



179 - REMOÇÃO DE COMPOSTOS RECALCITRANTES EM REATOR POR LACASE IMOBILIZADA EM NANOCELULOSE BACTERIANA

Hélen Cristina Oliveira dos Reis⁽¹⁾

Engenheira Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Experiência na área de saneamento, com ênfase em efluentes têxteis, biorremediação e biossorção. Atualmente, mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) na linha de pesquisa de Processos Químicos e Biotecnológicos para tratamento e valorização de resíduos.

Ketiny Camargo de Castro⁽²⁾

Engenheira Sanitária e Ambiental pela UFMT. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental pela UTFPR.

Giselle Maria Maciel⁽³⁾

Professora Dra. no Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) da UTFPR, Campus Curitiba.

Claudia Regina Xavier⁽⁴⁾

Professora Dra. no Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) da UTFPR, Campus Curitiba.

Gustavo Henrique Couto⁽⁵⁾

Professor Dr. no Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) da UTFPR, Campus Curitiba.

Endereço⁽¹⁾: Rua: Dep. Heitor Alencar Furtado, 5000 – Campo Comprido - Curitiba - Paraná - CEP: 81280-340 - Brasil - Tel: +55 (65) 99965-3072 - e-mail: helenreis08@gmail.com

RESUMO

Este trabalho tem o objetivo de imobilizar lacase de *Myceliophthora thermophila* para o pós-tratamento de efluente de papel e celulose tratado anteriormente por processo biológico com enfoque na remoção de compostos recalcitrantes. Para a imobilização, o suporte utilizado foi a nanocelulose bacteriana (NCB), um biopolímero produzido por algumas espécies de bactérias que apresenta diversas vantagens tais como elevada área superficial, resistência mecânica e flexibilidade. Após a produção da nanocelulose, a lacase foi imobilizada pelo método de adsorção. Os testes foram realizados em batelada em reator contendo 200 mL de efluente real a temperatura constante (30°C) com aeração, tendo um controle contendo apenas o suporte e outro com a enzima imobilizada. As análises foram feitas após 12 e 24 horas, analisando-se certos parâmetros, como, DQO, pH, turbidez, compostos fenólicos, aromáticos, lignínicos, lignossulfônicos e cor. Observou-se que ocorreu a adsorção destes compostos na NCB no controle para o período de 12 horas, tendo uma diminuição para o período de 24 horas. Enquanto que para as amostras referente ao tratamento do efluente pela enzima imobilizada, observou-se redução dos compostos com exceção dos compostos fenólicos. Em suma, infere-se o potencial da NCB como suporte para enzima para a utilização de remoção de compostos recalcitrantes.

PALAVRAS-CHAVE: Compostos Recalcitrantes, Efluente de papel e celulose, Imobilização de lacase.

INTRODUÇÃO

Atualmente, uma questão de preocupação no âmbito ambiental se refere a crescente geração industrial de poluentes, como, pesticidas, inseticidas, metais pesados, corantes, efluentes de papel e celulose e compostos fenólicos. Esta preocupação está relacionada com o fato destes compostos apresentarem alta toxicidade, serem carcinogênicos além persistirem e acumularem no meio ambiente afetando assim a saúde humana e os seres vivos da região impactada (SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018).

Diversos métodos podem ser utilizados na remediação destes compostos recalcitrantes, entretanto, tais métodos geralmente por si só não são capazes de promover a remoção de todos estes poluentes do meio ambiente. Além de que certos métodos, como, a utilização de radiação ultravioleta (UV), deposição destes resíduos em determinados locais ou incineração em altas temperaturas não são eficazes seja pelo elevado custo, alta complexidade e possível formação de compostos ainda mais recalcitrantes ou tóxicos que os originais (VIDALI, 2001).



Portanto, uma alternativa ambientalmente correta é a aplicação de enzimas como forma de biorremediação. Tratamentos enzimáticos geralmente são métodos rápidos, eficientes, seguro e com menor custo quando comparado à outras técnicas (DZIOŃEK, WOJCIESZYŃSKA, GUZIK, 2016; KARIGAR, RAO, 2011). Existem diversas classes de enzimas que podem ser utilizadas num processo de biorremediação, como, as hidrolases e oxirredutases (SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018).

Dentre as oxirredutases pode-se citar as lacases, que apresentam capacidade de catalisar a oxidação de diversos produtos orgânicos e inorgânicos, como, fenóis e aminas aromáticas por meio da redução de oxigênio para água (HUBLIK, SCHINNER, 2000; SHARMA, DANGI, SHUKLA, 2018; PACHECO, SOARES, 2014). Entretanto, utilizar a enzima livre não é viável economicamente devido a seu tempo de meia vida curto além de sofrer com as alterações operacionais, como mudanças no pH e temperatura (RODRIGUÉZ-DELGADO et al., 2015). Assim, a imobilização de uma enzima em um determinado suporte insolúvel torna possível a sua reutilização por ciclos, além de possibilitar maior estabilidade operacional a enzima frente a condições adversas (CHEN, ZOU, HONG, 2015). Pang, Li e Zhang (2015), alcançaram 98,9 % e 99,9% de remoção de bisfenol A e catecol, respectivamente, por lacase imobilizada em nanomateriais de carbono. Em trabalho de Pacheco e Soares (2014), averiguou-se que a imobilização da enzima foi necessária para ter o seu na remoção de fenóis presentes em efluentes de indústrias papeleiras.

Os materiais utilizados para a imobilização enzimática são os mais diversos como nanopartículas, resíduos agroindustriais, materiais compostos de sílica, entre outros. Entretanto, estes materiais sintéticos podem conter substâncias que de certa forma poderá trazer algum impacto ambiental, além de que certos materiais possam apresentar baixa área superficial para a imobilização enzimática (CHEN, ZOU, HONG, 2015). A utilização de nanocelulose bacteriana (NB), um biopolímero produzido por bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, é uma alternativa a estes materiais por ser biodegradável, apresentar grande área superficial para imobilização, além de possuir resistência mecânica e de ser moldável de acordo com o interesse (BIELECKI et al., 2002).

Poucos estudos testaram esse biopolímero em conjunto com enzimas no tratamento de efluentes reais. Nesse sentido, esse trabalho pretende avaliar o potencial de aplicação da lacase imobilizada em nanocelulose bacteriana como pós-tratamento de efluente de papel e celulose tratado previamente por processo biológico.

OBJETIVOS

Remover compostos recalcitrantes de efluente previamente tratado biologicamente por lacase comercial de *Myceliophthora thermophila* imobilizada em nanocelulose bacteriana (NCB) em reator de leito fluidizado. De forma mais específica, produzir membranas de nanocelulose bacteriana utilizando a cepa *Gluconacetobacter xylinum* por cultivo estático em placas de cultivo celular com posterior purificação, imobilizar a lacase em nanocelulose pelo método de adsorção, avaliar a atividade enzimática da lacase livre e imobilizada utilizando 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico (ABTS) e analisar a eficiência da lacase imobilizada como pós-tratamento de efluente de papel e celulose tratado previamente biologicamente por lodos ativados.

METODOLOGIA

O presente trabalho teve três etapas principais: a) produção, purificação e liofilização da nanocelulose bacteriana, b) imobilização da lacase na nanocelulose bacteriana e c) avaliação da remoção de compostos recalcitrantes pela lacase imobilizada em reator de escala laboratorial, conforme o fluxograma mostrado na Figura 1.

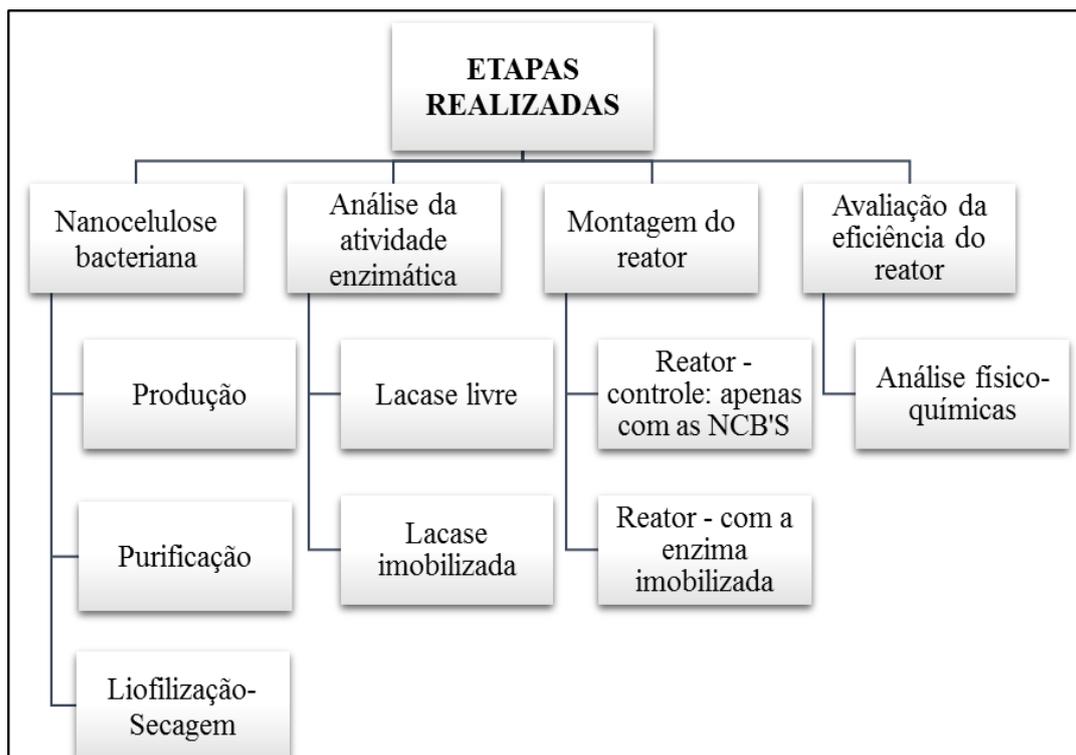


Figura 1: Fluxograma das principais etapas do projeto.

A produção de NCB, análise da atividade enzimática e tratamento do efluente foram realizados no laboratório de Pesquisa Relacionada a Biomassa e Bioenergia (LAPREBB) e no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Ecoville. As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias (LATAR), no Laboratório Multiusuário de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) da mesma universidade.

MATERIAIS

A enzima lacase (E.C. 1.10.3.2) de *Myceliophthora thermophila* comercial foi obtida da Novozymes Ltda. Outros reagentes necessários e o ABTS foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. A cepa *Gluconacetobacter* sp. utilizada representa um isolado de vinho tinto e mantido no laboratório de microbiologia.

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA

A produção de NCB cultivou a bactéria *Gluconacetobacter* sp. em meio de cultura Hestrin-Schramm (H-S) modificado cuja constituição em g.L-1 foi de: 20,0 de glicerol, 5,0 de extrato de levedura, 5,0 de peptona, 2,7 de fosfato de sódio bibásico e 1,15 de ácido cítrico com o pH ajustado para 4,0 utilizando solução de ácido acético glacial (SAMPAIO et al., 2016; HESTRIN, SCHRAMM, 1954). Para isso uma colônia mantida em meio H-S sólido foi transferida para um frasco contendo 10 mL de meio H-S modificado seguido por incubação a 28 °C por 48 h. Após, o frasco com meio foi agitado vigorosamente para liberar as células ligadas ao biofilme em formação. Essa suspensão foi então transferida para 90 mL de meio H-S modificado que após agitação foi transferido para placas de cultivo de células de seis poços (10 mL cada poço). Os cultivos foram realizados sob condição estática aeróbica a 28°C durante 5-7 dias até a formação de membranas de NCB com uma espessura em torno de 3-5 mm e um peso úmido médio de $4,0 \pm 1,0$ g (Figura 2).

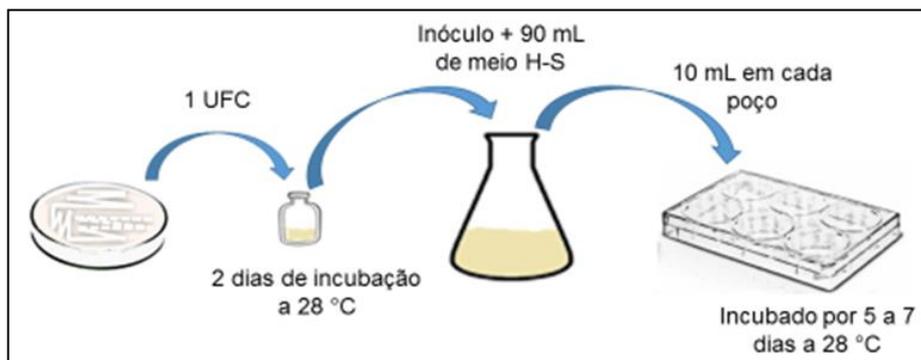


Figura 2: Representação esquemática do procedimento empregado para o cultivo de NCBs em placas de cultivo celular de 6 poços.

Para a purificação as membranas de NCB foram imersas em solução de hidróxido de sódio 0,1 M por 1 hora a uma temperatura de 90°C (processo repetido até três vezes) para remover qualquer resquício de células bacterianas e do meio de cultura. Por fim, as membranas foram imersas novamente em água deionizada até chegar a pH neutro e se não utilizadas imediatamente serão estocadas em geladeira até seu uso (DROZD et al., 2018; SAMPAIO et al., 2016; YAO et al., 2011).

IMOBILIZAÇÃO DA LACASE

As membranas de NCB purificadas foram congeladas a -80 °C em ultrafreezer e posteriormente liofilizadas (liofilizador marca Liotop, a -48 ° e 0,1 mbar, por 24 h). Para a imobilização por adsorção, membranas previamente cortadas na forma de pequenas esferas (6 mm de diâmetro) foram pesadas (200 mg) e imersas em 100 mL de solução aquosa contendo lacase (diluída 25.000, pH 5) seguido por incubação a 30 °C e agitação de 80 rpm durante 12 horas. Por fim, o material foi filtrado, lavado com uma solução tampão de acetato de sódio (50 mM - pH 5) e seco com papel e estufa a 30 °C (CHEN, ZOU, HONG, 2015).

MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para analisar a atividade enzimática tanto da enzima livre quanto da imobilizada utilizou-se o método que se baseia na oxidação do ABTS a ABTS+ e este produto apresenta absorção à 420 nm ($\epsilon = 36 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), sendo os dados obtidos por meio de um espectrofotômetro.

Para os ensaios, preparou-se uma mistura contendo 200 μL de ABTS 10 mM, 1,7 mL de tampão acetato de sódio (50 mM - pH 5) e 100 μL de enzima livre ou imobilizada. Esta mistura foi colocada em tubos que ficaram em banho maria à 40 °C por 5 minutos (tempo de reação) e então fez-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro. Vale ressaltar que para essa análise, uma unidade de atividade da enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar um μmol de ABTS por minuto e sua unidade expressa a atividade de 1 mL ou 1 mg de enzima (CHEN, ZOU, HONG, 2015; SAMPAIO et al., 2016; SATHISHKUMAR et al., 2014). Assim, a atividade enzimática é expressa em $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Neste trabalho foram medidas e comparadas as atividades da enzima livre e imobilizada.

Para o cálculo do valor da atividade enzimática, foram utilizadas as fórmulas a seguir:

$$U/g = \frac{ABS \times f_{dil} \times V_r \times 10^6}{t \times m_{CB} \times \epsilon}$$

equação (1)

$$U/L = \frac{ABS \times f_{dil} \times V_r \times 10^6}{t \times V_e \times \epsilon}$$

equação (2)

Em que, ABS é a absorvância lida a 420 nm, f_{dil} é o fator de diluição caso a enzima tenha sido diluída, V_r é referente ao volume total da reação que será colocada na cubeta em L (que para a livre foi 4 mL referente a 3,4 mL do tampão de acetato de sódio 50 mM, 0,4 mL do ABTS 10 mM e 0,2 mL da enzima livre; para imobilizada seguiu a mesma proporção para o tampão e o ABTS), enquanto que, V_e é o volume da enzima que foi adicionada em L, e m_{CB} é referente a massa da celulose bacteriana que foi adicionada ao experimento antes de ser imobilizada em g. Além de que t é o tempo da reação que foi de 5 minutos (para livre) e de até 10 minutos (para imobilizada) e ϵ é o coeficiente relacionado ao ABTS que é $36.000 M^{-1}.cm^{-1}$ a 420 nm. A equação 1 é referente ao cálculo da atividade enzimática para a enzima imobilizada, enquanto, a equação 2 é referente da enzima livre.

TRATAMENTO DO EFLUENTE KRAFT EM REATOR

Para realizar o tratamento foi montando um reator em escala de bancada laboratorial conforme apresentado na Figura 3. Para os testes, o reator operou em batelada com 200 mL de efluente de papel e celulose previamente tratado biologicamente por lodos ativados, 200 mg de nanocelulose bacteriana (controle), 200 mg de nanocelulose bacteriana imobilizada com lacase com aeração contínua e manteve a temperatura a 30 °C. As amostras foram retiradas depois de 12 horas e 24 horas.



Figura 3: Esquema do reator para a remoção de compostos recalcitrantes de efluente de papel e celulose tratado previamente por lodos ativados.

Para análise da eficiência do reator, o efluente da indústria foi caracterizado quanto a Demanda Química de Oxigênio (DQO), cor, turbidez (Turbidímetro Policontrol AP2000), Compostos Fenólicos Totais (CFTs), Compostos Aromáticos, Compostos Lignínicos (CL) e Compostos Lignossulfônicos conforme Tabela 1. Vale ressaltar que se realizou a caracterização do afluente e dos efluentes dos tempos 12 horas e 24 horas tanto do controle e do com a enzima imobilizada.

Tabela 1: Metodologias para caracterização de efluente quanto a DQO, cor, CFTs, Compostos Aromáticos, CL e Compostos Lignossulfônicos.

PROCEDIMENTOS	MÉTODO	DESCRIÇÃO
DQO	5220 D (APHA, 2012)	Refluxo fechado, método colorimétrico
Cor	UV ₄₄₀ (CHAMORRO et al., 2009)	Absorvância espectrofotométrica VIS em 440 nm
CFTs	UV ₂₁₅ CHAMARRO et al., 2009	Absorvância espectrofotométrica UV em 215 nm
Compostos Aromáticos	UV ₂₅₄ (CEÇEN, 2003)	Absorvância espectrofotométrica UV em 254 nm
Compostos Lignínicos	UV ₂₈₀ (CEÇEN, 2003)	Absorvância espectrofotométrica UV em 280 nm
Compostos Lignossulfônicos	UV ₃₄₆ (CEÇEN, 2003)	Absorvância espectrofotométrica UV em 346 nm

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA

Membranas de NCB foram produzidas por *Gluconacetobacter* sp. em placas para cultivo de células como apresentado na Figura 4.



Figura 4: Nanocelulose bacteriana produzida utilizando o inóculo de *Gluconacetobacter* sp.

Quanto ao tratamento, a metodologia utilizada mostrou-se eficiente como pode ser verificado na Figura 5 em que se tenha o antes e depois das membranas após processo de tratamento utilizando NaOH 0,1 M à 90°C durante uma hora, sendo o processo repetido três vezes (dependendo da coloração da membrana).

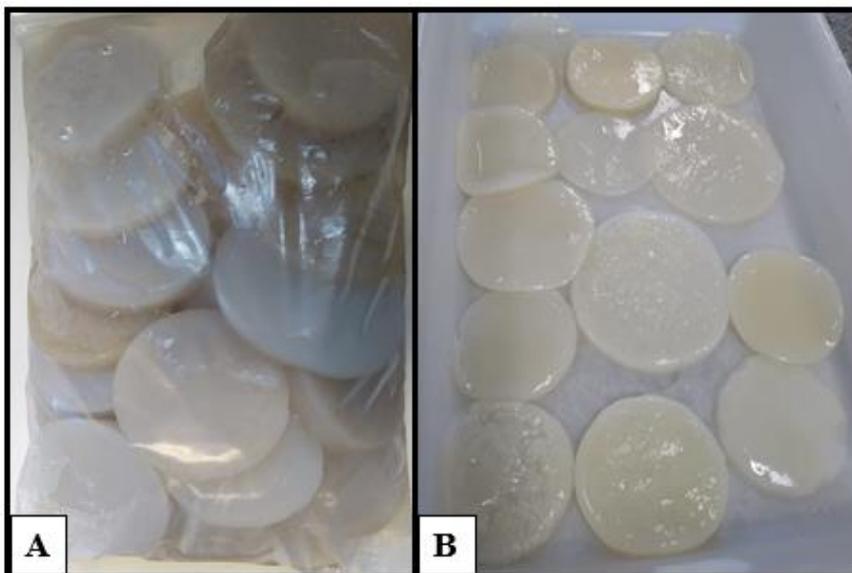


Figura 5: Membranas antes (A) e depois (B) do tratamento químico.

No que tange ao processo de liofilização, as membranas foram encaminhadas para este processo e pode-se observar o resultado deste processo na Figura 6. Após o processo de liofilização, as membranas foram cortadas com o tamanho previamente definido e estocadas até o uso conforme apresentado na Figura 7.



Figura 6: Membrana após o processo de liofilização.



Figura 7: Celulose bacteriana liofilizada com o corte padrão.

IMOBILIZAÇÃO DA LACASE EM NANOCELULOSE BACTERIANA

Visando determinar a atividade enzimática para a imobilização em NCB inicialmente foram determinados valores de atividade da lacase livre em diferentes concentrações. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 para 4 concentrações de lacase testadas.

Tabela 2: Resultados referentes a atividade enzimática da lacase livre.

Concentração (PPM)	Atividade enzimática	
	U/mL	U/L
20	1.614	1.613.940
15	1.663	1.662.780
10	2.434	2.434.230
5	3.934	3.933.840

Quanto a enzima imobilizada na NCB, foi observado um decaimento da atividade enzimática conforme Tabela 3 conforme observado em trabalho de Chen, Zou, Hong, 2015. Vale ressaltar que se considerou outras concentrações pelo fato de que após o processo de imobilização, esperava-se o decaimento da atividade da enzima. Em trabalho de Liu et al. (2012), uma variação da concentração da enzima foi determinante para obter a melhor recuperação da atividade enzimática na forma imobilizada.

Tabela 3: Resultados referentes a atividade enzimática da lacase imobilizada por adsorção.

Concentração enzimática na imobilização (PPM)	Atividade enzimática		Recuperação da atividade %
	U/mg de NCB	U/g de NCB	
100	8,93	8.932,76	0,65
200	4,63	4.631,64	0,34



CARACTERIZAÇÃO DO AFLUENTE DE PAPEL E CELULOSE

A caracterização do afluente utilizado neste trabalho está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4: Caracterização do afluente de papel e celulose tratado previamente por lodos ativados

PARÂMETROS	AMOSTRA
DQO (mg L ⁻¹)	303,22
pH	6,95
Turbidez (NTU)	139
CFT (mg L ⁻¹)	458,74
Cor (Vis _{440nm})	0,3590
Compostos aromáticos (UV _{254nm})	4,534
Compostos lignínicos (UV _{280nm})	3,762
Compostos lignossulfônicos (UV _{346nm})	1,308

Quanto as características deste afluente, HINOJOSA (2016) em seu trabalho apresentou valores semelhantes para certos parâmetros, vale ressaltar que o seu efluente era de indústria de papel e celulose e foi tratado previamente por processos biológicos.

CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES

A Tabela 5 apresenta a caracterização do efluente referente ao controle, ou seja, contendo apenas as nanocelulose bacteriana, para os dois tempos de análise 12 e 24 horas.

Tabela 5: Caracterização do efluente após 12 horas e 24 horas para o controle.

PARÂMETROS	12 horas	24 horas
DQO (mg L ⁻¹)	271,44	268,11
pH	6,95	7,00
Turbidez (NTU)	-	75
CFT (mg L ⁻¹)	373,82	462,50
Cor (Vis _{440nm})	0,286	0,316
Compostos aromáticos (UV _{254nm})	3,440	3,894
Compostos lignínicos (UV _{280nm})	2,891	3,361
Compostos lignossulfônicos (UV _{346nm})	1,080	1,213

Ao analisar a Tabela 5, percebe-se que com exceção da DQO, todos os outros parâmetros apresentaram um aumento de seus valores em 24 horas em relação a 12 horas. Isso pode ser devido a saturação do suporte. Além do pH que se manteve relativamente constante.

A Tabela 6 apresenta os dados referentes ao efluente tratado com a enzima imobilizada na nanocelulose bacteriana.

Tabela 6: Caracterização do efluente após 12 horas e 24 horas com a enzima imobilizada.

PARÂMETROS	12 horas	24 horas
DQO (mg L ⁻¹)	267,44	252,00
pH	8,16	7,50
Turbidez (NTU)	-	9 NTU
CFT (mg L ⁻¹)	454,89	457,54
Cor (Vis _{440nm})	0,316	0,299
Compostos aromáticos (UV _{254nm})	3,648	3,592
Compostos lignínicos (UV _{280nm})	3,081	3,028
Compostos lignossulfônicos (UV _{346nm})	1,110	1,109

O comportamento observado é que com exceção dos compostos fenólicos totais, os quais aumentaram dentro o período de 12 a 24 horas, e dos compostos lignossulfônicos que não apresentaram mudança, teve-se a diminuição dos outros compostos.

O comportamento referente aos compostos fenólicos tanto no controle quanto com a presença da enzima, pode ser decorrente da aeração como observado por Machado (2017), a qual realizou um projeto almejando a tratabilidade de efluente de papel e celulose por processo biológico em conjunto com enzimas, que ao realizar um teste apenas com aeração teve-se um aumento da concentração dos compostos fenólicos, comportamento observado em reatores que apresentam considerável aeração. Além de que como apresentado por (SKORONSKI et al., 2014), percebe-se uma perda rápida da atividade enzimática ao longo do tempo.

REMOÇÃO DOS COMPOSTOS RECALCITRANTES – ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DO REATOR

A Figura 8 apresenta os dados referentes a remoção da DQO considerando o controle e o reator com a enzima para os períodos de 12 horas e 24 horas para ambas situações. Vale ressaltar que a entrada é caracterizada como o valor para o afluente de um tratamento de lodos ativados, servindo então como efluente para este estudo. A relevância deste efluente para este projeto é que devido a aeração no processo de lodos ativados, tem-se um incremento dos compostos fenólicos totais que podem ser removidos por enzimas como a lacase.

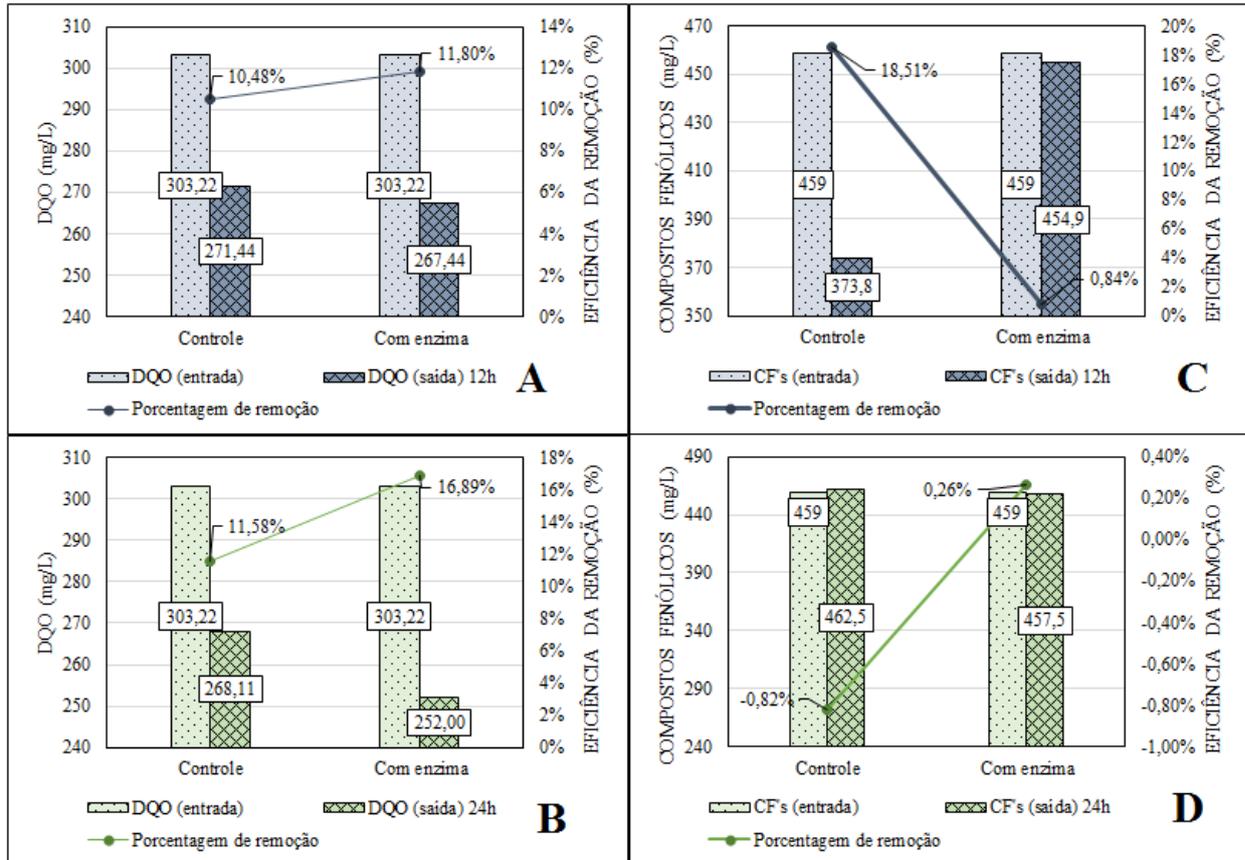


Figura 8: Resultados da remoção da DQO para o controle e com a enzima no período de 12h (A) e 24h (B) e da remoção de Compostos Fenólicos Totais (CFTs) também para o controle e com a enzima nos períodos 12h (C) e 24h (D).

A Figura 8.A é referente ao tempo de 12 horas em relação a remoção de DQO, percebe-se que com a presença da enzima tem-se um leve aumento da remoção deste parâmetro, cerca de 2%, quanto ao controle. Mesmo comportamento, observa-se com o período de 24 horas (Figura 8.B), havendo um aumento de 11,80% para o reator com a enzima, enquanto que, para o controle o aumento foi de 10,48% para 11,58%.

Enquanto que para os CFTs (Figuras 8.C e 8.D.), esperava-se que tivesse um aumento da remoção destes compostos como apresentado por Mohammadi et al. (2018) que alcançou 95% de remoção utilizando a enzima imobilizada, entretanto, os seus testes foram realizados com um composto fenólico específico, o catecol. Entretanto, observou-se uma reduzida remoção destes compostos no reator com a enzima. Além de que no controle, para o período de 24 horas, observou-se um aumento que ultrapassou o valor do efluente, o qual pode ser devido a aeração, porém, deve ser levado em conta também o processo de adsorção, pois, no período de 12 horas para o controle, teve a maior porcentagem de remoção com 18,51%. Um outro ponto importante a destacar é que para ambos os períodos teve uma redução da porcentagem de remoção dentre a faixa de 12 a 24 horas. Desta forma, uma alternativa seria realizar testes para um efluente sintético como realizado por SKORONSKI et al. (2014), o qual imobilizou lacase em quitosana para aplicação em reator de leito fixo para a bioconversão de fenóis.

A Figura 9 é referente ao comportamento da remoção dos compostos Lignínicos, aromáticos e lignossulfônicos tanto para o controle quanto para o reator com enzima para os dois períodos estudados.

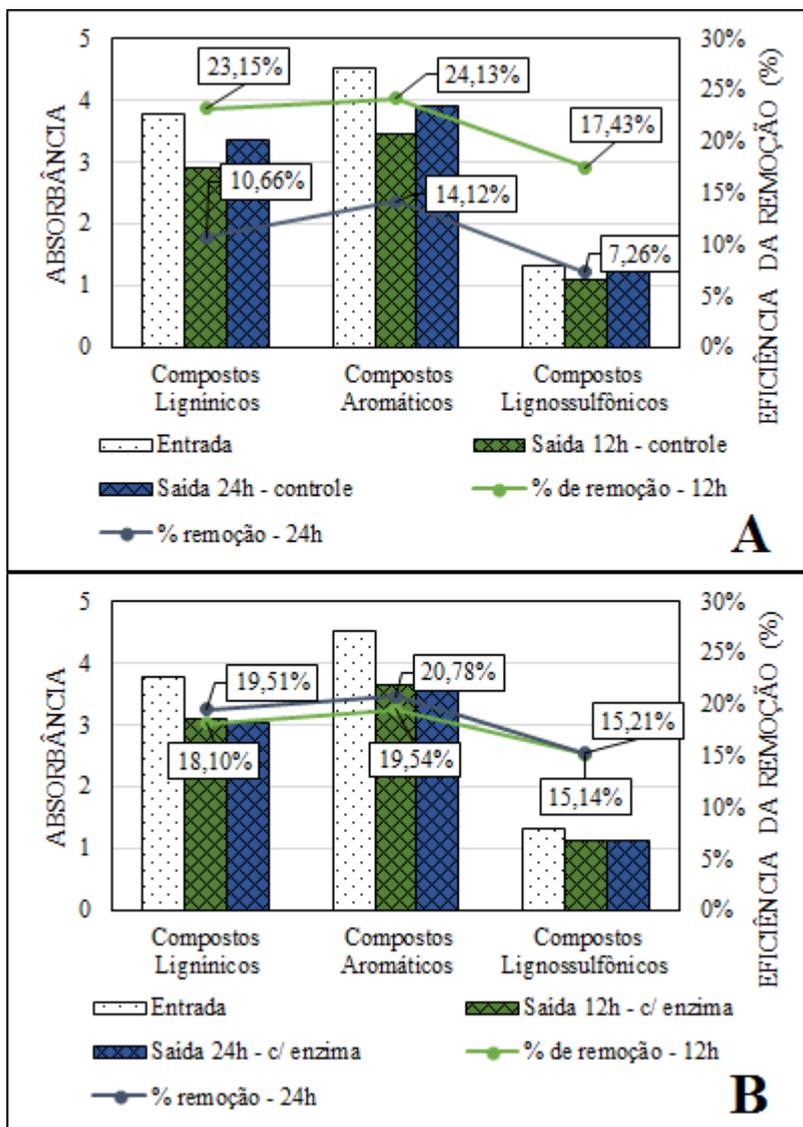


Figura 9: Resultados da remoção dos compostos lignínicos, aromáticos e lignossulfônicos para o controle no período de 12h e 24h (A) e da remoção dos compostos lignínicos, aromáticos e lignossulfônicos com a enzima nos períodos de 12h e 24h (B).

Estes compostos apresentaram um comportamento semelhante para o reator contendo enzima conforme apresentado na Figura 9.B em que se teve a remoção dos mesmos, porém, entre os períodos parece que teve uma estagnação da remoção, alcançando uma remoção de 18,10% e 19,51% para compostos lignínicos para 12 e 24 horas respectivamente, 19,54% e 20,78% para compostos aromáticos e 15,14% e 15,21% para os lignossulfônicos.

Uma outra situação foi verificada para o controle podendo ser verificado na Figura 9.A, em que comparação ao tempo de 12 horas, a remoção diminuiu para o tempo de 24 horas. Desta forma, obtiveram-se uma remoção de 23,15% para compostos lignínicos, 24,13% para aromáticos e 17,43% para lignossulfônicos para 12 horas, reduzindo-se para 10,66%, 14,12% e 7,26% respectivamente. Processo que pode ser explicado pela saturação dos poros ativos na membrana.

Conforme apresentado pela Figura 10, observa-se a remoção da cor também para o controle e o reator com a lacase imobilizada para os dois tempos de estudo.

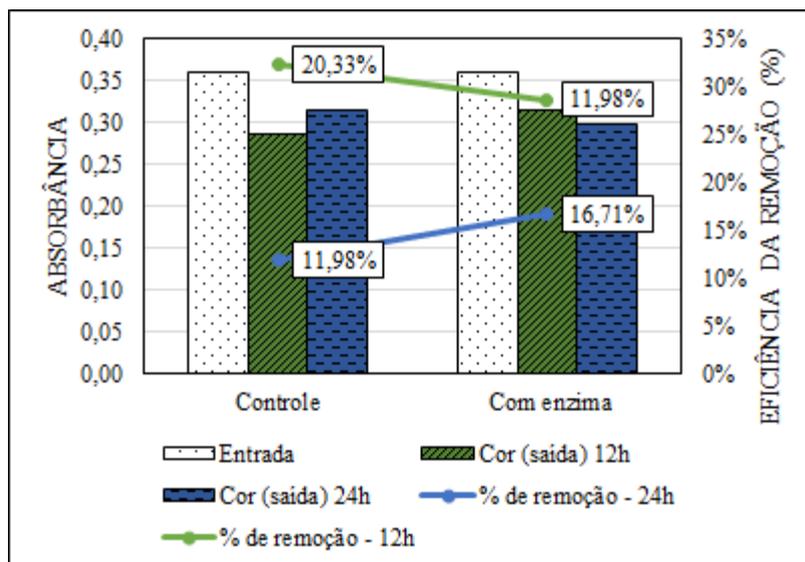


Figura 02: Resultados da remoção para cor para o controle nos períodos de 12h e 24h e para os mesmos períodos com o reator contendo a enzima.

Por meio da Figura 10 é possível avaliar a influência do reator com enzima e o controle na remoção da cor. Quanto ao controle, percebe-se que o mesmo comportamento foi observado nos compostos lignínicos e nos outros em que se tem a diminuição da remoção alcançada no período de 12 horas quando comparado ao período de 24 horas, indo de 20,33% para 11,98%. Vale ressaltar que a maior remoção foi alcançada no período de 12 horas para o controle. Para o reator com a lacase imobilizada, obteve-se um aumento na remoção, alcançando 16,71% para o tempo de 24 horas.

Por fim, é importante destacar que este comportamento do reator com a enzima depende de vários fatores inerentes ao processo de imobilização, em trabalho de Mohammadi (2014), o mesmo determinou a otimização do sistema avaliando a concentração de enzima a ser imobilizada, o pH do tampão que irá ser utilizada na preparação da enzima, tempo de contato e concentração de glutaraldeído (método de imobilização foi o *cross-linking*). Vale ressaltar que o método de imobilização irá influenciar na recuperação da atividade enzimática, além de afetar na estabilidade operacional da enzima imobilizada conforme apresentado por Chen, Zou, Hong (2015).

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Percebe-se a necessidade de uma otimização do processo de imobilização visando uma melhor recuperação da atividade enzimática. O comportamento apresentado no reator ocorre provavelmente devido a absorção de certos compostos após 12 horas, entretanto, após esse período até 24 horas, tem-se um aumento dos mesmos, reduzindo a eficiência de remoção. Um outro ponto importante seria em relação a testes com efluentes sintéticos para analisar a remoção destes compostos de forma mais específica. Por fim, ressalta-se a potencialidade da utilização da nanocelulose bacteriana como suporte de enzimas, neste caso a lacase, para a remoção de compostos recalcitrantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa e Ensino Superior (CAPES), a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) e aos Laboratórios de Pesquisa Relacionada a Biomassa e Bioenergia (LAPREBB), ao laboratório de Microbiologia, no Laboratório de Tratamento de Águas Residuárias (LATAR), ao Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) e ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (LAMAQ) pela estrutura e oportunidade de poder desenvolver o presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22ed, American Public Health Association, Washington, D.C. 2012.
2. 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.
3. CHAMORRO, et al. Aerobic removal of stigmaterol contained in kraft mill effluents. *Electronic Journal of Biotechnology* v.12, n. 2, p. 1–7, 2009.
4. CHEN, L.; ZOU, M.; HONG, F. F. *Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose*. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. NOV, p. 1–10, 2015.
5. DAVIS, S.; BURNS, R. G. *Covalent immobilization of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 4, p. 474–479, 1992.
6. DROZD, R. et al. *The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 462–470, 2018.
7. DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. *Natural carriers in bioremediation: A review*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 23, p. 28–36, 2016.
8. HINOJOSA, E. A.; XAVIER, C. R. *Remoção de matéria orgânica e cor de efluente Kraft usando carvão e argila*. *Revista Hydro*, v. NOV, p. 26-31, 2016.
9. HUBLIK, G.; SCHINNER, F. *Characterization and immobilization of the laccase from Pleurotus ostreatus and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 3–5, p. 330–336, 2000.
10. KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. *Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review*. *Enzyme Research*, v. 2011, n. 1, 2011.
11. LIU, Y. et al. *Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbono and the application in the re,oval of phenolic compounds*. *Bioresource Technology*, v.7, n. September, p. 1-12, 2016.
12. MACHADO, E. P. *Tratabilidade de efluente kraft por processo biológico facultativo assistido com enzimas ligninolíticas*. Curitiba, 2017. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.
13. MOHAMMADI, M. et al. *Imobilization of laccase on epoxy-functionalized sílica and its application in biodegradation of phenolic compounds*. *International Journal of Biological Macomolecules*, v. 109, -443-447, 2018.
14. PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. *Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras*. *Quim. Nova*, v. 37, n. 2, p. 209–214, 2014.
15. PANG, R.; LI, M.; ZHANG, C. *Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: Diffusional limitation investigation*. *Talanta*, v. 131, p. 38–45, 2015.
16. RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M. et al. *Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds*. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 74, p. 21–45, 2015.
17. SAMPAIO, L. M. P. et al. *Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties*. *Carbohydrate Polymers*, v. 145, p. 1–12, 2016.
18. SATHISHKUMAR, P. et al. *Laccase immobilization on cellulose nanofiber: The catalytic efficiency and recyclic application for simulated dye effluent treatment*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 100, p. 111–120, 2014.
19. SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. *Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review*. *Journal of Environmental Management*, v. 210, p. 10–22, 2018.
20. SKORONSKI, E. et al. *Imobilização de lacase de Aspergillus sp. em quitosana e sua aplicação na bioconversão de fenóis em reatores de leito fixo*. *Quim. Nova*, v. 37, n. 2, p. 215-220, 2014.
21. VIDALI, M. *Bioremediation. An overview **. *Pure and Applied Chemistry*. v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.
22. WU, S. C.; LIA, Y. K. *Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, n. 3-4, p. 103-108, 2008.
23. YAO, W. et al. *Bacterial cellulose membrane - A new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation*. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 10, p. 2054–2058, 2011.