

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**ELIANE PEREIRA MACHADO**

**TRATABILIDADE DE EFLUENTE KRAFT POR PROCESSO  
BIOLÓGICO FACULTATIVO ASSISTIDO COM ENZIMAS  
LIGNINOLÍTICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**CURITIBA  
2017**

**ELIANE PEREIRA MACHADO**

**TRATABILIDADE DE EFLUENTE KRAFT POR PROCESSO  
BIOLÓGICO FACULTATIVO ASSISTIDO COM ENZIMAS  
LIGNINOLÍTICAS**

Documento apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus Curitiba. Área de concentração: Tecnologia e Processos Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Xavier

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto

**CURITIBA  
2017**

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

---

M149t Machado, Eliane Pereira  
2017 Tratabilidade de efluente *kraft* por processo biológico facultativo assistido com enzimas ligninolíticas / Eliane Pereira Machado.-- 2017.  
114 f.: il.; 30 cm.

Texto em português com resumo em inglês.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2017.  
Bibliografia: p. 93-103.

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Lacase.  
3. Lagoa aerada facultativa. 4. Celulose. 5. Papel.  
I. Xavier, Claudia Regina. II. Couto, Gustavo Henrique.  
III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental.  
IV. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

---

**Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba**

## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 078

AVALIAÇÃO DA TRATABILIDADE DE EFLUENTE KRAFT POR PROCESSO BIOLÓGICO FACULTATIVO ASSISTIDO POR ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Por

ELIANE PEREIRA MACHADO

Dissertação apresentada às 09 horas do dia 22 de março de 2017, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, linha de pesquisa Controle e Monitoramento Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

### Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Regina Xavier (Orientadora)  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

---

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

---

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susan Grace Karp  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Visto da Coordenação:

---

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig  
Coordenador do PPGCTA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa”

## **DEDICATÓRIA**

Com carinho para a minha mãe Neide, o amor maior que tenho. Por me dar a vida e participar do meu crescimento pessoal, além de contribuir para minha formação profissional.

## AGRADECIMENTO

Agradeço a minha família, em especial ao meu esposo Marcelo, por me motivar a finalizar este trabalho.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Regina Xavier pelos ensinamentos e tempo dedicado a realização desta pesquisa, além dos conselhos profissionais e pessoais que levarei comigo para a vida.

Ao meu co-orientador Dr. Gustavo Henrique Couto, pelo apoio e fornecimento da enzima comercial usada neste estudo.

À Cocelpa pelo fornecimento do efluente e apoio financeiro para a pesquisa.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). À Capes pela bolsa de pesquisa.

Aos colegas do GTEF que de alguma forma contribuíram com a pesquisa ajudando com análises, troca de informações e apoio. Em especial à Camila, pelo auxílio com as análises de ecotoxicidade.

À Marcela Tibone, pela ajuda com as análises estatística dos dados. Aos colegas do laboratório de Biotecnologia, em especial a Aline, pelo auxílio com os procedimentos para produção dos extratos fúngicos e medições de atividade enzimática.

Aos professores Dr. Fernando Passig, Dr<sup>a</sup>. Susan Karp e Dr<sup>a</sup>. Gisele Maciel pelas contribuições durante arguição da banca. Especialmente à professora Gisele pela disposição em ajudar, sempre que a procurei com dúvidas.

Por fim, os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

MACHADO, E. P. **Tratabilidade de efluente *kraft* por processo biológico facultativo assistido com enzimas ligninolíticas**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental. 112 f. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

O processo *kraft* é o mais empregado em todo o mundo para produção de papel e celulose. Esse processo gera efluente com altas concentrações de matéria orgânica e compostos recalcitrantes, que podem causar impacto significativo no ambiente aquático. No Brasil, o tratamento mais difundido para este efluente são as Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs). Este tipo de tratamento é eficiente na remoção da matéria orgânica biodegradável, entretanto alguns contaminantes persistem devido à sua recalcitrância. O objetivo deste trabalho foi avaliar o tratamento de efluente *kraft* por processo biológico na presença de Lacase comercial (NOVOZYM 51003<sup>®</sup>) e enzimas ligninolíticas produzidas em laboratório por extrato de Fungos da Podridão Branca (FPB). Foi empregado delineamento experimental com sistema aerado em batelada, para determinar os efeitos do pH, temperatura e concentração da Lacase comercial, além de testes rápidos de batelada para verificar o efeito da inoculação associada a Lacase comercial, o efeito do sistema Lacase/mediador, o efeito da Lacase comercial inativa no tratamento do efluente, entre outros. Também foi estudado o desempenho da Lacase comercial e do Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET) em fluxo contínuo, com LAFs em escala de bancada, sob condições de temperatura ambiente, operadas por 60 dias em Carga Orgânica Volumétrica (COV) de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Numa segunda fase do experimento com as LAFs foram realizadas variações na COV e na biodegradabilidade do efluente *kraft*. O experimento fatorial mostrou que o uso da Lacase comercial influencia positivamente a remoção de lignina, cor e área espectral, sendo mais eficiente em pH 4 e temperatura de 37°C e 3,9 U mL<sup>-1</sup> de atividade de Lacase. Os testes em batelada mostraram que a inoculação não interfere na atividade enzimática e que a enzima comercial é biodegradável. O experimento com as LAFs em sistemas contínuos em COV de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, mostrou que a LAF com Lacase comercial, removeu 86 %, 52 %, 20 % e 30 % de DBO<sub>5,20</sub>, DQO, Cor e Compostos Lignínicos (CL), respectivamente. A LAF com EET removeu 90 %, 50 %, 2 % e 20 % de DBO<sub>5,20</sub>, DQO, Cor e CL, respectivamente. No entanto, os resultados anteriores não foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos nos sistemas sem enzimas (controles). Na LAF com Lacase comercial não se verificou remoção de Compostos Fenólicos Totais (CFT), enquanto na LAF com EET houve remoção de apenas 1 %, o qual foi importante, pois nos controles e LAF com enzima comercial ocorreu geração de CFT. O aumento da COV para 0,6 ou 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> não diminuiu a eficiência das LAFs, chegando a aumentar a redução dos parâmetros de DQO e CFT. Já a redução da biodegradabilidade do efluente *kraft* impactou mais os sistemas do que as sobrecargas de matéria orgânica biodegradável. Por conta das características do efluente e condições utilizadas, a atividade da Lacase comercial reduziu em 58 % após 24 horas de contato dentro da LAF. Já o EET na LAF, apesar de diluído, manteve a Lacase ativa e permitiu catalisar a oxidação dos CFTs no efluente *kraft*, possivelmente pela presença de compostos que interagem mediando estas reações. A enzima Lacase associada a LAF se manteve ativa no tempo de operação, não sofreu influência do inóculo, porém não foi capaz de melhorar o desempenho observado no sistema controle nas condições de operação, especialmente na forma pura, como Lacase comercial, já o EET se mostrou promissor pelo seu desempenho sobre os CFT.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lacase, lagoa aerada facultativa, celulose e papel.

## ABSTRACT

MACHADO, E. P. **Kraft wastewater treatability by facultative biological process assisted with ligninolytic enzymes.** Dissertation Master in Environmental Science and Technology. 112 f. Graduate Program in Environmental Science and Technology, Federal Technological University of Paraná, 2017.

The kraft process is the most used in the world for the production of pulp and paper. This process was done with high concentrations of organic matter and recalcitrant compounds, which can have a significant impact on the aquatic environment. In Brazil, the most widespread treatment for this effluent is as Facultative Aerated Lagoons (FALs). This type of treatment is efficient in the removal of biodegradable organic matter, however some contaminants persist because of its recalcitrance, attributing toxicity to the effluent even after treatment. The objective of this work was to evaluate the treatment of kraft effluent by biological process in the presence of commercial Laccase (NOVOZYM 51003®) and ligninolytic enzymes produced in the laboratory by extract of White Rot Fungi (WRF). An experimental study was carried out with the aerobic batch system to determine the effects of pH, temperature and commercial Laccase concentration, as well as the rapid batch tests to verify the effect of inoculation associated with commercial Laccase, the effect of Laccase/Mediator and the effect of Inactive commercial Laccase in the effluent treatment. We also study the performance of the commercial Laccase and the Enzymatic Extract of *Trametes* sp. (EET) in continuous flow, in lab scale FALs, under room temperature conditions, for 60 days in a constant Organic Load Rate (OLR). In a second phase of the experiment with FALs, a sudden increase in OLR was performed to verify the efficiency of shock systems. The factorial experiment showed that the use of commercial Laccase positively influences a lignin removal, color and spectral area, being more efficient at pH 4 and temperature of 37 ° C and 3.9 U mL<sup>-1</sup> laccase. Batch tests show that an inoculation does not interfere with enzymatic activity and that a commercial enzyme is readily biodegraded within the system. The experiment with FALs at constant OLR of 0.2 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, showed that FAL with commercial Laccase removed 86%, 52%, 20% and 30% of BOD<sub>5,20</sub>, COD, Color and Lignin Compounds (LC), respectively with FAL with EET removed 90%, 50%, 2% and 20% of BOD<sub>5,20</sub>, COD, Color and CL, respectively. But the values of both FALs were not statistically different compared to their control. Also in the OLR of 0.2 kg COD m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, the FAL with EET showed a 1% removal, which represents a reduction of the Total Phenolic Compound (TPC). The increase of OLR to 0.6 or 1.2 kg COD m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> does not negatively impact the efficiency of the FAL, leading to a weight increase in the removal of COD and TPC. A reduction of the BOD<sub>5,20</sub>/COD ratio caused a expressively more important shock them biodegradable organic matter overloads. Due to the effluent characteristics and conditions of use, the commercial Laccase had its activity reduced within the LAF system in 58% after 24 hours of contact. However, the FAL with EET it showed that, although diluted, the crude laccase present in the EET remained active and allowed to catalyze the removal of TPC present in the kraft pulp mill effluent, Due to the presence of other compounds Interacting with each other, mediating these reactions. This it seems expressively important, since the FAL used as control, absence of Laccase, promoted an increase of about 23% in the TPC content of the treated effluent.

**KEYWORDS:** Laccase, aerated stabilization basin, pulp and paper.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama do processamento <i>kraft</i> de pasta de papel.....	18
<b>Figura 2:</b> Esquema simplificado da estrutura da Lacase do <i>Trametes versicolor</i> .....	25
<b>Figura 3:</b> Fluxograma das atividades da pesquisa.....	32
<b>Figura 4:</b> Esquema das Lagoas Aeradas Facultativas (LAF) usadas no estudo.....	39
<b>Figura 5:</b> Comparação entre a eficiência de remoções de DQO (a), Cor (b), CFT (c), CL (d), AE (e) e Turbidez (f) em sistema com: Aeração (O <sub>2</sub> ); Inoculação e aeração (Lodo+O <sub>2</sub> ); Inoculação, aplicação de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase e aeração (Lodo+enzima+O <sub>2</sub> ) e Aplicação de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase e aeração (Enzima+O <sub>2</sub> ).....	45
<b>Figura 6:</b> Comparação entre a eficiência de remoções de DQO (a), Cor (b), CFT (c), CL (d), AE (e) e Turbidez (f) em sistemas com: 3,9 U mL <sup>-1</sup> (100 ppm) de Lacase comercial, 3,9 U mL <sup>-1</sup> (200 ppm) de Lacase comercial e controle (sem aplicação de Lacase).....	47
<b>Figura 7:</b> Eficiência do sistema controle, considerando C <sub>0</sub> = C <sub>0-Afluente bruto</sub> , comparado à eficiência do sistema com Lacase ativa, considerando C <sub>0</sub> = C <sub>0-Afluente bruto</sub> , e à Eficiência do sistema com Lacase ativa, considerando C <sub>0</sub> = C <sub>0-Afluente c/ enzima inativa</sub> .....	48
<b>Figura 8:</b> Eficiência do sistema sem enzimas (controle) comparado ao sistema com Lacase e ao sistema Lacase/SGZ e Lacase/HBT.....	50
<b>Figura 9:</b> Gráfico de Pareto com efeitos das variáveis e de suas inter-relações, na eficiência de redução dos parâmetros de DQO (a), remoção de Cor (b) e remoção de compostos fenólicos (c).....	54
<b>Figura 10:</b> Gráfico de Pareto com efeitos das variáveis e de suas inter-relações, na eficiência de remoção dos Compostos Lignínicos (a), remoção da Área espectral (b) e remoção da Turbidez (c).....	55
<b>Figura 11:</b> Gráfico de contorno da eficiência de remoção da DQO na presença de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de 25°C (c).....	58
<b>Figura 12:</b> Gráfico de contorno da eficiência de redução da Cor na presença de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de 25°C (c).....	59
<b>Figura 13:</b> Gráfico de contorno da eficiência de remoção dos Compostos Fenólicos Totais na presença de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de 25°C (c).....	61
<b>Figura 14:</b> Gráfico de contorno da eficiência de redução dos Compostos Lignínicos na presença de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de 25°C (c).....	62
<b>Figura 15:</b> Gráfico de contorno da eficiência de redução da Área espectral na presença de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de 25°C (c).....	64
<b>Figura 16:</b> Gráfico de contorno da eficiência de redução da Turbidez na presença de 1,95 U mL <sup>-1</sup> de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de 25°C (c).....	65
<b>Figura 17:</b> Eficiência do tratamento com aplicação de Lacase comercial, comparada ao tratamento com aplicação de Extrato Enzimático de <i>Pleurotus ostreatus</i> , ambos em condições de pH 4 e temperatura de 37 °C.....	68
<b>Figura 18:</b> Parâmetros de controle medidos nas Lagoa Aerada Facultativa controle (a e c) e na Lagoa Aerada Facultativa com aplicação de Lacase (b e d) na Fase I.....	71
<b>Figura 19:</b> Valores de eficiência das Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs), controle (□) e LAF assistida com Lacase (■), obtidos semanalmente, ao longo de 60 dias de funcionamento do experimento na Fase I.....	72

<b>Figura 20:</b> Eficiência média de remoção dos parâmetros de monitoramento da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida com Lacase (■) durante o período de 60 dias na Fase I. ....	73
<b>Figura 21:</b> Eficiência média de remoções de DBO (a), DQO (b), Cor (c), CFT (d), CL (e), AE (f) da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida com Lacase (■) separando as etapas do tratamento de acordo com a COV usada e a relação $DBO_{5,20}/DQO$ na Fase II. ....	78
<b>Figura 22:</b> Parâmetros de controle medidos nas Lagoa Aerada Facultativa controle (a e c) e com aplicação de Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. (b e d), durante a Fase I. ....	82
<b>Figura 23:</b> Valores de eficiência de remoções de DBO (a), DQO (b), Cor (c), CFT (d), CL (e), AE (f) das Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs), controle (□) e com aplicação de Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. (■), obtidos semanalmente ao longo dos 60 dias de experimento na Fase I. Nota: DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral. ....	83
<b>Figura 24:</b> Eficiência média de remoção dos parâmetros de monitoramento da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. (■) durante o período de 60 dias na Fase I. ....	84
<b>Figura 25:</b> Eficiência média de remoções de DBO (a), DQO (b), Cor (c), CFT (d), CL (e), AE (f) da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. (■) separando as etapas do tratamento de acordo com a COV usada e a relação $DBO_{5,20}/DQO$ na Fase II. ....	86
<b>Figura 26:</b> Atividade de Lacase comercial e Lacase de Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. aplicada no tratamento de efluente <i>kraft</i> em sistema biológico aerado, durante as primeiras 24 h. ....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Eficiências obtidas de diferentes estudos no tratamento de efluente de celulose e papel em Lagoa Aerada Facultativa. ....	22
<b>Tabela 2:</b> Métodos de análise físico-química e de armazenamento da amostra.....	31
<b>Tabela 3:</b> Condições experimentais utilizadas nas atividades da pesquisa. ....	33
<b>Tabela 4:</b> Fatores e respectivos níveis avaliados no delineamento experimental. ....	37
<b>Tabela 5:</b> Caracterização do efluente <i>kraft</i> . ....	44
<b>Tabela 6:</b> Eficiência do tratamento biológico na redução dos parâmetros analisados. ....	52
<b>Tabela 7:</b> Condições utilizadas no ensaio em fluxo contínuo com Lacase NOVOZYM 51003 <sup>®</sup> . ....	69
<b>Tabela 8:</b> Caracterização da Lacase no produto comercial NOVOZYM 51003 <sup>®</sup> . ....	70
<b>Tabela 9:</b> Condutividade Elétrica e Sólidos Dissolvidos Totais presentes no efluente da indústria. ....	74
<b>Tabela 10:</b> Série de sólidos da Lagoa Aerada Facultativa controle e com Lacase comercial. ....	76
<b>Tabela 11:</b> Condições utilizadas no ensaio em fluxo contínuo com Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. ....	81
<b>Tabela 12:</b> Caracterização do Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. ....	81
<b>Tabela 13:</b> Série de sólidos da LAF controle e LAF com Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp. ....	88

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs	Absorbância espectrofotométrica;
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfônico);
AR	Ácido Resínico;
AE	Área Espectral;
ANOVA	Análise de Variância;
AOP	<i>Advanced Oxidation Process</i> ;
APHA	American Public Health Association
APMP	<i>Alkaline peroxide mechanical pulping</i> ;
BRACELPA	Associação Brasileira de Celulose e Papel;
C <sub>0</sub>	Concentração inicial;
CE	Condutividade Elétrica;
CEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente;
C <sub>f</sub>	Concentração final;
CFT	Compostos fenólicos totais;
CH <sub>4</sub>	Metano;
CL	Compostos Lignínicos;
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono;
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente;
COT	Carbono Orgânico Total;
COV	Carga Orgânica Volumétrica;
CTMP	<i>Chemithermomechanical pulping</i> ;
Cu	Cobre;
DBO <sub>5,20</sub> /DQO	Relação que indica a porcentagem de biodegradabilidade;
DBO <sub>5,20</sub>	Demanda bioquímica de oxigênio, após 5 dias incubada a 20 °C;
DQO	Demanda química de oxigênio;
EC	<i>Enzyme Commission</i> ;
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético;
EET	Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp.;
EEP	Extrato Enzimático de <i>Pleurotus ostreatus</i> ;
E <sub>H</sub>	Potencial redox corrigido pelo valor do potencial redox de referência;
E°	Potencial de oxirredução padrão;
ER	Eficiência de remoção;
H <sub>2</sub> O	Água;
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio;
HBT	N-Hidroxibenzotriazol;
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial;
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> ;
IVL	Índice Volumétrico de Lodo;
IPPC	<i>Integrated Pollution Prevention and Control</i> ;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico;
KCN	Cianeto de Potássio;
kg tsa <sup>-1</sup>	Quilograma por tonelada de polpa seca ao ar;
LAF	Lagoa Aerada Facultativa;
LiP	Lignina Peroxidase;
mg L <sup>-1</sup>	miligramas por litro;
min	minutos;
MM	Massa Molecular;

mM	milimolar ( $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ );
Mn <sup>2+</sup>	Íon manganês
MnP	Manganês Peroxidase;
mV	milivolt;
Na <sub>2</sub> S	Sulfeto de sódio;
NaNO <sub>3</sub>	Nitrato de sódio;
NaOH	Hidróxido de sódio;
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônia;
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio;
OD	Oxigênio Dissolvido;
ORP	<i>Oxidation Reduction Potential</i> ;
pH	Potencial hidrogeniônico;
ppm	parte por milhão;
seg	segundos;
SGZ	Siringaldazina;
SSed	Sólidos Sedimentares;
SST	Sólidos Suspensos Totais;
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis;
SDT	Sólidos Dissolvidos Totais;
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica;
U	Unidade Enzimática;
UNT	Unidade Nefelométrica de Turbidez;
UV <sub>215</sub>	Luz ultra violeta no comprimento de onda de 215 nm;
UV <sub>280</sub>	Luz ultra violeta no comprimento de onda de 280 nm;
VIS <sub>440</sub>	Luz visível no comprimento de onda de 440 nm.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
3.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE E PAPEL	17
3.1.1 Características do processo industrial <i>kraft</i>	18
3.1.2 Consumo de água e característica das águas residuárias	20
3.2 TRATAMENTO DO EFLUENTE <i>KRAFT</i>	21
3.3 SISTEMAS ENZIMÁTICOS	23
3.3.1 Enzimas ligninolíticas	24
3.3.2 Lacases	24
3.3.2.1 Inibidores da Lacase	26
3.3.2.2 Substrato da Lacase	27
3.3.2.3 Aplicações da Lacase na biorremediação de efluentes	28
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>30</b>
4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE <i>KRAFT</i>	30
4.2 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES E CONDIÇÕES OPERACIONAIS	31
4.3 LACASE COMERCIAL	33
4.4 ENSAIOS EM BATELADA	34
4.4.1 Teste I - Efeito da inoculação	35
4.4.2 Teste II - Efeito da quantidade de Lacase comercial	35
4.4.3 Teste III - Efeito da Lacase comercial no afluente	36
4.4.4 Teste IV - Efeito dos mediadores	36
4.4.5 Teste V - Experimento fatorial	37
4.4.6 Teste VI - Comparação entre Lacase comercial e Extrato Enzimático de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
4.5 ENSAIO EM FLUXO CONTÍNUO	39
4.5.1 Lagoas Aeradas Facultativas com Lacase comercial NOVOZYM 51003 <sup>®</sup>	40
4.5.2 Lagoas Aeradas Facultativas com Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp.	42
4.5.3 Atividade enzimática durante o tratamento do efluente <i>kraft</i>	43
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE USADO NO ESTUDO	44
5.2 ENSAIOS EM BATELADA	45
5.2.1 Teste I - Efeito da inoculação	45
5.2.2 Teste II - Efeito da quantidade de Lacase	47
5.2.3 Teste III - Efeito da Lacase comercial no afluente	48
5.2.4 Teste IV - Efeito dos mediadores	49
5.2.5 Teste V - Experimento fatorial	51
5.2.6 Teste VI - Comparação entre Lacase comercial e Extrato Enzimático de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	67
5.3 EXPERIMENTO EM FLUXO CONTÍNUO	69
5.3.1 Lagoas Aeradas Facultativas com Lacase NOVOZYM 51003 <sup>®</sup>	69
5.3.2 Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) com Extrato Enzimático de <i>Trametes</i> sp.	80
5.3.3 Atividade enzimática de Lacase durante o tratamento do efluente <i>kraft</i>	89
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>93</b>

<b>APÊNDICE A – Resumo dos métodos utilizados</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE B – ANOVA dos efeitos de pH, Temperatura e atividade enzimática na remoção dos parâmetros</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO 1 – Catálogo com especificações técnicas do NOVOZYM 51003</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As indústrias de celulose e papel representam importante base para a economia brasileira. Em agosto de 2015, os valores de exportação foram de US\$429 milhões para celulose e US\$ 168 milhões para papel, representando um crescimento de 4,9% e 8,9%, respectivamente, em relação ao mesmo período de 2014 (IBÁ, 2015).

Em contrapartida a esse desenvolvimento econômico, a indústria de celulose e papel ainda enfrenta desafios para melhorar sua gestão de poluentes, considerando as consequências ambientais e requisitos legais dos órgãos ambientais competentes (KAMALI; KHODAPARAST, 2015). De acordo com Almeida, Assalin e Rosa (2004), esse setor é caracterizado pelo alto consumo de água em seus processos, gerando grandes volumes de efluentes líquidos com elevado potencial de contaminação ambiental.

O processo *kraft* é o mais empregado para a produção de polpa em todo o mundo (IPPC, 2013). Vários estudos têm indicado que esse processo gera efluente com altas concentrações de matéria orgânica, cor, compostos de desregulação endócrina (fitoesteróis) e compostos fenólicos de alto peso molecular, que se lançados sem o devido tratamento, causam impacto significativo no ambiente aquático (COSTIGAN et al., 2012; HEWITT et al., 2008; WAYE et al., 2014; DYKSTRA et al., 2015).

Por conta disso, cresce a preocupação em encontrar novas alternativas promissoras para o tratamento de efluentes, por meio da investigação dos contaminantes mais relevantes. No Brasil, o tratamento mais difundido para este efluente são os sistemas biológicos, em especial as lagoas aeradas facultativas, pelo bom rendimento e facilidade de operação. Este tipo de tratamento é eficiente na remoção da matéria orgânica biodegradável, removendo facilmente mais de 90 % da Demanda Bioquímica de Oxigênio ( $DBO_{5,20}$ ), entretanto alguns contaminantes do efluente *kraft*, como os compostos lignínicos e seus derivados, persistem devido à sua recalcitrância, atribuindo cor e toxicidade ao efluente mesmo após o tratamento (RABELO, 2005).

As opções de tratamento para a redução de cor, toxicidade e compostos recalcitrantes presentes no efluente, vão desde processos físico-químicos, adsorção, oxidação avançada, precipitação e filtração por membrana, mas esses métodos são caros e a sua inclusão em plantas antigas, esbarra em limitações econômicas que muitas vezes inviabilizam sua aplicação (ORREGO et al., 2010; KAMALI e KHODAPARAST, 2015).



No esforço para encontrar tecnologias de custo reduzido, processos de biorremediação catalisada por enzimas têm sido cada vez mais explorados ao longo dos anos (BOM e FERRARA., 2008; STRONG e CLAUS, 2011). A associação de processos enzimáticos com sistemas de Lagoas Aeradas Facultativas (LAF) é uma alternativa que não implica em grandes mudanças nas plantas mais antigas de tratamento biológico, pois o custo do tratamento enzimático depende praticamente do custo da enzima (IBRAHIM et al., 2001).

Desde a década de 1980, a partir da aplicação de fungos causadores de podridão branca, como alternativa na descoloração de efluentes e degradação de compostos xenobióticos (KLIBANOV et al., 1980), diversos estudos relatam o uso de enzimas ligninolíticas no tratamento de efluentes da indústria de celulose e papel (GALLIKER et al., 2010; MOHAPATRA et al., 2010; HUSAIN e QAYYUM, 2013).

Um grupo de enzimas que recebe atenção especial no setor de celulose e papel é o das Lacases, com aplicações tanto na tecnologia de branqueamento, devido ao seu papel na degradação da lignina (BORGES et al., 2010), como no tratamento de efluentes, pelo seu potencial de detoxificação de poluentes fenólicos (KUMARAN, SASTRY e VIKINESWARY, 1997; MADHAVI e LELE, 2009; KUNAMNENI et al., 2007; JANUSZ et al., 2013, PACHECO e SOARES, 2014; KÜES, 2015).

A Lacase pertence ao grande grupo das polifenoloxidasas, enzimas com íons de cobre em seu sítio ativo, que catalisam a oxidação de compostos mono, di e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas. A reação de oxidação catalisada por estas enzimas ocorre com a extração de um elétron de um substrato fenólico gerando um radical fenoxila. Estes atuam em reações não catalíticas como acoplamento de radicais, que podem ser despolimerizados ou serem levados à repolimerização (HATAKKA, 1994).

Embora tenham sido publicados muitos trabalhos envolvendo a aplicação de Lacase e outras enzimas ligninolíticas na biodegradação de compostos fenólicos individuais, em sistemas de batelada, são poucos os estudos que descrevem a aplicação destas enzimas na bioconversão de compostos lignínicos em sistemas de fluxo contínuo, usando uma matriz de efluente, no sentido de aproximar esta técnica para aplicações em escala real (SKORONSKI et al., 2014; KÜES, 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a tratabilidade de efluente de indústria de celulose *kraft* por processo biológico assistido por enzimas ligninolíticas em escala de bancada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o efluente industrial quanto a: Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>5,20</sub>); Cor; Compostos Fenólicos Totais (CFT); Compostos Lignínicos (CL); Área Espectral (AE); Turbidez e Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).
- Construir e operar uma Lagoa Aerada Facultativa (LAF) em escala de bancada, na presença de enzimas ligninolíticas de origem comercial e produzidas no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR – Campus Ecoville.
- Avaliar os parâmetros de controle: Carga Orgânica Volumétrica (COV), Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) Oxigênio Dissolvido (OD), Temperatura, pH, Quantidade de enzima aplicada (comercial e produzida), Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspenso Voláteis (SSV) e Sólidos Sedimentáveis (SSed).
- Avaliar a eficiência das condições de tratamento quanto aos parâmetros de DQO, DBO<sub>5,20</sub>, Cor; CFT; CL; AE; e Toxicidade Aguda em *Daphnia magna*.
- Propor condições ótimas para o tratamento do efluente *kraft* segundo as condições estudadas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No Brasil, a falta de água para o consumo, que antes era um problema característico apenas de regiões áridas e semi-áridas, hoje é encarado como uma dificuldade própria também de áreas com recursos hídricos abundantes mas que se encontram muito poluídos. A escassez de água no estado de São Paulo, ocorrida no ano de 2015, foi um exemplo de crise hídrica que prejudicou a população local, acentuando no restante do país a perspectiva de ausência de água em regiões que antes não sofriam desse problema. Soma-se ainda a esse cenário, o fato de os mananciais de acesso mais facilitado se apresentarem tão poluídos que o seu uso se torna inviável, uma vez que a descontaminação inclui processos complicados e dispendiosos (CNI, 2013).

Essa situação gera conflito de uso, em que a sociedade se obriga a sofrer restrições de consumo que afetam diretamente a qualidade de vida e o desenvolvimento econômico, pois a água, além de seu valor ambiental e social, é também um recurso primordial para a transformação de matérias-primas em bens de consumo, causando influência direta no crescimento econômico e na competitividade de empresas (CNI, 2013).

Esse princípio também se aplica à indústria de celulose e papel, pois desde a base florestal até o processo industrial, a água é um insumo fundamental, tanto no contexto atual quanto para o desenvolvimento do setor nos próximos anos (BRACELPA e CNI 2012).

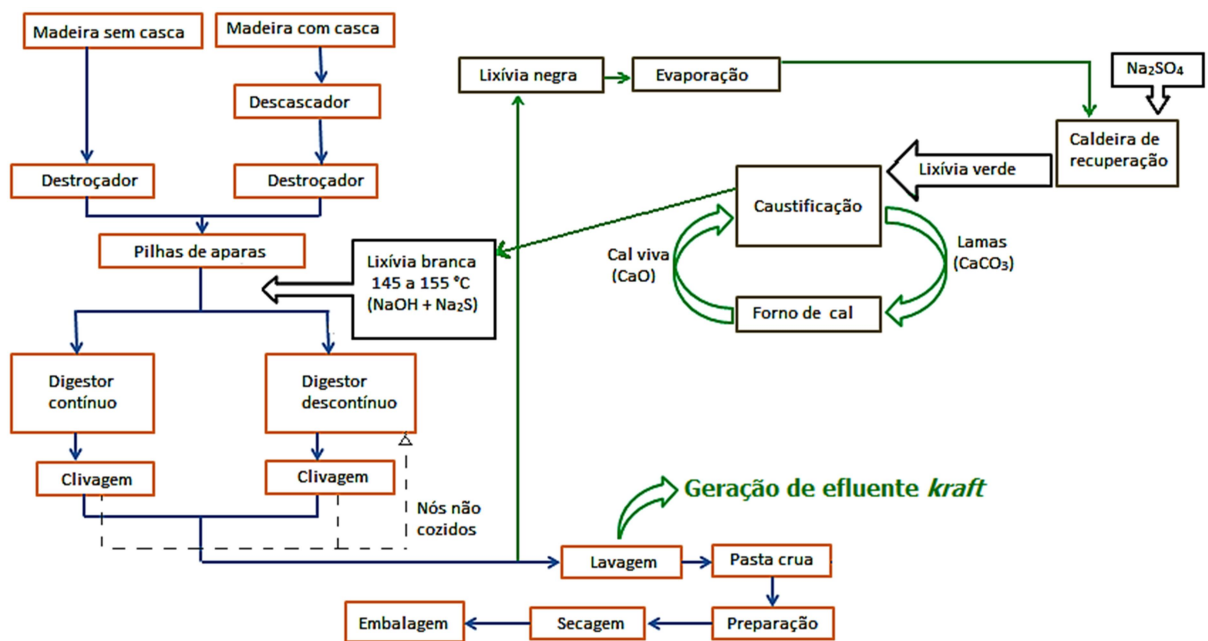
#### 3.1 PRODUÇÃO DE CELULOSE E PAPEL

As indústrias de celulose e papel representam importante base para a economia brasileira, devido principalmente à grande disponibilidade de recursos florestais no país. Em 2014, foram 7,74 milhões de hectares de árvores plantadas (eucalipto, pinus, acácia, araucária, paricá e teca), sendo que 34% dessa área destinaram-se à produção de celulose e papel (IBÁ, 2015). Os projetos de investimento, em andamento ou previstos, das empresas que visam aumento dos plantios, ampliação de fábricas e novas unidades, são da ordem de R\$ 53 bilhões de 2014 a 2020 (IBÁ, 2015).

### 3.1.1 Características do processo industrial *kraft*

A primeira etapa da produção de papel é a separação das fibras de celulose dos outros constituintes da madeira para formação da polpa celulósica, que pode ser realizada por processo mecânico e/ou químico. Somente depois dessa etapa, a polpa de celulose é convertida no papel propriamente dito (BAJPAI, 2010).

O processo *kraft* é o mais empregado para a produção de polpa em todo o mundo. Cerca de 80% da polpa é produzida utilizando este processo, que também é conhecido como processo “sulfato”, pelo fato da reposição das perdas ser feita com sulfato de sódio (PIOTTO, 2003). A Figura 1 apresenta um diagrama geral do processo de produção *kraft* incluindo a etapa de branqueamento.



**Figura 1:** Diagrama do processamento *kraft* de pasta de papel.

**Fonte:** Adaptado de Agapito (2007).

De acordo com o relatório *Integrated Pollution Prevention and Control* (IPPC, 2015), os primeiros passos do processo *kraft* são: estocagem de madeira, descascamento, produção de cavacos (destroçador) e peneiramento. Para a produção de celulose via processo químico é necessário utilizar a madeira na forma de cavacos uniformes para garantir um

cozimento homogêneo e obter o melhor rendimento. Já o peneiramento tem como objetivo separar as frações de cavaco muito finas ou muito acima do tamanho padrão (IPPC, 2015).

Na etapa do cozimento, é feita a dissolução da lignina e de parte das hemiceluloses, separando as fibras no licor de cozimento. Os compostos químicos usados são o sulfeto e o hidróxido de sódio (com pH ajustado entre 13 e 14 no início do cozimento). Em seguida vem a lavagem, que tem como objetivo separar as fibras e o licor negro (impregnado com lignina, hemiceluloses e outros compostos solubilizados durante o cozimento) para que esse último possa ser encaminhado para o processo de recuperação de insumos químicos e energia, enquanto as fibras são enviadas para a etapa seguinte (IPPC, 2015).

Sistemas eficientes de lavagem reduzem a quantidade de licor nas etapas seguintes, o que conseqüentemente reduz o consumo de produtos químicos e a carga orgânica das águas residuárias. No final da lavagem, a polpa é submetida ao processo de depuração em peneiras centrífugas, visando separar o material não processado (PIOTTO, 2003).

A deslignificação com oxigênio, normalmente, é um estágio intermediário entre o cozimento e a etapa de lavagem. Em geral, é feita em meio alcalino, utilizando-se licor branco oxidado, contendo hidróxido e tiosulfato de sódio decorrente da oxidação do sulfeto. Alguns processos fazem uso da lavagem intermediária (aplicada antes da deslignificação), o que reduz significativamente o arraste de matéria orgânica das lavagens subseqüentes para as águas residuárias (IPPC, 2015).

No branqueamento o objetivo é chegar a uma polpa com alvura<sup>1</sup> maior e mais estável (baixa reversão). Como as etapas anteriores não removem toda a lignina, é necessário o uso de agentes químicos oxidantes para tal função. Algumas indústrias não fazem o branqueamento, mas quando está contido no processo, geralmente é feito em mais de um estágio, normalmente quatro ou cinco. Os agentes químicos mais usados são dióxido de cloro, ozônio, oxigênio, peróxido e ácido peracético (PIOTTO, 2003).

Após o branqueamento é feita uma depuração utilizando o mesmo tipo de equipamento que faz a depuração da polpa marrom que saiu do digestor. Em fábricas integradas, a polpa é bombeada para a fabricação de papel com cerca de 4% de consistência. Em fábricas não integradas, a polpa é prensada e depois seca com vapor em um processo

---

<sup>1</sup> É o valor numérico da reflectância da amostra na porção azul do espectro (457 nm) quando comparado à reflectância de um padrão, no mesmo comprimento de onda, cuja reflectância é de aproximadamente 100% (COLODETTE, 2001).

multi-estágios, para então ser transportada. A folha de celulose seca é cortada e embalada em fardos. O teor de sólidos da polpa seca é de aproximadamente 92% (IPPC, 2015).

### 3.1.2 Consumo de água e característica das águas residuárias

A quantidade de águas residuárias geradas num processo de polpação celulósica depende diretamente do volume de água utilizado no processo, já no que diz respeito ao potencial poluidor, este é dependente da operação da fábrica e do grau de fechamento de circuitos químicos (PIOTTO, 2003). Em vista disso, ao longo dos anos o consumo de água no processo industrial caiu drasticamente, passando da faixa média de 200 m<sup>3</sup> tsa<sup>-1</sup> (tonelada seca ao ar), no final da década de 1980, para uma faixa de 35 m<sup>3</sup> a 50 m<sup>3</sup> tsa<sup>-1</sup> (CNI, 2013).

Atualmente, apesar da tendência existente no setor de celulose e papel em aproveitar cada vez mais a saída das Estações de Tratamento de Efluente (ETE) como água de reuso, no Brasil, a maior parte das indústrias de celulose e papel (principalmente as de médio e pequeno porte) estão longe de alcançar a autossuficiência no reaproveitamento de água e produtos químicos, fechando o ciclo do seu processo, como indicado no relatório do IPPC (2015), documento de referência para a produção de celulose, papel e cartão, da Comissão Europeia.

As águas residuárias do processo *kraft*, por exemplo, são tipicamente caracterizadas por altas concentrações de matéria orgânica e compostos coloridos, podendo variar de 770,9 a 2367,9 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> de DQO, 155,9 a 564,5 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> de DBO<sub>5,20</sub> e 0,40 a 0,89 de absorvância (abs) de Cor (VILLAMAR et al., 2009; LAGOS et al., 2009; CHAMORRO et al., 2010; XAVIER et al., 2011). Por conta dessas características, podem causar impactos nos ecossistemas aquáticos, devido ao alto consumo de oxigênio e as alterações na transparência da água afetando a penetração de luz no meio (COSTIGAN et al., 2012).

Há também o impacto causado pelos produtos da degradação do efluente de celulose. Estudos têm indicado que a degradação desse resíduo pode gerar produtos com poder de desregulação endócrina (fitoesteróis) e compostos fenólicos de alto peso molecular. Por serem considerados recalcitrantes estes contaminantes acarretam impactos ambientais significativos ao serem lançados em corpos receptores, causando toxicidade à biota aquática, especialmente no nível reprodutivo (BASU et al., 2012; HEWITT et al., 2008; WAYE et al., 2014).

De acordo com a Confederação Nacional da Indústria (CNI, 2013), a otimização do uso da água por meio de modernização tecnológica e de melhorias práticas de controle e

gestão, que visem extrair a menor quantidade possível de água dos rios, deve vir atrelada a um eficiente sistema de tratamento do efluente, tanto para fins de recirculação da água, quanto para atender aos padrões de lançamento de efluentes em corpos receptores, dada a grandiosidade do impacto que esse efluente pode causar em ecossistemas aquáticos, se lançado sem o devido tratamento.

### 3.2 TRATAMENTO DO EFLUENTE *KRAFT*

A Resolução nº 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a Resolução nº 081/2010 do Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA) impõem limites de lançamento de efluentes em corpos hídricos. Visando se adequar a essas legislações as indústrias fazem uso de tecnologias de tratamento para redução dos valores de parâmetros relacionados a impactos ambientais, como  $DBO_{5,20}$ , DQO, turbidez, cor, toxicidade, entre outros (PARANÁ, 2010; BRASIL, 2011).

Os tratamentos baseados em processos biológicos são os mais frequentemente utilizados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente transformando compostos orgânicos em  $CO_2$  e  $H_2O$  em sistema aeróbios ou  $CH_4$  e  $CO_2$  em sistemas anaeróbios, com custos relativamente baixos. Esses sistemas operam sob condições controladas, com alta carga orgânica aplicada gerando assim altas taxas de conversão (KAMALI; KHODAPARAST, 2015).

No Brasil, o tratamento mais difundido para o efluente *kraft* são as Lagoas Aeradas Facultativas (LAF), pelo bom rendimento e facilidade de operação. Esse tipo de sistema se assemelha às Lagoas Facultativas convencionais, exceto pela introdução de  $O_2$  na lagoa por meio de aeradores. O grau de energia introduzido visa apenas oxigenação, não sendo suficiente para a manutenção dos sólidos em suspensão e bactérias dispersos na massa líquida, possibilitando a sedimentação da matéria orgânica (lodo de fundo) que acaba por ser estabilizada anaerobicamente além da formação de zonas anóxicas (VON SPERLING, 2005; NUNES, 2012). A Tabela 1 apresenta alguns autores que trabalharam com Lagoas Aeradas Facultativas (LAF).

**Tabela 1:** Eficiências obtidas de diferentes estudos no tratamento de efluente de celulose e papel em Lagoa Aerada Facultativa.

Autores	Condições	Parâmetro	Eficiência de remoção (%)
Belmonte et al. (2006)	COV de 0,6 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e TDH de 1,96 d	DBO e DQO	98 e 67
		Cor	-17
		Fenóis	-18
		AR	81
Chamorro et al. (2009)	COV de 0,8 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e TDH de 2,2 d	DBO e DQO	96 e 65
		Fenóis	20
		Estigmaterol	-30
Xavier et al. (2011)	COV de 0,4 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e TDH de 2,2 d	Toxicidade	32
		DBO e DQO	99 e 57
		Cor	40
Lewis et al. (2012)*	COV de 0,02 kg DQO* m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e TDH de 28 d	Fenóis	-19
		COT	37
		Cor	-96
Dykstra et al. (2015)	COV de 0,15 kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> e TDH de 5,6 d	CL	-79
		Fitoesteróis	83
		DQO	64

**Nota:** COV = Carga Orgânica Volumétrica, DQO = Demanda Química de Oxigênio, DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, TDH = Tempo de Detenção Hidráulica, COT = Carbono Orgânico Total, AR = Ácido Resínico e CL = Compostos Lignínicos. \*DQO calculada como 3 vezes o valor de COT, conforme relação típica de DQO/COT em efluente *kraft* (RABELO et al., 2006; HINOJOSA, 2014). Valores negativos indicam incremento do parâmetro.

Como pode ser visto na Tabela 1, este tipo de tratamento é eficiente na remoção da matéria orgânica biodegradável, removendo mais de 90 % da DBO<sub>5,20</sub>, entretanto alguns contaminantes do efluente *kraft*, como os compostos lignínicos e seus derivados, persistem devido à sua recalcitrância, atribuindo cor e toxicidade ao efluente mesmo após o tratamento (RABELO, 2005).

Algumas possibilidades de tratamento para a redução de cor e compostos recalcitrantes presentes no efluente incluem processos oxidativos avançados (AOP), bem como processos físico-químicos de coagulação, floculação, sedimentação, adsorção, precipitação e filtração por membrana. Contudo, esses métodos são caros e a sua inclusão em plantas antigas esbarra em limitações econômicas que na maioria das vezes inviabilizam sua aplicação (ORREGO et al., 2010; KAMALI e KHODAPARAST, 2015).

No esforço para encontrar tecnologias de recursos menos extensivos, processos de transformação catalisados por enzimas têm sido muito explorados recentemente (BOM e FERRARA, 2008; STRONG e CLAUS, 2011). A associação de processos enzimáticos com sistemas de Lagoas Aeradas Facultativas (LAF) é uma alternativa que não implica em grandes mudanças nas plantas mais antigas de tratamento biológico. Autores como Ibrahim et al. (2001) defendem que no caso de adaptação de sistemas pré-instalados, o custo do tratamento



enzimático depende praticamente do custo da enzima. No entanto, ainda há muito para se descobrir sobre o comportamento bioquímico das enzimas e as condições adequadas para sua efetiva contribuição no tratamento de efluente *kraft* em Lagoas Aeradas Facultativas (LAF).

### 3.3 SISTEMAS ENZIMÁTICOS

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 (OKADA, 2010). Os Fungos da Podridão Branca (FPB) cumprem uma função primordial na decomposição destes materiais em ambientes naturais. Segundo Souza e Rosado (2009) os FPB conseguem decompor a madeira porque secretam enzimas capazes de, por meio da catálise enzimática, facilitar a digestão destes materiais nutritivos de difícil degradação.

A catálise enzimática é um mecanismo que aumenta a velocidade de uma reação química, sem que o catalisador sofra mudanças em todo o processo. A taxa de conversão destas reações é chamada de atividade de uma enzima. As enzimas são classificadas pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) através do número EC (*Enzyme Commission*), que as classifica em termos de classe, subclasse e subsubclasse, de acordo com a reação que catalisam (TAVARES, 2006).

Enzimas isoladas de fungos têm atraído atenção considerável para ciência e indústria. Revisões publicadas nos últimos anos revelam que uma infinidade de isoenzimas tem sido isolada de culturas de fungos, considerando seu ponto isoelétrico, purificadas e estudadas com suas particularidades, para aplicações em diversos campos industriais, a maioria com domínio de patentes (KÜES, 2015). Uma busca rápida no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2016) usando ‘Lacase’ como palavra chave mostrou que, nos últimos 17 anos no Brasil, foram registradas 19 patentes envolvendo produção e uso de Lacase aplicada em diversas áreas.

### 3.3.1 Enzimas ligninolíticas

Os FPB biodegradam a lignina através de diferentes combinações de peroxidases e oxidases, chamadas genericamente de ligninases, ou enzimas ligninolíticas (LEISOLA e FLEITCHER, 1985). Compreende-se por enzimas ligninolíticas várias isoenzimas, sendo que as mais conhecidas são: Lignina Peroxidases (LiPs), Manganês Peroxidases (MnPs) e as polifenoloxidasas (Lacases) (TUOR, WINTERHALTER e FIECHTER, 1995).

As LiPs e as MnPs são glicoproteínas que contêm um grupo heme porfirina-ferro por molécula. A LiP (EC 1.11.1.14) tem uma atividade ótima a pH de aproximadamente 2,0 à temperatura ambiente e é facilmente superoxidada pelo excesso de  $H_2O_2$  para uma forma inativa (LEISOLA e WALDNER, 1988). Quanto à MnP (EC 1.11.1.13), esta tem máxima atividade a pH 4,5 e demonstra dependência absoluta de  $Mn^{2+}$  e lactato. Já foi demonstrado também que o íon  $Mn^{2+}$  tem função na mineralização da lignina sintética pelo FPB, e atua como regulador da produção de MnP, LiP e Lacase, além de atuar como mediador ativo para MnP e Lacase (KEREM e HADAR, 1993).

Já as polifenoloxidasas são enzimas capazes de oxidar compostos aromáticos usando apenas oxigênio molecular como receptor final de elétrons (MAYER e STAPLES, 2002). A Lacase (EC 1.10.3.2) está incluída no grande grupo das Polifenoloxidasas, e é outra enzima que, devido ao seu papel na degradação da lignina e aplicações potenciais na detoxificação de poluentes fenólicos, vem sendo estudada e aplicada em diversas áreas inclusive no setor de celulose e papel (KUMARAN SASTRY e VIKINESWARY, 1997).

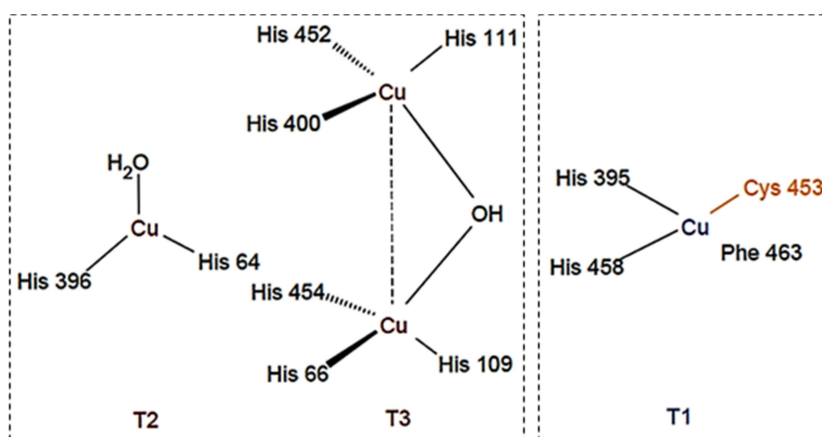
Uma vantagem do uso da Lacase é o fato desta enzima utilizar apenas oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, reduzindo o custo de sua aplicação quando comparada a outras enzimas ligninolíticas, como as peroxidases que necessitam da adição de peróxido de hidrogênio (IBRAHIM et al., 2001).

### 3.3.2 Lacases

A Lacase é um tipo de polifenoloxidase que também catalisa a oxidação de compostos não fenólicos (ARORA e GILL, 2000), polifenois, ortofenois, parafenois e difenóis, aminofenois, metoxi-fenois, fenilenodiaminas, poliamidas e uma gama considerável

de outros compostos bem como alguns íons inorgânicos (MINUSSI, PASTORE e DURAM, 2002). As semiquinonas resultantes podem sofrer reações catalisadas por enzimas, ou não, podendo resultar na destruição do anel aromático ou na polimerização (GIARDINA et al., 2010).

De acordo com estudos realizados por ressonância paramagnética eletrônica e espectroscopia UV/visível, esta enzima tem estrutura dimérica ou tetramérica, que geralmente possui 4 átomos de cobre por monômero, com sítio ativo que pode ser classificado em três grupos: T1, T2 e T3 (MADHAVI e LELE, 2009). Na Figura 2 é apresentada uma estrutura típica de Lacase.



**Figura 2:** Esquema simplificado da estrutura da Lacase do *Trametes versicolor*.

**Nota:** Sítios ativos T1 e T2/T3, grupos Histidinas (His), Cisteína (Cys) e Fenilalanina (Phe).

**Fonte:** Riva (2006).

Como mostra a Figura 2, o Cu 1 do centro ativo T1 tem um papel importante na estabilização da ligação aniônica entre os átomos de cobre do centro ativo T2/T3, e se caracteriza por ter como ligantes conservados, duas histidinas e o grupo sulfidrilo da cisteína que formam uma estrutura triangular, além de um ligante variável que pode ser a leucina ou fenilalanina em Lacases fúngicas (MOROZOVA et al., 2007a; MADHAVI e LELE, 2009).

O centro ativo T2 é um centro de cobre binuclear, constituído por um par de átomos de cobre (Cu 2 e Cu 3) que tem como ligantes 6 moléculas de histidina e funciona como receptor de 2 elétrons. O cobre do centro ativo T2 (Cu 4) localiza-se próximo ao centro ativo T3, está ligado a 2 histidinas e uma molécula de água, funcionando como aceitador de um elétron. Os centros ativos do T2 e T3 (Figura 2) estão juntos e formam um centro trinuclear

que está envolvido no mecanismo catalítico de ação da enzima (GOCHEV e KRASTANOV, 2007; MADHAVI e LELE, 2009; STRONG e CLAUS, 2011).

Ainda que o sítio ativo da Lacase seja bastante conservado evolutivamente, vários estudos sugerem que as Lacases de diferentes espécies têm características catalíticas diferentes por apresentarem grande variabilidade, tanto na estrutura protéica como nos glicídios (MAYER e STAPLES, 2002; MADHAVI e LELE, 2009).

Segundo Palmieri et al. (1997), o cobre do sítio ativo T1 está ausente em Lacases que apresentam pH ótimo mais neutro, o que evidencia a importância do Cu 1 no pH ótimo da enzima. A depleção de íons de cobre pode não só inativar Lacases como também dissociar os domínios da proteína. A libertação de cobre do centro ativo T2 pode ocorrer em elevadas temperaturas, resultando na perda acentuada da atividade (HILDÉN, HAKALA e LUNDELL 2009).

A reação catalítica típica da Lacase envolve todos os íons cobre que formam os núcleos catalíticos da enzima, e resulta na redução de uma molécula de oxigênio a duas moléculas de água, sem necessidade de produção de peróxido, e acompanhada da oxidação simultânea de 4 moléculas de substrato para produzir quatro radicais (BALDRIAN, 2006; BRIJWANI RIGDON e VADLANI, 2010; STRONG e CLAUS, 2011).

A redução do substrato pela Lacase envolve a perda de um elétron e a formação de um radical livre (cátion) que geralmente é instável e pode ser oxidado novamente pela Lacase ou por reações não enzimáticas. Para a redução completa de uma molécula de oxigênio a duas moléculas de água são necessários quatro elétrons (MINUSSI, PASTORE e DURÁN, 2002; MADHAVI e LELE, 2009). A transferência de elétrons do substrato para o cobre T1 é controlada pela diferença de potencial redox, assim um elevado potencial redox da Lacase ou um menor potencial de oxidação do substrato pode resultar numa elevada taxa de oxidação do substrato (MADHAVI e LELE, 2009).

### *3.3.2.1 Inibidores da Lacase*

A Lacase pode ser inibida por ânions pequenos como fluoreto, cloreto, azida e hidróxido que se ligam aos seus centros T2/T3 e perturbam a transferência interna de elétrons do centro T1 para o cluster T2/T3 inibindo consequentemente a atividade enzimática (MOROZOVA et al., 2007b). Outros inibidores incluem metais pesados, íons como cobalto,

potássio, zinco, cromo, cálcio e outros agentes sequestrantes de cobre (STRONG e CLAUS, 2011).

Geralmente, quando o inibidor está presente em quantidade suficiente, a degradação do substrato não irá ocorrer, uma vez que este inibe a atividade da enzima, no entanto o uso de Lacase imobilizada torna-a menos vulnerável aos inibidores do que a enzima livre (ROGALSKI et al., 1995; STRONG e CLAUS, 2011).

### 3.3.2.2 *Substrato da Lacase*

A gama de substratos que a Lacase pode oxidar é muito grande variando conforme a espécie que a produz (MAYER e STAPLES, 2002; BALDRIAN, 2006; MADHAVI e LELE, 2009). Também, a localização intracelular ou extracelular da Lacase no organismo produtor está relacionada com a sua função biológica neste organismo, o que determina a gama de substratos compatíveis com esta enzima (BALDRIAN, 2006; STRONG e CLAUS, 2011).

Em geral, os p-difenóis como a hidroquinona são melhores substratos que os m-difenóis (resorcinol, m-fenilenodiamina e orcinol) que são considerados maus substratos da Lacase (TEERAPATSAKUL et al., 2007; STRONG e CLAUS, 2011). Os substratos para-substituídos como o p-cresol e a p-fenilenodiamina tem uma baixa taxa de oxidação (STRONG e CLAUS, 2011). O ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfônico) e a Siringaldazina (SGZ) são considerados os substratos específicos da Lacase (BALDRIAN, 2006).

A diferença de potencial redox entre o substrato fenólico e o cobre T1 pode aumentar a oxidação do substrato, inclusive em valores de pH maiores que 7. Contudo, em ambientes mais alcalinos, a ligação do ânion hidroxila ao centro ativo T2 e T3 resulta na interrupção da transferência interna de elétrons entre os centros ativos T1 e T2/T3, o que causa uma inibição da atividade da Lacase (MADHAVI e LELE, 2009).

Os substratos com elevado potencial redox não podem ser oxidados diretamente por Lacases, contudo, a gama de substratos oxidados pela enzima pode ser aumentada pela combinação desta com mediadores (GIARDINA et al., 2010). Os mediadores são um grupo de compostos orgânicos de baixo peso molecular que aumentam a especificidade do substrato e o potencial de atividade da Lacase. Estes funcionam como intermediários entre os substratos com elevado potencial redox e a enzima, formando um cátion com radicais altamente ativos,

capaz de oxidar moléculas grandes que a Lacase sozinha não poderia oxidar (MOROZOVA et al., 2007a).

Atualmente existem vários mediadores para a Lacase mais ou menos eficientes que podem ser naturais ou sintéticos. A descoberta de muitos mediadores redox sintéticos aumentou a capacidade de oxidação e o potencial de aplicações desta enzima em nível industrial. Os mediadores sintéticos ABTS e HBT (N- hidroxibenzotriazol) têm sido muito estudados e estão entre os mais efetivos atualmente (STRONG e CLAUS, 2011), mas existem muitos outros mediadores da Lacase, naturais e sintéticos, como siringaldazina (SGZ), vanilina, acetovanilina, metilvanilato, acetosiringona, 2,4,6-trimetilfenol, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sináptico, guaiacol (MAYER e STAPLES, 2002; GOCHEV e KRASTANOV, 2007; MOROZOVA et al., 2007a; KUNAMNENI et al., 2008; MADHAVI e LELE, 2009; GIARDINA et al., 2010; STRONG e CLAUS, 2011).

Entretanto, existem muitas restrições na aplicação dos mediadores, uma vez que são caros, podem gerar derivados tóxicos e, em altas concentrações, até inibir a atividade enzimática (KUNAMNENI et al., 2007; STRONG e CLAUS, 2011). Por estas razões, alguns estudos vêm investigando os mecanismos pelos quais os fungos degradam naturalmente a lignina, e têm mostrado que os metabólitos secundários produzidos pelos fungos se comportam como substratos naturais da Lacase, agindo como mediadores da catálise enzimática da lignina (CAÑAS e CAMARERO, 2010).

### 3.3.2.3 Aplicações da Lacase na biorremediação de efluentes

Por conta da capacidade das Lacases de degradar uma grande variedade de compostos aromáticos, existem alguns estudos que já verificaram o potencial desta na degradação de corantes sintéticos e naturais. Chagas e Durrant (2001) utilizaram *Pleurotus sajor-caju* em um experimento em que este promoveu descoloração de 100% dos corantes amaranço e vermelho ácido, 50% de laranja G e 20% de tartrazina, sendo que esses resultados foram diretamente relacionados à ação de enzimas lignolíticas, especialmente as Lacases.

Li et al. (2014) reportam uma descoloração de 58 % do vermelho Congo, 92 % do azul de anilina e 97 % do índigo carmim, após 10 dias em fermentação sólida de substrato de mandioca com *Trametes* sp. SYBC-L4. Além disso, foi testado o tratamento *in vitro*, com Lacase bruta produzida pelo mesmo fungo, e verificou-se que a descoloração *in vitro*

aumentava com adição do mediador. No entanto, o tratamento *in vivo* foi indiferente à presença de mediador, e manteve a descoloração de anilina azul e índigo carmim durante variação do pH de 3,0 até 9,0.

A Lacase também tem sido aplicada em processos de polpação atuando no branqueamento da polpa em substituição ao cloro. O estudo de Camarero et al. (2004) ilustra a eficiência de biobranqueamento em polpas de papel usando o sistema Lacase-HBT, onde foi observado decréscimo de 63-68% do número de  $kappa^2$  da polpa estudada.

Também vem sendo amplamente investigado o uso das Lacases na biotransformação de compostos fenólicos. Munari, Gaio e Dillon (2003) avaliaram a degradação de fenóis totais do efluente de uma indústria papeleira em meios submersos com *Pleurotus sajor-caju*, e observaram que após 13 dias de incubação a redução de fenóis foi de até 59%. Esta redução foi associada à presença de enzimas Lacases e Peroxidases produzidas pelo fungo.

Liu et al. (2011), usando um inóculo a 3% (v/v) de cultura de *Aspergillus niger*, em pH 6, agitação de 160 rpm, por 60-72 h e a 30 ° C, também detectaram a produção de Lacase pelo fungo, e conseguiram remoção de 60 % da DQO, 77 % da Turbidez e 43 % da Cor presente em efluente de celulose e papel. Já Pacheco e Soares (2014), obtiveram remoções de 65 % dos Compostos Fenólicos e 60 % da Cor, tratando efluente de celulose e papel com atividade de 0,12 U mL<sup>-1</sup> de Lacase de *Aspergillus* sp. purificada e imobilizada em quitosana, com pH 5,5, aeração constante, TDH de 24 h e a 25 ° C.

---

<sup>2</sup> Representação numérica da quantidade de lignina residual na polpa celulósica, mediante reação de permanganato de potássio com a lignina presente na polpa, por 10 min em meio ácido (IPPC, 2013).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE *KRAFT*

O efluente industrial utilizado neste estudo foi obtido de uma indústria de celulose e papel localizada na região metropolitana de Curitiba - PR, Brasil. A indústria produz celulose *kraft* não branqueada e possui sistema de tratamento biológico composto de Lagoa de Decantação, Lagoa Aerada Facultativa e Lagoa de Maturação. O efluente foi coletado na entrada do sistema de tratamento da indústria, transportado para a universidade em galões de 10 L, e armazenado em temperatura de 4°C, na ausência de luz (ABNT, 1987).

As características do efluente foram determinadas por meio de análises dos parâmetros de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO<sub>5,20</sub>), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Cor, Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Compostos Lignínicos (CL) e Área Espectral (AE), em amostras filtradas com filtro de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm. No Apêndice A tem-se a descrição mais detalhada dos métodos analíticos usados na pesquisa.

Também foi feita a leitura de pH (pHmetro CienlaB mPA-210), Oxigênio Dissolvido (Oxímetro Lutron DO-5519), Turbidez (Turbidímetro Policontrol AP2000) e Potencial de Oxirredução - potenciômetro fabricado na universidade com eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl e registrado no trabalho de HEROSO (2016) - além de análises de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV). Na Tabela 2 são descritas as metodologias utilizadas na medição dos parâmetros usados durante a pesquisa. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



**Tabela 2:** Métodos de análise físico-química e de armazenamento da amostra.

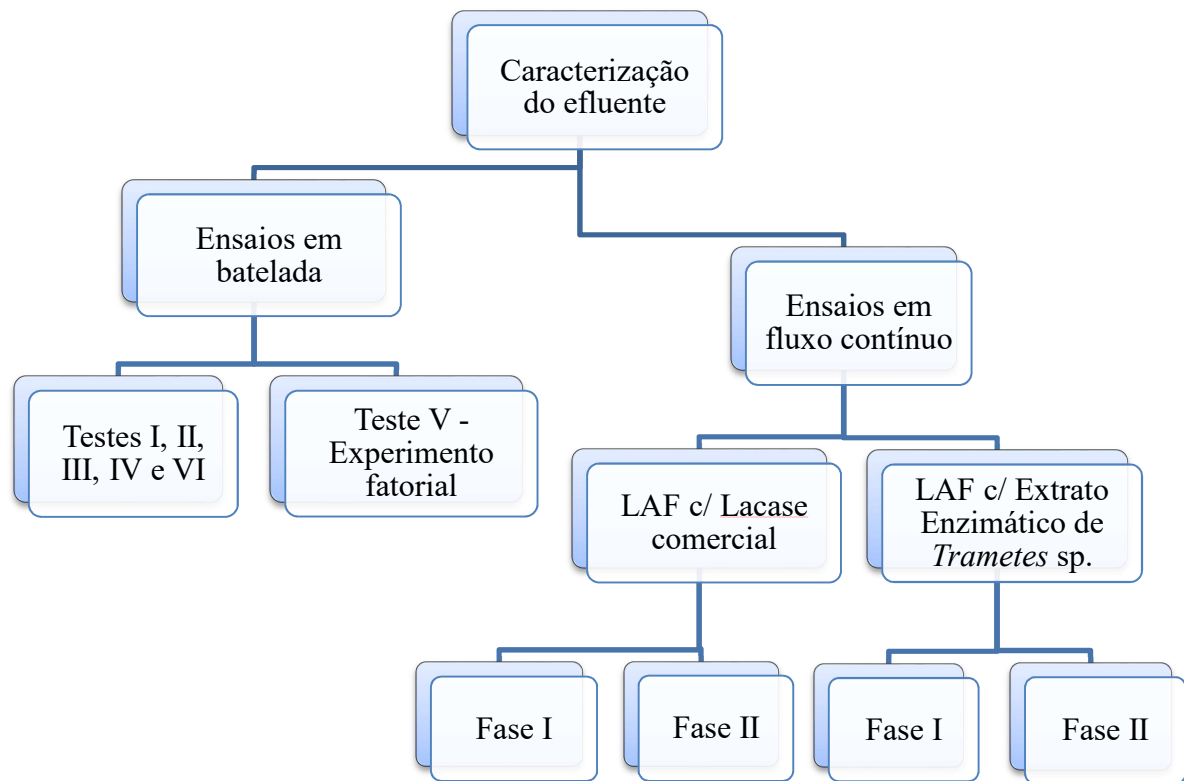
Procedimentos	Método	Descrição
Armazenamento e preservação da amostra	1060 C (APHA, 2005) e NBR 9898 (ABNT, 1987)	Temperatura de 4 °C, na ausência de luz.
DQO	5220 D (APHA, 2005)	Refluxo fechado, método colorimétrico
DBO <sub>5,20</sub>	5210 B (APHA, 2005)	Teste incubado 5 dias a 20 °C
Cor	VIS <sub>440</sub> (CEÇEN, 2003)	Absorbância espectrofotométrica VIS em 440 nm
CFTs	5530 D (APHA, 2005)	Absorbância espectrofotométrica UV em 215 nm
Compostos Lignínicos	UV <sub>280</sub> (CEÇEN, 2003)	Absorbância espectrofotométrica UV em 280 nm
Área Espectral	UV <sub>200</sub> -VIS <sub>800</sub> (SALVADOR, MARCOLINO, PERALTA-ZAMORRA, 2012)	Absorbância espectrofotométrica por varredura entre 200 e 800 nm
Toxicidade aguda	NBR 12713 (ABNT, 2009)	Ensaio com <i>Daphnia magna</i>
SST, SSV, SSed e IVL	2540 D, E e F (APHA, 2005) (HOFFMANN et al., 2005)	Sólidos Suspensos Totais (seco a 105 °C), voláteis (aquecido a 550 °C) e sedimentáveis (cone Inhoff)

## 4.2 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES E CONDIÇÕES OPERACIONAIS

Após a caracterização do efluente de papel e celulose *kraft*, foram montados os sistemas de tratamento com as Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) em fluxo contínuo. Durante a operação das LAFs, surgiu a necessidade de alguns testes de batelada em paralelo, a fim de esclarecer de forma mais rápida as possíveis interferências no tratamento.

Para facilitar a compreensão do processo, dividiu-se o trabalho em duas etapas principais: Ensaios em batelada, totalizando seis testes em nível de bancada, sendo um deles um experimento fatorial; e Ensaios em fluxo contínuo, trabalhando primeiro com Lagoa Aerada Facultativa (LAF) com adição de Lacase comercial (NOVOZYM 51003<sup>®</sup>), e depois com LAF com adição de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET), no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR - Campus Ecoville.

Para todos os ensaios realizados em fluxo contínuo, trabalhou-se com duas LAFs em paralelo, enquanto uma recebia adição de enzimas a outra foi usada como controle, nas mesmas condições operacionais, mas sem adição de enzimas. Na Figura 3 pode-se observar o fluxograma das atividades desenvolvidas na pesquisa.



**Figura 3:** Fluxograma das atividades da pesquisa.

Como pode ser visto na Figura 3, os ensaios em fluxo contínuo com as LAFs foram divididos em Fase I e Fase II. Na primeira, manteve-se a COV em  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  em ambas as lagoas, e realizou-se aplicação diária de enzimas em uma das lagoas (Lacase comercial ou Extrato Enzimático de *Trametes* sp.). A COV de  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , usada na Fase I, representa a carga média empregada na indústria de origem do efluente. Na Fase II, ambas as lagoas tiveram suas COVs aumentadas de forma brusca, de modo a causar choques de carga, e a cada aumento de COV, realizou-se aplicação de enzimas (Lacase comercial ou Extrato Enzimático) em uma das lagoas. No final da Fase II, um efluente mais concentrado (retirado da prensa) foi misturado ao efluente *kraft* utilizado, para reduzir sua biodegradabilidade antes da entrada nas LAFs, de modo a causar choque no sistema. Na Tabela 3 temos as condições experimentais utilizadas em cada ensaio de tratamento do efluente *kraft* realizado durante este estudo.

**Tabela 3:** Condições experimentais utilizadas nas atividades da pesquisa.

Experimento	COV (kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	DQO inicial (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	DBO/DQO inicial	TDH (d)	Tempo de experimento (d)
<b>Ensaaios em batelada</b>					
Testes I, II, III, IV, V e VI	0,2	595	0,31	3,0	3,0
<b>Ensaaios em fluxo contínuo com Lacase comercial</b>					
Fase I	0,2	767	0,35	3,8	60
Fase II	0,2	592	0,38	2,9	41
	0,6	529	0,45	0,9	13
	1,2	542	0,38	0,5	15
	1,2	857	0,19	0,7	7
<b>Ensaaios em fluxo contínuo com Extrato enzimático de <i>Trametes sp.</i></b>					
Fase I	0,2	550	0,35	2,7	60
Fase II	0,2	597	0,25	2,9	6
	0,6	551	0,37	0,9	8
	1,2	621	0,31	0,5	8
	1,2	864	0,14	0,7	8

#### 4.3 LACASE COMERCIAL

A Lacase comercial utilizada nesse estudo foi o produto NOVOZYM 51003<sup>®</sup>, gentilmente fornecido pela empresa Novozymes Latin America Ltda. Esta é uma Lacase do fungo ascomiceto *Myceliophthora thermophila* produzida por *Aspergillus sp.* (modificado geneticamente) em cultivo submerso. De acordo com a especificação comercial, o NOVOZYM 51003<sup>®</sup> apresenta 1000 LAMU (*Laccase Myceliophthora Units*) por grama, sendo um LAMU definido como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 mmol de Siringaldazina (SGZ) por minuto no pH 7,5 a 30°C (Anexo 1).

A atividade desta enzima foi determinada no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Ecoville, pelo método de oxidação do ABTS proposto por Hou et al. (2004), e descrito no Apêndice A. Neste teste a NOVOZYM 51003<sup>®</sup> apresentou  $39\,000 \pm 2000$  U mL<sup>-1</sup>, sendo uma unidade enzimática (U) a quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de oxidação de 1 μmol de ABTS por minuto.

#### 4.4 ENSAIOS EM BATELADA

Os testes em batelada, foram realizados com Carga orgânica volumétrica (COV) de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e oxigenação maior que 2 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. A COV usada representa a carga média empregada na indústria de origem do efluente, e foi mantida usando um volume de 250 mL, em Erlenmeyers de 500 mL, com um Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) de 3 dias, calculado usando a Carga Orgânica Volumétrica (COV) dada em kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e a concentração do efluente (S) dada em kg m<sup>-3</sup>, medida no dia do experimento (Equação 1).

$$TDH = \frac{S}{COV} \quad (1)$$

A oxigenação usada em todos os testes manteve-se por meio de compressor de ar (modelo Boyu - U 3800) com pedra porosa, já a neutralização do pH do afluente (pH 7,0 ± 0,05) foi realizada por meio da adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 e 1 mol L<sup>-1</sup>).

Nos experimentos em que se realizou a inoculação, utilizou-se do lodo da LAF da indústria para concentração final de 60 mg SSV L<sup>-1</sup> (VON SPERLING, 2005; NUNES, 2012). Quanto à proporção de nutrientes, nos testes em que se realizou esta correção, utilizou-se 1 mL de solução contendo NH<sub>4</sub>Cl (19,103 g L<sup>-1</sup>) e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5,624 g L<sup>-1</sup>), para cada 100 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> de DBO presente em 1 L de efluente bruto, afim de se obter a proporção de 100:5:1, para a DBO:N:P (DIEZ, 2002; METCALF e EDDY, 2003).

Nos testes I, II, III, IV e V analisou-se as remoções de DQO, Cor, Compostos Lignínicos (CL), Compostos Fenólicos Totais (CFTs), Área Espectral (AE) e Turbidez. Já no teste VI foram realizadas somente análises de DQO e Cor. Para todos os testes as análises seguiram a mesma metodologia usada na caracterização e a Eficiência de Remoção foi calculada de acordo com a Equação 2.

$$ER (\%) = \frac{C_o - C_f}{C_o} \cdot 100 \quad (2)$$

Em que ER é a eficiência de remoção,  $C_o$  é a concentração do afluente e  $C_f$  é a concentração do efluente tratado. Quando ER apresentou valor negativo considerou-se o resultado como porcentagem de incremento do parâmetro.

#### 4.4.1 Teste I - Efeito da inoculação

O Teste I foi realizado para verificar o efeito da inoculação no desempenho da Lacase comercial (NOVOZYM 51003<sup>®</sup>), já que a combinação dos processos acarretaria na atuação dos microrganismos simultaneamente a atuação catalítica das enzimas. A quantidade de enzima usada nesse teste foi de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial (50 ppm), representando a concentração mínima indicada pelo fabricante. Para isso foram montados quatro sistemas de tratamento em batelada com adição de nutrientes ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) no afluente e neutralização do pH:

- 1º - Controle, somente com aeração;
- 2º - Inoculação com lodo e aeração;
- 3º - Inoculação com lodo, aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial e aeração;
- 4ª - Aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial e aeração.

#### 4.4.2 Teste II - Efeito da quantidade de Lacase comercial

O Teste II buscou verificar o resultado da aplicação de quantidades maiores de Lacase comercial. Foram montados mais três sistemas de tratamento em batelada, com adição de nutrientes, pH corrigido para 7 e inoculação:

- 1º - Controle, sem aplicação de Lacase;
- 2º - Aplicação de  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  (100 ppm) de Lacase comercial;
- 3º - Aplicação de  $7,8 \text{ U mL}^{-1}$  (200 ppm) de Lacase comercial.

#### 4.4.3 Teste III - Efeito da Lacase comercial no afluente

No Teste III buscou-se verificar a contribuição da Lacase comercial na alteração das características do afluente do tratamento, e a consequente interferência desta no valor de Eficiência de Remoção (Equação 1) dos parâmetros analisados. Os sistemas de tratamento foram montados em batelada, com adição de nutrientes, pH corrigido para 7, e inoculação. A quantidade de Lacase comercial utilizada foi de  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  (100 ppm).

Para o cálculo da Eficiência de Remoção foram analisadas duas amostras do afluente para determinação da concentração inicial ( $C_0$ ), sendo uma amostra apenas com correção de nutrientes e pH ( $C_{0\text{-Bruto}}$ ) e a outra amostra com correção de nutrientes e pH, mais a adição de enzima inativa (digestão a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min) na mesma proporção usada no sistema com Lacase comercial ( $C_{0\text{-Enzima inativa}}$ ). Dessa forma, após análise da concentração final ( $C_f$ ) do efluente dos sistemas montados (controle e com enzima), obteve-se:

- 1º - Eficiência do sistema controle, considerando  $C_0 = C_{0\text{-Bruto}}$ ;
- 2º - Eficiência do sistema com Lacase ativa, considerando  $C_0 = C_{0\text{-Bruto}}$ ;
- 3º - Eficiência do sistema com Lacase ativa, considerando  $C_0 = C_{0\text{-Enzima inativa}}$ .

#### 4.4.4 Teste IV - Efeito dos mediadores

O Teste IV buscou-se avaliar o desempenho do sistema LAF com Lacase comercial, após adicionar 1-hidroxibenzotriazol (HBT) ou Siringaldazina (SGZ) como mediadores. Optou-se por esses dois compostos por serem substratos específicos da Lacase, apresentando bons resultados como mediadores (STRONG e CLAUS, 2011). Para isso foram utilizados 4 sistemas em batelada, com adição de nutrientes, pH corrigido para 7 e inoculação:

- 1º - Controle, sem aplicação de Lacase;
- 2º - Aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial (50 ppm);
- 3º - Aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial e 1 mM de SGZ;
- 4º - Aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial e 1 mM de HBT.

#### 4.4.5 Teste V - Experimento fatorial

O delineamento experimental utilizado foi o fatorial  $2^3$ , com adição de um ponto central, resultando em 9 condições experimentais, realizadas em triplicata. As variáveis foram: pH, temperatura e concentração de Lacase comercial. Os níveis máximos e mínimos utilizados para cada variável são mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Fatores e respectivos níveis avaliados no delineamento experimental.

Fatores	Nível mínimo (-)	Ponto central (0)	Nível máximo (+)
Temperatura (°C)	15	25	37
pH	4	7	8
Enzima (U mL <sup>-1</sup> )	0	1,95	3,9

Os níveis de dosagem da Lacase comercial NOVOZYM 51003<sup>®</sup> utilizados no desenho experimental foram de 1,95 e 3,9 U mL<sup>-1</sup> (50 e 100 ppm), de acordo com a recomendação do fabricante (comunicação pessoal).

O experimento foi realizado em batelada, sob condições de temperatura controlada em incubadora (modelo BOD SL200/034). Os experimentos montados trabalharam sob as mesmas condições de aeração, COV, nutrientes e inoculação, usadas nos outros testes em batelada. A correção do pH foi realizada com NaOH (3 mol L<sup>-1</sup>) ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 e 1 mol L<sup>-1</sup>).

Os parâmetros de resposta utilizados foram as remoções (ou incremento) de DQO, Cor, Compostos Fenólicos Totais (CFTs), Compostos Lignínicos (CL), Área Espectral (AE) e Turbidez, analisados seguindo a mesma metodologia usada na caracterização e calculados de acordo com a Equação 2.

Na análise estatística os parâmetros estudados foram analisados pelo teste de Kolmogorov- Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. As diferenças foram testadas pelo teste F através da Análise de Variância (ANOVA) e teste t de Student dos coeficientes relativos aos seus erros padrões. A associação linear das variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados utilizando o programa Statistica 10.0 (Stat soft Inc. USA).

#### 4.4.6 Teste VI - Comparação entre Lacase comercial e Extrato Enzimático de *Pleorotus ostreatus*

O Teste VI foi realizado para verificar o efeito da Lacase comercial e da Lacase bruta presente no Extrato Enzimático de *Pleorotus ostreatus*, na redução da DQO e da Cor. O extrato enzimático foi produzido no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR – Campus Ecoville de acordo com metodologia adaptada de Menezes, Silva e Durrant (2009). Como no momento do experimento não foi possível medir a atividade enzimática de Lacase presente no extrato enzimático, a aplicação foi realizada em três quantidades diferentes para ambos os tipos de enzima (Lacase comercial e extrato enzimático), seguindo a mesma proporção (200, 400 e 2000 ppm).

Posteriormente, foi realizada a determinação da atividade enzimática do extrato, que apresentou  $0,834 \pm 0,050 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase, medida pelo método de Hou et al. (2004), sendo essa atividade 46 000 vezes menor que a atividade medida na enzima Lacase comercial ( $39.000 \pm 2.000 \text{ U mL}^{-1}$ ), usando o mesmo método. Para este teste, foram montados sete sistemas de tratamento em batelada:

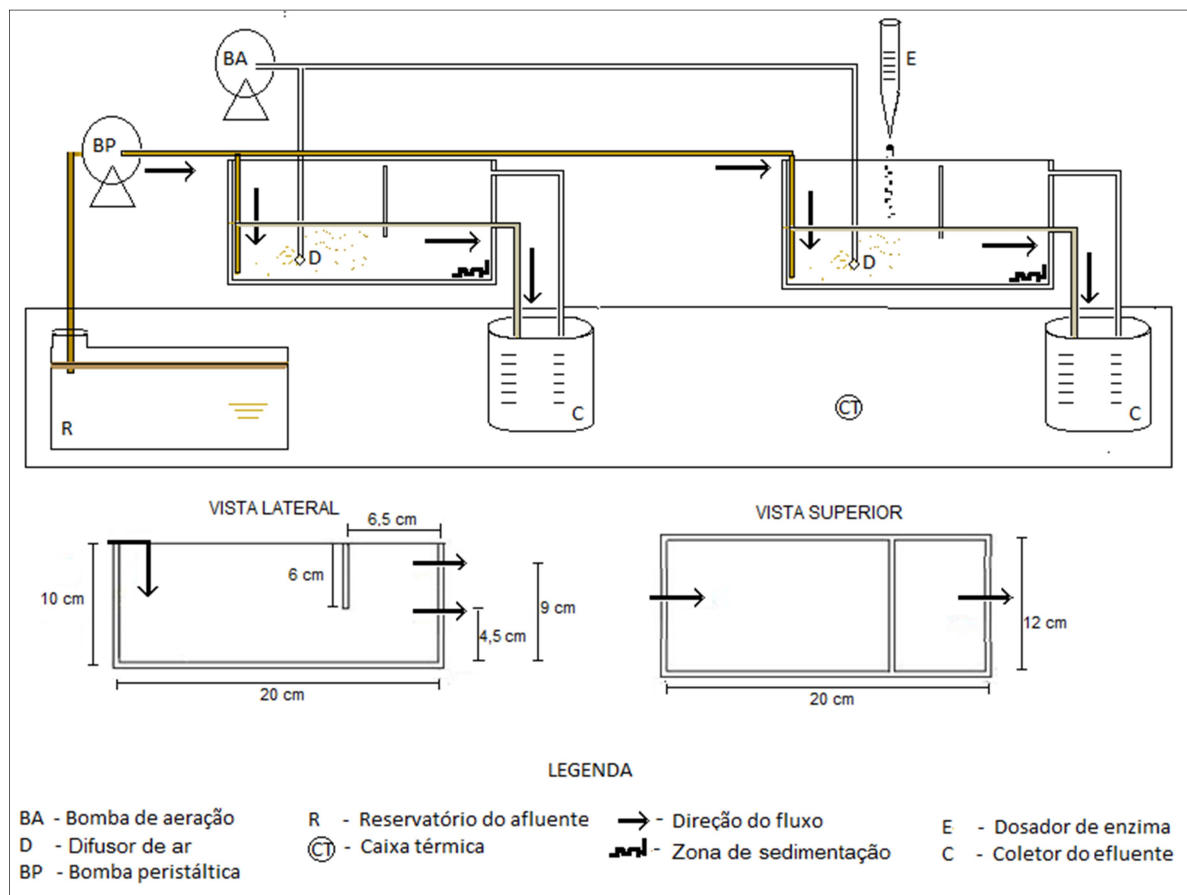
- 1º - Sem aplicação de enzimas;
- 2º - Com aplicação de  $7,8 \text{ U mL}^{-1}$  (200 ppm) de Lacase comercial;
- 3º - Com aplicação de  $15,6 \text{ U mL}^{-1}$  (400 ppm) de Lacase comercial;
- 4º - Com aplicação de  $78 \text{ U mL}^{-1}$  (2000 ppm) de Lacase comercial;
- 5º - Com aplicação de  $0,0002 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase do extrato enzimático (200 ppm);
- 6º - Com aplicação de  $0,0004 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase de extrato enzimático (400 ppm);
- 7º - Com aplicação de  $0,002 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase de extrato enzimático (2000 ppm).

Este último teste foi realizado sem inoculação com lodo nem adição de nutrientes, e fazendo uso da melhor condição de pH e temperatura obtida como resultado do experimento fatorial realizado anteriormente.



#### 4.5 ENSAIO EM FLUXO CONTÍNUO

Foram usadas 2 Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) em escala de bancada, ambas em material acrílico transparente e com volume útil de 1 L. As LAFs foram construídas com duas saídas, uma localizada a 4,5 cm do fundo e a outra a 9 cm do fundo, sendo esta última uma saída de emergência, em caso de entupimento da saída principal (Figura 4). O reservatório de afluente e o coletor do efluente do tratamento foram mantidos numa caixa térmica com gelo, para conservação das características do afluente e efluente do tratamento.



**Figura 4:** Esquema das Lagoas Aeradas Facultativas (LAF) usadas no estudo.

A alimentação deu-se por meio de bombas peristálticas (modelo Milan - Mod.BP 600) e a aeração por compressores de ar (modelo Boyu - U 3800). Durante todo o experimento manteve-se a aeração com OD maior que  $5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ , medida com oxímetro (modelo Lutron DO-5519). Também foi adicionado no efluente da indústria 1 mL de solução

contendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $19,103 \text{ g L}^{-1}$ ) e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $5,624 \text{ g L}^{-1}$ ), para cada  $100 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$  de DBO presente em  $1 \text{ L}$  de efluente bruto, afim de se obter a proporção de 100:5:1, para a DBO:N:P (DIEZ, 2002; METCALF e EDDY, 2003). O pH do efluente foi corrigido para 7,0, neutralizando-o com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,01$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) antes da entrada nas LAFs.

A Temperatura e Oxigênio Dissolvido (OD) no efluente foram monitorados por meio de medição direta (Oxímetro Lutron DO-5519), no mínimo duas vezes por semana. A eficiência do sistema (Equação 2) também foi monitorada duas vezes por semana, mediante realização de análises de DQO,  $\text{DBO}_{5,20}$ , Cor, Compostos Fenólicos Totais (CFT), Compostos Lignínicos (CL), Área Espectral (AE) e Turbidez, seguindo a mesma metodologia de caracterização do efluente.

Em relação à Carga Orgânica Volumétrica (COV), esta foi mantida variando o Tempo de Detenção Hidráulica (TDH), levando em conta a COV prevista ( $0,2$ ,  $0,6$  ou  $1,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ) e a concentração de matéria orgânica do efluente (S), de acordo com a Equação 1 apresentada anteriormente.

Utilizou-se para inoculação das lagoas (controle e com enzimas) biomassa proveniente do fundo da LAF da indústria, para uma concentração final de  $2 \text{ g SSV L}^{-1}$  em cada lagoa, valor intermediário entre os valores usados em sistemas biológicos aerados (VON SPERLING, 2005) e o valor usado em LAF no tratamento de efluente *kraft* (XAVIER et al., 2011).

No experimento em fluxo contínuo foram empregadas Lacase comercial (NOVOZYM 51003<sup>®</sup>) e Lacase bruta de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET) comparadas a LAF controle, sem enzimas.

#### 4.5.1 Lagoas Aeradas Facultativas com Lacase comercial NOVOZYM 51003<sup>®</sup>

As Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) foram iniciadas com COV de  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , permanecendo nessa COV durante 60 dias (Fase I). Nesse período, aplicou-se  $12,5 \mu\text{L d}^{-1}$  do produto NOVOZYM 51003<sup>®</sup> em uma das LAFs (equivalente a 50 ppm da vazão diária de efluente), enquanto a outra era usada como controle. Considerando a diluição da atividade enzimática dentro da lagoa (volume total de  $1 \text{ L}$  de efluente) e a atividade do produto comercial utilizado ( $39000 \pm 2000 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase medida pelo método de oxidação do ABTS), a aplicação diária de Lacase foi de aproximadamente  $0,49 \text{ U mL}^{-1}$ .

Foram realizadas análises de toxicidade aguda em *Daphnia magna*, nas amostras do afluente e efluente do estado estacionário<sup>3</sup> das LAFs em COV de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. As análises de toxicidade foram realizadas de acordo com a NBR 12713 da ABNT (2009) e os organismos utilizados foram oriundos de cultivos mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR – Campus Ecoville (Apêndice A).

Após 60 dias de funcionamento das LAFs em COV de 0,2 kg m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, foram realizadas análises de Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) e Sólidos Sedimentáveis (SSed), para quantificação da biomassa produzida durante o funcionamento das LAFs, e cálculo do Índice Volumétrico de Lodo (IVL). Assim como nos demais experimentos, nessa etapa da pesquisa, todas as análises foram realizadas em triplicata e seguiram a mesma metodologia de caracterização do efluente (Apêndice A).

Na Fase II, o experimento da Fase I foi repetido, seguindo a mesma metodologia (exceto pela aplicação diária de enzima). As duas LAFs iniciaram em COV de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> até a estabilização (41 dias). Após a estabilização a COV foi aumentada para 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (carga 3 vezes maior). Novamente depois da estabilização das LAFs (13 dias), a carga foi alterada para 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (carga 6 vezes maior). Após a estabilização das LAFs (15 dias), ainda usando uma COV de 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, misturou-se uma parte de efluente mais concentrado da indústria, de modo a diminuir a relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO deste. A intenção foi de simular sobrecargas que podem acontecer eventualmente no processo industrial.

A cada alteração na COV do sistema, e na diminuição da relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO, fez-se uma aplicação de 50 µL de Lacase NOVOZYM 51003<sup>®</sup> em uma das lagoas (equivalente a 1,95 U mL<sup>-1</sup>), com finalidade de testar a aplicação da enzima em situação de sobrecarga, enquanto a outra lagoa, passando pelas mesmas condições de sobrecarga, foi usada como controle.

---

<sup>3</sup> Estabilização ou estado estacionário, caracterizado pela ausência de variação estatisticamente significativa entre os valores de eficiência de redução da DBO<sub>5,20</sub> ao longo de uma semana (três análises consecutivas).

#### 4.5.2 Lagoas Aeradas Facultativas com Extrato Enzimático de *Trametes* sp.

Duas outras lagoas foram montadas para avaliar a adição do Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET) ao sistema biológico. Foi seguida a mesma metodologia descrita na sessão 4.3 em relação à inoculação, nutrientes, pH, OD e COV. Quanto à escolha desse fungo, em detrimento do cultivo de *Pleurotus ostreatus* (seção 4.4.6), esta se deu por conta dos bons resultados de atividade de Lacase, obtidos do Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET), produzido no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR – Campus Ecoville, de acordo com o método proposto por Hermann (2015) e descrito no Apêndice A.

Por conta da possibilidade da presença de Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase no EET, foram determinadas as atividades destas enzimas de acordo com o método de Hou et al. (2004), Wariishi, Valli e Gold (1992) e Archibald (1992), respectivamente (Apêndice A).

Assim como no experimento da LAF com Lacase comercial, durante todo o período experimental com EET, a eficiência do sistema (Equação 2) foi monitorada mediante realização de análises de DQO,  $DBO_{5,20}$ , Cor, Compostos Fenólicos Totais (CFT), Compostos Lignínicos (CL), Área Espectral (AE) e Turbidez, duas vezes por semana, seguindo a mesma metodologia de caracterização do efluente.

Após 60 dias de funcionamento das LAFs em COV de  $0,2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , iniciou-se a Fase II, seguindo a mesma metodologia do experimento da Fase I, exceto pela ausência de aplicação diária de enzima. Nesta fase as duas LAFs foram mantidas em COV de  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  até a estabilização (6 dias). Após a estabilização a COV foi aumentada para  $0,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Novamente depois da estabilização das LAFs (8 dias), a carga foi alterada para  $1,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Após a estabilização das LAFs (8 dias), ainda usando uma COV de  $1,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , misturou-se uma parte de efluente mais concentrado da indústria, de modo a diminuir a relação  $DBO_{5,20}/DQO$  deste. A intenção foi de simular sobrecargas que podem acontecer eventualmente no processo industrial.

A cada alteração na COV do sistema, e na diminuição da relação  $DBO_{5,20}/DQO$ , fez-se uma aplicação de 6 mL de EET em uma das lagoas (equivalente a  $0,034 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase), com finalidade de testar a aplicação da enzima em situação de sobrecarga, enquanto a outra lagoa, passando pelas mesmas condições de sobrecarga, foi usada como controle.

Ao final do experimento também foram realizadas análises de SST, SSV e SSed, para quantificação da biomassa produzida durante o funcionamento das LAFs, e cálculo do

IVL. Também foram realizadas análises de toxicidade aguda em *Daphnia magna*, nas amostras do afluente (efluente industrial) e do efluente das LAFs no estado estacionário da COV de  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Assim como nos demais experimentos, nessa etapa da pesquisa, todas as análises foram realizadas em triplicata e seguiram a mesma metodologia de caracterização do efluente (Apêndice A).

#### 4.5.3 Atividade enzimática durante o tratamento do efluente *kraft*

Com o intuito de monitorar a atividade enzimática durante o tratamento do efluente *kraft* dentro do sistema biológico aerado, foram montados dois sistemas de tratamento em batelada, um com aplicação de Lacase comercial NOVOZYM 51003<sup>®</sup> e outro com aplicação de Extrato enzimático de *Trametes* sp. (EET).

A quantidade de Lacase comercial utilizada foi de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$ , e para o EET foi de  $0,017 \text{ U mL}^{-1}$  (concentrações de enzimas Lacase usadas no experimento com as LAFs). Assim como nos outros testes em batelada, os dois sistemas montados tiveram adição de nutrientes, inoculação e correção do pH do efluente para 7 (sessão 4.4).

A partir do momento de aplicação das enzimas a medição da atividade de Lacase foi realizada nos tempos: 0,02 h; 0,25 h; 0,5 h; 0,75 h; 1 h; 2 h; 3 h; 4 h; 12 h e 24 h. Buscou-se concentrar as análises na primeira hora do experimento por ser o momento de maior atividade das enzimas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFLUENTE USADO NO ESTUDO

Na Tabela 5 são apresentados os valores obtidos da caracterização do efluente da indústria de celulose e papel *kraft*, usado no experimento. O resultado é a média de três coletas, acompanhado do desvio padrão associado.

**Tabela 5:** Caracterização do efluente *kraft*.

Parâmetros	Efluente usado no estudo*	Efluente <i>kraft</i> na Literatura**
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	655,57 ± 215,80	770,9 – 2367,9
DBO <sub>5,20</sub> (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	214,93 ± 41,43	155,9 – 564,5
DBO <sub>5,20</sub> /DQO	0,34 ± 0,05	0,20 – 0,34
CFT (UV <sub>215</sub> ) (mg L <sup>-1</sup> )	255,14 ± 69,88	234,5 – 831,3
Cor (VIS <sub>440</sub> ) (1×1cm)	0,52 ± 0,12	0,40 – 0,89
CL (UV <sub>280</sub> ) (1×1cm)	4,26 ± 1,59	0,67 – 5,45
pH	8,64 ± 0,28	3,2 – 11,3
Turbidez (UNT)	51,9 ± 6,6	–

**Nota:** \*n = 3; \*\* Faixa que engloba valores de caracterização encontrados nos trabalhos de Villamar et al. (2009), Lagos et al. (2009), Chamorro et al. (2010) e Xavier et al. (2011).

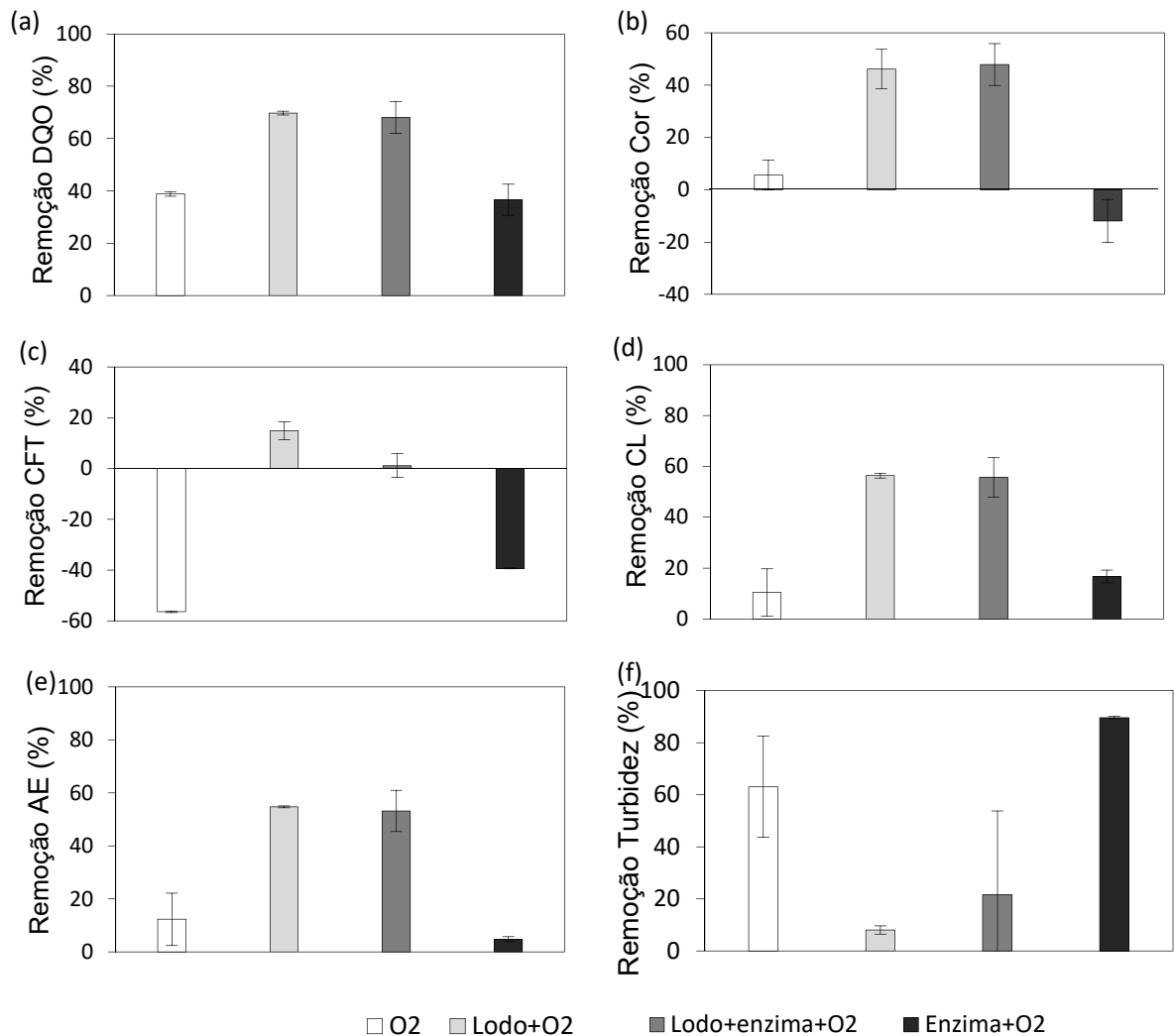
Como pode ser visto na Tabela 5, o efluente usado no estudo é predominantemente alcalino, um vestígio da polpação com sulfeto e hidróxido, sendo um valor característico de efluente *kraft*, sem branqueamento. Efluentes com cloro residual do branqueamento, em geral, possuem pH mais ácido. O efluente também 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.

De acordo com Whiteley e Lee (2006), 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 à elevada toxicidade conferida por esses compostos, por esse motivo há necessidade de testar tratamentos alternativos.

## 5.2 ENSAIOS EM BATELADA

### 5.2.1 Teste I - Efeito da inoculação

Na Figura 5 é apresentado o primeiro teste realizado para verificar se a atuação dos microrganismos provenientes da inoculação poderia, ou não, interferir na atuação das enzimas.



**Figura 5:** Comparação entre a eficiência de remoções de DQO (a), Cor (b), CFT (c), CL (d), AE (e) e Turbidez (f) em sistema com: Aeração (O<sub>2</sub>); Inoculação e aeração (Lodo+O<sub>2</sub>); Inoculação, aplicação de 1,95 U mL<sup>-1</sup> de Lacase e aeração (Lodo+enzima+O<sub>2</sub>) e Aplicação de 1,95 U mL<sup>-1</sup> de Lacase e aeração (Enzima+O<sub>2</sub>).

**Nota:** DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Como pode ser visto na Figura 5, os melhores valores de remoção para DQO, Cor, CL e Área espectral, foram obtidos no sistema com inoculação e aeração, e no sistema com inoculação, aeração e adição de Lacase ( $1,95 \text{ U mL}^{-1}$ ). No entanto, para esses parâmetros a diferença entre a eficiência de remoção destes dois experimentos não foi estatisticamente significativa.

Na Figura 5 b observa-se que, na ausência de inoculação, a Lacase comercial contribuiu para aumento de até 12 % no parâmetro de Cor. Já na Figura 5 c, observa-se que a maior geração de Compostos Fenólicos Totais (CFTs), ocorreu no sistema apenas com a aeração, chegando a um aumento de 56 %. Trata-se de um comportamento típico de sistemas biológicos bem aerados, resultante da remoção biológica de grupos metoxi e da auto oxidação de Compostos Fenólicos de alta MM gerando compostos de menor MM, que ainda continham o grupamento OH em ligações aromáticas (SIERRA-ALVAREZ et al., 1990, VILLELA, 2006; CHAMORRO et al., 2009).

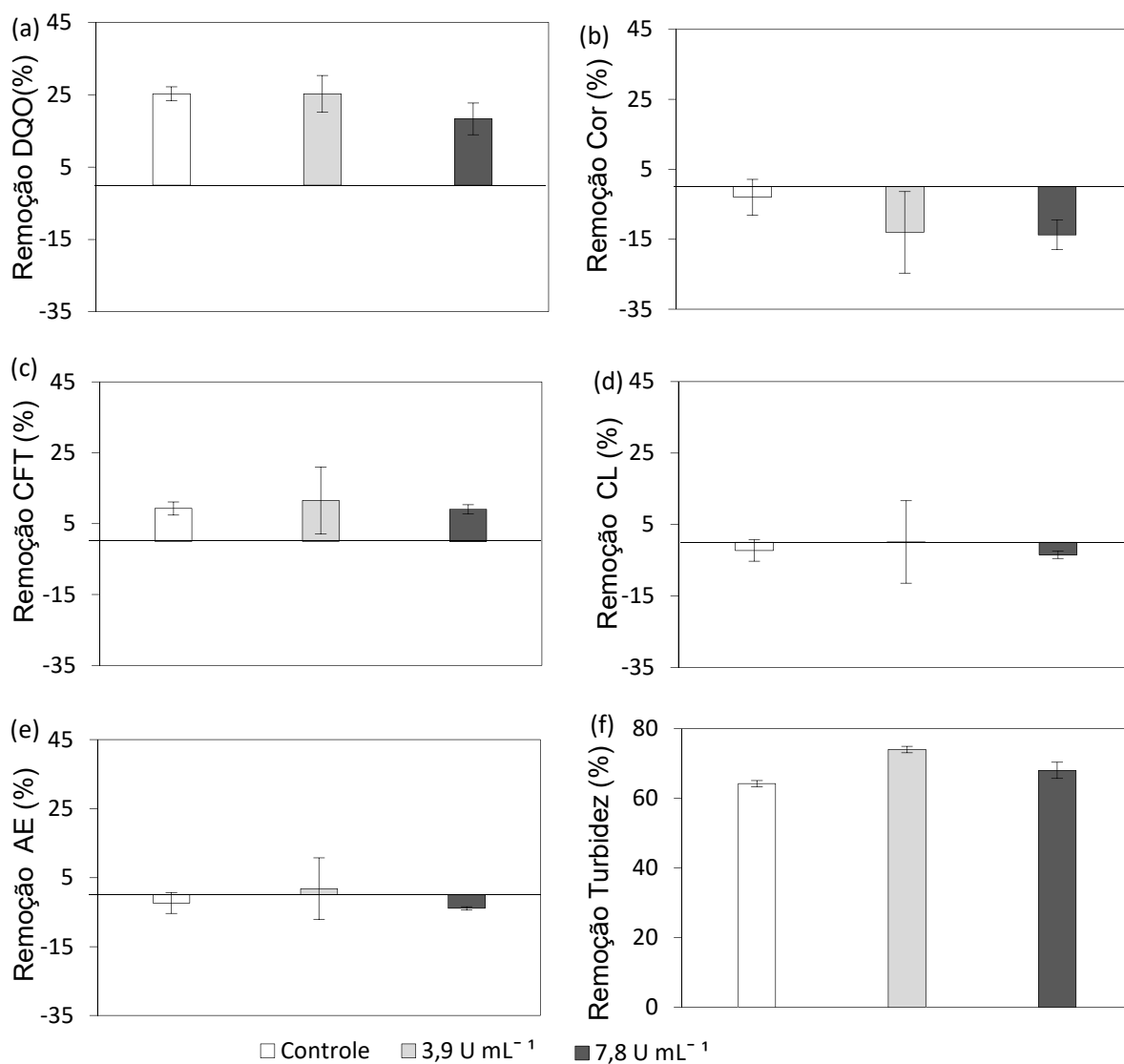
Ainda na Figura 5 c, observou-se que o sistema com inoculação de lodo e aeração mostrou o resultado de maior eficiência na remoção dos CFTs ( $15 \pm 4$  %), enquanto que o sistema apenas com aplicação de Lacase e aeração mostrou aumento de  $39 \pm 1$  % na quantidade deste parâmetro, e o sistema com inoculação, adição de enzima e aeração teve remoção de  $1 \pm 4$  %.

Pode-se observar também na Figura 5 f, que a maior remoção de Turbidez aconteceu no sistema com aeração e no sistema com aeração e aplicação de enzima, apresentando eficiência de remoção  $63 \pm 19$  e  $90 \pm 1$  %, respectivamente. Nos experimentos com inoculação de lodo, a remoção de Turbidez foi menor que 20 %, possivelmente pelo fato do sistema ser em batelada e o lodo ficar em atividade por um curto período de tempo (TDH de 3 dias), sendo necessário mais tempo para formação de flocos com boa sedimentabilidade (VON SPERLING, 2005).



## 5.2.2 Teste II - Efeito da quantidade de Lacase

Na Figura 6 são apresentados os resultados do segundo teste, realizado para verificar a eficiência do sistema de tratamento com aplicação de  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  (100 ppm) e  $7,8 \text{ U mL}^{-1}$  (200 ppm) de Lacase comercial NOVOZYM 51003<sup>®</sup>.



**Figura 6:** Comparação entre a eficiência de remoções de DQO (a), Cor (b), CFT (c), CL (d), AE (e) e Turbidez (f) em sistemas com:  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  (100 ppm) de Lacase comercial,  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  (200 ppm) de Lacase comercial e controle (sem aplicação de Lacase).

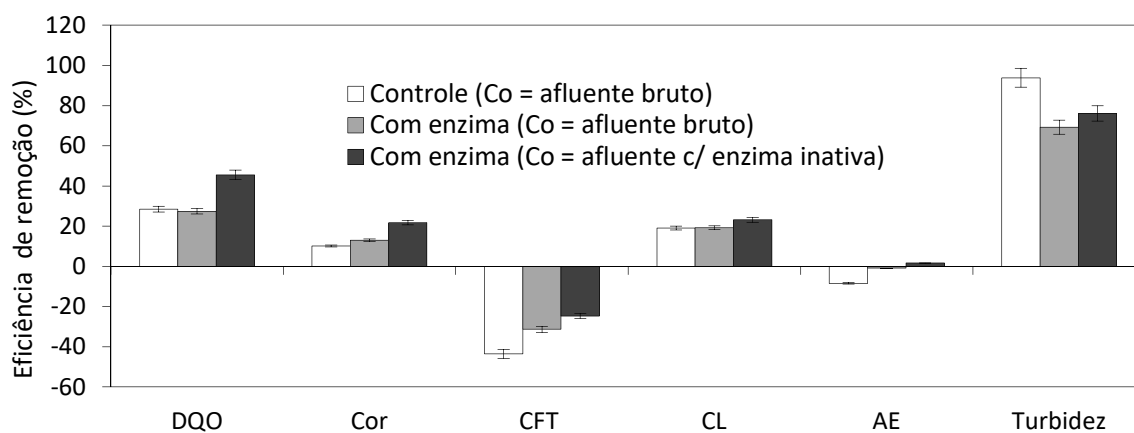
**Nota:** DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Como pode ser visto na Figura 6 o tratamento com aplicação de  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial mostrou valores médios de remoção dos parâmetros de DQO, Cor, CFT, CL, Área espectral e Turbidez superiores ao tratamento com aplicação de  $7,8 \text{ U mL}^{-1}$ . Com exceção dos parâmetros de DQO e Cor, os valores obtidos com  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial, superaram os valores de remoção do controle.

Pela Figura 6 também pode se observar que os maiores desvios foram obtidos no experimento com aplicação de  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase, na remoção dos parâmetros de Cor, CFTs, CL e Área Espectral, mostrando que essa quantidade de enzima, pode propiciar maior instabilidade das condições de degradação dos compostos específicos, de acordo com Villela (2006), isso ocorre por conta da despolimerização e repolimerização que podem ocorrer simultaneamente. Considerando os desvios, os valores obtidos dos testes controle e com  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase, não apresentam diferença estatisticamente significativa.

### 5.2.3 Teste III - Efeito da Lacase comercial no afluente

Na Figura 7 são mostrados os resultados do teste realizado para verificar a contribuição da Lacase inativa, no aumento dos parâmetros analisados (DQO, Cor, CFT, CL, Área Espectral e Turbidez) e a possível implicação na eficiência de remoção calculada.



**Figura 7:** Eficiência do sistema controle, considerando  $C_0 = C_{0\text{-Afluente bruto}}$ , comparado à eficiência do sistema com Lacase ativa, considerando  $C_0 = C_{0\text{-Afluente bruto}}$ , e à Eficiência do sistema com Lacase ativa, considerando  $C_0 = C_{0\text{-Afluente c/ enzima inativa}}$ .

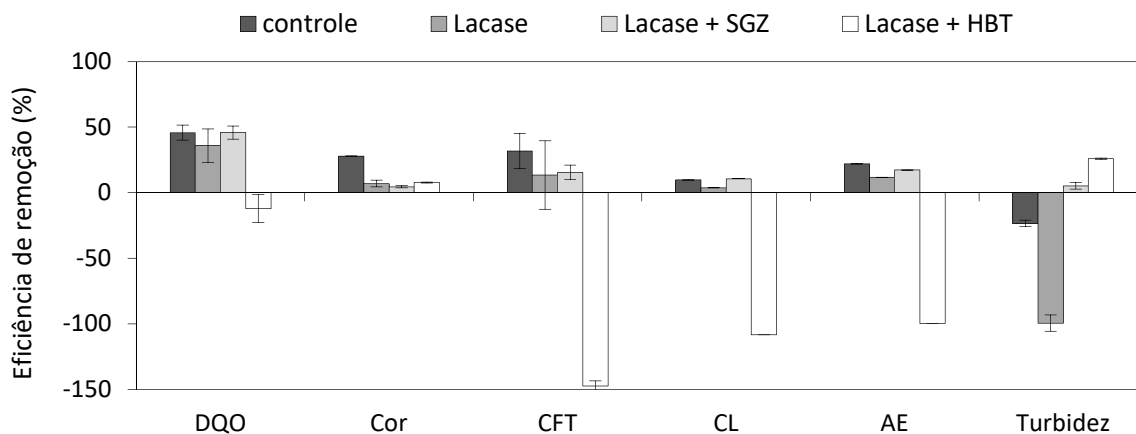
**Nota:** Concentração de  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase. DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Como mostra a Figura 7, para todos os parâmetros, os valores de eficiência de remoção foram maiores quando se considerou a presença das enzimas inativas na entrada do tratamento, ou seja, sua contribuição no afluente, mostrando que a Lacase comercial, altera as características do afluente, aumentando os valores de remoção dos parâmetros analisados, com exceção apenas da Turbidez.

Apesar da Lacase comercial absorver luz na mesma região espectral dos compostos analisados, por ser um composto biológico (proteína) pode ser aos poucos degradada por proteases secretadas pelos microrganismos que formam o lodo na LAF, não sendo possível detectá-la ao final do tratamento (SEIXAS, 2006).

#### 5.2.4 Teste IV - Efeito dos mediadores

Na Figura 8 pode se observar os resultados do Teste IV, em que se verificou o desempenho do sistema com aplicação de Lacase e 1-Hidroxibenzotriazol (HBT) e do sistema com aplicação de Lacase e Siringaldazina (SGZ), ambos comparado ao sistema aplicação somente de Lacase e ao sistema controle, sem enzimas. Lembrando que neste teste todos os sistemas foram montados com inoculação de lodo, adição de nutrientes e aeração.



**Figura 8:** Eficiência do sistema sem enzimas (controle) comparado ao sistema com Lacase e ao sistema Lacase/SGZ e Lacase/HBT.

**Nota:** Concentrações usadas: Lacase:  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  (50 ppm); SGZ: 1 mM e HBT: 1 mM. DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Como pode ser visto na Figura 8, o experimento com adição de Lacase e Siringaldazina (SGZ), apesar de se mostrar mais eficiente que o tratamento com Lacase na remoção de três parâmetros avaliados (DQO, CL e AE), apresentou níveis de remoção de Cor, CFTs e AE menores do que os obtidos no experimento controle.

Já o mediador HBT, na quantidade em que foi usado, mostrou resultados de eficiência muito abaixo do esperado, aumentando a quantidade de Compostos Fenólicos Totais (CFTs), Compostos Lignínicos (CL) e Área Espectral (AE) em 148 %, 108 % e 100 %, respectivamente.

Murugesan et al. (2007), alcançaram redução de até 84 % do corante Reactive Black-5 (RB-5) com concentração inicial de  $62,5 \text{ mg L}^{-1}$  e aplicação de  $0,0025 \text{ U mL}^{-1}$  de enzima Lacase e 1,5 mM de HBT em TDH de 36 horas. Li et al. (2014) também obtiveram valores de remoção maiores que 80 % para os corantes Azul de anilina e Índigo carmim, fazendo uso de  $20.000 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase e 1,25 mM de HBT em pH 4,5.

Entretanto, apesar de muito discutido na literatura, a maior parte dos estudos com mediadores apresentam experimentos realizados fazendo uso de efluentes sintéticos, além de trabalhar em condições ótimas de pH, temperatura e iluminação, diferentemente das condições do experimento do presente estudo, em que trabalhou-se com uma matrix de efluente real, sem uso de tampão, com variação de luminosidade natural, temperatura ambiente e pH 7,0.

Para melhor entendimento do efeito do sistema mediador-Lacase aplicado na remediação de efluente *kraft*, em condições mais próximas da realidade da indústria, seria necessário realizar um experimento mais completo, testando diversas proporções de Lacase comercial, mediador e efluente. Vale lembrar também que o uso de mediadores sintéticos (HBT) na biorremediação de efluentes ainda apresenta muitas ressalvas, principalmente no que diz respeito à toxicidade dos subprodutos da degradação, além do alto custo envolvido em sua implementação (CAÑAS e CAMARERO, 2010).

#### 5.2.5 Teste V - Experimento fatorial

Na Tabela 6 pode-se observar as respostas obtidas para cada uma das 9 condições experimentais do planejamento fatorial. O resultado mostrado é a média das triplicatas do experimento e das análises de remoções, acompanhada do desvio padrão associado.

**Tabela 6:** Eficiência do tratamento biológico na redução dos parâmetros analisados.

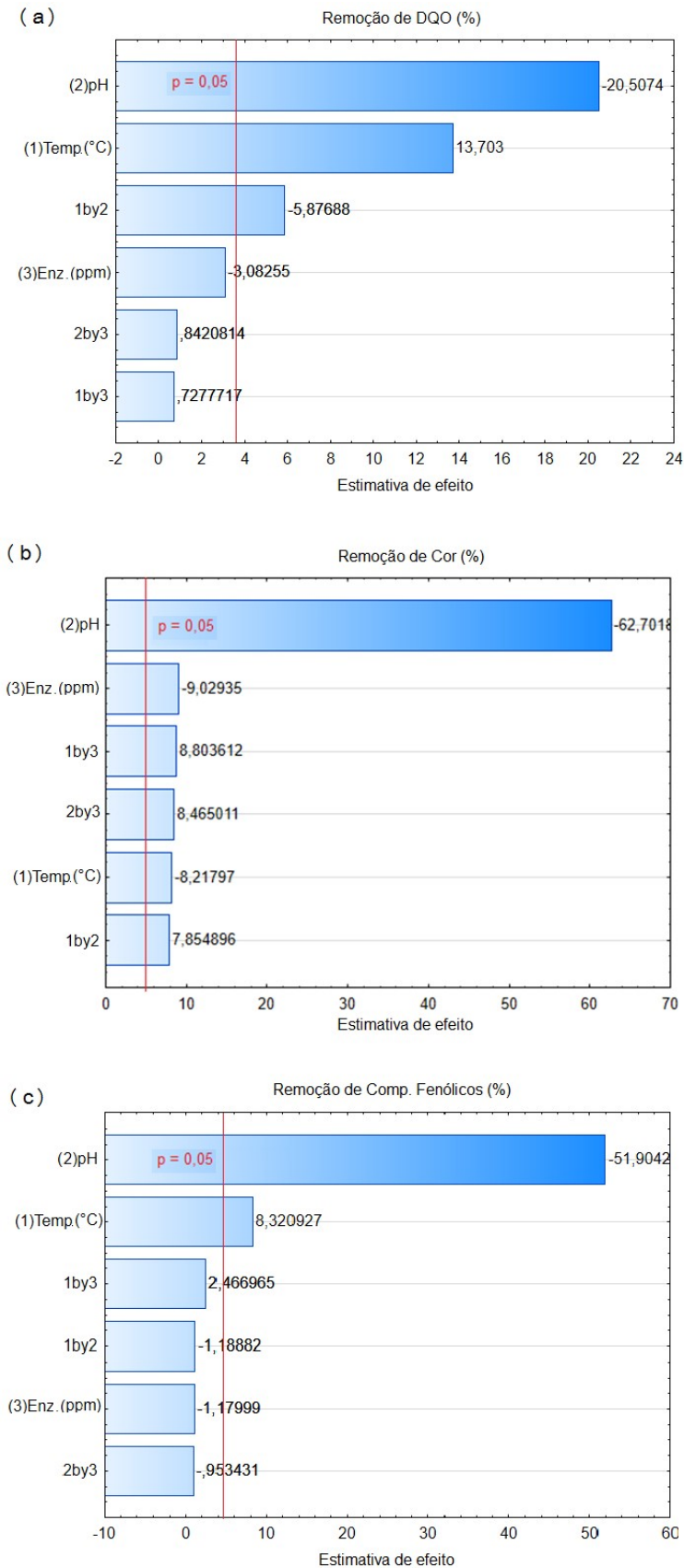
Experimento	Condições experimentais			DQO (%)	Cor (%)	CFT (%)	Comp. Lignínicos (%)	Área espectral (%)	Turbidez (%)
	Temperatura	pH	Enzima						
1	-	+	+	31,54 ± 5,25	-6,21 ± 2,74	7,93±5,27	15,56±1,62	16,97±0,13	87,28±0,12
2	-	+	-	39,22 ± 3,13	8,92±4,07	20,23±3,84	19,57±0,67	22,45±0,11	76,60±0,43
3	-	-	+	49,46 ± 5,15	59,48±0,78	65,94±5,17	70,36±0,10	71,46±0,02	-111,08±0,30
4	-	-	-	49,4 ± 8,66	80,02±0,34	60,93±9,58	55,88±0,21	58,72±0,05	-123,25±1,75
5	+	+	+	44,66 ± 0,60	7,45±7,28	24,89±2,33	21,58±0,12	25,70±0,16	97,22±0,12
6	+	+	-	41,46 ± 0,18	-6,55±0,52	16,85±1,03	14,99±0,19	17,73±0,13	96,16±0,16
7	+	-	+	65,00 ± 0,32	46,28±1,03	70,09±1,07	56,40±0,07	72,33±0,41	64,57±0,17
8	+	-	-	72,91 ± 0,80	60,72±0,68	75,56±1,02	67,42±0,35	60,65±0,32	87,45±1,10
9	0	0	0	38,82 ± 1,65	-2,03±3,92	18,20±4,38	19,18±0,84	17,57±1,43	79,97±5,06

**Nota:** n = 3. Condições de Temperatura: (-) = 15 °C, (0) = 25 °C e (+) = 37 °C; pH: (-) = 4, (0) = 7 e (+) = 8; Enzima: (-) = 0, (0) = 1,96 U mL<sup>-1</sup> e (+) = 3,9 U mL<sup>-1</sup>.

Como pode ser visto na Tabela 6, o maior valor de remoção da DQO e Compostos Fenólicos Totais (CFTs), foi obtido no experimento 8, em temperatura de 37 °C, pH 4 e sem adição de Lacase comercial. Os Compostos Lignínicos (CL) e a Área espectral também tiveram remoção significativa nessa condição, entretanto a melhor remoção dos CL se deu no experimento 3, com temperatura de 15 °C, pH 4 e aplicação de 100 ppm de Lacase.

A Cor foi o único parâmetro que teve melhor remoção durante o experimento 4 (temperatura de 15 °C, pH 4 e sem enzima). Em contrapartida, nesta mesma condição houve um aumento de mais de 100 % na Turbidez do efluente. Para melhor compreensão dos resultados realizou-se uma análise estatística para avaliar a correlação das variáveis e indicar um modelo de projeção para condições intermediárias às estudadas.

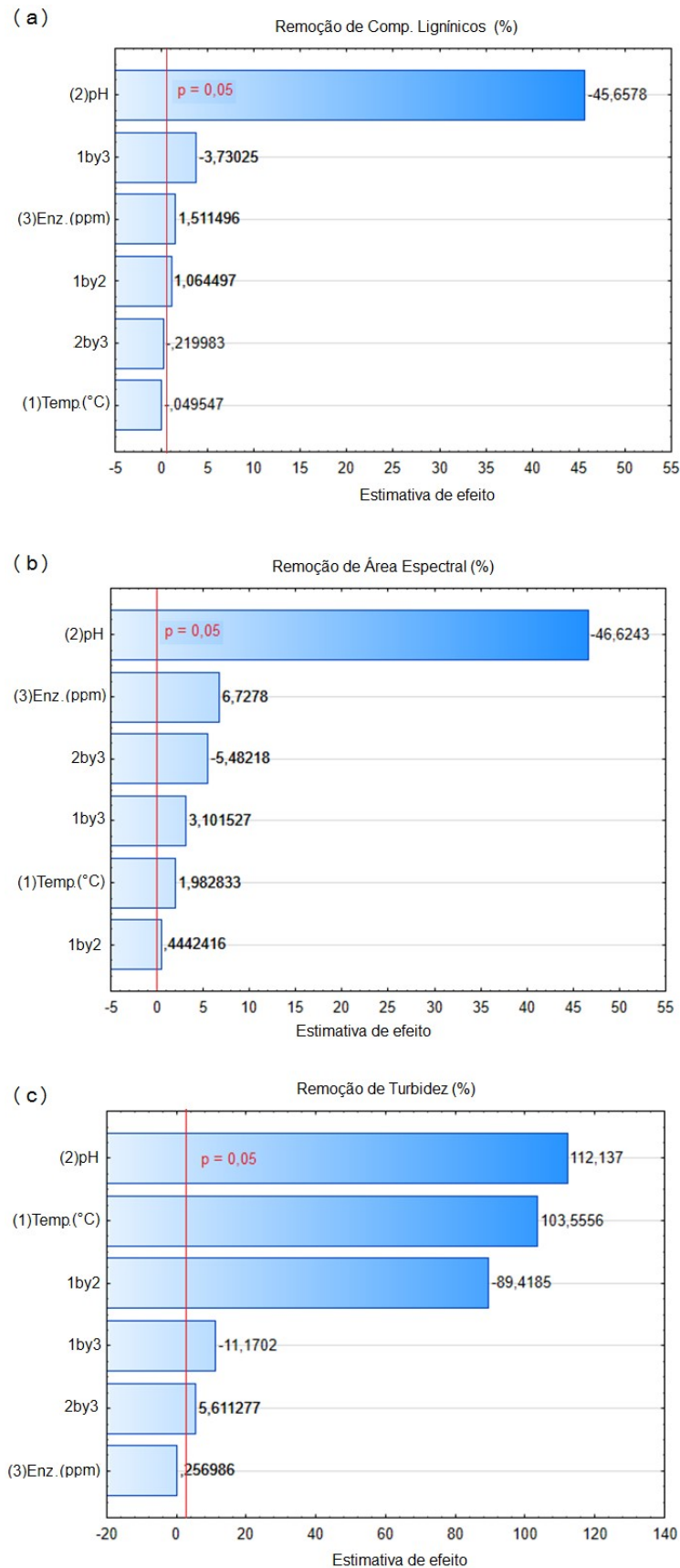
Após análise estatística dos dados, obteve-se os gráficos de Pareto (Figura 9 e 10) onde se vê os efeitos das variáveis e de suas inter-relações, na eficiência de remoção dos parâmetros analisados. Os valores obtidos do teste ANOVA para o efeito das variáveis pH, Temperatura e atividade de Lacase e suas correlações, na remoção dos parâmetros analisados, são mostrados no Apêndice B.



**Figura 9:** Gráfico de Pareto com efeitos das variáveis e de suas inter-relações, na eficiência de redução dos parâmetros de DQO (a), remoção de Cor (b) e remoção de compostos fenólicos (c).

**Nota:** Valores que ultrapassam a linha ( $p = 0,05$ ) são estatisticamente significativos.





**Figura 10:** Gráfico de Pareto com efeitos das variáveis e de suas inter-relações, na eficiência de remoção dos Compostos Lignínicos (a), remoção da Área espectral (b) e remoção da Turbidez (c).

**Nota:** Valores que ultrapassam a linha ( $p = 0,05$ ) são estatisticamente significativos.

Conforme ilustrado nas Figuras 9 e 10, para o nível de significância de 95% ( $p \leq 0,05$ ), nota-se que o pH é o fator que mais influencia, de forma isolada, na eficiência de remoção de todos os parâmetros analisados. Para o parâmetro de DQO, cor, compostos lignínicos, compostos fenólicos e área espectral, dentro da faixa de pH analisada (4 a 8) a eficiência de remoção diminui à medida que o valor de pH aumenta, chegando a um decréscimo de 21, 63, 52, 46, 47%, na remoção dos respectivos parâmetros. Já para a turbidez o comportamento é inverso, aumentando a remoção em até 112 %, em pH 8. De acordo com Metcalf e Eddy (2003), isso ocorre porque, possivelmente, o meio mais alcalino favorece a formação de hidróxidos, e os compostos hidrolisados, ao interagir com as partículas do meio, formam precipitados, caracterizando o mecanismo de varredura.

Quanto à temperatura, dentro da faixa analisada, observa-se influência significativa para quase todos os parâmetros analisados, com exceção dos compostos lignínicos, o que corrobora com Müller-Hagedorn et al. (2003), segundo os quais a degradação térmica da lignina só começa a ocorrer a partir de 100 °C. Para este parâmetro, a temperatura só apresenta efeito quando associada à presença de Lacase comercial, como o observado neste trabalho (Figura 10a).

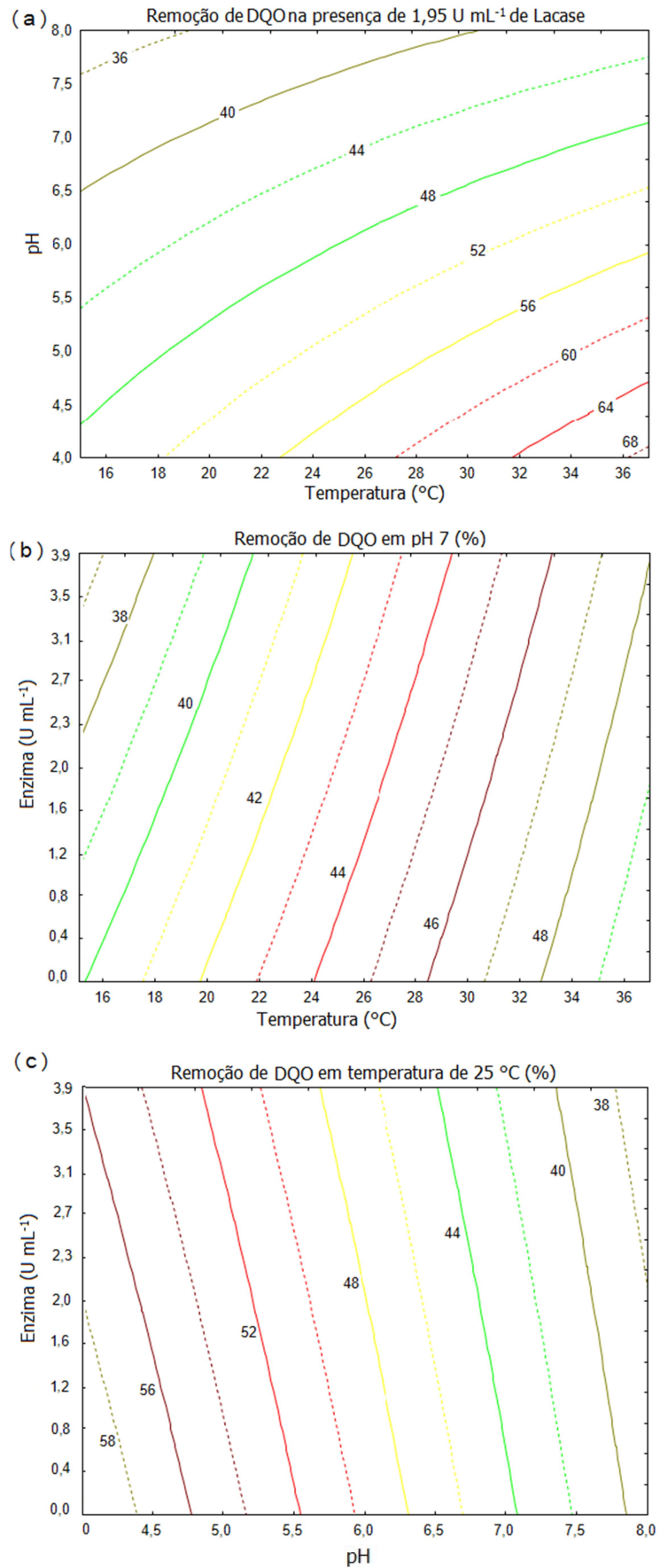
A temperatura ainda apresentou efeito na remoção do parâmetro de Turbidez, chegando a aumentar em 104 % a remoção deste parâmetro com o aumento da temperatura de 15 para 37 °C. Para os demais parâmetros, a temperatura causou influência discreta, aumentando a redução de DQO, compostos fenólicos e área espectral, na proporção de 14, 8, e 2 %, respectivamente. Para a cor, o efeito da temperatura foi negativo, gerando um decréscimo de 8 % na remoção, quando a temperatura aumenta de 15 para 37 °C.

A aplicação de Lacase NOVOZYM 51003<sup>®</sup> exerceu efeito na área espectral, proporcionando um aumento de 7 % na remoção deste parâmetro, superando o efeito da temperatura. A Lacase também influenciou na remoção dos compostos lignínicos, aumentando a remoção em 2 %. Já para a Cor, quando considerada isoladamente, o efeito do aumento da quantidade de enzima foi negativo, promovendo redução da remoção da cor em 9 %, entretanto o efeito do aumento da quantidade de enzima associado ao aumento da temperatura incrementou a remoção da cor em 9 %. Esses resultados mostram que a Lacase utilizada no experimento interfere positivamente na eficiência do sistema de tratamento, auxiliando na quebra das moléculas de lignina e conseqüentemente reduzindo a área espectral, ao mesmo tempo em que mantém os grupos fenólicos e a DQO do efluente.

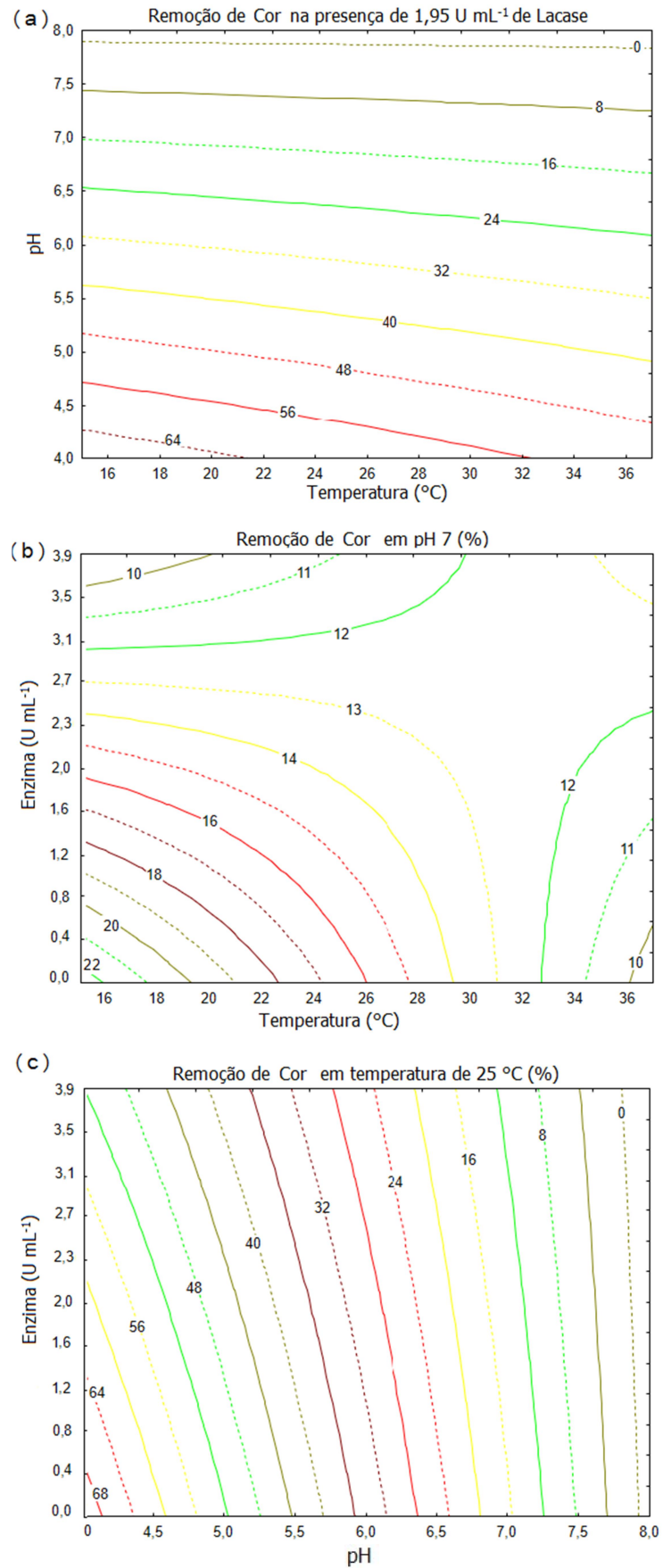
Na literatura existente, a Lacase é apresentada como um catalisador natural atuante na quebra dos grupos fenólicos, o que desestabiliza a molécula de lignina e favorece a sua

despolimerização, ou polimerização, a depender da sua função biológica: se degradação de lignina em fungos, ou se proteção em vegetais (HATAKKA, 1994; VILLELA, 2006; SKORONSKI et al., 2014). No entanto, a função específica e importância relativa dessas enzimas nos sistemas naturais de biotransformação da lignina, bem como o número de enzimas envolvidas nesses sistemas, são aspectos que ainda precisam ser estudados com maior profundidade.

As Figuras 11 e 12 mostram gráficos de contorno obtidos pelo modelo estatístico que melhor se ajustou ao conjunto de dados do planejamento experimental, para os parâmetros de DQO e Cor. Para cada parâmetro analisado, têm-se três perspectivas diferentes, trabalhando dois fatores de cada vez e fixando o terceiro no ponto médio. Além de evidenciar a magnitude dos efeitos observados nos gráficos de Pareto, os gráficos de contorno permitem observar os valores de remoção que podem ser obtidos variando dois fatores simultaneamente.



**Figura 11:** Gráfico de contorno da eficiência de remoção da DQO na presença de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de  $25 \text{ °C}$  (c).



**Figura 12:** Gráfico de contorno da eficiência de redução da Cor na presença de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de  $25 \text{ °C}$  (c).

Como mostra a Figura 11 a, os valores de redução da DQO aumentam à medida que a temperatura aumenta e o pH diminui. O melhor valor de remoção pode ser obtido com a aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase, em temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 4, atingindo aproximadamente 68 % de remoção. Apesar do efeito das enzimas não ser significativo, os modelos apresentados sugerem que a aplicação de enzima em quantidade superior a  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  proporciona menores remoções de DQO (Figura 11 b). De acordo com Villela (2006) isto se deve ao fato da enzima ser uma molécula orgânica que facilita oxidação do efluente, ao mesmo tempo que aumenta a DQO deste.

Quanto ao parâmetro de Cor, nota-se na Figura 12a que os valores de remoção aumentam à medida que a temperatura e pH diminuem. O ponto ótimo de remoção pode ser obtido em temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , ausência de enzima e pH 4 (Figura 12 c), atingindo aproximadamente 68 % de remoção (Exp. 8 da Tabela 6).

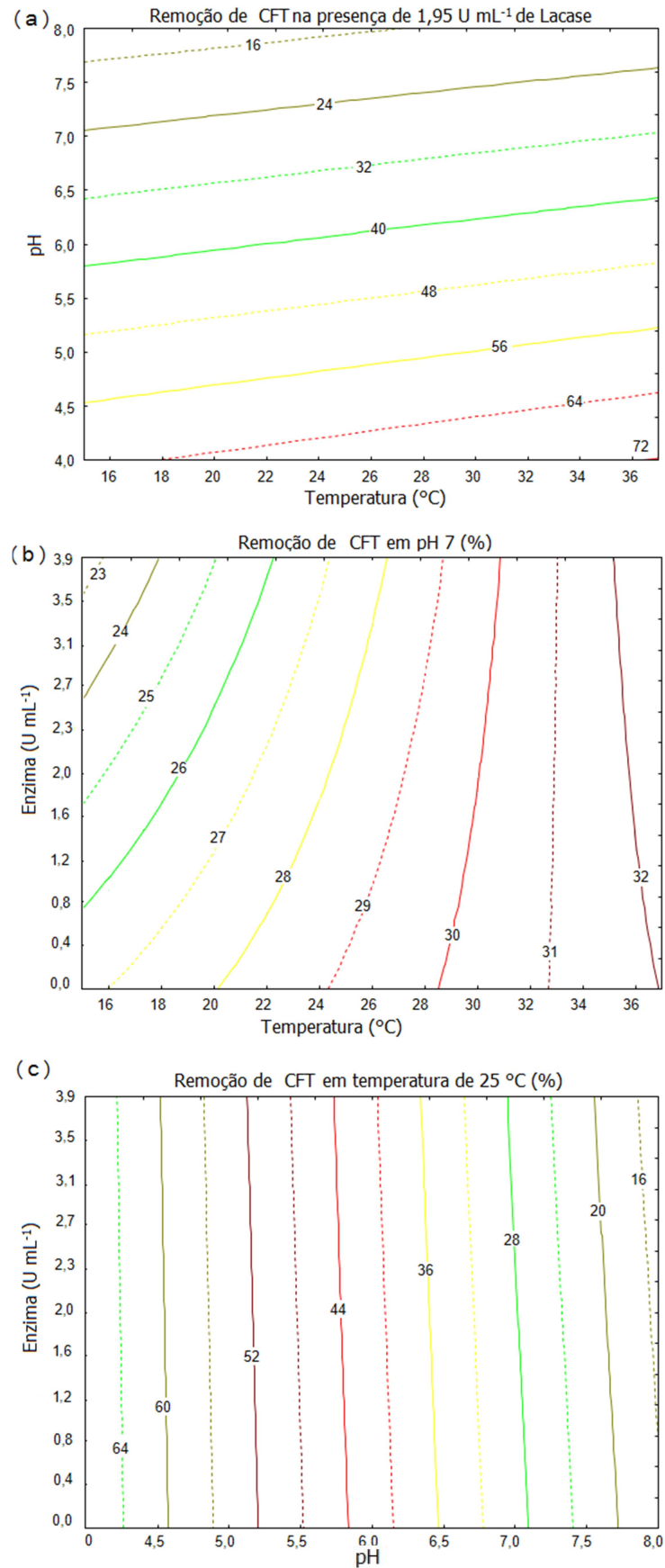
Grötzner (2014), ao estudar o tratamento físico químico de efluente de polpação quimiotermomecânica (CTMP) de indústria papeleira, também constatou que este efluente mostra alteração na Cor com a redução do pH, chegando a uma remoção de mais de 30 % apenas corrigindo o pH de 6 para 4.

Isto porque, de acordo com Gard, Mishra e Chand (2010), em condições mais ácidas, os íons  $\text{OH}^-$  deixam de dominar a reação da mistura, dessa forma a oxidação dos poluentes é facilitada devido à presença de radicais livres ativos. Em condições de pH mais altos, os íons  $\text{OH}^-$  atuam fazendo uma espécie de varredura dos radicais livres e inibindo algumas reações.

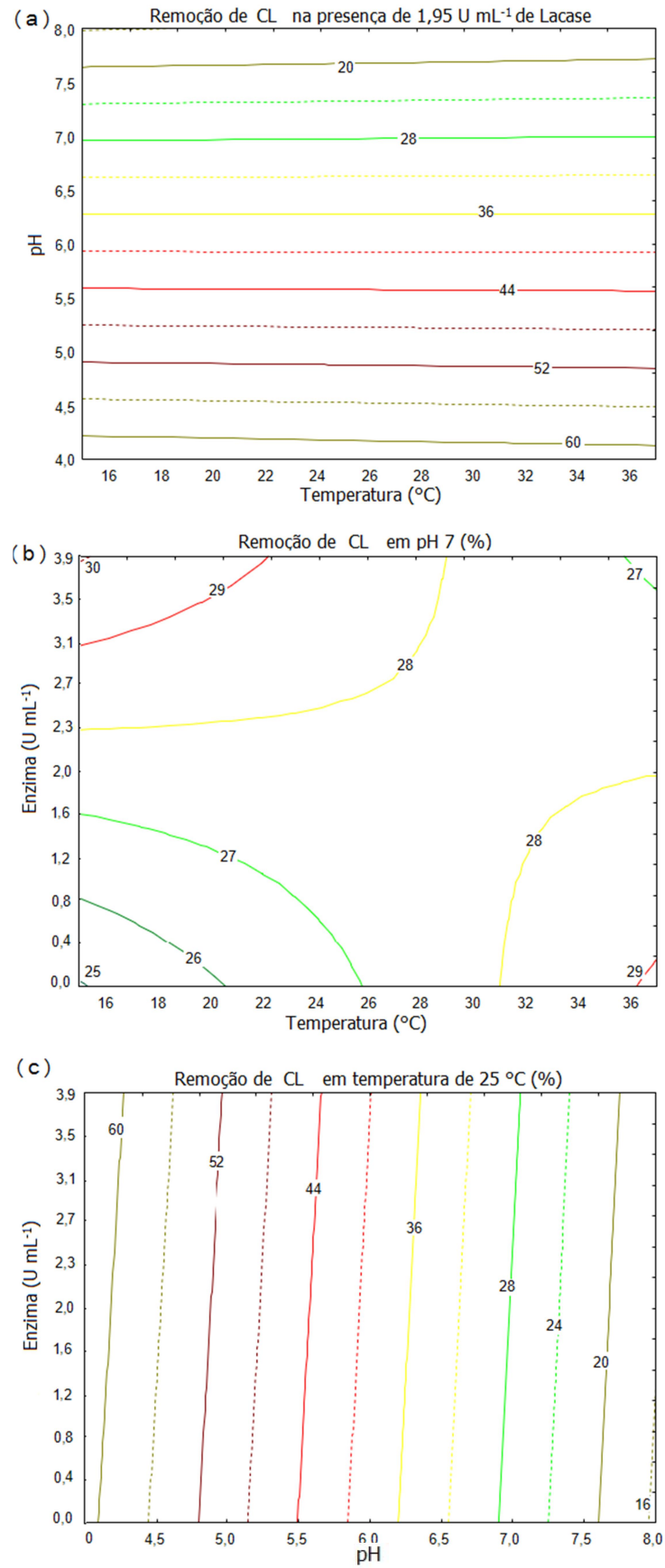
Ainda segundo o modelo, o melhor valor de remoção de Cor que pode ser obtido com uso da enzima é aproximadamente 62 %, com aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase, pH 4 e temperatura menor que  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 12 a), confirmando estudos de outros autores que mostram pH entre 4 e 5 como ideal para a atividade da Lacase na remoção desse parâmetro (GARCIA, 2006; PACHECO e SOARES, 2014).

No entanto, a eficiência de remoção obtida em temperatura de  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  é bastante diferente dos dados apresentados em alguns estudos, onde se constatou que a atividade de Lacases de Fungos da Podridão Branca é reduzida em temperaturas de até  $25^\circ\text{C}$ , ficando inativa em temperatura de  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  (VISWANATH et al., 2014; HOSSAIN e ISMAIL, 2015). Isso se deve ao fato da Lacase comercial utilizada neste trabalho ser uma isoforma atípica, com atividade ótima em temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Catálogo do produto no Anexo 1).

As Figuras 13 e 14 mostram gráficos de contorno obtidos pelo modelo estatístico que melhor se ajustou ao conjunto de dados do planejamento experimental para os parâmetros de Compostos Fenólicos Totais (CFT) e Compostos Lignínicos (CL).



**Figura 13:** Gráfico de contorno da eficiência de remoção dos Compostos Fenólicos Totais na presença de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  (c).



**Figura 14:** Gráfico de contorno da eficiência de redução dos Compostos Lignínicos na presença de 1,95 U mL<sup>-1</sup> de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de 25 °C (c).



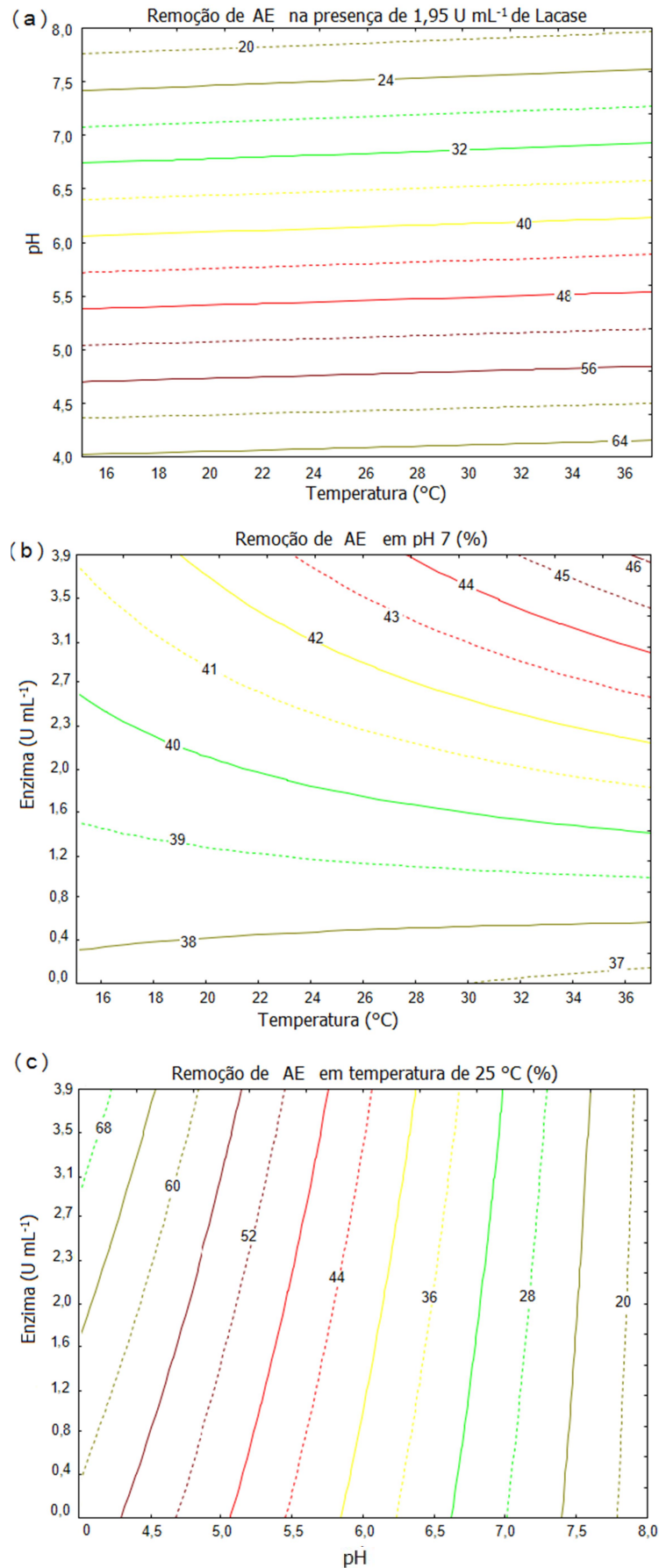
De acordo com os modelos mostrados na Figura 13, os valores de remoção dos Compostos Fenólicos Totais (CFTs) aumentam à medida que temperatura aumenta e o pH diminui, além de sugerirem que a aplicação de Lacase em quantidade superior a  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  proporciona menores remoções dos CFTs. O melhor valor obtido pelo modelo foi com a aplicação de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase, em temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 4 (Figura 13 a), atingindo 72 % de redução.

Na Figura 14, nota-se aumento na remoção dos Compostos Lignínicos (CL) à medida que o pH diminui e a quantidade de enzima aumenta. O ponto ótimo de remoção pode ser obtido a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , com aplicação de  $3,9 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase e pH 4 (Figura 14 c), atingindo mais de 60 % de remoção, sendo esse o parâmetro em que melhor se verifica a ação da enzima Lacase empregada nesse trabalho. Apesar da temperatura sozinha não apresentar efeito significativo na remoção dos CL, segundo o modelo apresentado, em temperaturas maiores que  $36 \text{ }^\circ\text{C}$ , o aumento da concentração de Lacase comercial diminui a remoção deste parâmetro mostrando um efeito negativo da associação desses dois fatores (Figura 10 a e Figura 14 b).

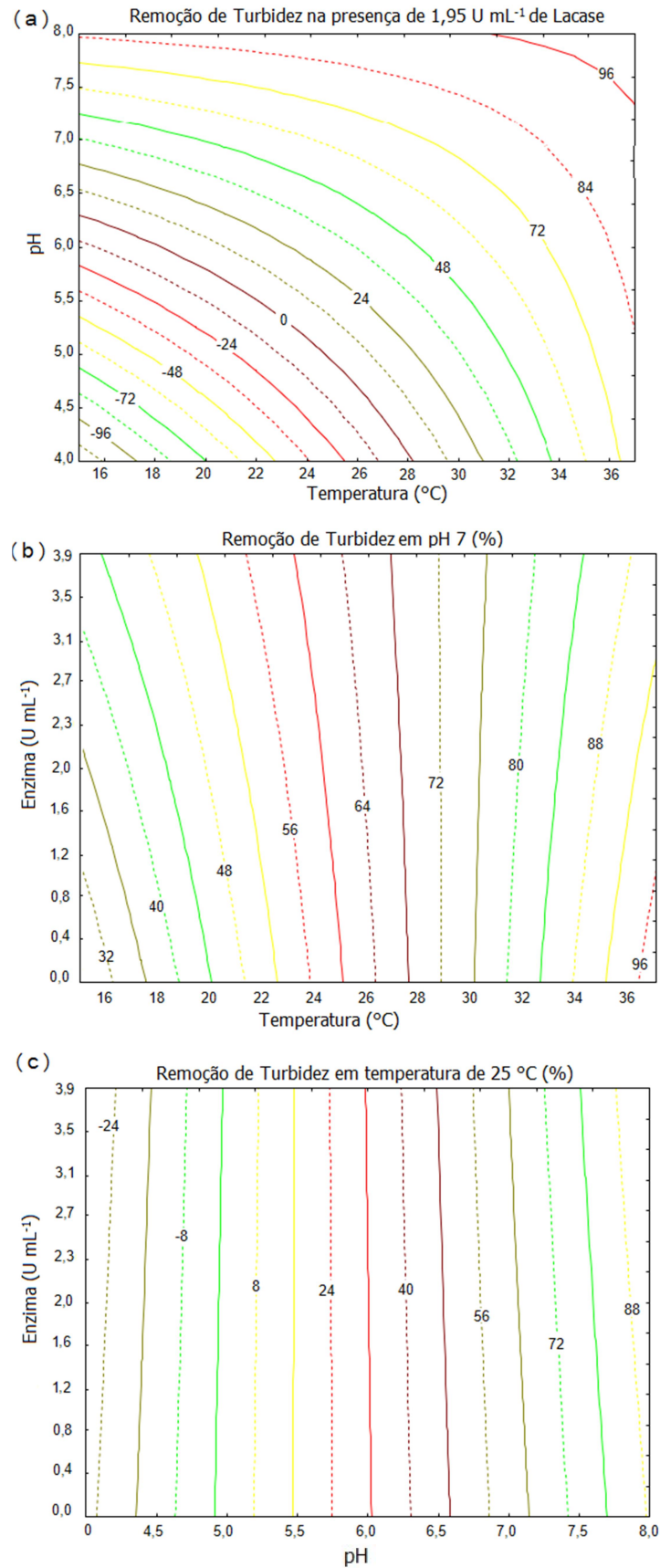
Isso mostra que, possivelmente, a temperatura interfere na reação intermediada pelas Lacases, aumentando o índice de repolimerização dos compostos após a fragmentação. De acordo com Hatakka (1994), a Lacase pode atuar tanto despolimerizando quanto polimerizando a lignina. Estudos conduzidos por esse autor mostram que a primeira etapa de degradação da lignina catalisada por enzimas é uma reação oxidativa com perda de 1 elétron de um grupo fenólico de lignina para produzir fenoxirradicais, os quais podem reagir através de mecanismos não enzimáticos.

Paralelamente, devido à atividade polimerizante da enzima, os produtos de baixa Massa Molar (MM) podem formar compostos maiores. Essas ações contrastantes sugerem que a eficiência da biodegradação da lignina por Lacases envolve condições de pH e temperatura do meio, além da presença de compostos não enzimáticos, que interagem para estabelecer um equilíbrio entre polimerização e despolimerização enzimática da lignina (VILLELA, 2006).

As Figuras 15 e 16 mostram gráficos de contorno obtidos pelo modelo estatístico que melhor se ajustou ao conjunto de dados do planejamento experimental, para os parâmetros de Área Espectral (AE) e Turbidez..



**Figura 15:** Gráfico de contorno da eficiência de redução da Área espectral na presença de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de  $25 \text{ °C}$  (c).



**Figura 16:** Gráfico de contorno da eficiência de redução da Turbidez na presença de  $1,95 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase (a), em pH 7 (b) e temperatura de  $25 \text{ °C}$  (c).

Na Figura 15, pode-se observar que a remoção da Área Espectral (AE) também aumenta à medida que o pH é reduzido e a quantidade de enzima e temperatura são aumentadas. O melhor valor de remoção obtido pelo modelo foi com a aplicação de 3,9 U mL<sup>-1</sup> de Lacase, a 25 °C e pH 4 (Figura 15 c), atingindo valores maiores que 68 %. Este efeito na AE se mostra como resposta da redução dos Compostos Lignínicos observados nestas mesmas condições de pH, temperatura e quantidade de enzima.

Além da influência do pH, a Área Espectral (AE) também sofre influência significativa da inter-relação dos fatores de quantidade de enzima e temperatura (Figura 10 b). Observa-se que o aumento da temperatura intensifica o efeito positivo da quantidade de enzima aplicada, na remoção da área espectral. Na temperatura máxima estudada, a redução da AE ocorre possivelmente por conta da biotransformação dos compostos fenólicos, já que se obteve uma média de remoção de 72% dos CFT nas medições realizadas em pH 4, 37 °C e adição de 1,95 U mL<sup>-1</sup> de Lacase (Figura 13 a).

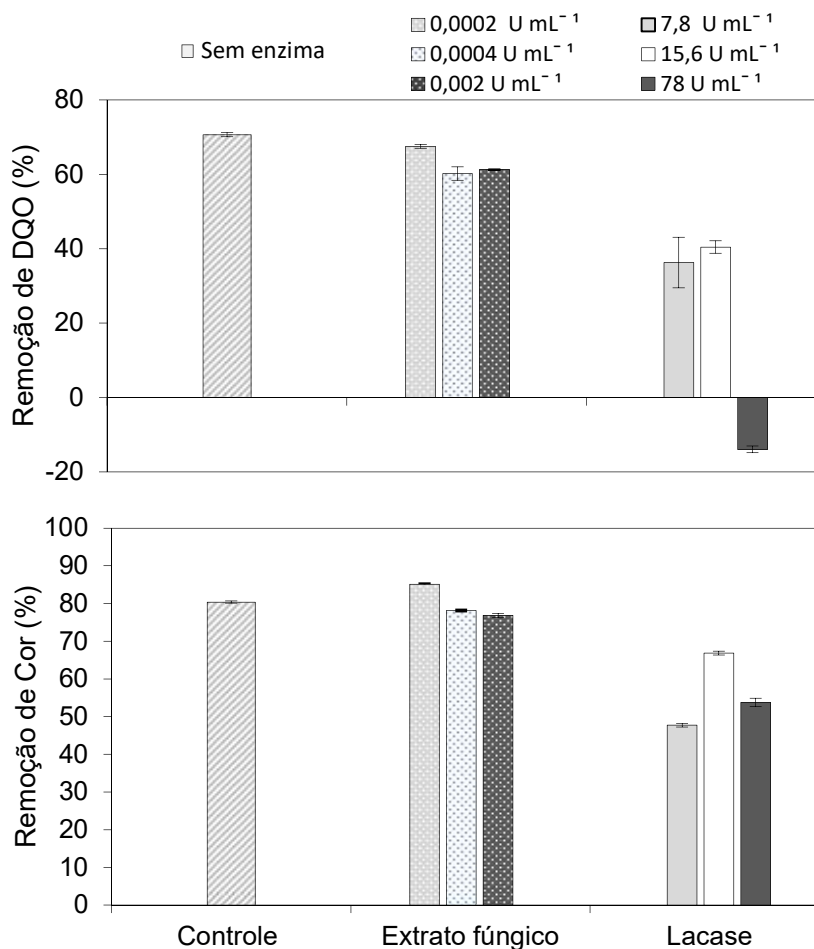
Quanto ao parâmetro de Turbidez (Figura 16), os modelos mostram que os valores de remoção aumentam à medida que a quantidade de enzima, pH e temperatura aumentam. O ponto ótimo de remoção pode ser obtido em temperatura de 37 °C, com aplicação de 1,95 U mL<sup>-1</sup> de Lacase e pH 8 (Figura 16 a), atingindo mais de 96 % de remoção por meio do mecanismo de varredura (METCALF e EDDY, 2003). Já em temperatura de 15 °C, pH 4 e com aplicação de 3,9 U mL<sup>-1</sup> de Lacase, houve um aumento de 108 % da Turbidez do efluente, por conta da formação de uma suspensão coloidal visível no meio líquido.

De uma forma geral, considerando o resultado das 9 condições estudadas no experimento fatorial, pode-se dizer que a condição do Experimento 8, com Temperatura de 37 °C, pH 4 e sem enzima (Tabela 7) apresentou os melhores resultados de remoção dos parâmetros analisados: remoção de aproximadamente 73 % da DQO, 61 % da Cor, 75 % dos CFT, 67 % dos CL, 61 % da AE e 87 % da Turbidez.

No entanto, o Experimento 7, com Temperatura de 37 °C, pH 4 e fazendo uso de 3,9 U mL<sup>-1</sup> de Lacase comercial, apesar de apresentar remoções um pouco menores para quase todos os parâmetros analisados (65 % da DQO, 46 % da Cor, 70 % dos CFT, 56 % dos CL e 64 % da Turbidez) foi o experimento com maior remoção da Área Espectral (72 %), indicando que o uso da Lacase comercial, nessas condições, potencializou a degradação destas estruturas cromóforas.

### 5.2.6 Teste VI - Comparação entre Lacase comercial e Extrato Enzimático de *Pleurotus ostreatus*.

Na Figura 17 tem-se os resultados do Teste VI realizado para comparar os efeitos da Lacase comercial (NOVOZYM 51003<sup>®</sup>) com Extrato Enzimático de *Pleurotus ostreatus* (EEP), na redução da DQO e da Cor, trabalhando com três quantidades diferentes para ambos os tipos de enzima. Como no experimento fatorial os melhores resultados de remoção dos parâmetros foram obtidos em pH 4, Temperatura de 37 °C e 3,9 U mL<sup>-1</sup> de Lacase comercial (nível máximo de aplicação de enzimas indicado pelo fabricante), neste teste aplicou-se as condições ótimas de pH e Temperatura e utilizou-se de concentrações maiores de enzima. Outro fato importante foi que neste teste não foi realizada inoculação com lodo, nem adição de nutrientes, para que fosse possível verificar a eficiência do tratamento enzimático isoladamente.



**Figura 17:** Eficiência do tratamento com aplicação de Lacase comercial, comparada ao tratamento com aplicação de Extrato Enzimático de *Pleurotus ostreatus*, ambos em condições de pH 4 e temperatura de 37 °C.

**Nota:** DQO = Demanda Química de Oxigênio.

Como mostra a Figura 17, o experimento controle apresentou o melhor índice de remoção para DQO (71 %), mostrando que as condições de pH 4 e temperatura de 37 °C são suficientes para que haja oxidação da matéria orgânica que proporciona também oxidação dos compostos específicos, diminuindo significativamente a Cor (80 %), mesmo na ausência de inoculação.

Na Figura 17 observa-se também que a Lacase comercial, nas concentrações utilizadas, incrementou a DQO e a cor no efluente do tratamento já que o controle e o Extrato Enzimático de *Pleurotus ostreatus* apresentaram resultados de remoção melhores. Também se confirmou o observado nos Testes I e II (seção 5.2.1 e 5.2.2), onde na ausência de inoculação e em concentrações maiores que 3,9 U mL<sup>-1</sup> de Lacase, o produto NOVOZYM 51003 pode aumentar os valores dos parâmetros físico-químicos do efluente.

Quanto ao EEP, apesar de não apresentar valores de remoção da DQO melhores que o controle, o experimento com  $0,0002 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase de EEP apresentou 85,15 % de remoção da Cor, sendo uma remoção maior que a obtida no controle para este mesmo parâmetro (80,39 %). A pequena diferença foi considerada estatisticamente significativa pela análise das variâncias dos dois experimentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

Esses resultados podem ser justificados quando se considera que em um EET, mesmo sendo bastante diluído, é comum encontrar maior diversidade de enzimas hidrolíticas, oxidativas, redutoras, dentre outras; e ainda outros compostos secretados que interagem com as enzimas mediando reações, tornando-as mais estáveis perante as condições do substrato (LEISOLA e WALDNER, 1988).

Quando se faz uso de extratos enzimáticos trabalha-se com todo o conjunto de compostos que o fungo utiliza para degradar a lignina e seus derivados no meio ambiente. O problema de se trabalhar com extratos não purificados, é o fato de serem necessários grandes volumes para se conseguir bons resultados, já que costumam ser bastante diluídos, apresentando menores valores de atividade específica do que as enzimas purificadas.

### 5.3 EXPERIMENTO EM FLUXO CONTÍNUO

#### 5.3.1 Lagoas Aeradas Facultativas com Lacase NOVOZYM 51003<sup>®</sup>

Na Tabela 7 são apresentadas as condições do tratamento e a atividade enzimática do produto comercial NOVOZYM 51003<sup>®</sup> aplicado na Fase I e II.

**Tabela 7:** Condições utilizadas no ensaio em fluxo contínuo com Lacase NOVOZYM 51003<sup>®</sup>.

Fase	Aplicação de enzima ( $\text{U mL}^{-1}$ )*	Tempo do experimento (d)	COV ( $\text{kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ )	DBO <sub>5,20</sub> /DQO	TDH (d)
I	0,49	60	0,2	0,35	3,8
	-	41	0,2	0,38	2,9
II	1,95	13	0,6	0,45	0,9
	1,95	15	1,2	0,38	0,5
	1,95	7	1,2	0,19	0,7

**Nota:** \* Aplicação diária de enzima na Fase I e aplicação única em cada ocasião de choque de carga durante a Fase II.

Como apresentado na Tabela 7, na Fase I dos ensaios em fluxo contínuo foi estudada a eficiência de uma Lagoa Aerada Facultativa (LAF) com COV de  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , TDH de 3,8 d e aplicação diária de aproximadamente  $0,49 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase NOVOZYM 51003<sup>®</sup>, comparado a um sistema controle, nas mesmas condições mas sem adição de Lacase. Na Tabela 8 são mostrados os valores de DQO, Cor, CFT, CL, AE, pH e Turbidez, obtidos na solução aquosa com concentração de  $0,49 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial (NOVOZYM 51003<sup>®</sup>).

**Tabela 8:** Caracterização da Lacase no produto comercial NOVOZYM 51003<sup>®</sup>.

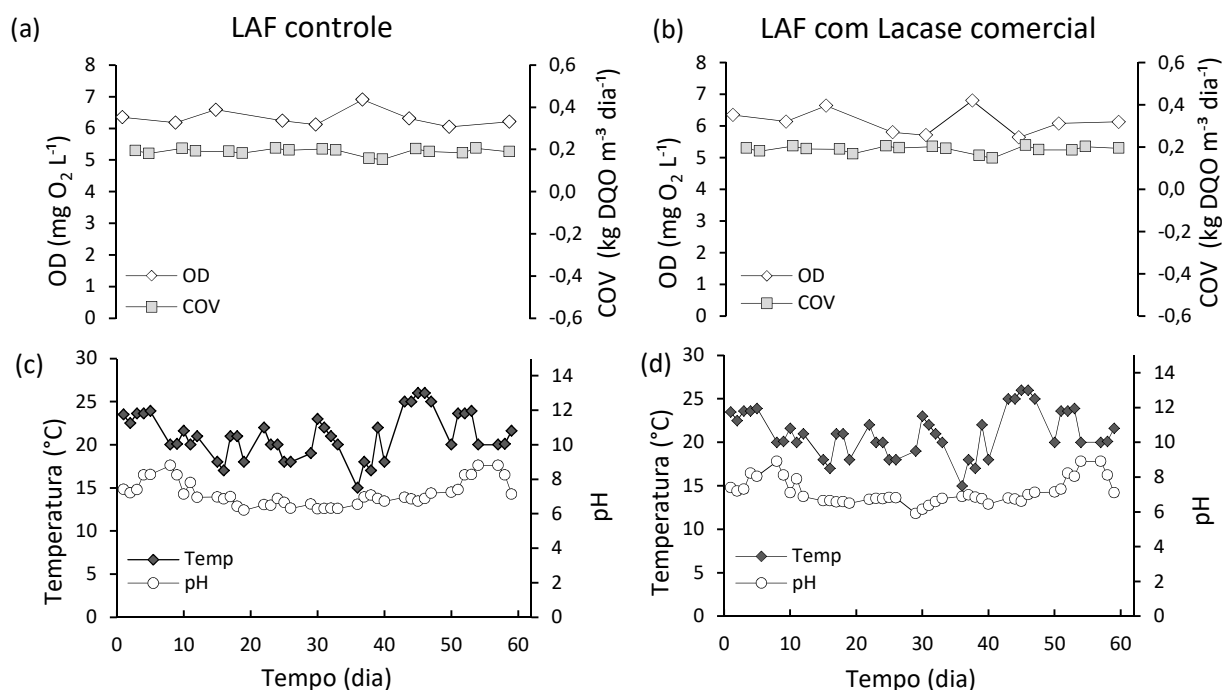
Parâmetros	Lacase comercial*
DQO ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )	$3,80 \pm 0,44$
Cor ( $\text{VIS}_{440}$ ) ( $1 \times 1 \text{ cm}$ )	$0,0005 \pm 0,0002$
CFT ( $\text{UV}_{215}$ ) ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$6,53 \pm 0,08$
CL ( $\text{UV}_{280}$ ) ( $1 \times 1 \text{ cm}$ )	$0,004 \pm 0,001$
Área espectral ( $\text{cm}^2$ )	$1,461 \pm 0,004$
pH	$7,12 \pm 0,04$
Turbidez (UNT)	$0,06 \pm 0,03$

**Nota:** \*Atividade de  $0,49 \text{ U mL}^{-1}$ .

Na Tabela 8 vê-se que, na atividade utilizada na Fase I da LAF ( $0,49 \text{ U mL}^{-1}$ ), a Lacase comercial isolada representa um pequeno aumento nos parâmetros que foram usados para o cálculo da eficiência das LAFs. Apesar disso, estes valores podem ser desconsiderados, pois são bastante inferiores às concentrações destes no efluente, como mostram os valores de caracterização apresentados na Tabela 5. Também por conta da enzima ser um composto de fácil degradação, não apresentando recalcitrância no meio biológico, como foi verificado no Teste III (Figura 7).

Vale ressaltar que, apesar dos valores de remoção de alguns dos parâmetros estudados serem melhores em condições de pH ácido, levou-se em conta que, na intenção de integrar os processos enzimáticos com tratamento biológico em LAFs, a acidificação é incompatível. Por conta disso, as lagoas operaram em fluxo contínuo, temperatura ambiente ( $18 - 26 \text{ }^\circ\text{C}$ ), e pH 7. Na Figura 18 são apresentados os parâmetros de controle das duas LAFs, controle e com Lacase comercial na Fase I.





**Figura 18:** Parâmetros de controle medidos nas Lagoa Aerada Facultativa controle (a e c) e na Lagoa Aerada Facultativa com aplicação de Lacase (b e d) na Fase I.

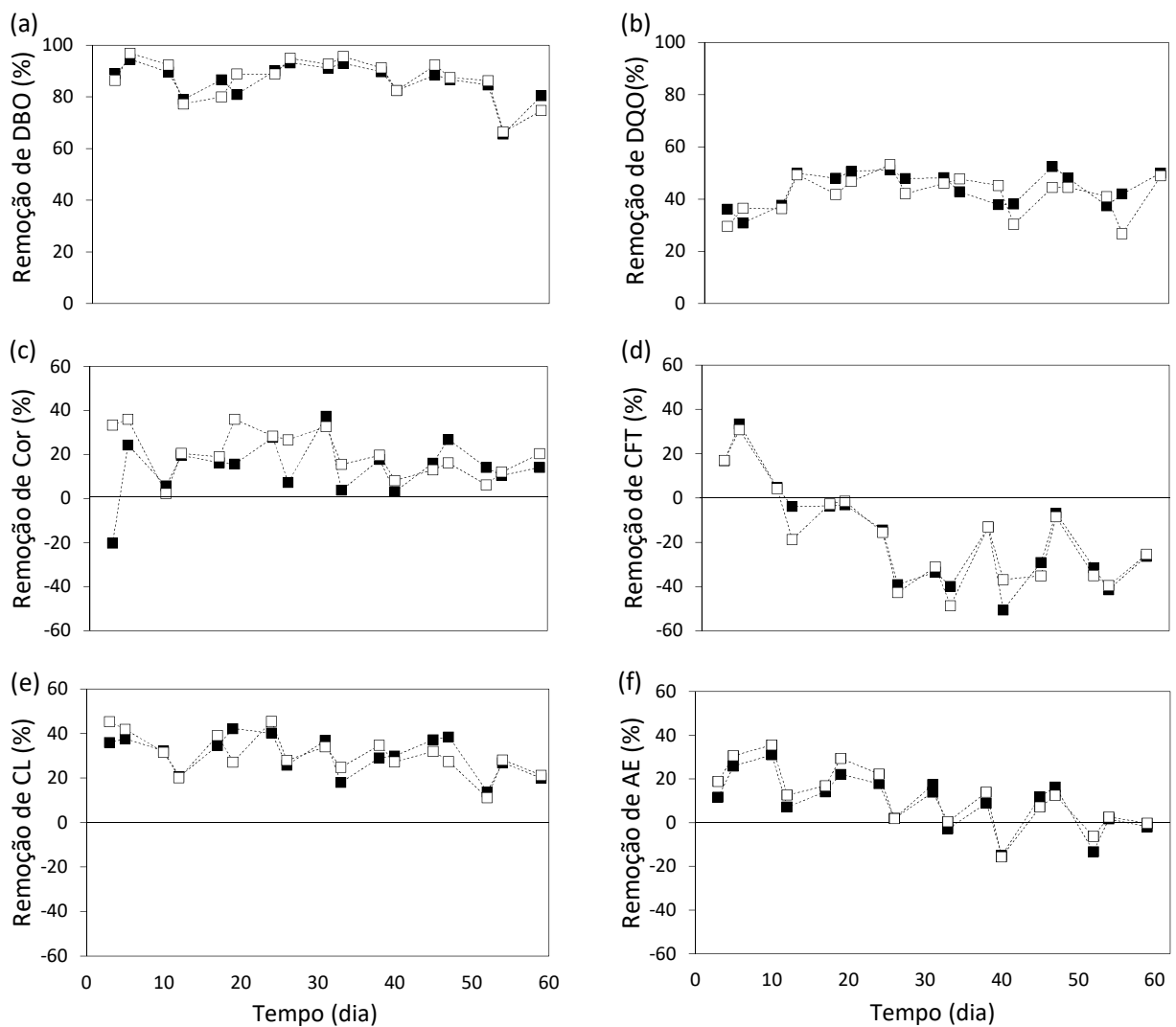
**Nota:** OD = Oxigênio dissolvido e COV = Carga Orgânica Volumétrica.

Como se pode observar na Figura 18, a temperatura ambiente teve uma média de  $21,20 \pm 2,54$  °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 18 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 18.

De acordo com a literatura (METCALF e EDDY, 2003) uma aeração eficiente proporciona Potencial de Oxirredução ( $E_H$ ) > 100 mV, e a medição dentro de ambas as lagoas, após correção com o valor de referencia do eletrodo usado (JARDIM, 2014), indicou valores de  $E_H$  que variaram de 198 a 240 mV no meio do efluente com aeração intensa, configurando alto potencial oxidativo, apesar do efluente *kraft* bruto, apresentar alto potencial de redução ( $E_H = -430 \pm 40$  mV). Já no sedimento, o  $E_H$  foi de  $-21 \pm 08$  mV, configurando uma região

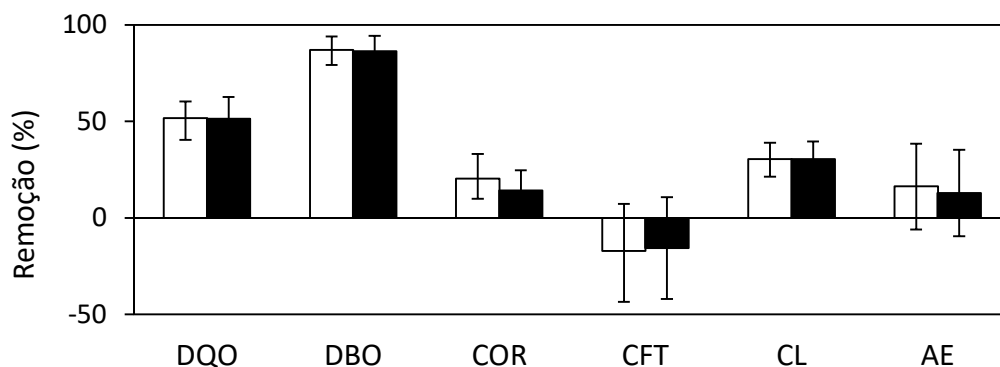
anáóxica. Condições anaeróbicas não foram detectadas no sedimento, provavelmente pela impossibilidade de fazer a medida no centro da biomassa sedimentada.

Na Figura 19 apresentam-se os valores de eficiência das Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs), controle e com aplicação da Lacase comercial, obtidos semanalmente, durante 60 dias, a partir de um período de aproximadamente 2 semanas para pré-aclimatação da biomassa inoculada na Fase I. Já na Figura 20 tem-se a eficiência média do tratamento obtida durante os dois meses de funcionamento do sistema na Fase I.



**Figura 19:** Valores de eficiência das Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs), controle (□) e LAF assistida com Lacase (■), obtidos semanalmente, ao longo de 60 dias de funcionamento do experimento na Fase I.

**Nota:** DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral. Remoções de DBO (a), DQO (b), Cor (c), CFT (d), CL (e), AE (f).



**Figura 20:** Eficiência média de remoção dos parâmetros de monitoramento da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida com Lacase (■) durante o período de 60 dias na Fase I.

**Nota:** DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Como pode ser visto nas Figuras 19 e 20, os valores obtidos na LAF com aplicação de enzima foram muito próximos aos valores obtidos com o controle, não apresentando diferença significativa no teste ANOVA, para nenhum dos parâmetros analisados. Isso mostra que no sistema de fluxo contínuo, a Lacase comercial não teve contribuição significativa para a redução nos parâmetros analisados.

Um fator que pode ter prejudicado a atividade enzimática dentro da LAF foi o pH 7 do efluente, que era neutralizado na entrada da LAF mas tendia a aumentar durante o tratamento. Apesar da Lacase comercial ser vendida como uma enzima com alta atividade em pH 7, o grau de especificidade do substrato e afinidade deste com a Lacase podem variar o ponto ótimo do pH. De acordo com Gianfreda, Xu e Bollag (1999), substratos que envolvem a troca de prótons, por exemplo, quando oxidados, apresentam um pH ideal que depende das isoformas de Lacase e não do pH do substrato, enquanto para os substratos que não envolvem a troca de prótons, a atividade da Lacase muitas vezes diminui à medida que o pH aumenta.

As condições de temperatura obtidas durante esta fase do experimento variaram de 19 a 24 °C, o que possivelmente também não configurou as melhores condições para o uso das enzima, de acordo com as especificações técnicas da enzima, sua atividade ótima pode ser obtida a 30 °C (Anexo 1). É importante salientar que as variações da temperatura ambiente são um fator importante a ser testado, já que representam a realidade encontrada nas Estações de Tratamento de Águas Residuárias (ETARs) das indústrias de celulose e papel *kraft*.

A salinidade do efluente da indústria é outro ponto que deve ser avaliado. Em um estudo sobre o efeito de sais e de íons metálicos na atividade enzimática da Lacase de *T.*

*hirsuta*, Couto, Sanromán e Gübitz (2005) observaram uma redução de 39 % na atividade da enzima após 24 h de contato com solução contendo  $10 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl e 41 % de redução da atividade da enzima após 7 dias de contato com solução contendo  $10 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$ .

O efluente *kraft* pode carregar sais e íons metálicos provenientes de impurezas trazidas junto com a madeira para o processo, ou na própria composição desta. Além disso, o processo *kraft* inclui adição de sulfeto e hidróxido de sódio, e uma parte destes produtos são retirados na lavagem e acabam sendo descartados no efluente, tornando-o alcalino. Todos esses fatores contribuem para a salinidade do efluente a ser tratado.

De acordo com Metcalf e Eddy (2003), a condutividade pode ser usada como medida indireta de Sólidos Dissolvidos Totais (SDT), incluindo sais como cálcio, magnésio, sódio, potássio, carbonatos, sulfatos e cloretos. A Tabela 9 mostra os valores de Condutividade Elétrica (CE) medidos no efluente da indústria antes e depois da correção do pH e da adição de nutrientes, bem como a quantidade de Sólidos Totais Dissolvidos calculada a partir da Equação 3 proposta por estes autores.

$$CE = 1,5625 \text{ SDT} \quad (\text{Equação 3})$$

**Tabela 9:** Condutividade Elétrica e Sólidos Dissolvidos Totais presente no efluente da indústria.

Efluente <i>kraft</i>	CE ( $\mu\text{S cm}^{-2}$ ) a 25 °C	SDT ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>Bruto</b>	779,7 $\pm$ 13,9	1218,3 $\pm$ 21,7
<b>Corrigido</b>	1059,5 $\pm$ 0,6	1655,4 $\pm$ 1,0

**Nota:** Constante da célula = 0,8619.

Como pode ser visto na Tabela 9, as medições de CE e SDT do efluente bruto mostraram considerável salinidade neste efluente, e ainda houve um aumento de 26 % desta após a correção do pH e adição de nutrientes ao efluente a ser tratado.

Ainda na Figura 20 observa-se que a LAF com Lacase mostrou remoções de 52 % da DQO, 20 % da Cor e 30 % dos Compostos Lignínicos (CL), melhores que os valores obtidos na condição do ponto médio do planejamento fatorial (Tabela 6 - experimento 9) onde se obteve remoção de aproximadamente 39 % da DQO, 19 % dos CL e aumento da Cor em 2 %. Em contrapartida, no experimento com as lagoas houve aumento dos Compostos Fenólicos

Totais (CFTs), enquanto que no experimento 9 do planejamento fatorial se obteve remoção de  $18,20 \pm 4,38$  % dos CFTs.

Essa diferença de remoções entre os experimentos possivelmente se deve à quantidade de biomassa usada na inoculação das LAFs ( $2000 \text{ mg SSV L}^{-1}$ ), relativamente maior que a quantidade usada no experimento fatorial ( $60 \text{ mg SSV L}^{-1}$ ). Também por conta do tempo de experimento (60 d), que possibilitou à população microbiana adaptar-se e atingir o crescimento necessário para formação de flocos, além de possibilitar a formação de regiões anóxicas e anaeróbicas (sedimentos) que poderiam contribuir para a degradação dos compostos (METCALF e EDDY, 2003).

Os valores de remoção de Cor e CL foram compatíveis com os resultados de LAFs apresentados na literatura (BELMONTE et al., 2006; CHAMORRO et al., 2009). Xavier et al. (2011), ao trabalharem com COV de  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  em lagoas aeradas facultativas, obtiveram aproximadamente 20 e 30 % de remoção dos parâmetros de Cor e CL, respectivamente.

Quanto à produção de Compostos Fenólicos Totais (CFTs), esta também foi verificada no teste para avaliação do efeito da inoculação (seção 5.2.1 – Figura 5 c), e corrobora com resultados de outros autores que também registraram geração de Compostos Fenólicos trabalhando em condições semelhantes (XAVIER et al., 2011). Já os valores de remoção de  $\text{DBO}_{5,20}$  e DQO obtidos das lagoas controle e com enzima foram de 87 % e 51 %, e 86 % e 52 %, respectivamente, corroborando com os valores apresentados por Xavier et al. (2011), que obtiveram mais de 85 % de remoção de  $\text{DBO}_{5,20}$ , e uma remoção de DQO entre 50 e 60 %, trabalhando na mesma COV e usando o mesmo sistema.

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 (VILLELA, 2006; CHAMORRO et al., 2009; XAVIER et al., 2011). A variação observada também se deve à dificuldade em manter a COV totalmente estável, frente a um efluente real com variabilidade na concentração inicial de DQO e na relação  $\text{DBO}_{5,20}/\text{DQO}$ . Apesar disso, a relação  $\text{DBO}_{5,20}/\text{DQO}$  do efluente usado ao longo dos 60 dias de operação foi em média 0,45, configurando um efluente parcialmente biodegradável.

Por conta da presença de microrganismos nas lagoas, inoculadas com lodo proveniente da indústria, também foi analisado o desenvolvimento desta biomassa da Fase I, por meio das análises de sólidos. Na Tabela 10 são apresentados os valores de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) presentes nas lagoas na etapa

inicial do sistema (dia 0), mediante inoculação com lodo, e ao final do experimento (dia 60), quando também foram medidos os Sólidos Sedimentáveis (SSed) e calculado o Índice Volumétrico do Lodo (IVL) para a LAF controle e LAF com Lacase comercial.

**Tabela 10:** Série de sólidos da Lagoa Aerada Facultativa controle e com Lacase comercial.

Etapa do experimento	(Dia 0)		(Dia 60)			
	SST (g L <sup>-1</sup> )	SSV (g L <sup>-1</sup> )	SST (g L <sup>-1</sup> )	SSV (g L <sup>-1</sup> )	SSed (mL L <sup>-1</sup> )	IVL (mL g <sup>-1</sup> )
LAF Controle	3,27 ± 0,27	1,97 ± 0,20	3,90 ± 0,35	2,52±0,12	190 ± 10	75,40±3,97
LAF com Lacase comercial	3,29 ± 0,19	1,97 ± 0,21	3,84 ± 0,32	2,31±0,15	200 ± 10	86,58±5,62

Como pode ser visto na Tabela 10, os valores médios da série de sólidos das lagoas na Fase I mostram que na lagoa controle houve um aumento de aproximadamente 19 % e 28 % na proporção de SST e SSV, respectivamente. Já na lagoa com Lacase comercial, houve um aumento de 17 % tanto para os SST quanto para os SSV.

No início do experimento as lagoas foram inoculadas com um lodo antigo, com alto grau de mineralização ( $SSV/SST = 0,48$ ) e, ao final de dois meses em funcionamento, constatou-se um aumento da fração orgânica do lodo, evidenciado pela relação de  $SSV/SST$  que chegou a 0,65 para a lagoa controle e 0,60 para a lagoa com enzima, mostrando a presença de uma biomassa ativa e em crescimento. Apesar de a lagoa controle apresentar um crescimento maior da biomassa, considerando o desvio padrão das medidas, pode-se dizer que não houve diferença significativa quanto à quantidade de formação de biomassa nas lagoas controle e com enzima.

Quanto ao Índice Volumétrico de Lodo (IVL), obteve-se 75 mL g<sup>-1</sup> para Lagoa controle e 87 mL g<sup>-1</sup> para Lagoa com Lacase. Mercalf e Eddy (2003) afirmam que valores de  $IVL < 120$  mL g<sup>-1</sup> caracterizam lodos com boa sedimentabilidade, o que corrobora com os resultados de remoção da turbidez obtidos das LAFs, já que após a primeira semana de operação, os valores de remoção se aproximaram de 80 % e até o final dos 60 dias de operação da Fase I, as LAFs (controle e com Lacase) permaneceram com a média de remoção da turbidez de 82 e 83 %, respectivamente.

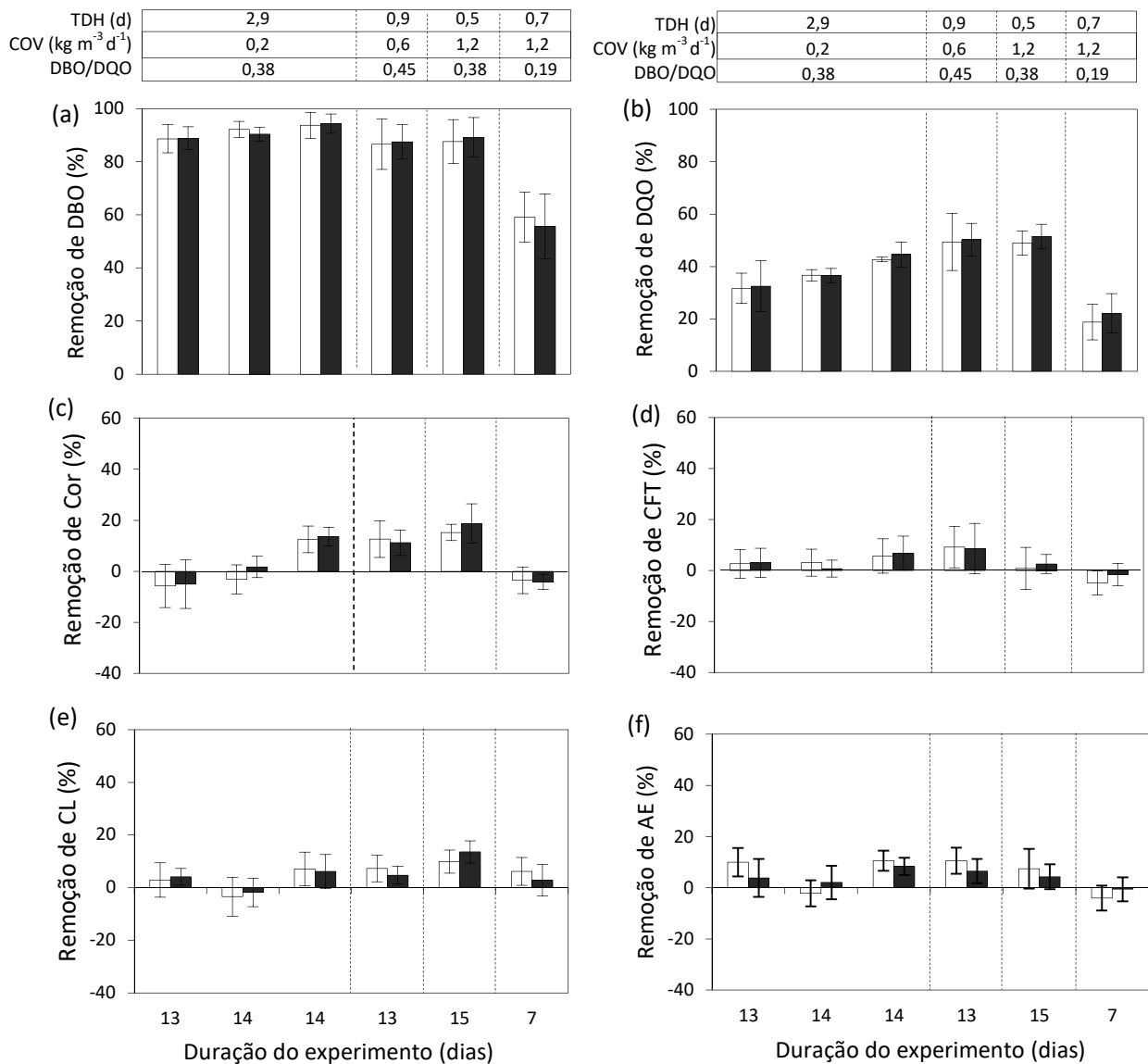
Os testes de ecotoxicidade mostraram efeito agudo para o afluente do tratamento,  $FT=2$ , sendo FT o Fator de Toxicidade. No entanto, o valor apresentado ainda se encontra

dentro do limite de lançamento estabelecido pelo Conselho Estadual do Meio Ambiente (PARANÁ, 2010) que, desde o ano de 2014 determina que o limite de FT seja no máximo 4.

Para as amostras do efluente da LAF controle e LAF com Lacase comercial, após atingir estado estacionário ( $84,3 \pm 6,6$  % e  $79,6 \pm 0,8$  % de remoção da DBO, respectivamente), não foi verificado efeito agudo (FT=1), indicando que não houve geração de subprodutos tóxicos durante a degradação biológica, que removeu a ecotoxicidade aguda em ambos os tratamentos (com e sem Lacase comercial).

O resultado de toxicidade se mostrou dentro do esperado, uma vez que os processos de degradação biológica removem com relativa facilidade a toxicidade aguda sendo mais difícil a remoção de toxicidade crônica (FREIRE et al., 2000). Neste estudo priorizou-se apenas os testes de toxicidade aguda por conta da exigência da legislação atual. Entretanto, sabe-se que o efeito da toxicidade crônica, a longo prazo, tem alto impacto no ambiente aquático, devendo ser levado em consideração sempre que possível (HEWITT et al., 2008; ORREGO et al., 2010; COSTIGAN et al., 2012).

Ao final destes testes iniciou-se a Fase II em fluxo contínuo com as LAFs, na intenção de testar o sistema em situação de choque, quando há um aumento brusco da COV. Este foi realizado nas mesmas condições do experimento anterior (Fase I), com exceção da aplicação diária da Lacase comercial, que foi usada somente no momento em que a COV foi aumentada de  $0,2$  para  $0,6$  kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$ , quando a COV foi novamente aumentada de  $0,6$  a  $1,2$  kg DQO  $m^{-3} d^{-1}$  e quando se aplicou efluente com relação  $DBO_{5,20}/DQO$  de  $0,19$ . Por conta do uso esporádico da enzima, o volume utilizado para cada aplicação foi de  $25$   $\mu$ L de Lacase (o dobro da quantidade usada na etapa anterior). Os resultados do experimento da Fase II podem ser vistos na Figura 21.



**Figura 21:** Eficiência média de remoções de DBO (a), DQO (b), Cor (c), CFT (d), CL (e), AE (f) da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida com Lacase (■) separando as etapas do tratamento de acordo com a COV usada e a relação  $\text{DBO}_{5,20}/\text{DQO}$  na Fase II.

**Nota:** DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Como apresentado na Figura 21 (Fase II) a eficiência de remoção da  $\text{DBO}_{5,20}$  nas duas LAFs alcançou  $89 \pm 5\%$  já nas primeiras semanas e aumentou gradativamente chegando até  $94 \pm 5\%$  no 41º dia, quando se fez a primeira alteração da COV de 0,2 para  $0,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Nesse primeiro aumento da COV se observou que a LAF com Lacase mostrou menor variação da eficiência do que a LAF controle. Durante a COV de  $0,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , as duas lagoas mostraram eficiência média de remoção da  $\text{DBO}_{5,20}$  de  $87 \pm 9\%$  na LAF controle e  $87 \pm 6\%$  na LAF com enzimas (Figura 21 a).



Na Figura 21 b, também nota-se o aumento gradativo das médias de remoção de DQO do 1º até o 54º dia de funcionamento do sistema, mesmo com a mudança de COV de 0,2 para 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>. Durante o período que a COV foi de 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, as duas lagoas mostraram eficiência média de redução da DQO de 49±11 % na LAF controle e 50±6 % na LAF com Lacase comercial.

Assim como na eficiência de redução da DBO<sub>5,20</sub>, também se observou que durante a primeira variação da COV, a eficiência de redução da DQO na LAF com Lacase teve menor variação do que na LAF controle. Já em relação aos compostos específicos, após aumento da COV de 0,2 para 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, houve um aumento da eficiência de remoção dos CFTs (Figura 21 d), enquanto que as remoções de Cor e Compostos Lignínicos (CL) se mantiveram praticamente inalteradas.

De acordo com esses resultados é possível afirmar que o aumento da COV em até 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> não causou impacto negativo na eficiência LAFs, chegando a aumentar a eficiência de remoção dos parâmetros de DQO e CFTs. Esse aspecto das LAFs também já foi observado por Xavier et al. (2011) que, ao variarem a COV de uma Lagoa Aerada Facultativa de 0,2 para 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, obtiveram melhores eficiências de remoção de DQO, DBO<sub>5,20</sub> e CFTs.

Ainda na Figura 21, observa-se que após aumentar a COV de 0,6 para 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, a LAF controle apresentou eficiência de redução de 88±8 % para DBO<sub>5,20</sub> e 49±5 % para DQO, e a LAF com enzimas, uma redução de DBO<sub>5,20</sub> de 89±8 % e de DQO de 51±5 %. Isso mostra uma maior eficiência do sistema na redução da DBO<sub>5,20</sub>, ao contrário do que aconteceu com a eficiência de remoção dos CFTs que piorou significativamente nessa COV.

Na carga de 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, houve aumento da eficiência de remoção dos parâmetros de Cor e CL, chegando à redução de 15±3 % e 9±4 % na LAF controle e 12±7 % e 13±4 % e na LAF com enzimas, respectivamente. Em contrapartida, observou-se também que a remoção da Área espectral diminuiu nessa COV (Figura 21 f), demonstrando que grande parte da redução da Cor e dos CL foi decorrente da fragmentação dos CL, que passaram a absorver luz em outras regiões do espectro e continuaram a contribuir para o tamanho da área espectral não permitindo a redução desse parâmetro (MONSALVEZ et al., 2009).

Outro aspecto importante a ser observado na Figura 21 é a alteração ocorrida no sistema após a mudança da relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO presente no afluente, mesmo mantendo-se a COV constante. Na ocasião da mudança, a relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO do afluente foi de 0,38 para 0,19. Nesta condição de baixa biodegradabilidade do afluente, a LAF controle teve uma

diminuição da eficiência para aproximadamente 62 % e 33 % e a LAF com enzimas uma redução de 57 % e 38 % para os parâmetros de DQO e DBO<sub>5,20</sub>, respectivamente.

Dessa forma é possível constatar que a redução da proporção de matéria orgânica biodegradável na entrada do tratamento causa no sistema biológico um choque muito maior do que sobrecargas de matéria orgânica biodegradável (MORALES, PESANTE e VIDAL, 2015). Isso indica a importância do controle total do processo industrial, fechando o ciclo do mesmo por meio da recuperação dos produtos utilizados na polpação, para evitar esse tipo de choque nos sistemas biológicos de tratamento por lagoas.

Apesar de se notar, na Figura 21, diferença entre as médias de redução dos parâmetros da LAF controle e da LAF com Lacase comercial, os valores de eficiência das LAFs, analisados semanalmente, foram avaliados por teste ANOVA e não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre a eficiência da LAF controle e da LAF com aplicação de enzimas.

### 5.3.2 Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) com Extrato Enzimático de *Trametes* sp.

O experimento com as Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) foi montado novamente, empregando as lagoas usadas no experimento com Lacase comercial e com a mesma metodologia descrita na sessão 4.3 em relação à inoculação, nutrientes, pH, OD e COV.

Os resultados da análise da atividade enzimática encontrada no Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET), produzido no Laboratório de Biotecnologia da UTFPR – Campus Ecoville, mostraram uma atividade de  $5,725 \pm 0,320$  U mL<sup>-1</sup> para Lacase e  $0,005 \pm 0,003$  U mL<sup>-1</sup> para Manganês Peroxidase (MnP). Já para Lignina Peroxidase (LiP) não foi detectada atividade. Na Tabela 11 são apresentadas as condições do tratamento e a atividade enzimática do Extrato Enzimático de *Trametes* sp. aplicado na Fase I e II.

**Tabela 11:** Condições utilizadas no ensaio em fluxo contínuo com Extrato Enzimático de *Trametes* sp.

Fase	Aplicação de enzima Lacase (U mL <sup>-1</sup> )*	Tempo do experimento	COV (kg DQO m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	DBO <sub>5,20</sub> /DQO	TDH
I	0,017	60	0,2	0,35	2,7
	-	6	0,2	0,25	2,9
II	0,034	8	0,6	0,37	0,9
	0,034	8	1,2	0,31	0,5
	0,034	8	1,2	0,14	0,7

**Nota:** \* Aplicação diária de enzima na Fase I e aplicação única em cada ocasião de choque de carga durante a Fase II.

Como mostrado na Tabela 11, a Fase I se iniciou a partir de um período de aproximadamente 2 semanas para pré-aclimatação da biomassa inoculada, e durou 60 dias em COV de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e TDH de 2,7 d. Durante a Fase I, uma das lagoas recebeu diariamente 3 mL de Extrato Enzimático de *Trametes* sp., enquanto a outra foi usada como controle. Dessa forma, considerando o volume total da lagoa, a atividade enzimática na lagoa assistida com o EET no momento da aplicação foi de aproximadamente 0,017 U mL<sup>-1</sup> de Lacase. Na Tabela 12 são apresentados os valores de DQO, Cor, CFT, CL, AE, pH e Turbidez, obtidos na solução aquosa de EET com concentração de 0,017 U mL<sup>-1</sup> de Lacase.

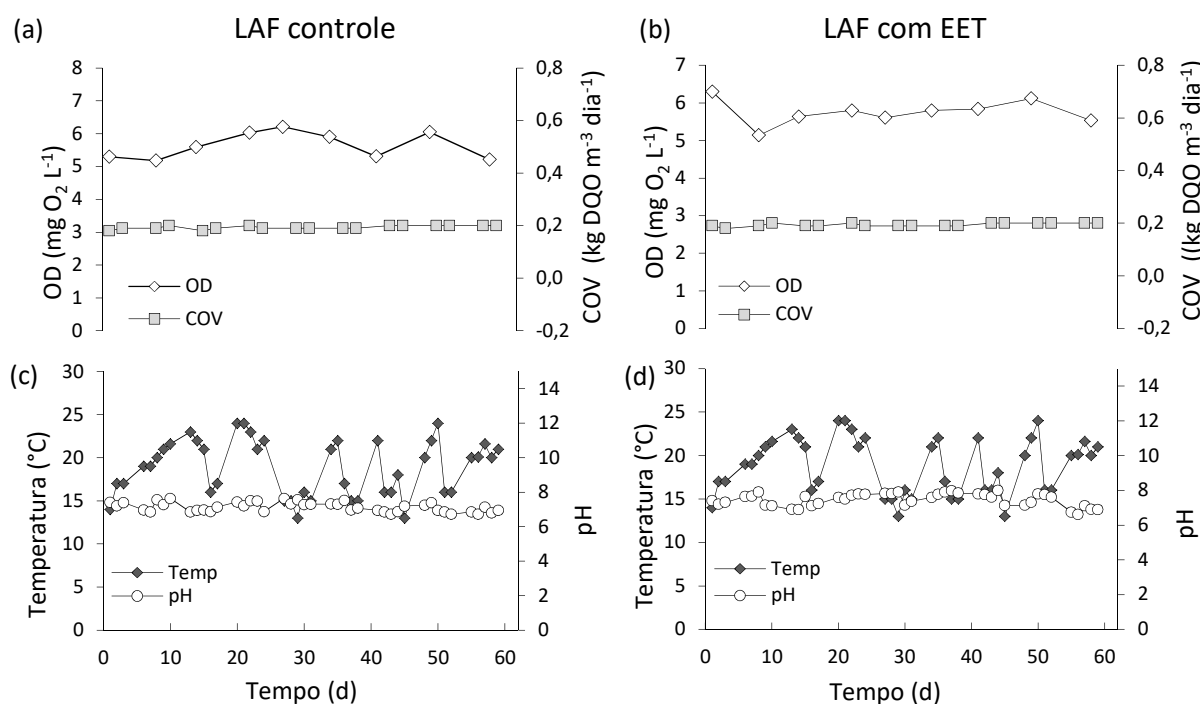
**Tabela 12:** Caracterização do Extrato Enzimático de *Trametes* sp.

Parâmetros	Lacase bruta de <i>Trametes</i> sp.*
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	39,39 ± 0,54
Cor (VIS <sub>440</sub> ) (1×1cm)	0,0022 ± 0,0001
CFT (UV <sub>215</sub> ) (mg L <sup>-1</sup> )	1,66 ± 0,28
CL (UV <sub>280</sub> ) (1×1cm)	0,0011 ± 0,0001
Área espectral (cm <sup>2</sup> )	4,50 ± 0,02
pH	7,12 ± 0,2
Turbidez (UNT)	0,60 ± 0,08

**Nota:** \*Atividade de 0,017 U mL<sup>-1</sup>.

Como pode-se observar na Tabela 12, a atividade de 0,017 U mL<sup>-1</sup> de Lacase bruta de *Trametes* sp. proporciona um incremento inicial nos parâmetros relacionados à eficiência das LAFs. Assim como no experimento com a Lacase comercial, estes valores de incremento podem ser desconsiderados, pois são bastante inferiores aos do efluente empregado e também por ser um composto natural e de fácil biodegradação.

Na Figura 22 são apresentados os parâmetros de controle das duas LAFs, controle e com Extrato Enzimático de *Trametes* sp. durante os 60 dias da Fase I.



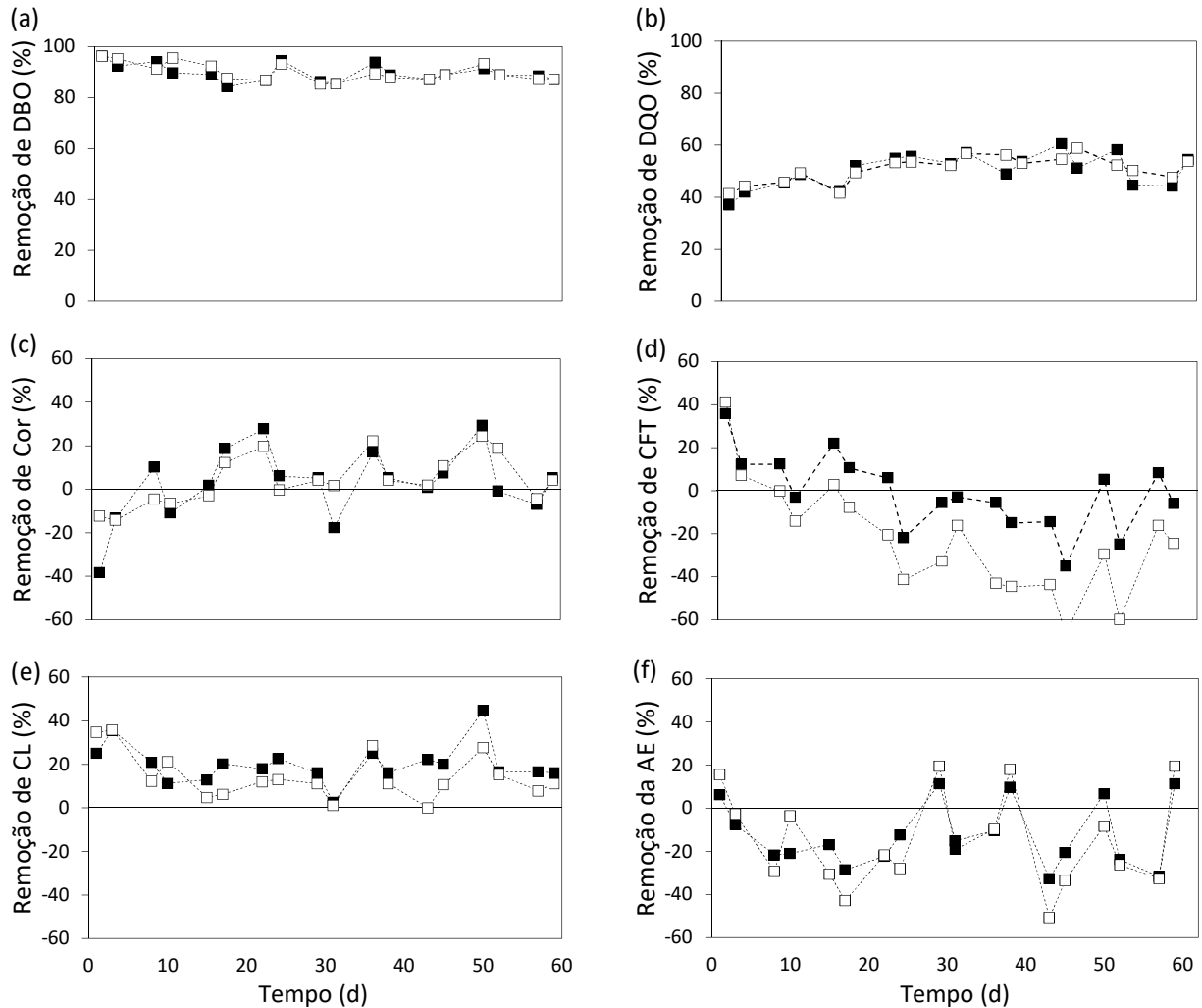
**Figura 22:** Parâmetros de controle medidos nas Lagoa Aerada Facultativa controle (a e c) e com aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (b e d), durante a Fase I.

Como se pode observar na Figura 22, com exceção da Temperatura ambiente, que teve uma média de  $18,87 \pm 3,23$  °C (por este experimento ter ocorrido no final do inverno), as condições de pH e OD foram muito semelhantes às obtidas na Fase I do experimento em fluxo contínuo com Lacase comercial. Também, as medições de ORP indicaram valores similares aos obtidos no experimento com Lacase comercial, tanto no meio do efluente na lagoa ( $E_H$  variando de 206 a 238 mV), quanto próximo dos sedimentos ( $E_H$  em torno de -40 mV), valores característicos de LAFs.

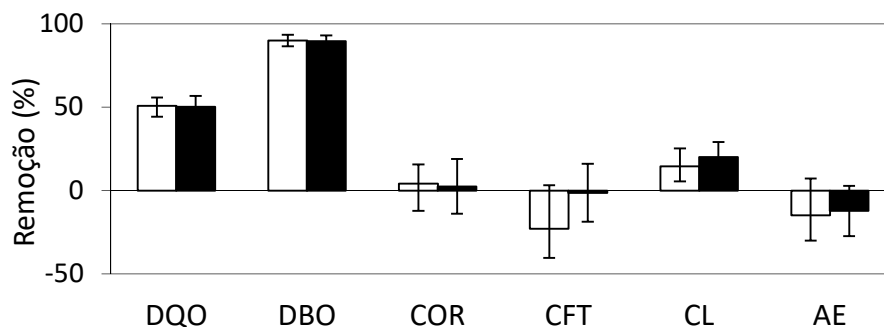
Quanto à Condutividade Elétrica (CE), um indicativo da salinidade do efluente, três medições realizadas nesta fase do experimento mostraram uma CE de  $989 \pm 20$   $\mu\text{S cm}^{-2}$  no afluente já com correção de pH e nutrientes, este valor foi semelhante ao valor medido durante o experimento com Lacase comercial.

Na Figura 23 apresentam-se os valores de eficiência das Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs), controle e com aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes* sp., obtidos

semanalmente, durante o período de 60 dias na Fase I de funcionamento do sistema em COV de  $0,2 \text{ kg m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ . Já na Figura 24 é apresentada a eficiência média, em termos de remoção dos parâmetros analisados durante esse período de tratamento do efluente *kraft*.



**Figura 23:** Valores de eficiência de remoções de DBO (a), DQO (b), Cor (c), CFT (d), CL (e), AE (f) das Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs), controle (□) e com aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (■), obtidos semanalmente ao longo dos 60 dias de experimento na Fase I. **Nota:** DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.



**Figura 24:** Eficiência média de remoção dos parâmetros de monitoramento da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (■) durante o período de 60 dias na Fase I.

**Nota:** DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Segundo mostrado nas Figuras 23 e 24, os valores obtidos na LAF com aplicação de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET) para os parâmetros de DBO, DQO, Cor, CL e AE foram de 90 %, 50 %, 2 %, 20 % e -12 %, respectivamente. Mas estes valores não apresentaram diferença significativa dos valores obtidos da LAF controle.

Também se observou que os valores de remoção da DBO e DQO foram muito próximos aos valores obtidos no experimento em fluxo contínuo com a Lacase comercial, podendo ser considerados valores típicos de LAF. Entretanto, para os parâmetros de Cor e CL, ambas as LAFs, controle e com EET, mostraram valores de remoção menores do que os obtidos durante a Fase I do experimento com Lacase comercial, possivelmente pelo fato do experimento ter sido realizado no inverno, o que pode ter prejudicado o desempenho da microbiota na degradação dos compostos específicos.

Quanto ao parâmetro de remoção dos CFTs, enquanto na LAF controle se observou um incremento médio de aproximadamente 23 % deste parâmetro, na LAF com EET, o incremento foi significativamente menor (ANOVA,  $p < 0,05$ ) apresentando uma média de aproximadamente 1% .

Alguns estudos mostram que o potencial do centro T1 na Lacase (Figura 2) determina a eficiência catalítica na oxidação da maioria dos seus substratos, quanto maior o potencial da Lacase e menor o potencial do substrato melhor a eficiência catalítica. Os fenóis têm potenciais redox que variam entre 0,5 a 1,0 V o que permite a captação de elétrons pelo Cu 1, tornando-os substratos típicos da Lacase. As Lacases de *Trametes versicolor*, e *Trametes villosa* são conhecidas por apresentar alto potencial, ambas com 0,79 V (MOROZOVA et al., 2007b; GIARDINA et al., 2010). O fato de se ter utilizado Lacase bruta

na presença de outras enzimas de *Trametes* sp, pode ter favorecido a degradação dos CFT no efluente de modo a compensar a geração de fenóis típicas de ambientes bem aerados.

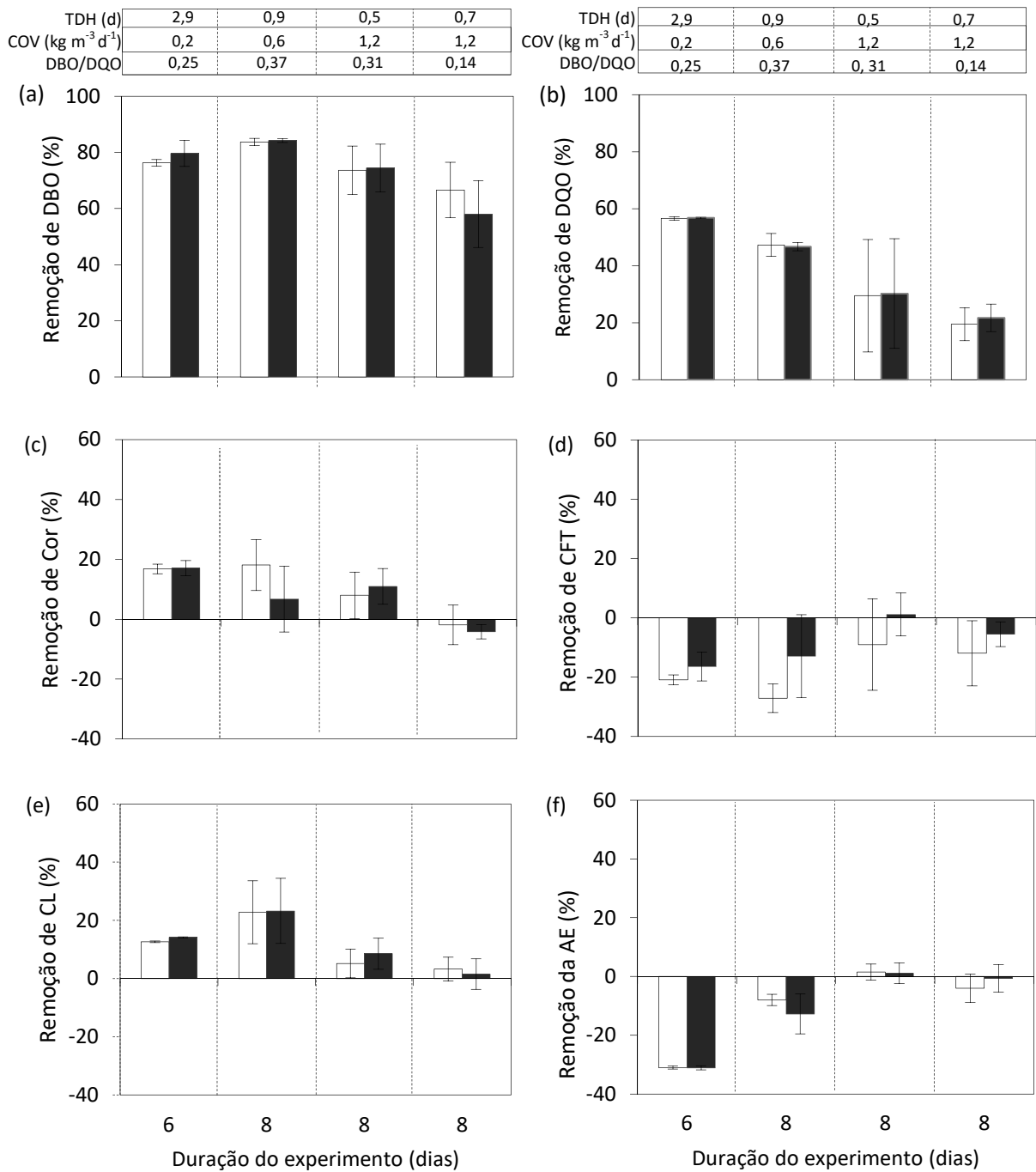
Por conta da constatação de uma pequena quantidade de MnP presente no EET ( $0,005 \text{ U mL}^{-1}$ ), pode-se considerar a presença de íons  $\text{Mn}^{2+}$  agindo como mediadores ativos das Lacases (KEREM e HADAR, 1993). Além disso, o uso de um extrato bruto possibilita a inserção de uma gama de metabólitos secundários da degradação fúngica dentro do sistema.

O álcool veratrílico, por exemplo, é um composto que aparece como metabólito secundário nas culturas ligninolíticas de alguns Fungos da Podridão Branca, e é conhecido como indutor da produção de enzimas ligninolíticas além de funcionar como um mediador na transferência de um elétron. Desta forma compostos que não são diretamente acessíveis à enzima podem ser oxidados pela via do álcool veratrílico (DHALIWAL, GARCHA e KHANNA, 1992).

Mas o efeito da Lacase, claramente observado nos valores de remoção dos CFT (Figura 23), não refletiu da mesma forma nos CL e AE. Apesar da média dos valores de remoção de CL na LAF com EET apresentar valor médio 27% maior que o controle, não houve diferença estatisticamente significativa entre a LAF controle e a LAF com EET ( $p < 0,05$ ). Isso porque, após desestabilização do polímero da lignina, ocasionada pela atividade catalítica da Lacase nos CFT, também pode ocorrer a repolimerização de sua estrutura em uma nova forma, pouco diferente da estrutura antiga, e conseqüentemente não se observa a redução da AE do efluente (HATAKKA, 1994).

Terminado o experimento da Fase I, iniciou-se novamente um segundo experimento (Fase II). Nessa Fase o sistema continuou sendo alimentado com COV de  $0,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , mas sem aplicação de EET, por 6 dias, para aclimação sem enzima. Após esse tempo, assim como no experimento com Lacase comercial, foi testada a aplicação do EET em uma das lagoas, mas somente em situações de choque pelo aumento brusco da COV.

No primeiro choque a COV foi alterada de 0,2 para  $0,6 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ , depois a COV foi de 0,6 a  $1,2 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$  e, por último, foi aplicado efluente *kraft* com relação  $\text{DBO}_{5,20}/\text{DQO}$  de 0,14. Por conta do uso esporádico da enzima, o volume utilizado para cada aplicação foi de 6 mL de EET (o dobro da quantidade usada na etapa anterior). Os resultados dessa etapa do experimento podem ser vistos na Figura 25.



**Figura 25:** Eficiência média de remoções de DBO (a), DQO (b), Cor (c), CFT (d), CL (e), AE (f). da Lagoa Aerada Facultativa (LAF) usada como controle (□) e LAF assistida Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (■) separando as etapas do tratamento de acordo com a COV usada e a relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO na Fase II.  
**Nota:** DBO = Demanda Bioquímica de Oxigênio, DQO = Demanda Química de Oxigênio, CFT = Compostos Fenólicos Totais, CL = Compostos Lignínicos, AE = Área Espectral.

Na Figura 25 observa-se que, após a aclimação da biomassa das LAFs em COV de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, em ambas as LAFs, controle e com EET, o aumento da COV de 0,2 para 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> não comprometeu a remoção de DBO e dos CL que chegou a aumentar



atingindo valores médios de 84 % e 23 %, respectivamente. No entanto, houve redução da remoção de DQO (57 para 47 %).

Ainda na COV de 0,6 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, observou-se que a remoção média de Cor e dos CL obtida na LAF com EET foi menor que a remoção obtida na LAF controle, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Quanto ao parâmetro de remoção dos CFTs, a LAF controle apresentou incremento de 27 % enquanto a LAF com EET apresentou incremento de 13 % deste parâmetro, e esta diferença foi considerada estatisticamente significativa (ANOVA  $p < 0,05$ ), possivelmente por conta da aplicação de 0,034 U mL<sup>-1</sup> Lacase bruta do EET no momento do choque de carga.

No aumento da COV de 0,6 para 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, diferentemente da reação das lagoas no experimento com Lacase comercial, ambas as LAFs, controle e com EET, apresentaram redução significativa na remoção da DBO, DQO, Cor e CL. Assim como na Fase I, o fator climático pode ter interferido no desempenho das LAFs, já que também durante essa fase, a temperatura média foi de 19 °C. Por outro lado, uma vez que a AE em geral se atribui à fragmentação dos compostos pela degradação biológica, ambas as LAFs deixaram de apresentar valores negativos de remoção da AE, possivelmente devido à diminuição na degradação dos CL.

Quanto à remoção dos CFT na COV de 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, a LAF controle reduziu o incremento deste parâmetro para 9 %, enquanto a LAF com EET chegou a apresentar remoção de 1 %, mas essa diferença entre as duas LAFs não foi considerada estatisticamente significativa. Isso pode ser justificado considerando que houve apenas uma aplicação de EET, e com o aumento da COV de 0,6 para 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> o TDH passou de 0,9 para 0,5 d, consequentemente isso implicou num tempo menor de contato das enzimas dentro do sistema. Já o choque com alteração da relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO mostrou que a redução da fração biodegradável causa impacto negativo na eficiência de remoção de todos os parâmetros, e também nessa condição, não houve diferença estatisticamente significativa entre a LAF controle e a LAF com EET.

A Tabela 13 mostra os valores de quantificação dos Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) formados nas lagoas durante todo o período experimental que envolveu Fase I e II das Lagoas assistidas com EET (total de 106 d) desde o dia da inoculação nas lagoas (dia 0), até o último dia de experimento (dia 106), quando também foram medidos os Sólidos Sedimentáveis (SS) e calculado o Índice Volumétrico do Lodo (IVL) para a LAF controle e LAF com EET.

**Tabela 13:** Série de sólidos da LAF controle e LAF com Extrato Enzimático de *Trametes* sp.

Etapa do experimento	(Dia 0)		(Dia 103)				
	LAFs	SST (g L <sup>-1</sup> )	SSV (g L <sup>-1</sup> )	SST (g L <sup>-1</sup> )	SSV (g L <sup>-1</sup> )	Ssed (mL L <sup>-1</sup> )	IVL (mL g <sup>-1</sup> )
Controle		3,11±0,10	1,98±0,32	4,07±0,26	3,02±0,33	285±10	94,53±3,32
Com EET		3,11±0,10	1,98±0,32	4,17±0,10	3,16±0,14	305±15	96,44±4,74

Na Tabela 13, é possível observar que os valores médios da série de sólidos das lagoas mostram que na lagoa controle houve um aumento de aproximadamente 23 % e 34 % na proporção de SST e SSV, respectivamente. Já na lagoa com EET, houve um aumento de 25 % e 37 % nos SST e SSV, respectivamente. Assim como no experimento em fluxo contínuo com a Lacase comercial, neste experimento também foi observado aumento da fração orgânica do lodo, evidenciado pela relação de SSV/SST que chegou a 0,75 para ambas as lagoas, controle e com EET.

Os valores de crescimento da biomassa e da fração orgânica do lodo foram maiores do que os observados no experimento que testou a LAF com Lacase comercial, isso porque, no teste com a Lacase comercial, a medição dos sólidos foi realizada no final da Fase I (60 d), quando o experimento foi desmontado e inoculado novamente para a Fase II. Já no experimento da LAF com EET, com o intuito de otimizar o tempo, a lagoa não foi desmontada entre a Fase I e a Fase II (totalizando 106 d de funcionamento do sistema). Apesar de a lagoa com EET apresentar um crescimento maior da biomassa, considerando as réplicas das medidas, não foi verificada diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento de biomassa nas duas lagoas, controle e com EET.

Quanto ao Índice Volumétrico de Lodo (IVL), os valores se mostraram um pouco maiores que os obtidos no experimento da LAF com Lacase comercial, mas foram valores menores que 120 mL g<sup>-1</sup> em ambas as LAFs (controle e com EET), caracterizando um lodo com boa sedimentabilidade (METCALF e EDDY, 2003). Isso justifica os resultados de remoção da Turbidez de 94 % na LAF controle e 84 % na LAF com EET, nas últimas análises de monitoramento da Fase II.

Os testes de ecotoxicidade realizados no estado estacionário do tratamento nas LAFs (96 % de remoção da DBO para ambas as lagoas, controle e com EET), novamente mostraram efeito agudo para o afluente do tratamento (FT=2) e remoção da ecotoxicidade aguda na LAF controle e na LAF com EET (ambas com FT=1), indicando que, assim como no uso da Lacase

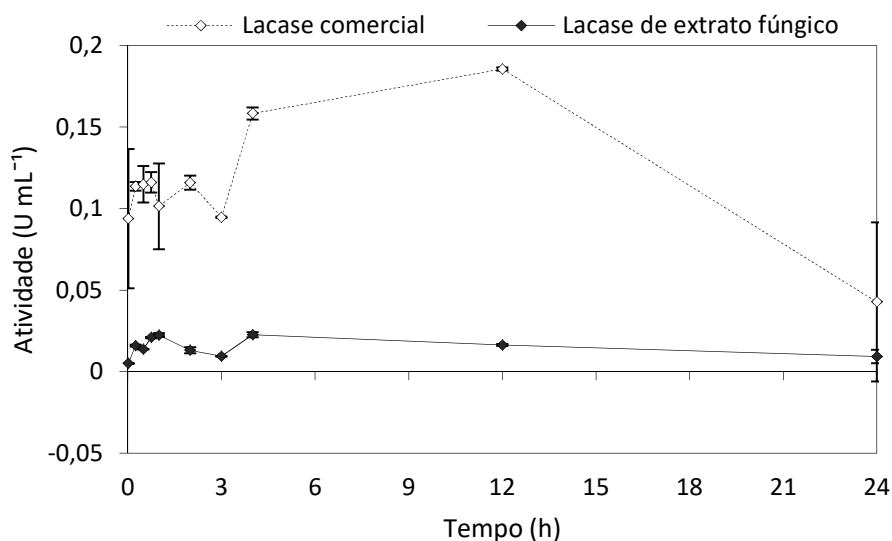
comercial, a aplicação de EET na LAF não proporcionou geração de subprodutos tóxicos durante a degradação biológica (XAVIER et al., 2011).

### 5.3.3 Atividade enzimática de Lacase durante o tratamento do efluente *kraft*

Por conta dos resultados da LAF com Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET) terem mostrado que a Lacase bruta presente foi mais efetiva para evitar geração de CFT durante o tratamento na LAF, foi realizado mais um teste em batelada, para verificar a atividade da Lacase diluída no efluente dentro de um sistema biológico aerado ao longo de 24 horas.

A quantidade de enzima aplicada foi a mesma usada na Fase I dos experimentos em fluxo contínuo com as LAFs (seção 5.3.1 e 5.3.2). Dessa forma foi montado um sistema com aplicação de  $0,49 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase comercial (NOVOZYM 51003), e um sistema com aplicação de  $0,017 \text{ U mL}^{-1}$  de Lacase do EET.

O sistema de tratamento com aplicação de Lacase comercial e o sistema com EET foram montados com inoculação de lodo, aeração, adição de nutrientes e correção do pH do efluente para 7, assim como nos outros testes realizados em batelada. Na Figura 26 pode se observar os resultados de atividade enzimática da Lacase comercial NOVOZYM 51003<sup>®</sup> e da Lacase do EET, durante as primeiras 24 h após a aplicação das enzimas no tratamento do efluente *kraft* em sistema biológico aerado.



**Figura 26:** Atividade de Lacase comercial e Lacase de Extrato Enzimático de *Trametes* sp. aplicada no tratamento de efluente *kraft* em sistema biológico aerado, durante as primeiras 24 h.

Segundo o apresentado na Figura 26, nos primeiros 15 min de contato com o efluente *kraft* dentro do sistema de tratamento montado, a atividade da Lacase comercial foi de  $0,10 \pm 0,04 \text{ U mL}^{-1}$ , valor 79 % menor que sua atividade previamente determinada de  $0,49 \text{ U mL}^{-1}$ , medida sem a presença do efluente *kraft*).

Apesar de a atividade da Lacase comercial aumentar ligeiramente após 3 h de contato dentro do sistema de tratamento, em 24 h a sua atividade já estava 58 % menor que a inicial. Isso mostra que as características da matriz do efluente, somadas às condições do tratamento utilizado, proporcionaram diminuição da atividade enzimática da Lacase comercial dentro do sistema de LAF.

Já a Lacase bruta do Extrato Enzimático de *Trametes* sp. (EET), apesar de mais diluída, com atividade 28 vezes menor que a da Lacase comercial, mostrou nos primeiros 15 minutos de contato dentro do sistema atividade de  $0,010 \pm 0,007 \text{ U mL}^{-1}$ , semelhante à atividade medida sem presença do efluente *kraft* ( $0,017 \text{ U mL}^{-1}$ ), e manteve-se mais estável que a lacase comercial, o que indica menor efeito inibitório.

## 6 CONCLUSÃO

- A caracterização do efluente não tratado da indústria de celulose e papel *kraft* usado neste estudo mostrou um efluente com alta carga orgânica (DQO de aproximadamente 655,57 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) e grande quantidade de compostos específicos que podem ser tóxicos à biota aquática. O efluente mostrou variação em termos da biodegradabilidade, apesar disso, a média da relação DBO<sub>5,20</sub>/DQO se manteve sempre acima de 0,25, valor recomendado para tratamentos biológicos.
- Quanto aos parâmetros de controle, o experimento fatorial mostrou que o sistema biológico aerado, associado à Lacase NOVOZYM 51003<sup>®</sup>, foi mais eficiente em concentração de 3,9 U mL<sup>-1</sup> de Lacase, pH 4 e temperatura de 37 °C, entretanto essas condições de temperatura controlada e pH ácido são incompatíveis em LAFs na indústria.
- O sistema de Lagoas Aeradas Facultativas (LAFs) com COV de 0,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> e TDH de aproximadamente 4 d, atingiu remoções muito próximas das encontradas na literatura para essas condições de tratamento. Mas os valores da LAF com Lacase NOVOZYM 51003<sup>®</sup> não foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos na LAF controle. Houve aumento dos CFTs em ambas as LAFs (controle e com enzima) mostrando também que a presença da Lacase comercial não influenciou na remoção deste parâmetro. O teste de ecotoxicidade mostrou que não houve geração de subprodutos tóxicos durante a degradação biológica, que removeu a ecotoxicidade aguda em ambos os tratamentos (com e sem Lacase comercial).
- Quando operadas em COV de 0,2, 0,6 e 1,2 kg DQO m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, as LAFs, (controle e com Lacase comercial) apresentaram eficiência na remoção dos parâmetros de DBO, DQO, CL e Turbidez similares, sem diferença significativa. Os parâmetros de Cor, CFT e AE tiveram incremento em COV de 1,2, e também nessa situação os valores obtidos da LAF com aplicação de Lacase comercial não foram estatisticamente diferentes da LAF controle. Após a redução da biodegradabilidade do efluente, ambas as LAFs

tiveram significativa perda de eficiência, e também nessa situação, a LAF com Lacase comercial não apresentou resultados de remoção melhores que a LAF controle, por conta da redução da sua atividade quando em contato com o efluente.

- 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, DQO, Cor, CL e AE, apresentando diferença apenas para o parâmetro de CFT. A redução do incremento dos CFT na LAF com EET mostrou que a Lacase fúngica realmente pode catalisar a oxidação de compostos fenólicos no efluente. Como os CFT são os principais agentes da toxicidade presentes no efluente, a redução destes compostos já é de grande valia para o sistema de lagoas.
- Os resultados positivos na remediação da geração de CFT poderiam ser potencializados fazendo uso de um Extrato Enzimático mais concentrado em termos de atividade enzimática. Uma vez descartada a purificação, para não abrir mão dos muitos metabólitos secundários da degradação da lignina por fungos, e sendo muito importante manter a diversidade de enzimas no extrato, o aprimoramento de técnicas para aumentar produção enzimática natural durante a formação do extrato bruto é uma nova possibilidade a ser estudada. Outra possibilidade a ser pensada é o isolamento de fungos com alto desempenho na produção de enzimas ligninolíticas, para compor um consórcio que pode ser aplicado no tratamento em lagoas, num processo conhecido como bioaugmentação.
- Assim, os estudos realizados nesta dissertação permitem afirmar que o emprego de Lacase comercial em sistemas de LAF com temperatura ambiente e pH 7 não é viável, e que o desempenho do Extrato Enzimático de *Trametes* sp., embora tenha sido melhor que o da enzima isolada, requer maiores estudos com a Lacase bruta mais concentrada, pois sua atividade é robusta ao longo do tempo e dessa forma pode-se prevenir a formação de CFTs, que apresentam toxicidade no efluente *kraft* tratado. Dessa forma, o presente trabalho permitiu explorar o tratamento biológico de efluente industrial e avaliar a contribuição de enzimas no desempenho de LAFs em escala de bancada.

## REFERÊNCIAS

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.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 9898: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores.** Rio de Janeiro, 1987.

AGAPITO, M. S. **Tratamento de efluente da indústria de papel e celulose por *Trametes versicolor*.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação de Gestão Ambiental, Materiais e Valorização de Resíduos. Universidade de Aveiro. 2007.

ALMEIDA, E.; ASSALIN, M. R.; ROSA, M. A. Tratamento de efluentes industriais por processos oxidativos na presença de ozônio. **Química Nova**. Vol. 27, n.º 5, p. 818-824, 2004.

APHA – American Public Health Association. **Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. Washington, USA, 2005.

ARAÚJO, J. E. **Processos de Tratamento Terciário para Redução da DQO e Cor dos Efluentes de uma Fábrica Integrada de Celulose Kraft Branqueada e Papel.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2013.

ARCHIBALD, F. S. A New Assay for Lignin-Type Peroxidases Employing the Dye Azure B. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 58, n.º 9, p. 3110-3116, 1992.

ARORA D. S.; Gill P. K. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions, **Bioresource Technology**. Vol. 73, p. 283-285, 2000.

BAJPAI, P. **Environmentally Friendly Production of Pulp and Paper**. New Jersey, USA: John Wiley e Sons; 2010.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties, **FEMS Microbiol Letters**, Vol. 30, p. 215-242, 2006.

BASU, N.; WAYE, A.; TRUDEAU, V.L.; ARNASON, J.T. Extracts from hardwood trees used in commercial paper mills contain biologically active neurochemical disruptors. **Science of the Total Environment**. Vol. 414, p.205-209, 2012.

BELMONTE, M., XAVIER, C., DECAP, J., MARTÍNEZ, M., SIERRA-ÁLVAREZ, R., VIDAL, G. Improved aerobic biodegradation of abietic acid in ECF bleached kraft mill effluent due to biomass adaptation. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 135, p. 256 – 263, 2006.

BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Interciência, 1º ed, 2008.

BORGES, M. T., SILVA, C. M., COLODETTE, J. L., ALVES, L. B., RODRIGUES, G. R., LAANA, L. C., TESSER, F. Effect of eucalyptus kraft pulp enzyme bleaching on effluent quality and bio-Treatability. Paper presented at the PAPTAC Annual Meeting in Montreal. **Pulp e Paper Canada**. Vol. 187, p. 2-3. 2010.

BRACELPA e CNI – Confederação Nacional da Indústria/Associação Brasileira de Celulose e Papel. **Florestas plantadas: oportunidades e desafios da indústria brasileira de celulose e papel no caminho da sustentabilidade**. Cadernos Setoriais Rio+20, 57 p. Brasília – DF, 2012.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**. Brasília, maio de 1997.

BRIJWANI, K., RIGDON, A., VADLANI, P. V. Fungal laccases: Production function, and applications in food processing. **Enzyme Research**. Vol. 2010, p. 1-10, 2010.

CAÑAS, A. e CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**. Vol. 28, nº 6, p. 694-705, 2010.

ÇEÇEN, F. **The use of UV-VIS measurements in the determination of biological treatability of pulp bleaching effluents**. In Conference Proceedings – 7<sup>th</sup> International Water Association Symposium on Forest Industry Wastewaters, Seattle- Washington, USA, 2003.

CHAGAS, E. P., DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. **Enzymed Microbiol Technology**, New York, Vol. 29, p. 473-477, 2001.

CHAMORRO, S., POZO, Z., JARPA, M., HERNANDES, V., BECERRA, J., VIDAL, G. Monitoring endocrine activity in kraft mill effluents treated by an Aerobic moving bed bioreactor system. **Water Science e Technology**. Vol. 62, p. 157-161, 2010.



CHAMORRO, S., XAVIER, C., HERNÁNDEZ, V., BECERRA, J., VIDAL, G. Aerobic removal of stigmasterol contained in kraft mill effluents. **Electronic Journal of Biotechnology** Vol.12 n° 2, p. 1–7, 2009.

CNI – Confederação Nacional da Indústria. **Água, indústria e sustentabilidade**. Gerência Executiva de Meio Ambiente e Sustentabilidade – GEMAS. Brasília – DF, 2013.

COLODETTE, J. L. **Química e tecnologia do branqueamento de celulose**. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2001.

COSTIGAN, S. L.; WERNER, J.; OUELLET, J. D.; HILL, L. G.; LAW, R. D. Expression profiling and gene ontology analysis in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver following exposure to pulp and paper mill effluents. **Aquatic Toxicology**. Vol. 122–123, p. 44–55, 2012.

COUTO, R. S., SANROMÁN, M. e GÜBITZ, G. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolourization by crude laccase from *Trametes 95adiate*. **Chemosphere**. Vol. 58, n° 4, p. 417-422, 2005.

DHALIWAL, R. P. S., GARCHA, H. S., KHANNA, P. K. High laccase producing mutants of *Pleurotus florida*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Vol. 8, p. 39-41, 1992.

DIEZ, M. C., CASTILLO, G., AGUILAR, L., VIDAL, G., MORA, M. L. Operational factors and nutrient effects on activated sludge treatment of *Pinus 95adiate* Kraft mill wastewater. **Bioresource Technology**. Vol. 83 p. 131 – 138, 2002.

DYKSTRA, C. M.; GILESA, H. D.; BANERJEEB, S.; PAVLOSTATHIS, S. G. Fate and biotransformation of phytosterols during treatment of pulp and paper wastewater in a simulated aerated stabilization basin. **Water Research** Vol. 68-1, p. 589–600, 2015.

FREIRE, R. S.; PELEGRINE, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**. Vol. 23-4, pag. 505-511, 2000.

GALLIKER, P., HOMMES, G., SCHLOSSER, D., CORVINI, P. F. X., SHAHGALDIAN, P. Laccase-modified silicanano particles efficiently catalyze the transformation of phenolic compounds. **Journal of the Colloid Interface Science**. Vol. 349, p. 98– 105, 2010.

GARCIA, T. A. (2006). **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Tese de mestrado. Programa de Pos-graduação em Biologia Celular. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Brasília – DF, 2006.

GARG, A.; MISHRA, I. M.; CHAND, S. Effectiveness of coagulation e acid precipitation processes for the pre-treatment of diluted black liquor. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 180, p. 158-164, 2010.

GIANFREDA, L., XU. F., BOLLAGE, J-M. Laccases: a useful group of a oxidoreductive enzymes. **Biorremediation Journal**. Vol. 3, p. 1-26, 1999.

GIARDINA, P., FARACO, V., PEZZELLA, C., PISCITELLI, A., VANHULLE, S., SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Vol. 67, p. 369-385, 2010.

GOCHEV, V. K., KRASTANOV, A. I. Fungal laccases, **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. Vol. 13, p. 75-83, 2007.

GRÖTZNER, M. B. **Tratamento de efluente de processo de polpa quimiotermomecânica – CTMP**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**. Vol.13, p.125-135, 1994.

HERMANN, A. C. **Biodegradação dos Antimicrobianos Sulfametoxazol e Trimetoprima por Enzimas Ligninolíticas de Basidiomicetos**. Trabalho de Conclusão de Curso do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

HEROSO, L. F. **Medidor digital de orp e ph para auxílio no tratamento de efluentes**. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso do Programa de Graduação em Engenharia de Computação - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

HEWITT, L. M.; KOVACS, T. G.; DUBÉ, M. G.; McLATCHY, D. L.; MARTEL, P. H.; McMASTER, M. E.; PAICE, M. G.; PARROTT, J. L.; van den HEUVEL, M. R.; van der KRAAK, G. J. Altered reproduction in fish exposed to pulp and paper mill effluents: Roles of individual compounds and mill operating conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Vol. 27-3, p. 682–697, 2008.

HILDÉN, K., HAKALA, T. K., LUNDELL, T. Thermotolerant and thermostable laccases, **Biotechnology Letters**. Vol. 31, p. 1117-1128, 2009.

HINOJOSA, E. A. L. **Remoção de matéria orgânica e cor de efluente kraft por adsorção usando carvão ativado e argila**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

HOFFMANN, H., WOLFF, D. B., SILVA, B. S., PLATZER, C., COSTA, R. H. R. Decantabilidade do lodo e formação de 97adiate97 em reator sequencial por batelada. **Anais do 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Campo Grande – MS, 2005.

HOSSAIN, K., ISMAIL N. Bioremediation and Detoxification of Pulp and Paper Mill Effluent: A Review. **Research Journal of Environmental Toxicology**. Vol. 9, nº 3, p. 113-134, 2015.

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**. Vol. 39, p. 1415-1419, 2004.

HUSAIN, Q., QAYYUM, S. Biological and enzymatic treatment of bisphenol and other endocrine disrupting compounds: a review. **Critical Review Biotechnological**. Vol. 33, p. 260–292, 2013.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Cenários, Estatísticas da Indústria Brasileira de Árvores**, 10º edição. 2016. Acessado em: 16/03/2016. Disponível em: <[http://www.iba.org/shared/destaque/cenarios\\_marco\\_imprensa2016.pdf](http://www.iba.org/shared/destaque/cenarios_marco_imprensa2016.pdf)>

IBRAHIM, M. S., ALI, H. I., TAYLOR, K. E., BISWAS, N., BEWTRA, J. K. Enzyme-catalyzed removal of phenol from refinery wastewater: feasibility studies. **Water Environment Research**. Vol. 73, p. 165-72, 2001.

INPI- Instituto Nacional de Propriedade Industrial. **Banco de patentes**. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>> Acessado em: Dezembro de 2016.

IPPC – Integrated Pollution Prevention and Control. Best Available Techniques (BAT) Reference I for the production of pulp, paper and board. Industrial Emissions Directive. **Joint Reserch Centre: Institute for Prospective Technological Studies, Sustainable Production and Consumption**. Unit European Commission Bureau.Bruxelas. Final Draft July 2015.

JANUSZ, G.; KUCHARZYK, K. H.; PAWLIKA, A.; STASZCZAKA, M.; PASZCZYNSKI, A. J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 52, p. 1-12, 2013.

JARDIM, W. F. Medição e interpretação de valores do potencial redox ( $E_H$ ) em matrizes ambientais. **Química Nova**. Vol. 37, n. 7, p. 1233-1235, 2014.

KAMALI, M.; KHODAPARAST, Z. Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Vol. 114, p. 326-342, 2015.

KEREM, Z.; HADAR, Y. Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during soli-state fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. Vol. 61, p. 3057-3062, 1993.

KLIBANOV, A. M., ALBERTI, B. N., MORRIS, E. D., FELSHIN, L. M. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters. **Journal of Applied Biochemistry**. Vol. 2, p. 414-421, 1980.

KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current Opinion in Biotechnology**. Vol. 33, p. 268-278, 2015.

KUMARAN, S., SASTRY, C. A., VIKINESWARY, S. Laccase, cellulose and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago "hampas". **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Vol. 13, p. 43-49, 1997.

KUNAMNENI, A., BALLESTEROS, A., PLOU, F. J., ALCALDE, M. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. Inc: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Foromatex Research. Vol. 1, p. 233-245, 2007.

LAGOS, C., URRUTIA, R., DECAP, J., MARTÍNEZ, M., VIDAL, G. *Eichhornia crassipes* used as tertiary color removal treatment for Kraft mill effluent. **Desalination**. Vol. 246, p. 45-54, 2009.

LEISOLA, M. S. A., FLECHTER, A. Inc: MIZRAHI, A.; WEZEL, A.L. (eds). New trends in lignin biodegradation. **Advances in Biotechnological Process**. Vol. 5, p. 59-89, 1985.

LEISOLA, M.; WALDNER, R. Inc: ZADRAZIL, F.; REINIGER, P. (eds). Treatment of lignocellulosics with white rot fungi. **Elsevier Applied Science**, p. 37-42, 1988.

LEWIS R., VAN LEEUWEN, J. A., CHOW, C. W.K., EVERSON, A., LEWIS, D. M. Assessment of coagulated and non-coagulated ASB performance used to treat *Pinus 99adiate* sulfite pulp and paper mill effluent by resin fractionation and HPSEC techniques. **Chemical Engineering Journal**. Vol. 213, nº. 2013, p. 109-117, 2012.

LI, H., ZHANG, R., TANG, L., ZHANG, J., MAO, Z. In vivo and in vitro decolorization of synthetic dyes by laccase from solid state fermentation with *Trametes* sp. SYBC-L4. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Vol. 37, nº. 12, p. 2597-2605, 2014.

LIU, T., HU, H., HE, Z., NI, Y. Treatment of poplar alkaline peroxide mechanical pulping (APMP) effluent with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. Vol. 102, p. 7361–7365, 2011.

MADHAVI, V., LELE, S. S. Laccase properties and applications. **Bioresources**. Vol. 4, p. 1694-1717, 2009.

MAYER, A. M., STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme, **Phytochemistry**. Vol. 60, p. 551-565, 2002.

MENEZES, C. R., SILVA, I. S., DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**. Vol. 5, p. 68-78, 2009.

METCALF & Eddy. Inc: TCHOBANOGLOUS, G., BURTON, F. L., STENSEL, H. D. **Wastewater Engineering treatment Disposal Reuse**. Mc Graw Hil Education. 4º Ed., p. 1815, 2003.

MINUSSI, R. C., PASTORE, G. M., DURÁN, N. Potential Laccase in the food industry. **Tends in Food Science e Tecnology**. Vol. 13, p. 205-216, 2002.

MOHAPATRA, D. P., BRAR, S. K., TYAGI, R. D., SURAMPALLI, R. Y. Degradation of endocrine disrupting bisphenol during pre-treatment and biotransformation of wastewaters ludge. **Chemical Engineering Journal**. Vol. 163, p. 273–283, 2010.

MONSALVEZ, E. ; JARPA, M. ; XAVIER, C. R.; VIDAL, G. Evaluación de 99adiate99ico de 99adiate99ic biológicas convencionales para eliminar el potencial 99adiate99ico ver efluentes de celulosa. **SciTopics**. Vol. 29, p. 54-62, 2009.

MORALES, G., PESANTE, S., VIDAL, G. Effects of black liquor shocks on activated sludge treatment of bleached kraft pulp mill wastewater. **Journal of Environmental Science and Health**. Vol. 50, n. 6, p. 639-45, 2015.

MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., SHLEEV, S. V., YAROPOV, Y. I. "Blue" Laccases. **Biochemistry**. Vol. 72, p. 1136-1150, 2007 b.

MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., SHLEEV, S. V., YAROPOV, Y. I. Laccase-mediator systems and their applications: A review. **Applied Biochemistry And Microbiology**. Vol. 43, p. 523-535, 2007 a.

MÜLLER-HAGEDORN, M., BOCKHORN, H., KREBS, L., MÜLLER, U. A comparative kinetic study on the pyrolysis of three different wood species. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. Vol. 68, p. 231-249, 2003.

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 papelreira. In: XIV **Simpósio Nacional de Fermentações**. Florianópolis. Anais. Florianópolis, 2003.

MURUGESAN, K., DHAMIJA, A., NAM, I-H., KIM, Y. M., CHANG, Y. S. Descolourization of reactive black 5 by laccase: Optimization by response surface methodology. **Dyes and Pigments**. Vol. 75, p. 176-184, 2007.

NUNES, J. A. **Tratamento biológico de águas residuárias**. Ver. J. Andrade. 3. Ed., 2012.

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. São Paulo – SP, 2010.

ORREGO, R., GUCHARDI, J., KRAUSE, R., HOLDWAY, D. Estrogenic and anti-estrogenic effects of wood extractives present in pulp and paper mill effluents on rainbow trout. **Aquatic Toxicology**. Vol. 99, p.160-167, 2010.

PACHECO, S. M. V., SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústria papelereiras. **Química Nova**, Vol. 37, p. 209-214, 2014.

PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., SCALONI, A., CAPASSO, A. SANNIA, G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*, **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 272, p. 31301-31307, 1997.

PARANÁ – BR. Conselho Estadual do Meio Ambiente (CEMA). Resolução 081/2010. Dispõe sobre Critérios e Padrões de ecotoxicidade para o Controle de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Paraná. **Diário oficial**. Curitiba – PR, 2010.

PARANÁ (Estado). Conselho Estadual do Meio Ambiente – CEMA. Resolução nº 081 de 16 de outubro de 2010. Dispõe sobre critérios e padrões de ecotoxicidade para o controle de efluentes líquidos lançados nas águas superficiais no Estado do Paraná. **Diário Oficial**. Paraná, Curitiba – PR, 2010.

PIOTTO, Z. C. (2003). **Eco-eficiência na indústria de celulose e papel – estudo de caso**. Tese de Doutorado. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária. São Paulo – SP, 2003.

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. Viçosa – MG, 2005.

RABELO, M. D., BELLATO, C. R., SILVA, C. M., SILVA, M. G. **Aplicação do processo foto-Fenton no tratamento de efluentes de indústria de celulose Kraft branqueada**. 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP, 2006.

RIVA, S. Laccases: Blue enzymes for green chemistry. **Trends biotechnology**. Vol. 24, p. 219-226, 2006.

ROGALSKI, J., JÓZWIK, E., HATAKKA, A., LEONOWICZ, A. Immobilization of laccase from *Phlebia 101adiate* on controlled porosity glass. **Journal of Molecular Catalysis Chemical**. Vol. 95, p. 99-108, 1995.

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. **Química Nova**. Vol. 35, p. 932-938, 2012.

SEIXAS, A. C. M. **Produção e utilização de protease de *Bacillus subtilis* em tratamento de efluente líquido**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Departamento de Engenharia de Alimentos. Campinas – SP, 2006.

SIERRA-ALVAREZ, R., KORTEKAAS, S., VAN EEKERT, M., HARBRECHT, J., LETTINGA, G. The continuous anaerobic treatment of pulping wastewaters. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Vol.70, p.119-127, 1990.

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**. Vol. 37, nº 2, p. 215-220, 2014.

SOUZA, A. F., ROSADO, F. R. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. Vol. 2-1, p.121-139, 2009.

STRONG, P. J., CLAUS H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation, Critical Reviews. **Environmental Science and Technology**. Vol. 41, p. 373-434, 2011.

TAVARES, A. P. M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira**. Tese de Doutorado. Universidade de Aveiro. Departamento de Química, 2006.

TEERAPATSAKUL, C., ABE, N., BUCKE, C., KONGKATHIP, N., JAREONKITMONGKOL, S., CHITRADON, L. Novel lacases of *Ganoderma* sp. KU-Alk4, regulated by different glucose concentration in alkaline media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Vol. 23, p. 1559-1567, 2007.

TUOR, U., WINTERHALTER, K., FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**. Vol. 41, p. 1-17, 1995.

VILLAMAR, C. A., JARPA, M., DECAP, J., VIDAL, G. Aerobic moving bed bioreactor performance: a comparative study of removal efficiencies of kraft mill effluents from *Pinus 102adiate* and *Eucalyptus globulus* as raw material. **Water Science Technology**. Vol. 59, p. 507-514, 2009.

VILLELA, S. M. **Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papelereiras**. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC, 2006.

VISWANATH, B., RAJESH, B., JANARDHAN, A., PRAVEEN, A. K., NARASIMHA, G. Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. **Enzyme Research**. Vol. 2014, p. 1 – 21, 2014.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Vol. 1: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais. 4º ed., 452 p, 2005.



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**. Vol. 267, n° 33, p. 23688-23695, 1992.

WAYE, A., ANNAL, M., TANG, A., PICARD, G., HARNOIS, F., GUERRERO-ANALCO, J. A., SALEEM, A., HEWITT, L. M., MILESTONE, C. B., MACLATCHY, D. L., TRUDEAU, V. L., ARNASON, J. T. Canadian boreal pulp and paper feed stocks contain neuroactive substances that interact in vitro with GABA and dopaminergic systems in the brain. **Science of the Total Environment**. Vol. 469, p. 315–325, 2014.

WHITELEY, C. G., LEE, D. J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol. 38, p. 291-316, 2006.

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**. Vol. 36, p. 412-416, 2011.

## APÊNDICE A – Resumo dos métodos utilizados

### Demanda Química de Oxigênio – DQO

Metodologia adaptada do método 5220 D (APHA, 2005).

Em tubos de 10 mL com tampas rosqueáveis, foram adicionados 2,0 mL das amostras filtradas, 2,0 mL de solução digestora (10,216 g de  $K_2Cr_2O_7$ , 33 g de  $HgSO_4$  e 168 mL de  $H_2SO_4$  concentrado foram adicionados em um balão volumétrico de 1 L e completado com água destilada) e 2,0 mL de solução catalítica (10,7 g  $AgSO_4$  dissolvido em  $H_2SO_4$  até completar o volume de um balão de 1 L). Os tubos foram rosqueados firmemente, homogeneizados com cuidado e colocados no digestor por 2 horas a  $150^\circ C$ . Após a digestão, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e submetidas à leitura de absorbância de 600 nm em espectrofotômetro UV-vis (Cary-win50), utilizando cubeta de quartzo (10 mm). A concentração da DQO ( $mg\ O_2\ L^{-1}$ ) foi obtida a partir de uma curva de calibração utilizando reagente biftalato de potássio padrão (Merck). A seguir é mostrado uma das curvas de calibração do método realizada durante o experimento. Sempre que necessário realizou-se diluição da amostra para adequação à curva analítica (Figura A).

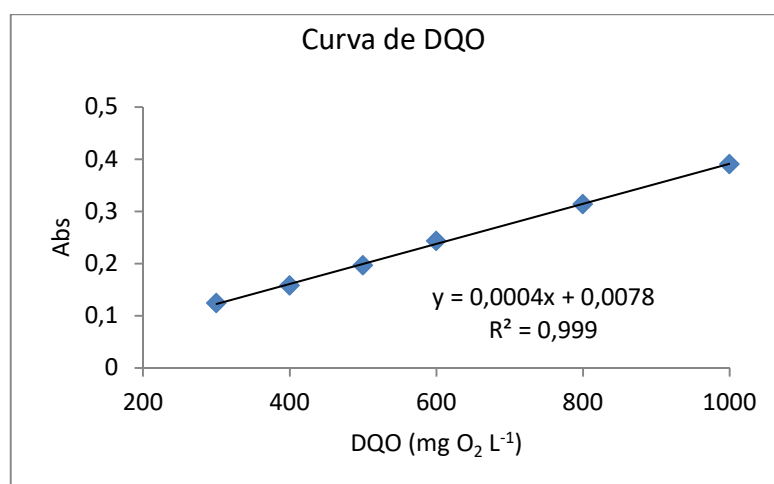


Figura A1: Curva analítica para determinação da DQO.

### Demanda Bioquímica de Oxigênio após 5 dias– DBO<sub>5,20</sub>

Metodologia adaptada do método 5210 B (APHA, 2005).

Utilizando frascos Winkler de 300 mL, foram adicionados 0,3 mL de solução tampão fosfato, 0,3 mL da solução de sulfato de magnésio, 0,3 mL de solução de cloreto de cálcio, 0,3 mL de solução de cloreto férrico, 2,0 mL da amostra filtrada e completado o volume com água aerada por 24 horas e previamente desligada por 30 minutos. Os frascos Winkler foram preparados em duplicata e um fez-se a leitura de oxigênio dissolvido no mesmo dia e após 5 dias incubado em temperatura de  $20^\circ C$ . Na amostra a ser lida no dia foi adicionado 1 mL de solução de Sulfato de manganês e 1 mL de solução de iodeto-azida alcalina. Após agitar suavemente foi colocado em repouso por 15 minutos antes de adicionar 1 mL de  $H_2SO_4$  (98 %). Em seguida um volume conhecido da amostra foi titulado com solução de tiosulfato de sódio  $0,0125\ mol\ L^{-1}$ , com fator de correção conhecido. Após anotar o volume gasto de

tiosulfato de sódio na titulação da amostra, o volume gasto e o volume da amostra usada foram aplicados na Equação A1 a seguir:

$$OD = \frac{Vg \cdot 0,0125 \cdot FC \cdot 8000 \cdot 300}{100 \cdot Va} \quad (\text{Equação A1})$$

Em que: OD = Oxigênio dissolvido ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ ); Vg = Volume gasto na titulação (mL); FC = fator de correção obtido na padronização da solução de tiosulfato de sódio; Va = volume da amostra (mL). A determinação da  $\text{DBO}_{5,20}$  ( $\text{mg/L}$ ) se fez pela diferença entre o valor da OD lida no primeiro dia menos a OD lida no 5 dia.

### Cor

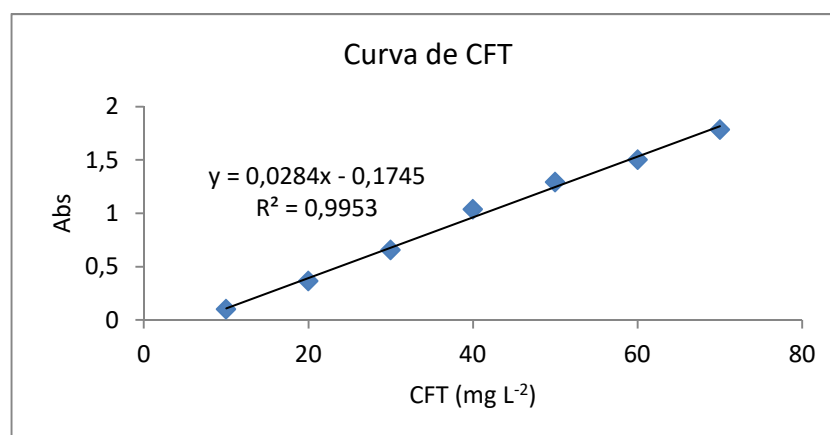
Metodologia  $\text{VIS}_{440}$  (CEÇEN, 2003).

Fez-se o ajuste do pH das amostras filtradas para 9,0 utilizando NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ). Em seguida as amostras foram submetidas à leitura de absorvância de 440 nm em espectrofotômetro UV-vis (Cary-win50), utilizando cubeta de quartzo (10 mm). Sempre que necessário se fazia diluição da amostra obter valores de absorvância  $< 1$ .

### Compostos Fenólicos Totais – CFT

Metodologia adaptada do método 5530 D (APHA, 2005).

Utilizando tubos rosqueáveis, adicionou-se 2,0 mL das amostras filtradas, 2,0 mL de solução tampão de diidrogênio fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaOH e água destilada) em cada tubo. Os tubos foram rosqueados, homogeneizados com cuidado e submetidos à leitura de absorvância de 215 nm em espectrofotômetro UV-vis (Cary-win50), utilizando cubeta de quartzo (10 mm). A concentração de compostos fenólicos da amostra, em  $\text{mg L}^{-1}$ , foi obtida a partir de uma curva analítica utilizando reagente fenol padrão (Merck). Na Figura B é mostrado uma das curvas de analítica do método realizada durante o experimento. Sempre que necessário realizou-se diluição da amostra para adequação à curva analítica.



**Figura A2:** Curva analítica para determinação da concentração dos CFTs.

### **Compostos Lignínicos**

Metodologia UV<sub>280</sub> (CEÇEN, 2003).

Fez-se o ajuste do pH das amostras filtradas para 7,0, utilizando solução de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 mol L<sup>-1</sup>). Em seguida as amostras foram submetidas à leitura de absorvância de 280 nm em espectrofotômetro UV-vis (Cary-win50), utilizando cubeta de quartzo (10 mm). Sempre que necessário se fazia diluição da amostra para obter valores de absorvância < 1.

### **Área Espectral**

Metodologia UV<sub>200</sub>-VIS<sub>800</sub> (SALVADOR, MARCOLINO, PERALTA-ZAMORRA, 2012).

Fez-se o ajuste do pH das amostras filtradas para 7,0 utilizando NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 mol L<sup>-1</sup>). Em seguida as amostras foram submetidas à varredura da absorvância de 200 à 800 nm, em espectrofotômetro UV-vis (Cary-win50), utilizando cubeta de quartzo (10 mm). Sempre que necessário se fazia diluição da amostra para obter valores de absorvância < 1. Os valores medidos foram aplicados em software Origin para cálculo da integral da curva obtida.

### **Ecotoxicidade aguda em *Daphnia magna***

NBR 12713 (ABNT, 2009).

Para os ensaios de ecotoxicidade aguda foram utilizados filhotes *Daphnia magna* (neonatos entre 2 e 24 horas de vida) de um mesmo lote, com as mesmas condições de cultivo e idade. Os filhotes foram submetidos a concentrações de 6,25%; 12,5%; 25%; 50% e 100% do efluente, e um controle utilizando-se água de diluição. Cada concentração foi avaliada em triplicata, mantida nas mesmas condições de temperatura que o cultivo e protegido da luz. Em cada béquer de 50 mL foram adicionados 20 neonatos em 40 mL das respectivas concentrações do efluente e do controle. O efeito agudo foi estimado pelo Fator de Toxicidade (FT), que é a unidade que representa quantas vezes o corpo receptor precisaria diluir o efluente para que ele deixe de ser tóxico para os organismos.

### **Sólidos Suspensos Totais e Voláteis – SST/SSV**

Método 2540 D e E (APHA, 2005).

Utilizando membranas de fibra de vidro de 1,2 µm, fez-se a filtração de um volume conhecido das amostras, em seguida as membranas contendo os sólidos retidos foram colocadas em cápsulas de porcelana previamente calcinadas e pesadas (P1), e ficaram na estufa a 105°C por 24 horas. Após o conjunto cápsulas-membranas ser retiradas da estufa e resfriada em dessecador, fez-se uma nova pesagem, subtraindo o peso de uma membrana deixada na estufa na temperatura de 105°C durante 2 horas (P2). Em seguida o conjunto foi colocado na mufla a 550°C por 1 hora. Após o resfriamento do conjunto em dessecador, fez-se uma terceira pesagem, subtraindo o peso de uma membrana deixada na mufla em 550°C por 40 minutos (P3). O valor de Sólidos Suspensos Totais (SST) e Fixos (SSF) foram obtidos aplicando as três pesagens na fórmula a seguir:

$$\text{SST} = \frac{P2-P1}{v} \quad (\text{Equação A2})$$

Os sólidos suspensos voláteis foi obtido por meio da diferença entre SST e SSF.

$$\text{SSF} = \frac{P3-P1}{v} \quad (\text{Equação A3})$$

$$\text{SSV} = \text{SST} - \text{SSF} \quad (\text{Equação A4})$$

Em que: P1= Peso dos cadinhos calcinados sem a amostra; P2= Peso dos cadinhos com amostra após 24 horas na estufa; P3= Peso dos cadinhos com amostra após 2 horas na mufla.

### **Determinação do Índice Volumétrico de Lodo (IVL)**

Adaptado de APHA (2005) e Hoffmann et al. (2005).

Usou-se uma proveta de 100 mL, esperando decantação de 30 min. O resultado dos volume de Sólidos Sedimentados (SSed) depois de 30 minutos, entrou na seguinte equação para o cálculo do Índice Volumétrico do lodo:

$$\text{IVL} = \frac{\text{SSed}_{30 \text{ min}} (\text{mL L}^{-1})}{\text{SST} (\text{g L}^{-1})} \quad (\text{Equação A5})$$

Quando o nível do lodo se manteve acima de 25 mL depois de 30 min, a amostra foi diluída e a decantação repetida, sendo o resultado multiplicado pelo fator de diluição.

### **Produção do Extrato Fúngico de *Pleurotus ostreatus***

Metodologia proposta por Menezes, Silva e Durrant (2009).

A cepa de *Pleurotus ostreatus* utilizada foi obtida no banco de cepas fúngicas do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ecoville. A manutenção do fungo para repique foi feito em placas de Petri com Ágar Batata Dextrose (PDA) com incubação em estufa a 28°C e armazenamento a 4°C. O inóculo foi preparado em frascos erlenmeyer contendo 50 mL de extrato de malte (20 g L<sup>-1</sup>) crescido durante 5 dias a 28°C. Os cultivos líquidos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados: 5 gramas de bagaço de cana de açúcar seco, 2,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte, 2,5 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 μM de CuSO<sub>4</sub>, 10 mL de uma solução basal de sais contendo 1,4 g L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>, 0,3 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>, 0,005 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>, 0,00156 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>, 0,002 g

$L^{-1}$  de  $CoCl_2$  e  $0,0014 g L^{-1}$  de  $ZnSO_4$ . O pH foi ajustado para 5,5 com  $HCl 0,5 mol L^{-1}$  ou  $NaOH 0,5 mol L^{-1}$ . Todos os cultivos ficaram em estufa a  $28^{\circ}C$ , em regime estático durante o período de 120 h. A umidade inicial foi ajustada para 75-80% com a adição de água destilada seguindo a equação:

$$mH_2O = \frac{ms(X_2 - X_1)}{(1 - X_2)} \quad \text{Equação A6}$$

Onde:  $mH_2O$  = massa de água para adicionar,  $ms$  = massa de bagaço seco,  $X_1$  = % de umidade inicial do substrato,  $X_2$  = % final de umidade.

Para extração da lacase, 5,0 g do fermentado foi homogeneizado em 50,0 mL de água deionizada, com auxílio de agitador magnético durante 20 minutos. Esta mistura foi filtrada em papel de trinitrotolueno (TNT) e centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos, seguida por nova filtração do sobrenadante em papel filtro qualitativo e submetido à determinação da atividade enzimática.

### Produção do Extrato Fúngico de *Trametes sp.*

Metodologia adaptada do método de Hermann (2015).

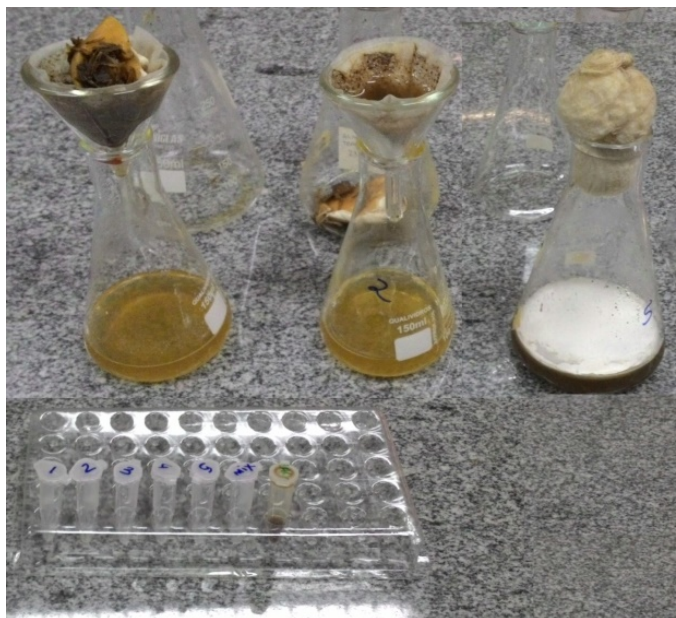
A cepa de *Trametes sp.* utilizada foi obtida de cultivos do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Ecoville. A cultura foi inoculada em placas de Petri contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar), e incubada por sete dias, a  $28^{\circ}C$  e em seguida foi armazenada a temperatura de  $4^{\circ}C$ , para posterior retirada do inóculo (plug de 12 mm) que foi posicionado no centro de uma placa contendo meio PDA, cultivada por mais sete dias, no escuro e em temperatura de  $28^{\circ}C$ . No sétimo dia de crescimento, o micélio foi utilizado como inóculo dos cultivos líquidos. O cultivo sólido é mostrada na Figura A3.



**Figura A3:** Amostra do crescimento fúngico em cultivo sólido.

Os cultivos líquidos foram realizados em frascos erlenmeyer de 250 mL, nos quais foram adicionados 50 mL de água destilada, Glicose ( $10 g L^{-1}$ ), Peptona ( $0,5 g L^{-1}$ ), casca de arroz ( $1 g L^{-1}$ ), bagaço de uva Bordô (*Vitis labrusca*) ( $0,5 g L^{-1}$ ),  $KH_2PO_4$  ( $3 g L^{-1}$ ),  $MnSO_4$  (1 mM) e  $CuSO_4$  (1 mM). Os meios foram autoclavados ( $121^{\circ}C$  por 15 min), e após resfriamento, foram inoculados (três plugs 12 mm) e fechados com algodão e gaze. Os cultivos foram mantidos no escuro e a  $28^{\circ}C$ , por sete dias, após esse tempo os meios de

cultivo foram submetidos à filtração em papel filtro. O filtrado foi centrifugado por 20 minutos a 5000 rpm. Alíquotas do extrato bruto obtido foram utilizadas para a determinação da atividade enzimática e o restante foi congelado em alíquotas de 1,5 mL para posterior aplicação. Na Figura A4 vê-se a extração do cultivo líquido.



**Figura A4:** Separação do extrato fúngico produzido em cultivo líquido

#### Atividade enzimática Lacase

Metodologia adaptada do método de Hou et al. (2004).

Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,55 mL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5,0) e 300  $\mu$ L de ABTS (10 mM). Em banho termostático, a reação ocorreu em temperatura de 40°C com a adição de 150  $\mu$ L do extrato enzimático bruto. A reação foi quantificada no quinto minuto por meio da medição da absorbância em um espectrofotômetro Bel (modelo UV-M51 UV/VIS). A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 420 nm. O valor medido foi utilizado na equação a seguir:

$$U \cdot L^{-1} = \frac{\Delta abs}{\epsilon \cdot V \cdot t} \cdot 10^6 \quad \text{Equação A7}$$

Onde:

$\Delta abs$ : Absorbância final menos absorbância inicial;  $\epsilon$ : coeficiente de extinção molar do ABTS oxidado ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) a 420 nm ( $\epsilon = 36\,000 \, L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ); V = volume de extrato enzimático (L); T = tempo de reação (minutos); e U = corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de oxidação de 1  $\mu$ mol de ABTS por minuto.

#### Atividade enzimática LiPs

Metodologia adaptada do método de Archibald (1992).

Em um tubo de ensaio pequeno foi adicionado 1 mL de tampão tartarato de sódio (125 mM em pH 3), 500  $\mu$ L da solução de Azure B (160 mM) e 500  $\mu$ L de extrato enzimático filtrado. A mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo e adicionada 500  $\mu$ L da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mM), iniciando a ação da LiP. Muito rapidamente foi tampada a cubeta, homogeneizada a solução e inserida no UV-Vis. A leitura foi iniciada no modo Kinectis a 651 nm e acompanhada até estabilizar (240 segundos sem alteração). No extrato enzimático de *Trametes* sp. analisado não foi detectada atividade para essa enzima.

#### **Atividade enzimática MnPs**

Metodologia adaptada do método de Wariishi, Valli e Gold (1992).

Em um tubo de ensaio pequeno foi adicionado 2,1 mL de tampão malonato (50 mM em pH 4,5), 300  $\mu$ L da solução de MnSO<sub>4</sub> (10 mM), e 300  $\mu$ L de extrato enzimático filtrado. A mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo e em seguida adicionado 300  $\mu$ L da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM), iniciando a ação da MnP. No UV-Vis iniciou-se a leitura de absorbância no modo Kinectis a 270 nm. A leitura foi acompanhada até não haver variações em até 240 segundos. Para os valores máximos de absorbância que ultrapassaram 0,90 foi efetuada diluições do extrato enzimático e repetido o procedimento. Após a medida da absorbância a atividade de MnP foi dada pela equação:

$$\text{Ativ} = \text{Abs} \cdot \text{Fator} \cdot \text{Diluição} \quad \text{Equação A8}$$

Em que: Ativ. = Atividade enzimática; Fator = 172,56 (abs. em 5 min) ou 862,81 (abs. em 1 min).



**APÊNDICE B – ANOVA dos efeitos de pH, Temperatura e atividade enzimática na remoção dos parâmetros**

**Quadro 1:** ANOVA para o parâmetro de Demanda Química de Oxigênio.

<b>Fator</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1)Temperatura	1127,64	1	1127,64	71,0767	0,000000
(2)pH	2593,33	1	2593,333	163,4614	0,000000
(3) Atividade	57,013	1	57,013	3,5936	0,074176
1 by 2	207,273	1	207,273	13,0647	0,001982
1 by 3	3,178	1	3,178	0,2003	0,659812
2 by 3	4,255	1	4,255	0,2682	0,610866
Falta de ajuste	195,695	1	97,848	6,1675	0,009119
Puro erro	285,572	2	15,865		
Total SS	4487,003	18			
R <sup>2</sup>	0,89274	26			

**Quadro 2:** ANOVA para o parâmetro de Cor.

<b>Fator</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1)Temperatura	405,57	1	405,57	38,451	0,000007
(2)pH	24243,61	1	24243,61	2298,447	0,000000
(3) Atividade	489,17	1	489,17	46,377	0,000002
1 by 2	370,28	1	370,28	35,105	0,000013
1 by 3	465,02	1	465,02	44,087	0,000003
2 by 3	429,94	1	429,94	40,761	0,000005
Falta de ajuste	1069,64	1	534,82	50,704	0,000000
Puro erro	189,86	2	10,55		
Total SS	27647,21	18			
R <sup>2</sup>	0,95444	26			

**Quadro 3:** ANOVA para o parâmetro de Compostos Fenólicos Totais.

<b>Fator</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1)Temperatura	415,8	1	415,8	19,8046	0,000309
(2)pH	16612,76	1	16612,76	791,2733	0,000000
(3) Atividade	8,35	1	8,35	0,3979	0,536095
1 by 2	8,48	1	8,48	0,404	0,533036
1 by 3	36,52	1	36,52	1,7392	0,203768
2 by 3	5,45	1	5,45	0,2598	0,61646
Falta de ajuste	704,81	1	704,81	16,7851	0,000077
Puro erro	377,91	2	352,4		
Total SS	18194,86	18	20,99		
R <sup>2</sup>	0,94049	26			

**Quadro 4:** ANOVA para o parâmetro de Compostos Lignínicos.

<b>Fator</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1)Temperatura	0,01	1	0,01	0,03	0,857754
(2)pH	12854,85	1	12854,85	28826,33	0,000000
(3) Atividade	13,71	1	13,71	30,74	0,000029
1 by 2	6,8	1	6,8	15,25	0,001038
1 by 3	83,49	1	83,49	187,22	0,000000
2 by 3	0,29	1	0,29	0,65	0,430251
Falta de ajuste	741,86	1	370,93	831,79	0,000000
Puro erro	8,03	2	0,45		
Total SS	13710,78	18			
R <sup>2</sup>	0,94531	26			

**Quadro 5:** ANOVA para o parâmetro de Área Espectral.

<b>Fator</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1)Temperatura	23,61	1	23,61	88,96	0,000000
(2)pH	13404,82	1	13404,82	50505,38	0,000000
(3) Atividade	271,58	1	271,58	1023,23	0,000000
1 by 2	1,18	1	1,18	4,46	0,048884
1 by 3	57,72	1	57,72	217,46	0,000000
2 by 3	180,33	1	180,33	679,41	0,000000
Falta de ajuste	611,02	1	305,51	1151,07	0,000000
Puro erro	4,78	2	0,27		
Total SS	14561,69	18			
R <sup>2</sup>	0,95771	26			

**Quadro 5:** ANOVA para o parâmetro de Turbidez.

<b>Fator</b>	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
(1)Temperatura	64400,1	1	64400,1	19146,94	0,000000
(2)pH	77541,6	1	77541,6	23054,07	0,000000
(3) Atividade	0,4	1	0,4	0,12	0,735398
1 by 2	47984,8	1	47984,8	12266,46	0,000000
1 by 3	748,6	1	748,6	222,58	0,000000
2 by 3	188,9	1	188,9	56,17	0,000001
Falta de ajuste	1367	1	683,52	203,22	0,000000
Puro erro	60,5	2	3,36		
Total SS	191845,3	18			
R <sup>2</sup>	0,95771	26			

## ANEXO 1 – Catálogo com especificações técnicas do NOVOZIM 51003

**SIGMA-ALDRICH**<sup>®</sup>[sigma-aldrich.com](http://sigma-aldrich.com)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)Email USA: [techserv@sial.com](mailto:techserv@sial.com)Outside USA: [eurtechserv@sial.com](mailto:eurtechserv@sial.com)**Product Specification**Product Name:  
Laccase from *Aspergillus* sp.

Product Number: SAE0050

Storage Temperature: 2 - 8 °C

**TEST****Specification**

Activity

≥ 1000

Laccase Units (LAMU/g)

One LAMU is defined as the amount of enzyme which oxidizes 1 micromole syringaldazine per minute at pH 7.5 at 30 Deg C.

Specification: PRD.1.ZQ5.10000068357

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at [Sigma-Aldrich.com](http://Sigma-Aldrich.com). For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.