azure B. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.9, p.3110-3116, 1992.
14. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* sp. (*Cladocera*, *Crustacea*). Rio de Janeiro, p. 16, 2009.
15. WHITELEY, C.G., LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.38, p.291-316, 2006.
16. METCALF & Eddy. Inc: TCHOBANOGLIOUS, G., BURTON, F. L., STENSEL, H. D. Wastewater Engineering treatment Disposal Reuse. Mc Graw Hil Education. 4º Ed., p. 1815, 2003.
17. JARDIM, W. F. Medição e interpretação de valores do potencial redox (EH) em matrizes ambientais. *Química Nova*. Vol. 37, n. 7, p.1233-1235, 2014.
18. CHAMORRO, S., XAVIER, C., HERNÁNDEZ, V., BECERRA, J., VIDAL, G. Aerobic removal of stigmaterol contained in *kraft* mill effluents. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.12 n.2, p.1–7, 2009.
19. XAVIER, C.R., OÑATE, E., MONDACA, M.A., CAMPOS, J.L., VIDAL, G. Genotoxic effects of *kraft* pulp mill effluents treated by biological aerobic systems. *Interciencia*, v.36, p.412-416, 2011.
20. VILLELA, S. M. Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleiras. Dissertação de mestrado-Programa de Pós-graduação em Biotecnologia-Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
21. HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, v.13, p.125-135, 1994.
22. MUNARI, F.M., GAIO, T.A., DILLON, A.J.P. Cinética da secreção de lacases e peroxidases e degradação de fenóis totais em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* com efluentes da indústria papeleira. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis. Anais. Florianópolis, 2003.
23. KEREM, Z.; HADAR, Y. Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during soli-state fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3057-3062, 1993.