

IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LACASE E SEU USO NA BIODEGRADAÇÃO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS PAPELEIRAS**Sabrina M. V. Pacheco^{a,*} e Carlos Henrique L. Soares^b**^aInstituto Federal de Santa Catarina, 88495-000 Garopaba – SC, Brasil^bDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis – SC, Brasil

Recebido em 26/03/2013; aceito em 04/09/2013; publicado na web em 24/09/2013

IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE AND ITS USE IN THE BIODEGRADATION OF PAPER MILL EFFLUENT. Laccase from *Aspergillus sp* was immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. A comparative study between free and immobilized laccase was conducted and the potential of the resulting immobilized derivative in the biodegradation of pulp and paper mill effluent was evaluated. The immobilized laccase is more resistant to various denaturing conditions, which allows for the reduction of 65% of the phenols (total and low molecular weight) and loss of 60% of total color in the effluent. These results show the potential of the immobilized laccase in the biodegradation of phenols, the chemical agents responsible for the high toxicity of the effluent generated in cellulose pulp industries.

Keywords: laccase; immobilization; paper mill effluents.

INTRODUÇÃO

As indústrias de papel e celulose produzem um grande volume de efluentes, cujas características variam dependendo do processo de fabricação utilizado. O processo de fabricação do papel resume-se nas seguintes etapas: corte da madeira e peneiramento, polpação, branqueamento da polpa obtida e fabricação do papel, sendo que os efluentes mais tóxicos são gerados na etapa de branqueamento da polpa.¹ Para a realização do branqueamento da polpa vários agentes podem ser utilizados, dentre os quais é possível citar o oxigênio, peróxido de hidrogênio, ozônio, ácido paracético, hipoclorito de sódio e o dióxido de cloro. Entre um estágio de branqueamento e outro, a polpa é lavada com elevada quantidade de água para a remoção das substâncias responsáveis pela cor da mesma. Nos processos mais modernos, o oxigênio é normalmente utilizado no primeiro estágio de branqueamento. Neste aspecto, existe uma tendência geral em não utilizar qualquer tipo de substância clorada utilizando o chamado branqueamento “total chlorine-free” (TCF) ou branqueamento totalmente livre de cloro.² Contudo, o processo tradicional de branqueamento ainda é utilizado por algumas fábricas, que, por sua vez, ocorre quando as polpas são branqueadas por cloro molecular (Cl₂), seguido de sucessivas extrações alcalinas com NaOH concentrado. Dessa forma, os efluentes gerados na etapa de branqueamento são constituídos de uma grande diversidade de compostos organoclorados. Esses compostos são de difícil biodegradação, podem exercer significativo efeito tóxico à comunidade biológica e conferem aos efluentes cores e altas cargas de matéria orgânica consumidora de oxigênio.³ Além de compostos organoclorados, os efluentes também contêm ácidos carboxílicos aromáticos, clorados e não clorados, ligninas de alta e baixa massa molar e seus produtos de degradação.³⁻⁵ Os tratamentos dos efluentes mais empregados por essas indústrias são as lagoas de estabilização, lagoas de aeração e o lodo ativado, que são eficientes na redução de demanda química de oxigênio (DQO) e na fração de compostos fenólicos de baixa massa molar. No entanto, não reduzem a fração de compostos fenólicos de alta massa molar. Os tratamentos convencionais também não reduzem a cor dos efluentes, que por sua vez, é atribuída principalmente aos compostos fenólicos de alta massa molar.⁶⁻⁸ Considerando isso, outros métodos,

principalmente relacionados à etapa de branqueamento das polpas e ao tratamento desses efluentes, vêm sendo estudados, dentre eles merecem destaque os processos enzimáticos que visam a utilização de enzimas lignolíticas extracelulares obtidas de fungos degradadores de madeira. Dentre a vasta diversidade de enzimas lignolíticas existentes, encontram-se as lacases.^{5,9-12}

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas que catalisam, por abstração de um elétron, uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos incluindo mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas com concomitante redução de oxigênio para água. As lacases vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como a biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais,¹³ a descoloração de corantes,¹³ a biorremediação de solos contaminados,¹³ a produção de bioetanol,^{14,15} a clarificação de vinhos e chás e a produção de biossensores.¹³ No entanto, as aplicações citadas para as lacases possuem menor viabilidade com a utilização das mesmas na forma livre, ou seja, seu uso efetivo é normalmente dificultado devido às mesmas estarem sujeitas a fatores químicos, físicos e biológicos que limitam sua vida útil durante uso ou estocagem. Muitas destas características indesejáveis podem ser removidas ou amenizadas com o uso das enzimas na forma imobilizada.^{13,16} A definição para enzimas imobilizadas recomendada pela Primeira Conferência sobre Engenharia Enzimática de 1971 diz que as enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma certa região definida no espaço com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser usadas repetida e continuamente.^{16,17} O confinamento das enzimas em suportes sólidos proporcionam diversas vantagens sobre as enzimas livres, tais como promover maior estabilidade operacional, aumentar a vida útil da enzima e facilitar a separação do produto do catalisador, em processos analíticos e em reatores de fluxo contínuo.¹⁶ Vários tipos de suportes sólidos vêm sendo estudados para a imobilização das lacases, dentre eles destaca-se a quitosana.^{18,19} A quitosana é o derivado mais importante da quitina, possuindo várias propriedades físicas, químicas e biológicas que tornam este polímero muito versátil quimicamente quando comparado à quitina.²⁰ Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi promover a imobilização da lacase em esferas de quitosana e avaliar seu potencial de biodegradação do efluente coletado de uma indústria papelreira de Santa Catarina.

*e-mail: sabrinap@ifsc.edu.br

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

A quitosana e a lacase de *Aspergillus niger* recombinante (DENILITE TMII BASE) foram doadas respectivamente pelo Laboratório QUITTECH - Departamento de Química (UFSC) e NOVOZYMES®. A siringaldazina e o glutaraldeído 25% (v/v) foram adquiridos, respectivamente, da SIGMA e VETEC. A quitosana utilizada apresentou as seguintes características: Grau de desacetilação de 72,5%, massa molar média de 83,79 kDa e área específica de 4,86 m²/g. O efluente foi coletado da indústria de papel e celulose KLABIN S.A. da região de Correia Pinto - Santa Catarina, produtora de polpas não branqueadas, e apresentou as seguintes características: pH = 8,1; condutividade = 1,225 mS; DQO = 1748 mg/L e DBO = 750 mg/L.

Preparo e ativação das esferas de quitosana

Foi preparada uma solução de quitosana 33,3 g/L utilizando como solvente ácido acético 5%. Esta solução foi gotejada em uma solução NaOH 1,0 mol L⁻¹ com uma bomba peristáltica (PERIMAX-12 SPETEC). Em seguida, as esferas permaneceram no banho de precipitação por 6h e, posteriormente, foram lavadas com água ultrapura até o pH da solução resultante ter atingido um valor próximo a 8,0.^{21,22} Para o processo de ativação, foi incubada uma proporção aproximada de 10 g de esferas de quitosana por mL de solução de glutaraldeído 3% (v/v) por 6 h.²³ Em seguida, as esferas foram lavadas com três volumes de 150 mL de água destilada.

Imobilização da lacase nas esferas de quitosana ativadas

A imobilização consistiu em incubar, uma proporção aproximada de 10 g de esferas de quitosana por 1 mL de solução de lacase 0,5 g/L, por 5h, a 25 °C e sob agitação de 100 rpm. O sistema permaneceu em um shaker (CERTOMAT - BS-1). Na sequência, as esferas foram lavadas com 150 mL de água destilada e armazenadas em geladeira até o uso. Para a enzima livre e imobilizada, foram realizadas as determinações enzimáticas utilizando-se o método que se baseia na oxidação de siringaldazina para sua forma quinona, que apresenta absorção à 525 nm ($\epsilon = 65.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).²⁴ Os dados foram obtidos com o auxílio de um espectrofotômetro Hewlett-Packard. Para determinação da atividade foram utilizados: 500 μL de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0, 50 μL de solução enzimática 0,5 g/L ou 0,07 g de suporte com enzima e 25 μL de solução alcoólica de siringaldazina (0,5 g/L) em uma cubeta de quartzo de 1 mL ou cubeta de vidro de 3 mL para o caso da enzima imobilizada. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima livre ou imobilizada necessária para oxidar 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de substrato por minuto em 1 mL de solução ou 1 g de suporte.

Propriedades bioquímicas e cinéticas da lacase livre e imobilizada em quitosana

Para conhecer o pH que favorece a maior atividade enzimática, a reação citada anteriormente foi acompanhada a 25 °C em tampões tartarato (0,1 mol L⁻¹) pH 3,0 a 5,5 e, em tampões fosfato (0,1 mol L⁻¹) pH 6,0 a 8,0. A determinação das propriedades cinéticas (KM e Vmáx) foi realizada com três substratos: ABTS (ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato) (MERCK), siringaldazina (SIGMA) e vermelho de fenol (VETEC). Os parâmetros cinéticos KM e Vmáx foram calculados a partir do ajuste na equação de Michaelis-Menten dos dados de velocidade de oxidação e concentração de substrato usando o software ENZFITTER (Elsevier-Biosoft, Cambridge, UK).

Testes de estabilidade da lacase

Para a determinação da estabilidade enzimática frente a diferentes inibidores, os mesmos foram adicionados na solução usada para os ensaios de atividade enzimática descritos no item anterior. Os volumes dos inibidores foram adicionados na solução de modo que as concentrações finais da mesma variassem de 0 a 180 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no instante inicial em que todos os reagentes foram misturados. Os inibidores usados na mistura de reação para os ensaios de atividade enzimática foram: EDTA (CAAL), K₃[Fe(CN)₆] (CINÉTICA QUÍMICA), NaN₃ (DIFCO), K₂Cr₂O₇ (CINÉTICA QUÍMICA) e H₂O₂ (MERCK). Os inibidores citados foram escolhidos por serem os tipos de substâncias que sabidamente inibem a atividade das enzimas, de modo geral.

Para a determinação da estabilidade térmica, as enzimas livre (solução 0,5 g/L - 20 U) e imobilizada (0,07 g de suporte + enzima) foram adicionadas em 500 μL de tampão tartarato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0 e pré-incubadas a temperaturas de 25 a 70 °C. Para os ensaios de atividade enzimática relativa foram retiradas alíquotas de 50 μL após 30 minutos de incubação. Os cálculos dos ensaios de atividade enzimática relativa foram realizados levando-se em consideração a razão entre a atividade enzimática final (após o período de incubação) e atividade enzimática inicial (antes do período de incubação).

Para a determinação de estabilidade frente a diferentes solventes, as enzimas livre (solução 0,5 g/L - 20 U) e imobilizada (0,07 g de suporte + enzima) foram incubadas com soluções de etanol (NUCLEAR), dioxano (NUCLEAR), acetato de etila (GRUPO QUÍMICA), acetona (NUCLEAR) e glutaraldeído (VETEC) em concentrações finais de solução entre 0 e 90%. Os ensaios de atividade enzimática foram realizados após 30 minutos de incubação da enzima com os solventes utilizando o mesmo método do item anterior.

O efeito do uso repetido foi determinado, no qual as esferas pesando aproximadamente 0,07 g e contendo a enzima imobilizada foram adicionadas em uma cubeta de 3 mL contendo 1 mL de tampão tartarato (0,1 mol L⁻¹) pH 4,0 e 25 μL de siringaldazina (0,5 g/L) para a realização dos ensaios de atividade enzimática. Após completa oxidação do substrato, as esferas foram lavadas com 100 mL de água destilada a 25 °C em uma peneira plástica. A oxidação final do substrato foi avaliada por meio da queda total de absorbância, quando a leitura da solução foi realizada em 525 nm com o auxílio de um espectrofotômetro. Após a etapa de lavagem, o mesmo método para a realização do ensaio de determinação de atividade enzimática foi repetido cinco vezes.

Ensaio de biodegradação do efluente com a enzima imobilizada

Em erlenmeyers de 1000 mL foram adicionados 412,5 mL de efluente misturados com 87,5 mL de tampão tartarato (17,5% v/v) 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5 e incubados com 2 g de suporte com enzima imobilizada ou equivalente a, aproximadamente, 120 esferas. Com base em uma amostra de 12 esferas foi possível estimar que, em média, cada esfera apresentou 0,5 U. Um segundo grupo de frascos foi incubado com os mesmos componentes, porém, com o suporte sem a enzima imobilizada, para a obtenção de valores do controle negativo. Os frascos foram mantidos sob aeração e temperatura de 25 °C. A aeração nos frascos foi realizada com auxílio de uma bomba de aquário de 1,5 W. Para determinação das modificações químicas causadas no efluente, após tratamento de 24h, foram analisados os seguintes parâmetros: fenóis totais,²⁵ fenóis totais de baixa massa molar,²⁵ medidas de cor,²⁶ característica da cor,²⁶ demanda química de oxigênio (DQO)²⁵ e determinação de grupos ionizáveis utilizando titulação potenciométrica.⁴ Para os resultados observados foi realizado o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey utilizando o software STATISTICA 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Propriedades bioquímicas e cinéticas da lacase livre e imobilizada em quitosana

Adotando as condições de imobilização previamente otimizadas, foi obtido um derivado imobilizado com atividade enzimática de 20 U/g.²³ A determinação do pH ótimo das lacases livre e imobilizadas em quitosana foi realizada pela variação do valor do pH do substrato numa faixa de 3,0 a 5,5, a 25 °C (Figura 1).

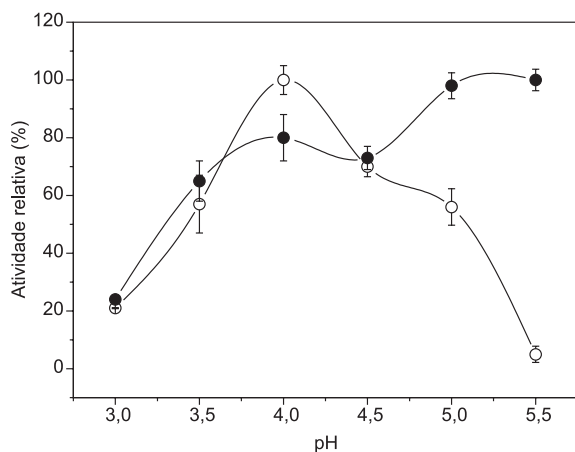


Figura 1. Efeito do pH sobre a atividade da enzima livre (○) e imobilizada (●). A atividade a 25 °C. Os pontos das curvas representam as médias de 3 repetições para cada análise

Verificou-se que o pH ótimo de 4,0 para a enzima livre foi deslocado para valores mais elevados no caso da enzima imobilizada (5,5). Esse comportamento tem sido atribuído à diferença na concentração de íons H⁺ entre o microambiente, no qual a enzima está imobilizada (suporte polieletrólito), e a solução que envolve este suporte.²⁶⁻²⁹ Embora o conceito sobre a mudança de pH em relação a natureza elétrica do suporte seja uma ferramenta útil para explicar os deslocamentos de pH após a etapa de imobilização, vale a pena ressaltar que essas mudanças podem estar associadas a outros fatores, além da carga do polímero. Cada sistema de enzima imobilizada apresenta características únicas dependentes de fatores como fonte de enzima, tipo de suporte, método de imobilização e interação da enzima-suporte.¹⁶

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade da enzima imobilizada foi investigado e comparado com o da lacase livre, sob as mesmas condições de reação, empregando diferentes substratos ABTS, siringaldazina e vermelho de fenol em concentrações variando entre 5 a 12 μmol L⁻¹. Para todos os substratos testados foi constatado um incremento significativo da velocidade de reação para enzima imobilizada em relação à enzima livre. Os valores de KM e V_{máx} aparentes foram calculados e estão ilustrados na Tabela 1.

Os valores de KM encontrados foram mais elevados para enzima imobilizada, independentemente do substrato utilizado, indicando

Tabela 1. Parâmetros cinéticos para a lacase livre e imobilizada

Forma da lacase	Substrato utilizado	V _{máx} (μmol/s)	K _m (μM)
Livre	siringaldazina	34±13	4,6±3,4
Imobilizada	siringaldazina	87±0,1	47±0,1
Livre	ABTS	9,0±0,1	0,3±0,1
Imobilizada	ABTS	167±0,21	79±0,1

uma mudança da afinidade da lacase pelos substratos (ABTS, siringaldazina e vermelho de fenol) na forma imobilizada. Esta alteração de afinidade foi maior para o substrato ABTS (18,6 vezes superior ao da enzima livre). Foi também constatada uma relação entre os valores dos parâmetros cinéticos e a massa molar dos substratos, ou seja, o aumento da massa molar do substrato parece estar associado ao aumento da diferença dos valores obtidos para as constantes cinéticas de ambas as formas de enzima (livre e imobilizada). Dessa forma, a diferença aumenta em ordem crescente para os substratos: vermelho de fenol > siringaldazina > ABTS, que possuem, respectivamente, massas molares de 354, 360 e 548 g/mol. É relevante esclarecer que, apesar desta relação constatada, outros eventos também contribuem para o aumento dos valores de KM, como: a) perda de flexibilidade da enzima necessária para a ligação com o substrato;¹⁶ b) limitação difusional do substrato e produtos devido a natureza não porosa do suporte;³⁰ c) formação de uma camada de solvente ao redor da esfera (camada de Nernst), que pode conter concentração de substrato menor em relação a solução.^{16,31}

Os efeitos de vários inibidores sobre a lacase livre foram investigados. Os resultados (Figura 2) demonstram que, nas concentrações estudadas, EDTA, K₂Cr₂O₇ e K₃[Fe(CN)₆] não provocaram inibição da atividade enzimática.

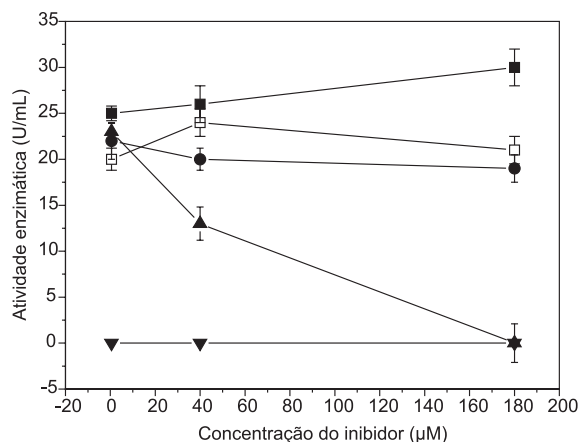


Figura 2. Efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima livre a 25 °C em tampão tartarato 0,1 M pH 4,0. Foram avaliados: EDTA (■), K₂Cr₂O₇ (□), K₃[Fe(CN)₆] (●), H₂O₂ (▲) e NaN₃ (▼). Os pontos das curvas representam as médias de 3 repetições para cada análise

Um estudo realizado ilustrou uma comparação entre as lacases de *Phlebia radiata* e *Cerrena versicolor* com relação ao efeito inibitório de agentes quelantes. Os autores observaram que a lacase de *P. radiata* foi mais resistente à inibição devido ao menor conteúdo de átomos de cobre no centro catalítico. Outro estudo também ilustrou que o EDTA não provocou inibição sobre lacase de *Cerrena unicolor*. Dessa forma, é possível supor que a lacase utilizada neste trabalho deve possuir um número reduzido de átomos de cobre, o que explica sua menor susceptibilidade a inibição pelo EDTA. Entretanto, os compostos H₂O₂ e NaN₃ mostraram-se potentes inibidores. Desta forma, para avaliar se a imobilização foi capaz de tornar a enzima menos vulnerável frente a tais inibidores, foram realizados experimentos adicionais visando determinar o efeito desses compostos na atividade da lacase imobilizada. Para concentração de 45 μmol L⁻¹ de H₂O₂ verifica-se que a enzima livre foi capaz de reter apenas 10% de sua atividade original enquanto a lacase imobilizada foi menos suscetível à inibição do H₂O₂, reterendo 50% de sua atividade original. No entanto, a lacase imobilizada foi vulnerável à inibição por NaN₃ da mesma forma que a enzima livre. Esses resultados são similares aos descritos na literatura utilizando lacase imobilizada em vidro

de porosidade controlada,³² sendo observado que na presença de NaN_3 o processo de imobilização causou uma retenção de atividade desprezível em comparação a enzima livre.

Testes de estabilidade da lacase

Para análise da estabilidade térmica, as enzimas livre e imobilizada foram pré-incubadas com tampão tartarato pH 4,0 por 30 minutos em temperaturas variando entre 30-70 °C. Os resultados revelaram que a imobilização conferiu maior estabilidade térmica a enzima lacase. Na temperatura de 40 °C a lacase imobilizada foi 70% mais ativa que a enzima livre e a 50 °C a enzima livre foi completamente desnaturada, enquanto a enzima imobilizada ainda demonstrou atividade relativa de 40%. Esse resultado indica que a atividade da enzima tornou-se menos dependente da temperatura após o processo de imobilização. Embora alguns autores tenham observado apenas um pequeno abrandamento da perda de atividade em temperaturas superiores a 60 °C, outros estudos revelaram que o processo de imobilização conferiu à enzima um aumento significativo da estabilidade térmica em relação à enzima livre. Após 210 minutos de incubação a 60 °C, a lacase imobilizada possuía uma atividade relativa de 74% enquanto a lacase livre possuía atividade relativa de 19,4%. Constatou-se, desta forma, que a enzima adquiriu satisfatória estabilidade térmica após o processo de imobilização, possibilitando possíveis aplicações em processos industriais com temperaturas mais elevadas.

Testes de estabilidade das enzimas livre e imobilizada frente a solventes de diferentes características estruturais e hidrofóbicas (Figuras 3 a-e) foram efetuados.

Esses estudos podem ser justificados pelo fato das lacases serem intensamente estudadas para biodegradação de uma série de xenobióticos que possuem pouca solubilidade em água. Verificou-se que a acetona foi o solvente que provocou maior desativação para ambas as formas de lacase (Figura 3a), embora a forma imobilizada tenha retido 100% de atividade em solução contendo 10% de acetona. Para soluções com porcentagens superiores a 30%, ambas as formas de lacases foram praticamente desnaturadas. A enzima imobilizada forneceu bons resultados de retenção de atividade em relação à enzima livre frente aos demais solventes (Figuras 3b-e). Os valores mais elevados de retenção de atividade foram obtidos em soluções de glutaraldeído (Figura 3e), sendo constatados valores de até 94,9% superiores para a lacase imobilizada em relação à lacase livre. De uma forma geral, os resultados obtidos mostraram que a lacase imobilizada tem a capacidade de reter boa parte de sua atividade na presença de solventes hidrofóbicos, como o dioxano e o acetato de etila, demonstrando a viabilidade de aplicação deste derivado imobilizado na biodegradação de compostos recalci-trantes, tais como ligninas comerciais insolúveis em água. Resultados satisfatórios de retenção da atividade em soluções contendo diferentes porcentagens de hexano, acetonitrila, tetrahydrofurano, dioxano e tampão citrato pH 4,5 foram descritos para lacase de *Trametes versicolor* imobilizada em Sepharose.³³ Maiores valores de retenção de atividade foram constatados para enzima imobilizada quando incubada em dioxano em relação a incubação efetuada em tampão citrato pH 4,5. Dessa forma, é possível concluir que a enzima imobilizada foi cataliticamente ativa em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar, ou em certos casos até superior à obtida em ambientes aquosos. Essa característica deve-se, em parte, ao aumento das interações entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos e ao aumento do número de ligações pontes de hidrogênio intramoleculares, além da estabilidade estrutural fornecida pelas ligações cruzadas com glutaraldeído. No entanto, para que a enzima imobilizada tenha eficiência catalítica em meio orgânico, ela necessita ter uma quantidade mínima de água ligada, o que também deve assegurar a sua integridade.¹⁶

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi determinada

em ciclos oxidativos consecutivos usando a siringaldazina como substrato. Os resultados revelaram que após cinco ciclos oxidativos a atividade residual da enzima imobilizada foi de apenas 2,25%. Esses resultados sugerem que o processo de imobilização selecionado não conferiu satisfatória estabilidade operacional à lacase imobilizada. A estabilidade operacional da enzima imobilizada pode ser diretamente relacionada ao suporte e o método de imobilização, entretanto, comparando os resultados obtidos neste trabalho com dados descritos na literatura (Tabela 2) verificou-se estabilidades operacionais distintas para diferentes enzimas imobilizadas em quitosana. Desta forma, estudos adicionais deverão ser realizados visando identificar os fatores que limitaram a manutenção da atividade da lacase nos ciclos, entre os quais podem ser citados (a) o desprendimento da enzima do suporte; (b) a obstrução dos poros por impurezas ou produtos secundários; (c) a perda do suporte por atrito ou dissolução e (d) crescimento de microorganismos.

Ensaio de biodegradação do efluente com a enzima imobilizada

A lacase utilizada neste trabalho é amplamente utilizada no setor têxtil, especialmente na área de beneficiamento têxtil. Devido ao fato do uso desta enzima ser muito comum nesta área, procurou-se saber como a mesma se comportaria com efluentes com características ligeiramente diferentes, como os efluentes das indústrias papelarias.

Verificou-se que a enzima imobilizada degradou de forma eficiente, além dos compostos fenólicos totais (remoção de 65%), compostos fenólicos de baixa massa molar (remoção de 65%) e cor (remoção de 60%) do efluente (Figura 4).

Os resultados revelaram que o material orgânico contido no efluente sofreu intensa degradação, indicada por uma acentuada diminuição da área total obtida nos cromatogramas medidos a 240, 280 e 310 nm antes e após tratamento com a lacase.

As análises de DQO revelaram que não houve alteração deste parâmetro durante o processo de biodegradação do efluente. Esse resultado corrobora o trabalho de outros autores que realizaram o tratamento do efluente de uma indústria de azeite de oliva com lacase e verificaram 65% de redução de fenóis totais, 86% de orto-difenóis e apenas 5% de redução de DQO.²⁸ Essas constatações podem ser explicadas com base na composição química do efluente e no modo de ação das lacases, que, por sua vez, catalisam apenas a oxidação de compostos fenólicos, levando à biotransformação dos mesmos. A modificação do estado dos grupos ionizáveis, antes e após tratamento enzimático, também foi avaliada por meio de titulação potenciométrica. A curva de titulação potenciométrica (Figura 5) obtida para o efluente sem tratamento apresentou um ponto de inflexão no intervalo de pH 4,5 a 5,5, portanto, exibindo duas inclinações, sendo a primeira delas (a) menos acentuada do que a segunda (b). A região da curva com inclinação mais acentuada (b) assinala uma variação mais brusca de pH, o que indica um maior número de grupamentos com pKa em torno de 8. A região da curva (a) ilustra um número menor de espécies com pKa em torno de 2. Estes valores de pKa podem ser inferidos a partir do tratamento de Henderson-Hasselbach, que descreve o comportamento de grupamentos ionizáveis a partir da curva de titulação. A titulação potenciométrica do efluente após tratamento da enzima imobilizada apresentou um perfil diferente. A região da curva (c) é mais inclinada que a segunda região da mesma (d). Essa mudança de perfil evidencia que o tratamento com a enzima modifica a natureza das espécies ionizáveis, onde as espécies com pKa em torno de 2 tornaram-se em número maior, enquanto as espécies com pKa em torno de 8 tiveram a sua quantidade reduzida. Possivelmente, as espécies com pKa em torno de 8 e que sofreram depleção são compostos fenólicos, e as espécies com pKa em torno de 2 são ácidos carboxílicos.

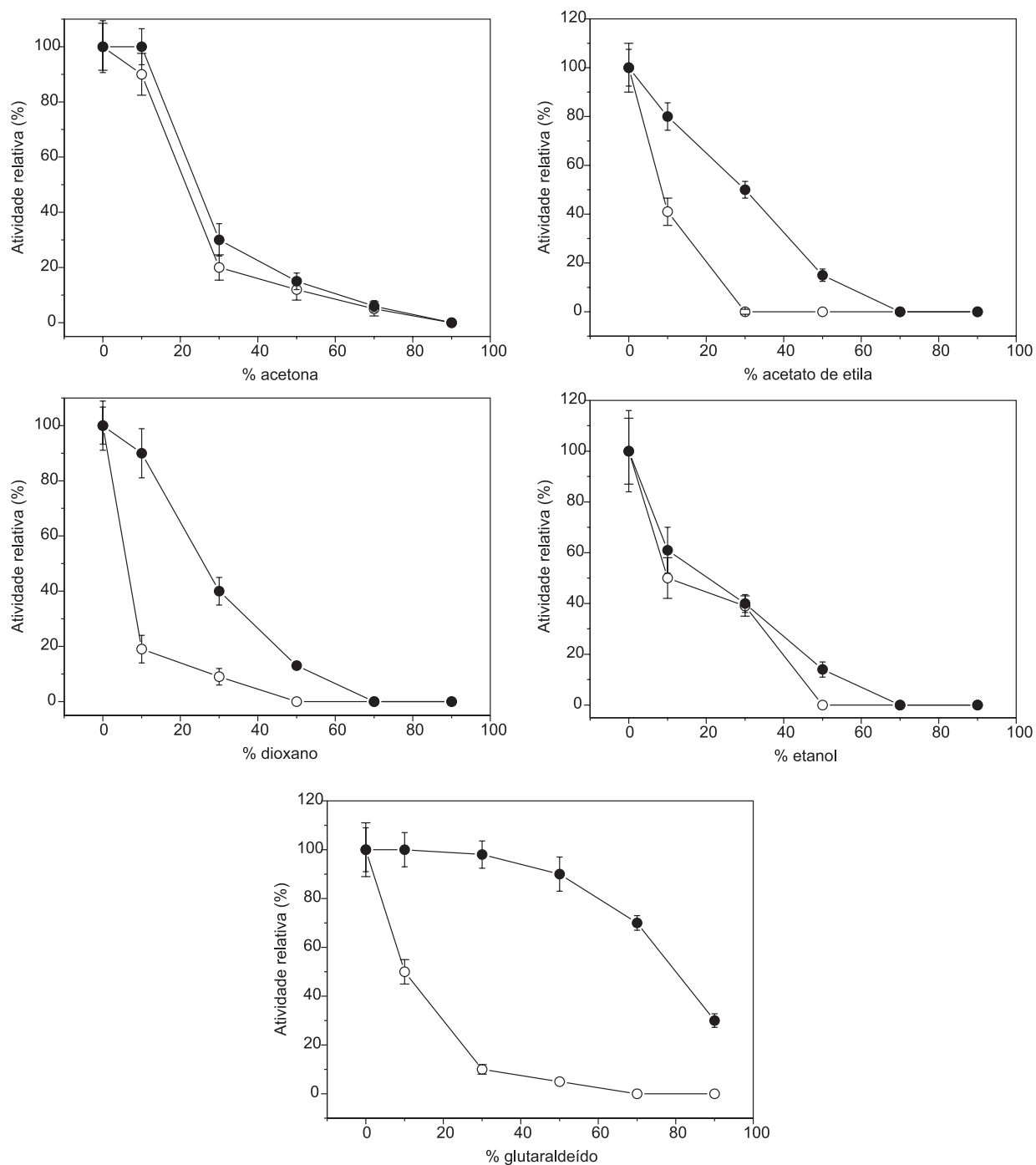


Figura 3. Efeito do solvente + tampão fosfato (0,1 M) pH 4,0 (% v/v) sobre a atividade relativa da enzima livre (○) e a enzima imobilizada (●) a 25 °C

Tabela 2. Resultados obtidos por outros autores de estabilidade operacional de diferentes enzimas imobilizadas em suportes de quitosana ativadas com glutaraldeído

Referência	Suporte usado para imobilização	Enzima	Reagente usado para ativação do suporte	Ciclos de uso	Principais observações
34	filme de quitosana	lipase	glutaraldeído 5%	4	Verificou-se perda de atividade enzimática de 65%.
29	filme de quitosana	catalase	glutaraldeído 2%	4	Verificou-se perda de atividade enzimática de 50%.
28	esferas de quitosana	lacase	glutaraldeído 1%	30	A atividade enzimática manteve-se acima de 80% usando ABTS como substrato.
31	microesferas magnéticas de quitosana	lacase	glutaraldeído 8%	10	A atividade enzimática manteve-se acima de 80% usando ABTS como substrato.

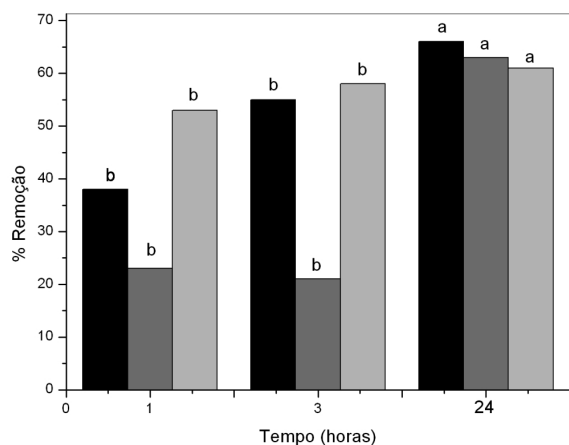


Figura 4. Determinação de fenóis de baixa massa molar (barras listradas), fenóis totais (barras claras) e cor (barras vermelhas) após 1, 3 e 24 horas de tratamento do efluente com a lacase imobilizada. As médias baseiam-se em 3 repetições, onde as que são representadas pela mesma letra são estatisticamente não significantes entre si, sendo $a > b$

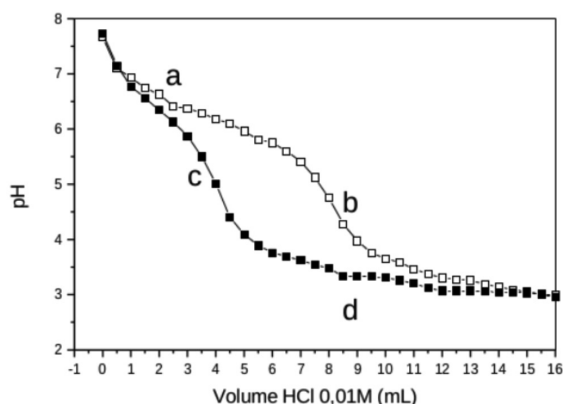


Figura 5. Curva de titulação potenciométrica do efluente antes e após incubação com a lacase imobilizada por 24 horas utilizando como titulante solução de HCl 0,01 M. O (□) representa o efluente sem tratamento e o (■) após tratamento. Os pontos das curvas representam as médias de 3 repetições

CONCLUSÃO

Os ensaios de estabilidade da lacase livre e imobilizada em relação às condições e meios desnaturantes revelaram que a enzima imobilizada em esferas de quitosana foi significativamente mais estável quando comparada com a enzima livre. Esses resultados indicam que o uso dessa enzima imobilizada apresenta-se como uma metodologia adequada para um grande número de processos industriais que normalmente envolvem reações em condições menos brandas de temperatura e pH. A enzima imobilizada também foi significativamente mais estável frente a diversas concentrações de solventes de diferentes características estruturais e hidrofóbicas. Esses resultados confirmam outras aplicações para as lacases, como uso na biodegradação de xenobióticos em meios orgânicos. Apesar dos bons resultados de estabilidade relacionados a esses parâmetros, o processo de imobilização acarretou pouca estabilidade operacional a lacase. A enzima imobilizada foi capaz de remover com muita eficiência compostos fenólicos de baixa massa molar, compostos fenólicos totais e a cor do efluente em estudo. Estes dados são indicativos do uso potencial desta enzima para compor novas tecnologias para o tratamento dos efluentes das indústrias papeleiras.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Biermann C. J.; *Handbook of Pulping and Papermaking*, 2th ed., Academic Press Limited: London, 1996.
- Bajpai, P.; *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*, 1th ed., Springer: New York, 2012.
- Lora, E. E. S.; *Prevenção e controle da poluição nos setores energético, industrial e de transporte*, 1th ed., Aneel-Agência Nacional de Energia Elétrica: Brasília, 2000.
- Soares, C. H. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1998.
- Rydhholm, S. A.; *Pulping Process*, 1th ed., Interscience Publishers: New York, 1965.
- Melo, I. S.; Azevedo, J. L.; *Microbiologia Ambiental*, 1th ed., Embrapa: Jaguariúna, 1997.
- Ali, M.; Sreekrishnan, T. R.; *Adv. Environ. Res.* **2001**, 5, 175.
- Thompson, G.; Swain, J.; Kay, M.; Forster, C. F.; *Bioresour. Technol.* **2001**, 77, 275.
- Singh, P.; Sulaiman, O.; Hashim, R.; Rupani, P. F.; Peng, L. C.; *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2010**, 9, 141.
- Couto, S. R.; Herrera, J. L. T.; *Biotechnol. Adv.* **2006**, 24, 500.
- Widsten, P.; Kandelbauer, A.; *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, 42, 293.
- Mayer, A. M.; Staples, R. C.; *Phytochemistry* **2002**, 60, 551.
- Durán, N.; Rosa, M. A.; D'annibale, A.; Gianfreda, L.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 31, 907.
- Moreno, A. D.; Ibarra, D.; Fernández, J. L.; Ballesteros, M.; *Bioresour. Technol.* **2012**, 106, 101.
- Plácido, J.; Imam, T.; Capareda, S.; *Bioresour. Technol.* **2013**, 139, 203.
- Zanin, G.; Moraes, F. F. Em *Enzimas como agentes biotecnológicos*; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto, 2004.
- Jesus, P. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 1998.
- Adriano A. M.; Pedro C. O.; Hezir F. C.; Raquel L. C. G.; *Quim. Nova* **2011**, 34, 831.
- Krajewska, B.; *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, 35, 126.
- Tharanathan, R. N.; Kittur, F. S.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, 1, 61.
- Goy, R. C.; Assis, O. B. G.; Campana-Filho, S. P.; *Rev. Bras. Biotechnol.* **2004**, 33, 30.
- Adriano, W. S.; Filho, E. H. C.; Silva, J. A.; Giordano, R. L. C.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2005**, 22, 529.
- Villela, S. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2006.
- Ander, P.; Eriksson, K.; *Arch. Microbiol.* **1976**, 109, 1.
- Apha Awwa. *Standard Methods for examination of water and wastewater 550B*, 17th ed., American Public Health Association: New York, 1989.
- Yang, R. D.; Humphrey, A. E.; *Biotechnol. Bioeng.* **1975**, 17, 1211.
- Goldstein, L.; Levin, Y.; Katchalski, E.; *Biochemistry* **1964**, 3, 1913.
- D'annibale, A.; Stazi, S. R.; Vinciguerra, V.; Di Mattia, E.; Sermanni, G. G.; *Process Biochem.* **1999**, 34, 697.
- Cetinus, S. A.; Öztóp, H. N.; *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, 32, 889.
- Cetinus, S. A.; Öztóp, H. N.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 26, 497.
- Jiang, D.; Long, S.; Huang, J.; Xiao, H.; Zhou, J.; *Biochem. Eng. J.* **2005**, 25, 15.
- Rogalski, J.; Józwick, E.; Hatakka, A.; Leonowicz, A.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, 95, 99.
- Milstein, O.; Nicklas, B.; Hüttermann, A.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, 31, 70.