

## **EFEITO DA INCORPORAÇÃO DA ENZIMA CELULASE E DOS FATORES ABIÓTICOS NA BIODEGRADAÇÃO AERÓBIA DO PEBD**

L. Alban, G. M. Miranda, J. P. Pires, G. L. de Souza, F. S. de Fraga, R. Lourega, R. A. Ligabue, J. E. A de Lima  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
gabriela.messias@acad.pucrs.br

### **RESUMO**

*Tendo em vista que a adição de biomoléculas aos polímeros sintéticos e a exposição dos mesmos a fatores abióticos (UV e umidade) podem promover a biodegradação, foi produzido um biocompósito de PEBD (Braskem) com 4% m/m da enzima celulase (Sigma Aldrich). O ensaio de envelhecimento acelerado foi conduzido em uma câmara QUV (QLAB) sob as condições do Ciclo 1 da ASTM G154-16 durante 1000 h (triplicata). A avaliação da biodegradação aeróbia em solo foi realizada sob as condições da norma ASTM D5988-12 durante 56 dias a 30°C ± 2 °C. Amido de milho foi utilizado como controle positivo. Os resultados da respirometria sugerem que a incorporação da celulase promove a biodegradação do PEBD. Ainda que a amostra de PEBD/celulase envelhecida tenha apresentado um comportamento similar à amostra não envelhecida até 51 dias, foi observado uma tendência de aumento na produção de CO<sub>2</sub> a partir do último ponto obtido (56 dias).*

**Palavras-chave:** celulase, intemperismo, PEBD, biodegradação.

### **INTRODUÇÃO**

Polietilenos de baixa densidade (PEBD) são polímeros termoplásticos compostos de monômeros de etileno amplamente utilizados na produção de embalagem e sacolas plásticas devido às suas características de leveza, de baixo custo e durabilidade <sup>(1,2)</sup>. Entretanto, o uso descontrolado deste plástico tem levantado à questão do descarte incorreto do mesmo e da poluição do meio ambiente <sup>(3)</sup>.

O PEBD, entretanto, é um polímero resistente ao ataque de microrganismos devido ao seu alto peso molecular e estrutura de cadeia longa <sup>(4)</sup>. Neste sentido, diferentes abordagens vêm sendo conduzidas a fim de

auxiliarem na degradação de PEBDs, como a incorporação de biomoléculas como enzimas e peptídeos, que visam à modificação da cadeia dos mesmos <sup>(2)</sup>. Ainda, estudos indicam que enzimas são capazes de degradar PEBD <sup>(1)</sup> devido a clivagem das cadeias do polímero em monômeros <sup>(5)</sup>.

A celulase é uma enzima multicomponente produzida principalmente por fungos, bactérias e protozoários <sup>(6)</sup>, capaz de catalisar reações de quebra <sup>(7)</sup>, se mostrando como uma ferramenta interessante no estudo da biodegradação de polímeros como polietilenos. Além disso, fatores ambientais, como luz, calor, umidade são conhecidos por causarem alterações físicas e químicas na estrutura de polímeros, desempenhando um papel significativo na decomposição biológica dos mesmos <sup>(3,5)</sup>. Assim, a avaliação do comportamento de materiais poliméricos frente a estes fatores é de grande interesse.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho é avaliar o comportamento de biodegradação de PEBD com incorporação da enzima celulase antes e após o envelhecimento acelerado do mesmo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

A produção do biocompósito de PEBD/enzima celulase foi conduzida pela adição de 4% em massa da Enzima Celulase (produzida pelo fungo *Aspegillus Niger*, Sigma Aldrich) ao PEBD, a qual foi denominada PEC. A mistura foi realizada em um Rheomix OS Haake acoplado a unidade motriz PolyLab OS Rheodrive 7 da Thermo Scientific, sob as condições de 60 rpm e temperatura de 150°C. Filmes de PEBD puro e PEBD/celulase foram obtidos em uma prensa hidráulica da marca Marconi, com capacidade de 15 ton. Os filmes com aproximadamente 0,2 mm de espessura foram obtidos por prensagem entre placas de aço, na temperatura de 110 °C e uma carga de 3 ton por 2 minutos.

### Ensaio de envelhecimento acelerado

Para o ensaio de envelhecimento acelerado da amostra PEC, utilizou-se uma Câmara de Envelhecimento Acelerado QUV spray (QLAB) sob as condições do Ciclo 1 da ASTM G154-16. Os filmes produzidos (95 mm x 65 mm) foram irradiados com lâmpadas UVA provendo uma irradiância de 0,89 W/cm<sup>2</sup>

(a 340 nm) com ciclos intervalados de 8 h de radiação e temperatura de 60°C e 4 h com spray de água potável, a 40°C e umidade relativa de 50%. As amostras PEC foram expostas durante 1000 h e em triplicata, resultando em amostras denominadas PEC1000h.

### Caracterização

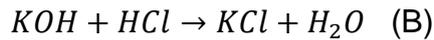
Antes e após o ensaio o envelhecimento acelerado as amostras foram caracterizadas em relação a degradação térmica e as características estruturais conforme seguem os itens, respectivamente:

- Análise Termogravimétrica (TGA): a avaliação da estabilidade térmica das amostras foi realizada em equipamento SDT, modelo Q600 (TA Instruments) utilizando taxa de aquecimento de 10 °C/min, da temperatura ambiente até 600 °C sob atmosfera de gás nitrogênio. A análise foi realizada em triplicata.
- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR): a análise de espectroscopia de infravermelho foi realizada a fim de investigar a presença de grupos funcionais na estrutura molecular do polímero antes e após envelhecimento. Para esta análise utilizou-se o equipamento Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR Spectrometer e a aquisição do espectro foi feita com o acessório de amostras UATR (acessório de refletância atenuada total universal) no intervalo de número de onda de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>.

### Ensaio de Biodegradação

O ensaio de biodegradação aeróbia da biocompósito PEBD/celulase foi conduzido durante 56 dias em estufa microbiológica com temperatura controlada de 30°C ± 2°C. A avaliação da biodegradação foi realizada segundo as condições da norma ASTM 5988-12, utilizando-se soluções de KOH 0,5N e HCl 0,25N na proporção de 500 g de solo (mistura em três partes iguais de areia, terra vermelha e esterco bovino) para 1 g de amostra. Foi necessário um sistema com um material de referência (amido de milho) e um de PE/celulase não

envelhecido para fins de avaliação da qualidade do solo e comparação, respectivamente. A análise elementar dos materiais foi realizada em um Analisador Elementar TruSpec CHN da LECO, a fim de quantificar o percentual de carbono de cada amostra e calcular o CO<sub>2</sub> teórico produzido por meio da estequiometria das reações envolvendo as Equações A, B, C e D.



$$mg \text{ de } CO_2 = \frac{(0,05N) \times ml \text{ HCl} \times 44}{2} \quad (C)$$

$$\% \text{ Biodegradação} = \frac{mg \text{ } CO_2 \text{ produzido}}{mg \text{ } CO_2 \text{ teórico}} \quad (D)$$

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados referentes a caracterização dos materiais produzidos e ao ensaio de biodegradação estão apresentados nos itens a seguir.

### Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 1a apresenta os termogramas (TG) e a Figura 1b apresenta as derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) para Celulase, PEBD, PEBD modificado com celulase (PEC) e PEBD modificado com celulase envelhecido por 1000h (PEC 1000h).

A Figura 1 mostra que as curvas de degradação térmica da celulase e do PEBD ocorrem em uma etapa, entre 250 e 400 °C e entre 400°C e 500°C, respectivamente. A degradação do biocompósito PEC apresenta duas etapas de degradação entre 200 e 400 °C e entre 400°C e 500°C, referentes a degradação da celulase ao PEBD. Este resultado indica que a celulase foi efetivamente incorporada na amostra PEC.

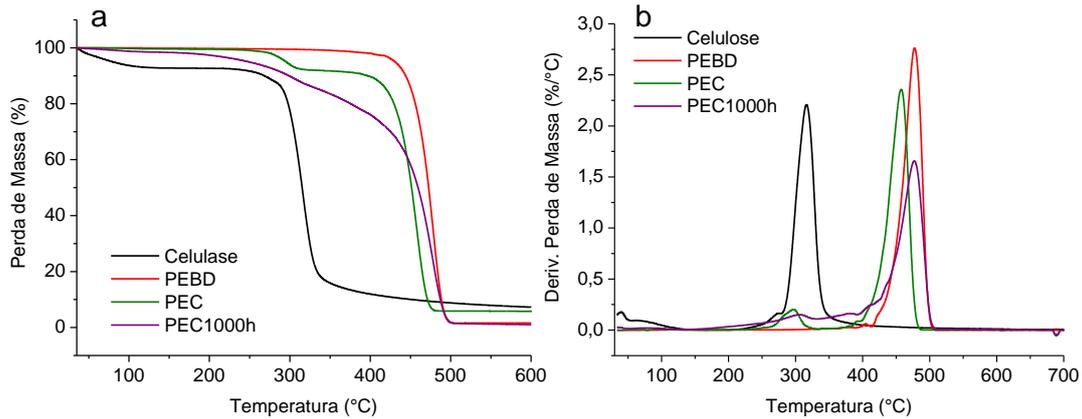


Figura 1- Curvas de a) TG e b) DTG de Celulose, PEBD, PEC e PEC1000h.

A curva de degradação de PEC1000h apresenta uma etapa de degradação de 250°C e 500 °C, compreendendo a degradação da enzima e do polímero PEBD. Observa-se, entretanto, um alargamento da primeira etapa de degradação devido aos compostos voláteis gerados durante o processo de envelhecimento.

### Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 2 apresenta os espectros de infravermelho obtidos para Celulose, PEBD, PEC e PEC1000h.

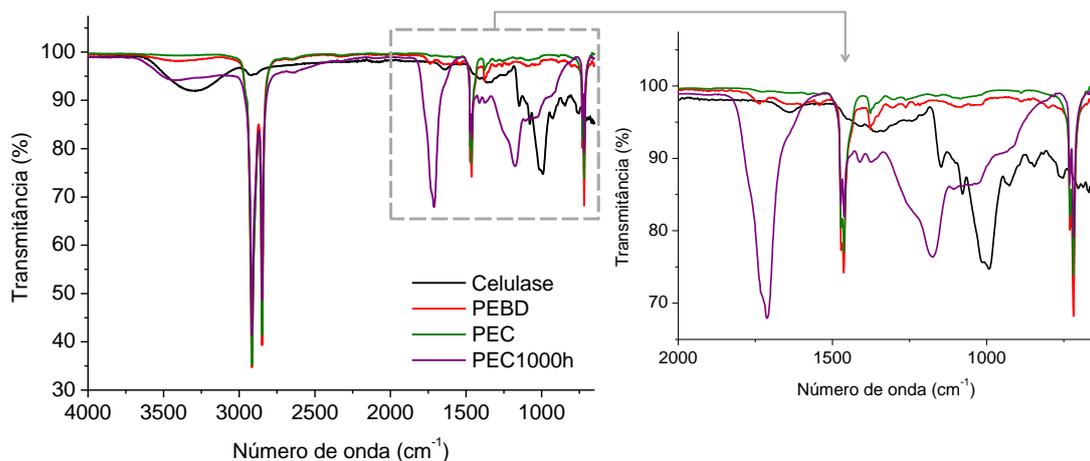


Figura 2 - Espectros de infravermelho obtidos para Celulose, PEBD, PEC e PEC1000h.

Os espectros obtidos para a amostra de PEBD mostram a presença de bandas em 2916 e 2844  $\text{cm}^{-1}$  correspondente às ligações C-H alifáticos; em 1464  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a deformação angular de cadeia das ligações  $-(\text{CH}_2)_n$ , sendo  $n>3$ ; em 1377  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente deformação angular da ligação  $-\text{CH}_3$ ; e em 718  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a deformação angular de cadeia das ligações  $-(\text{CH}_2)_n$ , sendo  $n>3$ . Os mesmos espectros são encontrados nas amostras PEC e PEC1000h.

A Figura 2 mostra a presença de uma banda entre 3000 e 3400 $\text{cm}^{-1}$  referentes a grupamentos  $\text{NH}_2$  and OH da celulase <sup>(8,9)</sup>. O pico em 1650  $\text{cm}^{-1}$  é referente a amida <sup>(8)</sup>. Ainda, foram observadas bandas na enzima em 840, 990, 1080 e 1152  $\text{cm}^{-1}$ , já referenciadas anteriormente na literatura <sup>(9)</sup>.

O espectro da amostra PEC mostra o surgimento de uma banda fraca alargada entre 3000 e 3400  $\text{cm}^{-1}$  referente a celulase, também observada em PEC1000h. O sinal fraco pode estar relacionado a baixa concentração de enzima no biocompósito, chegando próximo ao limite de detecção do equipamento.

Já o espectro de PEC1000h mostra o surgimento de uma banda forte entre em 1710  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao grupamento C=O de ácidos carboxílicos e outra em 1182  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupamento C-O, ambas provenientes do processo de envelhecimento do biocompósito <sup>(10, 11)</sup>.

### **Ensaio de Biodegradação**

A Figura 3 mostra as curvas de degradação obtidas para as amostras PEBD, PEC, PEC1000h e as referências de solo e amido.

A Figura 3 mostra que as curvas de PEBD e PEC1000h apresentam mineralização negativa, comportamento já relatado na literatura para polímeros não biodegradáveis como o PEBD, devido a barreira física oferecida pelo filme polimérico que limita a distribuição de carbono e nutrientes para os microrganismos <sup>(12)</sup>.

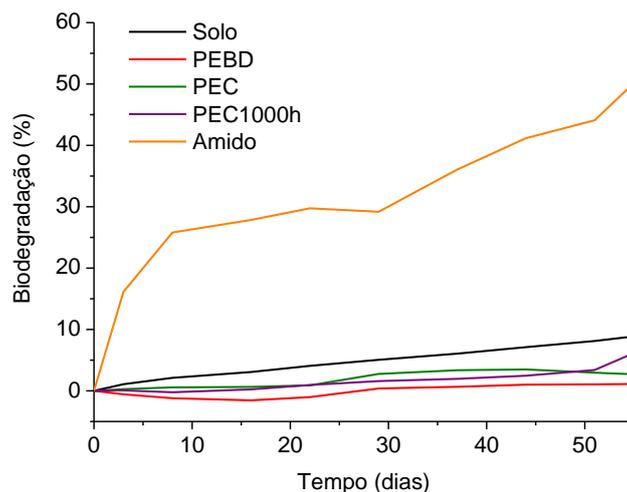


Figura 3 -Curvas de degradação de PEBD, PEC, PEC 1000h e referências de solo e amido.

A curva de degradação para PEBD mostra uma mineralização negativa do mesmo durante todo o período testado. Trabalhos reportados na literatura obtiveram valores de degradação de PEBD iguais a 8% após 45 dias de teste <sup>(12)</sup>, e 7,6% após 126 dias <sup>(5)</sup>.

Já as curvas de degradação de PEC e PEC1000h mostraram que a adição da enzima na matriz do PEBD facilita a permeação de oxigênio no material e disponibiliza uma melhor fonte de nutrientes para os microrganismos do solo, uma vez que o biocompósito não apresentou uma mineralização negativa, indicando que a incorporação da celulase promove a biodegradação do PEBD.

Em relação a amostra PEC envelhecida por 1000h, não foi possível perceber uma variação expressiva na curva de biodegradação em relação a mesma amostra não envelhecida até 50 dias de teste. Porém, a partir deste período, foi observado uma tendência de aumento na produção de CO<sub>2</sub>, comportamento o qual deve ser melhor estudado.

## CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou o comportamento de biodegradação de PEBD com incorporação da enzima celulase antes e após o envelhecimento acelerado do mesmo. As curvas de degradação indicaram que a incorporação da celulase promove a biodegradação do PEBD. Mais estudos devem ser conduzidos em

relação a amostra envelhecida, porém os resultados obtidos até o momento mostraram que a combinação de PEBD e celulase se apresenta como um objeto de estudo atrativo na biodegradação de polímeros.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pelas bolsas concedidas e à empresa Brasilata pelas bolsas e materiais concedidos para realização do trabalho.

## REFERÊNCIAS

- (1) MEHMOOD, C. T., QAZI, I. A., HASHMI, I., BHARGAVA, S. AND DEEPA, S. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) modified with dye sensitized titania and starch blend using *Stenotrophomonas pavanii*. Intern. Biodet. and Biodeg., v. 113, p. 276–286, 2016.
- (2) SKARIYACHAN, S., PATIL, A. A., SHANKAR, A., MANJUNATH, M., BACHAPPANAVAR, N. AND KIRAN, S. Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. Polym. Degrad. and Stab., v. 149, ~~n. November 2017~~, p. 52–68, 2018.
- (3) KALE, S. K., DESHMUKH A. G., DUDHARE, M. S. AND PATIL, V. B. Microbial Degradation of Plastic: a Review. J. Bioc.Tech., v. 6, n. 2, p. 952–961, 2015.
- (4) HADAD, D.; GERESH, S.; SIVAN, A. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. J. App. Microb., v. 98, n. 5, p. 1093–1100, 2005.
- (5) ESMAEILI, A., POURBABAE, A. A., ALIKHANI, H. A., SHABANI, F. AND ESMAEILI, E. Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by Mixed Culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in Soil. PLoS ONE, v. 8, n. 9, p. 1-10, 2013.
- (6) ZHANG, X.-Z.; ZHANG, Y.-H. P. Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications. Bioproc. Tech. in Bioref. for Sustain. Prod. of Fuels, Chem. and Polym., p. 131–146, 2013.
- (7) AHIRWAR, R., SHARMA, J. G., NAHAR, P. AND KUMAR, S. Immobilization studies of cellulase on three engineered polymer surfaces. Biocat. and Agric.Biotech., v.11, p. 248-251, 2017.
- (8) MISHRA, A.; SARDAR, M. Cellulase assisted synthesis of nano-silver and gold: Application as immobilization matrix for biocatalysis. Intern. J. of Biolog. Macromol., v. 77, p. 105–113, 2015.

(9) POORAKBAR, E., SHAFIEE, A., SABOURY, A. A., RAD, B. L., KHOSHNEVISAN, K., MA'MANI, L., DERA KHSHANKHAH, H., GANJALI, M. R. AND HOSSEINI, M. Synthesis of magnetic gold mesoporous silica nanoparticles core shell for cellulase enzyme immobilization: Improvement of enzymatic activity and thermal stability. *Proc. Biochem.*, v. 71, p. 92–100, 2018.

(10) GEWERT, B.; Plassmann, M.; Macleod, M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci.: Proc. & Imp.*, v. 17, p. 1513-1521, 2015.

(11) PEIXOTO, J.; Silva, L.; Krüger, R. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. *J. Haz. Mat.*, v. 324, Parte B, p. 634-644, 2017.

(12) CASTRO-AGUIRRE, E., AURAS, R., SELKE, S., RUBINO, M. AND MARSH, T. Insights on the aerobic biodegradation of polymers by analysis of evolved carbon dioxide in simulated composting conditions. *Polym. Degrad. and Stab.*, v. 137, p. 251–271, 2017.

## **INCORPORATION EFFECT OF CELLULASE ENZYME AND ABIOTIC FACTORS IN AERODE BIODEGRADATION OF LDPE**

### **ABSTRACT**

*Since the addition of biomolecules to synthetic polymers and their exposure to abiotic factors (UV and moisture) may promote biodegradation, a bio-compound of LDPE (Braskem) with 4% w/w of the cellulase enzyme (Sigma Aldrich) was elaborated. The accelerated aging test was conducted on a QUV camera (QLAB) under the conditions of Cycle 1 of ASTM G154-16 for 1000 h (triplicate). The evaluation of aerobic biodegradation in soil was performed under the conditions of ASTM D5988-12 for 56 days at 30°C ± 2 °C. Corn starch was used as a positive control. The results of respirometry suggest that the incorporation of cellulase promotes the biodegradation of LDPE. Although the sample of aged LDPE/cellulase presented a behavior similar to the sample not aged up to 51 days, a tendency of increase in CO<sub>2</sub> production from the last obtained point (56 days) was observed.*

**Keywords:** cellulase, weathering, LDPE, biodegradation.