

## PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS IMOBILIZADAS NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Mirna dos Santos Nery<sup>1</sup>; Michely Correia Diniz<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas.

<sup>1</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF – Petrolina/PE – Brasil  
mirna.nery@discente.univasf.edu.br

<sup>2</sup>Colegiado de Ciências Biológicas

<sup>2</sup>Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF – Petrolina/PE – Brasil  
michely.diniz@univasf.edu.br

### Resumo

*O bioetanol tornou-se uma alternativa para reduzir problemas ambientais e energéticos devido à escassez, aumento dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição que eles geram. Tecnologias que aumentem o desempenho da produção de bioetanol tornam-se fundamentais no mundo. Nesse cenário a imobilização enzimática, traz um diferencial para a produção de etanol lignocelulósico ao conferir as enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose uma maior estabilidade, flexibilidade no projeto de reatores, maior versatilidade na etapa da separação, um uso mais eficiente do catalisador. Desta forma, esta prospecção teve a finalidade de delinear um cenário nacional e internacional de pedidos de patentes relacionados às tecnologias de imobilização enzimática aplicada a produção de bioetanol por meio de análises dos bancos de dados INPI, WIPO e EPO. Para isso, foram usadas as palavras-chave "enzima", "imobilização", "etanol" e uma busca relacionando os três termos. Para buscas com os termos relacionados, o INPI se destacou com 4276, seguido pelo EPO (318) e WIPO (3). Entretanto, na análise temporal do banco nacional apresentou decréscimo na média de pedidos anuais. A partir dos dados evidenciados nesta prospecção, foi possível concluir que os estudos associados a enzimas são amplos e abundantes, entretanto a área de imobilização enzimática aplicada à produção do bioetanol precisa ser mais estimulada.*

**Palavras-chave:** hidrólise enzimática; biocombustível; patentes.

### 1 Introdução

O bioetanol se tornou uma alternativa para reduzir problemas ambientais e energéticos no mundo devido à escassez e aumento dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição que eles geram. Quando comparado aos combustíveis fósseis, este traz como vantagem a característica de ser uma fonte renovável de energia, e contribuir para a redução das emissões de dióxido de carbono. Nesse cenário, tecnologias que proporcionem um maior desempenho da produção de bioetanol ganham importância fundamental no país (PACHECO, 2011)

Em 2020, o Brasil alcançou a maior produção de etanol da história, registrando um total de 35,6 bilhões de litros oriundos da cana-de-açúcar e do milho. Isso representa um aumento de 7,5%

em comparação a 2018/19 (CONAB, 2020). Nesse sentido, algumas iniciativas tem buscado explorar outros substratos para esta produção, como uma forma de reduzir os impactos associados à produção de grãos.

Uma dessas alternativas é a produção de bioetanol de 2ª geração, também chamado de etanol lignocelulósico (CARVALHO, 2011). Esta tecnologia faz uso do bagaço e parte das palhas e pontas da cana-de-açúcar em sua produção, aumentando o rendimento de álcool em 30 a 40%, reduzindo, conseqüentemente, a necessidade de área plantada (PACHECO, 2011).

Diversas são as rotas tecnológicas para produção de etanol lignocelulósico, sendo uma delas a separação da hemicelulose através da hidrólise enzimática (PANDEY et al., 2000). Todavia, para alcançar a produção ideal de glicose são necessárias altas concentrações de enzima, o que acaba tornando o processo economicamente desvantajoso, evidenciando um dos principais impecilhos na produção do etanol de segunda geração (EKLUND et al., 1990).

Por isso, o aprimoramento de tecnologias que levem ao aperfeiçoamento da hidrólise enzimática da celulose faz-se cada vez mais necessário, e a imobilização enzimática entra nesse cenário como um diferencial para a produção do etanol através da hidrólise da celulose, por conferir as enzimas uma maior estabilidade, flexibilidade no projeto de reatores, maior versatilidade na etapa da separação, desenvolvimento de sistemas contínuos e um uso mais eficiente do catalisador através de reutilizações (VILLENEUVE et al., 2000, DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Segundo Oliveira et al., (2005), o desenvolvimento de um país pode ser mensurado de acordo com o número de patentes concedidas tanto em seus bancos nacionais quanto em outros países, principalmente os desenvolvidos. Isso porque a informação de patentes é um insumo à atividade de pesquisa e desenvolvimento, e por tanto, acompanha o crescimento econômico e tecnológico de um país.

Esse trabalho visou realizar uma prospecção tecnológica de patentes associadas às tecnologias de imobilização enzimática aplicada a produção de bioetanol

## 2 Metodologia

A prospecção foi feita com base nos pedidos de patentes depositados em bases de dados nacionais e internacionais, no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual - INPI; no European Patent Office - EPO, e no World Intellectual Property Organization - WIPO. A coleta de dados foi realizada em Julho de 2021, num intervalo de 10 anos (2012-2021), e foram usados diferentes métodos de busca de acordo com o banco de dados.

Em cada base de dados foram realizadas quatro pesquisas com cada palavra-chave escolhida. Os termos utilizados na busca foram: **enzima, imobilização, bioetanol** e a última busca relacionando os termos **enzima, imobilização e etanol**, a fim de ter um resultado amplo de pedidos de patentes relacionadas à energia produzidas através de hidrólise por enzimas imobilizadas. Nos bancos de dados internacionais os termos foram: *enzyme, immobilization, ethanol* e *bioethanol* por último estes mesmos termos associados.

Os resultados foram organizados em planilhas em Excel, e processados através de análises descritivas percentuais, sendo apresentados em tabelas e gráficos.

## 3 Resultados e Discussão

Os pedidos de patente que foram localizados a partir das palavras-chave, nos bancos de dados nacional e internacionais, foram discriminados na Tabela 1.

Uma grande quantidade de patentes foi encontrada através da busca do termo *enzyme* (enzima), com predominância na WIPO (1.372.974), seguido pelo EPO (+10.000) e por último o INPI (829). Para o termo *immobilization* (imobilização), foram encontrados 196 pedidos de patentes no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI, 162.737 pedidos no EPO e 180.703 pedidos no WIPO. Possivelmente, a grande quantidade de resultados esteja relacionada ao fato da palavra ser muito genérica, ou seja, comum a diversos setores.

O terceiro termo buscado em todos os bancos de dados foi *bioethanol* (**bioetanol**), que resultou em 38, 9.924 e 11.113 pedidos de patentes para os bancos de dados INPI, EPO e WIPO respectivamente, demonstrando o menor resultado dentre os termos escolhidos.

Para a pesquisa de termos relacionados obtivemos o maior número de pedidos registrados na base nacional de dados, INPI, com um total de 4276 pedidos de patentes com termos relacionados às palavras-chave, contra 3 resultados no WIPO e 318 no *European Patent Office* (EPO).

Tabela 1 – Distribuição das patentes nas plataformas INPI, EPO, WIPO.

	<b>Enzima/enzyme</b>	<b>Imobilização/ immobilization</b>	<b>Bioetanol/ Bioethanol</b>	<b>Enzima, imobilização e bioetanol/ enzyme, immobilization, bioethanol</b>
<b>INPI</b>	829	196	38	4276
<b>EPO</b>	1.125.830	162.737	9.924	318
<b>WIPO</b>	1.373.427	180.703	11.113	3
<b>TOTAL</b>	2.500.086	343.636	21075	4596

Fonte: Autoria própria (2021).

Dessa forma, foram contabilizados mais de 2.800.000 documentos na prospecção, sendo boa parte destes encontrados na busca pela palavra enzima (*enzyme*). Entretanto, destaca-se que as buscas podem ser superestimadas, devido a possibilidade de sobreposição entre os registros presentes nestes bancos de dados, como pode ser observado quando comparado o resultado da palavra “enzima” (mais genérica) às palavras associadas.

Quando a busca ficou mais restrita, e próxima do tema em questão, 4596 pedidos de patentes estavam relacionados a *enzyme immobilization bioethanol* (*Enzima imobilização bioetanol*) no EPO, INPI e WIPO. Estes foram reunidos e analisados quanto à distribuição por país, ano de publicação e Classificação Internacional de Patente (CIP).

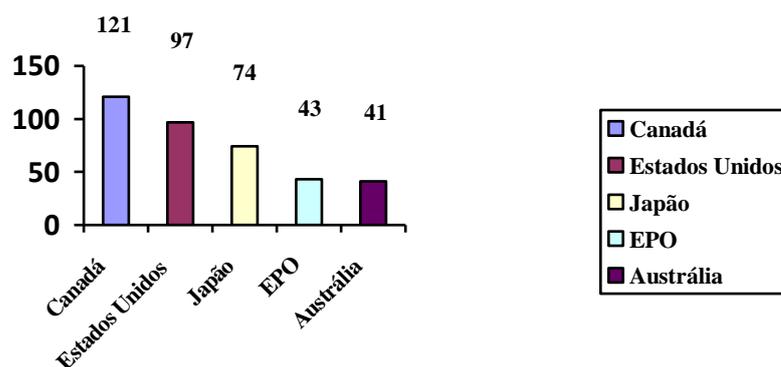
Tais resultados sugerem que as pesquisas relacionadas a enzimas são abundantes, entretanto, quando associadas à técnica de imobilização e a produção de bioetanol, estas ainda são escassas.

### 3.1 Distribuição de patentes por país

Analisando somente os dados do EPO, o país que apresentou o maior número de patentes relacionadas a enzimas imobilizadas e associadas ao bioetanol foi o Canadá 121 (38%), seguido do depósito de 97 (30%) pedidos realizados nos Estados Unidos, e 74 (23%) por meio do Japão, como representado na Figura 1.

Entretanto, por se tratar de um banco de dados internacional, muitos pedidos estão depositados em mais de um país, como é o caso dos Estados Unidos e Canadá, que apresentaram 183 pedidos em comum. Por tanto, a soma dos pedidos por país, pode ultrapassar o número de patentes encontradas para buscador, uma vez que estas possivelmente estão sobrepostas.

Figura 1 – Distribuição de patentes por país



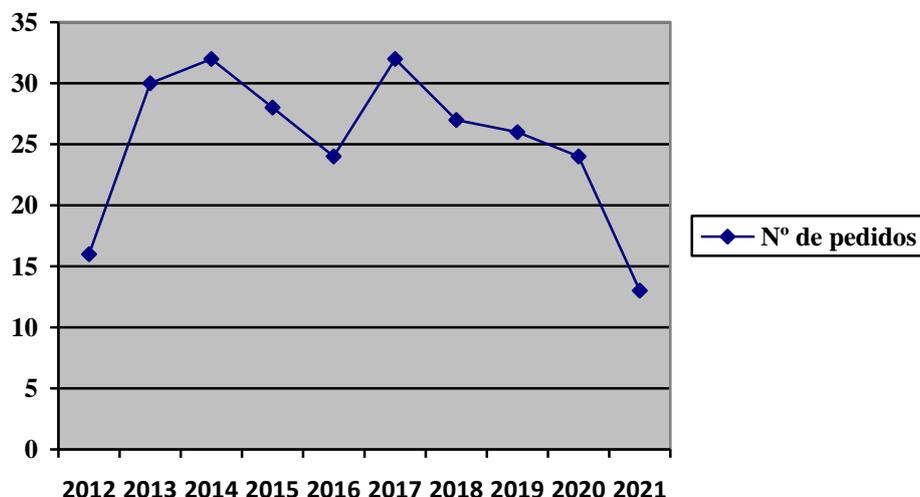
Fonte: Autoria própria (2021)

O banco de dados nacional INPI apresentou um total de 4276 pedidos de patentes, que representa mais de 10 vezes o número de pedidos registrados no EPO (318). Isso se deve provavelmente ao fato do Brasil possuir vantagens competitivas em relação aos outros países na produção do etanol de segunda geração, pois apresentar o menor custo além de disponibilidade de matérias-primas (PACHECO, 2011).

### 3.2 Ano de publicação das patentes

Tomando como parâmetro um intervalo de 10 anos (2012-2021), o banco de dados internacional com maior número de pedidos de patentes registrado nesse período foi o EPO. A análise temporal dessas patentes mostra os pedidos desde 2012 a 2021, sendo os anos de 2014 e 2017, os com os maiores números, somando 64 pedidos de um total de 250 para esse período, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Disposição temporal de pedidos de patente depositados no EPO.



Fonte: Autoria própria (2021).

Percebe-se que a partir de 2012 houve um crescimento elevado com ápice em 2014, mas diminuiu de 2015 a 2016, e de 2018 até 2021 como está representado na Figura 2. Nesse intervalo, a maior baixa de pedidos (excetuando-se 2021 que ainda não foi concluído) ocorreu em 2016 e 2020, que apresentaram apenas 24 pedidos cada.

Este índice elevado de pedidos entre 2013 e 2017 pode estar associado ao aumento constante no valor do combustível no fim de 2013 (CHOUCAIR; RIBAS, 2013), levando à ampliação de estudos para busca de fontes renováveis e alternativas mais sustentáveis para produção de combustível.

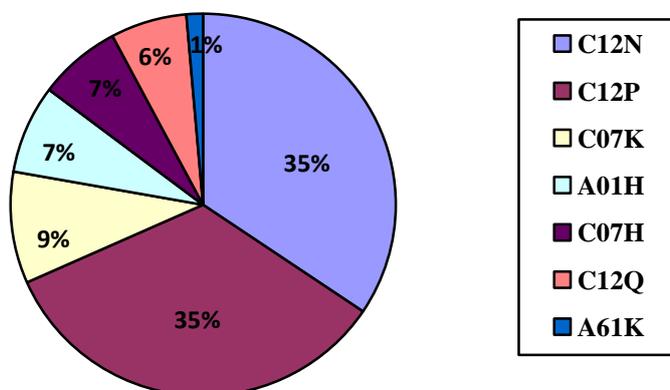
Já a queda, na perspectiva do Brasil, pode estar conectada às crises econômicas que tem acontecido desde 2015, que afetaram tanto os investimentos em educação e pesquisa, quanto à produção industrial, bem como a pandemia de Covid-19 que se iniciou em 2020 e dificultou as atividades das instituições, indústrias e universidades. Além disso, à especificidade técnica e os custos associados ao processo podem ter levado ao desinteresse na área.

### 4.3 Classificação Internacional de Patentes (CIP)

O sistema de classificação internacional- CIP, foi estabelecido através do Acordo de Estrasburgo em 1971 e este tem como objetivo sistematizar a classificação de patentes de forma hierárquica. Para isso, foram constituídos símbolos independentes da, nos quais as áreas tecnológicas são separadas em classes de A a H. Essa sistema se resume em 8 seções e 70000 subdivisões para grupos principais e grupos (SERAFINI et al., 2012).

Com base nesse sistema, as patentes encontradas foram divididas nas seções C (Química; Metalúrgica), A (necessidades humanas) e D (têxteis; papel), sendo a secção C a mais representativa, com um somatório de 299 pedidos. Dentre as 10 subsecções mais representativas, destacam-se 3, sendo estas: C12N (microorganismo ou enzimas) apresentando 218 (35%) resultados, seguida da C12P ( processos de fermentação ou utilização de enzimas) com 215 (35%) resultados e por fim a C07H (9%) (açúcares e derivados; nucleosídeos, nucleotídeos e ácidos nucléicos) com 86 resultados como demonstrado na Figura 3.

Figura 3 – Distribuição das subsecções das patentes mais representativas do EPO.



Fonte: Autoria própria (2021).

Estes resultados, confirmam que as pesquisas relacionadas a enzimas são abundantes, mas a utilização destas com a técnica de imobilização para a produção de bioetanol ainda são reduzidas.

O depósito de patente número BR 112020026979-4 A2, que tem como título **CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE QUE EXPRESSAM ENZIMAS GLUCOAMILASE E XILANASE EXÓGENA E SEU USO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**, inventada por Georges Pignede; Maud Petit; Benoît Thomas; Sébastien Hulin, e depositada em 2019 por Lesaffre Et Compagnie. Possui classificação IPC C07K 14/9; C12N 1/18; C12N 15/51; C12P 7/06.

Esta invenção descreve as cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* que são geneticamente modificadas para coexpressar um gene que codifica uma glucoamilase de origem fúngica, um gene que codifica uma glucoamilase de *Saccharomyces cerevisiae* var. diastaticus, e um gene que codifica uma xilanase de origem fúngica. Com a utilização destas cepas, o rendimento na produção de bioetanol pode ser aumentado quando comparado ao das cepas que são idênticas. Esta invenção também apresenta uma maneira de obtenção dessas leveduras e o seu uso na produção de bioetanol.

O depósito BR 11 2020 010897 9 A2, denominado **MÉTODO PARA PRODUZIR BIOETANOL PELA TÉCNICA ENZIMÁTICA USANDO BIOMASSA CELULÓSICA COMO MATÉRIA-PRIMA**, trata da produção de etanol lignocelulósico, com método adaptado para aumentar a concentração de etanol de um líquido de fermentação e reduzir a carga de destilação, através da hidrólise enzimática da celulose contida na biomassa.

Esta invenção foi criada por Takashi Nishino, Noriaki Izumi, Hironori Tajiri, Shoji Tsujita, Asuka Oda, Manabu Masamoto e Yusuke Waratani, depositada em 2018 por Kawasaki Jukogyo Kabushiki Kaisha (JP), e possui classificação IPC C12P 7/10; C12P 19/02; C12N 9/24.

BR 10 2013 027182-9 A2, de título **PROCESSOS DE IMOBILIZAÇÃO DE SUBSTRATO ENZIMÁTICO EM PARTÍCULAS MAGNÉTICAS E SUA UTILIZAÇÃO NA PURIFICAÇÃO, ISOLAMENTO, EXTRAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE ENZIMAS**, descreve uma metodologia para utilização de partículas magnéticas revestidas e ativadas como suporte para imobilização de enzimas. Este processo tem como finalidade, a purificação, isolamento, extração e/ou separação de enzimas de uma amostra com contaminantes, permitindo assim sua reutilização.

Esta tecnologia foi criada por Ana Lucia Figueiredo Porto, Carolina de Albuquerque Lima Duarte, Jackeline da Costa Maciel, José Manoel Wanderley Duarte Neto e Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, e foi depositado em 2013 por José Manoel Wanderley Duarte Neto e possui classificação IPC C12P 1/00.

Dentre os depósitos de patentes associados aos termos enzima, imobilização e bioetanol depositadas no INPI, foram encontradas também patentes concedidas. Dentre elas, destacamos BR 10 2012 005230 0 B1, de título **PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DO PSEUDOCALULE DE BANANEIRA COM HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E USO DO MESMO, E CLASSIFICAÇÃO C12P 7/08**.

Esta invenção se refere a uma forma de produção de bioetanol a partir do pseudocalule de bananeira, através da hidrólise enzimática. Nesse processo foi empregado o pré-tratamento com ácidos combinado a explosão a vapor e hidróxido de sódio, com posterior hidrólise enzimática da biomassa através de enzimas celulasas, realizada em banho de ultra-som ou banho com agitação.

Observa-se, portanto, que os processos que estão sendo desenvolvidos através do uso de tecnologia de imobilização enzimática são promissores e podem ser uma alternativa para alavancar o setor de produção do etanol lignocelulósico.

## 5 Considerações Finais

A partir dos dados evidenciados nesta prospecção, foi possível concluir que os estudos associados a enzimas são amplos e abundantes, entretanto a área de imobilização enzimática aplicada à produção do bioetanol precisa ser mais estimulada. Esse fato é corroborado pela quantidade reduzida de pedidos de patente registrados nos bancos de dados internacionais (EPO e WIPO), além das categorias de classificação IPC das patentes encontradas nas buscas para os termos associados.

O decréscimo na média de pedidos de patentes anuais é também preocupante, e mostra uma necessidade emergente de investimento em pesquisas relacionadas ao tema, principalmente para o Brasil, que se caracteriza como um potencial produtor de bioetanol.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OLIVEIRA, L. G. et al. Informação de Patentes: ferramenta indispensável para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v. 28, S36-S40. 2005.
- PACHECO, T. F. et al. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? *Circular Técnica*, **04**, Brasília, v. 1, versão eletrônica, p. 1-6, abril. 2011.
- ABRAS, A. et al. Covalent attachment of trypsin on plasma polymerized allylamine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Londres, v. 73, n. 15, p.315-324, jun. 2009.
- ALLAN, E. D. et al. Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *Journal of biotechnology*, Bielefeld v. 152, n. 18, p.395-407, abr. 2006.
- ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, v. 39, n. 2, p. 23-39, 1998.
- BASSETTI, F. J. **Caracterização da Invertase Imobilizada em Sílica de Porosidade Controlada e sua Aplicação em Reator de Leito Fixo e Fluidizado**. M. Sc. Thesis, Universidade Estadual de Londrina, 1995.
- CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; OLIVEIRA, E.A.; CARVALHO-JR, L.B. Immobilization of protein on ferromagnetic dacron. *Applied Biochem Biotechn*, v. 31, p. 53-58, 1991.
- CARVALHO, M. L. Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-Açúcar. UFSCAR. 2011.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia Enzimática. 2008
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2021. Disponível em <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> Acesso em 18 jul. 2021.
- CONTIERO, J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por *Kluyveromyces bulgaricus***. Campinas: UNICAMP, 1992. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1992.
- EKLUND, R; GALBE, M; & ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12(June 1988), 1988–1991.

FILHO, M. T. L.; Produção de etanol combustível primeira e segunda geração a partir de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora* (sw.) dc.). Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, p. 121, 2020.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M.; **J. Mol. Catal. B: Enzym.** 2000, *10*,157.

LÓPEZ-GALLEGO F., BETANCOR L., MATEO C., HIDALGO A., ALONSO-MORALES N., DELLAMORA-ORTIZ G., GUISÁN J. M. (2005). Enzyme stabilization by glutaraldehyde cross linking of adsorbed proteins on aminated supports, **Journal of Biotechnology**, 119, 70-75

MOTEVALIZADEH, S. F. et al Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Vol. 120, p. 75–83, 2015.

MUSSATTO, S. I. and MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 68, n. 3, p. 587-597, 2007.

MUSSATTO, S. I. et al. Fructooligosaccharides and  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 59, p.76–81, Braga, jan. 2009

NERI D.F.M., BALCÃO V.M, CARNEIRO-DA-CUNHA M.G., CARVALHO JR. L. B., TEIXEIRA J.A.. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane–polyvinyl alcohol magnetic (mPOS–PVA) composite for lactose hydrolysis. **Catalysis Communications**, v.9 (14): 2334-2339, 2008.

NERI D.F.M., BALCÃO V.M., DOURADO F.O.Q., OLIVEIRA J.M.B., CARVALHO JR. L.B., TEIXEIRA J.A. Immobilized  $\beta$ -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, p. 74-80, 2011a.

NERI, D.F.M., BALCÃO, V.M., DOURADO F.O.Q., OLIVEIRA J.M.B., CARVALHO JR. L.B., TEIXEIRA J.A. Galactooligosaccharides production by  $\beta$ -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane–polyaniline particles. **Reactive and Functional Polymers**, v. 69 (4): 246-251, 2009a.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.; CARDOSO, S.M.; SILVA, A.M.S.; DOMINGUES, M.R.M.; TORRES, D.; RODRIGUES, L.; CARVALHO-JR, L.B.; TEIXEIRA, J.A.C. Characterization of galactooligosaccharides produced by  $\beta$ -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 172-178, 2011b.

NERI, D.F.M.; BALCÃO, V.; COSTA, R.; ROCHA, I.; FERREIRA, E.; TORRES, D.; RODRIGUES, L.; CARVALHO-JR, L.B.; TEIXEIRA, J.A.C. Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. **Food Chemistry**, v. 115, p.92 – 99, 2009b.

SERAFINI, M. R.; QUINTANS, J. S. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R.V.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Mapeamento de tecnologias patenteáveis com o uso da hecogenina. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 5, p. 427- 435, 2012.

SILVA, F. S. G.; MIGOST, B. C.; SILVA, S. F. G. A importância do bioetanol dentro do contexto brasileiro, comparação de sua síntese a partir de cana-deaçúcar e milho e bioetanol de segunda geração. **8ª JORNACITEC- Jornada Científica e Tecnológica da Fatec de Botucatu**, 2019.

TISCHER, W.; KASCHE, V.; Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**. v. 17, p .326. 1999.