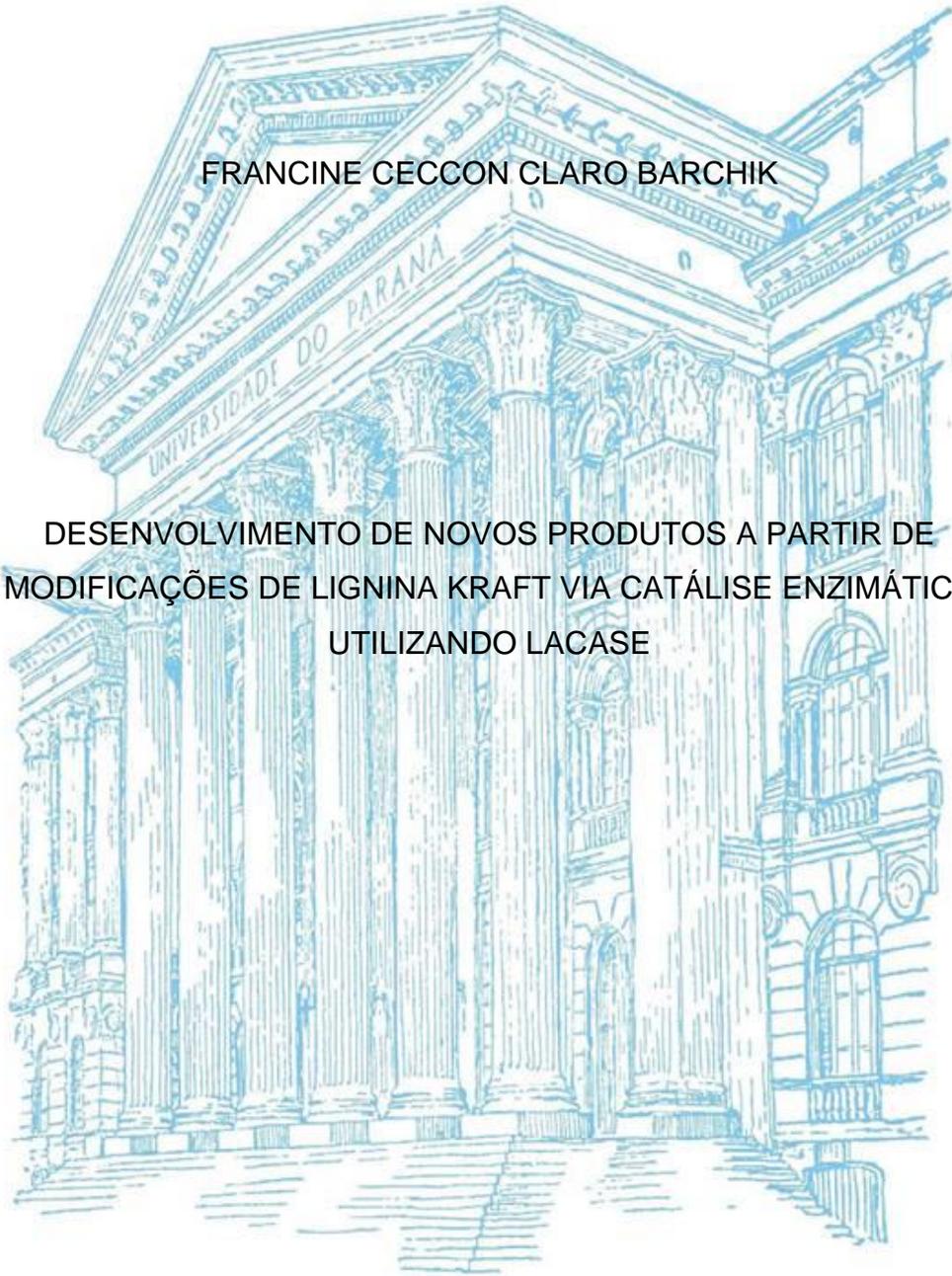


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCINE CECCON CLARO BARCHIK

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS A PARTIR DE  
MODIFICAÇÕES DE LIGNINA KRAFT VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA  
UTILIZANDO LACASE



CURITIBA

2022

FRANCINE CECCON CLARO BARCHIK

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS A PARTIR DE  
MODIFICAÇÕES DE LIGNINA KRAFT VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA  
UTILIZANDO LACASE

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais – PIPE. Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Linha de Pesquisa: Materiais de Engenharia.

Orientador: Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães.

Coorientadora: Dra. Patrícia Raquel Silva Zanoni.

CURITIBA

2022

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Barchik, Francine Ceccon Claro

Desenvolvimento de novos produtos a partir de modificações de lignina kraft via catálise enzimática utilizando lacase. / Francine Ceccon Claro Barchik. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães.

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia Raquel Silva Zanoni.

1. Engenharia. 2. Ciência dos Materiais. 3. Celulose. 4. Enzimas. I. Magalhães, Washington Luiz Esteves. II. Zanoni, Patrícia Raquel Silva. III. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. IV. Título.

Bibliotecário: Nilson Carlos Vieira Junior CRB-9/1797



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA E  
CIÊNCIA DOS MATERIAIS - 40001016033P9

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de FRANCINE CECCON CLARO BARCHIK intitulada: *Desenvolvimento de novos produtos a partir de modificações de lignina kraft via catálise enzimática utilizando lacase.*, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

09/03/2022 09:57:52.0

PATRICIA RAQUEL SILVA ZANONI  
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 19:13:40.0

MAILSON DE MATOS

Avaliador Externo (INSTITUTO SENAI DE INOVAÇÃO EM  
ELETROQUÍMICA)

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 15:44:05.0

CAMILLA KARLA BRITES QUEIROZ MARTINS DE OLIVEIRA  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 13:42:22.0

PEDRO HENRIQUE GONZALEZ DE CADEMARTORI  
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

08/03/2022 15:06:07.0

CRISTIANE VIEIRA HELM  
Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3308 - E-mail: pipe@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 160160

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 160160

## AGRADECIMENTO

Em primeiro agradeço à Deus, por ser cuidado, amparo e força. Por se mostrar presente nos tempos mais difíceis. Pelas portas que abriu e pelas que fechou. Por mostrar sua verdadeira face neste tempo de doutorado, por permitir ouvir sua voz, que acalma, acolhe e fortalece no momento de incerteza. Por mostrar que para Ti nada é impossível e me permitir viver o sobrenatural de Deus.

Agradeço aos meus pais Ademir e Rita, pelo incentivo em toda carreira acadêmica, por todo apoio, amor e acolhida. Por sempre estarem presentes para ouvirem minhas alegrias e frustrações. Por se orgulharem de cada passo e conquista da minha vida. Por compreenderem minhas ausências, nervosismos e choros de cada etapa.

Meu agradecimento ao meu marido Bruno, por me ouvir, me acalmar, apoiar e incentivar. Sempre conseguir me fazer sorrir, mesmo nos dias mais difíceis. Mostrar a simplicidade de cada situação, ajudar a vencer meus medos e frustrações. Pelos seus olhos que brilham de orgulho, e sempre dizer que irá mostrar aos nossos (futuros) filhos cada conquista da mamãe.

Aos meus amigos da célula Alcance Curitiba, por cada oração e apoio.

Ao meu orientador Dr. Washington Luiz Esteves Magalhães, pela oportunidade de fazer parte deste trabalho. A minha coorientadora Dra. Patrícia Raquel Silva Zanoni pela acolhida, apoio e ensino neste período.

A Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária - Embrapa Florestas, pela disponibilização do espaço de pesquisa, e aos colaboradores Fabrício, Dayanne, Cristiane e Simone pelo auxílio.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os professores e pesquisadores que de alguma maneira colaboraram para meu aprendizado, Pedro Cademartori, Diego Lomonaco, Daniela Lemos e Giselle Maciel.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Tecnologia da Madeira, Mailson, Tielidy, Caroline, Francielen, Mirela, Aline, Soraia e Gabriel. Agradeço o apoio e a amizade nestes anos. Compartilhamos momentos de alegrias, tristezas, frustrações, aprendizados, ansiedades e de amadurecimento nesta longa caminhada.

## RESUMO

A lignina é um polímero natural aromático fenilpropanóide, encontrado nos vegetais. Apesar de possuir características únicas, a maior parte da lignina é queimada para gerar energia. Para potencializar as aplicações da lignina é necessário superar a sua heterogeneidade gerando modificações estruturais. Uma opção é uma rota biotecnológica utilizando a enzima lacase. A enzima gera radicais que aumentam a reatividade das moléculas de lignina. Como resultado, uma grande variedade de novos compostos com propriedades distintas podem ser obtidos. Um entrave para o emprego das enzimas é o seu alto custo, assim, a imobilização em um substrato é uma melhoria significativa, que permite a reutilização da enzima. A celulose nanoestruturada é uma opção de substrato com baixo custo, facilidade de produção, renovável e biodegradável. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta processos de modificações de lignina via catálise enzimática com a enzima lacase comercial de *Myceliophthora thermophila*, em meios reacionais com até 60% de etanol, visando à geração de novos produtos de alto valor à base de lignina kraft. Além disso propõe a imobilização de lacase em nanofibrilas de celulose em suspensão obtidas por desfibrilação mecânica, visando à recuperação da enzima do meio reacional catalítico, diminuindo os custos de produção em processos envolvendo enzimas. Os principais resultados mostraram maior processo de oligomerização da lignina em meios reacionais com maior teor de álcool etílico, apesar da menor atividade enzimática. A maior solubilização do substrato no meio reacional intensificou a ação da enzima. A amostra obtida em meio reacional com 60% de etanol teve um aumento da média ponderada das massas moleculares de 5,8 vezes em relação a lignina solúvel em etanol, além de apresentar redução na atividade antioxidante, e redução na proporção de unidades siringil. As amostras de lignina obtidas em meio reacional com tampão acetato de sódio pH 4,5 e com 60% de etanol não apresentaram resultados de irritação cutânea, no teste de viabilidade celular, podendo ser utilizadas em produtos de saúde humana. As amostras de lignina apresentaram fator de proteção solar de até 30, podendo ser aplicadas como protetores solares, ou adicionadas em fotoprotetores comerciais. A imobilização da enzima lacase em suspensão de nanofibrilas de celulose apresentou rendimento de até 88 %, sendo viável para recuperação da enzima no meio reacional. Entretanto, a análise de reuso e o estudo cinético sugerem que o processo não conferiu satisfatória estabilidade operacional. A lacase imobilizada em nanocelulose apesar da redução da atividade pode ser recuperada e reutilizada até 4 vezes com a devida correção da massa aplicada na reação a partir da atividade apresentada.

Palavras-chave: Oligomerização. Lignina Kraft. Catálise Enzimática. Lacase. Imobilização. Nanocelulose.

## ABSTRACT

Lignin is a natural aromatic phenylpropanoid polymer found in vegetables. Despite its unique characteristics, most of the lignin is burned to generate energy. To enhance lignin applications, it is necessary to overcome its heterogeneity by generating structural changes. One option is a biotechnological route using the laccase enzyme. The enzyme generates radicals that increase the reactivity of lignin molecules. As a result, a wide variety of new compounds with distinct properties can be obtained. An obstacle to the use of laccase enzymes is their high cost, so immobilization on a substrate is a desirable development as it would allow the enzyme to be reused several times. Nanostructured cellulose is a substrate option due to its low cost, ease of production by mechanical defibrillation, renewable and biodegradable. In this context, the present work presents processes of lignin modifications via enzymatic catalysis with the *Myceliophthora thermophila* laccase enzyme, in reaction media with up to 60% ethanol, aiming at the generation of new high-value products based on kraft lignin. Furthermore, it proposes the immobilization of laccases in suspended cellulose nanofibrils obtained by mechanical defibrillation, aiming at their recovery from the catalytic reaction medium, reducing production costs in processes involving enzymes. The main results showed a higher lignin oligomerization process in reaction media with higher ethyl alcohol content, despite the lower enzymatic activity. The greater solubilization of the substrate in the reaction medium intensified the action of the enzyme. The sample in reaction medium with 60% ethanol had an increase in the weighted average of the molecular masses of 5.8 times compared to soluble lignin in ethanol, in addition to showing a reduction in antioxidant activity, and a reduction in the proportion of siringil units. The samples did not present skin irritation results in the cell viability test and can be used in human health products. The lignin samples showed a sun protection factor of up to 30, which can be applied as sunscreens, or added to commercial sunscreens. The immobilization of the laccase enzyme in suspension of vegetable cellulose nanofibrils showed a yield of up to 88%, being viable for recovery of the enzyme in the reaction medium. However, the reuse analysis and the kinetic study suggest that the process did not provide satisfactory operational stability. The laccase immobilized on nanocellulose, despite the reduction in activity, can be recovered and reused up to 4 times with due correction of the mass applied in the reaction from the activity presented.

Keywords: Oligomerization. Kraft Lignin. Enzymatic Catalysis. Laccase. Immobilization. Nanocellulose.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DOS PRECURSORES DOS MONÔMEROS DA LIGNINA.....	21
FIGURA 2 - UNIDADE DE FENILPROPANO.....	22
FIGURA 3 - LIGAÇÕES COMUNS ENTRE UNIDADES DE FENILPROPANO NA LIGNINA.....	23
FIGURA 4 - MODELO ESTRUTURAL PROPOSTO PARA LIGNINA.....	24
FIGURA 5 - POTENCIAL DE VALOR DE MERCADO PARA PRODUTOS À BASE DE LIGNINA .....	26
FIGURA 6 - ESQUEMA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DA LIGNINA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E AS CORRESPONDENTES PRODUÇÕES DE LIGNINAS TÉCNICAS.....	27
FIGURA 7 - ESTRUTURA DA LACASE E SÍTIO ATIVO .....	31
FIGURA 8 - CICLO CATALÍTICO DA LACASE.....	32
FIGURA 9 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS: CONFINAMENTO; ENCAPSULAÇÃO; ADSORÇÃO; LIGAÇÃO COVALENTE E RETICULAÇÃO	35
FIGURA 10 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE.....	36
FIGURA 11 - MODELO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO PARA O CÁLCULO DE HIDROXILAS FENÓLICAS .....	48
FIGURA 12 - ATIVIDADE RELATIVA DA LACASE EM DIFERENTES VALORES DE pH E TEMPERATURA .....	51
FIGURA 13 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA LACASE LIVRE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL.....	52
FIGURA 14 – GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK DA LACASE EM SOLUÇÃO TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO PH 4,5.....	53
FIGURA 15 - GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK DA LACASE EM TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO:ETANOL (40:60) .....	54
FIGURA 16 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, R1, R2, R3 E R4 EM FUNÇÃO DO TEMPO .....	56
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, R1, R1DE E R1SE EM FUNÇÃO DO TEMPO .....	57

FIGURA 18 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, R1 E R2 EM FUNÇÃO DO TEMPO ..	58
FIGURA 19- CROMATROGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, E10 A E60 EM FUNÇÃO DO TEMPO	59
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, E60 E E60SE EM FUNÇÃO DO TEMPO .....	60
FIGURA 21 - DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR PONDERAL DAS AMOSTRAS DE LIGNINA.....	61
FIGURA 22 - TGA DAS AMOSTRAS DE LIGNINA.....	63
FIGURA 23 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE LIGNINA EM MEIO ETANOL.....	67
FIGURA 24 - ESPECTRO FTIR DAS AMOSTRAS LE, R1 E60 E CONTROLES SEM ENZIMA R1SE E E60SE .....	68
FIGURA 25 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE LIGNINA .	69
FIGURA 26 - TEOR DE HIDROXILAS FENÓLICAS.....	70
FIGURA 27 - TEOR DE LIGNINA E POLISSACARÍDEOS .....	72
FIGURA 28 - RELAÇÃO DAS UNIDADES MONOMÉRICAS DA LIGNINA .....	73
FIGURA 29 VIABILIDADE CELULAR DAS LIGNINAS LE, R1 e E60.....	83
FIGURA 30 – HISTOLOGIA DAS RHE DO CN, R1, LE E E60. AUMENTO DE 40X.....	84
FIGURA 31 - SUSPENSÃO DA AMOSTRA E60 EM ETANOL PARA TESTE FPS .....	86
FIGURA 32 A) MOINHO SUPER MASSCOLOIDER MASUKO SANGYO B) DISCO DE PEDRA MÓVEL .....	93
FIGURA 33 - PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE .....	96
FIGURA 34 SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE .....	103
FIGURA 35- CELULOSE OXIDADA POR PERIODATO.....	104
FIGURA 36 - LIGAÇÃO COVALENTE DA ENZIMA LACASE COM O GRUPO ALDEÍDO DA CELULOSE.....	105
FIGURA 37 - A) FILME DE NANOCELULOSE B) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO FILME DE NANOCELULOSE.....	106
FIGURA 38 LACASE IMOBILIZADA EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE ..	109

FIGURA 39 - CURVA ANALÍTICA DE PROTEÍNAS TOTAIS POR BRADFORD .....	110
FIGURA 40 - GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK DA ENZIMA IMOBILIZADA .....	111
FIGURA 41 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA EM DIFERENTES MEIOS DE pH E TEMPERATURA .....	113
FIGURA 42 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA AO LONGO DO TEMPO .....	114
FIGURA 43 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA EM CICLOS DE USO.....	115

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - AMOSTRAS DE LIGNINAS CARACTERIZADAS E RESPECTIVAS SIGLAS .....	44
TABELA 2- PARÂMETROS CINÉTICOS DA LACASE EM DIFERENTES MEIOS REACIONAIS .....	55
TABELA 3 – $M_n$ , $M_w$ E PDI DAS LIGNINAS .....	62
TABELA 4- $T_{ONSET}$ , $DTG_{max}$ E TEOR DE RESÍDUO A 800 °C DAS AMOSTRAS DE LIGNINA.....	64
TABELA 5 - $T_g$ DAS AMOSTRAS DE LIGNINA.....	65
TABELA 6 - RELAÇÃO S/G .....	73
TABELA 7 - PONDERAÇÃO EMPREGADA NO CÁLCULO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	80
TABELA 8 - FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DA LIGNINA.....	85
TABELA 9 - FPS DA AMOSTRA E60 DETERMINADO PARA FILTRO FÍSICO .....	87
TABELA 10 TEOR MÉDIO DE AÇÚCARES DA POLPA CELULÓSICA UTILIZADA NA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE .....	102
TABELA 11- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E RENDIMENTO DOS TESTES PRELIMINARES COM LAA EM SUSPENSÃO DE NANOCELULOSE.....	106
TABELA 12- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E RENDIMENTO DURANTE O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA LACASE.....	107
TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DAS SOLUÇÕES DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	110
TABELA 14 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA LACASE IMOBILIZADA .....	111

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I – ASPECTOS GERAIS .....	17
I.1. INTRODUÇÃO GERAL .....	17
I.2. HIPÓTESE E OBJETIVOS .....	20
I.2.1. HIPÓTESE .....	20
I.2.2. OBJETIVO GERAL.....	20
I.2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
I.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	21
I.3.1. LIGNINA .....	21
I.3.2. ENZIMA LACASE.....	29
I.3.3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....	33
I.3.4. CELULOSE .....	36
I.3.5. NANOCELULOSE.....	37
CAPÍTULO II - MODIFICAÇÕES DE FRAÇÕES DE LIGNINA KRAFT VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	39
II.1. INTRODUÇÃO .....	39
II.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
II.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA KRAFT .....	40
II.2.1.2 FRAÇÃO SOLÚVEL EM ETANOL DA LIGNINA KRAFT .....	40
II.2.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE.....	41
II.2.2.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	41
II.2.2.2. ESTUDO CINÉTICO .....	42

II.2.3. REAÇÃO PARA MODIFICAÇÃO DA LIGNINA KRAFT .....	42
II.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE .....	43
<b>II.2.4.1. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO .....</b>	<b>44</b>
II.2.4.2 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC) .....	45
II.2.4.3. ANÁLISE TÉRMICA POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) .....	46
II.2.4.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	46
II.2.4.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES MODIFICADAS- MÉTODO ABTS .....	46
II.2.4.6. TEOR DE HIDROXILAS FENÓLICAS.....	47
II.2.4.7. PIRÓLISE ANALÍTICA ACOPLADA COM CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA (PY-GC-MS) .....	48
II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
II.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA KRAFT .....	50
II.3.1.2. LIGNINA KRAFT - FRAÇÃO SOLÚVEL EM ETANOL .....	50
II.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE .....	50
II.3.2.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA MÁXIMA.....	50
II.3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE .....	55
II.3.3.1 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO.....	55
II.3.3.2. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC) .....	61
II.3.3.3. ANÁLISE TÉRMICA POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) .....	63
II.3.3.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	66

II.3.3.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES MODIFICADAS- MÉTODO ABTS .....	69
II.3.3.6. TEOR DE HIDROXILAS FENÓLICAS.....	70
II.3.3.7. PY-GC/MS.....	71
II.4. CONCLUSÃO.....	75
CAPÍTULO III AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO COMO PROTETOR SOLAR DE FRAÇÕES DE LIGNINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE .....	76
III.1 INTRODUÇÃO .....	76
III.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	77
III.2.1. TESTE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA .....	77
III.2.2. HISTOLOGIA .....	78
III.2.3. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	79
III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
III.3.1. TESTE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA .....	82
III.3.2. HISTOLOGIA .....	83
III.3.3 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	84
III.4. CONCLUSÃO.....	89
CAPÍTULO IV. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE OBTIDAS POR DESFIBRILAÇÃO MECÂNICA .....	90
IV.1. INTRODUÇÃO .....	90
IV.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	91
IV.2.1 MATERIAIS.....	91
IV.2.2. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA .....	91

IV.2.3. OBTENÇÃO DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE .....	92
IV.2.4 OBTENÇÃO DE FILMES DE NANOCELULOSE.....	93
IV.2.5. OXIDAÇÃO DA NANOFIBRILAS DE CELULOSE .....	94
IV.2.6. TEOR DE GRUPOS ALDEÍDO GERADOS APÓS OXIDAÇÃO .....	94
IV.2.7. IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE ....	95
IV.2.8. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE IMOBILIZADA.....	96
IV.2.8.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	96
IV.2.8.2. TESTE DE VAZAMENTO .....	98
IV.2.8.3 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR BRADFORD .....	99
IV.2.8.4. ESTABILIDADE OPERACIONAL DA ENZIMA IMOBILIZADA .....	100
IV.2.8.5. CICLOS DE USO DA ENZIMA .....	100
IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	102
IV.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA .....	102
IV.3.2. OBTENÇÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE.....	102
IV.3.3. OXIDAÇÃO DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE .....	103
IV.3.4. TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO COM A LACASE AZUL .....	105
IV.3.5. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE .....	107
IV.3.6. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS – BRADFORD.....	109
IV.3.7. ESTUDO CINÉTICO .....	111
IV.3.8. TESTE DE VAZAMENTO .....	112
IV.3.9. ESTABILIDADE OPERACIONAL .....	112

IV.3.10. CICLOS DE USO DA ENZIMA .....	114
IV.4. CONCLUSÃO .....	116
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	117
REFERÊNCIAS.....	118

## CAPÍTULO I – ASPECTOS GERAIS

### I.1. INTRODUÇÃO GERAL

A lignina é a fonte de carbono mais abundante na Terra após a celulose, presente na parede celular das plantas e, portanto, na biomassa lignocelulósica, compondo entre 20 – 32% em massa da biomassa (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014; SILVA et al., 2012). Polímero fenilpropanóide ( $C_6C_3$ ) altamente complexo sintetizado principalmente a partir de três monômeros precursores, p-hidroxifenil, guaiacil e siringil. A estrutura apresenta uma alta heterogeneidade, causada por variações na composição, tamanho e grupos funcionais devido a diferenças na matéria-prima e condições de isolamento, não sendo possível definir precisamente a estrutura da lignina como uma molécula. Todavia, uma definição comum é uma rede polimérica ramificada formada por unidades básicas de fenilpropano (SENA-MARTINS; ALMEIDA-VARA; DUARTE, 2008).

Em todo o mundo, cerca de 70 milhões de toneladas de lignina são produzidas anualmente como um subproduto em processos de produção de papel e celulose na polpação da madeira. Apesar de suas características únicas, a maior parte da lignina é queimada para geração de energia (GOSELINK et al., 2004; SENA-MARTINS; ALMEIDA-VARA; DUARTE, 2008).

No entanto, pesquisas têm mostrado que a lignina apresenta um alto potencial muito além de combustível de baixo valor. Alguns exemplos dessas aplicações em potencial são: dispersante para a indústria química, aditivo/substituto de resinas fenólicas utilizadas na fabricação de painéis de fibras, fabricação de fibras de carbono, fonte de compostos químicos, com potencial de substituição de produtos oriundos de substâncias petroquímicas com as vantagens de ser baixo custo, biodegradável e renovável (NORBERG et al., 2013; STIEFEL et al., 2016).

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 certa para cada

potencial aplicação (LOURENÇON et al., 2015; STIEFEL et al., 2016). Os processos físico-químicos para modificação da lignina são os mais comumente abordados. Alguns aplicam o fracionamento, incluindo a utilização de reagentes químicos e/ou membranas de filtração (LINDBERG; TYLLI; MAJANI, 1964; LOURENÇON et al., 2015; WALLBERG; JÖNSSON, A. S. WIMMERSTEDT, 2003). Esta modificação pode ser realizada também por uma rota biotecnológica a partir de enzimas como as lacases, atuando como biocatalisador agregando valor a produtos de lignina, especialmente a lignina Kraft (FIŤIĜAU; PETER; BOERIU, 2013; MATE; ALCALDE, 2015; ORTNER et al., 2015).

As lacases são enzimas que por abstração de um elétron, catalisam reações de 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. São encontradas em plantas, insetos, bactérias e fungos principalmente nos fungos da podridão branca da madeira (PACHECO; SOARES, 2014; SILVA et al., 2012).

O tratamento com enzima lacase é frequentemente utilizado para promover a polimerização oxidativa de unidades fragmentadas e dissolvidas da lignina após os processos de polpação (FIŤIĜAU; PETER; BOERIU, 2013; ORTNER et al., 2015).

Dentre as enzimas mais importantes, a lacase é de 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 (MUNK et al., 2015).

A enzima lacase gera radicais que aumentam a reatividade das moléculas de lignina, gerando 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 obtidos (SENA-MARTINS; ALMEIDA-VARA; DUARTE, 2008).

No entanto seu uso na forma livre possui menor viabilidade devido às mesmas estarem sujeitas a fatores químicos, físicos e biológicos que limitam sua vida útil durante uso ou estocagem tornando-a um produto de alto custo. Muitas

destas características indesejáveis podem ser removidas ou amenizadas com o uso das enzimas na forma imobilizada. O confinamento 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 do produto do catalisador (PACHECO; SOARES, 2014; SOUZA et al., 2017).

Na busca por materiais para aplicação como suportes sólidos destaca-se a celulose por ser biodegradável e renovável, além de poder ser obtida em indústrias de papel e celulose, mesmo setor de obtenção da lignina (SAMPAIO et al., 2016; SATHISHKUMAR et al., 2014). Uma alternativa promissora é o uso das nanofibrilas de celulose, que além de apresentarem maior área superficial possuem baixo custo de obtenção e facilidade de produção por desfibrilação mecânica (CLARO et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2017).

Apesar de todas as soluções biotecnológicas apontadas para a lignina, até o momento não há nenhuma plataforma que proporcione a valorização e a utilização da lignina para novos produtos. Uma das principais razões é a necessidade de uma abordagem multidisciplinar dada a sua complexidade estrutural. Métodos para a conversão e aplicação de lignina, além da geração de energia, ainda são escassos. É necessário desenvolver novas tecnologias para valorização deste material, convertendo-o em produtos de maior valor agregado.

Assim, o objetivo deste projeto é o desenvolvimento de novos produtos a partir de reações enzimáticas com lignina utilizando lacase livre. Além de propor a imobilização da enzima lacase em nanocelulose, visando a reutilização da enzima.

## **I.2. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

### **I.2.1. HIPÓTESE**

“A lignina Kraft pode sofrer modificação química via catálise enzimática, que resultará em produtos oligomerizados, o que influencia diretamente a ação biológica do composto.”

### **I.2.2. OBJETIVO GERAL**

- Obter novos produtos a partir da modificação da lignina Kraft por rota enzimática.

### **I.2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Otimização do processo de oligomerização e/ou polimerização da lignina por rota enzimática;
- Caracterização das frações de lignina Kraft modificadas enzimaticamente;
- Avaliação da atividade biológica de frações de lignina modificadas;
- Desenvolver novos produtos a partir da lignina oligomerizada;
- Imobilização da enzima lacase em nanofibrilas de celulose obtidas por desfibrilação mecânica.

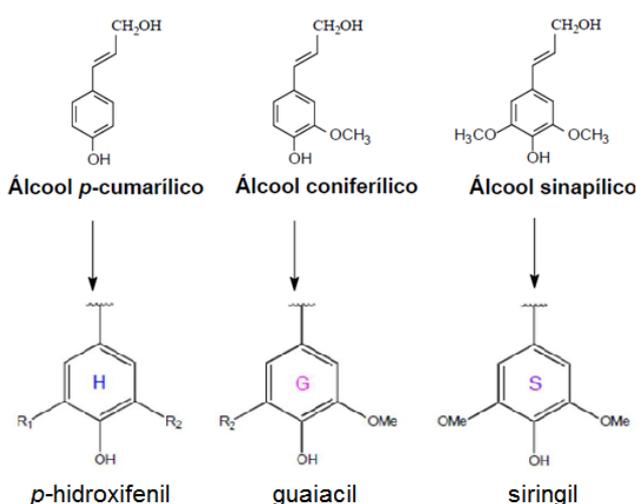
## I.3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### I.3.1. LIGNINA

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira (FENGEL; WEGENER, 1984). A lignina é o material renovável aromático mais disponível na natureza e a segunda fonte de carbono mais abundante após a celulose (HATAKKA, 2001; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014; SILVA et al., 2012). Encontrada na parede celular dos vegetais e na lamela média, compõe entre 20 – 32% em massa da biomassa lignocelulósica (FENGEL; WEGENER, 1984; SILVA et al., 2012). Confere rigidez à planta fortalecendo o tecido vegetal, além de inibir degradações enzimáticas e ter um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos (FENGEL; WEGENER, 1984; GRABBER, 2005).

É um polímero fenilpropanóide ( $C_6C_3$ ) altamente complexo sintetizado principalmente a partir de três monômeros precursores: *p*-hidroxifenil (a partir do álcool *p*-cumarílico), guaiacil (do álcool coniferílico) e siringil (do álcool sinapílico) (FIGURA 1) (SALIBA et al., 2001).

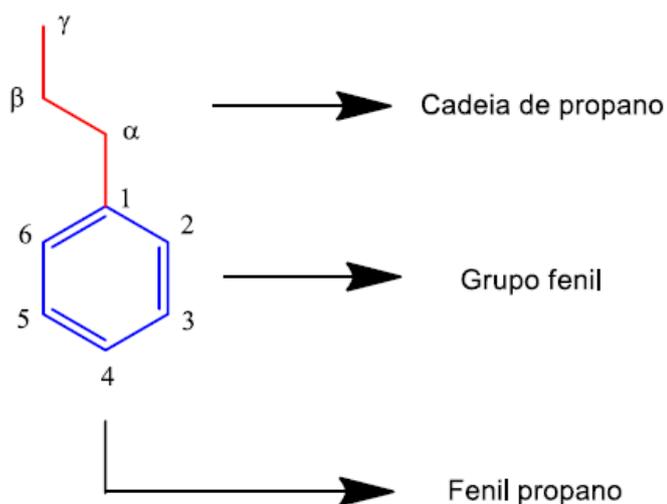
FIGURA 1 - ESTRUTURA DOS PRECURSORES DOS MONÔMEROS DA LIGNINA



FONTE: Adaptado de LAURICHESSE; AVÉROUS (2014).

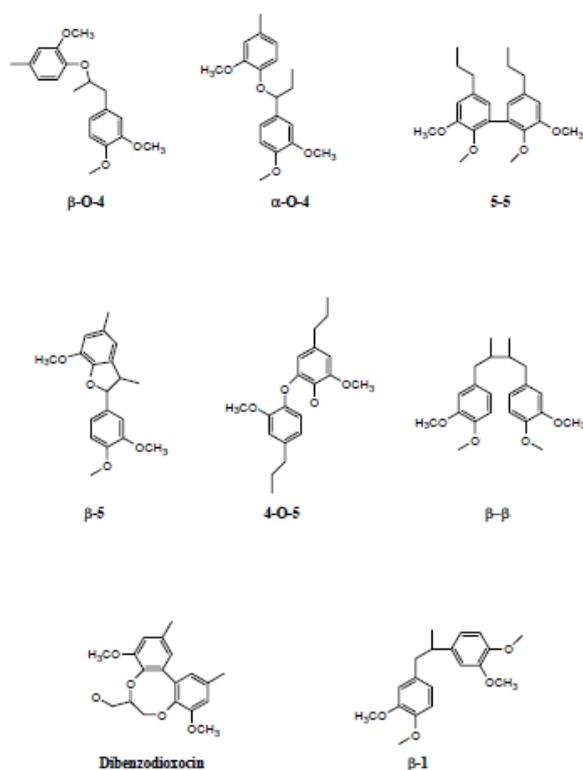
A unidade básica de fenilpropano (FIGURA 2) consiste em um anel aromático e uma cadeia lateral alifática de três átomos de carbono, denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . As unidades fenilpropano apresentam uma série de ligações características (FIGURA 3) entre si sendo a mais abundante do tipo  $\beta$ -O-4 (SALIBA et al., 2001).

FIGURA 2 - UNIDADE DE FENILPROPANO



FONTE: BONFATTI JÚNIOR ( 2020).

FIGURA 3 - LIGAÇÕES COMUNS ENTRE UNIDADES DE FENILPROPANO NA LIGNINA

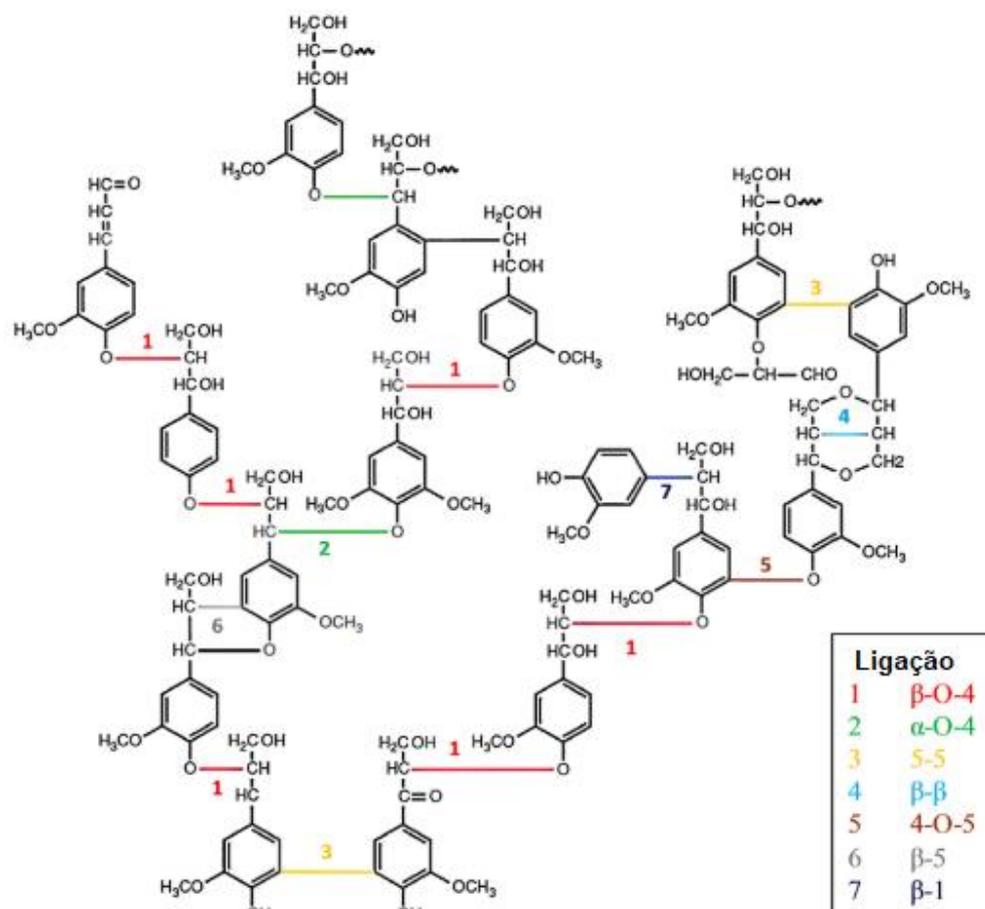


FONTE: CHAKAR; RAGAUSKAS (2004).

Foi descoberta inicialmente por Anselme Payen em 1838, as primeiras tentativas de proposição de uma estrutura para a lignina foram feitas por Freudenberg e Neish (1968), combinando resultados da reação de polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico com dados analíticos (SALIBA et al., 2001; SJÖSTRÖM, 1993).

Como resultado da união de unidades monoméricas de lignina, forma-se um composto aromático, complexo, tridimensional, amorfo e altamente irregular em sua constituição e estrutura molecular (FIGURA 4). Entre as ligações distribuídas aleatoriamente no polímero de lignina, aproximadamente dois terços são ligações éter e um terço são ligações carbono-carbono (HENRIKSSON, 2010).

FIGURA 4 - MODELO ESTRUTURAL PROPOSTO PARA LIGNINA



FONTE: LAURICHESSE; AVÉROUS (2014).

Os anéis aromáticos e os grupos hidroxilas da lignina permitem a formação de ligações com hemicelulose e pectinas, formando o complexo lignina - carboidrato, conhecido por ser responsável pela fraca deslignificação durante o cozimento (BALAKSHIN, M. Y. CAPANEMA; CHANG, 2007).

Na composição química elementar da lignina ocorrem exclusivamente carbono, hidrogênio e oxigênio. Entretanto a composição química e as características da lignina são influenciadas pela espécie vegetal, origem citológica, condições de crescimento (solo e clima) e estágio de desenvolvimento da planta (FENGEL; WEGENER, 1984; MORAIS, 1987, 1992).

Classificação geral das ligninas:

1. Lignina guaiacila (G): Presente nas coníferas, como o pinus, a estrutura é composta pelo grupo G, da polimerização do álcool coniferílico, com menores quantidades de grupos H (LIN; DENCE, 1992).

2. Lignina guaiacila-siringila (G-S): Presente nas folhosas, como o eucalipto, estão presentes em torno de S 50-75% e G unidades 25-50%, com alguns traços do grupo H (GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2008).

3. Lignina 4-hidroxifenil-guaiacila-siringila (H-G-S): Presente nas gramíneas com níveis semelhantes de S e G e maiores concentrações de H (5-35%) (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

Diferentes relações S/G podem ser encontradas na parede celular vegetal por diversas causas, como exemplo a lignina G possuir maior massa molar e maior estabilidade térmica, degradando-se em temperaturas mais altas que a lignina S (DEL RÍO; GUTIÉRREZ; HERNANDO, 2005).

O termo protolignina ou lignina *in situ* refere-se à lignina associada ao tecido da planta, uma vez que para a extração da lignina da sua associação natural na parede celular ocorre a ruptura das ligações lignina-polissacarídeos e uma redução na massa molecular (FENGEL; WEGENER, 1984). As massas moleculares dos derivados solúveis de lignina situam-se numa ampla faixa (YOSHIDA; MÖRCK; KRINGSTAD, 1987).

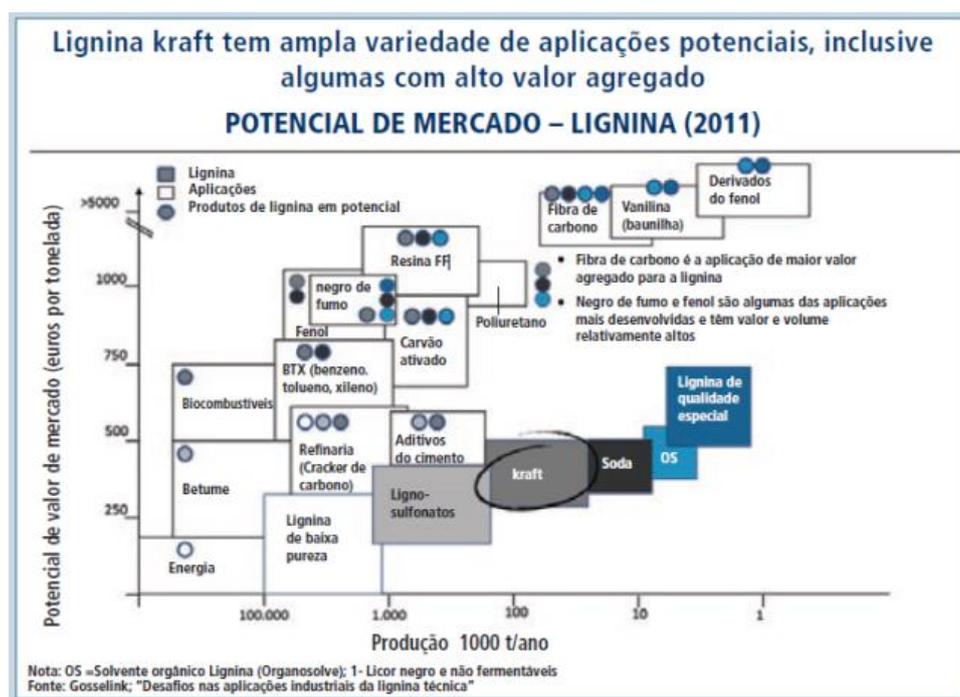
A lignina é um coproduto na indústria de celulose ou um subproduto de pré-tratamento e sacarificação de biomassa, raramente é extraída como componente de interesse (CARVAJAL; GÓMEZ; CARDONA, 2016).

Cerca de 70 milhões de toneladas de lignina são obtidas anualmente como um subproduto em processos de produção de papel. Apesar de suas características únicas, a maioria da lignina é queimada para geração de energia (menos de 10% da lignina disponível na indústria de celulose e papel é comercializada) (GOSSELINK et al., 2004; LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014). A quantidade total de lignina produzida por indústrias modernas de celulose é 60% maior do que a necessária para o fornecimento interno de energia (SANNIGRAHI; PU; RAGAUSKAS, 2010).

As indústrias de papel e celulose estão em busca de novos produtos além do papel, devido à queda na demanda por produtos tradicionais de celulose, a competição entre economias emergentes, o fornecimento limitado de petróleo e o incentivo a produtos verdes (HEININGEN, 2006).

Pesquisas têm mostrado que a lignina apresenta um alto potencial muito além de combustível de baixo valor (KIM; DALE, 2004; RAGAUSKAS et al., 2014). Alguns exemplos dessas aplicações em potencial são: dispersante para a indústria química, aditivo/substituto de resinas fenólicas utilizadas na fabricação de painéis de fibras, fabricação de fibras de carbono, fonte de vários compostos químicos, com potencial de substituição de produtos oriundos de substâncias petroquímicas com a vantagem de ter baixo custo, ser natural e renovável (FIGURA 5) (SANNIGRAHI; PU; RAGAUSKAS, 2010).

FIGURA 5 - POTENCIAL DE VALOR DE MERCADO PARA PRODUTOS À BASE DE LIGNINA

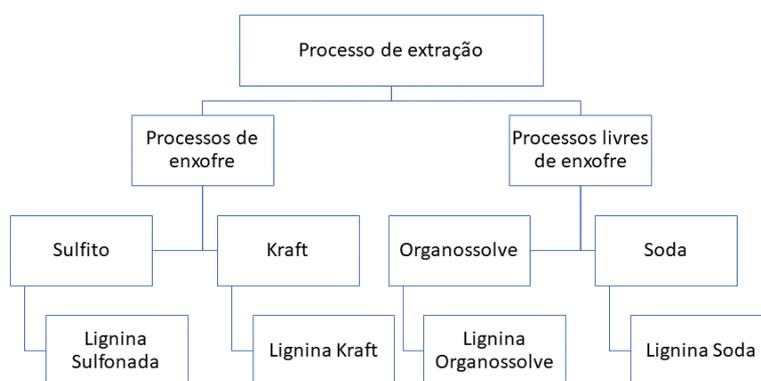


FONTE: "A lignina da Suzano" (2016).

A lignina pode ser isolada de madeira, plantas ou resíduos por diferentes processos de extração. Os principais processos são extrações comerciais da indústria de celulose e papel que recuperam a lignina através de processos de

enxofre (sulfito e kraft) e livres de enxofre (organossolve e soda) (FIGURA 6). Nas ligninas de processos de enxofre a recuperação é baseada nas acidificações do licor negro produzido (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014). A lignina kraft representa a maior quantidade de ligninas técnicas produzidas (HADDAD et al., 2016; NORGREN; EDLUND, 2014). O processo de polpação kraft é o mais utilizado para a produção de polpa celulósica no Brasil, sendo mais de 95% da produção de polpa celulósica obtida por esse processo (DARÉ ALVES et al., 2015).

FIGURA 6 - ESQUEMA DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DA LIGNINA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E AS CORRESPONDENTES PRODUÇÕES DE LIGNINAS TÉCNICAS



FONTE: Adaptado de LAURICHESSE; AVÉROUS (2014).

No processo Kraft na etapa de cozimento são empregados o hidróxido de sódio (NaOH) e o sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S) como agentes ativos na reação de deslignificação da madeira (CHAKAR; RAGAUSKAS, 2004). A despolimerização da lignina durante o cozimento Kraft ocorre principalmente pela clivagem das ligações  $\alpha$  e  $\beta$  aril éter (SJÖSTRÖM, 1993).

A lignina é recuperada do licor negro pelo processo de acidificação e reduzindo a solubilidade da lignina em água. Primeiro adiciona-se dióxido de carbono gasoso a pH 9-10 para precipitar a lignina (cerca de 75%) na forma de sal de sódio. Em seguida é realizado aquecimento, formando um material mais facilmente filtrável, o qual suspenso em água é purificado pela adição de ácido sulfúrico (VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011). Outros componentes do licor negro

como carboidratos, seus produtos e inorgânicos são solúveis em água em uma ampla faixa de pH, possibilitando a recuperação de lignina com relativamente baixo teor de cinzas e carboidratos (LORA, 2008).

As ligninas técnicas apresentam estruturas químicas variadas, diferentes solubilidades e reatividades. A presença de impurezas (como compostos inorgânicos e traços de holocelulose) na lignina recuperada podem restringir sua utilização como produtos de alto valor agregado. Entretanto, as ligninas técnicas estão prontamente disponíveis em grandes quantidades (VISHTAL; KRASLAWSKI, 2011).

A obtenção de frações de lignina purificadas com propriedades definidas permite potencializar sua aplicação em diversos campos. A lignina em sua forma macromolecular apresenta propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antiviral (GOSSELINK et al., 2004; LIU; YANG, 2014). Tais propriedades também sugerem que este material apresenta características antifúngicas, podendo ser utilizado para prolongar a vida útil de alimentos durante o armazenamento, conforme já apresentado na literatura por Jonglertjunya et al., (2014). Nesse sentido, a lignina tem sido amplamente estudada no campo do bioplástico (ZHANG et al., 2017), embalagens (YANG; OWCZAREK, J. S.; FORTUNATI, 2016), cosméticos como bloqueadores solares (QIAN et al., 2017; QIAN; QIU; ZHU, 2015; SAJINCIC et al., 2021) e painéis solares (GONG; IMBAULT; FARNOOD, 2017).

Cresce também o interesse da lignina para uso na agricultura, na composição de herbicidas, fertilizantes e biocidas (WANG; ZHAO, 2013), como também no desenvolvimento de compostos bioativos naturais para produtos de saúde humana (FIGUEIREDO; LINTINEN; KIRIAZIS, 2017; UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008).

O interesse no papel fisiológico de compostos bioativos presentes em plantas aumentou ao longo dos últimos anos, particularmente, com foco no desenvolvimento de produtos para a saúde humana (UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008). Foram relatadas atividades da lignina atribuídas a potenciais benefícios à saúde humana: atividade antitumoral; antiviral, atividade imunopotencializadora; ação antibacteriana, antiparasitária; antioxidante e

agentes antimutagênicos (KOSIKOVA et al., 2002; MIKULASOVA; KOSIKIVA, 2003; THÁ et al., 2021; UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008; VINARDELL; UGARTONDO; MITJANS, 2008).

Recentemente, duas patentes depositadas por instituições médicas chinesas (CN104173328-A, e CN104072515-A) foram desenvolvidas para o tratamento e prevenção de doenças relacionadas com angiogênese (tumor, esclerose múltipla, diabetes, doença de pele, psoríase, aterosclerose e hipertensão) utilizando piranos derivados da lignina de carnaúba (DU et al., 2013a) e para o preparo de drogas antitumorais utilizando lignina de amargoseira indiana (LIU; YANG, 2014).

A aplicação da lignina na indústria de cosmético encontra-se bem estabelecida, ou seja, amplamente utilizada devido à sua alta capacidade antioxidante e ausência de efeitos adversos à saúde humana (UGARTONDO; MITJANS; VINARDELL, 2008).

### **I.3.2. ENZIMA LACASE**

Diferentemente dos catalisadores químicos convencionais, as enzimas são catalisadores naturais altamente específicos e, portanto, capazes de discriminar não somente as reações, como também os substratos (SOUZA et al., 2017).

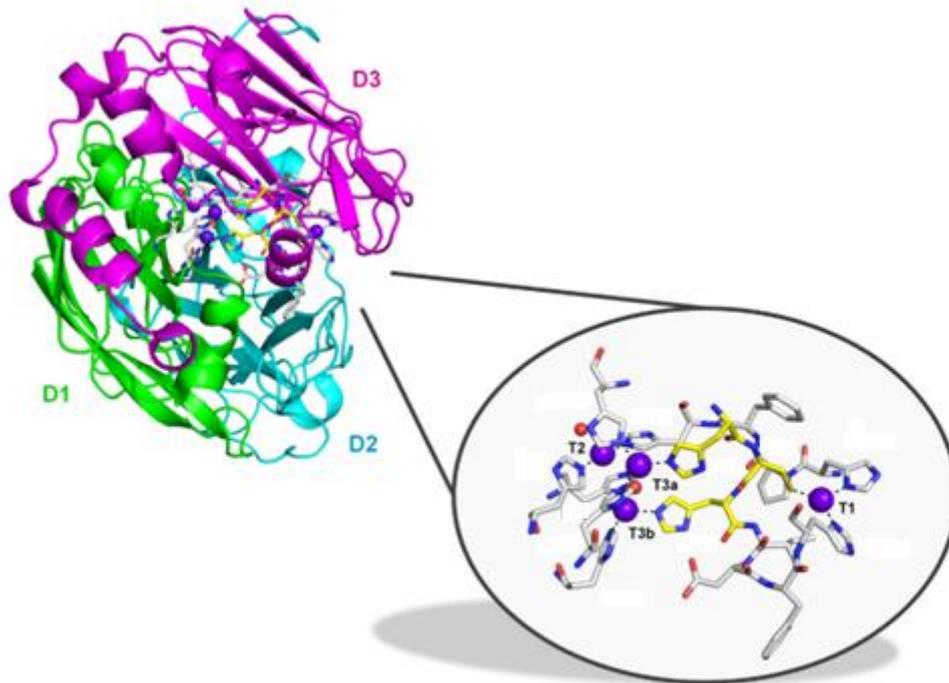
Os reagentes envolvidos em uma reação catalisada por uma enzima são chamados de substratos. Como todos os catalisadores, a enzima diminui a energia de ativação para uma reação, ou seja, encontra um mecanismo de reação distinto entre substratos e produtos, com uma energia de ativação inferior à da rota reacional inicial. A enzima não é consumida na reação e não altera o equilíbrio da reação. Há, no entanto, uma característica que torna as enzimas diferentes de outros catalisadores: as enzimas são altamente específicas para seus substratos (PACHECO; SOARES, 2014; SOUZA et al., 2017).

As lacases (EC 1.10.3.2) fazem parte de um grupo de enzimas denominadas enzimas multicobre. É uma polifenol oxidase que atua sobre uma variedade de doadores de hidrogênio aromáticos, e catalisam a oxidação, por abstração de um elétron, substratos orgânicos e inorgânicos incluindo mono-, di- e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas gerando um radical fenoxila (MAYER; STAPLES, 2002).

A enzima lacase foi descrita primeiramente por Yoshida em 1883 e caracterizada como uma oxidase contendo metal por Bertrand em 1985. São classificadas em dois grupos principais as extraídas de plantas e as sintetizadas por fungos. Apesar de vários estudos realizados as funções biológicas das lacases nos organismos produtores ainda não são bem estabelecidas (HARVEY; WALKER, 1999; MAYER; STAPLES, 2002).

Possuem quatro átomos de cobre nos sítios ativos, os quais são distribuídos em dois centros de cobre responsáveis pela transferência de elétrons durante as reações redox (FIGURA 7). Um dos centros é mononuclear e possui o cobre tipo 1 (T1), responsável pela coloração azul da enzima e pela oxidação do substrato e a partir do qual ocorrem as transferências de elétrons para o centro tri-nuclear. O outro centro é tri-nuclear e possui um cobre tipo 2 (T2) e dois tipo 3 (T3a e T3b). O cobre tipo 2 atua na atividade catalítica e redox em conjunto com moléculas de histonas. O cobre tipo 3 é responsável pela ativação do O<sub>2</sub> para transporte e oxigenação (LEONOWICZ et al., 2001). As lacases possuem três domínios (D1, D2 e D3) característicos das cupredoxinas (proteínas de cobre azul devido a presença de cobre mononuclear tipo 1 (MATE; ALCALDE, 2015).

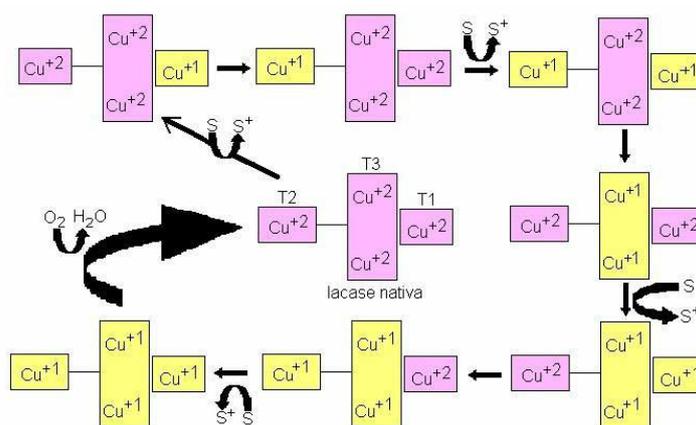
FIGURA 7 - ESTRUTURA DA LACASE E SÍTIO ATIVO



FONTE: MATE; ALCALDE (2015).

À medida que a enzima vai promovendo a oxidação de seus substratos, os átomos de cobre vão se reduzindo e transferindo seus elétrons, de forma que o sítio 1 sempre esteja pronto para promover a oxidação de um substrato, até a completa redução de todos os sítios e sua reoxidação formando água para retomar novamente o ciclo (FIGURA 8) (MATE; ALCALDE, 2015).

FIGURA 8 - CICLO CATALÍTICO DA LACASE



FONTE: VILLELA (2006).

A mudança na estrutura da lignina é iniciada quando a lignina é oxidada pela lacase pela abstração de um elétron de uma subunidade fenilpropanoide. A abstração de um elétron ativa a superfície da lignina, criando um radical ativo. A ativação da estrutura da lignina pode induzir diferentes eventos reativos, como clivagem de ligação, modificação e / ou acoplamento. A maioria dos estudos demonstram que o tratamento com apenas lacase resulta na polimerização da lignina. No caso de modificações de polímeros de lignina com altas taxas fenólicas ou ligados a carboidratos, a lacase diminui a massa molecular do polímero (MUNK et al., 2015).

Pesquisas sugerem que existe concorrência entre despolimerização, acoplamento oxidativo de mediadores ou polimerização. Li; Henriksson; Gellerstedt, (2007) sugeriram que uma competição entre despolimerização e polimerização ocorre quando a ligação  $\beta$ -O-4' é quebrada durante a explosão de vapor de madeira. O tipo de radical criado, as condições de reação e a presença de mediadores podem influenciar o curso da reação para a despolimerização ou polimerização (CRESTINI; JURASEK; ARGYROPOULOS, 2003). A sugestão de competição entre rotas de reação é uma explicação para os resultados inconsistentes em relação à polimerização e despolimerização (MUNK et al., 2015).

Se as unidades fenilpropanóides ativadas resultarem em clivagem da lignina, é provável que um número de clivagens consecutivas facilitará a fragmentação da lignina, resultando em uma redução na massa molecular média

da lignina, isto é, despolimerização. A despolimerização é a fragmentação da lignina associada à clivagem de ligação, produzindo lignina de menor massa (MUNK et al., 2015).

Estudos realizados por Bourbonnais; Paice, (1990) demonstraram que a atividade polimerizante das lacases sobre a lignina foi detectada quando a reação ocorria na presença de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) e Remazol Blue. Essas substâncias atuam como mediadores, que permitem a lacase catalisar a oxidação e clivagem de substratos não fenólicos.

As lacases vêm sendo estudadas para várias aplicações biotecnológicas, tais como a biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais, descoloração de corantes, biorremediação de solos contaminados, produção de bioetanol e a produção de biossensores (GARCIA, 2006; PACHECO; SOARES, 2014).

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 (PACHECO; SOARES, 2014; SOUZA et al., 2017).

### **I.3.3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

A imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. Enzimas imobilizadas ou sistemas enzimáticos são 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 (SOUZA et al., 2017).

A imobilização enzimática tem sido considerada a técnica mais promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas em larga escala (PACHECO; SOARES, 2014; SOUZA et al., 2017).

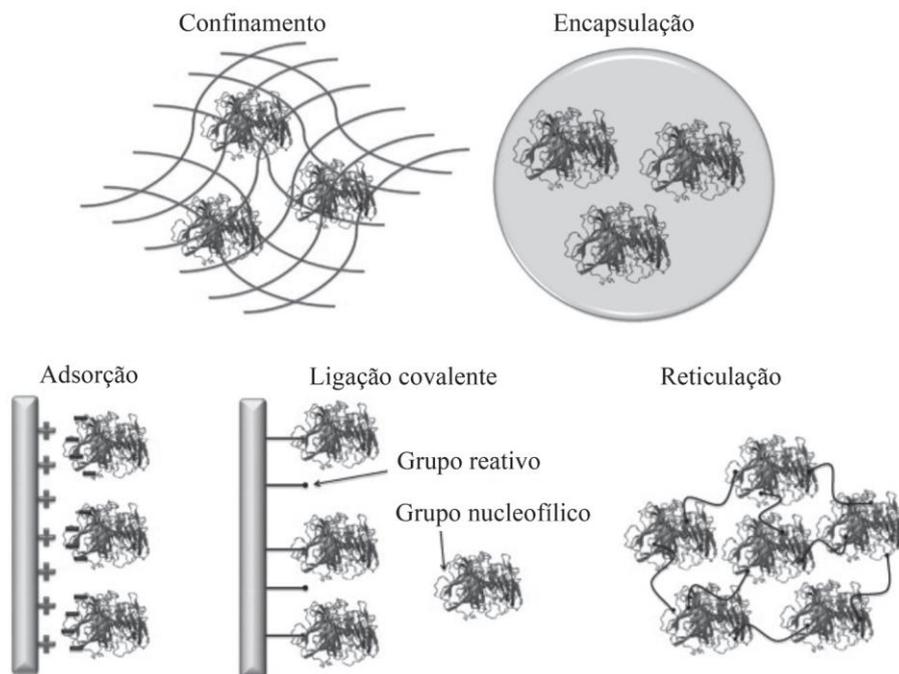
Existem diferentes protocolos de imobilização que se diferenciam quanto ao tipo de suporte e eficiência. Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos, não há um método aplicável para todas as enzimas conhecidas, sendo indispensável o conhecimento prévio das características do suporte e do efeito dos métodos empregados para selecionar a técnica de imobilização a ser utilizada para uma determinada finalidade (DURÁN; ROSA; D'ANNIBALE, A., GIANFREDA, 2002; SOUZA et al., 2017).

As lacases, assim como quaisquer enzimas, estão sujeitas à inativação por diversos fatores químicos, físicos e biológicos, podendo estes ocorrer quando estocadas ou durante o uso (SAID; PIETRO, 2004).

Por razões práticas e econômicas o confinamento das enzimas em suportes sólidos proporciona diversas vantagens em relação às 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 (JESUS, 1998; NASCIMENTO; SOLDI; DALLA-VECCHIA, 2004).

As enzimas podem ser imobilizadas por diferentes métodos, tais como: encapsulação em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; encapsulação; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação (FIGURA 9) (NASCIMENTO; SOLDI; DALLA-VECCHIA, 2004; SOUZA et al., 2017).

FIGURA 9 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS: CONFINAMENTO; ENCAPSULAÇÃO; ADSORÇÃO; LIGAÇÃO COVALENTE E RETICULAÇÃO



FONTE: SOUZA et al. (2017).

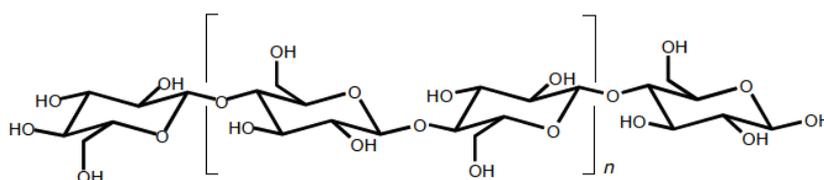
A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como: atividade global do biocatalisador, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, estabilidade operacional, propriedades hidrodinâmicas e características finais desejadas para a enzima imobilizada (ILLANES et al., 2012; PACHECO; SOARES, 2014; SOUZA et al., 2017).

Vários tipos de suportes vêm sendo estudados para a imobilização das enzimas, dentre estes encontram-se: celulose (CHEN; ZOU; HONG, 2015; DROZD et al., 2018; FRAZÃO et al., 2014; GHODAKE et al., 2018; SATHISHKUMAR et al., 2014; SONG et al., 2018), nanopartículas de titânio (HOU et al., 2014; LI et al., 2017), membranas com PVA (TANG et al., 2015; WANG; HSIEH, 2008), quitosana (SINHA et al., 2012; SKORONSKI et al., 2014) e diversos outros.

### I.3.4. CELULOSE

A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra, com uma elevada taxa de regeneração via fotossíntese, sendo o principal componente estrutural das plantas. Polissacarídeo de fórmula molecular  $(C_6H_{10}O_5)_n$  é composto pela união de moléculas de D - glicopiranosose através das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (FIGURA 10), com característica fibrosa (HOENICH, 2006; VIERA, 2013). A unidade de repetição é um dímero de glicose conhecido como celobiose (GRAÇA, 2009; ZHU et al., 2014).

FIGURA 10 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE



FONTE: NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS (2016).

A celulose pode ser encontrada em uma ampla variedade de plantas, algas e bactérias. No caso da madeira compõe de 40 - 45% das fibras, associada à hemicelulose e à lignina na parede celular. Uma vasta gama de estruturas de celulose (fibras, nanofibrilas, cristais, entre outras) estão sendo estudadas para inúmeras aplicações comerciais (HOENICH, 2006; IOELOVICH, 2008; VIERA, 2013).

A celulose é muito aplicada como suporte na imobilização de enzimas, sendo encontrada de várias maneiras como: celulose bacteriana (CHEN; ZOU; HONG, 2015; DROZD et al., 2018; FRAZÃO et al., 2014; SONG et al., 2018), celulose modificada (LI et al., 2018), compósitos de celulose (GHODAKE et al., 2018; YAOHUA et al., 2019) e filmes de nanocelulose (SATHISHKUMAR et al., 2014).

### I.3.5. NANOCELULOSE

O interesse das indústrias de papel e celulose pela nanotecnologia na busca por novos materiais têm crescido (HEININGEN, 2006). O principal diferencial na escala nanométrica é a potencialização das propriedades físicas e químicas, resultante de uma área superficial elevada, maior grau de dispersão e funcionalidades (KAMEL, 2007).

A nanocelulose possui ao menos uma dimensão na escala nanométrica entre 1 – 100 nm. Dependendo das condições da produção, das dimensões e propriedades pode ser dividida em nanocristais de celulose, nanofibrilas de celulose e celulose bacteriana, ocorrendo naturalmente na estrutura da parede celular vegetal ou na síntese bacteriana. Podem ser obtidas por diversos processos mecânicos ou químicos que abram a estrutura da fibra expondo as microfibrilas (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016).

A desfibrilação é feita principalmente por tratamentos mecânicos utilizando homogeneização, moagem, refinação e *cryocrushing*. As nanofibrilas podem ser obtidas por desintegração da celulose através de processo mecânico de homogeneização, promovendo a exposição das fibrilas (ABDUL KHALIL et al., 2014).

Os nanomateriais celulósicos possuem grande área superficial e a capacidade de formar ligações de hidrogênio, o que permite criar uma rede forte e densa (FERRER; PAL; HUBBE, 2017). As propriedades da estrutura da nanocelulose dependem principalmente da origem da celulose e do processo de extração (MAITI et al., 2013).

A nanocelulose possui ampla variedade de aplicações devido a propriedades únicas como baixa expansão térmica, transparência óptica, biodegradabilidade, baixo custo e baixa toxicidade (SACUI et al., 2014). É utilizada em nanocompósitos, fabricação de papel, fármacos, cosméticos, aditivos de revestimento, embalagens de alimentos, barreira para gases e na área biomédica (ABDUL KHALIL et al., 2014).

A celulose nanoestruturada é uma boa opção de suporte sólido devido à facilidade de produção e à elevada área superficial, sendo biodegradável e renovável e podendo ser obtida em indústrias de papel e celulose (SOUZA et al., 2017).

Sathishkumar et al. (2014) imobilizaram a enzima lacase em filmes de nanocelulose. 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 dissolvida (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016; WAN; GUO; PAN, 2004). Para a dissolução da celulose é necessário um solvente específico, em geral o N-óxido de N-metilmorfolina (NMMO) ou o LiCl/DMAc (cloreto de lítio/N,N-dimetilacetamida) (NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016).

O método de moagem ou desfibrilação mecânica ocorre pelo processo mecânico de compressão e forças de cisalhamento. Comumente é utilizado um moinho de pedras MasukoSangyo. Quando a polpa é forçada pela abertura entre as pedras de moagem, disco superior estático e disco inferior rotativo ocorre o processo de desfibrilação, sendo utilizada água e energia, obtendo nanofibrilas em suspensão (ABDUL KHALIL et al., 2016; MAGALHÃES et al., 2017; NECHYPORCHUK; BELGACEM; BRAS, 2016). A nanocelulose obtida por desfibrilação mecânica apresenta menor custo e maior facilidade de produção em relação à técnica sofisticada de eletrofiação.

## **CAPÍTULO II - MODIFICAÇÕES DE FRAÇÕES DE LIGNINA KRAFT VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA**

### **II.1. INTRODUÇÃO**

A estrutura da lignina apresenta características únicas, porém a maior parte deste composto é queimado para geração de energia(LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014). Nos últimos anos, esta estrutura tem despertado o interesse da biorrefinaria. Pesquisas têm mostrado que a lignina apresenta um alto potencial muito além de combustível de baixo valor, com potencial de substituição de produtos oriundos de substâncias petroquímicas com as vantagens de baixo custo, biodegradável e renovável (STIEFEL et al., 2016).

Entretanto devido a heterogeneidade da estrutura da lignina, resultado dos diferentes métodos de extração, torna-se necessário aplicar processos de modificações para produzir idealmente a lignina para cada potencial aplicação. Esta modificação pode ser realizada por uma rota biotecnológica a partir de enzimas como a lacase (FIŤIĚAU; PETER; BOERIU, 2013; MATE; ALCALDE, 2015; ORTNER et al., 2015).

Como resultado da reação com enzima lacase, formam-se radicais sendo que estes aumentam a reatividade das moléculas de lignina. O aumento da reatividade gera reações de forma aleatória formando polímeros tridimensionais de maior ou menor massa molecular e com uma variedade de novas ligações. Assim uma grande variedade de novos compostos com propriedades distintas podem ser obtidos (SENA-MARTINS; ALMEIDA-VARA; DUARTE, 2008).

O objetivo deste capítulo é apresentar a modificação de frações de lignina Kraft via catálise enzimática utilizando lacase livre para obtenção de novos produtos da lignina.

## II.2. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foi utilizado um preparado enzimático comercial fornecido pela Buckman – NZ51003, lacase de *Myceliophthora thermophila*. Aspecto – líquido marrom. Temperatura recomendada de armazenagem 2 °C - 8 °C.

Para o processo de oligomerização, a fração solúvel em etanol da lignina (LE) foi utilizada como substrato inicial. A LE foi obtida a partir da lignina de eucalipto resultante do processo kraft (LK), cedida por indústria de papel e celulose da região de São Paulo, após processo industrial de precipitação ácida do licor negro, referente a fração pH 9.

### II.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA KRAFT

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, o material foi mantido a 100°C até atingir massa constante (KLOCK et al., 2005).

Para 1 g de amostra foram adicionados 15 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 72% e mantido 2 h em repouso. Em seguida foram adicionados 560 mL de água destilada e levado para ebulição em condensador por 4 h. Após resfriar, o material foi filtrado e o teor de lignina determinado pelo método gravimétrico (KLOCK et al., 2005).

A amostra foi calcinada em mufla a 525 °C por 1 h. O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico (KLOCK et al., 2005).

#### II.2.1.2 FRAÇÃO SOLÚVEL EM ETANOL DA LIGNINA KRAFT

Para obter a lignina Kraft solúvel em etanol foram pesadas 10 g de lignina previamente seca e realizada a extração em equipamento Soxhlet utilizando 200 mL de álcool etílico absoluto P.A. Pelo método gravimétrico foi quantificada o

teor de lignina Kraft solúvel em etanol, pela diferença de massa do filtro após o processo de extração.

## II.2.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE

### II.2.2.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para aplicação da lacase foi necessária quantificar atividade enzimática do preparado enzimático comercial, utilizando ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) como substrato, leitura em espectrofotômetro a 420 nm e 5 min de tempo de reação.

A atividade enzimática foi determinada em diferentes valores de pHs e temperaturas pelo cálculo da equação (A) em U.mL<sup>-1</sup>:

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

Considerando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) do ABTS a 420 nm = 36 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Sendo (U) a unidade de atividade enzimática, definida como a quantidade de enzima que catalisa a reação de 1  $\mu$ mol de substrato em um minuto, neste caso o substrato ABTS.

A influência do pH e da temperatura na atividade enzimática foi avaliada variando os meios reacionais entre pH 4,5 e 7,5 e faixa de temperatura de 30 °C a 80 °C. Em cada combinação de pH e temperatura foram determinadas as atividades enzimáticas por leitura em espectrofotômetro a 420 nm e 5 min de tempo de reação, conforme cálculo da equação (A). Após determinação do pH e da temperatura de atividade máxima nas condições estudadas, foram selecionados os parâmetros ideais e realizada a determinação da atividade adicionando ao meio entre 10 e 80% (v/v) etanol.

### II.2.2.2. ESTUDO CINÉTICO

Os parâmetros cinéticos da equação (B) de Michaelis-Menten ( $K_m$  e  $V_{max}$ ), que descrevem a taxa de reação enzimática relacionando a velocidade da reação e a concentração do substrato para enzimas, foram determinados a partir das atividades enzimáticas usando ABTS como substrato na faixa de 0,025 – 1 mM a 40 °C, em meio reacional de tampão acetato de sódio pH 4,5 e tampão acetato de sódio pH 4,5:etanol (40:60) (v/v). Os parâmetros cinéticos foram calculados usando o gráfico de Lineweaver-Burk, que lineariza a equação B, ou seja, um gráfico de  $1/V_0$  versus  $1/[S]$  produz uma linha que possui inclinação de  $K_m/V_{máx}$  e intersecção de  $-1/K_m$  (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014; SATHISHKUMAR et al., 2014).

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{(K_m + [S])} \text{ (B)}$$

$V_0$  – Velocidade inicial da reação ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )

$V_{max}$  – Velocidade máxima da reação ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )

$K_m$  – Constante de Michaelis-Menten (mM)

$[S]$  – Concentração do substrato (mM)

### II.2.3. REAÇÃO PARA MODIFICAÇÃO DA LIGNINA KRAFT

As reações foram realizadas adicionando-se 1,5 g da fração de lignina solúvel em etanol (LE) em 1 L do meio reacional (GOUVEIA et al., 2012), os meios testados foram:

- Tampão acetato de sódio pH 4,5 100 mM
- Tampão acetato de sódio pH 5,5 100 mM

- Tampão fosfato de potássio pH 7,5 100 mM
- Tampão acetato de sódio pH 4,5: álcool etílico; nas proporções de 10 – 60% etanol (v/v).

A enzima lacase foi adicionada ao meio reacional atingindo uma atividade final de 2 U mL<sup>-1</sup> (GOUVEIA et al., 2012), o volume de enzima necessário foi determinado a partir da atividade enzimática no meio reacional calculada anteriormente no tópico II.2.2.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA. A reação foi mantida sob agitação em banho à temperatura de 40 °C, por 2 horas. Para avaliação da influência do tempo foi realizada uma reação com tampão pH 4,5 por 4h a 40 °C. Para finalizar a reação, a amostra foi transferida para banho-maria com temperatura de 100 °C, por 10 minutos, seguida da adição de ácido clorídrico fumegante até atingir pH 2,0. Para obtenção do produto da reação, a amostra foi filtrada em membrana de nylon 0,22 µm e lavada duas vezes com solução de ácido clorídrico pH 2,0. Em seguida o filtrado foi seco em estufa, na temperatura de 60 °C, por 12 horas. Para caracterização da reação a solução filtrada foi coletada e armazenada em refrigerador a 4°C.

Foram realizados experimentos controles para garantir que os produtos obtidos fossem resultantes da atividade enzimática. O controle negativo foi realizado sem a presença de enzima, onde o volume da enzima foi substituído pelo volume do meio reacional. O controle positivo foi realizado na presença de enzima desnaturada. Para desnaturação a enzima foi mantida por 1 h a temperatura de 100 °C em seguida da redução do pH para 2. As reações de controle foram realizadas nas mesmas condições das reações com enzima ativa, para os meios reacionais tampão acetato de sódio pH 4,5 e tampão acetato de sódio pH 4,5: álcool etílico (40:60) (v/v).

#### **II.2.4. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE**

Na TABELA 1 está apresentada a relação das amostras de lignina e os códigos para identificação nos resultados de caracterização das frações de lignina modificadas enzimaticamente

TABELA 1 - AMOSTRAS DE LIGNINAS CARACTERIZADAS E RESPECTIVAS SIGLAS

<b>Amostra</b>	<b>Código</b>
Lignina Kraft	LK
Fração da lignina Kraft solúvel em etanol	LE
Lignina após reação em meio pH 4,5 por 2h	R1
Lignina após reação em meio pH 4,5 por 4h	R2
Lignina após reação em meio pH 5,5 por 2h	R3
Lignina após reação em meio pH 7,5 por 2h	R4
Lignina após reação em meio pH 4,5:etanol (90:10) por 2h	E10
Lignina após reação em meio pH 4,5:etanol (80:20) por 2h	E20
Lignina após reação em meio pH 4,5:etanol (70:30) por 2h	E30
Lignina após reação em meio pH 4,5:etanol (60:40) por 2h	E40
Lignina após reação em meio pH 4,5:etanol (50:50) por 2h	E50
Lignina após reação em meio pH 4,5:etanol (40:60) por 2h	E60
Controle lignina em meio pH 4,5 por 2h sem presença de enzima	R1SE
Controle lignina em meio pH 4,5 por 2h enzima desnaturada	R1DE
Controle lignina em meio pH 4,5:etanol (40:60) por 2h sem presença de enzima	E60SE
Controle lignina em meio pH 4,5: etanol (40:60) por 2h enzima desnaturada	E60DE
Controle filtrado da reação em meio pH 4,5: etanol (40:60) por 2h	FE60

#### II.2.4.1. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO

A metodologia de cromatografia por exclusão de tamanho no equipamento Akta Pure, foi adaptada a partir da técnica de purificação de proteínas, técnica originalmente desenvolvida para uso do equipamento. A

técnica foi aplicada qualitativamente para pré-seleção das amostras a serem encaminhadas para a cromatografia de permeação em gel (GPC) em equipamento Shimadzu LC-20AD, sendo este método quantitativo.

A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada em coluna Superdex Peptide 10/300 GL (100 – 7000 Da) e eluição isocrática com o eluente NaOH 0,10 M e NaCl 0,15 M, pH 13, e fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup>, com a detecção por UV a 280 nm, em cromatógrafo Akta Pure da marca GE. As amostras de lignina foram solubilizadas no eluente NaOH 0,10 M e NaCl 0,15 M, pH 13, na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> para injeção no sistema.

#### **II.2.4.2 CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)**

Pelos diferentes tamanhos dos poros da fase estacionária da coluna o sistema de cromatografia de permeação em gel realiza a distribuição das moléculas presente na amostra, o que permite determinar a distribuição de massas moleculares de uma amostra em solução. Moléculas menores são retidas na fase estacionária da coluna, pois penetram nos poros e eluem por último. Moléculas com maior massa molar não penetram nos poros, consequentemente eluindo primeiro (AMORIM, 2019). Para determinação da massa molecular das amostras foi realizada a análise de cromatografia de permeação em gel (GPC) em equipamento Shimadzu LC-20AD a 40 °C utilizando duas colunas analíticas de GPC em série (Phenogel 5 µm 50 Å e Phenogel 5 µm 10<sup>3</sup> Å 7,38 mm x 300 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) e tetraidrofurano (THF) como fase móvel. As amostras foram monitoradas por detector UV-Vis (Shimadzu SPD-M20A) a 280 nm. A calibração padrão foi realizada com poliestireno. A polidispersividade (PDI) foi determinada pela razão da média ponderada das massas moleculares ( $M_w$ ) e da média aritmética das massas moleculares ( $M_n$ ). Para o preparo das amostras, a lignina foi dissolvida em THF e filtrada utilizando filtro de PTFE de 0,22 µm. As amostras E30 a E60 não solubilizaram totalmente em THF, portanto somente a fração solúvel destas amostras foram injetadas. Para quantificação da fração solúvel em THF, 1 mg de cada amostra foi adicionado a 1 mL de THF e mantido sob agitação 24 h.

Após centrifugação a fração solúvel foi determinada por método gravimétrico. As análises foram realizadas na Universidade Federal do Ceará.

#### **II.2.4.3. ANÁLISE TÉRMICA POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)**

As análises térmicas foram conduzidas em analisador térmico modelo Q600 SDT com uma taxa de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em atmosfera inerte de  $\text{N}_2$  da temperatura ambiente até  $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **II.2.4.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Os espectros foram coletados utilizando o espectrofotômetro Bruker Tensor 37, em modo de absorbância com 64 varreduras (scans) e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , com varredura de  $400$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

As amostras foram previamente secas a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e incorporadas ao KBr na proporção de 1:100 (m:m), maceradas, homogeneizadas e pastilhadas.

#### **II.2.4.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES MODIFICADAS- MÉTODO ABTS**

Para determinação do potencial antioxidante das amostras de lignina foi aplicado o método ABTS. Foi pipetado  $88\text{ }\mu\text{L}$  de persulfato de potássio ( $140\text{ mmol L}^{-1}$ ) a  $5\text{ mL}$  de ABTS ( $7\text{ mmol L}^{-1}$ ). A mistura foi armazenada no escuro e à temperatura ambiente durante  $16\text{ h}$ . Após  $16\text{ h}$  foi adicionado  $1\text{ mL}$  da solução ABTS em  $100\text{ mL}$  de tampão acetato de sódio  $20\text{ mmol L}^{-1}$ , e ajustada a absorbância da mistura para  $0,70 \pm 0,05$  a  $\lambda = 734\text{ nm}$ . Em seguida,  $30\text{ }\mu\text{L}$  da amostras de lignina diluídas em dioxano (90%) foram adicionados a  $3\text{ mL}$  da solução ABTS. A solução permaneceu no escuro por  $2\text{ h}$ , em seguida foi

realizada a leitura em espectrofotômetro a 734 nm. Os resultados foram expressos em equivalente Trolox, calculados a partir da curva de calibração (RE et al., 1999).

#### II.2.4.6. TEOR DE HIDROXILAS FENÓLICAS

Para determinação das hidroxilas fenólicas, foi utilizado o método de espectrometria diferencial na região do ultravioleta, que consiste na obtenção de espectros em diferentes condições de pH. Para obtenção dos espectros foram preparadas soluções das amostras de lignina (0,001 g mL<sup>-1</sup> em dioxano). Foram trabalhados com duas condições de pH:

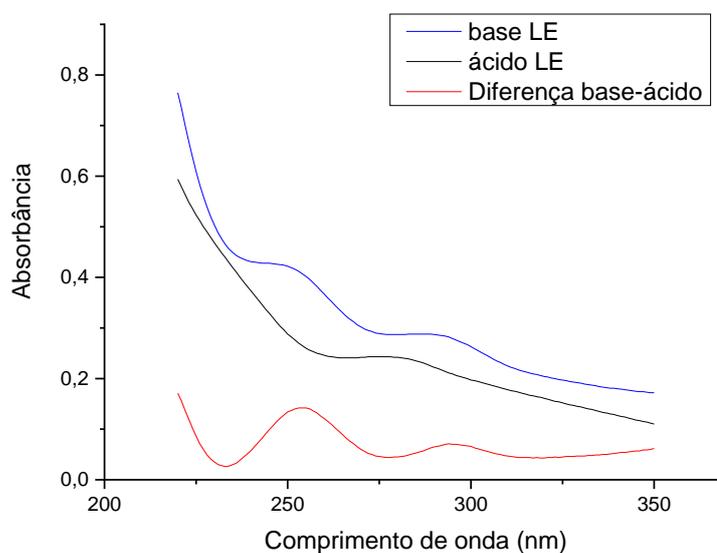
- Meio ácido – HCl 1 mol L<sup>-1</sup>
- Meio básico – NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>

Foram adicionados 100 µL da solução amostra de lignina, em 1 mL do meio ácido e 100 µL da solução de lignina em 1 mL do meio básico, em balão volumétrico de 10 mL e completado o volume final com água destilada. Em seguida foram coletados os espectros de absorção entre 220 nm -350 nm para as amostras em cada condição de pH, meio básico e meio ácido. O percentual de hidroxilas fenólicas foi calculado pela equação (C):

$$\% = (\Delta 254 \cdot 0,192) / C \quad (C)$$

Onde  $\Delta 254$  é a absorbância em 254 nm resultante da subtração do espectro de absorção em meio ácido do espectro de absorção do meio básico de cada amostra, conforme resultado modelo apresentado na FIGURA 11 e C a concentração da amostra de lignina em g L<sup>-1</sup> (WEXLER, 1964).

FIGURA 11 - MODELO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO PARA O CÁLCULO DE HIDROXILAS FENÓLICAS



#### II.2.4.7. PIRÓLISE ANALÍTICA ACOPLADA COM CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSA (PY-GC-MS)

Py-GC/MS é uma técnica altamente sensível para caracterizar a estrutura química da lignina. O uso de pirólise em combinação com espectrometria de massa é de grande interesse no estudo da modificação da lignina. Permite realizar medições quantitativas da lignina baseadas em unidades estruturais (MUNK et al., 2015).

Foram realizadas as análises de PY-GC/MS das amostras selecionadas, que apresentaram maior  $M_w$  após reação com lacase, e os seus controles. A análise foi realizada em pirolisador de filamento aquecido com tubo de amostra de bobina e quartzo. As amostras foram sililadas com 15  $\mu\text{L}$  da solução N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) com 5 % (v/v) de piridina. A pirólise foi realizada a 550 °C por 30 s com o aquecedor do filamento da bobina ajustado para 15 °C  $\text{m s}^{-1}$ . Temperatura programada: 50  $\rightarrow$  280 °C (100 °C  $\text{min}^{-1}$ ), 280 °C mantido por 120 s; a linha de transferência também foi aquecida a 280 °C. O cromatógrafo gasoso foi combinado com espectrômetro de massa Polaris Q (Thermo, Waltham, EUA). As temperaturas da interface GC-MS e da fonte de

íons foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. O espectrômetro de massa foi operado a 70 eV, e o tempo total de varredura foi de 0,58 s para o intervalo  $m/z$  50–650; emissão corrente: 250 mA. A deconvolução espectral de massa e os cálculos de índices de retenção (RI) foram realizados usando o sistema AMDIS. Alcanos lineares de produtos de pirólise de polietileno foram usados para a calibração do índice de retenção de Kováts (RI).

Os compostos foram identificados a partir dos espectros de massa deconvoluídos em comparação com dados da literatura. Os picos integrados foram normalizados e os rendimentos foram expressos em porcentagem dos picos detectados, sendo que apenas compostos com porcentagem superior a 0,5% foram identificados (MELO et al., 2018).

## **II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **II.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA LIGNINA KRAFT**

A lignina kraft (LK), cedida por indústria de papel e celulose da região de São Paulo, após o processo de precipitação ácida do licor negro - pH 9 apresentou umidade média de 5%, teor médio de 86% de lignina insolúvel em ácido, 8% de lignina solúvel em ácido e 1% de cinzas (em base seca).

#### **II.3.1.2. LIGNINA KRAFT - FRAÇÃO SOLÚVEL EM ETANOL**

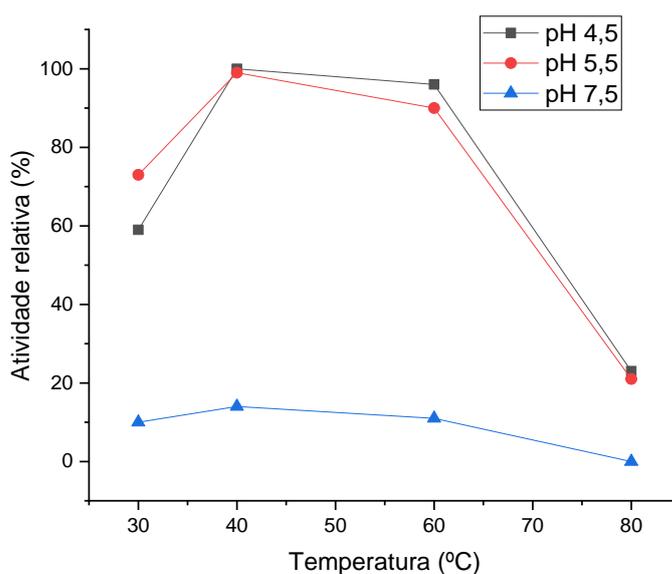
Um dos grandes problemas que as ligninas industriais apresentam para sua aplicação em determinados campos é sua heterogeneidade. Uma possível maneira de reduzir a complexidade da lignina poderia ser por fracionamento. Fracionamento é o processo pelo qual a lignina é dividida em porções, frações com diferentes pesos moleculares. Espera-se que as frações isoladas tenham uma maior homogeneidade de seus grupos funcionais, bem como uma maior uniformidade quanto ao seu tamanho e, conseqüentemente, um índice de polidispersividade menor. Para as reações de modificações da lignina via catálise enzimática foi utilizada a fração solúvel em etanol da lignina kraft obtida da precipitação ácida do licor negro. A lignina apresenta alta heterogeneidade estrutural, portanto para maior controle reacional e melhor caracterização dos produtos obtidos após reação com enzima lacase, foi utilizada uma fração mais homogênea, a fração solúvel em álcool etílico (LE). A fração obtida após extração em soxhlet utilizando álcool etílico apresentou rendimento de 50%.

### **II.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE**

#### **II.3.2.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA MÁXIMA**

Devido à desnaturação da lacase, que está relacionada a temperatura e pH, a caracterização da lacase é essencial para que a enzima seja usada para uma aplicação prática. A atividade do preparado enzimático comercial fornecido pela Buckman – NZ51003, lacase de *Myceliophthora thermophila*, foi determinada em diferentes condições reacionais (pH e temperatura), a fim de determinar as condições ideais de atuação da enzima. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que oxidou 1  $\mu\text{mol}$  de substrato ABTS por min. Os valores de pH e temperatura avaliados foram determinados com base em valores indicados por fornecedores para diferentes lacases. As condições experimentais e as atividades de lacase obtidas em cada experimento, são mostradas na FIGURA 12.

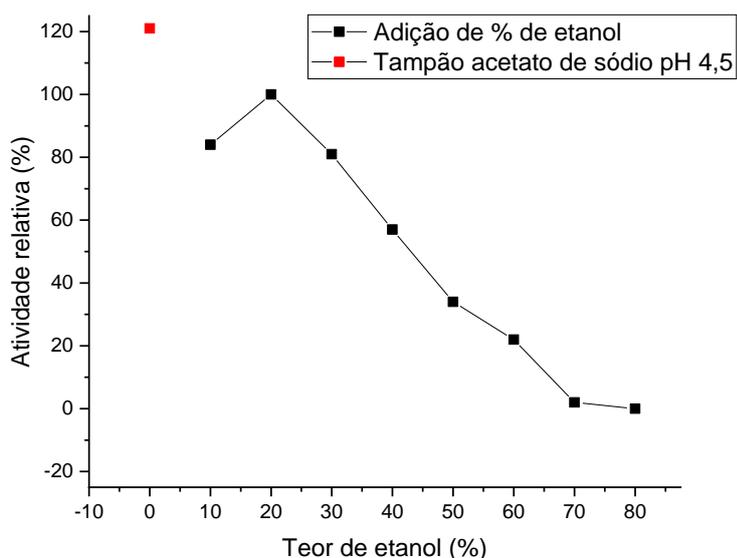
FIGURA 12 - ATIVIDADE RELATIVA DA LACASE EM DIFERENTES VALORES DE pH E TEMPERATURA



A atividade enzimática máxima da lacase de *Myceliophthora thermophila* dentre as condições avaliadas, ocorreu de pH 4,5 e 40 °C. Mantendo as condições ótimas encontradas (tampão acetato de sódio pH 4,5 e temperatura 40 °C) foram analisadas as atividades enzimáticas substituindo parte do tampão por álcool etílico ao meio reacional, variando de 10 a 80%. As condições

experimentais e as atividades de lacase obtidas com a substituição por álcool etílico, são mostradas na FIGURA 13.

FIGURA 13 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA LACASE LIVRE EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL



A atividade enzimática máxima da lacase de *Myceliophthora thermophila* na presença de álcool etílico ocorreu no meio reacional com adição de 20% de etanol, atingindo inativação com 80% etanol. A enzima lacase apresentou redução de atividade enzimática na presença de etanol quando comparada à do meio reacional apenas com tampão acetato de sódio. Entretanto a adição de etanol ao meio reacional aumentou a solubilidade da LE, uma vez que a LE foi obtida por extração em etanol, favorecendo a cinética enzimática. De acordo com a literatura, um teor crescente de solvente orgânico na reação inativa a lacase gradualmente, embora a perda de reatividade possa ser parcialmente compensada pelo aumento da reatividade do substrato (FIȚIȚĂU; PETER; BOERIU, 2013).

### II.3.2.2. ESTUDO CINÉTICO

Os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten ( $K_m$  e  $V_{max}$ ) para lacases foram determinados usando ABTS como substrato na faixa de 0,025 –1 mM a 40 °C, tampão acetato de sódio pH de 4,5 e tampão acetato de sódio:etanol (40:60) (SATHISHKUMAR et al., 2014). Os gráficos Lineweaver-Burk (FIGURA 14 e FIGURA 15) foram usados para determinar os parâmetros cinéticos.

FIGURA 14 – GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK DA LACASE EM SOLUÇÃO TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO PH 4,5

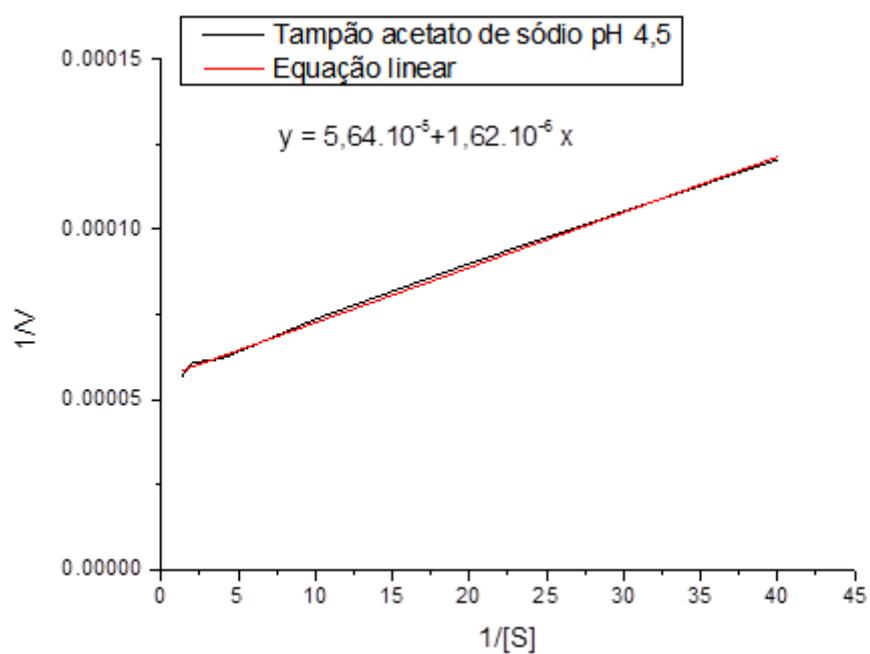
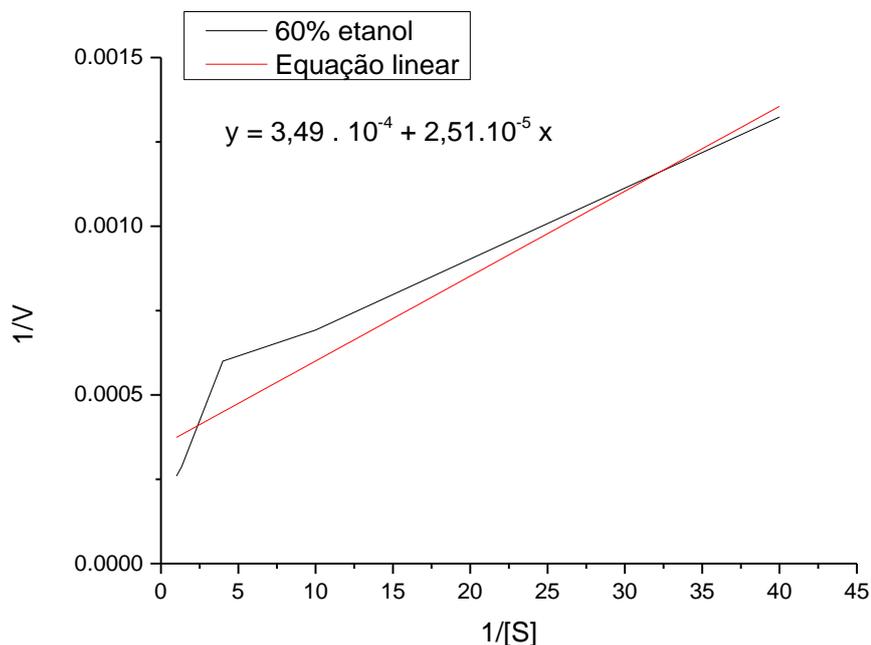


FIGURA 15 - GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK DA LACASE EM TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO:ETANOL (40:60)



A atividade catalítica da lacase ao interagir com um substrato pode ser explicada pelos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$ . A TABELA 2 mostra os valores dos parâmetros cinéticos conforme determinados pela FIGURA 14 e FIGURA 15 para lacase em meio reacional solução tampão acetato de sódio e solução tampão acetato de sódio:etanol (40:60). O valor de  $K_m$  para a lacase encontrado em meio reacional com 60% de etanol foi de  $7,20 \cdot 10^{-2}$  mM, cerca de 2,5 vezes maior que o da lacase em meio tampão acetato de sódio ( $2,90 \cdot 10^{-2}$  mM). O  $V_{max}$  da lacase na presença de etanol foi inferior ao da lacase apenas em solução tampão acetato de sódio. Os resultados mostraram um aumento no valor de  $K_m$  no meio reacional com etanol, o que indicou uma menor afinidade pelo substrato (IBRAHIM et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011). Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  corroboram com a redução dos teores da atividade enzimática determinada em meios contendo etanol. Entretanto, os valores determinados são calculados utilizando ABTS como substrato modelo, sendo que para a reação de modificação da lignina os parâmetros cinéticos podem sofrer alteração devido às diferenças nas condições reacionais.

TABELA 2- PARÂMETROS CINÉTICOS DA LACASE EM DIFERENTES MEIOS REACIONAIS

Meio reacional	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )
Tampão acetato de sódio pH 4,5	$2,90 \cdot 10^{-2}$	17730,50
Tampão acetato de sódio:etanol (40:60)	$7,20 \cdot 10^{-2}$	2865,33

### II.3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DE LIGNINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE

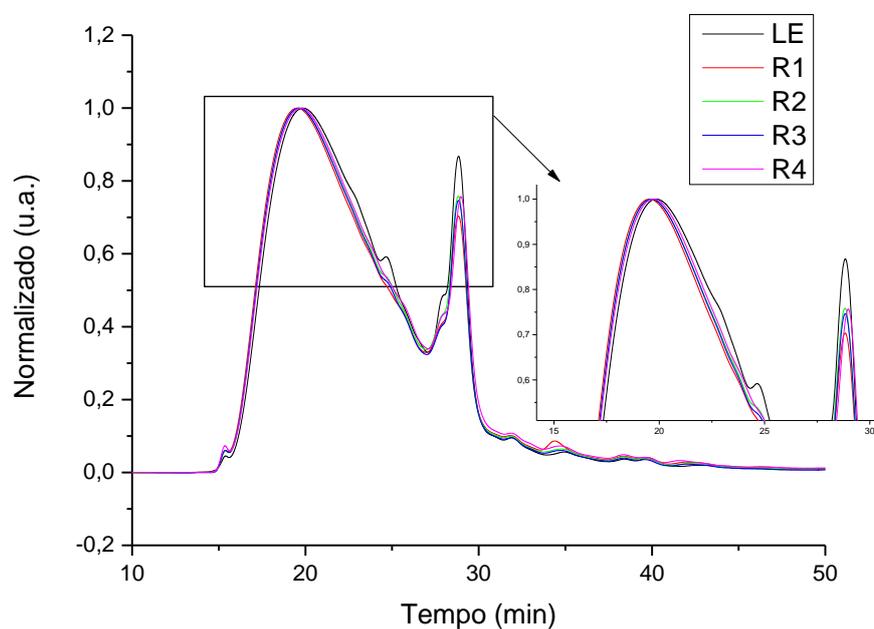
As ligninas modificadas enzimaticamente seguem nomenclatura definida na TABELA 1.

As amostras das reações com lacase são referentes aos produtos retidos na etapa de filtração e lavagem, o mesmo ocorreu para os controles em meio reacional tampão acetato de sódio pH 4,5 (R1SE e R1DE). Entretanto, nos procedimentos controles em meio reacional contendo etanol (E60SE e E60DE) a lignina foi solúvel e não foi possível coletar material retido na filtração, portanto essas amostras foram caracterizadas pelo material seco da solução resultante dos processos.

#### II.3.3.1 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO

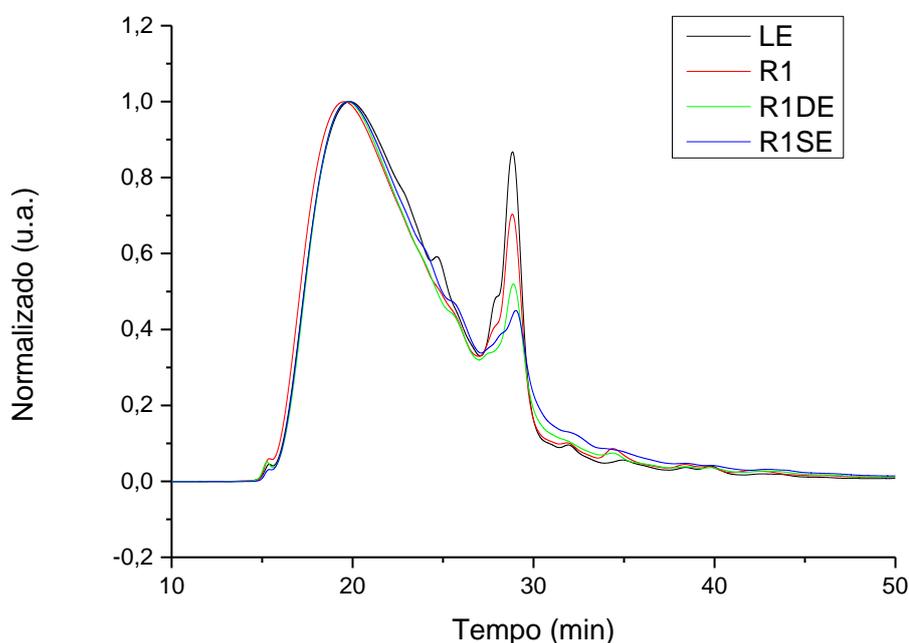
A amostra de lignina não modificada (LE) apresentou valor máximo de tempo de retenção na coluna cromatográfica (19,84 minutos) maior em relação às amostras modificadas pela lacase em R1 (19,51 min), R2 (19,61 min), R3 (19,62 min) e R4 (19,68 min), conforme FIGURA 16. Entretanto a variação foi pequena para todas as reações em tampão acetato de sódio pH 4,5, o que pode ter ocorrido devido à baixa solubilidade da lignina em meio ácido.

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, R1, R2, R3 E R4 EM FUNÇÃO DO TEMPO



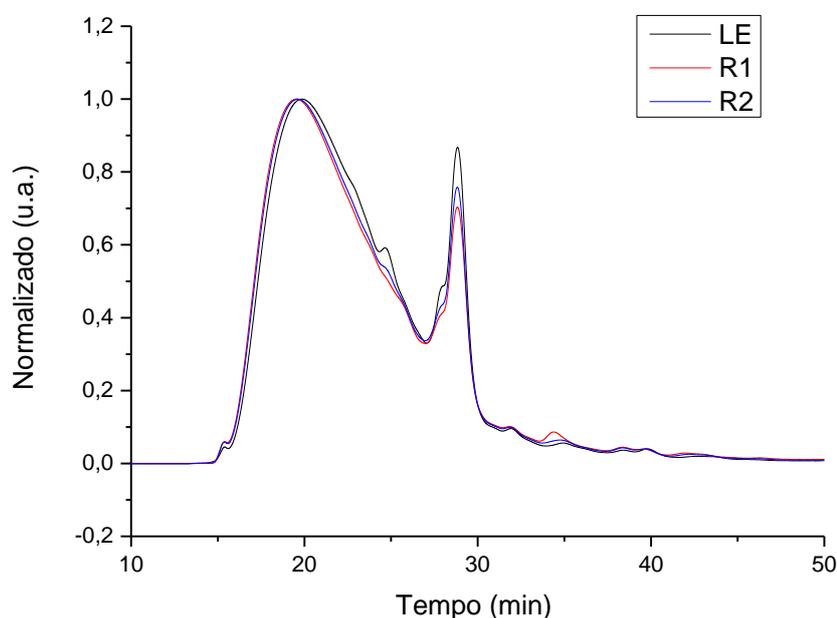
Para avaliar a ação da enzima lacase no grau de polimerização, foram realizados experimentos controles em relação à reação de maior variação de tempo de eluição (R1) no meio reacional tampão acetato de sódio pH 4,5. Os experimentos R1SE e R1DE foram realizados sem a presença da enzima lacase e na presença da enzima desnaturada respectivamente. Os controles R1SE (19,76 min) e R1DE (19,75 min) aparentam sobreposição a amostra LE, conforme observado na FIGURA 17. A ausência de variação nos controles, certifica a ação da enzima lacase.

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, R1, R1DE E R1SE EM FUNÇÃO DO TEMPO



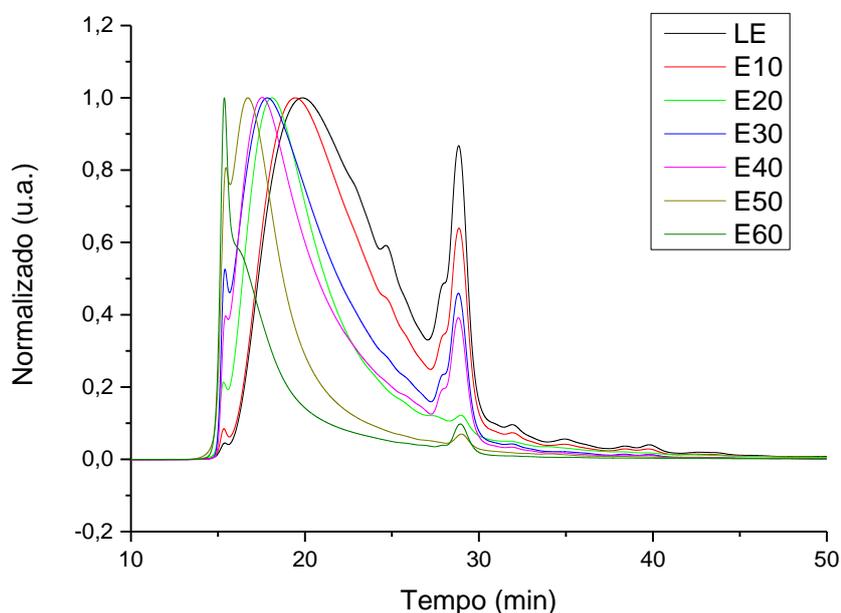
Para estabelecer a influência do tempo de reação no grau de polimerização, os experimentos R1 e R2 foram realizados por 2 e 4h de reação, respectivamente. A principal mudança no tempo de retenção ocorreu durante as primeiras 2h, ou seja, na amostra R1 (19,51 min) enquanto em R2 (19,61 min) a amostra retornou a apresentar aumento no tempo de eluição conforme FIGURA 18. Mattinen et al. (2008), observaram que a lignina era oxidada 2h após a adição da enzima, empregando lacase de *Trametes hirsuta* para polimerizar uma lignina de *Eucalyptus globulus*. Uma vez que a polimerização da lignina é iniciada pela ação da enzima lacase na oxidação de terminais fenólicos, o valor ótimo para o tempo de tratamento (2h) está de acordo com a literatura de estabilidade enzimática. Em reações mais longas, após um aumento da massa molecular, o impedimento estérico também pode reduzir a continuidade da polimerização (GOUVEIA, 2014).

FIGURA 18 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, R1 E R2 EM FUNÇÃO DO TEMPO



Para avaliar a eficiência da polimerização em relação à solubilidade da lignina no meio reacional foram realizadas reações com a adição de etanol variando de 10 a 60 %. Conforme observado na FIGURA 19, com o aumento do teor de etanol ao meio reacional ocorre gradativamente redução no tempo de eluição das amostras, ou seja, aumento da massa molecular. Enquanto LE apresentou tempo de 19,84 min, as amostras apresentaram tempo de eluição E10 (19,40 min), E20 (18,10 min), E30 (17,83 min), E40 (17,54 min), E50 (16,72 min) e E60 (15,37 min). Apesar da menor atividade enzimática da lacase em meio contendo etanol quando comparada à dos meios de apenas tampão, as modificações mais significativas ocorreram no meio etanólico. A solubilidade da lignina no meio reacional é um critério importante para reatividade da enzima.

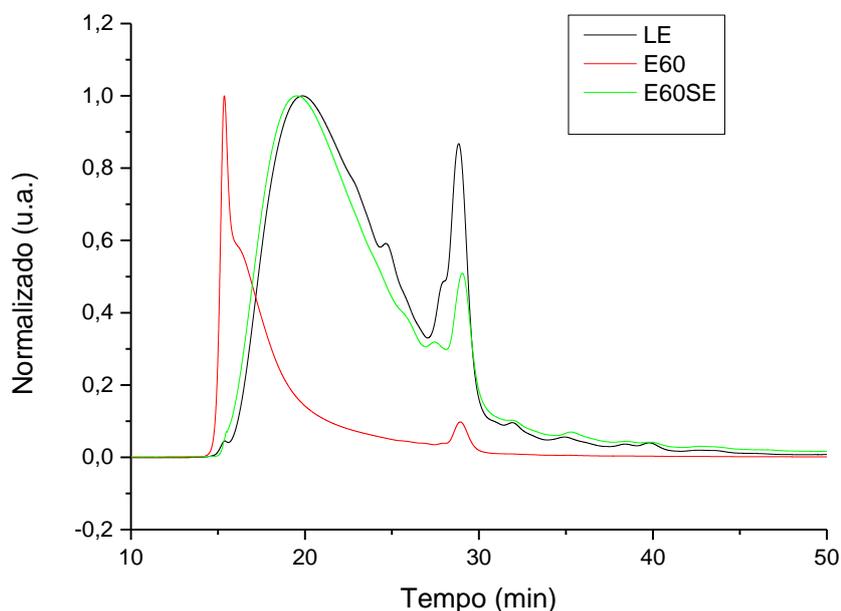
FIGURA 19- CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, E10 A E60 EM FUNÇÃO DO TEMPO



A amostra LE apresentou pico maior que os cromatogramas das ligninas após reação com lacase. Para picos de base mais larga a distribuição de massas moleculares é mais heterogênea.

O pico menor em torno de 30 min apresentou uma redução gradativa na intensidade após a reação com a lacase nos meios etanólicos. A redução no segundo pico acoplado ao aumento da massa molecular referente ao deslocamento no tempo do primeiro pico, sugere que houve oligomerização de parte das moléculas menores para formar estruturas de maior massa molecular (MAGALHÃES et al., 2020).

FIGURA 20 - CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO NORMALIZADO DAS AMOSTRAS LE, E60 E E60SE EM FUNÇÃO DO TEMPO



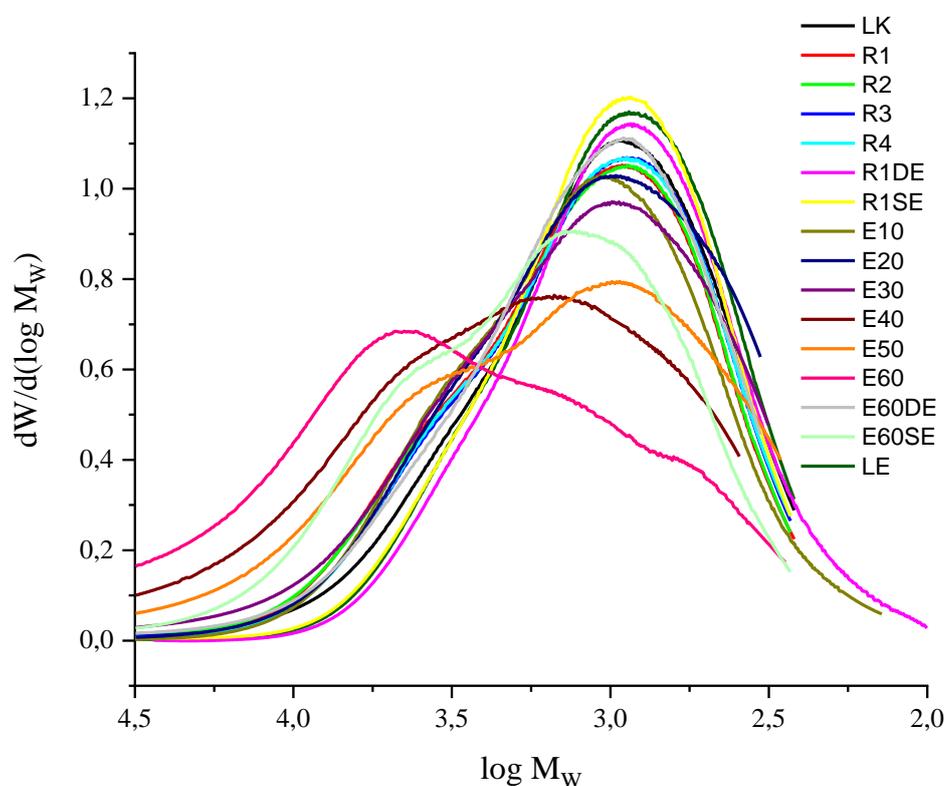
Para avaliar a ação da enzima lacase no meio reacional contendo adição de etanol, que apresentou maior variação de tempo de eluição, foi realizado o experimento E60SE sem a presença da enzima lacase. Enquanto a reação E60 (15,37 min) apresentou variação acentuada no tempo de eluição em relação a LE (19,84 min), o controle E60SE (19,55 min) aparentou quase sobreposição à amostra LE, conforme observado na FIGURA 20. A discreta variação entre LE e E60SE deve-se à solubilização da LE no processo de obtenção da E60SE. Entretanto, a alteração acentuada do comportamento do pico da E60 comprova a ação da enzima lacase no processo de oligomerização.

A análise qualitativa da cromatografia por exclusão de tamanho, indicaram que houve o aumento da massa molecular da lignina após a reação com a enzima lacase. Para comprovar o perfil dos picos obtidos foi realizada a análise de cromatografia de permeação em gel.

### II.3.3.2. CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC)

Com intuito de quantificar a modificação das massas moleculares das amostras de lignina, observadas pelos resultados na cromatografia por exclusão de tamanho, foi realizada a cromatografia de permeação em gel com curva de calibração de poliestireno. O perfil das modificações na média ponderada das massas moleculares ( $M_w$ ) são mostradas na FIGURA 21.

FIGURA 21 - DISTRIBUIÇÃO DA MASSA MOLAR PONDERAL DAS AMOSTRAS DE LIGNINA



Os valores calculados para média aritmética das massas moleculares ( $M_n$ ), média ponderada das massas moleculares ( $M_w$ ) e polidispersividade (PDI) são apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 –  $M_n$ ,  $M_w$  E PDI DAS LIGNINAS

Amostra	$M_n$ (g mol <sup>-1</sup> )	$M_w$ (g mol <sup>-1</sup> )	PDI
LK	811	1806	2,227
LE	770	1365	1,772
R1	871	1978	2,271
R2	867	1777	2,049
R3	846	1735	2,050
R4	845	1668	1,972
R1DE	648	1197	1,848
R1SE	803	1427	1,778
E10	795	1632	2,054
E20	887	1794	2,023
E30 <sup>a</sup>	910	2325	2,556
E40 <sup>a</sup>	1281	5335	4,163
E50 <sup>a</sup>	953	3666	3,848
E60 <sup>a</sup>	1350	7859	5,821
E60DE	1052	2812	2,672
E60SE	916	2158	2,355

<sup>a</sup> lignina parcialmente solubilizada em THF

A LK pode ser fracionada em diferentes faixas de massa molar por extração com solvente em condições moderadas (YOSHIDA; MÖRCK; KRINGSTAD, 1987). Como mencionado, foi obtida a LE para menor heterogeneidade das estruturas, e maior homogeneidade nas reações realizadas. A LE apresenta PDI de 1,772 enquanto a LK de 2,227.

Para todos os experimentos com lacase ativa, ocorreu um aumento do  $M_w$  e da PDI das ligninas polimerizadas, em comparação com a LE. O aumento da PDI está ligado com o aumento da  $M_w$ , devido à natureza não seletiva do radical formado nos grupos terminais fenólicos da lignina após a ação da enzima lacase. Reações de acoplamento, ocorrem espontaneamente com pouco ou nenhum controle e o aumento na  $M_w$  leva a uma PDI mais alta devido a relação ( $M_w / M_n$ ).

Após o preparo das amostras em THF para injeção no cromatógrafo as ligninas obtidas entre E30 a E60 permaneceram parcialmente solúveis. A solubilidade de cada fração foi de 85 % da E30, 83 % da E40, 82 % da E50 e 58 % da E60. Por este motivo, os resultados obtidos pelo GPC, tanto  $M_n$  quanto  $M_w$ , só podem ser atribuídos as frações solúveis, que consistem dos polímeros com o menor  $M_w$  da fração de lignina polimerizada em cada amostra (GOUVEIA, 2014).

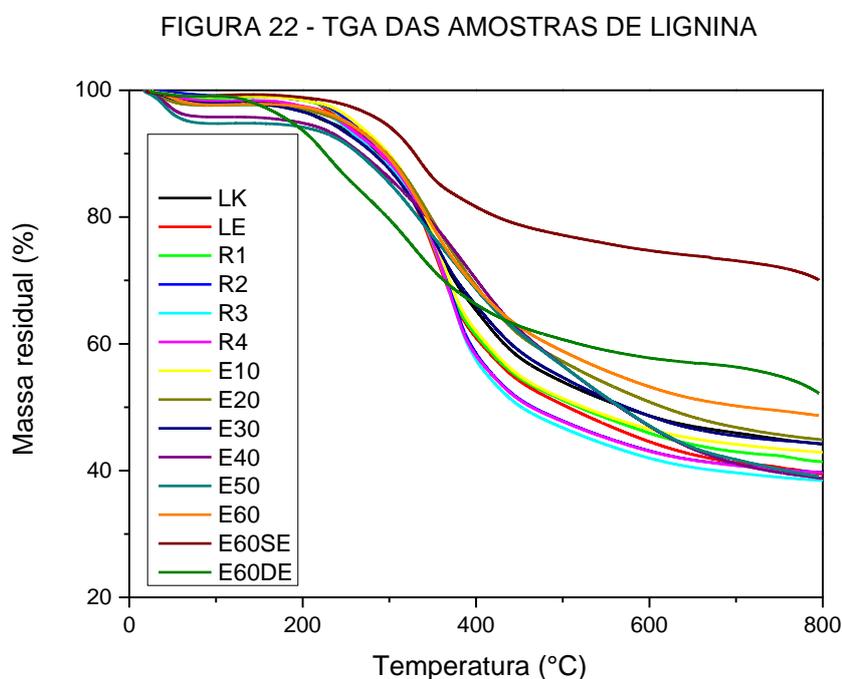
Enquanto a lacase apresentou atividade máxima em pH 4,5 para o tampão acetato de sódio, o meio reacional que produziu o maior aumento na  $M_w$

foi a E60. Isto ocorreu devido ao meio reacional com etanol favorecer a solubilização da LE e conseqüentemente, facilitando a ação da enzima no substrato. A amostra E60 teve um aumento da  $M_w$  de 5,8 vezes em relação a LE.

### II.3.3.3. ANÁLISE TÉRMICA POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA) E CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

Nos polímeros, a distribuição da massa molecular tem grande influência nas propriedades e conseqüentemente na aplicação do material, o comportamento térmico é um dos pontos críticos quanto à aplicação de um material. O comportamento térmico das amostras de ligninas foi avaliado por TGA e DSC.

O comportamento de perda de massa em função da temperatura das amostras pode ser observado na FIGURA 22.



Para a determinação das temperaturas máximas de degradação térmica das amostras a diferencial DTG foi obtida das curvas de TGA. Os valores encontrados podem ser observados na TABELA 4.

TABELA 4-  $T_{ONSET}$ ,  $DTG_{max}$  E TEOR DE RESÍDUO A 800 °C DAS AMOSTRAS DE LIGNINA

Amostra	$T_{onset}$ (°C)	$DTG_{máx}$ (°C)	Resíduo (%)
LE	303,4	356,1	39,4
LK	292,8	351,9	43,9
R1	292,8	352,4	41,3
R2	303,2	367,7	39,7
R3	310,4	369,3	38,3
R4	306,6	364,4	39,5
E10	298,3	360,9	42,7
E20	277,4	343,0	44,7
E30	280,0	353,3	44,0
E40	270,1	387,9	38,6
E50	264,9	337,3	38,9
E60	281,2	343,3	48,6
E60SE	287,1	333,3	69,8
E60DE	202,0	223,4	52,0

Os teores elevados de resíduo obtidos nas amostras controles E60DE e E60SE são devidos exclusivamente ao fato de as amostras serem provenientes da solução filtrada do procedimento da reação com lacase, o material mesmo seco possui os inorgânicos da solução tampão e solução de lavagem. As amostras dos controles foram totalmente solúveis no meio reacional e para caracterização das mesmas, foi utilizada a solução da reação. A fração não volátil de lignina, é composta por estruturas aromáticas altamente condensadas que permanecem estáveis após o aquecimento a 800 °C (TEJADO et al., 2007).

O comportamento esperado para as amostras de maior massa molecular era um aumento na estabilidade térmica, ou seja, maior temperatura de degradação máxima. Entretanto a amostra E60 apresentou temperatura de degradação máxima inferior a LE, sendo que este comportamento também foi observado por Gouveia (2014). A lignina apresentou ampla faixa de degradação térmica, podendo se estender de 200 a 500 °C, devido à existência de diferentes grupos funcionais oxigenados que possuem diferentes estabilidades térmicas,

assim como pela existência de fragmentos de massas moleculares diferentes e também pela presença de açúcares residuais provenientes das hemiceluloses. Além disso, há variação da composição da lignina em relação às unidades S e G (TEJADO et al., 2007). Como visto nos resultados de GPC a amostra E60 possui maior PDI, portanto a presença de moléculas de massa menores e a presença de açúcares residuais podem reduzir a temperatura de degradação. A composição das amostras será discutida nos tópicos de FTIR e PY-GC/MS.

Para obter mais informações, a técnica de TGA é combinada com outras técnicas, como DSC. Os valores de transição vítrea ( $T_g$ ) das amostras foram obtidas pelo ponto de intersecção dos segmentos das retas nas curvas de DSC, os resultados podem ser observados na TABELA 5.

TABELA 5 -  $T_g$  DAS AMOSTRAS DE LIGNINA

Amostra	$T_g$	
	$T_{onset}$ (°C)	Ponto médio (°C)
LE	122,7	127,7
R1	110,8	120,6
R2	119,1	123,7
R3	134,6	138,8
R4	----	----
R1SE	124,4	122,2
R1DE	125,3	124,7
E10	200,9	200,7
E20	206,7	206,7
E30	----	----
E40	----	----
E50	----	----
E60	----	----
E60SE	146,9	153,8
E60DE	-----	-----

Na amostra R4 não foi possível detectar o valor de  $T_g$ . A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em ligninas costuma ser quase imperceptível. Alguns autores justificam este fato pelas fortes interações eletrostáticas entre moléculas de lignina. Outra razão pode ser a origem heterogênea de amostras de lignina onde a mistura de polímeros distintos, cada um com um valor de  $T_g$  discreto,

tornaria difícil apontar uma única temperatura de transição vítrea (GARCÍA et al., 2009). A partir da amostra E30 não foi possível determinar a  $T_g$ , sendo essas as amostras de maior massa, o que indica um comportamento de estrutura condensada.

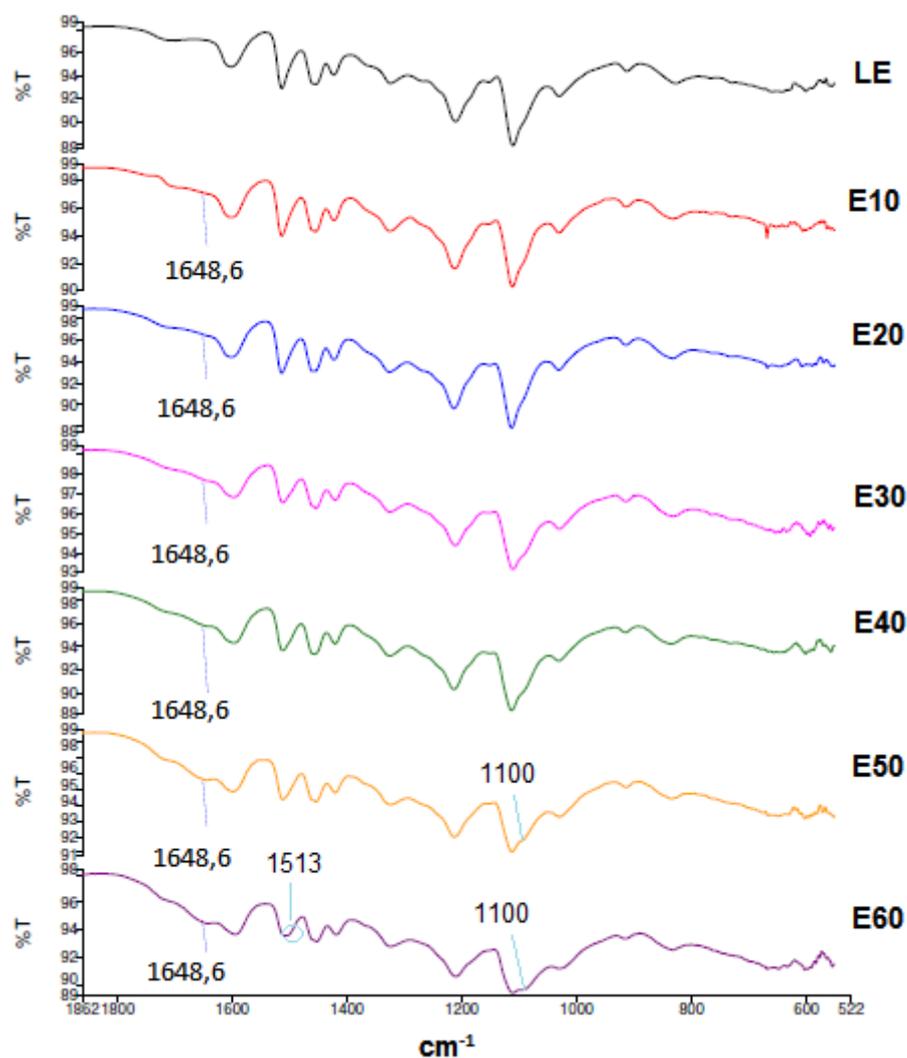
No caso das amostras controles as  $T_g$  foram determinadas em R1SE, R1DE e E60SE. O controle E60SE apresentou valor de  $T_g$ , diferentemente da amostra E60, a qual não foi possível determinar o valor de  $T_g$ . Portanto as alterações nas propriedades não ocorrem somente devido ao processo de solubilização no meio reacional, assim podemos comprovar a ação da enzima na amostra resultante. Entretanto, não é possível observar a  $T_g$  na E60DE. Como ocorreu aumento da  $M_w$  nesta amostra, pode ter ocorrido uma ação residual da enzima, ou seja, a enzima não estava totalmente desnaturada.

Apesar das amostras apresentarem alteração da  $T_g$ , a mudança significativa ocorreu nas amostras acima da E30, onde não ocorre a transição vítrea na mesma região da LE (VURAL; SMITH; PETRIDIS, 2018).

#### **II.3.3.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

FTIR é um método não destrutivo de alta sensibilidade com um curto tempo de análise. O espectro de FTIR apresenta os principais grupos funcionais e as alterações da estrutura da lignina. Os espectros das amostras de lignina em meio etanol são apresentados na FIGURA 23.

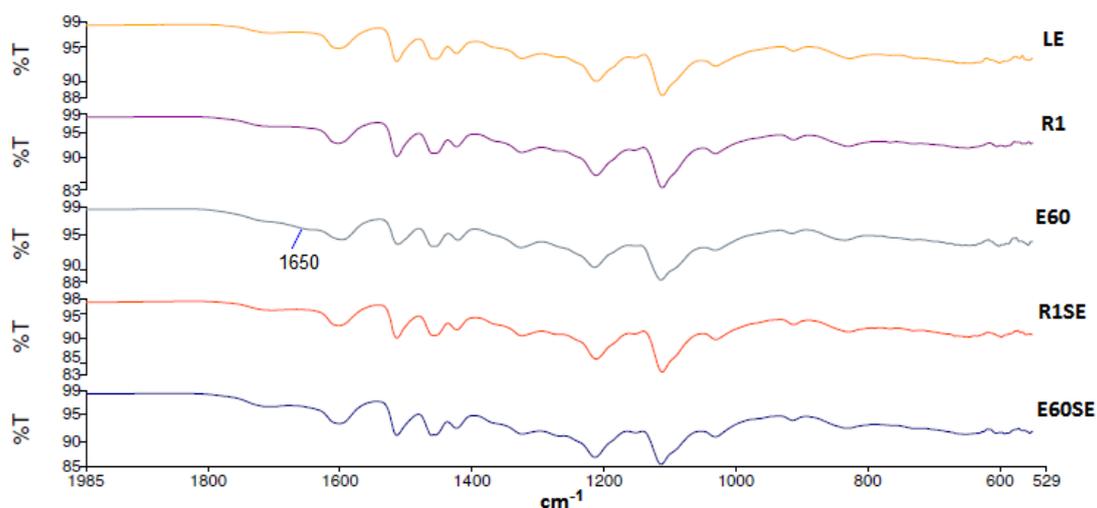
FIGURA 23 - ESPECTRO DE FTIR DAS AMOSTRAS DE LIGNINA EM MEIO ETANOL



As amostras apresentam bandas características de ligações químicas pertencentes à lignina. Destacam-se as bandas na região de  $1593$  e  $1510 \text{ cm}^{-1}$ , referentes ao estiramento  $\text{C}=\text{C}$  de anel aromático. Bandas de absorção referentes à ligação  $\text{C}-\text{H}$  de aromáticos podem ser observadas em  $1459$  e  $1420 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{C}-\text{H}$  alifático de grupos metila em  $1327 \text{ cm}^{-1}$ , estiramento de  $\text{C}=\text{O}$  em  $1214 \text{ cm}^{-1}$  e alongamento de  $\text{C}=\text{O}$  em  $1600 \text{ cm}^{-1}$  (GARCÍA et al., 2009; GOUVEIA et al., 2012; MUNK et al., 2015). Embora os espectros obtidos sejam semelhantes, sugerindo uma estrutura similar, a modificação na região entre  $1.700 \text{ cm}^{-1}$  –  $1.600 \text{ cm}^{-1}$ , típica de carbonilas, ocorreu apenas nas amostras em meio etanol, sendo que a modificação fica mais intensa com o aumento no teor de etanol no meio reacional, consequentemente com o aumento da  $M_w$  (MAGALHÃES et al.,

2020). Além disso, duas novas bandas foram formadas na amostra E60 a primeira em  $1513\text{ cm}^{-1}$  correspondendo a vibração aromática e em  $1100\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação C-O de álcoois secundários (RASHID; KAIT; MURUGESAN, 2016).

FIGURA 24 - ESPECTRO FTIR DAS AMOSTRAS LE, R1 E60 E CONTROLES SEM ENZIMA R1SE E E60SE



Como observado na FIGURA 24, a amostra R1 de maior  $M_w$  em meio tampão acetato de sódio, não apresentou alteração na região de carbonilas. Os controles sem enzima R1SE e E60SE também não apresentam modificação na região comparada a LE (MUNK et al., 2015). Isto comprova a atividade enzimática da lacase gerando oxidação das hidroxilas fenólicas e, conseqüentemente, a modificação da estrutura da lignina.

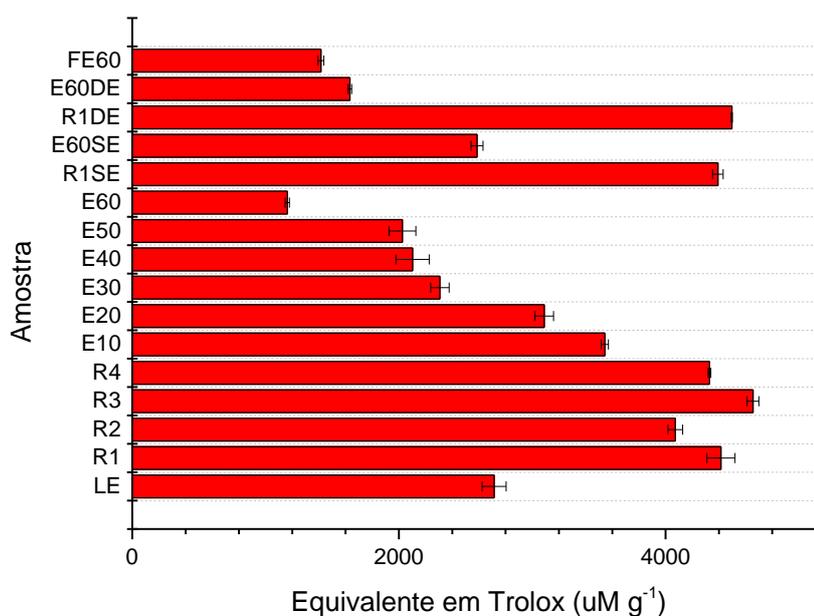
As bandas observadas em  $620\text{ cm}^{-1}$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a hemiceluloses ligadas à lignina, entretanto em todos os espectros não foram observadas modificações nessa região (GARCÍA et al., 2009).

### II.3.3.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES MODIFICADAS- MÉTODO ABTS

O método ABTS é utilizado para a triagem da atividade antioxidante sendo relatado como um ensaio de descoloração, em função da concentração e tempo, cujo resultado é calculado em relação à reatividade de Trolox como padrão, nas mesmas condições (RE et al., 1999).

O potencial antioxidante das amostras de lignina das reações com lacase são apresentadas na FIGURA 25.

FIGURA 25 - POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE LIGNINA

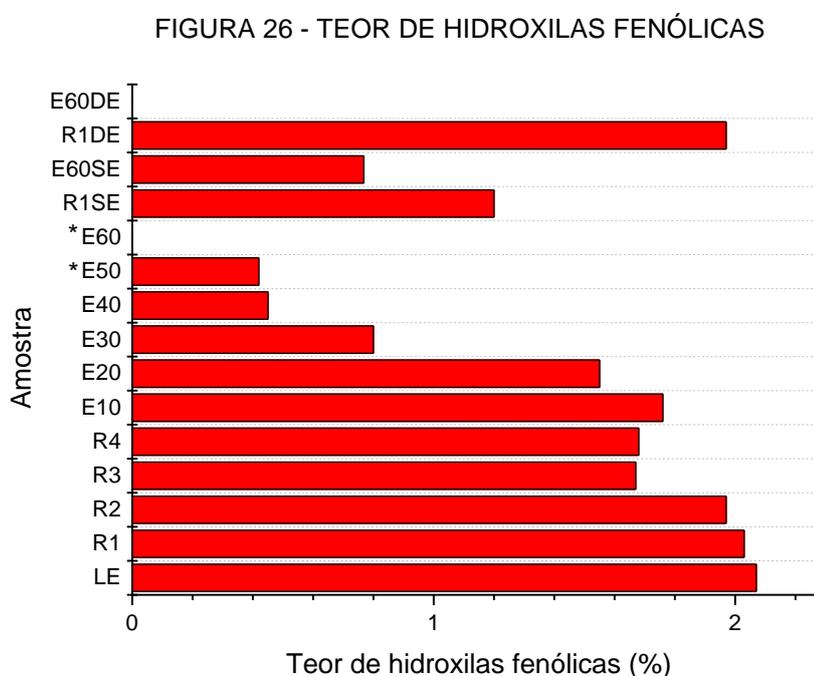


A atividade antioxidante das ligninas é atribuída principalmente às funções hidroxilas fenólicas, sendo que ligninas com menor massa molecular tendem a ter maior atividade antioxidante (THÁ et al., 2021). Portanto, frações com alto teor de fenólicos apresentam alto potencial antioxidante (LOURENÇON et al., 2021). Com o processo de polimerização da lignina tende a ocorrer a redução no teor de hidroxilas fenólicas, conseqüentemente a redução no potencial antioxidante, como pode ser observado na amostra E60 em relação à amostra LE. A amostra FE60 é composta pela lignina solúvel no meio reacional,

os açúcares do complexo lignina e a estrutura da enzima desnaturada da reação E60, por isso encontramos um teor antioxidante baixo. Novamente a amostra E60DE apresenta comportamento da amostra parcialmente polimerizada comparada à E60, o que demonstra uma atividade residual da enzima lacase. As composição da lignina também pode influenciar, as unidades S tendem a ser mais antioxidantes do que unidades G, que, por sua vez, tendem a ser mais antioxidantes do que unidades H (MATOS et al., 2021). Para certificação dos resultados do potencial antioxidante, foi realizada a determinação de hidroxilas fenólicas.

### II.3.3.6. TEOR DE HIDROXILAS FENÓLICAS

A partir dos valores obtidos pelas subtrações das curvas de absorção (WEXLER, 1964), calculamos o teor de hidroxilas fenólicas de cada amostra conforme apresentado na FIGURA 26.



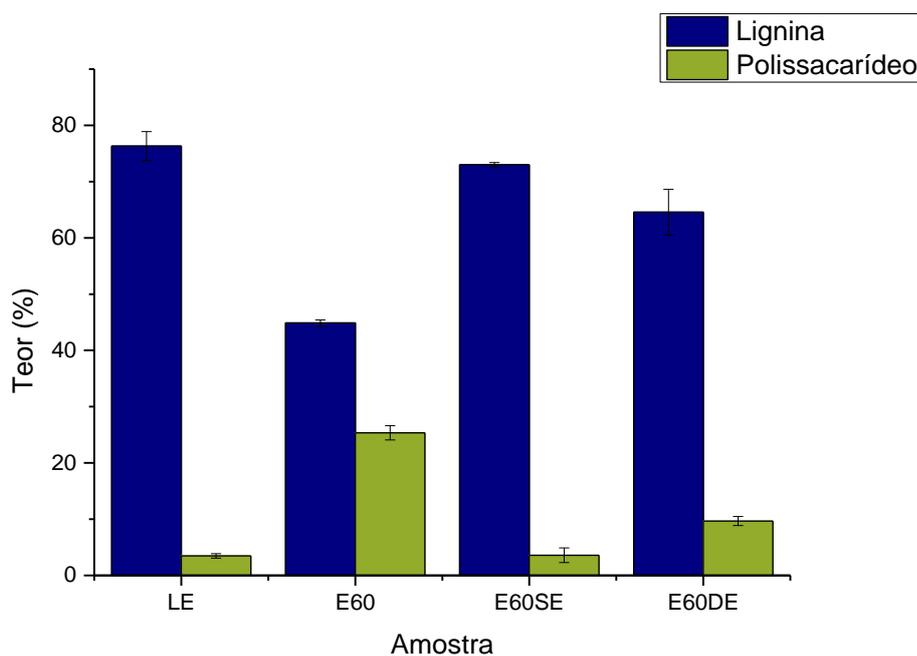
\*Amostras parcialmente solúveis

A maior quantidade de OH fenólicas está relacionada a uma alta atividade antioxidante. Compostos aromáticos derivados de lignina, sem a presença deste grupamento não apresentam atividade antioxidante (MATOS et al., 2021). As hidroxilas fenólicas determinadas das amostras de lignina são condizentes com os resultados de atividade antioxidante apresentados na FIGURA 25. Cabe ressaltar, que as amostras E50 e E60 foram parcialmente solúveis, sendo que a amostra E50 apresentou teor de hidroxilas enquanto na E60 não foi possível identificar o grupamento. Portanto os resultados apresentados destas amostras são referentes às frações solúveis. Não foi possível determinar as hidroxilas fenólicas da amostra E60DE pelo método espectrofotométrico, indicando novamente ação residual da enzima.

#### **II.3.3.7. PY-GC/MS**

Foram realizadas as análises de PY-GC/MS das amostras LE, E60 e os seus controles E60SE e E60DE. A quantificação dos compostos referentes à lignina e aos polissacarídeos determinados nestas amostras é apresentada na FIGURA 27.

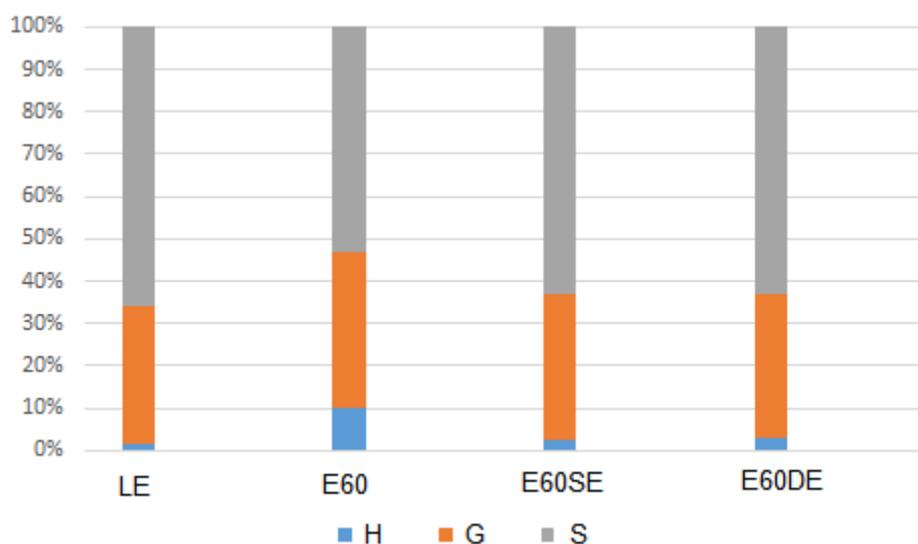
FIGURA 27 - TEOR DE LIGNINA E POLISSACARÍDEOS



É possível observar que as amostras LE, E60SE e E60DE apresentam teor de polissacarídeos semelhantes. Entretanto a amostra E60 apresenta redução acentuada no teor de lignina e aumento dos compostos referentes a polissacarídeos, o que pode indicar a ação enzimática comparada às outras amostras.

Podemos observar a relação das unidades monoméricas das amostras na FIGURA 28.

FIGURA 28 - RELAÇÃO DAS UNIDADES MONOMÉRICAS DA LIGNINA



As três unidades fenólicas de lignina foram detectadas (hidroxifenil, guaiacil e siringil), com predomínio de unidades siringil e guaiacil, conforme o esperado uma vez que as ligninas são obtidas de folhosas.

Observamos novamente que as amostras LE e os controles apresentam comportamento semelhante, enquanto a amostra E60 apresentou uma redução na unidade estrutural siringil (S) e um aumento em hidroxifenil (H). A relação S/G está apresentada na TABELA 6.

TABELA 6 - RELAÇÃO S/G

	LE	E60	E60SE	E60DE
S/G	2,02	1,45	1,83	1,85

A lignina G possui maior massa molar e maior estabilidade térmica, degradando-se em temperaturas mais altas que a lignina S. A amostra E60 possui proporcionalmente maior quantidade da unidade G e, conseqüentemente, apresenta maior  $M_w$  (DEL RÍO; GUTIÉRREZ; HERNANDO, 2005). Entretanto a amostra E60 apresentou redução na estabilidade térmica comparada à amostra LE, o que poderia estar relacionado à maior quantidade de polissacarídeos

presentes na E60, já que estes compostos possuem menor estabilidade térmica e causam um deslocamento no pico máximo da degradação térmica da E60.

A amostra E60 apresentou menor relação S/G (1,45). Lourençon et al. (2021) encontrou valores menores para a razão S/G nas frações de maiores  $M_w$ . Uma quantidade maior de unidade G permite a ligação química no carbono C5 da lignina, indicando uma estrutura mais condensada e estável. Wang et al. (2021) também encontrou uma redução da relação S/G com o aumento da  $M_w$ .

Rico et al. (2014), ao tratar madeira de eucalipto na presença de lacase *Myceliophthora thermophila* e um mediador, observaram uma redução nas unidades de G com relação às unidades de S, resultando em um aumento de S/G para 4,9. Du et al. (2013b) encontraram resultados semelhantes ao tratar polpa kraft, sendo que buscavam a degradação da lignina. Diferentemente destes autores, ao aplicarmos a lacase de *Myceliophthora thermophila*, em uma fração da lignina Kraft em meio etanólico, reduzimos a relação S/G, com aumento da unidade G e, conseqüentemente, aumentando a  $M_w$ .

Substituintes tais como grupos metoxil, estabilizam radicais fenoxil por ressonância. Portanto, as unidades S tendem a ser mais antioxidantes do que unidades G, que, por sua vez, tendem a ser mais antioxidantes do que unidades H, devido ao maior número de estruturas ressonantes quando há substituintes no anel (MATOS et al., 2021). A amostra E60 apresenta redução na atividade antioxidante, e também a redução na proporção de unidades S.

Vale ressaltar que o aumento da  $M_w$  não ocorreu apenas pela redução das unidades S, e conseqüente aumento da proporção das unidades G. Uma vez que os controles E60SE e E60DE não apresentarem sólidos retidos na etapa de filtração, enquanto a amostra E60 foi recuperada do filtro na etapa de lavagem da reação, portanto indicando a ação enzimática.

## II.4. CONCLUSÃO

A lacase apresentou menor atividade enzimática na presença de etanol, não apresentou atividade em meio com 80 % de etanol. Entretanto os resultados de maior  $M_w$  obtidos foram nos meios reacionais etanólicos. Este comportamento foi observado devido à maior solubilização do substrato no meio reacional, consequentemente facilitando a ação enzimática.

As ligninas de maior  $M_w$  obtidas não solubilizaram em diversos solventes dificultando a caracterização do material, sendo necessária a aplicação de técnicas combinadas como GPC, TGA, DSC e PY-GC/MS.

Os resultados dos controles sem enzima indicaram a ação enzimática da lacase nas amostras obtidas em presença da enzima ativa. O controle de enzima desnaturada apresentou variação nas propriedades o que pode indicar uma atividade residual nestas amostras.

Em resumo, o processo de oligomerização da lignina Kraft, por meio 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, apresentando maior proporção de unidades G. A variação na estrutura química pode gerar novas possibilidades de aplicação de acordo com as novas características do composto.

## **CAPÍTULO III AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO COMO PROTETOR SOLAR DE FRAÇÕES DE LIGNINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE**

### **III.1 INTRODUÇÃO**

A obtenção de frações de lignina purificadas com propriedades definidas permite potencializar sua aplicação em diversos campos. O interesse no papel fisiológico de compostos bioativos presentes em plantas aumentou drasticamente ao longo dos últimos anos, particularmente, com foco no desenvolvimento de produtos para a saúde humana (LOURENÇON et al., 2021; THÁ et al., 2021).

Tem se levantado uma preocupação do ponto de vista ambiental e de saúde em relação a ativos químicos em produtos de cuidados com a pele. Por exemplo, alguns conservantes, antioxidantes e filtros UV demonstraram bioacumular em ambientes aquáticos, ecossistemas e organismos vivos. Portanto, existe uma necessidade de desenvolver alternativas inovadoras, ecologicamente corretas e saudáveis para as formulações de cuidados com a pele. Pesquisas estão sendo desenvolvidas para substituir aditivos de base fóssil por alternativas de base biológica, considerando fitoquímicos como polifenóis e pigmentos naturais (SAJINCIC et al., 2021).

A biomassa lignocelulósica foi reconhecida como fonte de ingredientes de base biológica. Foram relatadas em pesquisas a atividade da lignina em sua forma macromolecular atribuídas a potenciais benefícios à saúde humana: atividade antitumoral; antiviral; bloqueadores solares; ação antibacteriana, antiparasitária; antioxidante e como agentes antimutagênicos (LOURENÇON et al., 2021; QIAN; QIU; ZHU, 2015; THÁ et al., 2021).

Com a polimerização da lignina, apresentada no capítulo anterior, buscamos uma aplicação adequada para este material, melhorando as atividades biológicas, como o fator de proteção solar, uma vez que esse efeito da lignina está relacionado aos compostos aromáticos. Para isso foi avaliado o teste de irritação cutânea, histologia e fator de proteção solar da lignina.

## III.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### III.2.1. TESTE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA

Os modelos de *Reconstructed Human Epidermis* (RHE) utilizados para realização do teste de irritação cutânea *in vitro* foram desenvolvidos pelo Laboratório de (Eco)Toxicologia *in vitro*, da Universidade Federal do Paraná.

Para a construção do modelo *SkinVitro-RHE*, os queratinócitos neonatais (HEKn) foram isolados de amostras de prepúcio (doadores de 1 a 4 anos), segundo protocolo de Aasen e Belmonte (2010), após consentimento informado e aprovação do comitê de ética (Aprovação do Comitê de Ética Local - CAAE: 84000016.9.3001.0097).

Para a construção das RHEs, primeiramente os HEKn foram cultivados em monocamada, em meio EpiLife suplementado com HKGS (*Human Keratinocytes Growth Supplement*), a 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, onde foram mantidos em cultura por no máximo duas passagens, para a obtenção de HEKn proliferativos. Após atingirem 80% de confluência em garrafas de cultura, as reconstruções epidérmicas foram feitas, onde 4x10<sup>5</sup> HEKn foram semeados em cada inserto (Thermo Scientific™ Nunc™, 141002), previamente revestido com colágeno IV, em uma placa *Deep Well* (Thermo Scientific™ Nunc™, 141002). As células foram mantidas em condição submersa, em uma mistura de meios na proporção de 3:1, DMEM e Ham's F12, respectivamente, suplementado com fatores de crescimento, durante 96 h. Em seguida, as células foram expostas à interface ar-líquido por meio da remoção do meio de cultura do compartimento superior do inserto. As células foram então cultivadas sob condição de ALI por dez dias, substituindo o meio de cultura a cada dois dias (GAGOSIAN, 2021).

O teste de irritação cutânea foi realizado utilizando modelos da *SkinVitro-RHE*, conforme a norma OECD TG 439, seguindo valores de referência da SkinEthic™ RHE.

Após a construção do *SkinVitro-RHE*, os modelos passaram por pré-incubação de 2 h em meio de manutenção (meio DMEM e Ham's F-12 (3:1) sem suplementação). Posteriormente foram expostos por 42 min a:

- 16  $\mu\text{L}$  de solução salina tamponada com fosfato (PBS) onde este foi o controle negativo (CN);
- 16  $\mu\text{L}$  de dodecil sulfato de sódio (SDS) 5 % -v/v em PBS, sendo o controle positivo (CP);
- 16 mg das ligninas LE, R1 e E60.

Após a exposição, as RHE foram lavadas com 25 jatos de PBS e transferidas para placa de 6 poços para pós-incubação de 42 h, contendo 2 mL de meio de crescimento. Após 42 h foi realizado o teste de viabilidade celular, através do teste de MTT (OECD, 2013).

A viabilidade celular foi realizada pelo teste de MTT, onde as RHEs foram incubadas com 1 mg mL<sup>-1</sup> de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina - Sigma Aldrich, por 3 h a 37 °C, na ausência de luz (MOSMANN, 1983). Em seguida, as RHE foram incubadas em isopropanol P.A. (solução extratora dos cristais de formazan) por 2 h, sob agitação orbital. Da solução extratora foram transferidos 200  $\mu\text{L}$  para uma placa de 96 poços, em triplicata, e realizada a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 570 nm (OECD, 2013).

A análise foi realizada considerando o CN sendo 100% viável, na condição de que o valor de densidade óptica estivesse dentro dos valores recomendados pela OECD 439 ( $0,6 \leq X \leq 3,0$ ). A viabilidade de cada condição analisada foi então calculada (em %) proporcionalmente CN. São considerados irritantes, valores inferiores a 50% e não irritantes, valores superiores a 50% de viabilidade celular em relação ao CN.

### III.2.2. HISTOLOGIA

Após o teste de irritação cutânea, os tecidos foram coletados para realização de histologia e verificação de penetrabilidade das amostras de ligninas na RHE.

Os tecidos foram coletados para realização da histologia, fixados em paraformaldeído (PFA) 2%/ PBS (v/v), por 24h, e transferidos subsequentemente para a solução de 15 % de sacarose e 30% de PBS, por 2h em cada solução, para crioproteção do material.

Concluída a etapa de fixação, as RHEs foram incluídas em resina Tissueteck e foram realizados cortes de 5-7  $\mu\text{m}$  de espessura com auxílio de um criostato. Os cortes foram inseridos em lâminas cobertas com Biobond Tissue Section Adhesive (EMS™), para que ocorresse uma interação eletrostática entre a lâmina e o material.

Em seguida, foi realizado o processo de coloração das lâminas com hematoxilina e Eosina (H&E). Para isso, as lâminas foram incubadas em Hematoxilina de Harris por 1 min, lavadas 2 vezes com água destilada, coradas com eosina por 1 min e lavadas novamente com água destilada para remoção do corante não fixado.

Na sequência, foi iniciada a desidratação das amostras através de uma série alcoólica, a partir do álcool 70%, 80%, 90%, 100% (2 x), solução álcool: xilol 1:1 (v/v) e em xilol P.A. (2x) (todas as lavagens de 1 min).

Para finalizar as lâminas foram montadas em resina Entellan® (Merck™) e analisadas em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 40x.

### **III.2.3. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) POR ESPECTROFOTOMETRIA**

Para a determinação do FPS para filtro químico utilizou-se o método espectrofotométrico *in vitro* desenvolvido por Mansur et al. (1986). A análise foi realizada em triplicata, a partir da solubilização das amostras de ligninas em etanol, obtendo concentração final de 0,02 mg mL<sup>-1</sup>, e as absorvâncias das

amostras foram medidas em espectrofotômetro no intervalo de 290 – 320 nm, faixa correspondente à radiação UVB responsável por causar eritema na pele, a cada 5 nm, logo após a diluição de cada amostra. Para o cálculo do FPS foi utilizada a expressão matemática descrita por Mansur et al (1986), equação (D):

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot ABS(\lambda) \quad (D)$$

Em que:

FC = Fator de correção igual a 10, determinado de acordo com dois filtros solares de FPS conhecidos, de tal forma que um creme contendo 8 % de homossalato obtivesse FPS = 4;

EE ( $\lambda$ ) = efeito erimatogênico da radiação em cada comprimento de onda  $\lambda$ ;

I ( $\lambda$ ) = intensidade da radiação solar em cada  $\lambda$ ;

ABS ( $\lambda$ ) = Absorbância em cada  $\lambda$ .

A relação entre o efeito erimatogênico (EE) e a intensidade (I) da luz de cada comprimento de onda, foi considerada conforme TABELA 7, calculada por Sayre et al. (1979).

TABELA 7 - PONDERAÇÃO EMPREGADA NO CÁLCULO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR POR ESPECTROFOTOMETRIA

Comprimento de onda (nm)	EE x I (normalizado)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

TOTAL

1

---

Valores calculados por SAYRE et al. (1979).

Os resultados foram dados como média aritmética  $\pm$  o valor do erro e comparados através de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, considerando valores de  $p < 0,05$  como significativos.

A amostra E60 não solubilizou em etanol portanto a determinação do FPS foi realizada considerando filtros físicos, pelo método de transmitância difusa em espectrofotômetro no intervalo de 290 – 320 nm (VELASCO et al., 2011). Os dados da transmitância difusa obtidos foram convertidos para valores de absorbância monocromática conforme equação (E) (MCCORMICK; TSUZUKI, 2012):

$$ABS(\lambda) = -\log\left(\frac{T(\lambda)}{100}\right) \quad (E)$$

Onde:

ABS ( $\lambda$ ) = Absorbância em cada  $\lambda$

T ( $\lambda$ ) = Transmitância difusa em % em cada  $\lambda$

Em seguida utilizando os valores de ABS ( $\lambda$ ) foi calculado o FPS a partir da expressão matemática descrita por Mansur et al (1986).

### III.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

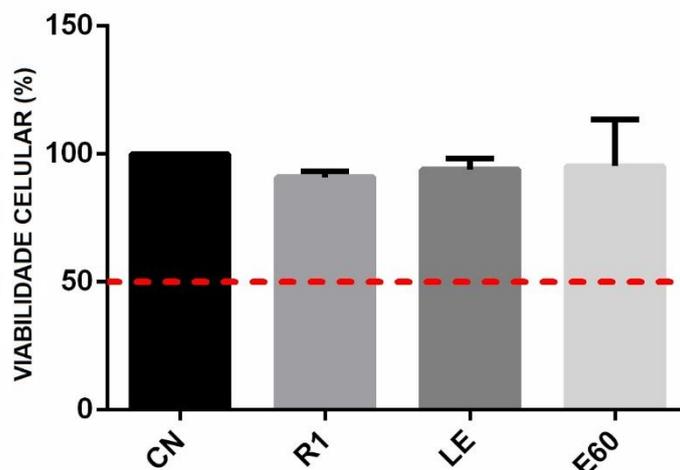
#### III.3.1. TESTE DE IRRITAÇÃO CUTÂNEA

Embora a lignina possa ter várias aplicações de maior valor para a indústria, o perfil toxicológico da lignina deve ser investigado para buscar a aplicação adequada. Portanto, para promover o uso de ligninas em produtos de consumo, avaliações de eficácia (capacidade antioxidante, fator de proteção solar, efeito bactericida) e segurança (viabilidade celular) precisam ser consideradas. Também é importante avaliar a segurança para cada tipo de lignina, uma vez que as ligninas variam em sua composição dependendo de sua origem, método de extração e /ou modificação (LOURENÇON et al., 2021; MAGALHÃES; THÁ; LEME, 2018; THÁ et al., 2021).

Para análise de irritação dérmica, foi realizado o teste de viabilidade celular nas amostras LE (como controle da ação da enzima), R1 (lignina obtida de maior massa em meio reacional contendo apenas tampão de acetato de sódio) e E60 (lignina obtida de maior massa em meio reacional contendo etanol).

A viabilidade celular de cada amostra de lignina analisada foi determinada (em %) proporcionalmente ao controle negativo (OECD, 2013). São considerados irritantes valores inferiores a 50% e não irritantes, valores superiores a 50 % de viabilidade celular em relação ao CN. Os resultados preliminares para o teste de irritação cutânea, das ligninas testadas na *Skin Vitro-RHE*, demonstram que as ligninas LE, R1 e E60, não causam irritação cutânea, por apresentarem valores de viabilidade celular de 88,8%, 89,5% e 92,2% respectivamente, conforme FIGURA 29, valores estes que sugerem que as ligninas LE, R1 e E60 são seguras para uso dérmico.

FIGURA 29 VIABILIDADE CELULAR DAS LIGNINAS LE, R1 e E60

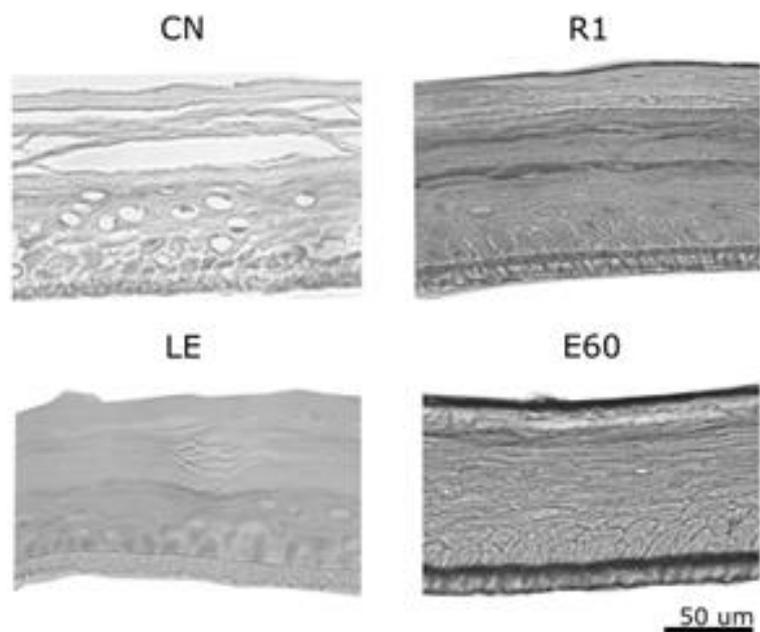


A lignina antes de passar por reação com lacase (LE) também apresentou alta viabilidade celular, portanto mesmo a fração solúvel em etanol pode ser aplicada em uso dérmico. Para buscar o uso adequado das frações R1 e E60, de maior massa molecular, outras análises são necessárias como análise de fator de proteção solar, para as quais ligninas de maiores massas podem se mostrar mais promissoras (LOURENÇON et al., 2021; THÁ et al., 2021).

### III.3.2. HISTOLOGIA

Para sugerir a aplicação de um material na área da saúde são necessários testes de segurança complementares, como a análise de histologia além do teste de irritação cutânea. A histologia tem o objetivo de detecção de possíveis alterações ou lesões no tecido, neste caso foi utilizada para verificação da penetrabilidade das amostras de lignina na *RHE*. As microscopias das anatomias observadas após aplicação das amostras de lignina (LE, R1 e E60) podem ser observadas na FIGURA 30.

FIGURA 30 – HISTOLOGIA DAS RHE DO CN, R1, LE E E60. AUMENTO DE 40X.



Não foi observada a presença de corpo estranho, ou seja, pontos de lignina absorvidas nas lâminas da histologia em nenhuma das camadas da epiderme (camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea), indicando que as amostras de ligninas não penetraram na pele. A ausência da penetrabilidade da lignina na derme é uma vantagem para o uso dérmico, uma vez que o produto não irá entrar em contato com fluídos corporais que poderiam causar inflamação. Visando uso como filtro solar, na aplicação ideal o composto deve permear o mínimo possível para a circulação sanguínea, visto que a foto proteção é perdida se o filtro é absorvido (SECCO; BELTRAME; SCHWANZ, 2019).

### III.3.3 DETERMINAÇÃO DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS) POR ESPECTROFOTOMETRIA

Os danos cumulativos causados pelas radiações UVA e UVB podem causar lesões no DNA, relacionadas ao envelhecimento cutâneo, além de levar ao desenvolvimento de câncer de pele (SECCO; BELTRAME; SCHWANZ, 2019). O uso de fotoprotetores, substâncias com propriedades de absorver,

refletir e dispersar a radiação que incide sobre a pele, é uma questão relevante tanto do ponto de vista cosmético como da saúde pública. A eficácia de um filtro solar é geralmente expressa pelo fator de proteção solar (FPS), definido como a energia UV necessária para produzir uma dose mínima de eritema (MED) na pele protegida, dividida pela energia UV necessária para produzir um MED na pele desprotegida (DUTRA et al., 2004; MANSUR et al., 1986a; SAYRE et al., 1979). Os métodos mais aceitos para comercialização de um produto são os testes *in vivo*, porém correlações entre as metodologias de eficácia fotoprotetora *in vivo* e *in vitro* são utilizadas na seleção para estudo com voluntários para fins de registro do produto visando oferecer um produto de eficácia fotoprotetora comprovada (MANSUR et al., 1986b; SAYRE et al., 1979; SECCO; BELTRAME; SCHWANZ, 2019).

O método de (MANSUR et al., 1986b), determina o FPS *in vitro* de filtros químicos por meio da leitura espectrofotométrica das soluções diluídas. Os resultados de FPS das ligninas analisadas são apresentados na TABELA 8.

TABELA 8 - FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR DA LIGNINA

Amostra	FPS
LK	27,5 <sup>a</sup> ± 0,05
LE	33,8 <sup>b</sup> ± 0,02
R1	22,7 <sup>c</sup> ± 0,04
E60	2,1 <sup>d</sup> ± 0,06
E60DE	4,8 <sup>e</sup> ± 0,06
E60SE	11,7 <sup>f</sup> ± 0,05
FE60	1,9 <sup>g</sup> ± 0,03

Os filtros são essencialmente compostos aromáticos formados por moléculas orgânicas que apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila, na posição *orto* ou *para*. São moléculas capazes de absorver a radiação UV (alta energia) e transformá-la em radiações com energias menores e inofensivas ao ser humano. Quanto maior o FPS maior será a proteção, ou seja, maior será o tempo em que a pele ficará protegida frente à radiação UVB (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

A lignina é o material renovável aromático mais abundante disponível na natureza, contém grupos funcionais de absorção no UV, como fenólicos, cetonas e outros cromóforos (QIAN; QIU; ZHU, 2015). A lignina é um bloqueador solar natural de amplo espectro e os resultados preliminares de viabilidade celular corroboram com a aplicação para uso dérmico (HATAKKA, 2001). Os resultados da TABELA 8 mostram um maior resultado de fator de proteção solar das amostras LE, LK e R1, respectivamente. Foram determinados fatores de proteção entre 20 e 30, valor utilizado em cosméticos, portanto uma alternativa de aplicação para estas ligninas (MANSUR et al., 1986a; VELASCO et al., 2011). Qian et al. (2015) cita que a adição de lignina a loções de proteção solar comerciais aumenta o desempenho do protetor em até duas vezes o FPS.

Entretanto, a amostra E60 não solubilizou no etanol, ou seja, não apresenta resultado real pela metodologia de Mansur et al., (1986a), para qual é necessária a diluição do filtro químico no solvente. Por essa razão pode-se estimar que o valor de fator de proteção da amostra E60 pode ser superior ao calculado na TABELA 8, como esperado devido à maior massa molecular. O que pode justificar o maior valor de FPS encontrado para LE, uma vez que esta lignina é a fração solúvel em etanol da LK e o solvente utilizado na determinação é o etanol. A obtenção de uma suspensão com amostra E60 poderia classificar a amostra como filtro físico (VELASCO et al., 2011). No caso de filtros físicos, os pigmentos precisam estar adequadamente dispersos no veículo, normalmente uma emulsão, para que se tenha a eficácia adequada (SAYRE et al., 1979). A E60 permanece em suspensão no solvente como mostra a FIGURA 31.

FIGURA 31 - SUSPENSÃO DA AMOSTRA E60 EM ETANOL PARA TESTE FPS



Pelas características da amostra, o material foi testado como filtro físico, pelo método de transmitância difusa recomendado para este tipo de filtro (VELASCO et al., 2011). Os dados da transmitância difusa foram obtidos e convertidos para valores de absorvância monocromática, em seguida calculado o FPS para a amostra E60, conforme resultado apresentado na TABELA 9 (DIFFEY; ROBSON, 1989; MCCORMICK; TSUZUKI, 2012).

TABELA 9 - FPS DA AMOSTRA E60 DETERMINADO PARA FILTRO FÍSICO

Amostra	FPS (filtro físico)
E60	22,4 ± 0,19

O resultado encontrado para o fator de proteção solar em torno de 22 é um valor encontrado em cosméticos comerciais, portanto uma alternativa de aplicação para esta lignina, como filtro físico (QIAN; QIU; ZHU, 2015; VELASCO et al., 2011).

Os filtros físicos comumente utilizados são o óxido de zinco e dióxido de titânio, que funcionam como uma barreira na proteção da pele (CABRAL; PEREIRA; PARTATA, 2013). A legislação brasileira estabelece que o uso de alguns metais na fabricação de cosméticos não é permitido ou possui um limite de concentração, o que limita o uso deste filtros (MCCORMICK; TSUZUKI, 2012). Este tipo de filtro possui baixo potencial alergênico especialmente importante para formulação de produtos infantis, entretanto apresenta característica branca, opaca e de difícil aplicação (CABRAL; PEREIRA; PARTATA, 2013).

Ao aplicar a lignina como filtro físico, o composto não estaria sujeito aos limites de concentração aplicados aos metais e não apresentaria a desvantagem da textura branca e opaca, uma vez que a coloração marrom da lignina poderia ser utilizada na formulação de protetor solar com cor. A lignina não é apenas um bloqueador solar natural, mas também é conhecido por suas atividades antioxidantes devido à presença dos grupos hidroxila fenólicas. Portanto, uma

alternativa para o uso também é o reforço de filtros solares comerciais com adição de lignina (QIAN; QIU; ZHU, 2015).

### III.4. CONCLUSÃO

As amostras de ligninas testadas para viabilidade celular, não resultaram em irritação cutânea. Na avaliação da histologia das amostras testadas, não houve absorção das ligninas em nenhuma das camadas da epiderme. Assim, apresentou potencial para aplicações com foco em produtos para a saúde humana.

Uma das aplicações propostas para as ligninas de maiores massas moleculares foi como fotoprotetoras. As amostras mais promissoras apresentaram FPS entre 20 e 30, resultado potencial das amostras para uso em produtos fotoprotetores. Entretanto a amostra de maior massa (E60) não solubilizou no solvente para o teste de FPS como filtro químico, portanto foi aplicado o teste de filtro físico para suspensão da amostra E60. Como potencial aplicação como filtro físico, a coloração marrom da lignina poderia ser utilizada na formulação de protetor solar com cor.

Uma alternativa para o uso da lignina é o reforço de filtros solares comerciais com lignina, que além da ação como bloqueador solar natural, apresenta atividade antioxidante.

## **CAPÍTULO IV. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE OBTIDAS POR DESFIBRILAÇÃO MECÂNICA**

### **IV.1. INTRODUÇÃO**

Processos de modificações da lignina Kraft podem ser realizados por uma rota biotecnológica a partir de enzimas como a lacase, atuando como biocatalisador produzindo valor agregado a produtos de lignina (FIȚIȚĂU; PETER; BOERIU, 2013; MATE; ALCALDE, 2015; ORTNER et al., 2015).

No entanto o uso da enzima na forma livre possui menor viabilidade devido ao fato de a mesma estar sujeita a fatores químicos, físicos e biológicos que limitam sua vida útil durante uso ou estocagem tornando-a um produto de alto custo. Muitas destas características indesejáveis podem ser removidas ou amenizadas com o uso das enzimas na forma imobilizada. O confinamento 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 do produto do catalisador (PACHECO; SOARES, 2014; SOUZA et al., 2017).

Vários tipos de suportes vêm sendo estudados para a imobilização das enzimas, dentre estes encontram-se: celulose, por ser biodegradável e renovável, além de poder ser obtida em indústrias de papel e celulose, mesmo setor de obtenção da lignina. Uma alternativa promissora é o uso das nanofibrilas de celulose, que além de apresentarem maior área superficial possuem baixo custo de obtenção e facilidade de produção por desfibrilação mecânica (CLARO et al., 2020; MAGALHÃES et al., 2017).

Neste contexto este capítulo propõe a imobilização da enzima lacase em nanofibrilas de celulose obtidas por desfibrilação mecânica, visando à reutilização da enzima no processo de modificação da lignina Kraft.

## IV.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### IV.2.1 MATERIAIS

Neste estudo foi utilizada a polpa branqueada obtida pelo processo Kraft da madeira do gênero *Eucalyptus*, cedida por uma empresa de papel e celulose da região de São Paulo.

A enzima utilizada foi um preparado enzimático comercial fornecido pela Buckman – NZ51003, lacase de *Myceliophthora thermophila*. Aspecto: líquido marrom. Temperatura recomendada de armazenagem 2 °C - 8 °C.

Estudos preliminares de imobilização foram realizados com uma lacase cedida por uma empresa da região de São Paulo, entretanto este material estava envolvido em processo de análise de patenteabilidade, sendo necessário preservar as informações. Não foram fornecidos dados sobre o microrganismo de obtenção e parâmetros de atividade enzimática. Portanto, esta lacase foi denominada lacase azul (LAA), e foi utilizada em testes preliminares.

### IV.2.2. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA

A polpa celulósica branqueada do processo Kraft, utilizada na obtenção das nanofibrilas aplicadas como suporte sólido para imobilização da enzima lacase, foi caracterizada através das análises de teor de lignina insolúvel em ácido, teor de cinzas e teor de açúcares.

Para determinação do teor de lignina insolúvel foi pesada 1 g de amostra em 15 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 72%. A amostra foi mantida por 2 h em repouso. Em seguida foi adicionado 560 mL de água destilada e levado para ebulição em condensador por 4 h. Após resfriar, o material foi filtrado em cadinho sinterizado previamente seco e pesado. O teor de lignina foi determinado pelo método gravimétrico, pela diferença de massa do cadinho após a filtração (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2002a).

Para determinação do teor de cinzas a amostra foi calcinada em mufla a 525 °C por 1 h. O teor de cinzas foi determinado pelo método gravimétrico, ou seja, pela diferença de massa da amostra após a calcinação (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2002b).

O teor de açúcares da polpa de celulose foi quantificado por cromatografia de troca iônica em HPAEC/PAD da Thermo. A separação foi feita em coluna CarboPac PA 20 (4 mm x 250 mm, 5 µL looping, taxa de fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup> e temperatura 30 °C). A quantificação dos açúcares foi realizada por uma curva externa com padrões de arabinose (0,4 – 9,9 mg L<sup>-1</sup>), galactose (0,4 – 10,1 mg L<sup>-1</sup>), glicose (3,8 – 95,3 mg L<sup>-1</sup>), xilose (0,98 – 24,6 mg L<sup>-1</sup>), manose (0,4 – 10,0 mg L<sup>-1</sup>) e celobiose (0,65 – 16,2mg L<sup>-1</sup>). O preparo da amostra foi realizado por hidrólise ácida total (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12 M) da polpa de celulose previamente seca em estufa a 60 °C (SCHROEDER et al., 2017).

#### **IV.2.3. OBTENÇÃO DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE**

As nanofibrilas de celulose foram obtidas a partir da polpa celulósica branqueada de eucalipto pelo método de desfibrilação mecânica em moinho coloidal Super Masscoloider Masuko Sangyo (FIGURA 32A).

O processo de desfibrilação mecânica da polpa ocorre por forças de compressão e cisalhamento quando a celulose é forçada pela abertura entre os discos de pedra que compõem o moinho (FIGURA 32B), sendo um disco de pedra rotativo e um disco de pedra estático, com uma abertura ajustável.

Para obtenção da celulose nanofibrilada a polpa celulósica branqueada foi dispersa em água destilada e homogeneizada em liquidificador laboratorial para obtenção de uma pasta. Para o processo mecânico de desfibrilação a pasta, na concentração de 3% em base seca, foi inserida no moinho Super Masscoloider Masuko Sangyo, sob rotação de 1500 rpm e 20 passes, sendo o passe um ciclo completo de moagem da amostra (MAGALHÃES et al., 2017). Após o processo de desfibrilação mecânica foi determinado o teor de umidade

da amostra, pelo método gravimétrico (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 2002c).

FIGURA 32 A) MOINHO SUPER MASSCOLOIDER MASUKO SANGYO B) DISCO DE PEDRA MÓVEL



FONTE: O autor

#### IV.2.4 OBTENÇÃO DE FILMES DE NANOCELULOSE

Testes preliminares de imobilização enzimática foram realizados em filmes de nanocelulose.

Com base no valor da umidade de cada suspensão nanocelulósica foram calculadas as massas necessárias para a produção dos filmes com gramatura objetivada de  $20 \text{ g m}^{-2}$ , considerando a área de cada filme sendo  $0,0294 \text{ m}^2$ .

Os filmes foram produzidos por meio de filtração com membranas de nylon de abertura de  $22 \mu\text{m}$ . As massas de suspensão necessária para obter cada filme foram diluídas em água destilada até concentração de  $3 \times 10^{-3} \text{ g mL}^{-1}$ , as misturas foram agitadas com bastão de vidro por 1 min até completa homogeneização. Após foram filtradas em membrana de nylon  $22 \mu\text{m}$  suportada em peneira de 60 Mesh. As suspensões foram prensadas com placa de vidro para a retirada do excesso de água, em seguida o conjunto de peneira, material e placa de vidro foram colocados em estufa a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  para secagem por 24 h (CLARO et al., 2020; MAGALHÃES; CLARO, 2018).

#### IV.2.5. OXIDAÇÃO DA NANOFIBRILAS DE CELULOSE

As nanofibrilas foram oxidadas pelo processo adaptado de Huang et al., (2011), com o objetivo de gerar grupos aldeídos que atuam como local de ligação para a lacase. Um grama de nanofibrilas de celulose (base seca) foi adicionada em 100 mL de solução 4,2 mg mL<sup>-1</sup> de periodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>; pH 6,1), e mantida sob agitação, em banho-maria a 30 °C, durante 7 horas. Em seguida, a celulose nanofibrilada foi lavada com 100 mL de água deionizada por centrifugação, a 5000 rpm e 15 minutos, por três vezes.

#### IV.2.6. TEOR DE GRUPOS ALDEÍDO GERADOS APÓS OXIDAÇÃO

O teor de aldeído das fibras oxidadas foi determinado pela titulação de hidróxido sódio (NaOH) (WEI et al., 2016). Foi preparada 25 g de uma solução de fibras oxidadas a 1% (massa), e uma solução de NaOH 0,1 M foi usada para ajustar o pH a 5,0. Uma solução de cloridrato de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH HCl) 0,05 g mL<sup>-1</sup> foi preparada e também ajustada para pH 5,0 usando NaOH 0,1 M. Em seguida, 10 mL de solução de NH<sub>2</sub>OH HCl foram adicionados à solução de fibras oxidada, que foi colocada em um banho maria a 40 °C durante 4 h. A titulação foi realizada usando NaOH 0,1 M, e o volume de NaOH consumido até atingir pH 5,0 foi registrado. O teor de aldeídos foi calculado pela equação (F):

$$\text{Teor de aldeído (\%)} = \frac{C \cdot (V_1 - V_2) \cdot 162}{M \cdot 1000} \times 100 \quad (F)$$

Onde: C = concentração da solução de NaOH (mol L<sup>-1</sup>)

V1 = volume em mL da solução de NaOH gastos nas fibras oxidadas

V2 = volume em mL da solução de NaOH gastos nas fibras não oxidadas

M = massa em g das fibras em base seca

#### IV.2.7. IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE

Neste estudo a enzima lacase foi imobilizada em nanofibrilas de celulose obtidas por desfibrilação mecânica, testes de imobilização foram realizados em suspensão e filmes de nanofibrilas, adaptando o método desenvolvido por Sathishkumar et al., (2014) para de nanofibras de celulose obtidas por eletrofiação.

Para os testes com suspensão de nanocelulose foi determinado o teor de umidade da amostra e calculada uma massa de suspensão que continha 0,5 g de nanocelulose em base seca. Para amostras de filmes foi utilizada uma área de amostra que continha 0,5 g, após secagem do filme a 60°C.

Um volume de lacase para 250 U foi determinado a partir da atividade enzimática determinada anteriormente.

O processo de imobilização da lacase (FIGURA 33) foi realizado pela imersão 0,5 g de nanofibrilas de celulose oxidadas em 25 mL de tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,5) contendo 250 U de lacase (solução inicial), a mistura foi mantida a 30 °C e agitação de 150 rpm por 30 min.

Após 30 min, a mistura foi resfriada a 4 °C em refrigerador, por 2 h. Para fixação da enzima foi realizada a adição de 0,5 % (m/v) de glutaraldeído e a amostra foi mantida por 12 h a 4 °C. Após as 12h uma alíquota da solução final da mistura foi coletada.

Para o processo de imobilização em suspensão de nanofibrilas foi realizada três lavagens do material imobilizado com tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,5) por centrifugação a 5000 rpm por 15 min.

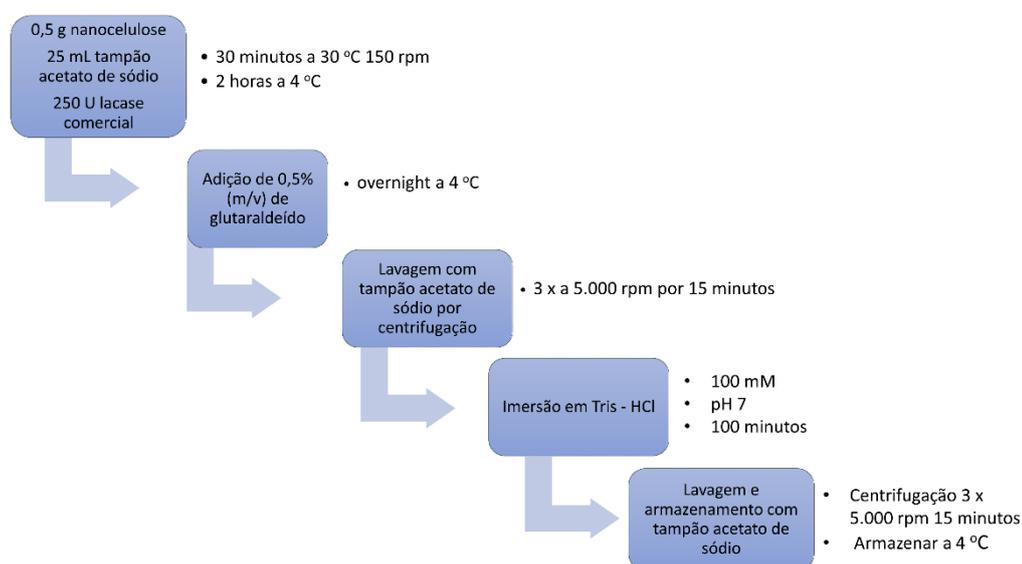
Para o processo de imobilização realizado em filmes as amostras foram lavadas com jatos de tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,5).

Para recobrir os grupos aldeídos gerados na oxidação que não reagiram durante a imobilização, foi realizada a imersão da amostra em Tris-HCl (100 mM pH 7) por 100 min. Na sequência o material imobilizado foi lavado novamente

três vezes com solução tampão de acetato de sódio (100 mM; pH 5,5) e estocado em solução tampão a 4 °C para uso futuro (MAGALHÃES et al., 2018).

Para caracterização do processo de imobilização uma alíquota da solução inicial (usada para a imobilização) e uma alíquota da solução final (antes da etapa de lavagem e imersão em TrisHCl) foram coletadas e armazenadas a 4 °C.

FIGURA 33 - PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE



FONTE: MAGALHÃES et al. 2018

## IV.2.8. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE IMOBILIZADA

### IV.2.8.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática da lacase nas soluções de enzima livre (antes da imobilização) e nas imobilizadas, foi determinada utilizando ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) 10 mM como substrato, a 30 °C, leitura em espectrofotômetro a 420 nm e 5 min de tempo de reação (MAGALHÃES et al., 2018). Para a amostra imobilizada em suspensão de nanocelulose, as

nanofibrilas foram diluídas em solução tampão de acetato de sódio até o material atingir fluidez adequada para ser pipetado, com concentração conhecida. Para a imobilização realizada em filmes, a amostra foi cortada com área e massa conhecida.

A atividade de lacase livre, tanto para solução inicial quanto na solução final, foram determinadas pelo cálculo da equação (A) em U.mL<sup>-1</sup>:

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

Onde volume final é o volume em mL preparado para leitura em espectrofotômetro.

O volume de amostra é o volume em mL da lacase livre utilizada para leitura em espectrofotômetro.

O fator de diluição é referente a diluição da lacase livre utilizada para leitura em espectrofotômetro.

Sendo o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) do ABTS a 420 nm = 36 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

A atividade da lacase imobilizada em relação à massa de nanofibrilas de celulose foi determinada a partir do cálculo da equação (G) em U.mg<sup>-1</sup>:

$$\text{Atividade} \left( \frac{U}{mg} \right) = \frac{\text{Volume final (mL)} \times \text{Absorbância}}{\epsilon (mM^{-1} cm^{-1}) \times \text{Caminho óptico (cm)} \times \text{Tempo de reação (min)} \times \text{Massa de nanocelulose (mg)}} \quad (G)$$

Onde volume final é o volume em mL preparado para leitura em espectrofotômetro.

Sendo o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) do ABTS a 420 nm = 36 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

A massa de nanocelulose é referente à massa em mg de material imobilizado utilizada na leitura em espectrofotômetro.

A atividade total disponível para o procedimento de imobilização em função da massa de nanocelulose utilizada foi calculada pela equação (H):

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

O volume de enzima é o volume total e, mL da enzima diluída em tampão acetato de sódio utilizada no procedimento de imobilização.

A massa de nanocelulose é a massa em mg de nanofibrilas utilizada, tanto no procedimento em suspensão como na imobilização em filme.

O rendimento do processo de imobilização foi calculado pela equação (I) (PEZZELLA et al., 2014; SOUZA et al., 2017):

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

O rendimento da imobilização é razão da equação G e da equação H.

#### IV.2.8.2. TESTE DE VAZAMENTO

Para o teste de vazamento da enzima imobilizada em nanofibrilas, as amostras foram mantidas em tampão acetato de sódio pH 5,5 por 15 min a 30 °C sob agitação, em seguida a amostra foi filtrada em filtro (0,22  $\mu$ m). Foi determinada a atividade enzimática presente na solução após a filtração, por

método espectrofotométrico, conforme procedimento de determinação da atividade enzimática.

#### IV.2.8.3 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS POR BRADFORD

A diferença de proteínas totais nas soluções iniciais e finais do processo de imobilização da enzima lacase em nanofibrilas permite quantificar as proteínas imobilizadas e conseqüentemente a concentração de enzima lacase imobilizada.

Para quantificar as proteínas nas amostras de solução inicial e solução final do processo de imobilização, foram adicionados em tubos de ensaio 0,25 mL de amostra e 2,5 mL do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). As absorbâncias das amostras foram determinadas no quinto minuto de incubação à 595 nm em espectrofotômetro. Foi preparada uma curva analítica de albumina bovina em seis concentrações compreendidas entre 10 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nas mesmas condições do ensaio para as amostras (BRADFORD, 1976). As concentrações de proteínas foram calculadas a partir da curva analítica de albumina.

#### IV.2.8. ESTUDO CINÉTICO

Os parâmetros cinéticos da equação (B) de Michaelis-Menten ( $K_m$  e  $V_{max}$ ), foram determinados a partir das atividades enzimáticas da enzima imobilizada usando ABTS como substrato na faixa de 0,025 – 1 mM a 40 °C, em meio reacional de tampão acetato de sódio pH 4,5. Os parâmetros cinéticos foram calculados usando o gráfico de Lineweaver-Burk (LAURICHESSE; AVÉROUS, 2014; SATHISHKUMAR et al., 2014).

$$V_0 = \frac{v_{max} [S]}{(K_m + [S])} \quad (B)$$

$V_0$  – Velocidade inicial da reação

$V_{max}$  – Velocidade máxima da reação ( $U\ mg^{-1}$ )

$K_m$  – Constante de Michaelis-Menten (mM)

[S] – Concentração de substrato (mM)

#### **IV.2.8.4. ESTABILIDADE OPERACIONAL DA ENZIMA IMOBILIZADA**

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada pela influência do pH e da temperatura na atividade enzimática. Em cada combinação de pH e temperatura foram determinadas as atividades enzimáticas por leitura em espectrofotômetro a 420 nm e 5 min de tempo de reação, conforme cálculo da equação (A). Foram calculadas as atividades enzimáticas variando os meios reacionais entre pH 4,5 e 7,5 e faixa de temperatura de 40 °C a 80 °C.

A estabilidade operacional também foi avaliada pelo tempo após o procedimento de imobilização. A atividade enzimática foi acompanhada em 40 dias após a imobilização.

#### **IV.2.8.5. CICLOS DE USO DA ENZIMA**

Um dos principais objetivos da imobilização enzimática é poder recuperar a enzima do meio reacional após o processo de catálise (SOUZA et al., 2017).

Para avaliar o número de repetições que o substrato celulósico contendo lacase poderia ser reutilizado, foi avaliada a atividade da enzima após cada ciclo de reação. A atividade enzimática foi determinada em meio reacional tampão acetato de sódio pH 4,5, temperatura de 40 °C e 5 min de reação com substrato ABTS e leitura em espectrofotômetro à 420 nm. Após cada leitura a nanocelulose foi lavada três vezes com 5 mL de tampão acetato de sódio pH 4,5 e o mesmo

método para realização do ensaio de determinação da atividade enzimática foi repetido por 10 vezes (VILLELA, 2006).

### IV.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização do preparado enzimático comercial fornecido pela Buckman – NZ51003, lacase de *Myceliophthora thermophila*, utilizado na imobilização enzimática, foi descrita no capítulo II em II.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE.

#### IV.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA POLPA CELULÓSICA BRANQUEADA

A polpa celulósica branqueada de eucalipto utilizada no processo de obtenção de nanofibrilas para imobilização enzimática apresentou umidade média de 8,2%, e teor médio de 0,7% de lignina insolúvel em ácido e 0,5% de cinzas ambos em base seca.

O teor médio de açúcares da polpa é apresentado na TABELA 10.

TABELA 10 TEOR MÉDIO DE AÇÚCARES DA POLPA CELULÓSICA UTILIZADA NA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE

	Glucana (mg g <sup>-1</sup> )	Xilana (mg g <sup>-1</sup> )
Polpa celulósica de eucalipto	774±22	159±1

Por se tratar de uma polpa celulósica proveniente de uma folhosa as heteroxilanas foram as frações típicas de hemiceluloses encontradas. O alto teor de glucanas deve-se principalmente à hidrólise da celulose (CARVALHO et al., 2009).

#### IV.3.2. OBTENÇÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE

As nanofibrilas de celulose vegetal utilizadas como substrato no processo de imobilização enzimática foram obtidas pelo método de desfibrilação mecânica em moinho Super Masscoloider Masuko Sangyo (FIGURA 32), onde se obteve uma suspensão de nanofibrilas com teor de 3 % (FIGURA 34).

FIGURA 34 SUSPENSÃO DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE



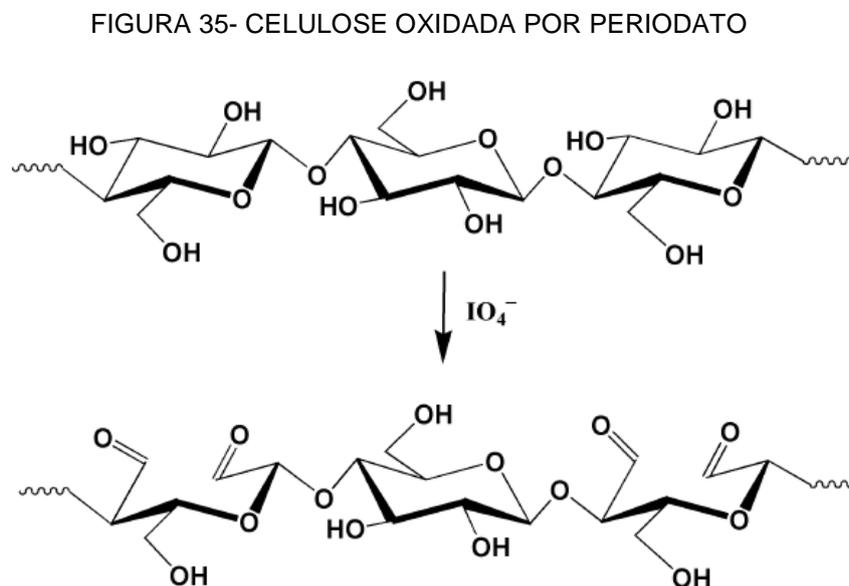
FONTE: MAGALHÃES et al. 2018.

De modo geral, um suporte ideal para imobilização deve apresentar: elevada área superficial, permeabilidade, estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais, custo viável, morfologia e composição adequadas, resistência ao ataque microbiano, alta densidade de grupos reativos presentes em sua superfície. Polímeros naturais vêm se destacando no campo da imobilização de biocatalisadores, pelo baixo custo e por serem facilmente degradáveis, não causando danos ao meio ambiente (SOUZA et al., 2017). Neste contexto a nanocelulose apresenta alto potencial como suporte para imobilização enzimática.

#### **IV.3.3. OXIDAÇÃO DAS NANOFIBRILAS DE CELULOSE**

Devido à sua estrutura a celulose é sensível a vários reagentes oxidantes. A estrutura química da celulose é alterada de modo que os grupos hidroxila são oxidados na estrutura para aldeído. Os periodatos, como oxidantes específicos, oxidam os grupos hidroxila em C-2 e C-3 em uma unidade de anidroglicose de

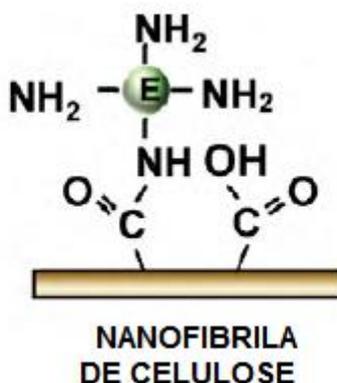
celulose, formando assim dois grupos aldeído, como mostrado na FIGURA 35 (WEI et al., 2016).



FONTE: WEI et al.(2016).

O teor de aldeídos da suspensão de nanocelulose oxidada foi determinado conforme a equação de Wei et al. (2016), sendo que o valor encontrado foi de 19,6%. Com a oxidação da nanocelulose e a formação de grupos aldeídos, a imobilização da enzima ocorre por ligação covalente, onde o grupamento amina da enzima liga-se ao carbono do aldeído, conforme FIGURA 36 (LEE et al., 2010; SOUZA et al., 2017).

FIGURA 36 - LIGAÇÃO COVALENTE DA ENZIMA LACASE COM O GRUPO ALDEÍDO DA CELULOSE



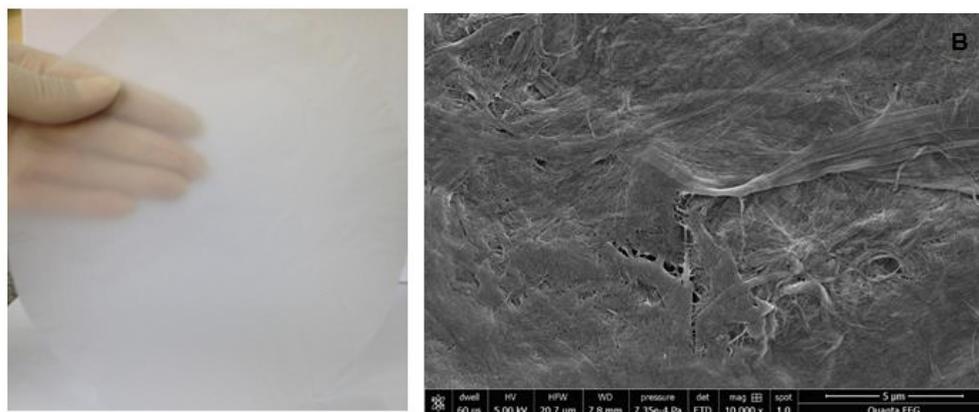
FONTE: Adaptado de LEE et al. (2010).

A ligação covalente é o método de imobilização mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas. As principais vantagens desse método residem em maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e incubação em solventes orgânicos (SOUZA et al., 2017).

#### IV.3.4. TESTES PRELIMINARES DE IMOBILIZAÇÃO COM A LACASE AZUL

Testes preliminares de imobilização foram realizados com a LAA, cedida por empresa biotecnológica. O teste inicial de imobilização foi realizado em filmes de nanocelulose obtidos por filtração conforme descrito no tópico IV.2.4 OBTENÇÃO DE FILMES DE NANOCELULOSE, mostrado na FIGURA 37A.

FIGURA 37 - A) FILME DE NANOCELULOSE B) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO FILME DE NANOCELULOSE



FONTE: A) O autor B) Adaptado de Magalhães et al. (2018)

A LAA com atividade enzimática de  $913 \text{ U mL}^{-1}$  em pH 5,5 e  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , foi imobilizada em filmes de nanocelulose de eucalipto, porém o rendimento obtido foi de 4,2%. Acredita-se que baixo rendimento é devido à falta de porosidade do filme (FIGURA 37B) e conseqüentemente menor área superficial para imobilização da enzima.

Posteriormente foram realizados testes de imobilização da enzima LAA na suspensão de nanocelulose, os quais resultaram em rendimentos satisfatórios conforme TABELA 11.

TABELA 11- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E RENDIMENTO DOS TESTES PRELIMINARES COM LAA EM SUSPENSÃO DE NANOCELULOSE

Amostra	Resultado
Solução inicial	$7,6 \text{ U mL}^{-1}$
Solução final	$0,8 \text{ U mL}^{-1}$
Lacase imobilizada em nanofibrilas	$0,27 \text{ U mg}^{-1}$
Rendimento da imobilização	83 %

Os resultados de imobilização na suspensão de nanocelulose apresentaram rendimentos acima de 80 %, valor superior ao encontrado para

imobilização nos filmes de nanocelulose. A maior área superficial das nanofibrilas dispersas na suspensão permite uma maior área para ligação covalente com a enzima. Baseado nos testes preliminares os testes de imobilização foram padronizados para serem realizados na suspensão de nanofibras. Por se tratar de preparado enzimático (LAA) envolvido em processo de análise de patenteabilidade, não possuímos informações deste produto e não estar disponível para comercialização os testes seguiram com preparado enzimático comercial da Buckman - NZ51003, lacase de *Myceliophthora thermophila*.

#### **IV.3.5. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE**

A adaptação na metodologia de imobilização baseada em Sathishkumar et al. (2014) ocorre na mudança da celulose utilizada. A literatura utiliza a celulose obtida por eletrofiação e no projeto empregamos a celulose desfibrilada por processo mecânico. A celulose utilizada é do tipo I (nativa) e a da literatura é do polimorfo do tipo II. A celulose nativa quando submetida a tratamentos térmicos ou químicos pode resultar em diferentes polimorfos de celulose (I, II, III, IV), ou seja, ocorrem alterações nas dimensões da cela unitária e conseqüentemente na estrutura cristalina (DE JESUS SILVA; D'ALMEIDA, 2009). Todavia, a morfologia de ambos os tipos de celulose, analisadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão são similares.

Para analisar o processo de imobilização em nanofibrilas foram determinadas as atividades das soluções iniciais (antes da imobilização), soluções finais (após imobilização) e da enzima imobilizada em celulose, conforme TABELA 12.

TABELA 12- ATIVIDADE ENZIMÁTICA E RENDIMENTO DURANTE O PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA LACASE

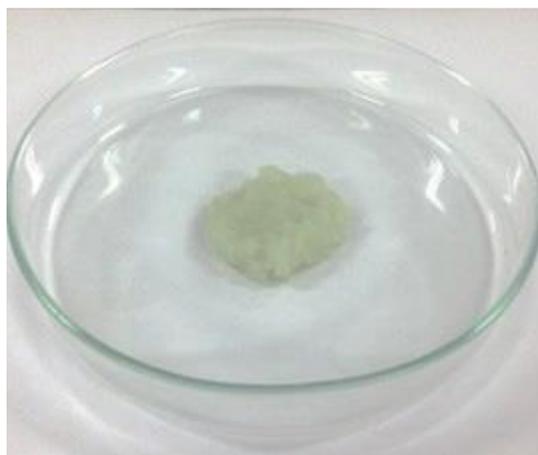
<b>Amostra</b>	<b>Resultado</b>
----------------	------------------

Solução inicial	215± 3 U mL <sup>-1</sup>
Solução final	37 ± 0,4 U mL <sup>-1</sup>
Atividade total disponível	0,43 ± 0,12 U mg <sup>-1</sup>
Lacase imobilizada em nanocelulose	0,38 ± 0,10 U mg <sup>-1</sup>
Rendimento da imobilização	88 ± 2 %
Rendimento teórico pela diferença da solução inicial e solução final	83 ± 1,82 %

A redução na atividade apresentada pela solução final indica a ausência da enzima comparada à solução inicial, ou seja, durante o processo a lacase permaneceu imobilizada nas nanofibrilas de celulose, o que é confirmado pela atividade apresentada na amostra de celulose.

Analisando a lacase imobilizada em celulose nanoestruturada (FIGURA 38), foi calculada a atividade enzimática em 0,38 U mg<sup>-1</sup> de substrato, considerando a massa de nanocelulose utilizada no processo. O rendimento da imobilização determinado a partir da atividade total disponível foi de 88 % semelhante ao rendimento de 88 % encontrado por Sathishkumar et al., (2014), para filmes de nanofibrilas de celulose obtidas por eletrofiação imobilizados com lacase de *Pleurotus florida*. Considerando a diferença das atividades medidas para a solução de lacase livre antes e após a imobilização, foi possível estimar o rendimento de imobilização de 83 ± 1,82%. A diferença nos valores de rendimento encontrados deve-se aos erros analíticos do procedimento considerando a diluição de nanoestruturas, a determinação de atividade de um catalisador biológico o qual apresenta alta sensibilidade além da possível perda de atividade da enzima durante o processo. Para confirmar a imobilização da estrutura da enzima o teste de proteínas Bradford foi realizado.

FIGURA 38 LACASE IMOBILIZADA EM NANOFIBRILAS DE CELULOSE



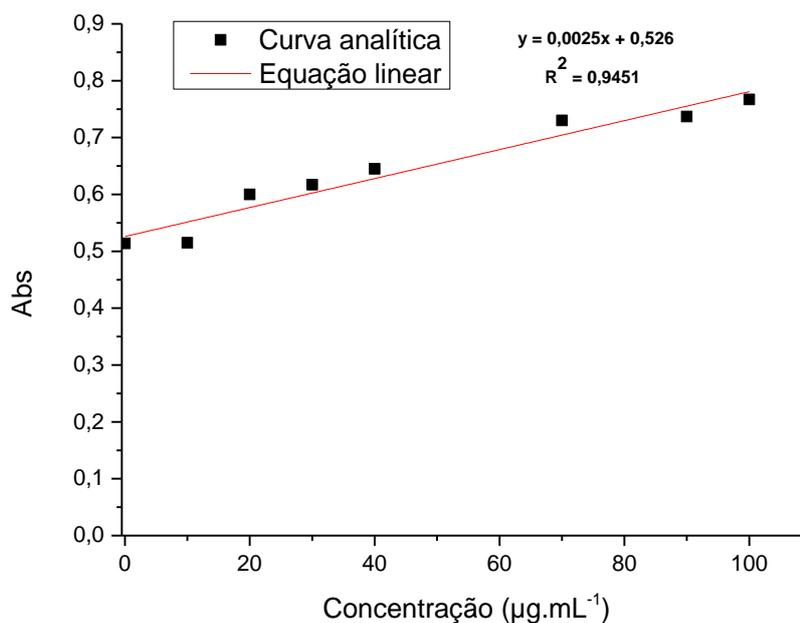
FONTE: MAGALHÃES et al. 2018

A eficiência da imobilização depende principalmente da natureza do suporte, das técnicas utilizadas para imobilização, e a interação de ligação entre a enzima e o suporte (SATHISHKUMAR et al., 2014).

#### **IV.3.6. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS – BRADFORD**

A quantificação da diferença de proteínas totais nas soluções iniciais e finais do processo de imobilização da enzima lacase em nanofibrilas permite determinar a atividade enzimática imobilizada, uma vez que a estrutura da enzima é uma proteína (SOUZA et al., 2017). Para isso obteve-se uma curva analítica de proteína padrão utilizando o reagente de Bradford, apresentada na FIGURA 39 (BRADFORD, 1976).

FIGURA 39 - CURVA ANALÍTICA DE PROTEÍNAS TOTAIS POR BRADFORD



A partir da curva de calibração por regressão linear foi possível calcular a concentração de proteínas nas soluções iniciais e finais do processo de imobilização e assim determinar o rendimento de proteínas imobilizadas, conforme apresentado na TABELA 13.

TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DAS SOLUÇÕES DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de proteínas</b>
Solução inicial	208 ± 10 µg mL <sup>-1</sup>
Solução final	22 ± 7 µg mL <sup>-1</sup>
<b>Rendimento</b>	<b>85 ± 6 %</b>

A diferença determinada nos valores de concentração de proteínas nas soluções iniciais e finais comprova a imobilização da enzima na estrutura de celulose, uma vez que a estrutura possui ligações peptídicas. Assim o rendimento da imobilização calculado pela concentração de proteína foi de 85 ± 6%, valor próximo ao rendimento determinado pela atividade enzimática de 88 ±

2%. Ou seja, este resultado corrobora com os resultados positivos de imobilização determinados pelo método da atividade enzimática.

#### IV.3.7. ESTUDO CINÉTICO

O efeito da concentração do substrato sobre a atividade enzimática imobilizada foi avaliado sob as mesmas condições de reações da lacase livre, variando a concentração do substrato ABTS. O gráfico de Lineweaver-Burk (FIGURA 40), foi usado para determinar os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$  (TABELA 14).

FIGURA 40 - GRÁFICO DE LINEWEAVER-BURK DA ENZIMA IMOBILIZADA

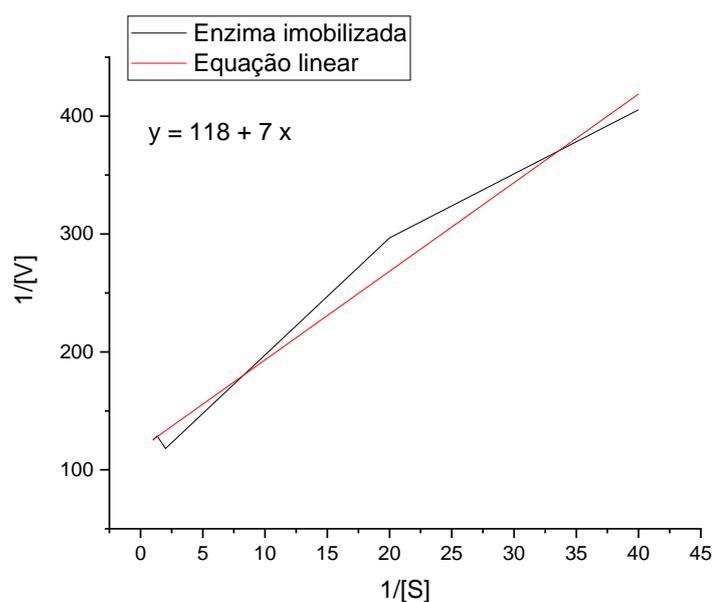


TABELA 14 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA LACASE IMOBILIZADA

Amostra	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U mg <sup>-1</sup> )
Lacase imobilizada	0,07	0,01

A atividade catalítica da lacase ao interagir com um substrato pode ser explicada pelos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{max}$ . O valor de  $K_m$  da enzima imobilizada foi maior que o  $K_m$  da enzima livre (0,3 mM), indicando menor afinidade da enzima imobilizada em relação a lacase livre em meio reacional contendo apenas tampão acetato de sódio pH 4,5. Uma menor afinidade com o substrato em uma enzima imobilizada pode ser causada por limitações como menor acessibilidade do substrato ao local ativo (SAMPAIO et al., 2016). Além disso, a velocidade máxima da reação foi determinada em relação a massa de nanocelulose contendo enzima imobilizada, obtendo um valor de 0,01 U mg<sup>-1</sup>, sendo menor em relação a lacase livre sugerindo também uma menor afinidade pelo substrato.

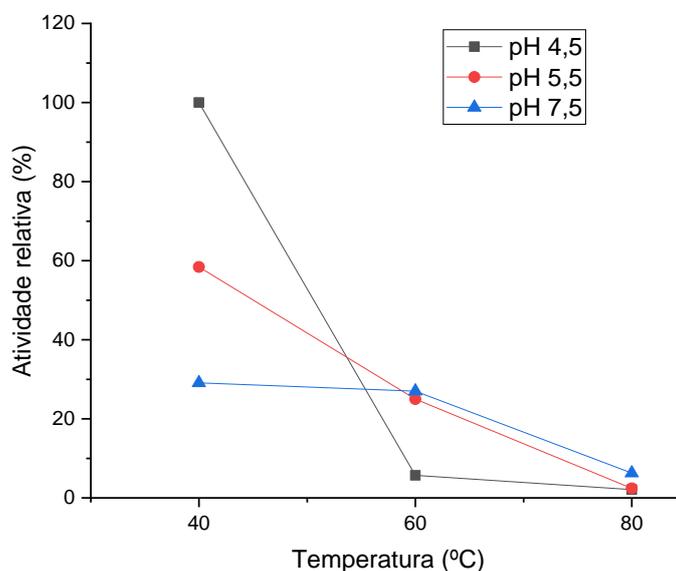
#### **IV.3.8. TESTE DE VAZAMENTO**

Para verificar a eficiência da imobilização, alguns testes de vazamento foram realizados para verificar se a atividade determinada era de fato proveniente da enzima imobilizada e não de um arraste da solução enzimática. As nanofibrilas foram incubadas em tampão acetato de sódio e, após foi adicionado ABTS nas soluções e a atividade enzimática foi determinada por espectrometria. As amostras filtradas para o teste de vazamento não apresentaram valores de absorbância, portanto foi possível concluir que a enzima foi imobilizada nas nanofibrilas de celulose, descartando resultados devido arraste de solução enzimática.

#### **IV.3.9. ESTABILIDADE OPERACIONAL**

A estabilidade operacional foi determinada através da atividade enzimática calculada pelo método espectrométrico com ABTS, em diferentes temperaturas e pHs, conforme apresentada na FIGURA 41.

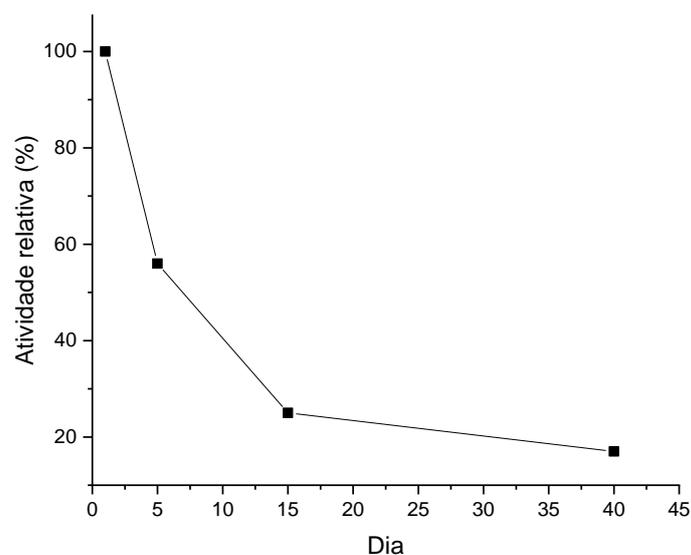
FIGURA 41 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA EM DIFERENTES MEIOS DE pH E TEMPERATURA



A enzima imobilizada apresentou maior atividade em pH 4,5 e temperatura de 40 °C, entretanto a maior variação da atividade enzimática acontece no mesmo pH na temperatura de 60 °C, onde a atividade reduz para 5%. Comparada a enzima livre a estabilidade operacional da enzima imobilizada é menor nos pHs 4,5 e 5,5. Entretanto no pH 7,5 ocorreu um aumento da atividade relativa em relação a enzima livre, ou seja, a imobilização conferiu maior estabilidade a enzima em pH alcalino.

A estabilidade também foi avaliada pelo fator tempo após o processo de imobilização. O acompanhamento foi realizado até 40 dias após o procedimento de imobilização, conforme curva apresentada na FIGURA 42.

FIGURA 42 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA AO LONGO DO TEMPO

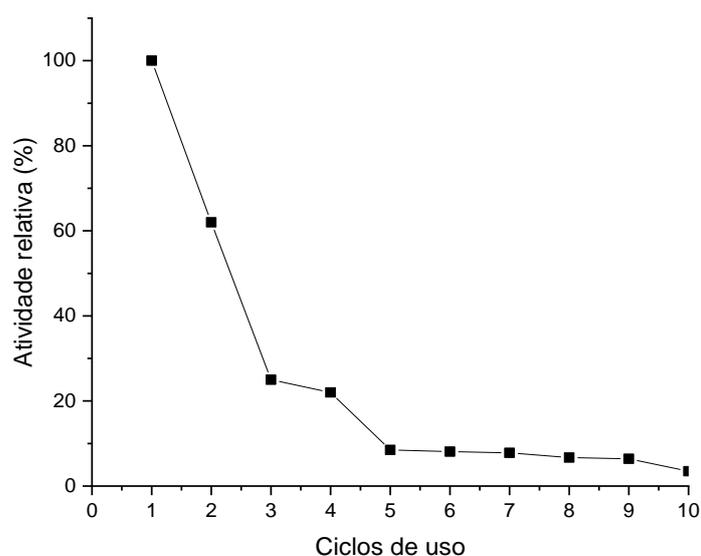


Após o 5º dia do processo da imobilização a atividade enzimática reduz para 56% da atividade inicial. Portanto a utilização e reutilização da enzima imobilizada torna-se mais indicada nos primeiros cinco dias para maior eficiência do processo. Entretanto, até o 40º dia a enzima imobilizada ainda apresentou 17% da atividade inicial. Apesar da redução da atividade, pode ser utilizada para catálises enzimáticas, neste caso sendo necessária a correção da massa aplicada em relação a atividade enzimática apresentada.

#### IV.3.10. CICLOS DE USO DA ENZIMA

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada em ciclos oxidativos consecutivos utilizando o ABTS como substrato. A atividade relativa da enzima foi calculada para cada ciclo de uso conforme FIGURA 43.

FIGURA 43 - ATIVIDADE RELATIVA DA ENZIMA IMOBILIZADA EM CICLOS DE USO



Após cinco ciclos de uso a atividade relativa da enzima foi de apenas 8% em relação a atividade inicial. Sathishkumar et al. (2014) determinou atividade relativa de 67% após 10 ciclos consecutivos, para imobilização da lacase em nanofibras de celulose obtidas por eletrofiação. O que sugere que o processo de imobilização conferiu baixo valor de estabilidade operacional à lacase imobilizada. Resultados semelhantes foram obtidos por Pacheco e Soares (2014), que encontraram atividade relativa de 2,25% após cinco ciclos de uso da lacase imobilizada em quitosana. Os fatores que podem limitar a atividade da enzima em reciclos são o desprendimento da enzima da nanocelulose, perda do suporte no processo de reciclo ou desnaturação da enzima (PACHECO; SOARES, 2014). Entretanto, em relação a lacase livre, a qual é utilizada apenas uma vez e não pode ser recuperada do meio reacional, a lacase imobilizada em nanocelulose apesar da redução da atividade relativa pode ser recuperada e reutilizada até 4 vezes (22 % de atividade relativa) com a devida correção da massa aplicada na reação a partir da atividade apresentada.

#### IV.4. CONCLUSÃO

Neste capítulo avaliamos a eficiência da imobilização da enzima lacase em nanofibrilas de celulose obtidas por desfibrilação mecânica. Os testes preliminares mostraram que a eficiência de imobilização em filmes de celulose é baixa, provavelmente devido a falta de porosidade dos filmes. Já a imobilização direta nas nanofibrilas em suspensão apresenta rendimento acima de 80%.

Os testes de quantificação de proteína corroboram com os valores de imobilização encontrados pelo método da atividade enzimática. Os resultados das análises de vazamento garantem o processo de imobilização da enzima, descartando falsos positivos por arraste da enzima.

Nos testes de estabilidade operacional após o quinto dia do processo da imobilização a atividade enzimática reduziu para 56 % da atividade inicial. No estudo cinético, concluímos que a enzima imobilizada apresentou menor afinidade pelo substrato em relação a lacase livre no meio reacional contendo apenas tampão acetato de sódio pH 4,5. Sugerindo que o processo de imobilização não conferiu satisfatória estabilidade operacional à lacase imobilizada.

Em relação ao reuso da enzima imobilizada, após cinco ciclos de uso a atividade relativa da enzima foi quase nula. Entretanto, em relação a lacase livre, a qual é utilizada apenas uma vez e não pode ser recuperada do meio reacional, a lacase imobilizada em nanocelulose apesar da redução da atividade pode ser recuperada e reutilizada até 4 vezes com a devida correção da massa aplicada na reação a partir da atividade apresentada.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, o processo de oligomerização da lignina Kraft, por meio da catálise enzimática em meio etanólico, é capaz de gerar um conjunto de moléculas de maior massa molar que o material de origem, apresentando maior proporção de unidades G. A variação na estrutura química gera novas possibilidades de aplicação de acordo com as novas características. Uma das aplicações propostas para as ligninas de maiores massas moleculares foi como fotoprotetoras. As amostras de ligninas testadas para viabilidade celular, não resultaram em irritação cutânea e não houve absorção das ligninas em nenhuma das camadas da epiderme. Assim, apresentando potencial para aplicações com foco em produtos para a saúde humana. Entretanto, as ligninas de maior  $M_w$  obtidas não solubilizaram em diversos solventes dificultando a caracterização do material, sendo necessária a aplicação de técnicas combinadas como GPC, TGA, DSC e PY-GC/MS.

A imobilização da enzima lacase em filmes de celulose apresentou baixo rendimento, provavelmente devido à falta de porosidade dos filmes. Já a imobilização direta nas nanofibrilas em suspensão apresentou rendimento acima de 80%. No entanto, avaliando o estudo cinético, concluímos que a enzima imobilizada apresentou menor afinidade pelo substrato em relação a lacase livre, sugerindo que o processo de imobilização não conferiu satisfatória estabilidade operacional à lacase imobilizada. A enzima imobilizada apresentou atividade relativa quase nula após cinco ciclos de uso. Apesar do pequeno número de ciclos, a enzima imobilizada ainda apresenta a vantagem do reuso em relação a lacase livre, a qual é utilizada apenas uma vez e não pode ser recuperada do meio reacional.

Baseado nesse estudo e na literatura recente, faz-se necessário dar continuidade ao estudo da ação da enzima lacase na estrutura da lignina e seus produtos obtidos, especialmente por se tratar de um composto biológico e uma estrutura altamente complexa (lignina) que não possuem uma cinética de reação bem consolidada.

## REFERÊNCIAS

- A lignina da Suzano. **Revista O Papel**, p. 43, 2016.
- AASEN, T.; BELMONTE, J. C. I. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. **Nature Protocols**, v. 5, n. 2, p. 371–382, 4 fev. 2010.
- ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 649–665, 2014.
- ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. A review on nanocellulosic fibres as new material for sustainable packaging: Process and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 64, p. 823–836, 2016.
- BALAKSHIN, M. Y. CAPANEMA, E. A.; CHANG, H.-M. MWL fraction with a high concentration of lignin-carbohydrate linkages: Isolation and 2D NMR spectroscopic analysis. **Holzforschung**, v. 61, p. 1–7, 2007.
- BOERJAN, W. ; RALPH, J. ; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 519–546, 2003.
- BONFATTI JÚNIOR, E. A. **Qualidade da lignina kraft em função do agente protonador**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2020.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates - An expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 1, p. 99–102, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyt. Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CABRAL, L. D. S.; PEREIRA, S. O.; PARTATA, A. K. Sunscreens and photoprotection compounds - a review. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 25, n. 2, 2013.
- 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.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quim. Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191–2195, 2009.

CHAKAR, F. S.; RAGAUSKAS, A. J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 2, p. 131–141, 2004.

CHEN, L.; ZOU, M.; HONG, F. F. Evaluation of fungal laccase immobilized on natural nanostructured bacterial cellulose. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. NOV, p. 1–10, 2015.

CLARO, F. C. et al. Low cost membrane of wood nanocellulose obtained by mechanical defibrillation for potential applications as wound dressing. **Cellulose**, 2020.

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

DARÉ ALVES, É. et al. Estudo do processo de obtenção celulose Kraft com ênfase no forno de cal. **Revista Liberato**, v. 16, n. 26, p. 101–220, 2015.

DE JESUS SILVA, D.; D'ALMEIDA, M. L. O. Nanocristais de celulose. **O Papel (Brazil)**, v. 70, n. 7, p. 34–52, 2009.

DEL RÍO, J. C. .; GUTIÉRREZ, A. .; HERNANDO, M. Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 74, p. 110–115, 2005.

DIFFEY, B. L.; ROBSON, J. A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 40, n. 3, p. 127–133, 1989.

DROZD, R. et al. The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 462–470, 2018.

DU, G. . et al. **Use of carnauba lignin pyran derivative for preventing and treating angiogenesis-related diseases, e.g. tumor, multiple sclerosis, diabetic retinopathy, skin disease, psoriasis, atherosclerosis and hypertension**, 2013a.

DU, X. et al. Understanding pulp delignification by laccase-mediator systems through isolation and characterization of lignin–carbohydrate complexes. **Biomacromolecules**, v. 14, p. 3073–3080, 2013b.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A., GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907–931, 2002.

DUTRA, E. A. et al. Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 381–385, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: De Gruyter, 1984.

FERRER, A.; PAL, L.; HUBBE, M. Nanocellulose in packaging: Advances in barrier layer technologies. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 574–582, 2017.

FIGUEIREDO, P. .; LINTINEN, K. .; KIRIAZIS, A. In vitro evaluation of biodegradable lignin-based nanoparticles for drug delivery and enhanced antiproliferation effect in cancer cells. **Biomaterials**, v. 121, p. 97–108, 2017.

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.

FLOR, J.; DAVOLOS, R.; CORREA, M. A. Protetores solares. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 153–158, 2007.

FRAZÃO, C. J. R. et al. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 500–508, 2014.

FREUDENBERG, K.; NEISH, A. C. **The constitution and biosynthesis of lignin**. Berlin: [s.n.].

GAGOSIAN, V. S. C. **APLICAÇÃO DE UM NOVO MODELO DE EPIDERME HUMANA RECONSTITUÍDA IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DE IRRITANTES CUTÂNEOS**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2021.

GARCÍA, A. et al. Characterization of lignins obtained by selective precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 68, n. 2, p. 193–198, 2009.

GARCIA, T. **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LACASES DE PYCNOPORUS SANGUINEUS**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB, 2006.

GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Lignins: Major Sources, Structure and Properties. In: M. N. Belgacem; A. Gandini (Orgs.); **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**, p. 201–224, 2008.

GHODAKE, G. S. et al. Paper waste extracted  $\alpha$ -cellulose fibers supermagnetized and chitosan-functionalized for covalent laccase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 261, n. February, p. 420–427, 2018.

GONG, J. .; IMBAULT, A. .; FARNOOD, R. The promoting role of bismuth for the enhanced photocatalytic oxidation of lignin on Pt-TiO<sub>2</sub> under solar light illumination. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 204, p. 296–303, 2017.

GOSSELINK, R. J. A. et al. Co-ordination network for lignin—standardisation, production and applications adapted to market requirements (Euro lignin). **Ind. Crops Prod.**, v. 20, p. 121–129, 2004.

GOUVEIA, S. M. A. F. DE. **LACCASE ENZYMATIC POLYMERIZATION . NOVEL ADHESION SYSTEM FOR WOOD PANEL MANUFACTURE**. [s.l.] Universidade de Vigo, 2014.

GOUVEIA, S. et al. Enzymatic polymerisation and effect of fractionation of dissolved lignin from Eucalyptus globulus Kraft liquor. **Bioresource Technology**, v. 121, p. 131–138, 2012.

GRABBER, J. H. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability? A Review of Cell Wall Model Studies. **Crop Science**

**Society of America**, v. 45, p. 820–831, 2005.

GRAÇA, J. **Composição Química da Madeira de Eucalipto (Eucalyptus globulus L .)**. [s.l.] Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

HADDAD, M. . et al. A feasibility study of a novel electro-membrane based process to acidify Kraft black liquor and extract lignin. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 106, p. 68–75, 2016.

HARVEY, B. M.; WALKER, J. R. K. Studies with plant laccases: I. comparison of plant and fungal laccases. **Biochem. Mol. Biol. Biophys**, v. 3, p. 45–51, 1999.

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin. In: M. Hofrichter; A. Steinbuchel (Orgs.); In: WILEY VCH (Ed.). . **Biopolymers: biology, chemistry, biotechnology, applications, Lignin, humic substances and coal**. Weinheim: [s.n.]. p. 129–180.

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

HENRIKSSON, G. Fiber and Polymer Technology. In: KTH (Ed.). . **The Ljungberg textbook Biofiber Chemistry**. Sweden: [s.n.]. p. 109–132.

HOENICH, N. Cellulose for medical applications: Past, Presente and Future. **BioResources**, v. 1, n. 2, p. 270–280, 2006.

HOU, J. et al. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 452, p. 229–240, 2014.

HUANG, X. J. et al. 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.

IBRAHIM, V. et al. Blue laccase from *Galerina* sp.: Properties and potential for Kraft lignin demethylation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 379–384, 2011.

ILLANES, A. et al. Recent trends in biocatalysis engineering. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 48–57, 2012.

IOELOVICH, M. Cellulose as a nanostructured polymer: a short review.

**BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1403–1418, 2008.

JESUS, P. . “**Enzimas imobilizadas em Crisotila e Organo-Gel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos**”. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.

JONGLERTJUNYA, W. . et al. Properties of lignin extracted from sugarcane bagasse and its efficacy in maintaining postharvest quality of limes during storage. **Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p. 116–125, 2014.

KAMEL, S. Nanotechnology and its applications in lignocellulosic composites: A Mini Review. **Polymer Letters**, v. 1, n. 9, p. 546–575, 2007.

KIM, S. .; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 361–375, 2004.

KLOCK, U. et al. **Química da madeira**. 3. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005.

KOSIKOVA, B. . et al. Reduction of carcinogenesis by bio-based lignin derivatives. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 153–159, 2002.

LAURICHESSE, S. .; AVÉROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 7, p. 1266–1290, 2014.

LEE, S. M. et al. Property control of enzyme coatings on polymer nanofibers by varying the conjugation site concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 5, p. 216–221, 2010.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal Basic Microbiology**, v. 41, p. 185–227, 2001.

LI, G. et al. Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO<sub>2</sub> functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. **Journal of Membrane Science**, v. 525, n. September 2016, p. 89–98, 2017.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3061–3068, 2007.

LI, N. et al. Immobilizing laccase on modified cellulose/CF Beads to degrade chlorinated biphenyl in wastewater. **Polymers**, v. 10, n. 7, 2018.

LIN, S. Y. .; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 1992.

LINDBERG, J. J.; TYLLI, H.; MAJANI, C. Notes on the molecular weight and the fraction of lignins with organic solvents. **Paperi ja Puu**, v. 46, n. 9, p. 521–526, 1964.

LIU, D.; YANG, C. **Extraction and purification method of Indian guassin X and application of Indian guassin X -CN104072515ANANJING ZELANG MEDICAL TECHNOLOGY CO LTD**China, 2014.

LORA, J. Industrial Commercial Lignins: Sources, Properties and Applications. In: BELGACEM, M.; ALESSANDRO, G. (Eds.). . **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**,. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 560.

LOURENÇON, T. V. et al. Hardwood and softwood kraft lignins fractionation by simple sequential acid precipitation. **Separation and Purification Technology**, v. 154, p. 82–88, 2015.

LOURENÇON, T. V. et al. Antioxidant, antibacterial and antitumoural activities of kraft lignin from hardwood fractionated by acid precipitation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1535–1542, 2021.

MAGALHÃES, W. L. E. et al. Comunicado Técnico 404 - Produção de nanofibrilas de celulose por desfibrilação mecânica em moinho coloidal. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Florestas**, v. 404, p. 1–5, 2017.

MAGALHÃES, W. L. E. et al. Comunicado Técnico 424 - Imobilização de lacase em nanofibrilas de celulose para aplicação em biorrefinaria de lignina. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Florestas**, v. 424, p. 1–8, 2018.

MAGALHÃES, W. L. E. et al. Comunicado Técnico 463 - Processo de oligomerização de lignina kraft via rota biotecnológica com enzima lacase. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Florestas**, v.

NOVEMBRO, p. 1–10, 2020.

MAGALHÃES, W. L. E.; CLARO, F. C. Comunicado Técnico 413 - Produção de filmes de celulose nanofibrilada. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Florestas**, v. 413, p. 1–8, 2018.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. Comunicado Técnico 427 - Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- Embrapa Florestas**, n. Dezembro, p. 10, 2018.

MAITI, S. et al. Preparation and characterization of nano-cellulose with new shape from different precursor. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 562–567, 2013.

MANSUR, J. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An Bras Dermatol**, v. 61, n. 3, p. 121–124, 1986a.

MANSUR, J. DE S. et al. Correlação entre a determinação do fator de proteção solar em seres humanos e por espectrofotometria. **An. bras. dermatol**, v. 61, n. 4, p. 167–172, 1986b.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 25–40, 2015.

MATOS, M. et al. Acetone:Water fractionation of pyrolytic lignin improves its antioxidant and antibacterial activity. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 156, p. 105175, jun. 2021.

MATTINEN, M. L. et al. Polymerization of different lignins by laccase. **BioResources**, v. 3, n. 2, p. 549–565, 2008.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Review – laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, p. 551–565, 2002.

MCCORMICK, P. G.; TSUZUKI, T. In vitro testing of zinc oxide sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 34, n. 4, p. 291–297, 2012.

MELO, T. O. et al. Simultaneous pyrolysis and trimethylsilylation with N-methyl-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide for the characterisation of lignocellulosic

- materials from kraft pulping. **Holzforschung**, v. 72, n. 10, p. 851–862, 2018.
- MIKULASOVA, M. .; KOSIKIVA, B. Modulation of mutagenicity of various mutagens by lignin derivatives. **Mutation Research**, v. 535, p. 171–180, 2003.
- MORAIS, S. A. L. **Contribuição ao estudo químico de Ligninas de Eucalyptus grandis**. [s.l.] UFMG, 1987.
- MORAIS, S. A. L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do Eucalyptus grandis: Isolamento, quantificação e análise estrutural**. [s.l.] UFMG, 1992.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- MUNK, L. et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin ? **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 13–24, 2015.
- NASCIMENTO, M. G. .; SOLDI, V. .; DALLA-VECCHIA, R. Aplicação de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623–630, 2004.
- NECHYPORCHUK, O.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 2–25, 2016.
- NORBERG, I. et al. A new method for stabilizing softwood kraft lignin fibers for carbon fiber production. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, p. 3824–3830, 2013.
- NORGREN, M. .; EDLUND, H. Lignin: Recent advances and emerging applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 409–416, 2014.
- OECD. **Test No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method**. [s.l.] OECD, 2013.
- ORTNER, A. et al. Laccase mediated oxidation of industrial lignins: Is oxygen limiting? **Process Biochemistry**, v. 50, n. 8, p. 1277–1283, 2015.
- PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase

e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Quim. Nova**, v. 37, n. 2, p. 209–214, 2014.

PEZZELLA, C. et al. Immobilization of a *Pleurotus ostreatus* laccase mixture on perlite and its application to dye decolourisation. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

QIAN, Y. . et al. Fabrication of uniform lignin colloidal spheres for developing natural broad-spectrum sunscreens with high sun protection factor. **Industrial Crops and Products**, v. 101, p. 54–60, 2017.

QIAN, Y. .; QIU, X. .; ZHU, S. Lignin: a nature-inspired sun blocker for broad-spectrum sunscreens. **Green Chem**, v. 17, n. 1, p. 320–324, 2015.

RAGAUSKAS, A. J. et al. Lignin Valorization : Improving Lignin Processing in the Biorefinery. **Science**, v. 344, n. 6185, p. 1246843–1, 2014.

RASHID, T.; KAIT, C. F.; MURUGESAN, T. A “Fourier Transformed Infrared” Compound Study of Lignin Recovered from a Formic Acid Process. **Procedia Engineering**, v. 148, p. 1312–1319, 2016.

RE, R. et al. ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL CATION DECOLORIZATION ASSAY. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RICO, A. et al. Pretreatment with laccase and a phenolic mediator degrades lignin and enhances saccharification of Eucalyptus feedstock. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 6, dez. 2014.

SACUI, I. A. et al. Comparison of the properties of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils isolated from bacteria, tunicate, and wood processed using acid, enzymatic, mechanical, and oxidative methods. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 9, p. 6127–6138, 2014.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. [s.l.: s.n.].

SAJINCIC, N. et al. An Exploratory Study of Consumers’ Knowledge and Attitudes about Lignin-Based Sunscreens and Bio-Based Skincare Products. **Cosmetics**, v. 8, n. 78, 2021.

SALIBA, E. DE O. S. et al. Ligninas: métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917–928, 2001.

SAMPAIO, L. M. P. et al. Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 145, p. 1–12, 2016.

SANNIGRAHI, P.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. Cellulosic biorefineries-unleashing lignin opportunities. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v. 2, n. 5–6, p. 383–393, 2010.

SATHISHKUMAR, P. et al. 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.

SAYRE, R. M. et al. a Comparison of in vivo and in vitro Testing of Sunscreening Formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, n. 3, p. 559–566, 1979.

SCHROEDER, B. G. et al. Evaluation of biotechnological processes to obtain ethanol from recycled paper sludge. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, v. 19, n. 1, p. 463–472, 2017.

SECCO, G. G.; BELTRAME, B. M.; SCHWANZ, M. Avaliação in vitro do fator de proteção solar (FPS) de cosméticos fotoprotetores manipulados. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 4, p. 242–249, 2019.

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.

SILVA, J. et al. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, v. 15, n. 2, p. 191–196, 2012.

SINHA, S. et al. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for chitosanase immobilization and its application in selective production of chitooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 152–157, 2012.

SIQUEIRA, A. J. S. et al. Determinação do Km e V Max: Revisão e Uma Nova Proposta. **Ciência em Movimento - Biociências e Saúde**, v. 13, n. 27, p. 47–

52, 2011.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. San Diego: [s.n.].

SKORONSKI, E. et al. IMOBILIZAÇÃO DE LACASE DE *Aspergillus* sp. EM QUITOSANA E SUA APLICAÇÃO NA BIOCONVERSÃO DE FENÓIS EM REATORES DE LEITO FIXO. **Quim. Nova**, v. 37, n. 2, p. 215–220, 2014.

SONG, J. E. et al. Bio-coloration of bacterial cellulose assisted by immobilized laccase. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018.

SOUZA, L. T. A. et al. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA: PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E TIPOS DE SUPORTE. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol.4**. Blucher ed. São Paulo: [s.n.]. p. 529–568.

STIEFEL, S. et al. Overcoming lignin heterogeneity: reliably characterizing the cleavage of technical lignin. **Green Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 531–540, 2016.

TANG, C. et al. Nanofibrous membranes for single-step immobilization of hyperthermophilic enzymes. **Journal of Membrane Science**, v. 472, p. 251–260, 2015.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 222 om-98, Acid-insoluble lignin in wood and pulp**, 2002a.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 211 om-93, Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C**, 2002b.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **T 412 om02, Moisture in pulp, paper and paperboard**, 2002c.

TEJADO, A. et al. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1655–1663, 2007.

THÁ, E. L. et al. Safety aspects of kraft lignin fractions: Discussions on the chemico antioxidant activity and the induction of oxidative stress on a cell-based in vitro model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p.

977–986, 2021.

UGARTONDO, V.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 14, p. 6683–6687, 2008.

VELASCO, M. V. R. et al. Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) - revisão. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 27–34, 2011.

VIERA, D. C. . **Produção de biofilme (membrana de biocelulose) por Glucanacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

VILLELA, S. M. **IMOBILIZAÇÃO DE LACASE E SEU USO NA BIOTRANSFORMAÇÃO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIAS PAPELEIRAS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, 2006.

VINARDELL, M. P.; UGARTONDO, V. .; MITJANS, M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p. 220–223, 2008.

VISHTAL, A. .; KRASLAWSKI, A. Challenges in industrial applications of technical lignins. **BioResources**, v. 6, n. 3, p. 3547–3568, 2011.

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.

WALLBERG, O.; JÖNSSON, A. S. WIMMERSTEDT, R. Ultrafiltration of kraft black liquor with a ceramic membrane. **Desalination**, v. 156, p. 145–153, 2003.

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.

WANG, L. et al. On Laccase-Catalyzed Polymerization of Biorefinery Lignin Fractions and Alignment of Lignin Nanoparticles on the Nanocellulose Surface via One Pot Water-Phase Synthesis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, n. 26, p. 8770–8782, jul. 2021.

WANG, X. .; ZHAO, J. Encapsulation of the herbicide picloram by using polyelectrolyte biopolymers as layer-by-layer materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 16, p. 3789–3796, 2013.

WANG, Y.; HSIEH, Y. L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 309, n. 1–2, p. 73–81, 2008.

WEI, J. et al. Preparation and Characterization of Aldehyde-Functionalized Cellulosic Fibers through Periodate Oxidization of Bamboo Pulp. **BioResources**, v. 11, n. 4, p. 8386–8395, 2016.

WEXLER, A. S. Characterization of Lignosulfonates by Ultraviolet Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 213–221, 1964.

YANG, W. .; OWCZAREK, J. S.; FORTUNATI, E. . ET AL. Antioxidant and antibacterial lignin nanoparticles in polyvinyl alcohol/chitosan films for active packaging. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 800–811, 2016.

YAOHUA, G. et al. Co-immobilization of laccase and ABTS onto novel dual-functionalized cellulose beads for highly improved biodegradation of indole. **Journal of Hazardous Materials**, v. 365, n. October 2018, p. 118–124, 2019.

YOSHIDA, H. .; MÖRCK, R. .; KRINGSTAD, K. P. Fractionation of kraft lignin by successive extraction with organic solvents. II. Thermal Properties of Kraft Lignin Fractions. **Holzforschung**, v. 41, p. 171–176, 1987.

ZHANG, Y. . et al. Renewable High-Performance Polyurethane Bioplastics Derived from Lignin–Poly( $\epsilon$ -caprolactone). **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, p. 4276–4284, 2017.

ZHU, H. et al. Transparent paper: fabrications, properties, and device applications. **Energy Environ. Sci.**, v. 7, n. 1, p. 269–287, 2014.