

FILMES FINOS PARA APLICAÇÕES NA ÁREA DE ENERGIA E BIOCATALISE POR MEIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA- DE- AÇÚCAR

Dilmer Rodrigues – dilmer@ig.com.br

Luciano Caseli – lcaseli@gmail.com

Universidade Federal de São Paulo, Laboratório de Materiais Híbridos

Resumo. Neste trabalho, pretendeu investigar em nível molecular a obtenção de uma fonte de energia renovável (limpa) por meio da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar utilizando como catalisadores enzimas que degradem celulose a açúcares menores, possibilitando a conversão subsequente a etanol.

Para isso, enzimas que participam na hidrólise de açúcares e também na identificação de açúcares fermentados a etanol foram imobilizadas em filmes ultrafinos por meio da técnica de Langmuir-Blodgett, o que viabiliza a produção de etanol e sua detecção via técnicas elétricas e óticas com controle em nível molecular. Fosfolipídios foram usados como matriz auxiliar para a imobilização das enzimas, que foram injetadas na subfase aquosa de monocamadas de fosfolipídios organizadas na interface ar-água. A avaliação da adsorção das enzimas foi por meio de medidas de pressão de superfície, curvas de cinética de adsorção, e espectroscopia vibracional. Os filmes foram transferidos para suportes sólidos usando a técnica de Langmuir-Blodgett e caracterizados por técnicas espectroscópicas. Os resultados serão avaliados sob a perspectiva da sustentabilidade no âmbito econômico, social e ambiental.

Palavras-chave: Energia, Biomassa, Sustentabilidade

1. INTRODUÇÃO

A biomassa do bagaço de cana-de-açúcar e outras biomassas (madeira, palhadas, etc.) possuem como principal componente a celulose. A celulose é um dos polímeros mais abundantes do mundo, sendo formada por uma cadeia linear de moléculas de glicose ligadas entre si na posição beta (β) -1,4. Este tipo de ligação guarda energia livre que, quando quebradas, liberam açúcares menores e fermentáveis. Porém, a celulose possui uma proteção fibrosa muito forte, tornando o processo de quebra das ligações desfavorável por meio das tecnologias atuais (Buckeridge, 2011).

Neste trabalho é abordado o bagaço de cana-de-açúcar, pois o mesmo possui um alto potencial energético. Uma tonelada de bagaço com 50% de umidade equivale a 2,5 GJ.

O bagaço de cana-de-açúcar possui como principais componentes aproximadamente 41% de celulose, 25% de hemicelulose e 20% de lignina, sendo que a lignina é responsável pelo seu poder calórico.

Atualmente no Brasil o bagaço de cana-de-açúcar é utilizado como insumo energético para geração de energia elétrica. Parte desta energia elétrica é consumida pela a usina de cana-de-açúcar e o excedente é vendido no mercado livre de energia. Pelo fato de ser aproveitado somente 1/3 da cana-de-açúcar para geração de açúcar e etanol, a queima do bagaço de cana-de açúcar torna-se um processo não nobre.

Atualmente diversos estudos apontam para processos enzimáticos, pois naturalmente micro-organismos se alimentam da parede celular e possuem enzimas específicas que fazem esta tarefa.

Porém este processo necessita de aprofundamento na estrutura da parede celular da cana-de-açúcar, desenvolvimento de novas tecnologias e aprofundamento em métodos e técnicas capazes de aumentar a eficiência e o rendimento do processo.

2. FILMES DE LANGMUIR E LANGMUIR-BLODGETT

Filmes monomoleculares podem ser formados na interface ar-água quando tensoativos são espalhados na interface ar-água (Langmuir, 1917), e podem ser comprimidos por barreiras móveis permitindo a diminuição da densidade superficial (figura 1). Durante a compressão, uma série de propriedades pode ser estudada, tais como a variação de pressão e potencial de superfície e o grau de compactação da monocamada.

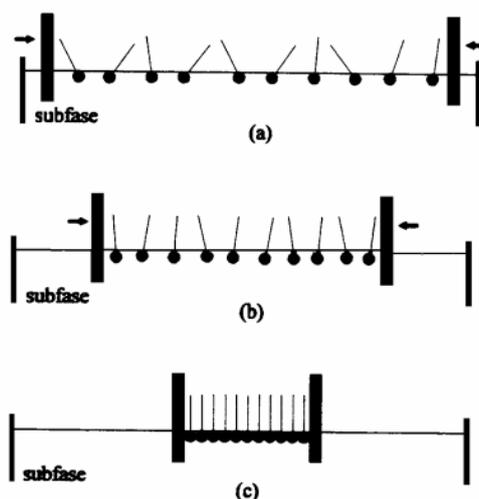


Figura 1: Esquema para a compressão de uma monocamada de Langmuir usando barreiras móveis

A pressão de superfície (π) é definida pela diminuição da tensão superficial da solução aquosa com a presença do filme, ou seja: $\pi = \gamma - \gamma_0$, onde γ é a tensão superficial com a presença do tensoativo, e γ_0 é a tensão superficial da água pura.

Define-se potencial de superfície (ΔV) pela diferença de potencial entre a superfície e a subfase, tomando-se o valor com tensoativo (ΔV_2) e subtraindo-se pelo valor sem o tensoativo presente na interface (ΔV_1), ou seja, $\Delta V = \Delta V_2 - \Delta V_1$.

Entre outras técnicas mais sofisticadas para caracterizar filmes de Langmuir, podemos destacar a espectroscopia de absorção-reflexão de infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS), capaz de detectar transições vibracionais em interfaces.

Ao se transferir as monocamadas da interface líquida para suportes sólidos, obtêm-se os filmes Langmuir-Blodgett (LB). Para isso, atravessa-se o suporte sólido perpendicularmente à interface ar-água (figura 2) permitindo a transferência para monocamadas líquida para o suporte sólido durante a imersão ou emersão do substrato (Blodgett, 1934), o que permite um número de camadas controlado, com elevado grau de orientação molecular.

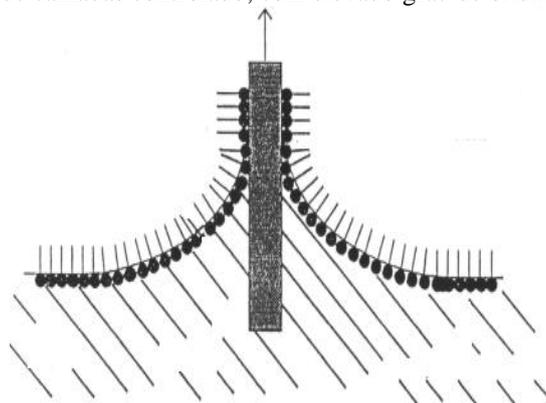


Figura 2: Esquema de formação de um filme Langmuir-Blodgett (LB)

Os filmes LB podem ser caracterizados através de uma quantidade maior de técnicas espectroscópicas e ópticas quando comparados com as monocamadas de Langmuir. Os filmes podem ser usados em dispositivos ópticos e eletrônicos, bem como aplicados como sensores de diversas espécies (Girard-Egrot, 2003; Oliveira Jr., 2005). Em muitos casos de usa a pressão de deposição em torno de 30 mN/m, por ser a pressão superficial correspondente àquela da membrana celular (Marsh, 1996).

2.1 Imobilização de enzimas em filmes de Langmuir- Blodgett

Enzimas imobilizadas são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente (Katchalski-Katzir, 2000).

A imobilização de enzimas é um mecanismo que pode ser usado para a condução de bioprocessos em varias situações. O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo. Na figura 3, apresentam-se vários métodos de imobilização de enzimas.

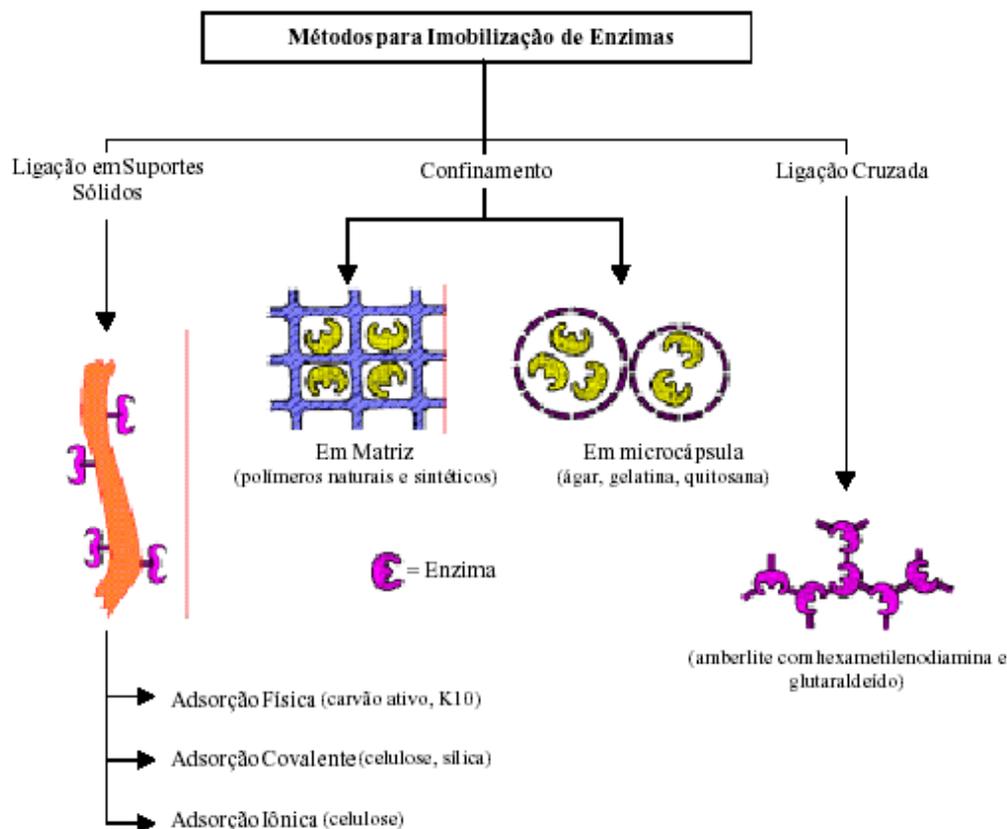


Figura 3- Métodos para imobilização de enzimas (Dors, 2005)

A imobilização de enzimas em filmes de Langmuir e filmes LB tem sido realizadas utilizando fosfolipídios na matriz de adsorção, a intenção é obter uma precisão de controle de espessura, composição, densidade da molécula. A estrutura anfifílica do fosfolipídio contribui para preservar a conformação da enzima ativa e também fornece uma orientação adequada da cadeia polipeptídica, melhorando a acessibilidade dos substratos catalíticos (Caseli, 2009) (Schmidit 2008). Por meio da técnica de LB é possível a imobilização das enzimas em um sistema altamente organizado, com arquitetura controlada em nível molecular, o que é vantajoso na produção de biossensores e sistemas biocatalíticos (Caseli, 2009).

Foi verificado se a imobilização da enzima ADH mostra alguma afinidade pelo fosfolipídio dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) para obtenção de uma monocamada de Langmuir em uma interfase ar-água. Conforme mostrado em artigo recente (Caseli, 2009) a enzima ADH imobilizada possui alta afinidade para o fosfolipídio ácido dimiristoilfosfatídico (DMPA), que forma uma monocamada de Langmuir em uma interface ar-água. O artigo também relata o monitoramento da incorporação da ADH com DMPA por meio de medições de pressão de superfície e espectroscopia no infravermelho. Mesmo com pressões de superfície elevadas, a ADH permaneceu na interface possibilitando a transferência para suporte sólido usando a metodologia de Langmuir-Blodgett (LB). Por meio da espectroscopia de fluorescência foi possível confirmar que a estrutura do ADH foi preservada mesmo após um mês da deposição. E com a aplicação de eletrodos interdigitados de ouro como sensores foi possível detectar etanol em concentrações abaixo de 10 ppb (em volume).

Para o melhor do nosso conhecimento, não há relatos na literatura sobre imobilização de celulasas em filmes de Langmuir-Blodgett.

2.2 Metodologia

As enzimas celulase e ADH serão compradas comercialmente e o bagaço de cana-de-açúcar é obtido por meio de parceria com usinas. DPPC comercial da Sigma-Aldrich foi dissolvido em clorofórmio. Esse lipídio foi escolhido porque fosfolipídios com terminação colina estão presentes em grandes quantidades em membrana celular. Em trabalhos futuros pretende-se misturar fosfolipídios com glicoproteínas para melhor simular uma membrana do protozoário. Para as medidas de tensiometria, foi usada uma cuba de Langmuir (Kibron, 1934). A cuba utiliza o método

de Wilhelmy e um fio de platina como sensor para a determinação da tensão de superfície. A adsorção das enzimas à interface ar-água foi realizada também na presença de um filme de Langmuir do fosfolípido DPPC. Nesse caso, a pressão de superfície inicial foi ajustada pela compressão do filme pelas barreiras móveis da cuba ou através de espalhamento de quantidades de fosfolípidos pré-determinadas. Foi testada a adsorção da celulase e ADH para uma série de valores de pressão inicial, o que simula a interação das enzimas com uma membrana em vários estados de compactação. A eficácia da penetração será medida pela variação da pressão ($\Delta\pi$), medida para cada pressão inicial.

Também os filmes foram caracterizados por espectroscopia de absorção-reflexão na região do infravermelho, com modulação da polarização. Todos os experimentos serão realizados a mesma temperatura, em torno de 25°C.

Foi procedida à caracterização dos filmes por isothermas de pressão e potencial de superfície, espectroscopia vibracional, e posterior transferência dos filmes de Langmuir mistos para suportes sólidos na forma de filmes LB.

Foram testados para a deposição diversos substratos como lâminas de vidro hidrofílico e hidrofóbico, quartzo, ouro e silício. A pressão de deposição será sempre alta, em torno de 30-40 mN/m, pois é relatado na literatura que a maior compactação do filme favorece a uniformidade dos filmes depositados (Girard-Egrot, 1996), além de ser a faixa que é creditada ser correspondente à pressão de uma membrana celular (Marsh, 1996).

O crescimento dos filmes LB foi monitorado com espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e com análise da razão de transferência. Primeiro produziu-se filmes LB mistos de DPPC-celulase para investigar a biocatálise heteorgênea da biomassa existente no bagaço de cana até glicose, e posterior conversão a etanol por processos fermentativos. A detecção do etanol será através de filmes LB de DPPC-ADH, com técnicas espectroscópicas ou elétricas.

2.3 Resultados

A isoterma do DPPC mostrada na figura 4, em subfase aquosa se comporta de forma que ao diminuir a área por molécula aumenta-se a pressão superficial. Em uma área molecular acima de 90 Å² observa-se o estado gasoso, onde há pouca interação entre as moléculas. Entre 90 e 80 Å² observamos o estado líquido-expandido, onde a pressão de superfície começa a aumentar mais significativamente. Entre 80 e 60 Å² aproximadamente, observa-se uma região de pressão aproximadamente constante (um patamar) representando a transição entre os estados líquido-expandido e líquido condensado. Entre 60 e 40 Å² o estado líquido-condensado, e por fim, o colapso ao redor de 30 Å² e pressão de 50 mN/m, onde a partir daí a monocamada se desfaz, originando multicamadas.

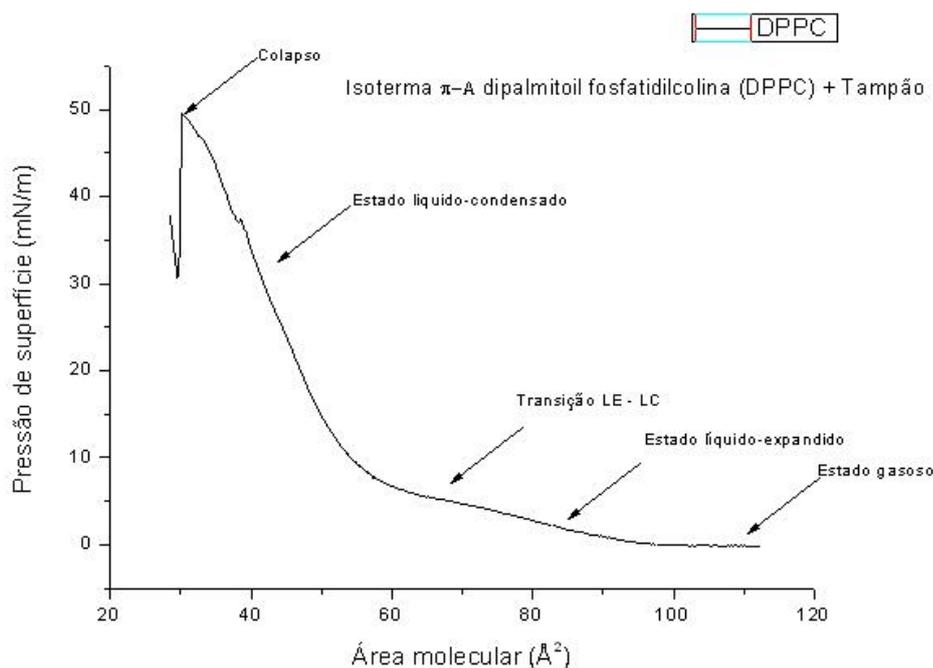


Figura 4: Isoterma de pressão de superfície-área de DPPC em subfase aquosa com tampão de fosfato.

A figura 5 mostra o comportamento da monocamada DPPC na presença da enzima ADH em diversos volumes na subfase aquosa, é possível notar o deslocamento da isoterma para áreas maiores, o que indica a expansão da monocamada. Quanto maior o volume da enzima ADH, maior é a intensidade da expansão, indicando que a enzima ADH interpenetra entre as caudas apolares do DPPC. Além disso, o patamar em que ocorre a mudança de estados aumenta seu valor de pressão conforme se aumenta a quantidade de enzima ADH incorporada.

Nota-se que com a presença de 150µL da enzima na subfase aquosa, a ocorre a expansão máxima da monocamada, devido à considerável interpenetração da enzima ADH. Já na presença de volumes maiores de 150µL da enzima ADH

há, provavelmente, um excesso de enzima impedindo a penetração da ADH, o que pode levar à agregação molecular da enzima, o que a leva à subfase aquosa, diminuindo sua capacidade de penetração.

Sendo assim, pode-se inferir que a ADH diminui sua capacidade de penetrar entre o DPPC com volumes acima de $150\mu\text{L}$, o que é observado devido ao deslocamento da isoterma para áreas menores quando se comparam as isotermas para 150 e $200\mu\text{L}$.

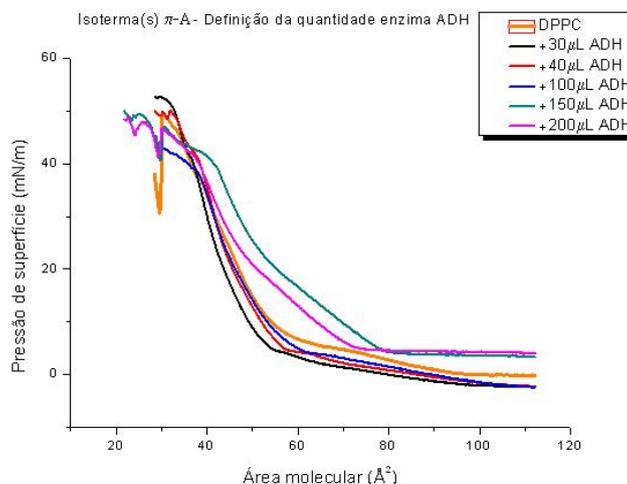


Figura 5: Isotermas de pressão superfície-área do DPPC em pH ~ 7 em diferentes quantidades da enzima Álcool Desidrogenase (ADH) em subfase aquosa (volume mostrado no encarte, sendo completado com água até preenchimento da cuba).

A figura 5 mostra o comportamento da monocamada DPPC na presença da enzima celulase em diversos volumes na subfase aquosa, é possível notar que o deslocamento da isoterma para áreas maiores só ocorre com um alto volume da enzima celulase, o que indica a expansão da monocamada. Idem ao comportamento da enzima ADH, quanto maior o volume da enzima celulase, maior é a intensidade da expansão, indicando que a enzima celulase interpenetra entre as caudas apolares do DPPC. Além disso, o patamar em que ocorre a mudança de estados aumenta seu valor de pressão conforme se aumenta a quantidade de enzima celulase incorporada.

Nota-se que com a presença de $700\mu\text{L}$ da enzima na subfase aquosa, a condensação da monocamada, indicando a interação eletrostática entre o DPPC e a enzima celulase estabilizando, assim, a monocamada e possibilitando a condensação mais efetiva. Além disso, pode-se concluir que há significativamente interpenetração da enzima celulase devido à forte interação. Já na presença de volumes maiores de $700\mu\text{L}$ da enzima celulase há, provavelmente, um excesso de celulase impedindo a penetração da celulase. Sendo assim, pode-se inferir que a celulase não consegue penetrar entre o DPPC com volumes acima de $700\mu\text{L}$, o que é observado devido ao deslocamento da isoterma para áreas menores.

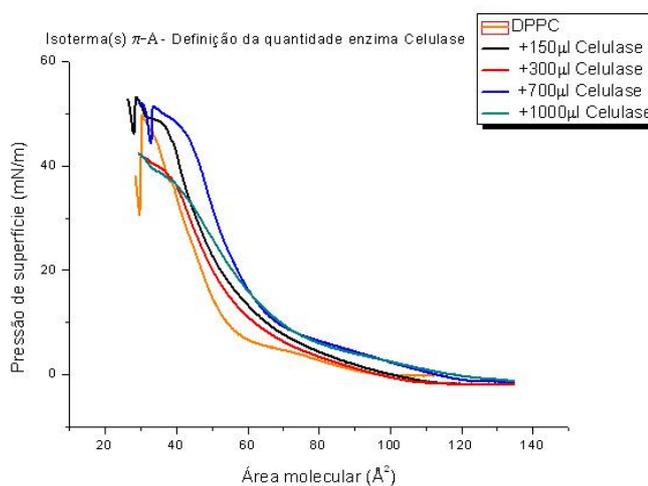


Figura 6: Isotermas de pressão superfície-área do DPPC em pH ~ 7 em diferentes quantidades da enzima celulase em subfase aquosa (volume mostrado no encarte, sendo completado com água até preenchimento da cuba).

De acordo com figura 7, as medidas feitas por infravermelho PM-IRRAS no filme de Langmuir com a enzima ADH, entre 1500 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} , visualiza-se bandas protéicas, nas quais foram localizadas bandas de amida II

(estiramento C-N) na região de 1523 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} e 1577 cm^{-1} amida I (estiramento C=O) em 1653 cm^{-1} e 1685 cm^{-1} , indicando respectivamente a conformação alfa-hélice e beta-folha da cadeia polipeptídica. Além disso, observa-se a banda proveniente (DPPC- éster C=O) em 1720 cm^{-1} .

As presenças das bandas amida I e amida II comprovam que a enzima ADH é adsorvida na monocamada de DPPC.

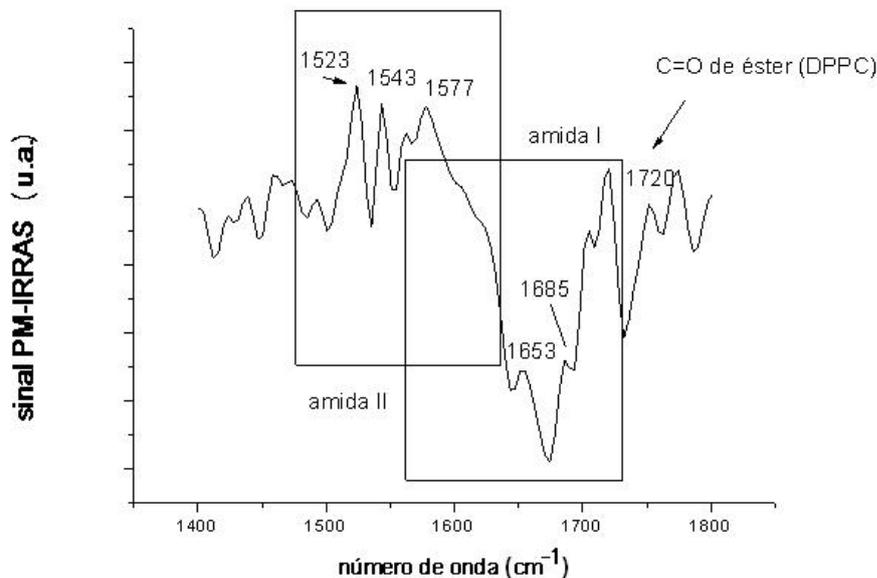


Figura 7: Espectro no infravermelho de monocamada de DPPC sob subfase da enzima Álcool Desidrogenase (ADH).

De acordo com a figura 8, entre 1500 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} , visualiza-se as bandas protéicas, nas quais foram localizadas bandas de amida II (estiramento C-N) na região de 1517 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} e 1592 cm^{-1} amida I (estiramento C=O) em 1624 cm^{-1} e 1680 cm^{-1} , indicando a conformação de beta-folha da cadeia polipeptídica. Além disso, observa-se a banda proveniente (DPPC- éster C=O) em 1742 cm^{-1} .

As presenças das bandas amida I e amida II comprovam que a enzima celulase é adsorvida na monocamada de DPPC.

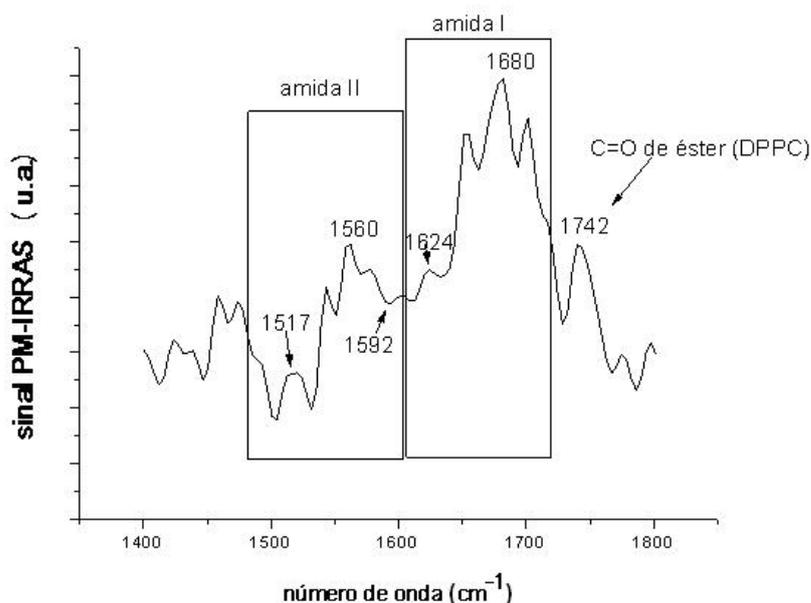


Figura 8: Espectro no infravermelho de monocamada de DPPC sob subfase da enzima celulase.

Para os filmes LB DPPC-ADH e DPPC-celulase (deposição do filme no substrato sólido) observou-se que houve uma razão de transferência próxima de 1 que indica a deposição do filme no substrato. Para os dois filmes houve somente a aderência de uma camada, caracterizando a deposição como monocamada. Também foram feitas as medidas por infravermelho PM-IRRAS no filme de Langmuir-Blodgett DPPC-ADH e DPPC-celulase.

De acordo com a figura 9, entre 1500 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} , visualiza-se as bandas proteicas, nas quais foram localizadas bandas de amida II (estiramento C-N) na região de 1544 cm^{-1} , 1563 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} amida I (estiramento C=O) em 1623 cm^{-1} e 1699 cm^{-1} , indicando respectivamente a conformação alfa-hélice e beta-folha da cadeia polipeptídica. Além disso, observa-se a banda proveniente (DPPC- éster C=O) em 1751 cm^{-1} .

As presenças das bandas amida I e amida II comprovam que a enzima ADH é adsorvida na monocamada de DPPC e foi depositada no substrato sólido.

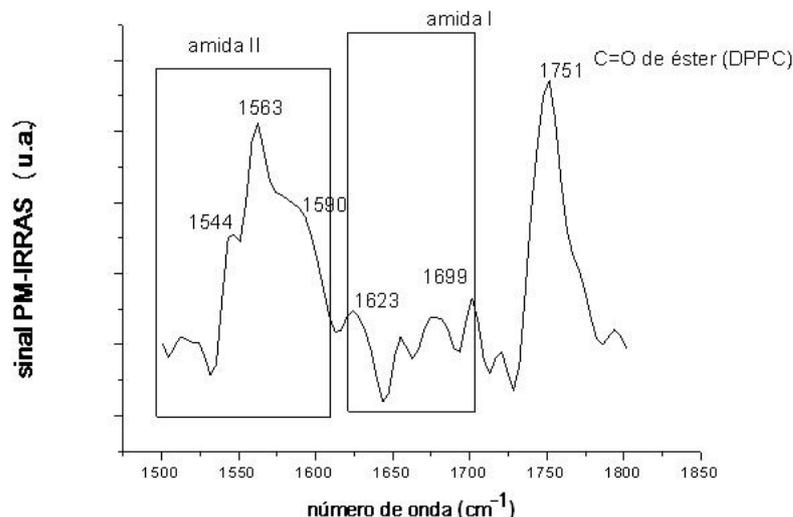


Figura 9: Espectro no infravermelho do filme de Langmuir-Blodgett com a enzima Álcool Desidrogenase (ADH).

De acordo com a figura 10, nas medidas entre 1500 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} , para visualização de bandas proteicas, foram localizadas bandas de amida II (estiramento C-N) na região de 1518 cm^{-1} , 1562 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} amida I (estiramento C=O) em 1614 cm^{-1} e 1662 cm^{-1} , indicando respectivamente a conformação alfa-hélice e beta-folha da cadeia polipeptídica. Além disso, observa-se a banda proveniente (DPPC- éster C=O) em 1716 cm^{-1} .

As presenças das bandas amida I e amida II comprovam que a enzima celulase é adsorvida na monocamada de DPPC e foi depositada no substrato sólido.

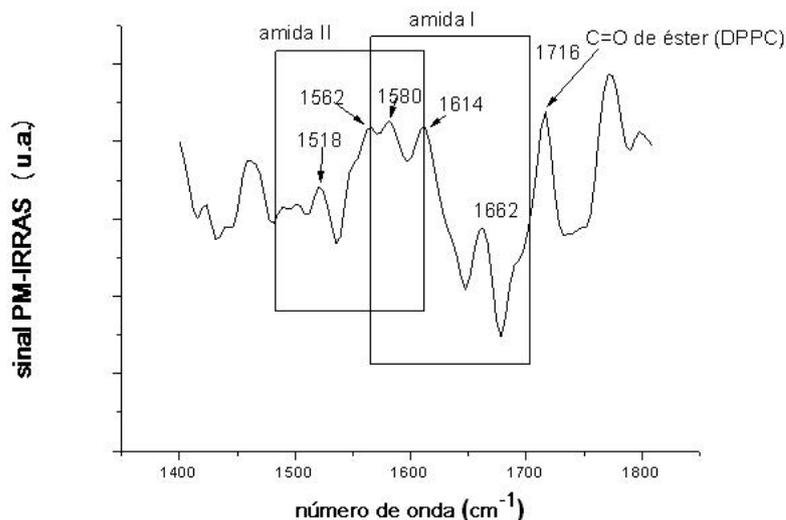


Figura 10: Espectro no infravermelho do filme de Langmuir-Blodgett com a enzima celulase.

3. CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostram que a enzima ADH e a enzima celulase, quando presente em subfase aquosa, são passíveis de adsorção em filme de Langmuir composto por um fosfolípido. Também os dados obtidos mostram que para enzima ADH necessitou de um baixo volume em relação ao volume necessário da enzima celulase para ocorrer à adsorção no filme de Langmuir com fosfolípido. As medidas de infravermelho, PM-IRRAS, conseguem indicar a

presença de proteínas (enzimas) no filme de Langmuir e Langmuir-Blodgett. Os dados obtidos até o momento foram importantes, pois através da análise destes dados conclui-se que por meio da caracterização Langmuir-Blodgett houve a deposição do filme DPPC-ADH e DPPC-celulase no substrato sólido.

A caracterização do filme de Langmuir (interface ar-água) e Langmuir Blodgett (deposição do filme) utilizando o fosfolípido DPPC viabiliza, portanto, o estudo em nível molecular para a quebra da celulose do bagaço de cana-de-açúcar e a posterior detecção da presença de álcool.

Agradecimentos

Este trabalho teve o suporte da FAPESP, CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

- Blodgett KB, 1934. Monomolecular Films of Fatty acids on glass, Journal of the American Chemical Society, vol. 56, pp.495-495
- Santos W.D., Gómez, E.O. & Buckeridge M.S. 2011. Bioenergy and the Sustainable Revolution. In: Buckeridge, M.S. & Goldman, G. (eds.) Routes to Cellulosic Ethanol. Springer, New York, pp. 15-26, DOI: 10.1007/978-0-387-92740-4_2
- Caseli L et al.; 2009. Immobilization of Alcohol Dehydrogenase in Phospholipid Langmuir-Blodgett Films To Detect Ethanol, vol. 25, pp. 3057-3061
- Girard-Egrot AP, Godoy S, Chauvet JP, Boullanger P and Coulet PR, 2003. *BBA- Biomembranes*, vol.1617, pp.39-51
- Gigerreverdin S, 1995. *Animal Feed Science and Technology*, vol.55, pp. 295-334, Katchalski-Katzir E., Kraemr DM, 2000. *J. Mol. Catalysis* vol. 10, pp. 157-176
- Langmuir I, 1917. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 39, pp. 1848-1906
- Marsh D, 1996. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, Vol. 1286, pp 183-223
- Oliveira Jr. ON, Dos Santos Jr. DS, Balogh DT, Zucolotto V and Mendonça CR, 2005. *Advances in Colloid and Interface Science*,. vol.116, pp.179-192
- Schmidt F.,Caseli L., et al., 2008, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, vol. 1778, pp. 2291

THIN FILMS FOR APPLICATIONS IN ENERGY AND IN ENZYMATIC BIOCATALYSIS HYDROLYSIS OF CANE SUGAR BAGASSE

Abstract. *In this study, the molecular level investigation to obtain a source of renewable energy (clean) by enzymatic hydrolysis of cane sugar bagasse using enzymes as catalysts that degrade cellulose to sugars lower, allowing the subsequent conversion to ethanol, was carried out. For that, enzymes involved in hydrolysis of cellulose and in the identification of fermented to ethanol were immobilized as ultrathin films by the Langmuir-Blodgett technique. With related detection techniques, electrical and optical, molecular level information may be reached. Phospholipids were employed as auxiliary matrix for the immobilization of enzymes, which were injected into the aqueous subphase of phospholipid monolayers organized on the air-water interface. The evaluation of the adsorption of the enzyme was done by obtaining surface pressure-area isotherms, adsorption kinetics, and vibrational spectra. The films were transferred to solid supports using the Langmuir-Blodgett technique and characterized by spectroscopic methods. The results will be evaluated from the perspective of sustainability in the economic, social and environmental point of view.*

Keywords: *Energy, Biomass, Sustainability*