



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



ENBEQ
2016

XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

PRODUÇÃO DE BIODIESEL UTILIZANDO LIPASE IMOBILIZADA COM SUPORTE ORIUNDO DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO (resíduo de processamento de fruta)

I. N. SOUZA¹, L. G. S. DUARTE¹, E.B. GOMES^{3,4}, C. M. F. SOARES^{1,2}, R. C. M. MIRANDA¹,
A.S. LIMA^{1,2}.

¹ Universidade Tiradentes,

² Instituto de Tecnologia e Pesquisa

³ Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Sergipe

⁴ Instituto Federal de Ciência e Tecnologia da Bahia

E-mail para contato: ritamend30@gmail.com

RESUMO – Este trabalho objetiva utilizar resíduo de abacaxi (*Ananas comosus*) como suporte de imobilização de lipase. Para isso foi caracterizado quimicamente (NREL) e morfologicamente (MEV e DRX). A biomassa "in natura" e submetida a diferentes tratamentos, alcalino e organosolv, foram avaliadas para imobilização da enzima lipase por adsorção física. O resíduo apresenta 35% de celulose, 25% de hemicelulose, 5% de lignina, 19% de extrativos e 4% de cinzas. A morfologia demonstrou exposição dos poros no material tratado, e aumento no Índice de Cristalinidade (Ic). Seu melhor carregamento foi de 0,35 g de enzima com melhor atividade relativa (110U/g.enzima imobilizada) a pH 7 em 50°C para a biomassa in natura e 60°C para a biomassa tratada. Os valores dos parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten para os biocatalizadores imobilizados foram $K_m = 158 \text{ mM}$ e $V_{max} = 3333,3 \text{ U/g}$ (in natura); $K_m = 169,8 \text{ mM}$ e $V_{max} = 1111,1 \text{ U/g}$ (extração alcalina); e, $K_m = 222 \text{ mM}$ e $V_{max} = 2500 \text{ U/g}$ (organosolv).

1. INTRODUÇÃO

Utilizando-se de diferentes técnicas, as refinarias de lignocelulose se destacam por fracionar a biomassa rica em lignocelulósicos para a produção de correntes intermediárias de celulose, hemicelulose e lignina (Cherubini & Stromman, 2011). Neste contexto o Brasil se encontra em uma posição privilegiada para assumir a liderança no aproveitamento integral das biomassas pelo fato de possuir a maior biodiversidade do planeta (Química Verde do Brasil, 2010). Uma das indústrias produtora de biomassa lignocelulósica, é a de processamento de fruta, onde o Brasil se destaca por ter sido o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas. Nesse cenário, a Região Nordeste vem se destacando, apresentando um aumento no número de agroindústrias instaladas por toda a região,

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

gerando um incremento na produção de resíduos agroindustriais. Dentre os Estados nordestinos, Sergipe, assume um importante papel por ser o maior produtor de frutas do país, sendo destaque os municípios de Indiaroba, Barra dos Coqueiros, Pirambu, Itaporanga e Estância (Silva Junior, 2004; IBRAF, 2015).

A biomassa lignocelulósica, pode ser usada como suporte para imobilização enzimática. Embora as enzimas têm excelentes características para a concepção de processos de síntese, os seus pedidos de processos de produção industrial foram amplamente negligenciados até surgirem os recentes avanços na biotecnologia moderna (Miletic et al., 2012). Dentro desse contexto, as demandas atuais das indústrias de biotecnologia do mundo estão na busca de novas técnicas tendo em vista, o aumento da vida útil enzimática uma vez que, esses requisitos são essenciais para facilitar a preparação em grande escala de forma econômica. A Imobilização da enzima proporciona uma excelente base para o aumento da disponibilidade da mesma para o substrato com maior volume ao longo de um período de tempo considerável (Datta et al., 2013). Por isso, torna-se importante destacar a utilização dos materiais lignocelulósicos como suporte para imobilização de enzimas, os quais constituem uma das classes mais amplamente utilizadas de suportes naturais (D'Souza & Godbole, 2012). Alguns trabalhos relatam a possibilidade da utilização de resíduo de algodão, girassol, milho, cana-de-açúcar, entre outros para este fim. Lv et al. (2013), estudando as características do centro do talo do milho (CAM) tratados com glicol e hidróxido de sódio (NaOH) a 2% (p/p), concluíram, que CAM tem uma melhor atividade relativa após imobilização.

Dessa forma, em virtude da importância biotecnológica atribuída a enzimas imobilizadas em suportes lignocelulósicos, este trabalho propõe a utilização de resíduo de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) para elaboração de suporte para imobilização de lipase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Resíduo do processamento de Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) e Enzima.

As amostras da coroa do abacaxi (*A. comosus*) usadas como matéria-prima neste trabalho foram obtidas de processamento da fruta na Central de Abastecimento S.A. (CEASA) do estado de Sergipe. Os resíduos foram moídos e posteriormente, peneirados obtenção e controle de granulometria.

As enzimas lipase de *Burkholderia cepacia* - LPS (30.000 U/g), comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK), foram utilizadas como agente enzimático.

Caracterização Química do Resíduo *In Natura*: A composição da matéria-prima não tratada e tratada foi determinada de acordo com os métodos analíticos preconizados pela *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) para caracterização de biomassa quanto ao teor de carboidratos e lignina. O líquido de hidrólise foi analisado quanto ao teor de açúcar e em um cromatógrafo líquido acoplado ao detector de índice de refração (RID-10A).



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

Caracterização Morfológica do Resíduo *In Natura*: Para a caracterização da morfologia, microfotografias foram tiradas em um microscópio eletrônico de varredura modelo (MEV) JEOL JSM5310 utilizando elétrons secundários, sendo coberta por uma fina camada de ouro. Caracterização Estrutural do Resíduo *In Natura*: Para observar as regiões amorfas e cristalinas do material lignocelulósico *in natura*, bem como depois do tratamento, as amostras foram caracterizadas por Difração de Raio X (DRX), em difratômetro Shimadzu modelo XDR-6000, com a fonte de radiação CuK, Tensão 40 kV, corrente de 40 mA, digitalização 0,05 (2 θ /5s) com radiação fonte CuK variando 2 θ entre 10 e 90°. Os índices de cristalinidade foram calculados a partir do grau de cristalinidade obtida a partir da análise de DRX de acordo com o modelo empírico de Segal et al. 1959).

2.2. Tratamentos dos Resíduos

Pré-tratamentos, extração alcalina e organosolv, foram avaliados visando à extração da lignina e hemiceluloses do resíduo de abacaxi, visando o preparo de suportes alternativos para a imobilização enzimática.

Extração Alcalina: Amostras de 2 g de resíduo seco e moído, foram tratadas com 100 mL de solução NaOH (0,25 – 1,0 mol/L) a temperatura de 55°C por 1h. Após esse tempo, a amostra foi acidificada para pH igual a 7,0 (pela adição de ácido acético), filtrada e guardada para análise posterior

Organosolv: Inicialmente, pesou-se 1,0 g da amostra seca em um cartucho de extração, o qual foi inserido no tubo de extração do soxhlet. A amostra foi submetida à extração, utilizando aproximadamente 200 mL de álcool etílico EtOH em cada balão. A extração foi mantida até desaparecimento total da coloração. Finalizada a extração, os sólidos foram transferidos, tão quantitativamente quanto possível, para um funil de Buchner, lavados com aproximadamente 100 mL de etanol, filtrados à vácuo e secos em estufa a 105°C até massa constante.

2.3. Imobilizações da Lipase por Adsorção Física em Resíduo de Abacaxi

O procedimento de imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* por adsorção física no suporte consistiu do contato de 10mL da solução enzimática aquosa com 1g de suporte, por um período de 24 h a 4°C em meio orgânico. Para determinar a quantidade ótima da lipase *Burkholderia cepacia* para a imobilização, estudou-se o efeito de várias proporções de enzima (0,10, 0,15, 0,225, 0,3, 0,375, e 0,45 g) na preparação da solução enzimática.

Determinação da Atividade Hidrolítica: A atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada foi determinada por meio de hidrólise descrito por Soares *et al.*, (1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 50mL de azeite de oliva e 50mL de goma arábica a 7% (p/v). A reação enzimática é formada por 5mL de substrato, 2 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e 1 mL da solução enzimática diluída em tampão (0,1 g/mL) ou 0,1 g de enzima imobilizada. A temperatura da reação foi mantida a 50°C em banho termostático por 10min para o

biocatalisador imobilizado ou 5 min para enzima livre, sob agitação constante de cerca de 80 rpm. Após esse período, a reação foi interrompida para determinação da atividade lipolítica. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,03 M, utilizando fenolftaleína como indicador.

Rendimento de imobilização e Atividade recuperada

Rendimento de imobilização (R) pode ser definido como a quantidade de enzima teoricamente imobilizada. Enquanto que, a atividade recuperada é a relação que mostra quanto das enzimas teoricamente imobilizadas, permanecem ativas. É uma avaliação desses parâmetros que indicará quais as melhores condições de imobilização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização Química do Resíduo *In Natura*

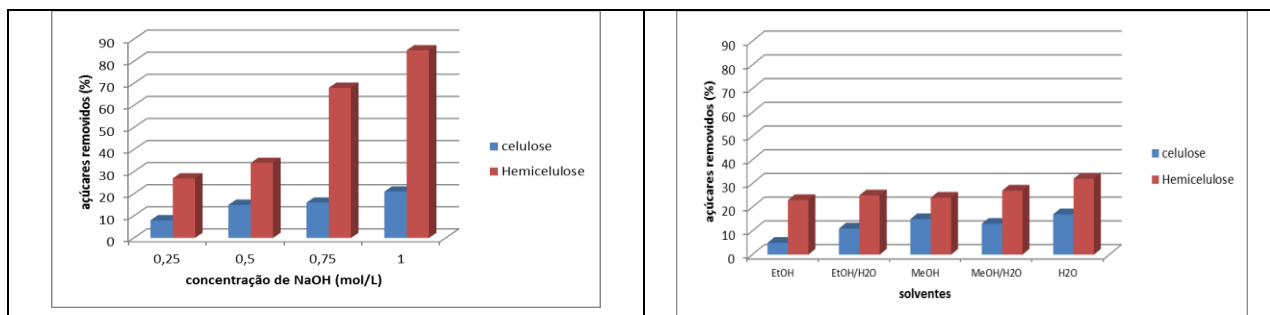
Após caracterização observou-se que os açúcares hemicelulósicos representam cerca de $25,4\% \pm 1,3$ do resíduo, sendo a galactose o principal açúcar (44%). Celulose (como glicose) e o teor de lignina ($34,6\% \pm 0,9$ e $5,14\% \pm 0,03$, respectivamente) estão na faixa relatada por outros autores, em estudos realizados com resíduos (RAUL *et al.*, 2013).

A soma dos componentes atingiu cerca de 90% para o resíduo, o que se deve a não quantificação de outros compostos presentes no material, tais como os ácidos urônicos e compostos inibidores fruto da alta temperatura e da acidificação no processo de hidrólise.

É importante ressaltar, que diferenças na composição podem ser parcialmente atribuídas a diferenças na variedade da planta, clima, solo, disponibilidade de água, métodos de plantio entre outros fatores, que acabam por fazer com que, plantas da mesma espécie apresentem composições diferentes (RAUL *et al.*, 2013).

3.2. Tratamentos dos Resíduos

Visando a remoção das hemiceluloses para obtenção de um suporte orgânico natural que propicie melhores condições para a imobilização de enzimas, os resíduos de caule do abacaxi foram tratados por extração alcalina e organosolv como podem ser visualizados nas figuras 1 e 2 para remoção parcial das hemiceluloses.





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

Figura 1 –percentual de celulose e hemicelulose removidos após o tratamento extração alcalina.

Figura 2 – percentual de celulose e hemicelulose removidos após o tratamento organosolv.

Analisando os resultados obtidos é possível observar um comportamento de extração de hemiceluloses bastante associado ao aumento da concentração alcalina no processo no tempo estudado, ou seja, com o aumento da concentração de NaOH ocorreu também um aumento na extração das hemiceluloses chegando a de 88% no tempo estudado (1h).

Estes resultados, perfis de comportamento, estão de acordo com os descritos na literatura (MCINTOSH E VANCOV, 2010; ASGHER *et al.*, 2013).

Kataria e Ghosh *et al.* (2014), avaliaram o efeito do pré-tratamento alcalino com NaOH (0,5, 1,0, 1,5, e 2% m/v) em diferentes tempos (30, 60, 90 e 120 min) a 121°C, na produção de açúcares redutores e observaram que a alta concentração de NaOH é favorável para a solubilização máxima de holoceluloses. O melhor resultado foi obtido com solução de NaOH (2,0%) durante 90 min a 121 °C, que resultou em aproximadamente 70 % remoção de holocelulose.

Além da remoção de hemicelulose, neste estudo, foi possível observar que houve, também, remoção de celulose o que indica uma provável degradação da celulose. Contudo, estes valores ficaram na faixa de 6%, indicando, portanto, baixa. Esta informação precisa ser levada em consideração ao escolher a melhor condição de processo em virtude da necessidade da celulose para a imobilização da enzima.

O percentual de deslignificação do resíduo oriundo de material lignocelulósico, pelo método organosolv pode ser visualizado na figura 2. Observou-se que após a exposição do material *in natura* aos dois solventes utilizados, o etanol (EtOH) se mostrou mais eficiente na retirada da lignina do material. Esse perfil se deve a polaridade do solvente, devido a natureza do material lignocelulósico favorecer a ação de um solvente de menor polaridade. Alguns autores relatam a eficiência do método organosolv no processo de deslignificação de material lignocelulósico. Yanez *et al.*, 2014 estudou o efeito de diversos solventes de diferentes polaridades na lignina de *Eucalyptus globulus*, e constatou o efeito desorganizador da fibra através de técnicas de microscopia eletrônica, Infra Vermelho por Transformadora de *Fourrier* e Ressonância Magnética Nuclear.

Caracterização Morfológica do Resíduo *In Natura*

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica capaz de produzir imagens da superfície da amostra com alta resolução. Logo, essa técnica foi empregada com o intuito de verificar as alterações morfológicas causadas pelos tratamentos aplicados (organosolv e extração alcalina) (Figura 3).

A superfície da matéria-prima *in natura* é homogênea, lisa e uniforme sem qualquer estrutura porosa (Figura 3A). Entretanto, nos materiais tratados seja por organosolv (Figura 3B) ou extração alcalina (Figura 3C), observa-se uma superfície irregular, com cavidades completas o que indica que a superfície das fibras individuais foi drasticamente alterada. Acredita-se que esse tipo de ruptura da superfície da parede celular ou um aumento visível de porosidade, aumenta a

área superficial específica do suporte, o que contribuiu para a imobilização de enzimas (YAN *et al.*, 2012).

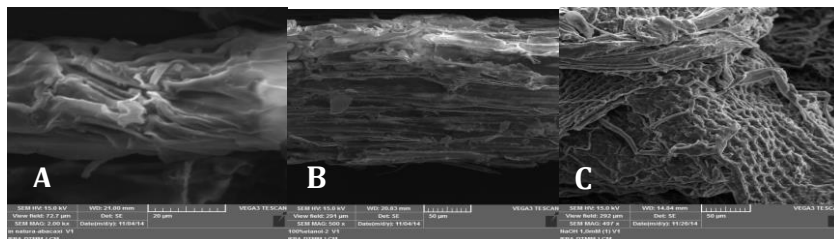


Figura 3 - Microscopia eletrônica de varredura do resíduo de caule do abacaxi *in natura* (A), tratado pelo método organosolv (B) e por extração alcalina (C) (magnitude 500X).

Além disso, é possível observar, tal como descrito na literatura, que o tratamento, causa desorganização no complexo lignocelulósico alterando a resistência do material, por conta da quebra da estrutura da lignina (Figura 3B e C) (MOOD *et al.*, 2013; BEHERA *et al.*, 2014).

Caracterização Estrutural do Resíduo *In Natura*:

O Índice de Cristalinidade (I_c) das amostras *in natura*, tratadas e da celulose pode ser visto na figura 4, onde observa-se que os tratamentos organosolv são mais eficientes que os extração alcalina, pois são os que apresentam maiores índices de cristalinidade. Dentre os solventes utilizados o etanol (EtOH) foi o que obteve o maior índice de cristalinidade (60%) comparado aos outros demonstrando ser o mais eficiente dentre todos os solventes testados. Este resultado sugere que o tratamento organosolv conserva melhor a organização das fibras de celulose. Quando calcula-se os I_c para o tratamento extração alcalina observa-se que quanto maior a concentração do hidróxido de sódio menor o I_c sugerindo uma maior desorganização da fibra.

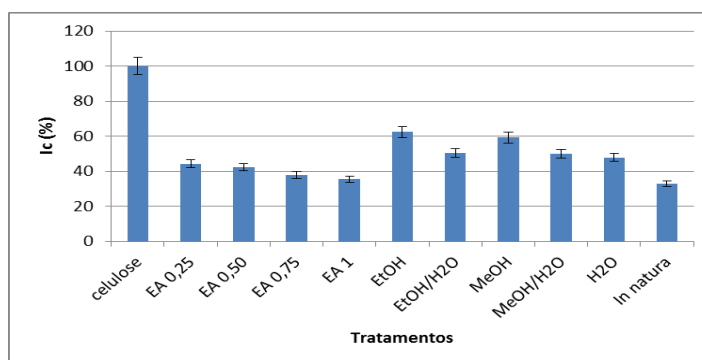


Figura 4 – Índice de cristalinidade da celulose e do resíduo *in natura* e tratado pelos diferentes processos.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

Enzinne et al., (2014) relataram experiências realizadas com celulose confirmou que a celulose recuperada mantém largamente a sua estrutura de cristal de celulose-I devido à baixa solubilidade da celulose.

3.3. Imobilizações da Lipase por Adsorção Física em Resíduo de Abacaxi

Determinação da Atividade Hidrolítica

Neste trabalho o carregamento de enzima foi analisado variando a relação enzima/suporte e verificando a atividade relativa e o rendimento de imobilização baseados na atividade por grama de enzima imobilizada.

Observou-se que o aumento da carga de enzima teve efeito positivo somente nas três primeiras razões enzima/suporte, causando aumento na atividade relativa, sendo a maior atividade no carregamento de 0,35g de enzima/g suporte. Deste modo, a condição de carregamento 0,35, foi selecionada como condição para realização de todos os experimentos e em ambos tratamentos. Em relação ao rendimento (120%) ocorreu um alto rendimento com carregamento de 0,35g/g. Sugerindo que esse carregamento é o melhor para a atividade da enzima. Em relação às propriedades bioquímicas a lipase imobilizada com material lignocelulósico *in natura* e tratados, apresentaram atividade máxima em pH 7,0, indicando que este método de imobilização não alterou o pH ótimo da enzima. Quando o parâmetro analisado foi a temperatura, verificou-se que o valor ótimo de atividade hidrolítica para a enzima foi de 50°C para o *in natura* e nos outros tratamentos foi de 60°C respectivamente. A estabilidade térmica foi analisada nas temperaturas 40°C, 50°C e 60°C e obteve maior estabilidade para lipase de BC imobilizadas por ADS na temperatura de 60°C em ambos materiais. No estudo de cinética os valores para os imobilizados por ADS foram *in natura* ($K_m = 158$ mM e $V_{max} = 3333,3$ U/g), extração alcalina ($K_m = 169,8$ mM e $V_{max} = 1111,1$ U/g) e organosolv ($K_m = 222$ mM e $V_{max} = 2500$ U/g) utilizando azeite de oliva como substrato.

4. CONCLUSÃO

A partir das caracterizações bioquímica, físico-química e morfológica pode-se verificar que os estudos deste trabalho apontam que o resíduo de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) pode ser aproveitado como suporte para imobilização de enzimas, sendo visto que os resultados apontam que a enzima Lipase BC não perde a atividade quando em contato com o material lignocelulósico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*. v. 44, p.488–495, 2013.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.36, p.91–106, 2014.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



ENBEQ
2016
XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

CHERUBINI, F.; STROMMAN, A. H. Modeling and Analysis: Chemicals from lignocellulosic biomass. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. v.5, p.548–561, 2011.

DATTA, S.; CHRISTENA, R. L.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*. v.3, p.1–9, 2013.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. *Journal Biochemical and Biophysical Methods*. v.52, p.59 – 62, 2002.

EZINNE C. ACHINIVU, REAGAN M. HOWARD, GUOQING Li, HANNA GRACZ, WESLEY A. HENDERSON, Lignin extraction from biomass with protic ionic liquids. *Green Chemistry*, 1-6, 2014

IBRAF – Instituto Brasileiro de Frutas, 2009. Mercado de Frutas no Brasil: da Lavoura ao Comércio. <http://www.ibraf.org.br/news/>. Acesso em 25/01/2016.

LV, J. S.; LIU, X. Y.; DENG, Y. F.; WU, Z.; WANG, Y. M.; FAN, M. Y.; XU, H. Preparation and properties of adsorption material from corn stalks core when used for enzyme immobilization and the subsequent activities of the adsorbed enzymes. *Industrial Crops and Products*. v.50, p.787–796, 2013.

MAURICIO, Y. AÑEZ-S, BETTY MATSUHIRO, CAROLINA NUÑEZ, SHAOBO PAN, CHRISTOPHER A. HUBBELL, POULUMI SANNIGRAHI, ARTHUR J. RAGAUSKAS, Physicochemical characterization of ethanol organosolv lignin (EOL) from Eucalyptus globulus: Effect of extraction conditions on the molecular structure, *Polymer Degradation and Stability*. 110, 184-194, 2014.

MCINTOSH, S.; VANCOR T. Enhanced enzyme saccharification of sorghum *bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*, v.101, p.6718–6727, 2010.

MILETIC, N.; NASTASOVIC, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*. v.115, p.126–135, 2012.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMIB, M.; ARDJMAND, MEHDI. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v.27, p.77–93, 2013.

QUÍMICA VERDE NO BRASIL: 2010-2030 - Brasília, DF : Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 238p. 2010.

RAUL, E.; ROMERO, I.; MOYA, M.; CARA, C.; VIDAL, J. D.; CASTRO, E. Dilute sulfuric acid pretreatment of sunflower stalks for sugar production. *Bioresource Technology*. v.140, p.292–298, 2013.

R. KATARIA, R.; GHOSH, S. NaOH Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Saccharum spontaneum for Reducing Sugars Production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*. v.36, p.1028–1035, 2014.

SEGAL, L.; CREELY, J.; MARTIN JUNIOR, A. E.; CONRAD, C.M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*. 1 October 1959 29:786-794.

SILVA JUNIOR, Fitosociologia e estrutura diamétrica da Mata de Galeria do Taquara, na Reserva Ecológica do IBGE.DF. *Revista Árvore*, v. 28, n 3, p. 419-428, 2004.

YAN, S.; CHEN, S.; WU, J.; WANG, P. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.94, p.829–838, 2012.