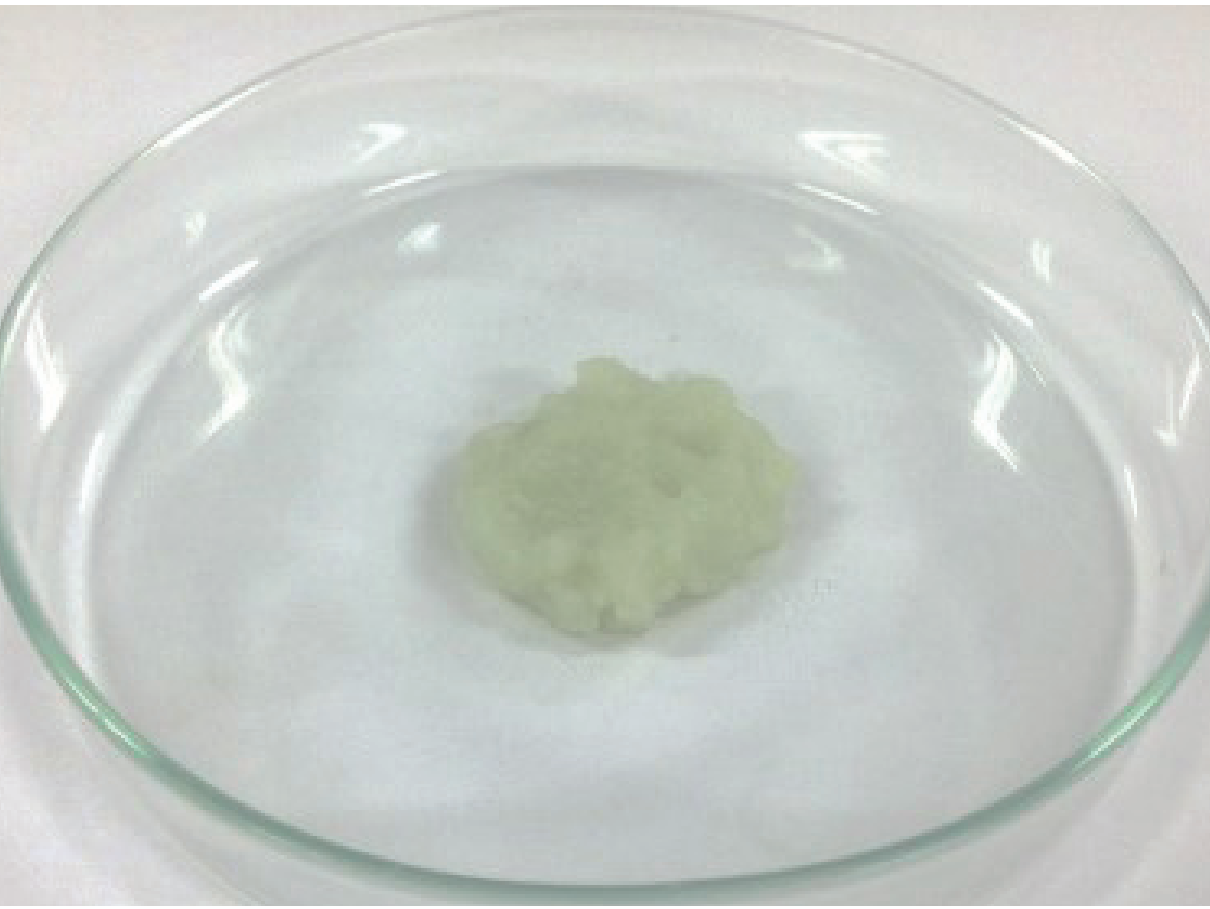
ISSN 1980-3982



COMUNICADO TÉCNICO

424

Colombo, PR
Dezembro, 2018

Embrapa

Imobilização de lacase em nanofibrilas de celulose para aplicação em biorrefinaria de lignina

Washington Luiz Esteves Magalhães
Patricia Raquel Silva Zanoni
Francine Ceccon Claro
Giselle Maria Maciel

Imobilização de lacase em nanofibrilas de celulose para aplicação em biorrefinaria de lignina

Washington Luiz Esteves Magalhães, Engenheiro químico, doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Patricia Raquel Silva Zanoni**, Engenheira química, doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Francine Ceccon Claro, Química**, doutoranda em Engenharia e Ciência dos Materiais na Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; **Giselle Maria Maciel**, Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, professora do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, PR.

A lignina é um polímero fenilpropanóide altamente complexo, sintetizado principalmente a partir de três monômeros precursores, p-hidroxifenil, guaiacil e siringil. É a fonte de carbono mais abundante na Terra após a celulose, está presente na parede celular das plantas e, portanto, na biomassa lignocelulósica, compondo entre 20% – 32% em massa (Silva et al., 2012; Munk et al., 2015). Em todo o mundo, cerca de 50 milhões de toneladas de lignina são produzidas anualmente como subproduto em processos de polpação da madeira, para a produção de papel. Apesar de suas características únicas, a maioria da lignina disponível na indústria de celulose e papel é queimada para geração de energia (Gosselink et al., 2004; Sena-Martins et al., 2008; Gouveia et al., 2012).

No entanto, pesquisas têm mostrado que a lignina apresenta alto potencial além de combustível de baixo valor. A estrutura da lignina apresenta alta heterogeneidade, causada por variações na composição, tamanho e grupos funcionais, devido a diferenças na matéria-prima e condições de isolamento (Sena-Martins et al., 2008; Gouveia et al., 2012). Para potencializar as aplicações da lignina é necessário superar a sua heterogeneidade, por meio de processos de fragmentação, purificação ou modificação da estrutura, produzindo idealmente a lignina para cada potencial aplicação (Gouveia et al., 2012; Stiefel et al., 2016). Esta modificação pode ser realizada por uma rota biotecnológica a partir de enzimas como a lacase, atuando como biocatalisador agregando valor a produtos de lignina (Gouveia et al., 2012; Fiţigău et al., 2013; Mate; Alcalde, 2015; Munk et al., 2015; Ortner et al., 2015).

A enzima lacase gera radicais que aumentam a reatividade das moléculas de lignina, levando a polimerizações de forma aleatória para formar polímeros tridimensionais de maior peso molecular e com variedade de novas ligações. Como resultado, grande variedade de novos compostos com propriedades distintas podem ser obtidas (Sena-Martins et al., 2008). No entanto, o uso da enzima na forma livre possui menor

viabilidade devido ao fato de estar sujeita a fatores químicos, físicos e biológicos que limitam sua vida útil durante uso ou estocagem, tornando-a produto de alto custo. Muitas destas características indesejáveis podem ser amenizadas com o uso das enzimas na forma imobilizada. A fixação das enzimas em suportes sólidos proporciona diversas vantagens sobre as enzimas livres, tais como promover maior estabilidade operacional, aumentar a vida útil da enzima e facilitar a separação entre produto e catalisador (Pacheco; Soares, 2014; Souza et al., 2017).

A celulose nanoestruturada é uma boa opção de suporte sólido devido ao baixo custo de obtenção e facilidade de produção por desfibrilação mecânica, podendo ser obtida inclusive em indústrias de papel e celulose, ser biodegradável e renovável. Mediante processo mecânico de compressão e forças de cisalhamento, quando a polpa é forçada pela abertura entre os discos do moinho coloidal, ocorre o processo de desfibrilação mecânica, sendo utilizada água e energia, obtendo nanofibrilas em suspensão (Magalhães et al., 2017). Sathishkumar et al. (2014) imobilizaram a enzima lacase sobre celulose. A celulose usada por estes autores foi obtida pelo método da eletrofiação. A eletrofiação é uma técnica que emprega elevado campo elétrico para puxamento das nanofibras a partir de uma gota de solução de celulose (Wan et al., 2004). Para a dissolução da celulose é necessário solvente especial, em geral o N-óxido de N-metilmorfolina (NMMO) ou o LiCl/DMAc (dimetil formamida). A técnica é sofisticada e resulta em um filme de nanocelulose com custos muito mais elevados que a nanocelulose obtida por desfibrilamento mecânico.

A metodologia aqui descrita propõe a imobilização de lacases em nanofibrilas de celulose obtidas por desfibrilação mecânica, visando a sua recuperação do meio reacional catalítico heterogêneo para reutilizá-la, diminuindo os custos de produção de processos envolvendo enzimas.

Material e Métodos

Nanofibrilas de celulose

As nanofibrilas de celulose (Figura 1) são obtidas a partir da polpa celulósica branqueada pelo método de desfibrilação mecânica em moinho coloidal Super Masscoloider Masuko Sangyo, sob rotação de 1.500 rpm e 20 passes, conforme procedimento descrito por Magalhães et al. (2017).

Figura 1. Suspensão de nanofibrilas de celulose.

Oxidação das nanofibrilas

O processo de oxidação das nanofibrilas foi adaptado de Huang et al. (2011). Cada grama de nanofibrilas de celulose são oxidadas em 100 mL de solução 4,2 mg mL^{-1} de periodato de sódio ($NaIO_4$; pH 6,1), sob agitação, em banho-maria a 30 °C, durante 7 horas. Em seguida, a celulose nanofibrilada é lavada com 100 mL de água deionizada por centrifugação, a 5.000 rpm e 15 minutos, por três vezes, com o objetivo de gerar grupos aldeídos que atuem como local de ligação para a lacase.

Imobilização de lacase em nanocelulose

O processo de fixação propõe imobilizar lacase em nanofibrilas de celulose obtidas por desfibrilação mecânica (Figura 2), adaptado do método desenvolvido por Sathishkumar et al. (2014), para filmes de nanofibras de celulose obtidas por eletrofiação.

A imobilização da lacase é realizada pela imersão das nanofibrilas de celulose oxidadas em tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,5) contendo lacase por 30 minutos. Então, a mistura é resfriada a 4 °C, por 2 horas. A fixação da enzima é realizada com a adição de glutaraldeído (GA) mantendo por 12 horas a 4 ºC. Após, o material

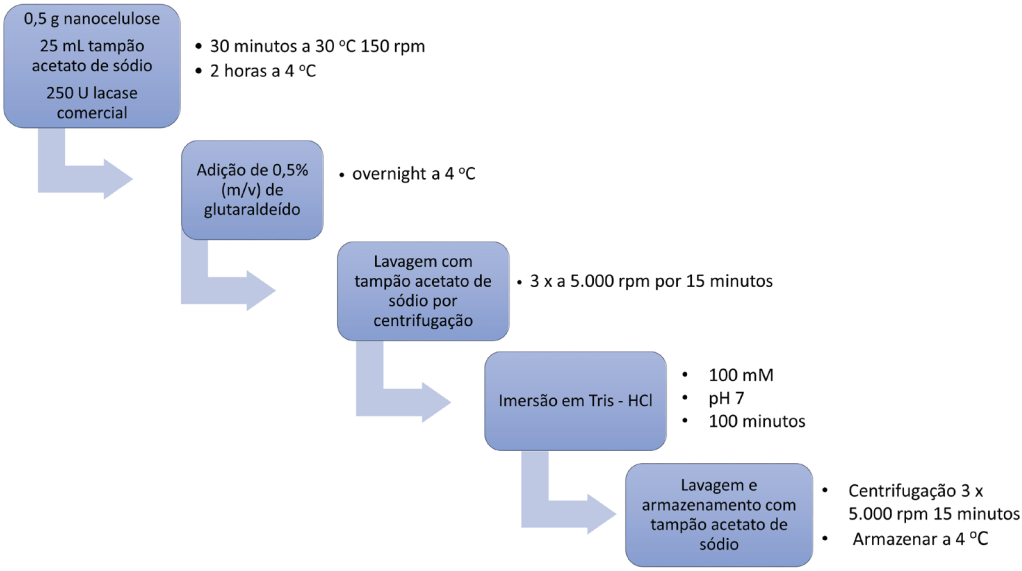


Figura 2. Processo de imobilização de lacase em nanofibrilas de celulose.

imobilizado é lavado com tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,5) por centrifugação. Os grupos aldeídos gerados na oxidação que não reagiram durante a imobilização são recobertos com Tris-HCl. A seguir, o material imobilizado é lavado em solução tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,5) e estocado em solução tampão a 4 °C, para uso futuro (Figura 3).

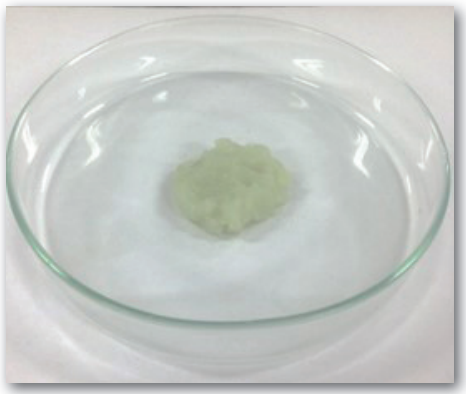


Figura 3. Enzima lacase imobilizada em nanofibrilas de celulose.

Determinação da atividade e rendimento

As atividades da enzima livre (solução enzimática antes da imobilização) e da enzima imobilizada são determinadas utilizando ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) como substrato. Em tubos de ensaio acrescentam-se:

- 1,7 mL de tampão acetato de sódio (100 mM; pH 5,5).
- 100 µL de amostra (enzima livre e/ou imobilizada diluída em solução tampão).
- 200 µL de ABTS 10 mM.

Para a amostra imobilizada, as nanofibrilas são diluídas em solução tampão de acetato de sódio até o material atingir fluidez adequada para ser pipetado, com concentração conhecida.

Os tubos são mantidos em banho-maria a 30 °C, por 5 minutos (tempo de reação) e obtida a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm; evitando que o tempo máximo de reação de 5 minutos seja excedido. Para a linha base do espectrofotômetro utilizar somente tampão e ABTS, na mesma proporção da leitura da amostra.

A lacase livre é a solução inicial da enzima diluída em tampão acetato de sódio que será adicionada às nanofibrilas para o processo de imobilização, para o cálculo de atividade da lacase livre em U mL^{-1}:

$$Atividade\ (\frac{U}{mL}) = \frac{Volume\ final\ (mL) \times Absorbância \times Fator\ diluição}{\varepsilon\ (mM^{-1}\ cm^{-1}) \times Caminho\ óptico\ (cm) \times Volume\ de\ amostra\ (mL) \times Tempo\ de\ reação\ (minutos)}$$

* O volume final e o volume de amostra são referentes à reação preparada no tubo de ensaio.

* Coeficiente de extinção molar (ε) do ABTS a 420 nm = 36 mM^{-1} cm^{-1}.

A atividade da lacase imobilizada em relação a massa de nanocelulose é determinada por:

$$Atividade\ (\frac{U}{mg}) = \frac{Volume\ final\ (mL) \times Absorbância}{\varepsilon\ (mM^{-1}\ cm^{-1}) \times Caminho\ óptico\ (cm) \times Tempo\ de\ reação\ (minutos) \times Massa\ de\ nanocelulose\ (mg)}$$

* A massa de nanocelulose é referente à massa de material imobilizado adicionada ao tubo de ensaio.

A atividade total disponível para o procedimento de imobilização em função da massa de nanocelulose é calculada por.

$$Atividade\ total\ disponível = \frac{Atividade\ lacase\ livre\ (\frac{U}{mL}) \times Volume\ de\ enzima\ (mL)}{Massa\ de\ nanocelulose\ (mg)}$$

* O volume de enzima é o volume total da enzima diluída em tampão acetato de sódio a ser utilizada no procedimento de imobilização e a massa de nanocelulose é a massa de nanofibrilas utilizadas.

O rendimento do processo de imobilização é calculado por (Pezzella et al., 2014; Souza et al., 2017):

$$Rendimento\ da\ imobilização\ (\%) = \frac{Atividade\ imobilizada\ (\frac{U}{mg}) \times 100\ (\%)}{Atividade\ total\ disponível\ (\frac{U}{mg})}$$

O procedimento de imobilização de lacase em nanofibrilas de celulose obtidas pelo método de desfibrilação mecânica apresentou rendimento de até 83% e atividade de 272 U g^{-1}, sendo próximo ao rendimento de 88% encontrado por Sathishkumar et al. (2014), para filmes de nanofibrilas de celulose obtidas por eletrofiação.

Agradecimento

Os autores agradecem à Tielidy Angelina de Morais de Lima pela valiosa ajuda na condução dos procedimentos laboratoriais.

Referências

FIŢIĞAU, I. F.; PETER, F.; BOERIU, C. G. Oxidative polymerization of lignins by laccase in water-acetone mixture. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, p. 817-822, 2013.

GOSSELINK, R. J. A.; JONG, E.; GURAN, B.; ABÄCHERLI, A. Co-ordination network for lignin: standardisation, production and applications adapted to market requirements (Eurolignin). **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 2, p. 121-129, 2004. DOI: 10.1016/j.indcrop.2004.04.015.

GOUVEIA, S.; FERNÁNDEZ-COSTAS, C.; SANRONÁN, M. A.; MOLDES, D. Enzymatic polymerisation and effect of fractionation of dissolved lignin from Eucalyptus globulus Kraft liquor. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 131-138, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.05.144.

HUANG, X. J.; CHEN, P.-C.; HUANG, F.; OU, Y.; CHEN, M.-R.; XU, Z.-K. Immobilization of Candida rugosa lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 3-4, p. 95-100, 2011. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.02.010.

MAGALHAES, W. L. E.; CLARO, F. C.; MATOS, M. de; LENGOWSKI, E. C. **Produção de nanofibrilas de celulose por desfibrilação mecânica em moinho coloidal**. Colombo: Embrapa Florestas, 2017. 5 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 404).

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 25-40, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.007.

MUNK, L.; SITARZ, A. K.; KALYANI, D.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 13-24, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.008.

ORTNER, A.; HUBER, D.; HASKE-CORNELIUS, O.; WEBER, H. K.; HOFER, K.; BAUER, W.; NYANHONGO, G. S.; GUEBITZ, G. M. Laccase mediated oxidation of industrial lignins: is oxygen limiting? **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1277-1283, 2015. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.05.003.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu usona biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209-214, 2014.

PEZZELLA, C.; RUSSO, M. E.; MARZOCCHELLA, A.; SALATINO, P.; SANNIA, G. Immobilization of a pleurotus ostreatus laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. **BioMed Research International**, v. 2014, article ID 308613, 11 p., 2014. DOI: 10.1155/2014/308613.

SATHISHKUMAR, P.; KAMALA-KANNAN, S.; CHO, M.; KIM, J. S.; HADIBARATA, T.; SALIM, M. R.; OH, B.-T. Laccase immobilization on cellulose nanofiber: the catalytic efficiency and recyclic application for

simulated dye effluent treatment. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 111-120, 2014. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.12.008.

SENA-MARTINS, G.; ALMEIDA-VARA, E.; DUARTE, J. C. Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 189-195, 2008. DOI: 10.1016/j.indcrop.2007.07.016.

SILVA, J.; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H.; SOUZA, S. G. H.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 191-196, 2012. DOI: 10.25110/arqvet.v15i2.2012.4234.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R. R.; MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: BIOTECNOLOGIA Aplicada à Agro&Indústria. São Paulo: Blucher, 2017. v. 4. p. 529-568.

STIEFEL, S.; MARKS, C.; SCHMIDT, T.; HANISCH, S.; SPALDING, G.; WESSLING, M. Overcoming lignin heterogeneity: reliably characterizing the cleavage of technical lignin. **Green Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 531-540, 2016. DOI: 10.1039/C5GC01506E.

WAN, Y. Q.; GUO, Q.; PAN, N. Thermo-electro-hydrodynamic model for electrospinning process. **International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation**, v. 5, n. 1, p. 5-8, 2004.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
83411-000, Colombo, PR, Brasil
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Versão digital (2018)

Embrapa

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente
Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente
José Elidney Pinto Júnior

Secretária-Executiva
Neide Makiko Furukawa

Membros
Álvaro Figueredo dos Santos, Gizelda Maia Rego, Guilherme Schnell e Schühli, Ivar Wendling, Luis Cláudio Maranhão Froufe, Maria Izabel Radomski, Marilice Cordeiro Garrastazu, Valderês Aparecida de Sousa

Supervisão editorial/Revisão de texto
José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica
Francisca Rasche

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Neide Makiko Furukawa

Fotos da capa e texto
Francine Ceccon Claro

CGPE 15079