



COMUNICADO
TÉCNICO

463

Colombo, PR
Novembro, 2020

Embrapa

Processo de oligomerização de lignina kraft via rota biotecnológica com enzima lacase

Washington Luiz Esteves Magalhães
Francine Ceccon Claro
Diego Lomonaco
Davi Rabelo Oliveira
Francisco Avelino

Processo de oligomerização de lignina kraft via rota biotecnológica com enzima lacase

Washington Luiz Esteves Magalhães, Engenheiro Químico, doutor em Ciências e Engenharia de Materiais, pesquisador da Embrapa Florestas, Colombo, PR; **Francine Ceccon Claro**, Química, doutoranda em Engenharia e Ciência dos Materiais da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; **Diego Lomonaco**, Químico, doutor em Química, professor da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE; **Davi Rabelo Oliveira**; Químico, doutorando em Química na Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE; **Francisco Avelino**, Químico, doutor em Química, professor do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Iguatu, CE

A lignina é o material renovável aromático mais abundante disponível na natureza e a segunda fonte de carbono mais abundante após a celulose (Hatakka, 2001; Munk et al., 2015). A sua estrutura química possui alta heterogeneidade, causada por variações nas fontes lignocelulósicas e condições de isolamento, não sendo possível definir precisamente a estrutura da lignina como uma única molécula (Saliba et al., 2001). Como resultado da união de unidades monoméricas, forma-se um composto aromático, complexo, tridimensional, amorfo e altamente irregular na estrutura molecular (Henriksson, 2009).

A lignina é um coproduto na indústria de celulose ou um subproduto de pré-tratamento e sacarificação de biomassa, raramente é extraída como componente de interesse (Carvajal et al., 2016). Entretanto, as indústrias de papel e celulose estão em busca de novos produtos devido à queda na demanda por produtos tradicionais de celulose, à competição entre economias

emergentes, ao fornecimento limitado de petróleo e ao incentivo a produtos verdes (Heiningen, 2006).

A lignina é comumente usada como combustível de baixo valor, mas tem apresentado um alto potencial para outras aplicações. Alguns exemplos dessas aplicações são: dispersante para a indústria química, aditivo/substituto de resinas fenólicas utilizadas na fabricação de painéis de fibras de madeira, fabricação de fibras de carbono, fonte de vários compostos químicos, sendo potencial à substituição de produtos oriundos de substâncias petroquímicas com a vantagem de ter baixo custo, e ser natural e renovável (Gouveia et al., 2012; Stiefel et al., 2016).

A maioria das ligninas industriais são misturas heterogêneas com uma ampla distribuição de peso molecular, e isso tem um grande impacto nas propriedades do polímero e na sua aplicação industrial (Crestini et al., 2003). Para produzir um material mais homogêneo, com distribuição de massa molecular definida, são aplicados processos como

fragmentação, purificação ou modificação da estrutura.

O tratamento com a enzima lacase é frequentemente utilizado para promover a polimerização oxidativa de unidades fragmentadas e dissolvidas da lignina, após os processos de polpação (Fitigau et al., 2013; Ortner et al., 2015). Dentre as enzimas, a lacase é umas das mais importantes e de alto interesse industrial, pois utiliza O_2 como receptor de elétron, catalisando a oxidação de hidroxilas de difenol e compostos relacionados, não necessitando da presença de H_2O_2 como as enzimas peroxidases e manganês peroxidases. A enzima lacase gera radicais que aumentam a reatividade das moléculas de lignina, levando a reações de forma aleatória formando polímeros tridimensionais de maior ou menor massa molecular e com uma variedade de novas ligações. Como resultado, uma grande variedade de novos compostos com propriedades distintas podem ser obtida, além de agregar valor aos produtos de lignina (Sena-Martins et al., 2008).

As ligninas modificadas obtidas por polimerização oxidativa mediada por lacase podem ser aplicadas como fonte de matéria-prima para a síntese de polímeros, ligantes para compósitos de madeira, complexos quelantes, produto intermediário para a fabricação de reagentes de alta reatividade, revestimentos, tintas e gabaritos para complexos poliméricos (Sena-Martins et al., 2008).

O presente trabalho apresenta um processo de oligomerização de lignina por via da catálise enzimática, visando a

geração de novos produtos de alto valor à base de lignina kraft, pela modificação com a enzima lacase.

Método

Lignina

A lignina kraft utilizada foi cedida por uma indústria de papel e celulose da região de São Paulo, após o processo de precipitação ácida do licor negro. Para o processo de oligomerização, a fração solúvel em etanol da lignina (LE) foi utilizada como substrato inicial.

Enzima

Preparo enzimático comercial fornecido pela Buckman – NZ51003, lacase de *Aspergillus oryzae*. Aspecto – líquido marrom. Temperatura recomendada de armazenagem 2 °C - 8 °C.

Atividade enzimática

A atividade da enzima foi determinada mediante uso de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3 etilben-zotiazolina-6-sulfônico)) como substrato na mistura etanol e tampão acetato de sódio (40:60). Para isso, em um tubo de ensaio, acrescentar:

- 0,9 mL de tampão acetato de sódio (100 mM; pH 4,5).

- 0,8 mL de etanol.
- 100 µL da enzima lacase.
- 200 µL de ABTS (10 mM).

Manter os tubos em banho-maria à temperatura de 40 °C, por 5 minutos (tempo de reação), após obter a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 420 nm; evitando que o tempo máximo de reação exceda 5 minutos. Para obter a linha base do espectrofotômetro, utilizar a mistura de tampão, etanol e ABTS, na mesma proporção da leitura da amostra, sem adição da enzima lacase (Magalhaes et al., 2018).

A atividade enzimática é medida de acordo com a Equação 1, onde:

Volume final = 2 mL.

Absorbância = o valor obtido na leitura em espectrofotômetro.

Fator diluição = aplicado na enzima para a determinação da absorbância.

Coefficiente de extinção molar (ϵ) do ABTS a 420 nm = 36 mM⁻¹ cm⁻¹.

Caminho óptico = a largura interna da cubeta.

Volume de amostra = 100 µL.

Tempo de reação = 5 minutos.

Reação lignina/lacase

Um estudo anterior foi realizado a fim de estabelecer as condições operacionais mais adequadas para a polimerização de lignina. Adicionar 1,5 g de lignina (LE) em 1 L etanol: tampão acetato de sódio pH 4,5 (100 mM) (40:60). Adicionar a enzima lacase ao meio reacional atingindo uma atividade final de 2 U mL⁻¹, o volume de enzima necessário é determinado a partir da atividade enzimática no meio reacional calculada anteriormente. Manter a reação sob agitação em banho à temperatura de 40 °C, por 2 horas. Finalizar a reação mantendo a amostra sob temperatura de 100 °C, por 10 minutos, seguida da redução do pH para 2,0, com ácido clorídrico fumegante. Filtrar o produto da reação em membrana de nylon 0,22 µm e lavar duas vezes com solução de ácido clorídrico com pH 2,0. Secar a lignina resultante da reação (E40) em estufa, na temperatura de 60 °C, por 12 horas (Figura 1). Realizar um experimento de controle, ou seja, sem a presença de enzima (S2), para garantir que os produtos obtidos sejam resultantes da atividade enzimática.

$$Atividade \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{Volume \text{ final (mL)} \times Absorbância \times Fator \text{ diluição}}{\epsilon (mM^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times Caminho \text{ óptico (cm)} \times Volume \text{ de amostra (mL)} \times Tempo \text{ de reação (min)}} \quad \text{Equação 1}$$



Figura 1. Processo de oligomerização da lignina kraft. O preparo enzimático comercial possui estabilizadores enzimáticos com a lacase, os quais atribuem a cor marrom à mistura, semelhante à lignina.

Lignina resultante

Para avaliar o processo de oligomerização, realizar análises como a Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) da lignina antes (LE), após reação com a lacase (E40) do controle (S2). Homogeneizar alguns miligramas das amostras secas de lignina com KBr, na proporção de 1:100 (m:m), e analisar entre 550 cm^{-1} e 4.000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} . O espectro de FTIR apresenta os principais grupos funcionais e as alterações da estrutura da lignina (Figura 2).

Embora os espectros obtidos sejam semelhantes, sugerindo uma estrutura similar, a modificação na região entre 1.600 cm^{-1} – 1.700 cm^{-1} , típica de carbonilas, ocorre apenas na amostra E40, comprovando a atividade enzimática da lacase que gera a oxidação das hidroxilas fenólicas e, conseqüentemente, a modificação da estrutura da lignina. A amostra controle S2 não apresenta alteração na região de carbonilas (Gouveia et al., 2012; Munk et al., 2015).

A análise termogravimétrica (TGA) possibilita conhecer as alterações que o aumento da temperatura pode provocar na massa da amostra, permitindo

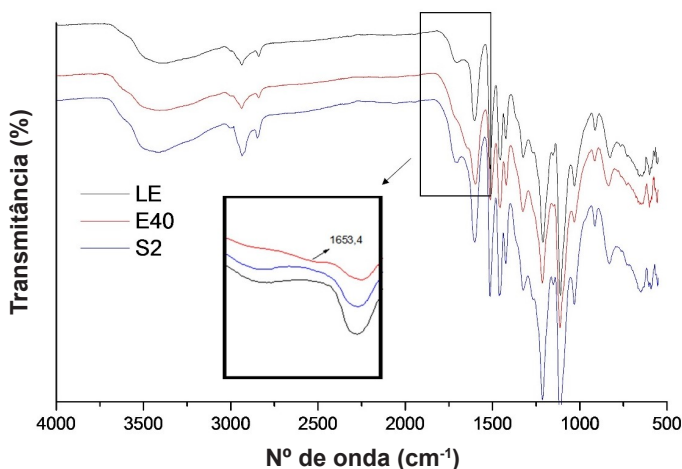


Figura 2. Espectro de infravermelho com transformada de Fourier das amostras LE (lignina sem reação), E40 (lignina após reação com lacase) e S2 (amostra controle: lignina passando pelo processo de reação sem a adição da enzima).

estabelecer a faixa de temperatura em que processos como a decomposição ocorrem. As TGAs foram conduzidas em um analisador térmico modelo Q600 SDT, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera inerte de N₂ da temperatura ambiente até 800 °C.

O perfil de degradação térmica da lignina modificada (E40) apresenta diferenças quando comparada com o material de partida (LE), o que indica modificação em sua estrutura polimérica. A amostra controle S2 também apresenta alterações no perfil de degradação térmica, porém a maior estabilidade térmica é observada na amostra E40. O pico máximo da temperatura de degradação da LE ocorre ao valor de 353 °C, enquanto nos produtos obtidos estes valores foram 370 °C e 390 °C para S2 e E40, respectivamente (Figura 3). Após a reação com lacase, a lignina

apresenta maior estabilidade térmica, o que é esperado com o aumento na massa molecular resultante do processo de condensação promovido pela enzima (Gouveia et al., 2012; Poursorkhabi et al., 2013).

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é utilizada para medir a variação de energia entre uma amostra e o material de referência, em função do aumento da temperatura sob atmosfera controlada. No caso da lignina, a DSC foi utilizada para determinar a temperatura de transição vítrea (Tg).

A Tg da lignina encontra-se em uma ampla faixa de temperatura, entre 110 - 150 °C, o valor depende da fonte da biomassa, taxa de aquecimento e massa molecular (Figura 4). Apesar da amostra controle S2 apresentar alteração da Tg, a mudança significativa é vista na amostra E40, onde não ocorre

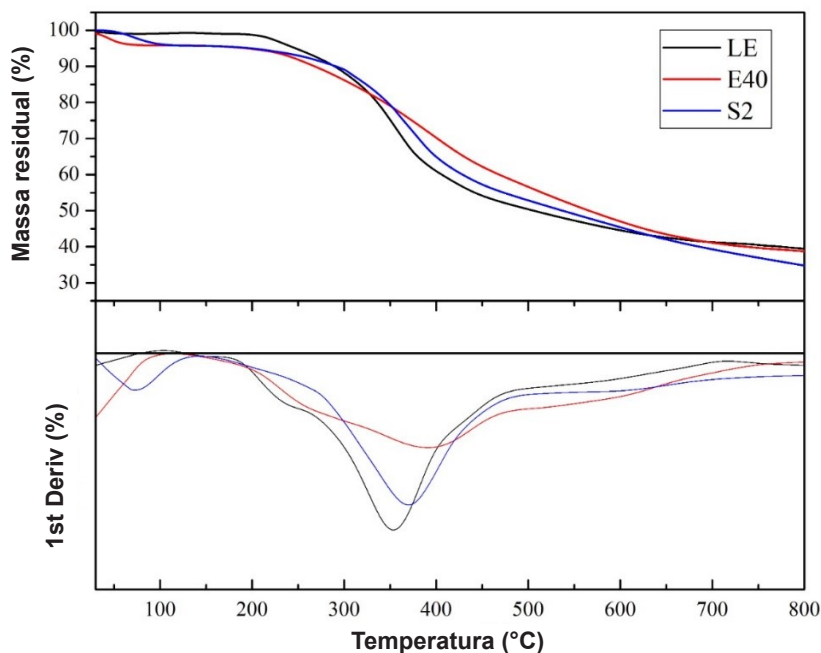


Figura 3. Análise termogravimétrica das amostras LE (lignina sem reação), E40 (lignina após reação com lacase) e S2 (amostra controle: lignina passando pelo processo de reação sem a adição da enzima).

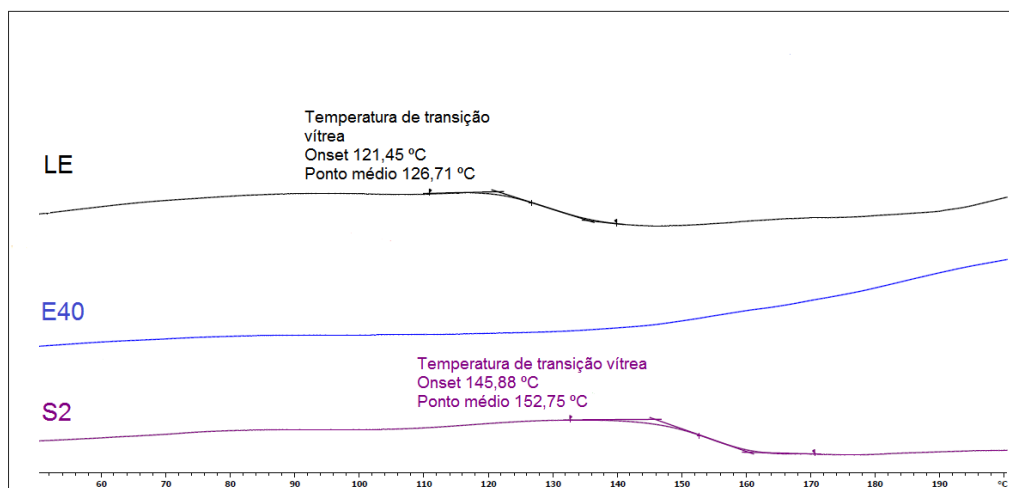


Figura 4. Calorimetria exploratória diferencial das amostras LE (lignina sem reação), E40 (lignina após reação com lacase) e S2 (amostra controle: lignina passando pelo processo de reação sem a adição da enzima).

a transição vítrea na mesma região da LE e S2 (Munk et al., 2015; Vural et al., 2018).

O sistema de cromatografia Akta Pure da marca GE permite determinar a distribuição de massas moleculares de uma amostra em solução, a separação é realizada como resultado da distribuição das moléculas presente na amostra pelos diferentes tamanhos dos poros da fase estacionária da coluna. A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada em coluna Superdex Peptide 10/300 GL e eluição isocrática com o eluente NaOH 0,10 M e NaCl 0,15 M, pH 13, e fluxo 0,5 mL min⁻¹, com a detecção por UV a 280 nm.

Moléculas com maior massa molar não penetram nos poros e não são retidas na fase estacionária da coluna, consequentemente eluindo primeiro. Moléculas menores penetram nos poros e são retidas na fase estacionária da coluna e eluem por último (Amorim, 2019). O valor máximo da amostra de lignina não modificada (LE) apresenta tempo de retenção na coluna cromatográfica

(19,84 minutos) maior que o da amostra modificada pela lacase (E40) (17,54 min). O cromatograma para a amostra de lignina após reação com lacase (E40) é formado por picos menos largos que a amostra original (LE). Isto ocorre quando a distribuição de pesos moleculares é menos heterogênea. Mais ainda, o segundo pico em torno de 30 min teve uma diminuição de sua intensidade após a reação com a lacase. Este pico é relativo a moléculas de menores pesos moleculares, sugerindo que houve oligomerização de parte das moléculas menores para formar estruturas de maior peso molecular. Esses resultados indicam que houve o aumento da massa molecular da lignina após a reação com a enzima lacase (Figura 5).

Em resumo, o processo de oligomerização da lignina kaft, por via da catálise enzimática em meio etanólico, é capaz de transformar a lignina, gerando um conjunto de moléculas de maior massa molar que o material de origem, menor heterogeneidade e com maior teor de carbonilas.

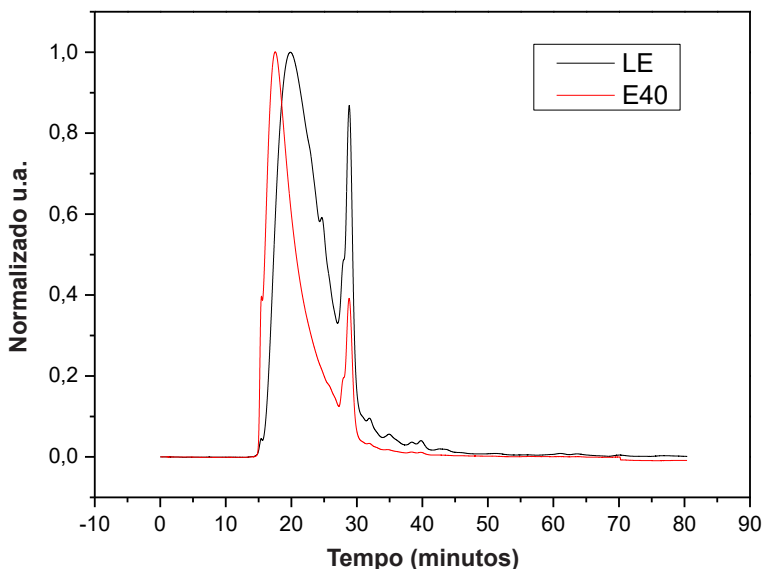


Figura 5. Cromatograma por exclusão de tamanho normalizado das amostras LE (lignina sem reação), E40 (lignina após reação com laccase), em função do tempo (minutos).

Referências

AMORIM, A. F. V. de. **Métodos cromatográficos**. Fortaleza: EdUECE, 2019.

CARVAJAL, J. C.; GÓMEZ, Á.; CARDONA, C. A. Comparison of lignin extraction processes: economic and environmental assessment. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 468–476, 2016.

CRESTINI, C.; JURASEK, L.; ARGYROPOULOS, D. On the mechanism of the laccase-mediator system in the oxidation of lignin. **Chemistry - A European Journal**, v. 9, p. 5371–5378, 2003.

FIȚIȚĂU, 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.

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: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.144>.

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin. In: STEINBUCHER, A.; HOFRICHTER, M. (ed.). **Biopolymers. biology, chemistry, biotechnology, applications**: v. 1: lignin, humic substances and coal. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. p. 129–180.

HEININGEN, A. van. Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. **Pulp and Paper Canada**, v. 107, n. 6, p. 141–146, 2006.

HENRIKSSON, G. Lignin. In: EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. (ed.). v. 1: wood chemistry and wood biotechnology. Berlin: De Gruyter, 2009. p. 121–146. (Pulp and paper chemistry and technology, v. 1). DOI: <https://doi.org/10.1515/9783110213409>.

MAGALHAES, W. L. E.; ZANONI, P. R. S.; CLARO, F. C.; MACIEL, G. M. **Imobilização**

de lacase em nanofibrilas de celulose para aplicação em biorrefinaria de lignina. Colombo: Embrapa Florestas, 2018. 21 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 424). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1104133>.

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: <https://doi.org/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: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.003>.

POURSORKHABI, V.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. Extraction of lignin from a coproduct of the cellulosic ethanol industry and its thermal

characterization. **BioResources**, v. 8, n. 4, p. 5083–5101, 2013.

SALIBA, E. de O. S. RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917–928, 2001.

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.

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: <https://doi.org/10.1039/C5GC01506E>.

VURAL, D.; SMITH, J. C.; PETRIDIS, L. Dynamics of the lignin glass transition. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 31, p. 20504–20512, 2018.

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 (2020)



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

Elisabete Marques Oaida

Membros

Annete Bonnet

Cristiane Aparecida Fioravante Reis

Guilherme Schnell e Schühli

Krisle da Silva

Marcelo Franca Arco-Verde

Marcia Toffani Simão Soares

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 capa e texto:

Francine Ceccon Claro