

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

WELLINGTON SABINO ADRIANO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE ENZIMAS**  
**INDUSTRIAIS EM QUITOSANA**

SÃO CARLOS – SP

2008

WELLINGTON SABINO ADRIANO

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS DE ENZIMAS  
INDUSTRIAIS EM QUITOSANA**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Profa.Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

SÃO CARLOS - SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A243pc

Adriano, Wellington Sabino.

Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana / Wellington Sabino Adriano. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

161 f.

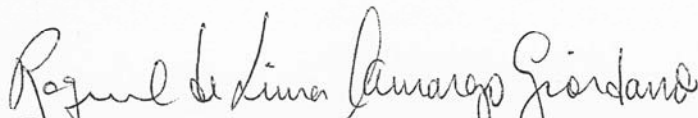
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Tecnologia de enzimas. 2. Carboxipeptidase A. 3. Celulase. 4. Quimotripsina. 5. Quitosana. 6. Imobilização multipontual. I. Título.

CDD: 660.634 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE WELLINGTON SABINO ADRIANO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 25 DE ABRIL DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:

  
Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano  
**Presidente, PPG-EQ/UFSCar**

  
Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami  
**PPG-EQ/UFSCar**

  
Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves  
**DEQ/UFC**

  
Profa. Dra. Heizer Ferreira de Castro  
**DEQUI-EEL/USP**

  
Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho  
**IQSC/USP**

*Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais José Gerardo e Luci, a minha irmã Ana Mônica, minha afilhada Lívia Maria, ao João Lucas e meu avô José Juca (in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida, saúde, perseverança e paciência para execução deste trabalho.

À Professora Raquel de Lima Camargo Giordano que tanto contribuiu para meu crescimento humano e profissional durante a orientação desta tese e por sua enorme paciência comigo, confiança e credibilidade no meu trabalho.

Ao Professor Roberto de Campos Giordano pelas excelentes aulas de Análise Numérica que me ajudaram em muito na minha formação e pelas contribuições dadas no desenvolvimento desta tese.

Agradecimento especial ao Professor Enrique Mammarella por sua fundamental contribuição nesta tese e também por me recepcionar tão bem na Argentina. Agradeço de coração a sua família e ao grupo de pesquisa da Professora Amélia Catalina Rubiollo (Intec – Conicet-UNL) Santa Fé-Argentina pela recepção, carinho e ajuda em tudo o que necessitava.

Aos meus colegas de pós-graduação da 1ª geração: Álvaro, Anny, Andréa, Angélica, Célia, Charles, Edson, Marcelo Vieira, Paulo, Vanessa e 2ª geração: Andréa, André, Adriano, Aline, Dannielle, Danny, Dasciana, Fabiana, Geísa, Gilson, Juliana Teodoro, Marcelo Ribeiro, Rafael, Rebeca, Tiago pelos momentos de trocas de idéia e descontração.

A todos do nosso grupo meu muito obrigado.

Aos técnicos Amadeus, Edílson, Francisco (Espanhol) e Tiago.

Aos alunos de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCar pelo companheirismo e contribuição nas disciplinas e tese.

Ao CNPq, Capes e Secyt (Argentina) pelo apoio financeiro de fundamental importância para realização deste trabalho.

Agradeço à Cássia pela cumplicidade e à Luiza por me suportarem durante estes 4 anos nos momentos tristes e alegres e por sermos uma verdadeira família..

Agradeço ao Adriano e Dasciana pelas trocas de idéias de fundamental importância ao decorrer deste trabalho.

Agradeço à “colônia” cearense do DEQ–UFSCar pelos momentos de descontração e ajuda mútua. (Dasci, Geísa, James, Karol).

*"Não há limites para o homem que possui a capacidade de sonhar e a determinação de transformar em realidade o seu sonho".*

*(Autor desconhecido)*

# Sumário

<i>Lista de figuras</i> .....	<i>i</i>
<i>Lista de tabelas</i> .....	<i>vii</i>
<i>Nomenclatura</i> .....	<i>xi</i>
<i>Resumo</i> .....	<i>xii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xiii</i>
<b>Capítulo 1 Introdução</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Referências bibliográficas</b> .....	<b>5</b>
<b>Capítulo 2 Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Soro de Queijo</b> .....	<b>7</b>
2.1.1 Hidrólise das proteínas do soro de queijo.....	8
2.1.2 Enzimas proteolíticas.....	8
2.1.3 Quimotripsina .....	9
2.1.4 Metaloenzimas .....	11
2.1.5 Carboxipeptidase A .....	11
<b>2.2 Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima lignocelulolítica</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Sistema celulolítico produzido por <i>Trichoderma reesei</i> .....	15
2.2.2 Mecanismo de ação das celulases: Sinergismo .....	16
2.2.3 Aplicações biotecnológicas da enzima celulase .....	17
<b>2.3 Tecnologia Enzimática</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Suportes para imobilização.....	19
2.3.1.1 Quitosana .....	21
2.3.1.2 Gelatina.....	23
2.3.1.3 Alginato de sódio.....	24
2.3.1.4 $\kappa$ -carragenana .....	25
2.3.1.5 Utilização de <i>Bacillus megaterium</i> na preparação de suportes .....	25
2.3.1.6 Utilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na preparação de suportes .....	26
2.3.1.7 Influência da adição de copolímeros e microorganismos em quitosana nos suportes.....	26
<b>2.4 Modificação química do suporte</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5 Imobilização de enzimas</b> .....	<b>34</b>
2.5.1 Métodos de imobilização enzimática .....	34
2.5.2 Estratégias para estabilização operacional de biocatalisadores.....	41
2.5.3 Efeitos difusivos .....	41
2.5.4 Influência do tempo de imobilização.....	42
<b>2.6 Referências bibliográficas</b> .....	<b>43</b>
<b>Capítulo 3 Materiais e Métodos</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1 Materiais</b> .....	<b>53</b>
3.1.1 Suportes .....	53
3.1.2 Microorganismos .....	53
3.1.3 Reagentes usados para tratamento dos suportes .....	53
3.1.4 Enzimas .....	53



3.1.5	Agentes ativantes.....	53
3.1.6	Substratos .....	54
3.1.7	Reagentes para análise de proteínas, açúcares e teor de celulose.....	54
3.1.8	Preparação das partículas de quitosana .....	54
<b>3.2</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>54</b>
3.2.1	Preparação das partículas de híbridos de quitosana.....	54
3.2.2	Preparação das partículas de híbridos de quitosana contendo microorganismos ..	55
3.2.3	Preparação de quitosana-alginato-epoxilado .....	56
3.2.4	Ativação dos suportes utilizando glutaraldeído.....	56
3.2.5	Ativação dos suportes utilizando glicidol.....	56
3.2.6	Ativação dos suportes utilizando epícloridrina .....	57
3.2.7	Determinação da quantidade de aldeídos nos suportes .....	58
3.2.8	Determinação da quantidade de epóxidos nos suportes .....	59
3.2.9	Microscopia eletrônica de varredura .....	59
3.2.10	Determinação de proteínas .....	59
3.2.11	Ensaio de atividade enzimática .....	59
3.2.12	Estabilidade térmica .....	62
3.2.13	Ensaio de temperatura – atividade enzimática.....	63
3.2.14	Ensaio de pH – atividade enzimática .....	63
3.2.15	Avaliação da interação enzima-suporte.....	64
3.2.16	Análise de aminoácidos de enzima livre e imobilizada.....	64
3.2.17	Acompanhamento do processo de imobilização através do rendimento e atividade recuperada.....	64
<b>3.3</b>	<b>Estudos de imobilização e estabilização de quimotripsina .....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Planejamento fatorial 2 <sup>5</sup> .....	66
3.3.2	Imobilização multipontual de quimotripsina em suportes ativados com glutaraldeído .....	67
3.3.3	Imobilização multipontual de quimotripsina em suportes ativados com glicidol ou epícloridrina.....	67
3.3.4	Ensaio de capacidade máxima de imobilização.....	68
3.3.5	Ensaio de hidrólise de soro de queijo utilizando quimotripsina imobilizada ....	68
<b>3.4</b>	<b>Estudos de imobilização e estabilização de carboxipeptidase A (CPA).....</b>	<b>68</b>
3.4.1	Imobilização multipontual de CPA em suporte ativado com glutaraldeído.....	69
3.4.2	Imobilização multipontual de CPA em suporte ativado com epícloridrina.....	70
3.4.3	Imobilização multipontual de CPA em suporte epoxilado.....	70
3.4.4	Ensaio de capacidade máxima de imobilização.....	71
3.4.5	Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise de hipuril-L-fenilalanina ...	71
3.4.6	Determinação dos parâmetros de transporte de massa na hidrólise de hipuril-L-fenilalanina .....	71
<b>3.5</b>	<b>Estudos de imobilização e estabilização de celulase .....</b>	<b>72</b>
3.5.1	Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com glutaraldeído e/ou glicidol.....	72
3.5.2	Imobilização covalente de celulase em suporte epoxilado.....	73
3.5.3	Imobilização de celulase por encapsulação e conseqüente reticulação com glutaraldeído .....	73
<b>3.6</b>	<b>Hidrólise de bagaço de cana utilizando celulase livre e imobilizada .....</b>	<b>74</b>
3.6.1	Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar.....	74
3.6.2	Determinação do teor de celulose no bagaço de cana-de-açúcar .....	74
3.6.3	Ensaio de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase livre e imobilizada .....	74

3.6.4	Cálculo da conversão da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase livre e imobilizada .....	75
<b>3.7</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>77</b>
<b>Capítulo 4</b>	<b><i>Resultados: Preparação e caracterização de derivados de quimotripsina ....</i></b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Planejamento Fatorial 2<sup>5</sup> .....</b>	<b>80</b>
<b>4.2</b>	<b>Preparação e caracterização de híbridos de quitosana.....</b>	<b>84</b>
4.2.1	Ativados com glutaraldeído .....	84
4.2.2	Ativados com glicidol.....	88
4.2.3	Ativados com epiclorigrina .....	88
4.2.4	Influência da adição de microorganismos durante a preparação do suporte .....	90
4.2.5	Influência do grau de ativação ao usar epóxidos como ativador.....	92
4.2.6	Ensaio de carga máxima de imobilização .....	93
4.2.7	Influência do tratamento de lise celular.....	94
4.2.8	Influência do tempo de imobilização.....	96
4.2.9	Análise de aminoácidos de quimotripsina livre e imobilizada .....	98
4.2.10	Ensaio de temperatura – atividade enzimática .....	100
4.2.11	Ensaio de pH – atividade enzimática.....	100
4.2.12	Ensaio de hidrólise de soro de queijo utilizando quimotripsina imobilizada ...	101
4.2.13	Imobilização de quimotripsina – comparação com trabalhos da literatura .....	102
<b>4.3</b>	<b>Conclusões parciais .....</b>	<b>103</b>
<b>4.4</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>105</b>
<b>Capítulo 5</b>	<b><i>Resultados: Preparação e caracterização de derivados de carboxipeptidase A</i></b> <b>.....</b>	<b>109</b>
<b>5.1</b>	<b>Preparação e caracterização de híbridos de quitosana.....</b>	<b>109</b>
5.1.1	Ativados com glutaraldeído.....	109
5.1.2	Ativados com epiclorigrina .....	113
5.1.3	Ativados com epiclorigrina (epoxilado).....	116
5.1.4	Efeito da concentração de enzima oferecida no rendimento de imobilização e na atividade recuperada.....	119
5.1.5	Influência da temperatura na atividade enzimática .....	122
5.1.6	Influência do pH na atividade enzimática .....	123
5.1.7	Determinação dos parâmetros cinéticos e de transferência de massa .....	124
<b>5.2</b>	<b>Conclusões parciais .....</b>	<b>127</b>
<b>5.3</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>129</b>
<b>Capítulo 6</b>	<b><i>Resultados: Preparação e caracterização de derivados de celulase .....</i></b>	<b>133</b>
<b>6.1</b>	<b>Preparação e caracterização de derivados de celulase.....</b>	<b>134</b>
6.1.1	Caracterização da Celluclast® (celulase) livre.....	134
6.1.2	Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com glutaraldeído e/ou glicidol.....	136
6.1.3	Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com glicidol e a influência de ditiotretitol (DTT) na etapa de imobilização .....	139
6.1.4	Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com epiclorigrina (epoxilado).....	141
6.1.5	Encapsulação de celulase seguida de reticulação com glutaraldeído .....	143
<b>6.2</b>	<b>Hidrólise de bagaço de cana utilizando celulase livre e imobilizada .....</b>	<b>145</b>
6.2.1	Tratamento térmico e alcalino do bagaço de cana-de-açúcar.....	145

6.2.2	Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando enzima livre e imobilizada .	145
6.2.3	Hidrólises seqüenciais do bagaço de cana-de-açúcar utilizando enzima livre e imobilizada .....	147
<b>6.3</b>	<b>Conclusões parciais .....</b>	<b>153</b>
<b>6.4</b>	<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>155</b>
<i>Capítulo 7</i>	<i>Conclusões.....</i>	<i>158</i>
<i>Capítulo 8</i>	<i>Sugestões.....</i>	<i>160</i>

## Lista de figuras

### Capítulo 2

<i>Figura 2.1 Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease [12].</i> .....	9
<i>Figura 2.2 Catálise da quebra de uma ligação peptídica numa proteína, efetuada pela quimotripsina. A histidina e a histidina protonada atuam como base e ácido em duas reações de substituição nucleofílica sucessivas: quebra da proteína com formação da acilenzima e liberação de um fragmento de proteína; hidrólise da acilenzima com regeneração da enzima e liberação de outro fragmento de proteína [12].</i> .....	10
<i>Figura 2.3 Esquema resumido da ação da CPA sobre uma ligação peptídica.</i> .....	13
<i>Figura 2.4 Processamento de cana-de-açúcar a etanol e energia introduzindo a hidrólise...</i>	14
<i>Figura 2.5 Processo de hidrólise para obtenção de etanol através de hidrólise ácida ou enzimática com fermentação simultânea.....</i>	15
<i>Figura 2.6 Mecanismo de ação sinérgico do complexo de celulases.</i> .....	17
<i>Figura 2.7 Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana</i> .....	21
<i>Figura 2.8 Diagrama de produção comercial de quitina e quitosana [45].</i> .....	22
<i>Figura 2.9 Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico.</i> .....	24
<i>Figura 2.10 Estrutura química da κ-carragenana.</i> .....	25
<i>Figura 2.11 Estrutura de um complexo de polietrólito de quitosana pH-dependente contendo; quitosana e polímero adicional [67].</i> .....	27
<i>Figura 2.12 Reação de ativação entre glutaraldeído e quitosana.</i> .....	30
<i>Figura 2.13 Reação de ativação do gel utilizando glicidol ou epícloridrina.</i> .....	31
<i>Figura 2.14 Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas</i> .....	35
<i>Figura 2.15 Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas</i> .....	36
<i>Figura 2.16 Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual através de bases de Schiff com ativação via glutaraldeído e glicidol.</i> .....	37

*Figura 2.17 Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual com ativação via epícloridrina. .... 38*

*Figura 2.18 Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual através de grupos epóxidos. .... 39*

### **Capítulo 3**

*Figura 3.1 Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos géis preparados. .... 56*

*Figura 3.2 Fluxograma mostrando a ativação via glicidol dos géis preparados. .... 57*

*Figura 3.3 Fluxograma mostrando a ativação via epícloridrina dos géis preparados. .... 58*

*Figura 3.4 Fluxograma representativo das etapas dos estudos de imobilização e estabilização de quimotripsina. .... 66*

*Figura 3.5 Fluxograma representativo das etapas dos estudos de imobilização e estabilização da CPA. .... 69*

*Figura 3.6 Fluxograma representativo das etapas dos estudos de imobilização de celulases e hidrólise do bagaço de cana. .... 72*

### **Capítulo 4**

*Figura 4.1 Inativação térmica de derivados ativados com glutaraldeído e com imobilização a pH 7,0 e 4°C por 2h, com carga oferecida de 5mg enzima liofilizada.g<sup>-1</sup> gel (55°C e pH 8,0) de (◆) quimotripsina solúvel, (□) quitosana 2,5%; (◇) quitosana 5,0%; (○) quitosana 4,0%-gelatina 3,0%; (■) quitosana 2,5%-alginato 2,5%; (▲) quitosana 2,5%-carragenana 2,5%. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais. .... 86*

*Figura 4.2 Inativação térmica de derivados ativados com glutaraldeído com carga oferecida de 5mg enzima liofilizada.g<sup>-1</sup> gel (55°C e pH 8,0), (◆) quimotripsina solúvel; (■) quitosana 2,5%-alginato 2,5% imobilização a pH 7,0; (□) quitosana 2,5%-alginato 2,5% imobilização a pH 10,05 ambos a 25°C. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais. .... 87*

*Figura 4.3 Influência do tratamento de lise celular no rendimento de imobilização (A) e na atividade recuperada (B), para gel ativado com glicidol, nos seguintes casos: 1: sem levedura; 2: gel com levedura e sem tratamento; 3: tratamento com SDS antes de ativar o*

<i>gel; 4: tratamento com SDS e alcalase antes de ativar o gel; 5: tratamento de lise celular após ativação.....</i>	<i>94</i>
<i>Figura 4.4 Influência do tratamento de lise celular no rendimento de imobilização (A) e na atividade recuperada (B), para gel ativado com epicloridrina, nos seguintes casos: 1: sem levedura; 2: gel com levedura e sem tratamento; 3: tratamento com SDS antes de ativar o gel; 4: tratamento com SDS e alcalase antes de ativar o gel; 5: tratamento de lise celular após ativação.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 4.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de uma fratura de quitosana 2,5%-carragenana 2,5% (A e C) e quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% (B e D) com resolução de 36.000× (A e B) e 100.000× (C e D).....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 4.6 Influência do tempo de imobilização na estabilização e atividade recuperada de derivados de quimotripsina. Tempo de meia-vida (<math>t_{1/2}</math>) determinado a 65°C, pH 8,0. Carga oferecida: 5mg enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel. (□) quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% epicloridrina e (●) quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% glicidol. ....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 4.7 Efeito da temperatura na atividade da (□) quimotripsina livre e (■) imobilizada em quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% ativado com epicloridrina. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 4.8 Efeitos do pH na atividade da (□) quimotripsina livre e (■) imobilizada em quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% ativado com epicloridrina, medido a 25°C com BTEE como substrato.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 4.9 Efetividade de quimotripsina imobilizada na hidrólise de soro de queijo a 55°C, pH 8,0 como função da carga de enzima teoricamente imobilizada.....</i>	<i>102</i>

## **Capítulo 5**

<i>Figura 5.1 Inativação térmica (55°C e pH 7,5) de (◆) carboxipeptidase A solúvel, (●) sem redução, (▲) redução na presença de tirosina 0,02M (■) redução na presença de íons zinco (□) redução na presença tirosina 0,02M e zinco. (A) Imobilização sem agente protetor, (B) presença de N-acetil-L-tirosina, (C) com cálcio, (D) com N-acetil-L-tirosina e cálcio. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais. ....</i>	<i>112</i>
--	------------

<i>Figura 5.2 Inativação térmica (55°C e pH 7,5) de (◆) CPA livre e ensaios: (Δ) 1, (▼) 2, (■) 3, (●) 4, (▽) 5, (○) 6, (□) 7 e (▲) 8. Todos derivados foram preparados após 3h de imobilização entre enzima-suporte a 25°C e pH 10,05 com carga oferecida de 1mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (44U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> gel) e ativado com epicloridrina sem redução por NaBH<sub>4</sub>. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.</i>	114
<i>Figura 5.3 Análise cúbica para os oito ensaios realizados para cada resposta obtida. A) Rendimento de imobilização (R<sub>I</sub>); B) Atividade recuperada (A<sub>R</sub>) e C) Fator de estabilidade a 55°C (FE).....</i>	115
<i>Figura 5.4 Influência do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização da CPA quitosana 2,5%-alginate 2,5%-epoxilado. Carga enzimática oferecida de 1mg de CPA.g<sup>-1</sup>gel (44 U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> gel) a pH 10,05 e 25°C: (■) Atividade recuperada e (□) Fator de estabilização</i>	118
<i>Figura 5.5 CPA teoricamente imobilizada (U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> gel) como função da carga enzimática oferecida. (A) glutaraldeído, (B) epicloridrina e (C) epoxilado. ....</i>	120
<i>Figura 5.6 Relação entre atividade aparente e teórica em função da carga enzimática em duas temperaturas (A) glutaraldeído, (B) epicloridrina e (C) epoxilado. ....</i>	121
<i>Figura 5.7 Efeito da temperatura na atividade de (■) solúvel CPA e (□) imobilizada: (A) glutaraldeído, (B) epicloridrina e (C) epoxilado. Experimentos foram realizados em tampão tris/HCl 0,025M Tris/HCl (NaCl 0,5M) a pH 7,5. ....</i>	123
<i>Figura 5.8 Efeito do pH na atividade de (■) solúvel CPA e (□) imobilizada: (A) glutaraldeído, (B) epicloridrina e (C) epoxilado. Experimentos foram realizados a 25°C. ....</i>	124
<i>Figura 5.9 Distribuição do tamanho de partícula para híbridos de quitosana (quitosana-alginate) e (quitosana-carragenana). ....</i>	125
<i>Figura 5.10 Curvas de pontos experimentais e cinéticas de acordo com modelo de Michaelis-Menten para CPA livre (■); (A) glutaraldeído 4mg CPA.g<sup>-1</sup>gel, (B) epicloridrina 4mg CPA.g<sup>-1</sup>gel e (C) epoxilado 4mg CPA.g<sup>-1</sup>gel (□) a pH 7,5 e 37°C. ....</i>	126

## Capítulo 6

- Figura 6.1 Inativação térmica de Celluclast<sup>®</sup> solúvel, (●) dialisada e (○) não-dialisada, a 65°C e pH 4,8 (tampão citrato 0,05M). As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais..... 135
- Figura 6.2 Influência da temperatura e pH na atividade hidrolítica da celulase livre (Celluclast<sup>®</sup>) (●) e imobilizada (■)..... 136
- Figura 6.3 Inativação térmica de quitosana 2,5%-alginate 2,5% com diferentes ativações. Carga oferecida de 10mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) ativados com glutaraldeído e (●) ativados com glutaraldeído e glicidol. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais..... 138
- Figura 6.4 Inativação térmica de celulase livre e imobilizada em quitosana 2,5%-alginate 2,5% ativados com glicidol. Carga oferecida de 10mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) presença de DTT e (●) ausência de DTT. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais..... 141
- Figura 6.5 Inativação térmica de celulase livre e imobilizada em quitosana 2,5%-alginate 2,5% ativados com epícloridrina (epoxilado). Carga oferecida de 10mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) imobilizada. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais. .... 143
- Figura 6.6 Inativação térmica de celulase livre e encapsulada em quitosana 1% m/v reticulado com glutaraldeído. Carga teórica imobilizada de 14,5mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) imobilizada. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais. .... 144
- Figura 6.7 Conversão do bagaço da cana-de-açúcar (50°C e pH 5,0) com 8,8% m/v de celullignina. Enzima solúvel 4,3U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> celullignina (■); enzima solúvel 8,6U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> celullignina (●); enzima imobilizada em quitosana 2,5%-alginate 2,5% pré-ativados com glutaraldeído e ativado com glicidol 4,3U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> celullignina (▲). .... 146
- Figura 6.8 Perfis de concentração de glicose (●) e celobiose (■) na hidrólise de bagaço de cana utilizando enzima livre (A) e bateladas seqüenciais com enzima imobilizada. 1<sup>a</sup> batelada (B), 2<sup>a</sup> batelada (C) e 3<sup>a</sup> batelada (D). Todos os ensaios foram realizados a 47°C durante 10h e 37°C até completar 36h em pH 5,0..... 150
- Figura 6.9 Perfis de concentração de celobiose: (●) enzima imobilizada sem adição de livre; 15U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de celullignina (○) enzima livre 5U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de celullignina. Glicose: (■) enzima



*imobilizada sem adição de livre; (□) enzima livre 5U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de celulignina na hidrólise de bagaço de cana utilizando Todos os ensaios foram realizados a 47°C durante 10h e 37°C até completar 33h em pH 5,0. .... 152*

*Figura 6.10 Perfis de conversão em glicose (A), celobiose (B) e açúcar redutor total (C) na hidrólise de bagaço de cana utilizando enzima livre (■) e bateladas seqüenciais com enzima imobilizada. 1<sup>a</sup> batelada (●), 2<sup>a</sup> batelada (▲) e 3<sup>a</sup> batelada (◆). Todos os ensaios foram realizados a 47°C durante 10h e 37°C até completar 36h em pH 5,0. .... 153*

## Lista de tabelas

### Capítulo 2

<i>Tabela 2.1 Exemplo de metaloenzimas [15].</i> .....	11
<i>Tabela 2.2 Classificação dos suportes conforme a composição [39].</i> .....	19
<i>Tabela 2.3 Possíveis complexos polieletrólíticos formados com a presença de quitosana.</i> ....	28

### Capítulo 3

<i>Tabela 3.1 Variáveis e níveis do planejamento fatorial <math>2^5</math>, sendo (A) concentração de quitosana, (B) concentração de gelatina, (C) concentração de NaOH, (D) temperatura de coagulação e (E) concentração de glutaraldeído.</i> .....	67
<i>Tabela 3.2 Imobilização de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C por 3h em suporte ativado com epicloridrina (quitosana – carragenana) em diferentes condições com carga enzimática de 1mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (44U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup>gel); (+) indica presença e (-) ausência.</i> .....	70

### Capítulo 4

<i>Tabela 4.1 Matriz experimental e resultados obtidos através do planejamento fatorial <math>2^5</math>, sendo <math>R_I</math> (rendimento de imobilização), <math>A_R</math> (atividade recuperada) e FE (fator de estabilidade a 55°C).</i> .....	81
<i>Tabela 4.2 Efeitos estimados, teste t de Student's para o planejamento fatorial <math>2^5</math>, sendo (A) concentração de quitosana, (B) concentração de gelatina, (C) concentração de NaOH, (D) temperatura de coagulação e (E) concentração de glutaraldeído.</i> .....	82
<i>Tabela 4.3 Análise de significância do planejamento fatorial <math>2^5</math> através do ponto central.</i> ...	83
<i>Tabela 4.4 Parâmetros de imobilização de quimotripsina em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 a 4°C em suportes ativadas com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de 5 mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (600U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel) por 2h, sendo (<math>R_I</math>) rendimento de imobilização, (<math>A_R</math>) atividade recuperada, (<math>A_{ap}</math>) atividade aparente, (<math>t_{1/2}</math>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.</i> .....	85
<i>Tabela 4.5 Parâmetros de imobilização de quimotripsina em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C em suportes ativados com glicidol com carga oferecida de 10mg de</i>	

<i>enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (1200 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel) por 24h, sendo (R<sub>i</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.....</i>	88
<i>Tabela 4.6 Parâmetros de imobilização de quimotripsina em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C em suportes ativados com epícloridrina com carga oferecida de 10 mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (1200 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup> gel) por 24h, sendo (R<sub>i</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.....</i>	89
<i>Tabela 4.7 Influência da adição de células na preparação de suportes durante imobilização de quimotripsina ativados com glutaraldeído (GLU), glicidol (GLI) e epícloridrina (EPI) nas mesmas condições de imobilização usadas nas Tabelas (4.4; 4.5 e 4.6), respectivamente. Sendo (R<sub>i</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.....</i>	91
<i>Tabela 4.8 Parâmetros de imobilização de quimotripsina em pH 10,05 a 25°C em suportes ativados com glicidol e oxidados com NaIO<sub>4</sub> 0,1M, carga enzimática oferecida de 50 mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (6000 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel). ....</i>	93
<i>Tabela 4.9 Quantidade máxima de quimotripsina teoricamente imobilizada (C<sub>MAX</sub>: mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel) para diferentes processos de ativação. A<sub>R</sub>: atividade recuperada, A<sub>teórica</sub>: atividade teórica, A<sub>ap</sub>: atividade aparente. (1mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel corresponde a 120 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel). ....</i>	93
<i>Tabela 4.10 Influência da redução com NaBH<sub>4</sub> após a imobilização em pH 10,05 e 25°C nos parâmetros de imobilização: quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5,0%, ativado com epícloridrina. Carga oferecida: 5mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (600 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel). ....</i>	98
<i>Tabela 4.11 Análise de aminoácidos de hidrolisados de quimotripsina livre e imobilizada... </i>	99
<i>Tabela 4.12 Concentração de grupos aldeído e oxirano nos melhores derivados obtidos. ....</i>	99
<i>Tabela 4.13 Imobilização de quimotripsina – comparação com trabalhos da literatura.....</i>	103

## Capítulo 5

*Tabela 5.1 Parâmetros de imobilização de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M, pH 10,05 a 25°C por 3h (quitosana – alginato) com glutaraldeído 5% (v/v) em diferentes condições com carga oferecida de 1mg de enzima. g<sup>-1</sup> gel ou (44U<sub>H-PHE</sub> CPA.g<sup>-1</sup> gel), sendo atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 55°C. .... 110*

*Tabela 5.2 Parâmetros de imobilização de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C por 3h de imobilização no suporte (quitosana – carragenana) com epicloridrina em diferentes condições com carga de enzima oferecida de 1mg de enzima.g<sup>-1</sup> gel (44U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> gel), sendo rendimento de imobilização (R<sub>i</sub>), atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 55°C..... 113*

*Tabela 5.3 Influência do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização da CPA quitosana 2,5%-alginato 2,5%-epoxilado. Carga enzimática oferecida de 1mg de CPA.g<sup>-1</sup> de gel (44 U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> de gel) sendo rendimento de imobilização (R<sub>i</sub>), atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 55°C a pH 10,05 e 25°C. Rendimento de imobilização foi de 100% em 2h de imobilização. .... 117*

*Tabela 5.4 Comparação de diferentes derivados de enzimas industriais obtidos por imobilização em suportes epoxilados. .... 119*

*Tabela 5.5 Determinação dos parâmetros cinéticos e de transferência de massa para diferentes derivados de CPA preparados utilizando hipuril-L-fenilalanina como substrato a pH 7,5 e 37°C..... 127*

## Capítulo 6

*Tabela 6.1 Valores das atividades enzimática e específica do consórcio enzimático (Celluclast<sup>®</sup>) contendo 41,4±0,5 mg de proteína. mL<sup>-1</sup> de extrato frente a diferentes substratos..... 134*

*Tabela 6.2 Parâmetros de imobilização de celulase em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 a 25°C em suporte ativado com glutaraldeído 5% (v/v) ou pré-ativado com glutaraldeído e depois com glicidol com carga oferecida de 10 mg de proteína.g<sup>-1</sup> gel (27U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> gel) por 24h, sendo (R<sub>i</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 65°C. .... 137*

<i>Tabela 6.3 Parâmetros de imobilização de celulase em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 a 25°C em suporte ativado com glicidol na presença e ausência de DTT com carga oferecida de 10 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel (27U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup>gel) por 24h, sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 65°C.....</i>	<i>140</i>
<i>Tabela 6.4 Parâmetros de imobilização de celulase em quitosana 2,5%-alginato 2,5%-epoxilado. Carga enzimática oferecida de 10mg de proteína.g<sup>-1</sup> de gel (27 U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de gel) sendo rendimento de imobilização (R<sub>I</sub>), atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 65°C. ....</i>	<i>142</i>
<i>Tabela 6.5 Parâmetros de imobilização de celulase em quitosana 1% m/v por encapsulação seguida de reticulação com glutaraldeído. Carga oferecida 40mg de proteína (108U<sub>FP</sub>) sendo rendimento de imobilização (R<sub>I</sub>), quantidade de proteína imobilizada (P<sub>I</sub>), atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 65°C (massa de gel obtida de 2,0g).....</i>	<i>144</i>
<i>Tabela 6.6 Teores de celulose quantificados pelo método antrona em bagaço de cana-de-açúcar em diferentes etapas de tratamento.....</i>	<i>145</i>

## Nomenclatura

<i>ART</i>	Concentração de açúcar redutor (g.L <sup>-1</sup> )
BOD	Demanda biológica de oxigênio
BSA	soro albumina bovina
BTEE	Éster etílico de N-benzoil-L-tirosina
Bm	<i>Bacillus megaterium</i>
CBH	Celobiohidrolase
CMC	Carboximetilcelulose
CPA	Carboxipeptidase A
<i>Deff</i>	Difusividade efetiva, (m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
EG	Endocelulase
FE	Fator de estabilidade
FP	Papel de filtro Whatman n° 1
H-PHE	Hipuril-L-fenilalanina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PGA	Penicilina G Acilase
PITC	Fenilisotiocianato
PTC	Feniltiocarbamil
<i>R</i>	Raio da partícula
<i>V</i>	Velocidade de reação
<i>V<sub>max</sub></i>	Velocidade máxima
<i>V<sub>T</sub></i>	Volume do reator (mL)
<i>V<sub>E</sub></i>	Volume de enzima (mL)
<i>T<sub>H</sub></i>	Tempo de hidrólise (min,h)
<i>t<sub>1/2</sub></i>	Tempo de meia-vida (min,h)
<i>k</i>	Constante de desativação de primeira ordem (tempo <sup>-1</sup> )
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten (mM)
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

## Resumo

Neste trabalho de tese, várias estratégias foram analisadas com objetivo de melhorar e promover uma imobilização covalente multipontual de quimotripsina, carboxipeptidase A e celulase em quitosana. Géis híbridos com diferentes estruturas internas foram obtidos usando alginato de sódio, gelatina e  $\kappa$ -carragenana, bem como, variando a concentração de polímeros, 2,5-5,0% (m/v) e os agentes de ativação (glutaraldeído, glicidol e epicloridrina). A adição de células aos híbridos, seguido de lise celular, o aumento no tempo de imobilização e o efeito da redução no derivado final por borohidreto de sódio foram investigados. Foram averiguadas a influência destas variáveis nos rendimentos de imobilização, atividades recuperadas e estabilização a 55°C e 65°C. Derivados de quimotripsina tiveram um incremento de estabilidade de 34 min a 55°C (para quitosana pura 2,5% ativada com glutaraldeído a pH 7,0 e a 4°C) para 468 min a 65°C (para quitosana 2,5%-carragenana 2,5% com adição de 5% de *S.cerevisiae* e ativado com epicloridrina com tempo de imobilização de 72h a pH 10,05 a 25°C e reduzido). Este melhor derivado foi 9900 vezes mais estável que a enzima livre. A máxima capacidade de imobilização foi de 40 mg de quimotripsina g.gel<sup>-1</sup>. O número de grupos aldeídos e oxiranos gerados no suporte e a quantidade de lisina envolvidas na imobilização multipontual, bem como as imagens do MEV das estruturas dos suportes explicam os resultados obtidos. Derivados de carboxipeptidase A quando ativado com glutaraldeído mostrou uma melhor estabilização de 5,3 vezes, já para o ativado com epicloridrina foi de 8,8 vezes. Entretanto, o derivado preparado com grupos oxiranos apresentou 100% de rendimento de imobilização com recuperação de atividade de 57% e foi 20 vezes mais estável que a enzima livre a 55°C com tempo de imobilização de 48h e bloqueio de grupos epóxidos com glicina. Os derivados ativados com glutaraldeído, epicloridrina e epoxilado apresentaram sérias limitações difusionais na hidrólise de hipuril-L-fenilalanina com  $D_{eff}$  de  $5,41 \cdot 10^{-12}$ ,  $5,59 \cdot 10^{-12}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> e  $5,10 \cdot 10^{-12}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, respectivamente. Ensaio de imobilização da celulase e sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar foram realizados concomitantemente. O derivado utilizado em uma seqüência de três bateladas foi obtido com quitosana-alginato ativado com glutaraldeído/glicidol sendo este derivado 20 vezes mais estável que a enzima livre. Entretanto o melhor derivado obtido nos ensaios de imobilização foi com ativação de glicidol com uma estabilidade de aproximadamente 38 vezes seguido da imobilização por encapsulação seguido de reticulação com glutaraldeído com um fator de estabilidade de aproximadamente 33 vezes em relação à livre. O desempenho do sistema de sacarificação foi muito bom, indicando a reusabilidade da celulase imobilizada é uma boa alternativa para reduzir custos na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

Palavras-chave: Tecnologia enzimática, quimotripsina, carboxipeptidase A, celulase, imobilização enzimática, quitosana, hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise de soro de queijo.

## Abstract

In this work, several strategies were tested to improve the covalent multipoint attachment of chymotrypsin, carboxypeptidase A and cellulase on chitosan. Hybrid gels with different internal structures were obtained using sodium alginate, gelatin or  $\kappa$ -carrageenan and by changing the polymer concentration, 2.5-5.0% (m/v) and the activating reactant, glutaraldehyde, glycidol or epichlorohydrin. The addition of microorganisms to the hybrid polymer followed by cellular lysis, the increase of immobilization reaction time and the effect of the reduction of the final derivative with sodium borohydride were also tested. The influence of these variables on immobilization yields, recovered activities, and stabilization factors at 55°C and 65°C, were assessed. Chymotrypsin derivatives half-lives increased from 34 min at 55°C (for pure chitosan 2.5% activated with glutaraldehyde at pH 7.0, 4°C) to 468 min at 65°C (for chitosan 2.5%-carrageenan 2.5%, with the addition of 5% of *S.cerevisiae*, activation with epichlorohydrin, immobilization for 72 h at pH 10.05, room temperature and reduction of the final derivative). This best derivative was 9900-fold more stable than the soluble enzyme. A maximum load of 40 mg chymotrypsin.g.gel<sup>-1</sup> was reached. The number of aldehyde and oxirane groups generated in the support, and of lysine residues of the enzyme involved in the multipoint attachment, as well SEM images of the gel structures, explain the obtained results. Carboxypeptidase A derivatives was analyzed. The results showed that immobilization via epichlorohydrin presented 40% (8.8) more stable derivatives than glutaraldehyde ones (5.3). However, derivative prepared with epoxides groups presented 100% of immobilization yield with 57% of recovered activity being 20-fold more stable than free enzyme after 48h of immobilization process. Derivatives activated by glutaraldehyde, epichlorohydrin and with epoxides presented diffusion limitations with  $D_{eff}$  of  $5.41.10^{-12}$ ,  $5.59.10^{-12}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> and  $5.10.10^{-12}$  m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, respectively. To cellulase, assays of immobilization and saccharification of sugarcane bagasse cane were tested. The derivative used in a sequence of three distinct batches, was prepared with chitosan-alginate activated with glutaraldehyde/glycidol being 20-fold more stable than free enzyme. The best enzyme derivative was about 38 – fold more stable activated via glycidol. The performance of the system of saccharification was excellent, indicating that enzyme immobilization may be a good alternative to reduce costs of ethanol production from lignocellulosic materials.

Keywords: Enzyme technology, chymotrypsin, carboxypeptidase A, cellulase, enzyme immobilization, chitosan, sugarcane bagasse hydrolysis, cheese whey hydrolysis.



# *Capítulo 1*

## *Introdução*

## 1. Introdução

A imobilização de enzimas a suportes pré-existentes mediante união covalente multipontual tem tido excelentes resultados com um grande número de enzimas: tripsina, quimotripsina, penicilina G acilase,  $\beta$ -galactosidase e termolisina [1,2]. A imobilização microbiana ou enzimática pode ser definida como um aprisionamento ou fixação de células e enzimas em uma fase fixa ou distinta, ligada a uma superfície ou incrustada em uma matriz de gel. Os suportes utilizados para a imobilização de enzimas são em sua maioria, insolúveis em água e possuem alta massa molecular, sendo na maioria dos casos polímeros hidrofílicos. Dentre estes, destaca-se a quitosana, um amino polissacarídeo formado por unidades repetidas de D-glucosamina derivado da quitina, um polímero de ocorrência natural encontrado nas paredes celulares dos fungos, leveduras, insetos e principalmente nas carapaças dos crustáceos, notadamente camarão, lagosta e caranguejo, constituindo cerca de 30% do exoesqueleto destes últimos. É um produto de baixo custo por ser um resíduo da indústria de pesca, não tóxico e possuidor de grupos amino primários funcionais em potencial, uma importante característica como suporte para imobilização de enzimas. A imobilização de células e enzimas se processa por vários métodos, incluindo a ligação covalente com o suporte, adsorção ou entrelaçamento. O tipo de ligação e a interação existente entre o suporte e as células ou enzimas depende da natureza do suporte e do tipo de material a ser imobilizado. A estabilidade da imobilização está diretamente ligada à interação entre o suporte e as células ou enzimas [3].

A imobilização de enzimas em materiais inertes e insolúveis é uma área ativa de pesquisa. Enzimas imobilizadas são mais estáveis que as solúveis, podem facilmente ser reutilizadas e seu uso facilita o isolamento do produto, o que diminui os custos de operação. Estas são características desejáveis para o uso comercial, mas a imobilização muitas vezes modifica os parâmetros da reação enzimática. Mudanças conformacionais e estéricas e restrições difusionais causadas pelo processo afetam a atividade da enzima. Este efeito depende da enzima, dos substratos e produtos utilizados, do tipo de suporte e do método de imobilização [4]. Apesar de milhares de enzimas conhecidas e dos seus múltiplos usos, somente algumas se converteram em catalisadores de um processo industrial. A escassez de processos enzimáticos em escala industrial é conseqüência da ausência de estudos integrais que dêem soluções aos problemas existentes quando se propõe o projeto de uma reação enzimática. A modulação das propriedades das enzimas através da imobilização em diferentes suportes, com diferentes métodos de ativação, e em diferentes condições de imobilização constitui uma alternativa tecnológica que contribui para solucionar ou atenuar os efeitos

negativos das propriedades enzimáticas, possibilitando a sua utilização em um maior número de processos [5]. O aumento dos esforços na pesquisa e desenvolvimento de novos derivados vem permitindo a substituição de algumas rotas de síntese tradicionais por rotas enzimáticas com menos custos de produção e maior rentabilidade para as indústrias [6].

As obrigações legislativo-ambientais têm estimulado a adoção por parte das indústrias químicas e farmacêuticas de métodos biológicos que ofereçam, principalmente, processos limpos. Este fato é decorrente da intensa poluição ocasionada pela liberação de resíduos protéicos líquidos sem tratamento prévio [7], bem como da necessidade do aproveitamento do bagaço de cana-de-açúcar como uma nova matriz energética através de sua hidrólise enzimática para produção de etanol. .

Dois exemplos bastante oportunos são o soro de leite e o bagaço de cana-de-açúcar. O soro de queijo, apesar de ser considerado um poluente orgânico, começa a ser visto como uma importante fonte de matéria-prima para as indústrias de alimentos, farmacêutica e química. A hidrólise controlada das proteínas do soro com proteases específicas permite gerar um hidrolisado composto de pequenos peptídeos e teor reduzido de aminoácidos aromáticos, em especial fenilalanina. Esse produto possui propriedades melhores que as presentes num hidrolisado constituído de aminoácidos livres e poderá ser usado na dieta de fenilcetonúricos. A hidrólise controlada pode ser feita utilizando proteases de grande especificidade, tais como tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A, e se constitui em processo que vem sendo estudado a alguns anos no grupo. A produção de derivados estabilizados dessas enzimas, utilizando suporte nacional, é, pois de grande interesse.

Já resíduos lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar e a palha de cereal moída são abundantemente produzidos no Brasil e estão disponíveis para utilização biotecnológica [8,9]. No caso do Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar, subproduto da indústria sucroalcooleira, destaca-se como um dos materiais lignocelulósicos mais abundantes, com produção superior a 100 milhões de toneladas, dos quais cerca de 8% não tem uma destinação apropriada. Uma das formas de utilização do bagaço de cana é na co-geração de energia, uma prática muito utilizada nas usinas, com produção média em torno de 30 kW/h/tonelada de cana moída.

Os resultados obtidos até agora pelos pesquisadores que vêm trabalhando com lignocelulósicos mostram que a hidrólise enzimática vem se inviabilizando pelos altos custos com as enzimas celulasas, um complexo de endo, exoenzimas e  $\beta$ -glicosidase e as xilanases envolvidas na degradação de celulose e xilanas. Estudos indicam que até 60% do custo operacional do processo enzimático corresponde à reposição do complexo enzimático de

celulases e muito esforço vem sendo investido na obtenção de enzimas mais baratas. Além disso, um dos principais problemas na hidrólise enzimática reside na reusabilidade da enzima, pois esta não é separada facilmente do meio reacional. A imobilização/estabilização de celulases poderá auxiliar a superar essa grande desvantagem da rota enzimática, pois permite fácil recuperação da enzima e aumenta sua vida operacional, reduzindo, portanto, custos com o catalisador [10,11].

Tornam-se necessários estudos enfocados na produção de derivados de baixo custo e estáveis de enzimas (quimotripsina, carboxipeptidase A e celulase) e caracterização destes em busca do melhor biocatalisador para a produção de hidrolisados a partir das proteínas do soro, bem como a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol.

Este projeto de pesquisa tem como objetivo geral produzir e caracterizar novos derivados de enzimas industriais, dentre as quais se destacam quimotripsina, carboxipeptidase A e celulase, em quitosana pura e híbridos de quitosana com outros polímeros de baixo custo utilizando diferentes protocolos de ativação e vários métodos de imobilização, bem como testar os melhores derivados obtidos nas respectivas reações de interesse de cada enzima.

## 1.1 Referências bibliográficas

- [1] Hernández-Justiz, O.; Fernández-Lafuente, R.; Terreni, M.; Guisán, J. M. Use of aqueous two phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v.59, p.73-79. **1998**.
- [2] Gonçalves, L. R. B. *Estudo cinético da síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em glioxil-agarose*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2001**.
- [3] Messing, R. A. *Immobilized enzymes for industrial reactors*. London: Academic Press, Inc. LTD. **1975**.
- [4] González Siso, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, v.57, p.1-11. **1996**.
- [5] Cardias, H. C. T.; Grininger, C. C.; Trevisan, H. C.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin g acylase on macroporous silica. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, p.141-148. **1999**.
- [6] Schmid, A.; Hollman, F.; Park, B. J.; Buhler, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, v.13, p.359-366. **2002**.
- [7] Galvão, C. M. A. *Hidrólise de proteínas do soro de queijo com tripsina e quimotripsina livres e imobilizadas*. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2000**.
- [8] Coelho, M. Z.; Leite, S. G. F.; Rosa, M. F. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *CEPP*, v.19, n.1, p.33-42. **2001**.
- [9] Ramos, L. P. The chemistry involved in the stream treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, n.6, p.863-871. **2003**
- [10] Gu, L.; Mao, X.; Guo, G.; Huang, J.; Du, Z.; Huang, Z.; Ma, L.; Li, P. A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, n.2, p.189-195. **2006**.
- [11] Xia, L.; Shen, X. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. *Process Biochemistry*, v.39, p.1363-1367. **2004**.

# *Capítulo 2*

## *Revisão bibliográfica*

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Soro de Queijo

A utilização do soro de queijo é assunto de muita pesquisa. Reduções de demanda biológica de oxigênio (DBO) em níveis de 75%, com a produção concomitante de biogás, etanol, foram alcançadas e o soro hoje em dia não é um poluente, mas um recurso. Porém, anualmente a produção mundial do soro de queijo está aumentando e estão sendo buscados novos bioprodutos por biotecnologia para reutilizar o soro produzido. O soro é a porção aquosa que se separa do coalho durante o processo convencional de fabricação de queijo. É um fluido opaco, de coloração amarelada, sabor salgado e perecível. Retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, dentre eles a lactose, sais minerais, lipídeos, proteínas solúveis, ácidos láctico, cítrico e úrico e vitaminas do grupo B [1-3].

No Brasil, o consumo de queijo tem atingido níveis recordes de consumo nos últimos anos e continua em ascensão. Aliada a estes dados está a necessidade de criar alternativas para utilização do soro, pois o tratamento de efluentes dessa natureza é caro e este subproduto é rico em nutrientes podendo assim ser empregado em várias áreas [4].

As proteínas do soro possuem um dos mais altos índices de valor biológico quando comparado a outras fontes de proteínas. O uso dessas proteínas está aumentando progressivamente à medida que as indústrias aumentam a capacidade de produzir concentrados das proteínas do soro isolados de proteínas séricas totais, ou concentrados ricos em frações específicas de proteínas do soro [5].

O soro de queijo começa a ser visto como uma importante fonte de matéria-prima para as indústrias de alimentos, farmacêutica e química. A hidrólise controlada das proteínas do soro com proteases específicas permite gerar um hidrolisado composto de pequenos peptídeos e teor reduzido de aminoácidos aromáticos, em especial fenilalanina. Este hidrolisado com baixo teor de fenilalanina poderá ser usado na dieta de fenilcetonúricos, bem como, edulcorante na indústria alimentícia. A hidrólise controlada pode ser feita utilizando proteases de grande especificidade, tais como tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase A, e se constitui em processo que vem sendo estudado a alguns anos no laboratório de Tecnologia Enzimática/ DEQ-UFSCar. A produção de derivados estabilizados dessas enzimas, utilizando suporte nacional, é, pois de grande interesse.

Novas plantas com processamentos diários de mais de dois milhões de quilogramas de leite por dia, vêm sendo construídas durante os últimos três anos nos Estados Unidos. Nenhum produto de alto valor agregado foi ainda fabricado nestas plantas. Entretanto,

mercados estão se expandindo e os custos e lucros de cada processo industrial decidirão quais produtos serão mais rentáveis no futuro [6].

### **2.1.1 Hidrólise das proteínas do soro de queijo**

Os hidrolisados protéicos são preparados pela degradação relativamente completa das moléculas de proteína em peptídeos menores e, eventualmente, em aminoácidos essenciais. Essa degradação – ou hidrólise – pode ser catalisada por ácido, base ou por proteases [7].

A hidrólise enzimática é muito eficiente e pode ser realizada em condições brandas, mantendo a qualidade nutricional dos aminoácidos [8].

A via enzimática da hidrólise de proteínas alimentícias, por muitos anos, representou uma alternativa para pacientes hospitalizados e impossibilitados de ter uma nutrição adequada através de alimentos sólidos comuns. O emprego dessa técnica se dá devido à melhoria nas características nutricionais, solubilidade permutável, melhoria na textura, remoção de sabor e fatores antinutricionais, dentre outros [9].

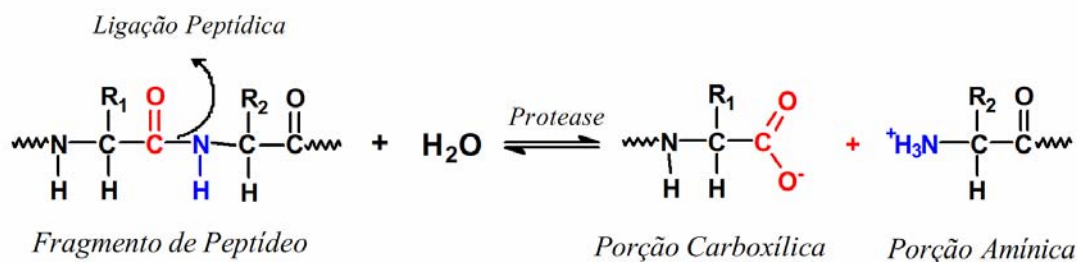
Os hidrolisados das proteínas do soro têm as seguintes aplicações: complemento nutricional para atletas e pessoas alérgicas a algum tipo de proteína, alimentação infantil, produção de aromas de carnes e cosméticos e na produção de antianêmicos [10].

### **2.1.2 Enzimas proteolíticas**

As proteases são enzimas específicas cuja principal atividade é catalisar reações de hidrólise de proteínas. Diferem entre si principalmente por sua especificidade, sítio ativo e mecanismo catalítico.

Na proteólise de uma ligação peptídica, uma molécula de água reage com um grupo carbonil peptídico e a ligação com o grupo amino do aminoácido seguinte é rompida - Figura 2.1.





**Figura 2.1** Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease [12].

As enzimas deste grupo catalisam a hidrólise de ligações peptídicas pelo ataque nucleofílico sobre a ligação carbono-oxigênio assistida pela doação de um próton para o nitrogênio peptídico. Os resíduos de asparagina, histidina e serina atuam como nucleófilo e doadores de prótons. As serina-proteases podem ser obtidas a partir do pâncreas de animais como a tripsina e quimotripsina ou a partir de bactérias como a subtilisina [11,12].

### 2.1.3 Quimotripsina

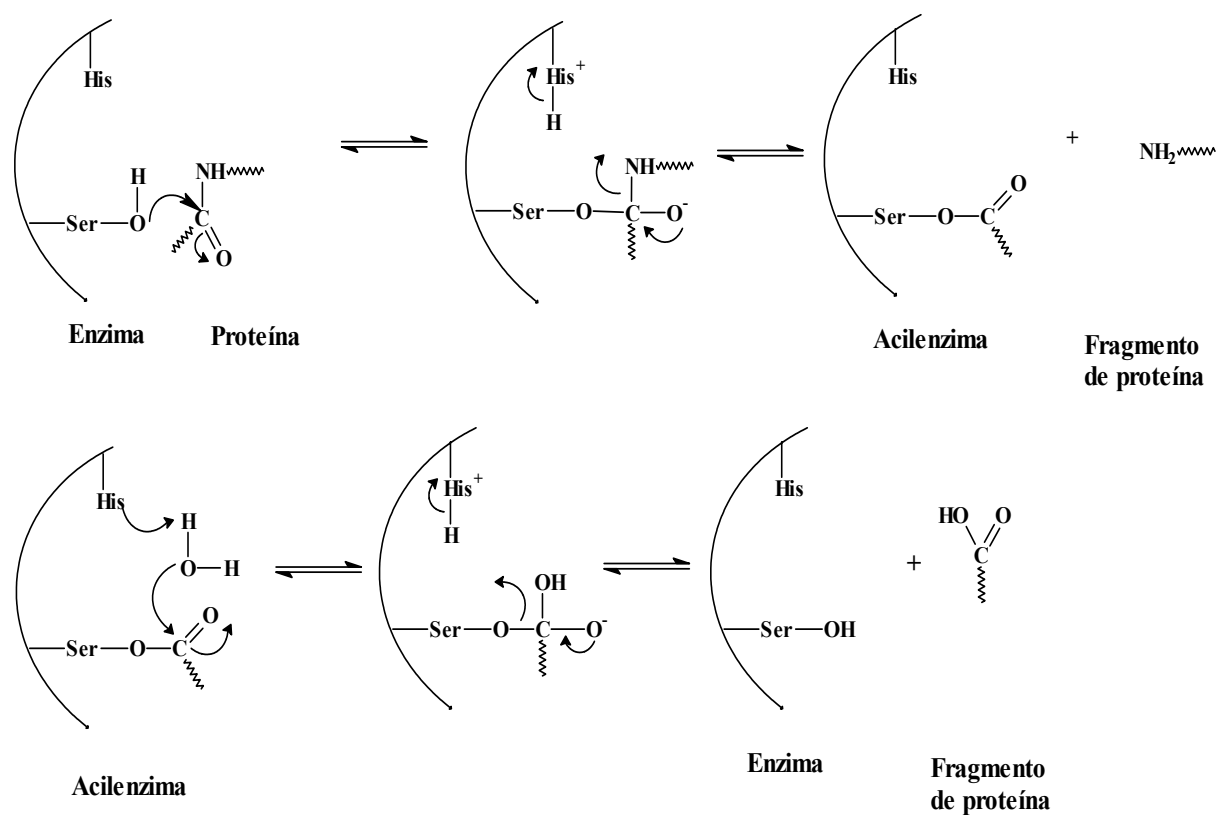
A quimotripsina (EC 3.4.21.1) é sintetizada por biossíntese proteica como um precursor denominado quimotripsinogênio enzimaticamente inativo. Rompe-se pela ação da tripsina em duas partes que permanecem unidas por pontes dissulfeto (S-S) e estas moléculas de quimotripsinogênio podem ativar outras eliminando dois pequenos peptídeos em uma *trans*-proteólise. A molécula resultante é uma quimotripsina ativa, uma molécula tripeptídica interconectada por pontes dissulfeto. Sua estrutura é composta por três cadeias: A (13 aminoácidos), B (131 aminoácidos) e C (97 aminoácidos) com massa molecular de 25,66 kDA e ponto isoelétrico de 8,4. A quimotripsina *in vivo* é uma enzima proteolítica que atua nos sistemas digestivos dos mamíferos e outros organismos. Facilita a ruptura de ligações peptídicas por reações hidrolíticas, um processo que apesar de ser termodinamicamente favorável ocorre de forma lenta na ausência de catalisadores. O principal substrato da quimotripsina inclui o triptofano, tirosina, fenilalanina e metionina, que são hidrolisados em seus grupos carboxil terminal.

Como em várias proteases, a quimotripsina também hidrolisa ligações éster *in vitro*, característica que permite a utilização de substratos análogos como o éster N-acetil-L-fenilalanina-p-nitrofenil para análises enzimáticas.

A quimotripsina rompe as ligações peptídicas atuando sobre o grupo carbonil não reativo com um potente nucleófilo, o resíduo 195 da serina que se localiza no centro ativo da

enzima, que se une covalentemente ao substrato formando um intermediário enzima-substrato.

A reação da enzima com seu substrato ocorrem em duas etapas, uma primeira fase de "ignição" ao princípio da reação e um estado estacionário posterior, seguindo a cinética de Michaelis-Menten. A forma de atuar da quimotripsina se explica como uma hidrólise que ocorre em duas etapas: primeiro se acila o substrato para formar um intermediário acil-enzima que posteriormente perde o grupo acil para que a enzima retorne ao seu estado original [13]. O mecanismo de ação da quimotripsina está ilustrado na Figura 2.2.



**Figura 2.2** Catálise da quebra de uma ligação peptídica numa proteína, efetuada pela quimotripsina. A histidina e a histidina protonada atuam como base e ácido em duas reações de substituição nucleofílica sucessivas: quebra da proteína com formação da acilenzima e liberação de um fragmento de proteína; hidrólise da acilenzima com regeneração da enzima e liberação de outro fragmento de proteína [12].

### 2.1.4 Metaloenzimas

Dentro deste grupo, estão as (metalo-proteases) exopeptidases, encontradas nos tecidos de animais superiores e sendo todas inibidas por agentes quelantes, por conterem um íon metálico no sítio ativo, participante do mecanismo catalítico. São também encontradas em bactérias e bolores e são mais ativas em pH 7,0. Como exopeptidases que necessitam de zinco, tem-se a carboxipeptidase A. Como aquelas que necessitam de manganês, tem-se a polidase e a iminopeptidase com especificidade para resíduos de prolina carboxi e amino terminal, respectivamente [12]. Ainda existem as hidantoinases que são dependentes de dois íons metais para a sua atividade [14]. Alguns exemplos de metaloenzimas com seus respectivos metais são apresentados na Tabela 2.1

**Tabela 2.1** Exemplo de metaloenzimas [15].

<b>Tipos de reações</b>	<b>Exemplo de sítio ativo M<sup>n+</sup></b>	<b>Enzima</b>
Hidrólise ácida/básica	Zn, (Mg, Co, Ni, Cu)	anidrase carbônica
Transferência de elétrons	Fé, Cu	citocromos
Oxidação (O <sub>2</sub> )	Fe, Cu	citocromo P-450
Oxidação (H <sub>2</sub> O)	Mo, Mn	aldeído oxidase
Oxidação (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , RO <sub>2</sub> H)	Se, Fe	peroxidases
Hidrogenação	Ni, Fe	hidrogenases

### 2.1.5 Carboxipeptidase A

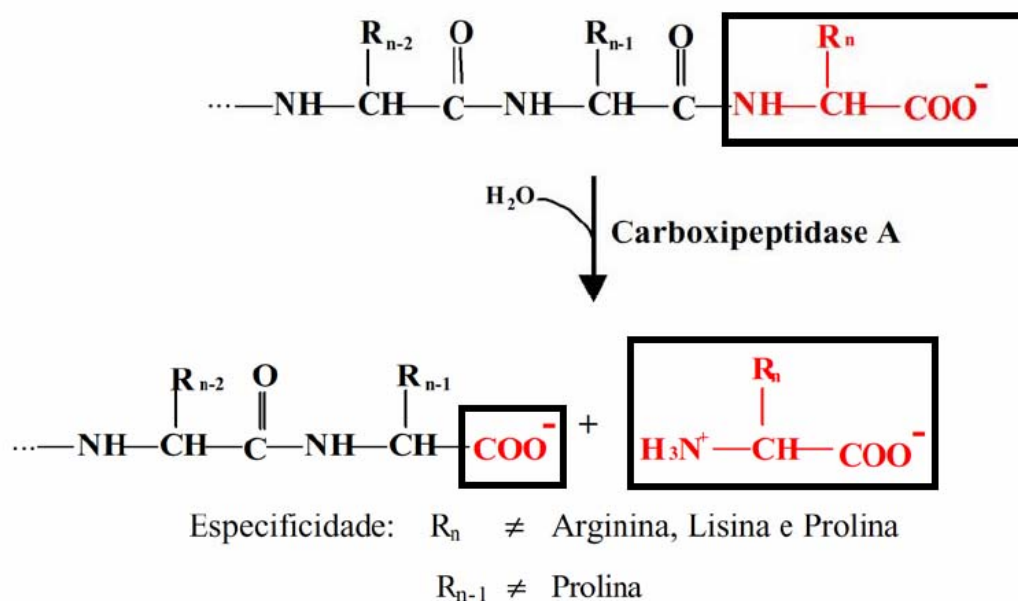
A carboxipeptidase A é uma exopeptidase produzida no pâncreas de animais superiores como um composto de três cadeias polipeptídicas (massa molecular de 80 KDa), que por ativação com tripsina produz a enzima com uma única cadeia contendo 307 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 34,5 KDa. Esta enzima possui regiões de  $\alpha$ -hélice (38%) e de folha pregueada  $\beta$  (17%). Carboxipeptidase A hidrolisa ligações peptídicas contendo resíduos carboxi-terminais que não seja arginina, lisina ou prolina.

CPA remove rapidamente os aminoácidos aromáticos carbóxi-terminais (tirosina, fenilalanina e triptofano), mas também aminoácidos hidrofóbicos e alifáticos volumosos, tais como: leucina, isoleucina, metionina, treonina, glutamina, histidina, alanina e valina.

Nesta enzima, o íon zinco está coordenado com três aminoácidos His<sup>196</sup>, His<sup>69</sup> e Glu<sup>72</sup> e uma molécula de água. O íon zinco pode ser removido por fortes agentes quelantes e substituído por cobalto, níquel ou chumbo.

A cadeia lateral do resíduo carboxi-terminal a ser liberado liga-se a uma cavidade hidrofóbica expulsando moléculas de água (pelo menos quatro moléculas). Essa interação hidrofóbica é a base da preferência desta enzima por cadeias laterais aromáticas ou alifáticas volumosas. No caso da carboxipeptidase B, específica para lisina e arginina carboxi-terminais (resíduos polares), a cavidade hidrofóbica contém um resíduo aspartato.

O oxigênio carbonílico da ligação peptídica susceptível coordena-se com o íon zinco, que atua como um ácido de Lewis e polariza o grupo carbonila da ligação peptídica susceptível, facilitando o ataque no átomo de carbono polarizado pelo grupo carboxílico do Glu<sup>270</sup>, ou por uma molécula ativada de água. Uma polarização similar é obtida por diferentes meios nas serinas proteases. O grupo hidroxila da Tyr<sup>248</sup> move-se aproximadamente um quarto do diâmetro da molécula de enzima (a maior mudança conformacional observada), a partir da superfície da molécula, para formar uma ligação de hidrogênio com o NH da ligação peptídica susceptível e uma ligação com o NH da penúltima ligação peptídica. O Glu<sup>270</sup> forma um anidrido com o átomo de carbono polarizado da ligação peptídica susceptível (ou o Glu<sup>270</sup> promove o ataque de uma molécula de água sobre esse átomo de carbono polarizado). A carga negativa do átomo de oxigênio no intermediário tetraédrico é estabilizada por uma interação eletrostática com a cadeia lateral, carregada positivamente, da Arg<sup>127</sup>, que se moveu para uma posição estratégica próxima. O substrato ligado é envolvido por todos os lados pelos grupamentos catalíticos da enzima (Zn<sup>2+</sup>, Glu<sup>270</sup>, Arg<sup>127</sup>, Arg<sup>145</sup>, Tyr<sup>248</sup>). O intermediário anidrido carboxílico formado torna a ligação cindível pronta para o ataque por uma molécula de água que está ligada ao Zn<sup>2+</sup> [12,13,16,17]. A Figura 2.3 mostra resumidamente a ação da CPA sobre uma ligação peptídica.



**Figura 2.3** Esquema resumido da ação da CPA sobre uma ligação peptídica.

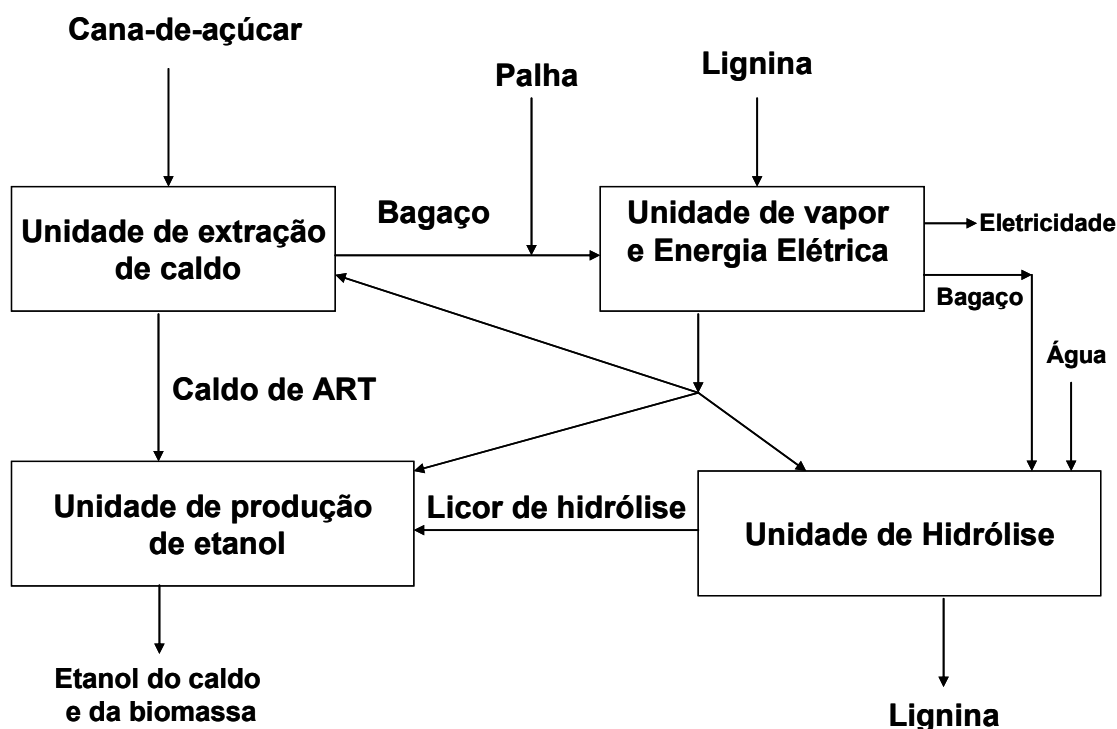
## 2.2 Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima lignocelulolítica

O Brasil, maior produtor de cana - de - açúcar, gera como subproduto o bagaço de cana, um resíduo lignocelulósico oriundo da indústria sucroalcooleira. Nos últimos anos, a produção de cana-de-açúcar superou os 100 milhões de toneladas. Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada, são gerados em média 230 kg de bagaço [18]. A composição química do bagaço integral é de 46,0% de celulose, 25,2% de hemicelulose e 20,7% de lignina [19].

Uma das formas de utilização deste resíduo é a cogeração de energia através da queima do bagaço em caldeira sendo uma prática tradicional na indústria sucroalcooleira. No Brasil, para cada tonelada de cana moída é produzido cerca de 30 kW.h<sup>-1</sup>. A cogeração de energia através do bagaço irá certamente melhorar a rentabilidade da produção sucroalcooleira, aumentando a competitividade do álcool carburante.

Portanto, existe um excedente de 16 milhões de toneladas de bagaço que podem ser utilizadas para produção de etanol, tecnologia desenvolvida pela empresa DEDINI com parceria da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. A “DHR”, Dedini Hidrólise Rápida como é chamada, baseada na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol. Com um hectare de cana, são colhidas 80 toneladas de cana

limpa, Estas 80 toneladas produzem, pelo processo convencional, 6.400 litros de etanol hidratado. Processamento de cana a etanol e energia introduzindo a hidrólise é representado na Figura 2.4.

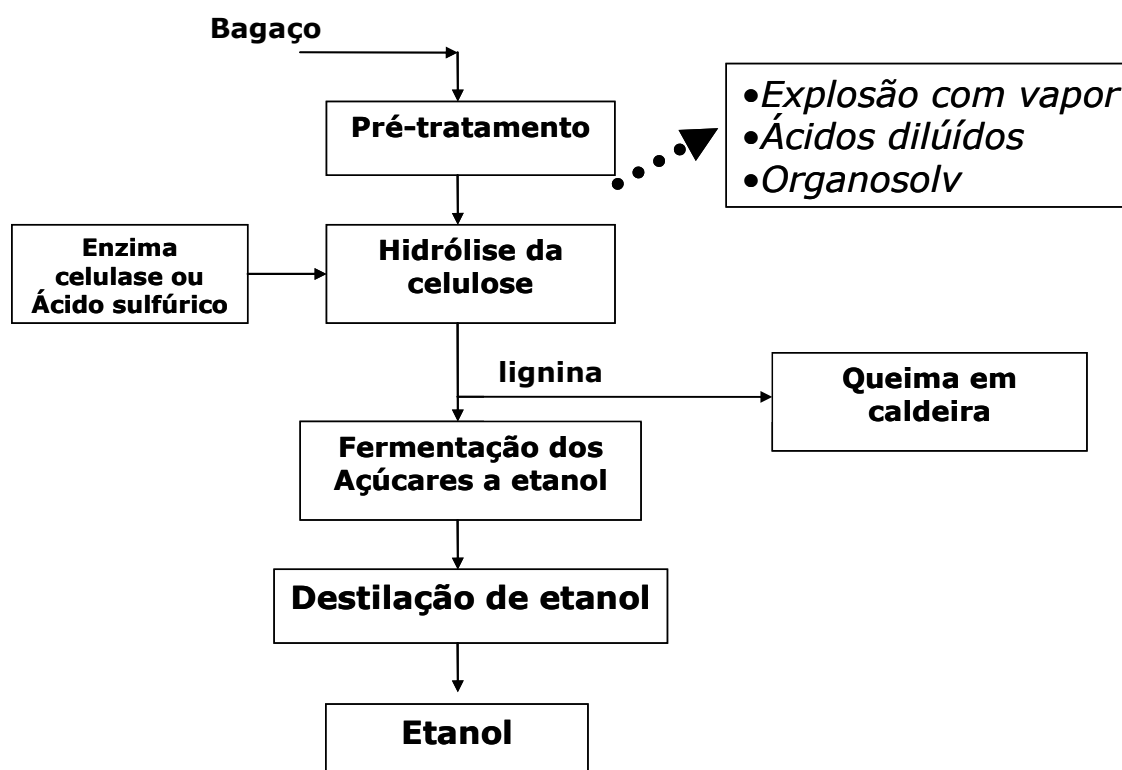


**Figura 2.4** Processamento de cana-de-açúcar a etanol e energia introduzindo a hidrólise.

Se a empresa passar a colher a cana integral, que inclui a palha hoje deixada no campo, a produção por hectare passa a ser de 96 toneladas. Além dos 6.400 litros de etanol hidratado produzido a partir do caldo resultante do processo convencional, a empresa poderá produzir mais 5.650 litros de etanol com o uso da tecnologia DHR para extração de mais açúcar do bagaço e a queima da palha para gerar energia que antes era produzida a partir do bagaço. Somam-se, assim, 12.050 litros produzidos por hectare, ou seja, dobra-se a produção se a tecnologia DHR for empregada e se a palha for usada para geração de energia para a usina.

A hidrólise dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos pode ser feita com diferentes tecnologias utilizadas individualmente ou combinadas: cozimento com vapor a alta pressão seguida ou não de descompressão rápida, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, uso de peróxido de hidrogênio, dissolução da lignina a quente com solvente orgânico ou álcali, entre outros. Dependendo da severidade do processo utilizado o tratamento pode gerar grande quantidade de subprodutos tóxicos aos microrganismos que irão utilizar os açúcares produzidos durante a fermentação.

Por outro lado, um complexo de enzimas (celulases e xilanases), pode catalisar essa hidrólise em condições brandas de reação, sem geração de subprodutos. Evidentemente, será necessário um pré-tratamento do material para facilitar a ação das enzimas, mas esse deve ser brando. Ramos [20] discute os diferentes tratamentos que podem ser utilizados, suas vantagens e desvantagens. Concentração do ácido ou base, temperatura e tempo de processo são variáveis decisivas na composição do hidrolisado resultante. Cozimento rápido sob pressão, utilizando ácido diluído por curto tempo, seguido de descompressão rápida pode ser um bom caminho para se preparar o material para o ataque enzimático. A Figura 2.5 apresenta o processo de hidrólise para obtenção de etanol.



**Figura 2.5** Processo de hidrólise para obtenção de etanol através de hidrólise ácida ou enzimática com fermentação simultânea.

### 2.2.1 Sistema celulolítico produzido por *Trichoderma reesei*

Celulases são capazes hidrolisar a celulose, que é a matéria-prima mais abundante do planeta, a principal fonte de carbono [21] e são encontradas nas paredes celulares de vegetais, constituída de a) glicanas; b) substâncias pécnicas; c) hemiceluloses (xilanas, arabinoxilanas e [4-o-metil]glicoronoxilanas, glicomananas, galactoglicanas, galactoglicomananas, xiloglicanas e glicanas); d) outros polissacarídeos em menores porcentagens (calose,

arabinogalactanas e glicoronomananas); e) glicoproteínas, bem como, álcoois aromáticos formando as ligninas [22]. A celulose apresenta-se na forma amorfa e cristalina [20].

Na hidrólise da celulose é necessário um consórcio de enzimas: endocelulases, exocelulases,  $\beta$ -glicosidase, descritas na literatura como tendo uma ação sinérgica entre elas [22-25]. Este consórcio se divide em:

**I – Endocelulases (EG I,II,III e IV; EC 3.2.1.4)**, são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações  $\beta$ -(1,4) D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações  $\beta$ -(1,4) em D-glicanas que contêm ligações  $\beta$ -(1,3). As endocelulases são também conhecidas como carboximetilcelulases ou endoglucanase. Seu substrato natural é a celulose e xiloglicana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), avicel (celulose cristalina),  $\beta$ -glicana e xilana.

**II – Exocelulase ou Celobiohidrolases (CBH I e II; EC 3.2.91)**, conhecida como avicelases ou exocelulase. Catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -(1,4)-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras da cadeia.

**III -  $\beta$ -Glicosidases (EC 3.2.1.21)**, conhecida como celobiases. Catalisa a hidrólise de resíduos  $\beta$ -D-glicose terminais não redutoras, liberando  $\beta$ -D-glicose. Apresentam ampla especificidade por  $\beta$ -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também  $\beta$ -galactosídeos,  $\alpha$ -L-arabinosídeos,  $\beta$ -D-xilonosídeos.

As endocelulases e as celobiohidrolases degradam celodextrinas solúveis e celulose amorfa, enquanto somente as celobiohidrolases, com notáveis exceções, degradam a celulose cristalina eficientemente.

A endocelulase quebra aleatoriamente a cadeia polimérica, posteriormente a exocelulase quebra o final dessa cadeia em um dímero de glicose (celobiose). Por último, a  $\beta$  – glicosidase converte a celobiose em glicose [22].

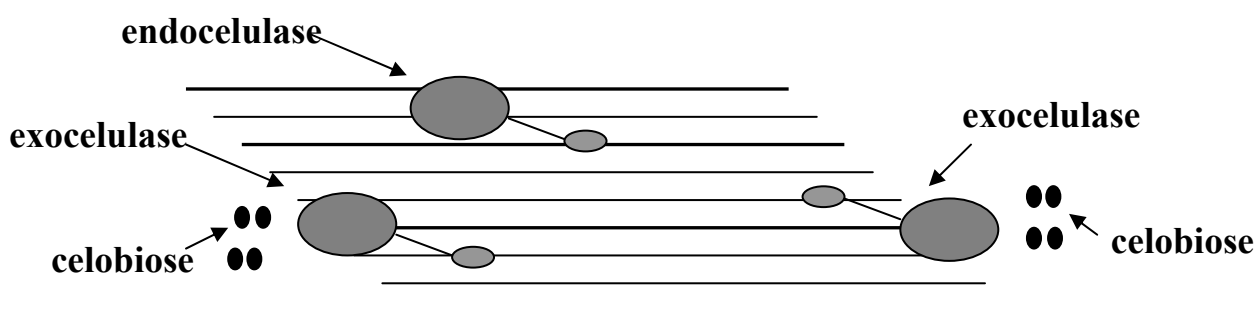
### 2.2.2 Mecanismo de ação das celulases: Sinergismo

Apesar das hipóteses apresentadas por alguns autores, relacionadas com a especificidade das diferentes celulases e o seu modo de ação, é geralmente reconhecida a existência de três tipos de celulases nos sistemas completos: exocelulases ou celobiohidrolases (CBH), endocelulases e  $\beta$ -glicosidase (celobiase).



As endocelulases hidrolisam majoritariamente as ligações internas da celulose, produzindo novas cadeias terminais, logo causam uma diminuição considerável no grau de polimerização da celulose [26,27]. As exocelulases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose [26,28]. CBHI e CBHII quebram as unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora do polímero, respectivamente [26,29]. As celobiohidrolases também podem atuar nas regiões cristalinas da celulose sem a ajuda das endocelulases [26,30]. As  $\beta$ -glicosidades completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glicose.

A hidrólise da celulose cristalina pelas celulases requer a ação sinérgica das endocelulases e das celobiohidrolases. O máximo sinergismo é obtido com uma elevada quantidade de exocelulases na mistura [31]. Sabe-se também que o grau de sinergismo depende do substrato usado [32]. A Figura 2.6 representa o mecanismo sinérgico acima descrito.



**Figura 2.6** Mecanismo de ação sinérgico do complexo de celulases.

### 2.2.3 Aplicações biotecnológicas da enzima celulase

Há várias aplicações da celulase em processos biotecnológicos na qual em sua grande maioria produzida por fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* para degradação de materiais lignocelulósicos [33,34]. As indústrias de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, medicina, química fina, agroindústria e de alimentação animal e silagem vêm aplicando essa tecnologia enzimática para redução de custos operacionais, aumento da qualidade e buscando processos mais limpos diminuindo assim os impactos ambientais. A produção de etanol utilizando biomassa lignocelulósicos atrai as atenções de pesquisadores em busca de um processo mais econômico e alternativo [34,36]. Kim e colaboradores [34] propuseram a fermentação por meio sólido da palha de arroz e

farelo de trigo por *Aspergillus niger* em busca de energia alternativa, produzindo etanol. Tal processo consiste em hidrolisar os materiais lignocelulósicos reduzindo os principalmente em glicose e xilose e transformá-los posteriormente em caldo de açúcares para bioconversão em etanol.

## 2.3 Tecnologia enzimática

Na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial existem limitações associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, pois são pouco versáteis, exigem altas temperaturas e possuem baixa especificidade. As enzimas são catalisadores que atuam em condições brandas de temperatura, pH e pressão.

A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação durante a década de 60, com a imobilização de enzimas para utilização em processos químicos [37]. Desde então, os processos enzimáticos têm sido aplicados em diversos setores, incluindo construção de biossensores, terapia enzimática, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais como curtumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos e dentre outras aplicações.

O crescimento no mercado de enzimas é de aproximadamente 4-5% ao ano. O crescimento para os próximos 4 anos também está estimado em torno de 3%, com estimativa para 2009 de US\$ 2,4 bilhões de dólares [35].

### 2.3.1 Suportes para imobilização

Segundo Messing [38], suportes para imobilização de enzimas podem ser classificados conforme sua composição e morfologia. A Tabela 2.2 mostra a classificação de suportes em termos de composição.

**Tabela 2.2** Classificação dos suportes conforme a composição [39].

<b>Orgânico</b>
<p>Polímeros naturais</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Polissacarídeos: celulose, dextranas, ágar, agarose, quitina, quitosana, alginato, carragenana</li> <li>▪ Proteínas: colágeno, albumina</li> <li>▪ Carbono</li> </ul> <p>Polímeros sintéticos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Poliestireno</li> <li>▪ Poliacrilato, polimetacrilato, poliamidas, poliacrilamida</li> </ul>
<b>Inorgânicos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Minerais naturais: bentonita, sílica</li> <li>▪ Materiais processados: vidro (não poroso e poro controlado), metais, óxidos.</li> </ul>

Suportes inorgânicos são mais adequados para o uso industrial devido as suas propriedades físicas, além disso, apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como: elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de microrganismos e fácil regeneração por processo de pirólise. No mais, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas são obtidas com matrizes orgânicas, provavelmente, devido a grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos [11].

Quanto à morfologia, os suportes podem ser: porosos, não porosos e estrutura gel. Os suportes porosos, tanto orgânicos quanto os inorgânicos, apresentam como vantagem grande área superficial interna disponível para imobilização da enzima, que neste caso fica protegida

de turbulência externa. Observa-se que a morfologia interna dos suportes porosos permite não só a imobilização da enzima, como também o acesso das moléculas de produtos e substratos. Os não-porosos eliminam a resistência à transferência de massa interna, contudo, apresentam uma limitada área superficial disponível para imobilização de enzimas. Para aumentar a carga de enzima imobilizada, utilizam-se partículas finas ou fibras, porém, estas são dificilmente removidas da mistura reacional, limitando o uso em reações contínuas, desde que levadas a uma alta pressão em reatores de leito fixo. Além disso, influem no grau de escoamento se utilizadas em reatores de leito fluidizado [40].

Os géis, embora de uso simples, são úteis apenas nos casos em que a grade formada seja de malha suficiente para reter a enzima sem implicar em restrições difusionais sérias para o substrato.

O suporte para imobilização de enzimas deve apresentar numerosos grupos de fácil ativação para participar de múltiplas ligações entre os grupos reacionais [41]. Para se conseguir uma imobilização com múltiplas ligações, necessita-se uma elevada densidade de grupos funcionais no suporte e uma congruência geométrica entre suporte e enzima. Esta imobilização multipontual da enzima ao suporte aumenta a estabilidade enzimática [42].

Segundo Rossel [42], suportes porosos com uma área superficial muito maior que a enzima, serão os mais adequados, pois permitirão interações proteína-superfície planas, ideais para estabelecer ligações em vários pontos com a enzima sem impedimento estérico. Devem possuir numerosos grupos ativáveis como, por exemplo, hidroxila. Copolímeros e sólido poroso tipo géis de agarose, sílica e alumina atendem a essas especificações.

Dado que o desejado é a multinteração enzima-suporte, a escolha dos grupos reativos na enzima deve recair sobre os grupos amino terminais ou grupos lisina residual dada sua reatividade. A maioria das proteínas apresenta alguns resíduos de lisina os quais geralmente não estão envolvidos no sítio ativo da enzima. Grupos amino são polares e estes ficam geralmente expostos para o meio na superfície da proteína e, quando desprotonados, são muito reativos e, mesmo sem prévia ativação, atuam como agente nucleofílico contra os átomos com carga parcial positiva localizado na superfície do suporte.

O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos deve-se à reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica enquanto reagem reversivelmente com grupos amino da enzima [40].

### 2.3.1.1 Quitosana

Quitosana é um derivado N - desacetilado da quitina, embora esta desacetilação nunca seja completa. Uma nomenclatura bem definida para este grau de desacetilação ainda não está bem definida entre quitina e quitosana [43,44]. As estruturas da celulose, quitina e quitosana são apresentadas na Figura 2.7. Estes polímeros naturais apresentam vantagens em relação aos sintéticos por terem menos limitações quanto à biodegradação e biocompatibilidade. Entretanto, podem exibir uma limitação em suas reatividades e processamentos.

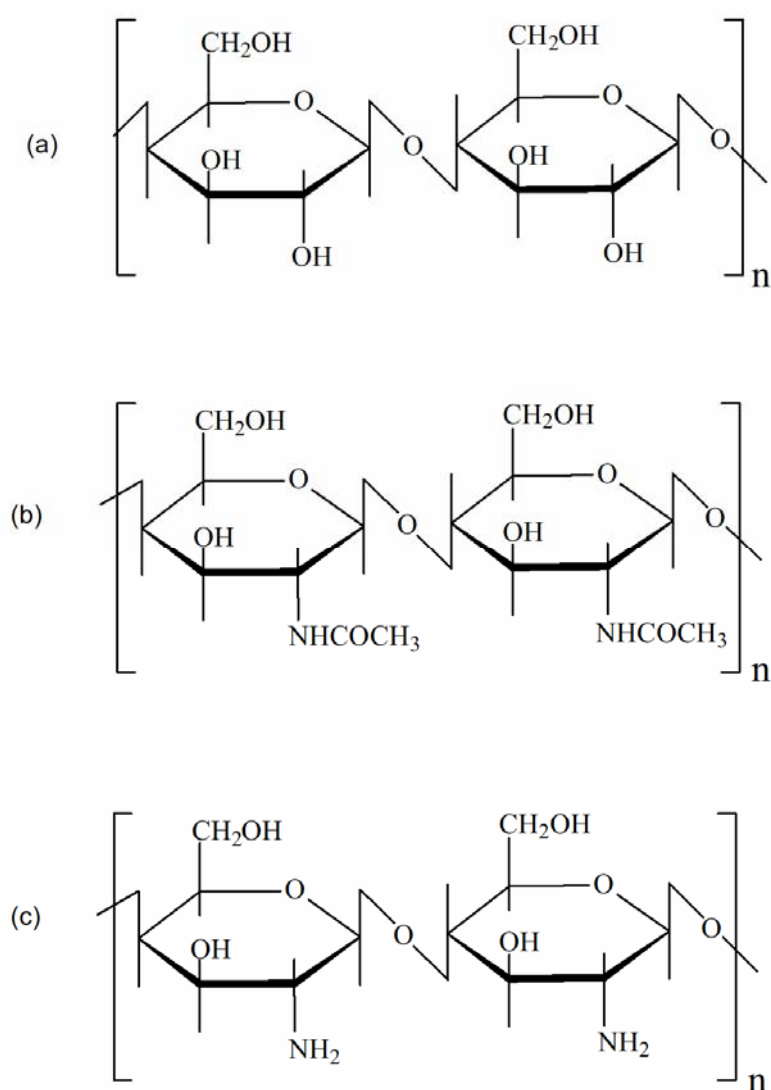
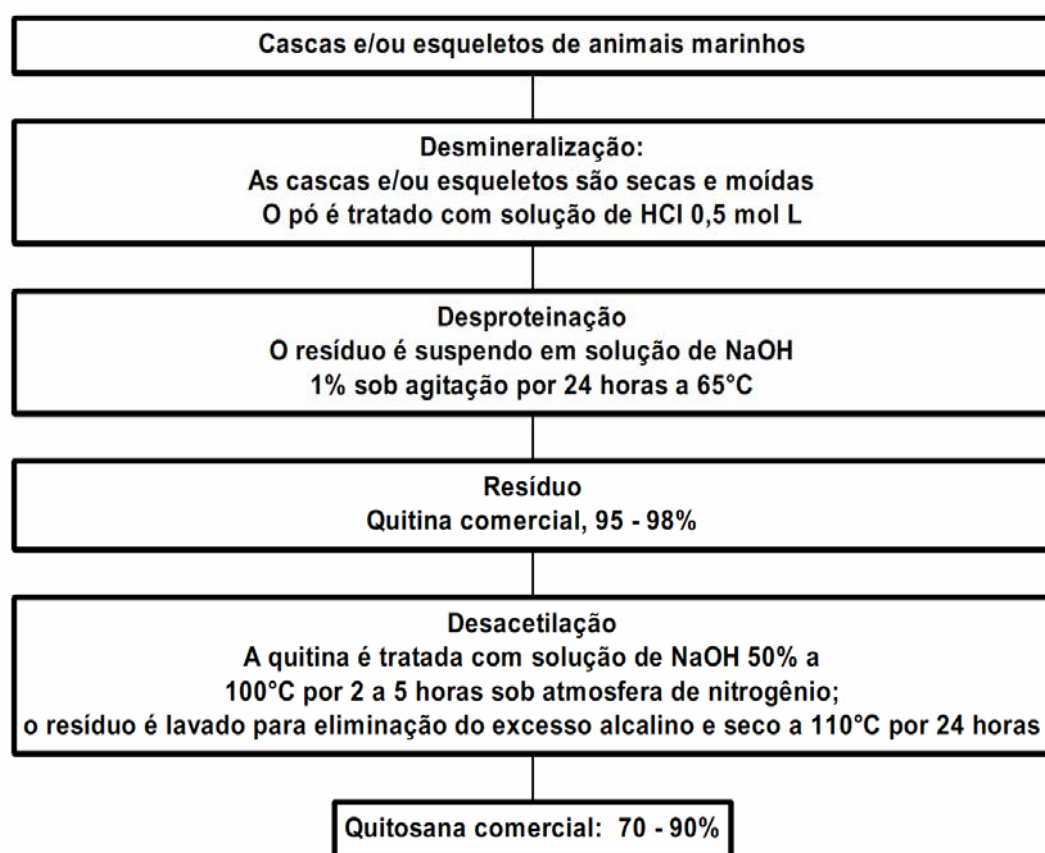


Figura 2.7 Representação esquemática das estruturas primárias de (a) celulose, (b) quitina e (c) quitosana.

A quitosana apresenta um grande interesse industrial devido a sua alta percentagem de nitrogênio (6,89%) comparado à celulose sintética substituída (1,25%). Isto faz da quitosana um potente agente geleificante [43], propriedade que é responsável por muitas das aplicações

da quitosana em diversos setores de síntese e produção industrial. Outro importante fator é que a quitina (precursor da quitosana) é o polímero mais abundante na natureza depois da celulose.

A extração de quitina a partir de cascas e esqueletos de animais marinhos vem sendo proposta em inúmeros trabalhos na literatura. Um exemplo de procedimento para obtenção comercial de quitina e quitosana é apresentado na Figura 2.8 e depende de algumas etapas químicas. Alguns destas etapas são bastante drásticas e podem causar degradação na cadeia polimérica [45].



**Figura 2.8** Diagrama de produção comercial de quitina e quitosana [45].

A quitosana é solúvel em ácidos diluídos como ácido acético e fórmico, além disso, sofre reações típicas de aminas, dentre as quais, N-acetilação e reação de Schiff são mais importantes. Este polímero é interessante devido ao alto conteúdo de grupos amino primário, que permitem a quitosana ser homoganeamente modificada em meio aquoso enquanto a nucleofilidade destes grupos permitem modificações químicas na molécula visando a um melhor desempenho funcional [46].

Os grupos aminos livres presentes no polímero podem adquirir uma carga positiva em presença de soluções ácidas diluídas formando um sal solúvel que confere à quitosana importantes propriedades. Destas, destaca-se a quelação podendo se ligar a compostos específicos como as enzimas, gorduras, íons metálicos. Em pH ácido, ela se comporta como um polieletrólito, apresentando alta densidade de carga (carga positiva por cada unidade de glicosamina). Isto favorece as enzimas que possuem cargas negativas apresentando forte interação devido à carga positiva da quitosana [47].

O grau de desacetilação é uma outra importante propriedade da quitosana, sendo que este mede a quantidade de grupos aminos livres no polissacarídeo. Para definir o grau de desacetilação da quitosana analiticamente, utilizam-se ferramentas como espectroscopia no infravermelho, espectrofotometria no ultravioleta e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono [48-51]. Já a distribuição da massa molecular da quitosana tem sido feita por cromatografia líquida de alta eficiência [52] e cromatografia de permeação em gel [53].

### 2.3.1.2 Gelatina

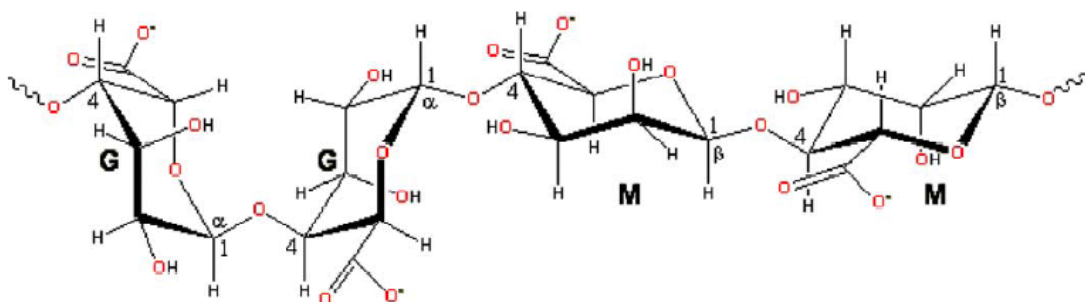
Gelatina é preparada pela desnaturação térmica do colágeno isolado de pele animal e ossos com ácidos diluídos. Também pode ser extraído de peles de peixe. Gelatina contém um número grande de glicina (quase 1 em 3 resíduos), prolina e resíduos de 4-hidroxiprolina. Uma estrutura típica é - Ala-Gly-Pro-Arg-Gly-Glu-4Hyp-Gly-Pro.

Gelatina é uma mistura heterogênea de um ou vários polipeptídeos, entre 300 - 4000 aminoácidos. A tripla hélice de colágeno tipo I extraído de pele e ossos estão compostas de duas cadeias  $\alpha 1(I)$  e  $\alpha 2(I)$ , cada uma com massa molecular de aproximadamente 95 kDa, largura  $\sim 1,5$  nm e comprimento  $\sim 0,3$  mm. Há dois tipos de gelatina dependente da preparação que envolve ou não um pré-tratamento alcalino que converte asparagina e resíduos de glutamina aos seus respectivos ácidos e resultam em viscosidades mais altas. Pré-tratamento ácido (gelatina tipo A) utiliza pele suína enquanto tratamento alcalino (gelatina tipo B) faz uso de peles de gado e ossos.

### 2.3.1.3 Alginato de sódio

Alginato é um polímero amplamente usado para imobilização e tecnologias de microencapsulação [54,55]. Alginato é um extrato de alga composta de cadeias alternadas de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico e resíduos ácidos de  $\beta$ -D-manurônico [56]. Suportes de alginato normalmente são feitos por entrecruzamento do grupo carboxyl do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico com uma solução catiônica geleificante como cloreto de cálcio, cloreto de bário [57,58]. O alginato de sódio, ou algina é o carboidrato purificado extraído de vegetais marítimos pelo uso de uma solução alcalina. É extraído, sobretudo da alga *Macrocystispyrifera*.

A algina é encontrada em todas as espécies de sargaços (Classe *Phaeophyceae*), e é possível fazer uso comercial de espécies de *Ascophyllum*, *Emonia*, *Laminaria* e *Nereocystis*, entre outras. A *Macrocystis pyrifera* é colhida em várias zonas temperadas do oceano Pacífico: nos Estados Unidos, a área do sul da Califórnia é a principal produtora. A algina é constituída principalmente pelo sal sódico do ácido alginico, polímero linear do ácido L-gulurônico e do ácido D-manurônico. Este último é o principal componente, mas há alguma variação, dependendo da alga de origem (Figura 2.9).



**Figura 2.9** Estrutura química do alginato. G é o grupo do ácido gulurônico e M é o grupo do ácido manurônico.

A molécula de ácido alginico é um copolímero de unidades de ácido manopiranosilurônico com ligação 1,4, de unidades de ácido gulopiranosiltirônico com ligação 1,4 e de segmentos em que esses ácidos urônicos se alternam com ligações 1,4. O alginato de sódio ocorre como pó fino ou grosso quase inodoro e insípido, de cor branco-amarelada. É bastante hidrossolúvel, formando uma solução coloidal viscosa. É usado na indústria alimentícia, para cosméticos em suspensão, como goma e como ligante e espessante em comprimidos. Os sais de vários cátions polivalentes e o ácido alginico têm propriedades úteis para formação de géis. O alginato de sódio tem aplicação na geleificação para vários fins como imobilização enzimática, formação de membranas e encapsulação de drogas.



### 2.3.1.4 K-carragenana

Carragenanas são biopolímeros lineares solúveis em água de aproximadamente 25.000 unidades de galactose com estruturas imprecisas extraídas de algas vermelhas. São utilizadas como estabilizantes na indústria alimentícia, farmacêutica e para imobilização de enzimas e drogas. Todas as carragenanas são moléculas altamente flexíveis que, a altas concentrações arranjam-se uma a outra para formar zonas de dupla hélice. Existem três tipos principais de carragenanas designadas pelas letras gregas  $\kappa$ ,  $\iota$  e  $\lambda$ . Elas diferem no grau de sulfonação e desidratação das unidades de galactose.

A  $\kappa$ -carragenana (Figura 2.10) apresenta uma carga negativa por unidade de dissacarídeo [59] e tem as melhores propriedades dentre os três tipos de carragenana para geleificação passando para um estado de hélice através de altas temperatura ou interações iônica. Embora o mecanismo preciso de geleificação induzido por cátions ainda seja um assunto em debate, há um consenso geral de um mecanismo baseado em dois passos. Uma transição sol-gel para formação de hélice seguido por uma agregação rápida destas.

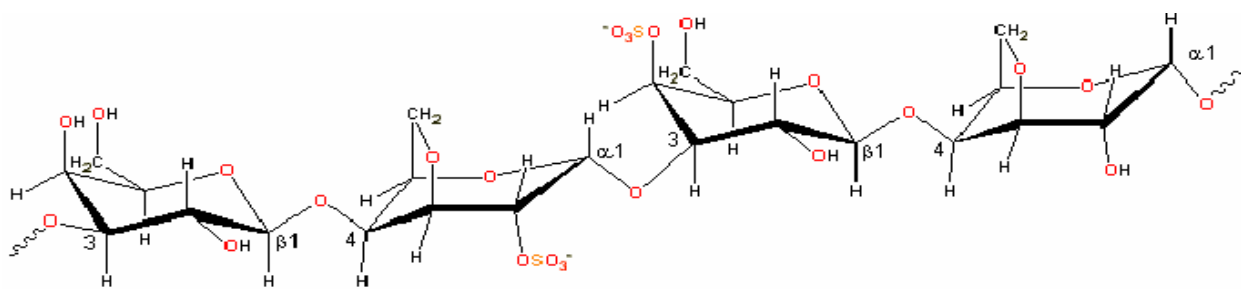


Figura 2.10 Estrutura química da  $\kappa$ -carragenana.

### 2.3.1.5 Utilização de *Bacillus megaterium* na preparação de suportes

*Bacillus megaterium* ATCC 14945 é um microorganismo aeróbio e gram-positivo que vem sendo utilizado no grupo de pesquisa liderado pela Professora Raquel de Lima Camargo Giordano (DEQ-UFSCar) para a produção de penicilina G acilase visando à produção de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. As células vegetativas mostram-se como cilindros de extremidades arredondadas apresentando diferentes dimensões conforme o meio de cultura. Estas células após uma batelada fermentativa podem ser usadas na produção de suportes para possibilitar a formação de poros devido à lise celular depois da produção das partículas do suporte ou até mesmo promover um melhor ambiente para que a interação enzima-suporte seja mais bem orientada possibilitando aumento de rendimentos de imobilização e estabilidades dos derivados enzimáticos formados.

*B. megaterium* tem cerca de  $60 \mu\text{m}^3$  de volume [60] e sua parede celular é composta por uma camada delgada de ácido teicóico e um complexo de peptídeoglicanas [61] com espessura entre 24 e 37nm [62].

### 2.3.1.6 Utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na preparação de suportes

*Saccharomyces cerevisiae* também conhecido como o fermento do "padeiro" ou "cervejeiro" é usado na indústria alimentícia, vinícola e cervejarias. Este fungo é um fermento geneticamente tratável e está intimamente relacionado à *Candida albicans*. Como uma consequência, torna-se um fermento modelo geralmente usado em pesquisa molecular, incluindo seqüência de análise de DNA, mecanismo de ação drogas antifúngicas.

O gênero *Saccharomyces* inclui várias espécies sendo *Saccharomyces cerevisiae* a mais conhecida. Suas colônias crescem rapidamente e amadurecem em três dias. Eles são planos, lisos, úmidos. São unicelulares e gram positivos.

*S. cerevisiae* tem aproximadamente  $40\mu\text{m}^3$  de volume [63] contendo  $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glicana,  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glicana, quitina, e manoproteína(s). Kolla'r e colaboradores [64] estudaram a parede celular de *S. cerevisiae* e reportaram que os polissacarídeos parecem ter uma função estrutural, considerando que manoproteína(s) podem agir como protetoras e são importantes para a permeabilidade da parede celular.

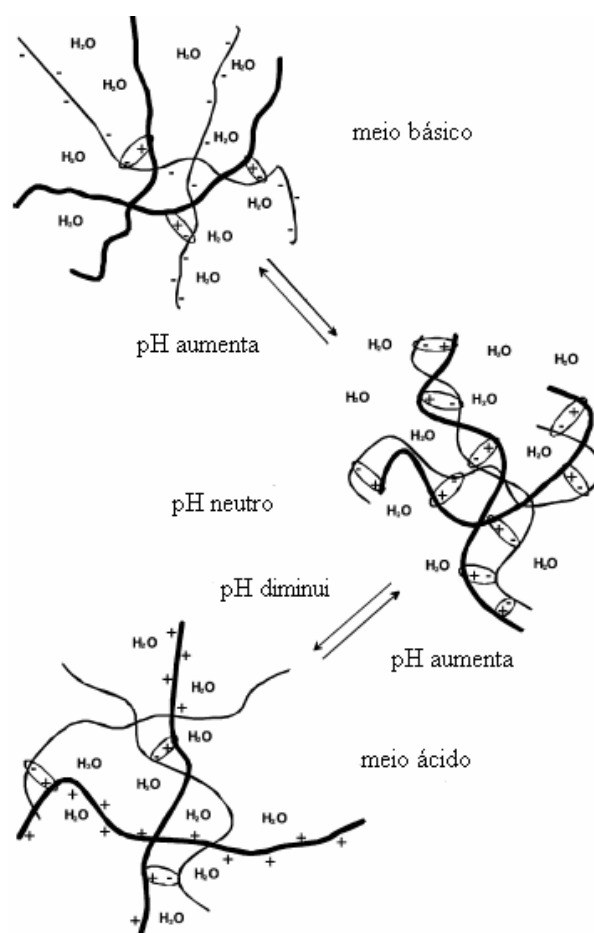
### 2.3.1.7 Influência da adição de copolímeros e microorganismos em quitosana nos suportes

Diversas técnicas são estudadas na literatura com o objetivo de controlar o tamanho e distribuição do tamanho de poros em membranas e partículas através de modificações químicas e/ou físicas. Reações com óxido de etileno, ácido ftálico e glutaraldeído incluindo outras derivatizações e copolimerizações são as técnicas químicas mais comuns [65] Outra possibilidade é a formação e elaboração de hidrogéis (híbridos) de quitosana. Há várias definições de hidrogel. De acordo com Peppas e colaboradores [66], hidrogéis são redes macromoleculares em meio aquosos ou fluidos biológicos e são divididos freqüentemente em três classes que dependem da natureza de suas redes que podem ser entrecruzadas covalentemente e redes formadas através de interações físicas.

Para a quitosana, esta classificação não é completamente satisfatória. De fato, não há um limite claro para classificação desses híbridos. Nesta situação, uma nova classificação para quitosana é sugerida: hidrogéis químicos são formados por ligações covalentes

irreversíveis e físicos que seriam aqueles formados por interações físico-químicas reversíveis [67]. A preparação de um híbrido de quitosana necessitará um outro polímero aniônico. Catalisadores ou iniciadores são dispensáveis e a reação ocorre geralmente em meio aquoso que representa a principal vantagem em relação às redes entrecruzadas covalentemente. Os mais comuns poliânions utilizados são aqueles carregados com grupos carboxílicos como alginato, pectina, gelatina e carragenana.

Uma rede formada por interações iônicas é representada pela Figura 2.11, sendo caracterizada por um microambiente hidrofílico com uma alta quantidade de água e densidade elétrica. A atração eletrostática entre os grupos amino catiônicos da quitosana e os grupos aniônicos de outros polieletrólitos são a principal interação que leva à formação de hidrogéis de quitosana.



**Figura 2.11** Estrutura de um complexo de polieletrólito de quitosana pH-dependente contendo; quitosana e polímero adicional [67].

Na verdade, para se formar complexos de polieletrólitos, ambos os polímeros devem estar ionizados e carregados com cargas opostas. Isto significa que a reação só ocorrerá em valores de pH próximos ao  $pK_A$  das espécies envolvidas. Durante a complexação, polieletrólitos

podem resultar em hidrogéis mais ou menos compactos e resistentes de acordo com o meio que este é formado. Mas se interações iônicas são intensas, haverá precipitação e impedirá a formação de hidrogéis como mostrado na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** Possíveis complexos polieletrólíticos formados com a presença de quitosana.

Classe química	Polieletrólito	Grupo ácido
Polissacarídeo	Alginato	- COO <sup>-</sup>
	κ- carragenana	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Proteína	Colágeno	- COO <sup>-</sup>

Hidrogéis de quitosana formados por complexação de polieletrólitos apresentam propriedades interessantes na imobilização de células e enzimas, pois formam redes que possibilitam a difusão de substratos, produtos e aditivos.

O uso de espaçadores mecânicos para produzir poros é outro procedimento comum: a preparação de membranas ou partículas macroporosas usando partículas de sílica [65] ou células que podem ser extraídas ou dissolvidas após geleificação da solução do polímero gerando assim mais poros.

## 2.4 Modificação química do suporte

Dado que o desejado é a multinteração enzima-suporte, a escolha dos grupos reativos na enzima deve recair sobre os grupos amino terminais ou grupos lisina residuais, devido a sua reatividade.

A maioria das proteínas apresenta alguns resíduos de lisina os quais geralmente não estão envolvidos no sítio ativo da enzima. Grupos amino são polares e estes ficam geralmente expostos para o meio na superfície da proteína e, quando desprotonados, são muito reativos e, mesmo sem prévia ativação, atuam como agente nucleofílico contra os átomos com carga parcial positiva localizadas na superfície do suporte.

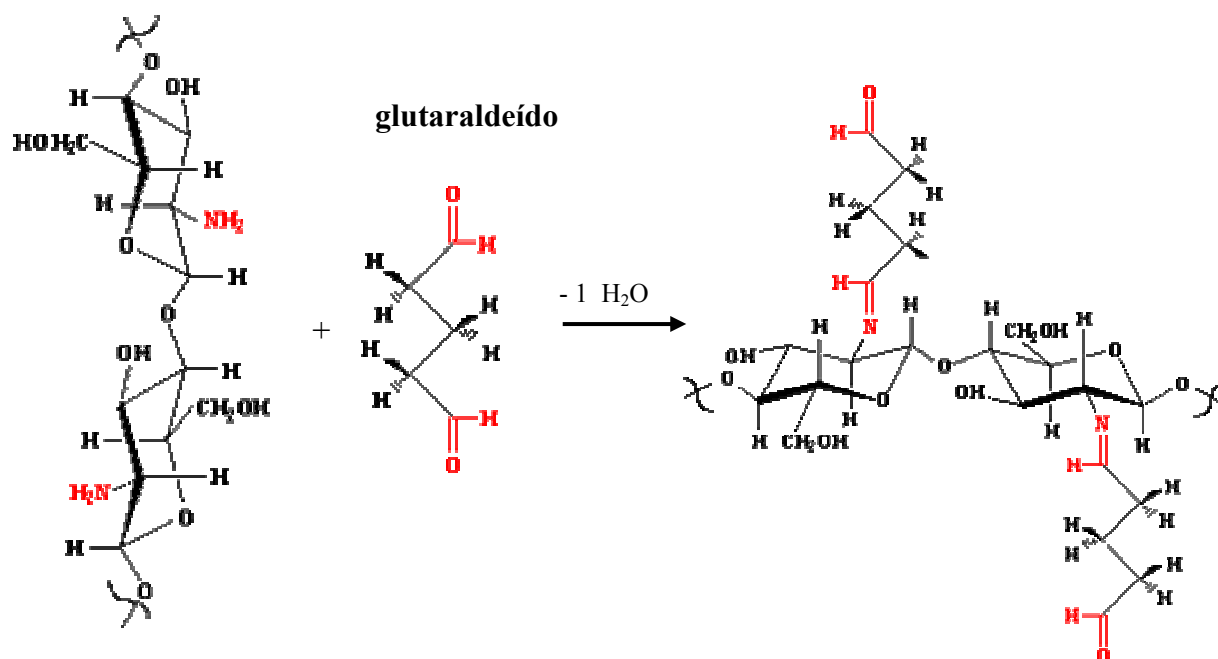
O método de ativação do suporte mais adequado deve ser aquele que produza grupos aldeídos moderadamente afastados do suporte para evitar impedimento estérico. A principal vantagem de se utilizar grupos aldeídos deve-se à reversibilidade da ligação amino-aldeído, que facilita a imobilização da enzima sem causar importantes distorções na estrutura protéica, enquanto reagem reversivelmente com grupos amino da enzima [40].

Esta modificação química, ou seja, ativação objetiva aumentar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade da quitosana, biocompatibilidade e estabilidade química tornando-a mais resistente [53]. Para ativação de diversos suportes, vários agentes bifuncionais têm sido utilizados.

O glutaraldeído é o dialdeído mais popular empregado para a ativação de suportes para imobilizar enzimas [68] e tem sido extensivamente citado como agente ativador de matrizes para imobilização de enzimas e proteínas. Apesar de sua reação com grupos amino primários para promover reticulação covalente ter sido explorada em várias circunstâncias, o mecanismo preciso dessa reação e a estrutura dos componentes químicos formados não foram ainda estudados em detalhe. Glutaraldeído reage com aminos da quitosana e consequentemente, esses grupos ficam disponíveis em menor quantidade para a formação de complexos e sua capacidade de adsorção diminui [69,70].

Os grupos aminos podem reagir com vários grupos laterais das proteínas, como hidroxila, carbonila, amino e sulfidril. Sua característica é a alta reatividade dos grupos aldeídicos com aminos primários inclusive a pH inferiores a dos grupos aminos da enzima. Estes grupos são capazes de imobilizar proteínas através de bases de Schiff em uma larga faixa de condições (baixas temperaturas e curto tempo de contato enzima-suporte), inclusive utilizando suportes com baixo grau de ativação [71].

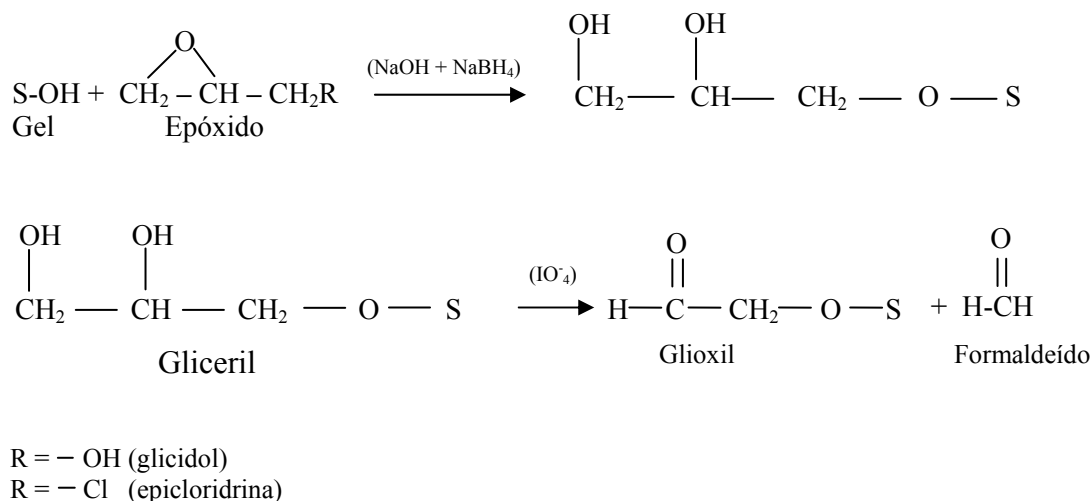
Entretanto, as moléculas de enzima podem ser imobilizadas de tal maneira a distorcer o centro catalítico desta e tornando estes muitas vezes inacessíveis ao acesso direto por moléculas de substrato grande. Múltiplas camadas de proteína no interior dos poros dificultam o acesso do substrato ao interior do poro [12]. Outra característica é a produção de derivados com baixa estabilidade e alta restrição difusional. A Figura 2.12 mostra a ligação formada entre o grupo aldeído e o grupo amino da quitosana.



**Figura 2.12** Reação de ativação entre glutaraldeído e quitosana.

Glioxil-suportes têm se mostrado bastante eficazes para imobilizações covalentes multipontuais. Diversas enzimas vêm sendo estabilizadas por este método de ativação. Há formação de grupos aldeídicos lineares que possibilitam a imobilização enzimática através da formação de bases de Schiff [78]. Suportes ativados com glicidol e epícloridrina não são capazes de promover imobilização de proteínas multipontualmente a pH 7,0 sendo necessário um pH alcalino cerca de 10,0. A pH alcalino, a imobilização acontece mais rapidamente devido à forte concentração de aminoácidos lisina não ionizados.

A ativação de suportes via epóxidos (glicidol e epícloridrina) de um modo geral se dá em duas etapas: na primeira ocorre a eterificação do suporte com o epóxido, resultando em grupos gliceril, e na segunda a oxidação com periodato de sódio, de onde resultam grupos aldeído, entretanto com epícloridrina, são gerados também grupos oxirano de acordo com a Figura 2.13.



**Figura 2.13** Reação de ativação do gel utilizando glicidol ou epicloridrina.

Suportes com grupos epóxidos em sua composição surgem como uma alternativa muito vantajosa no desenvolvimento de protocolos simples para a imobilização de enzimas, quando comparados com suportes ativados via metodologias convencionais (ativação com bromocianogênio - BrCN, glutaraldeído, grupos glioxil e etc).

Os grupos epóxidos são muito estáveis e, por isso, a obtenção de suportes contendo uma elevada densidade de tais grupos é absolutamente factível. Estes suportes podem ser ativados com uma densa camada de grupos reativos.

Quando os suportes são resinas sintéticas epóxi-acrílicas, os grupos epóxidos já fazem parte da estrutura da superfície do suporte e, assim, não há necessidade de proceder com nenhum tipo de ativação. As interações entre os grupos epóxidos do suporte e os grupos nucleofílicos da proteína são dificilmente afetadas por efeitos estéricos [4].

A reação de interação enzima-suporte pode ser facilmente interrompida mediante o bloqueio dos grupos ativos remanescentes do suporte, utilizando-se diferentes agentes, como por exemplo β-mercaptoetanol, glicina, etanolamina e etc, sem a necessidade de realização de uma etapa final de redução. Os suportes epóxidos são capazes de formar ligações extremamente fortes (amino secundário, éter, tioéter) com mínima modificação química da proteína [73].

Os grupos epóxidos são relativamente estáveis a valores de pH 7,0 e em meio aquoso, o que possibilita a estocagem do suporte comercial por longos períodos de tempo. Ao final do processo de imobilização, grupos epóxidos podem ser facilmente bloqueados através da reação com compostos contendo grupos tiol ou amino, sob condições brandas de reação

[74,75]. Este procedimento previne reações indesejadas entre o suporte e a enzima, o que poderia causar diminuição da estabilidade enzimática.

Desta forma, os suportes ativados com grupos epóxidos parecem bastante adequados para a preparação de suportes cromatográficos e como suportes para a imobilização e estabilização de enzimas [76,77]. A utilização de quitosana acetilada com posterior epoxilação através de epícloridrina foi proposta por Fangkangwanwong e colaboradores [78].

Mateo e colaboradores [79] descobriram a possibilidade de imobilizar proteínas em suportes ativados com glutaraldeído mesmo em pH 7,0, isto é, algum resíduo da molécula de enzima pode estar exposto com significativa reatividade.

Vieira [53] utilizou quitosana ativada com glutaraldeído e epícloridrina para adsorção de íons  $Hg^{2+}$  de efluentes industriais e observou que conseguia uma melhor adsorção ao se reticular a quitosana com glutaraldeído, mesmo para diferentes valores de pH.

Arruda [80] estudou a adsorção de  $\beta$ -amilase em quitosana ativada com glutaraldeído, concluindo ser um agente bifuncional de boa eficácia e fácil aplicação.

Zhang e colaboradores [21] analisaram a influência da concentração de glutaraldeído e tempo de contato enzima-suporte na imobilização de hemoglobina em quitosana sendo 0,7% v/v de glutaraldeído e tempo de 6h as melhores condições de imobilização obtidas.

Oliveira [81] estudou a preparação de esferas de quitosana com diferentes tipos de reticulação com glutaraldeído para uso em vacinação gênica e verificou que a reticulação com glutaraldeído gerou propriedades de superfície tais como potencial zeta elevado e um melhor controle sobre o intumescimento. Estas microesferas foram testadas para a adsorção superficial de pDNA e analisadas quanto à capacidade de transfecção de células in vitro. Os resultados confirmaram a transfecção, apontando o uso potencial destas partículas como carreadoras de vacinas gênicas.

Rodrigues e colaboradores [82] estudaram a influência de diferentes agentes de ativação (glutaraldeído, glicidol e epícloridrina) na imobilização multipontual de lipase de *C. antarctica* em quitosana com estabilidade de 58 vezes em relação à enzima livre.

Tiller e colaboradores [83] ativaram polímeros derivados de celulose com L-ácido ascórbico para imobilização de enzimas como glicose oxidase, lactato oxidase e peroxidase observando que esta reação de ativação pode ser utilizada para imobilização covalente de enzimas e demais compostos aminados de alta e baixa massa molecular e este agente bifuncional apresentou um derivado de melhor estabilidade em relação ao glutaraldeído.



Cardias e colaboradores [71] estudaram a influência da concentração de glutaraldeído nos parâmetros de imobilização da PGA em sílica, observando que esta variável afetava as taxas de imobilização, bem como, a quantidade de proteína ligada covalentemente ao suporte.

Tardioli e colaboradores [12] prepararam vários derivados de alcalase sobre diferentes suportes ativados com diferentes agentes bifuncionais como: glioxil-agarose, glutaraldeído-agarose e brometo de cianogênio-agarose sendo o derivado ativado com glicidol (glioxil) mais estável e com glutaraldeído, geraram o derivado menos estável em relação à enzima solúvel.

Eldin e colaboradores [83] estudaram a influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de ativação durante imobilização de penicilina G acilase em partículas de nylon aminoalquiladas e observaram que um aumento na concentração de glutaraldeído aumentou a atividade enzimática em uma concentração máxima de 2,5% v/v, diminuindo a atividade obtida fora dessa faixa de concentração. Os autores não observaram nenhum efeito no tempo de ativação, no intervalo de 1 a 3 horas. O pH da solução de glutaraldeído foi analisado numa faixa de 6,0 a 10,0, obtendo-se atividade máxima da enzima em pH 9,0.

Cetinus e Östöp [84] observaram aumento da atividade da catalase imobilizada com o aumento da concentração de glutaraldeído utilizada numa faixa de concentração de 0,00 a 0,05%.

Ichikawa e colaboradores [85] imobilizaram quitosanase em gel ágar e observaram que a concentração de glicidol utilizada influenciava na termoestabilidade da enzima imobilizada, bem como, na percentagem de enzima imobilizada. Ao se ativar o suporte com concentrações de 0,7 a 4,8M de glicidol, obtinha-se rendimento de 82%, contudo, em concentração de glicidol de 0,25M, o rendimento diminuiu para 62,5%. Os autores concluíram que o rendimento de imobilização era proporcional à quantidade de grupos aldeídos existentes no suporte e que a partir de uma determinada concentração de glicidol, o rendimento do processo não sofria alterações.

Yi e colaboradores [86] estudaram a adsorção de metais bivalentes em um derivado de quitosana via reação com dietilenotriamina.

Grazú e colaboradores [74] estudaram a imobilização de  $\beta$ -galactosidase em suportes contendo grupos epóxidos e tióis após ativação.

## 2.5 Imobilização de enzimas

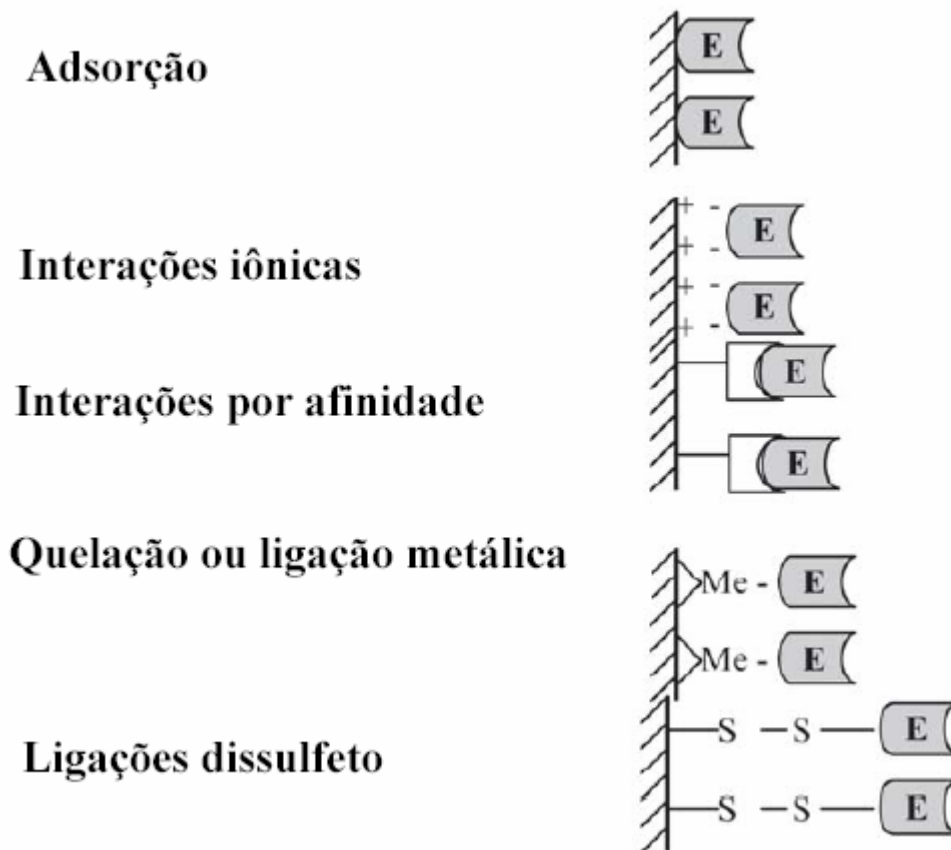
As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização de enzimas são: o aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações de enzimas, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica. As principais desvantagens deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização, interação suporte-enzima e a redução da atividade catalítica devido aos efeitos difusionais, de microambiente e estéricos-conformacionais [87,88]. Portanto, possibilidade de reutilização ou uso contínuo, insolubilidade e estabilidade são características desejadas comercialmente, oferecidas por uma enzima quando esta se encontra imobilizada em um suporte inerte adequado [89].

As propriedades das enzimas imobilizadas são determinadas pelas características da enzima e do suporte utilizados. A interação entre os dois resulta em um biocatalisador com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas [41]. Para um eficiente processo de imobilização, alguns fatores devem ser destacados, tais como: as propriedades bioquímicas da enzima, propriedades químicas do suporte, método de imobilização empregado, as características do agente bifuncional, efeitos de transporte de massa e a estabilidade do derivado obtido. A possibilidade da utilização do derivado em vários ciclos compensa as desvantagens advindas do processo, sendo necessário um estudo para cada caso em particular.

### 2.5.1 Métodos de imobilização enzimática

Os métodos de imobilização têm sido subdivididos em três grupos principais [11]. A primeira divisão baseia-se no modo como a imobilização foi alcançada: por confinamento num espaço limitado ou por ligação a um suporte material. Enzimas confinadas são subdivididas de acordo com a estrutura do sistema de confinamento: num espaço simples, como na encapsulação ou em muitos espaços pequenos, ao qual a enzima pode estar ligada como o confinamento em uma matriz.

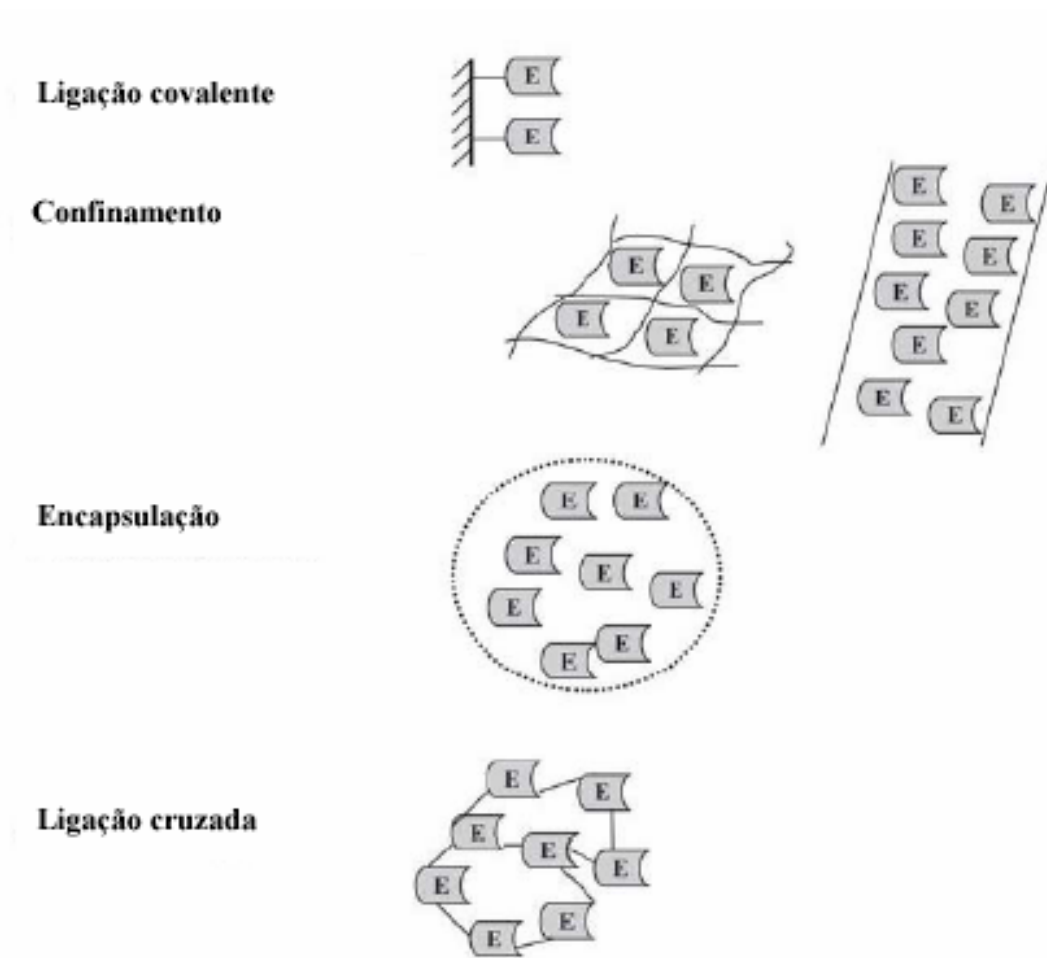
A ligação das enzimas a um suporte material pode ser por adsorção ou por ligação química. As enzimas ligadas por ligação química podem ser posteriormente subdivididas de acordo com o tipo de interação entre a enzima e o suporte ou entre as próprias moléculas de enzimas. A imobilização enzimática pode ser dividida em irreversíveis e reversíveis.



**Figura 2.14** Classificação dos métodos de imobilização reversíveis de enzimas.

Dentre estes (Figura 2.14), a adsorção física é o método mais simples e o mais utilizado para imobilização de enzimas. Consiste na interação física não-específica da enzima com a superfície do suporte por agitação de uma solução concentrada de enzima. O suporte a ser utilizado passa por uma etapa de ativação bastante simples para um maior rendimento de imobilização. A enzima é estabilizada por interações fracas com o suporte como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligações iônicas [90].

As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada. As desvantagens são a adsorção não-específica de outras proteínas e substâncias como substrato e a dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH, força iônica e a presença de substrato [90].



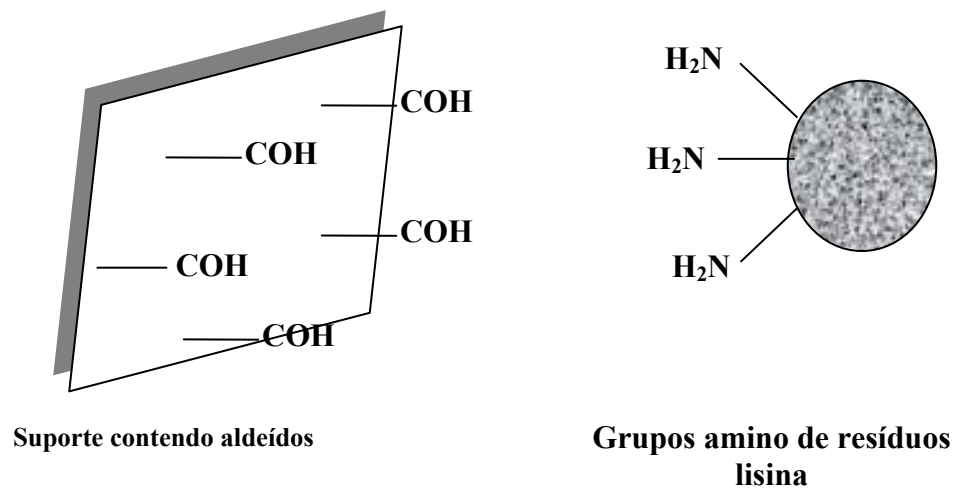
**Figura 2.15** Classificação dos métodos de imobilização irreversíveis de enzimas

A ligação covalente se estabelece através da combinação química entre o suporte e grupos funcionais da enzima não essenciais para a atividade catalítica. Poucos suportes contêm grupos reativos que permitem acoplamento direto, necessitando por isso na maioria das vezes, de ativação (Figura 2.15).

Entre as vantagens da ligação covalente, tem-se: grande força de ligação com conseqüente estabilidade do complexo enzima-suporte. Pode-se obter alta atividade recuperada após imobilização e, além disso, a alteração ocorrida na enzima com a ligação ao suporte pode ser favorável (alteração do pH e da temperatura ótima, por exemplo) embora seja um método mais complexo que os anteriores e pode ter alto custo.

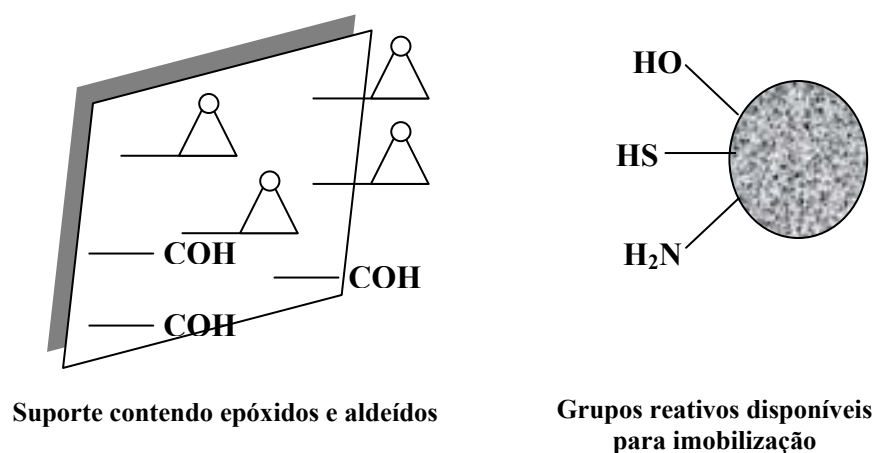
Desenvolveram-se novas estratégias racionais de imobilização/estabilização de enzimas por ligação covalente multipontual a suportes sólidos ao assumirem que, se projetada cuidadosamente, uma ligação multipontual muito intensa entre uma pequena área da enzima e o suporte pode ter ótimos efeitos estabilizantes [68,91,92]. Há uma inter-relação muito forte

entre todas as partes da molécula de proteína e a “rigidificação” de uma pequena área que pode transladar esta estabilização para toda a estrutura da enzima. Deve-se, evidentemente, assumir que o desempenho prático desta hipótese aparentemente simples é, na verdade, muito complexa. Não é muito fácil obter este tipo de interação muito intensa e muito rígida entre duas estruturas complexas como uma enzima e um suporte ativado. A Figura 2.16 representa a imobilização multipontual através de bases de Schiff, isto é, interações entre aldeído do suporte e grupos amino desprotonados de resíduos lisina da enzima. Esta imobilização pode representar imobilizações realizadas em suportes ativados com glutaraldeído e glicidol, entretanto para epícloridrina, a melhor representação está na Figura 2.17.



**Figura 2.16** Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual através de bases de Schiff com ativação via glutaraldeído e glicidol.

Em suportes como híbridos de quitosana, serão gerados grupo aldeído (glioxil) e oxiranos quando ativados com epícloridrina. Estes grupos podem se ligar covalentemente não somente com grupos aminos, mas também com outros grupos hidroxilas e tióis da enzima (Figura 2.16).



**Figura 2.17** Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual com ativação via epícloridrina.

A atividade, estabilidade e especificidade da enzima imobilizada podem depender: da origem da enzima, do suporte, do método de ativação, do número de ligações covalentes enzima-suporte, do tempo e da temperatura de imobilização, do pH e da presença de inibidores e de substratos no meio reacional [40].

Entretanto, é possível imobilizar proteínas via ligação covalente bipontual usando suportes com uma baixa densidade de grupos reativos. Estes derivados apresentam propriedades típicas similares à enzima livre. Este método de imobilização não aumenta necessariamente a rigidez da estrutura enzimática, contudo a estabilidade operacional pode ser significativamente melhorada no momento da formação das interações enzima-suporte.

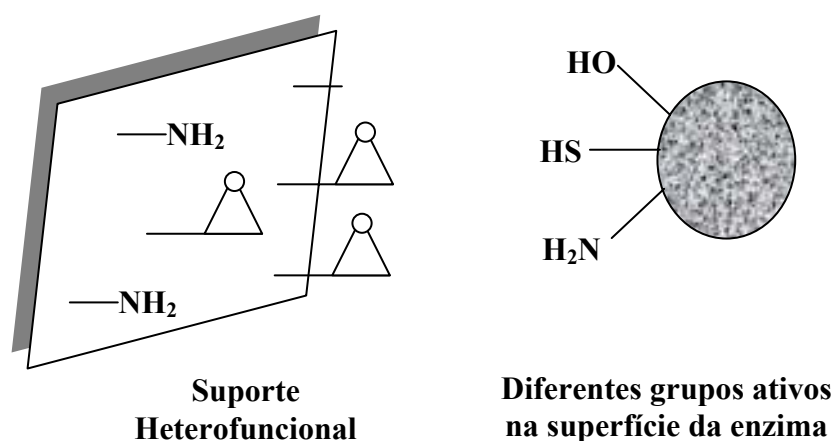
Suportes ativados com grupos epóxidos representam uma possibilidade para o desenvolvimento de imobilização covalente multipontual pelo fato de cumprirem todos os requisitos necessários. No entanto, os grupos epóxidos são relativamente estáveis em condições muito brandas [4,73,74]. Tal característica poderia requerer condições de trabalho mais drásticas no sentido de se aumentar a reatividade tanto dos grupos epóxidos do suporte quanto dos grupos nucleofílicos da superfície protéica. Por exemplo, as lisinas, que são os aminoácidos mais frequentes na superfície, têm um pK em torno de 10,5, sendo, portanto, dificilmente reativas a pH 7,0.

Por outro lado, seria de se esperar que os grupos reativos do suporte e da proteína não estivessem corretamente alinhados devido a diferenças nas estruturas. Assim, pode-se assumir que a imobilização covalente multipontual requererá períodos de tempos mais longos. Além

disso, o uso de temperaturas moderadamente altas promove uma maior flexibilidade da estrutura da proteína, o que favorece sua reatividade com os grupos do suporte.

Variáveis como pH e temperatura podem incrementar a multiinteração com o suporte. Como a reatividade dos grupos epóxidos do suporte com proteínas solúveis é muito baixa, estes processos de imobilização devem ocorrer mediante um mecanismo composto por duas etapas: uma primeira onde a enzima seria adsorvida hidrofobicamente sobre a superfície do suporte e uma segunda etapa onde se promoveria a reação covalente entre os grupos reativos da proteína e o suporte. Para a utilização deste método de imobilização, é necessário se efetuar a substituição de uma parte dos grupos epóxidos do suporte por compostos que tenham a capacidade de adsorver a proteína por diferentes métodos.

Esta modificação deve ocorrer apenas em uma quantidade de grupos epóxidos suficiente para adsorver a proteína, deixando inalterada a maior parte dos grupos epóxidos para que se possa promover a posterior imobilização covalente. A etapa inicial de adsorção pode ocorrer através de diferentes mecanismos e, assim, os derivados obtidos podem ter diferentes características devido à implicação de diferentes zonas da proteína no processo. O uso destes suportes heterofuncionais unidos a estes novos possíveis protocolos de imobilização pode apresentar numerosas vantagens, como por exemplo, a preparação de biocatalisadores. [4,73,74,75]. Esta estratégia de imobilização pode ser representada através da Figura 2.18.



**Figura 2.18** Sistema de imobilização/estabilização por ligação covalente multipontual através de grupos epóxidos.

Hong e colaboradores [93] investigaram a imobilização covalente de quimotripsina em nanopartículas paramagnéticas funcionalizadas com grupos amino obtendo uma capacidade máxima de imobilização de 61mg de proteína por grama de suporte.

Mateo e colaboradores [73] investigaram a imobilização de penicilina G acilase e quimotripsina em Eupergit C<sup>®</sup> atingindo estabilizações de 18 e 6 vezes, respectivamente empregando longos tempos de incubação.

Spagna e colaboradores [94] estudaram a imobilização de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase em quitosana por ligação covalente com ativação por glutaraldeído, por adsorção com conjugação e por reticulação. Observaram que o melhor método de imobilização foi por conjugação, cujo derivado obtido atingiu uma atividade recuperada de 150UI.g<sup>-1</sup> e um aumento de estabilidade não reportado quantitativamente em relação à enzima livre.

Martino e colaboradores [95] obtiveram êxito em imobilizar  $\beta$ -glicosidase em quitosana por adsorção com posterior formação de ligações cruzadas com glutaraldeído e por ligação covalente alcançando atividades recuperadas de 55 a 85% e derivados com estabilidade operacional, sendo o tempo de meia-vida de 55 dias.

Aise Dinçer e colaboradores [96] estudaram a imobilização por adsorção de celulase em quitosana modificada com álcool polivinílico obtendo um rendimento de imobilização de 87% apresentando uma boa estabilidade operacional.

Xia e Shen [97] imobilizaram celulase (esporos de *A. niger*) em géis se alginato de sódio para conversão de materiais lignocelulósicos em açúcar solúveis e a imobilização da celulase em nanofibras de PVA.

Gu e colaboradores [98] imobilizaram a celulose em géis de quitosana obtendo valores de fator de estabilidade térmica de 3 vezes.

Li e colaboradores [99] imobilizaram a celulase em lipossomas, obtendo ganhos na atividade específica de cerca de 10 vezes quando comparados aos sistemas convencionais e uma menor inibição pelo produto.

Vértesi e colaboradores [100] estudaram a imobilização de CPA em resinas por adsorção e por ligação covalente com ativação por etilenocarbodiimida, obtendo uma estabilização de 3,5 vezes.



### 2.5.2 Estratégias para estabilização operacional de biocatalisadores

Várias estratégias têm sido utilizadas para se aumentar a estabilidade de derivados enzimáticos: uso de aditivos estabilizantes, modificação química da estrutura da enzima, imobilização, cristalização. Aditivos estabilizantes são uma prática comum na tecnologia enzimática, entretanto sua aplicação tem pouca significância [101].

Estabilização por modificação química da proteína é atrativo, mas não tem recebido muita atenção [102]. Derivatização de enzimas com polímeros, como proteases com sacarose e dextrana apresentaram uma boa estabilização [103].

Imobilização enzimática é o método mais estudado e aplicado para melhorar a estabilidade do biocatalisador, melhorar o controle de operação, aumentar flexibilidade do modelo de reator e recuperação facilitada sem contaminação do derivado [104]. Dentre os métodos de imobilização, a união covalente multipontual é o mais eficiente [77].

López-Gallego e colaboradores [105] funcionalizaram a enzima penicilina G acilase e glutaril acilase com grupos aminos através da reação das enzimas com etilenodiamina e etilenocarbodiimida, de modo a diminuir o  $pK_a$  destes aminos quando comparados aos aminos de lisina e suporte glioxil-agarose.

### 2.5.3 Efeitos difusivos

Através da imobilização enzimática, há uma restrição na mobilidade da enzima afetando também o fluxo de substratos em direção aos poros do biocatalisador. Com isso, haverá um decréscimo na velocidade de reação e conseqüente perda de eficiência catalítica quando comparado à enzima livre.

Para minimizar este efeito de maneira a se otimizar a produtividade e evitar a perda de biocatalisadores e produtos, aconselha-se diminuir o tamanho da partícula para minimizar a difusão interna [106], reduzir a carga enzimática [12], promover a ligação da enzima preferencialmente na superfície do suporte.

Eldin e colaboradores [83] observaram que na imobilização de PGA em partículas de nylon, ao fornecer uma carga enzimática superior a  $25 \text{ UI.mL}^{-1}$  de suporte durante a imobilização, a atividade recuperada do derivado se mantivera constante, concluindo haver limitações difusionais no sistema em estudo.

Prabhune e Sivaraman [107] imobilizaram a PGA em esferas uniformemente porosas de poliacrilamida gel observando uma limitação difusional durante o processo de imobilização, contudo ressaltam a facilidade do manuseio do gel.

Van Langen e colaboradores [108] utilizaram uma técnica de titulação do centro ativo da PGA e através desta, observaram uma perda de atividade da enzima após imobilização em Eupergit C<sup>®</sup>, descrevendo assim qualitativamente uma limitação difusional devido a impedimentos estéricos, bem como uma perda de atividade devido à alguma deformação promovida na molécula da enzima.

#### **2.5.4 Influência do tempo de imobilização**

Os grupos amino situados na superfície da proteína não estão exatamente alinhados com os grupos aldeídos da superfície do suporte, ou seja, a enzima e o suporte ativado não são estruturas complementares. Assim, quando a enzima, já imobilizada, continua a interagir com o suporte ativado, novos e corretos alinhamentos entre os grupos da enzima e os grupos aldeídos do suporte são formados. Quando esses alinhamentos são produzidos, a subsequente ligação química deve ser muito rápida e irreversível.

Este mecanismo para estabilização da enzima por ligação covalente multipontual em suporte ativado está de acordo com a dependência observada da estabilização do derivado e com o tempo de imobilização. A formação de alinhamentos adicionais amino-aldeído deve ser mais lenta do que o primeiro processo de imobilização (reação da enzima solúvel com o suporte ativado), e isto, envolvem a dependência entre a estabilidade do derivado final e o tempo de contato entre a enzima já imobilizada e o suporte ativado [68]. Conclui-se, então, que a estabilidade dos derivados resultantes aumenta à medida que se aumenta o tempo de contato entre a enzima solubilizada e o suporte ativado.

Tardioli e colaboradores [12] estudando a CPA em glioxil-agarose, observaram que o tempo de contato entre a enzima imobilizada e o suporte ativado teve grande influência na estabilização da enzima na ordem de 230 vezes em relação à enzima livre. O derivado obtido apresentou uma diminuição na concentração de aminoácidos lisinas envolvidas nas ligações covalentes enzima-suporte, confirmando a formação de ligações multipontuais.

Pedroche e colaboradores [109] investigaram a influência do tempo na imobilização de quimotripsina e CPA em glioxil-agarose alcançando uma estabilidade de 10.000 e 1.000 vezes, respectivamente.

## 2.6 Referências bibliográficas

- [1] González Siso, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, v.57, p.1-11. **1996**.
- [2] Ponsano, E. H. G.; Pinto, M. F.; Castro-Gomes, R. J. H. *Soro de leite - obtenção, características e aproveitamento*. Seminário Cia. Agr. Londrina, **1992**.
- [3] Richards, N. S. Emprego racional do soro. Indústria de Laticínios. 67 **1997**.
- [4] Galvão, C. M. A. *Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2004**.
- [5] The U.S. Dairy Export Council. Ingredientes lácteos para uma alimentação saudável. USDEC News. 2: 1-3 p. **2000**.
- [6] Peters, R. H. Economic aspects of cheese making as influenced by whey processing options. *International Dairy Journal*. **2005**.
- [7] Adler-Nissen, J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers. **1986**.
- [8] Galvão, C. M. A. *Hidrólise de proteínas do soro de queijo com tripsina e quimotripsina livres e imobilizadas*. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2000**.
- [9] Kumar, A.; Gupta, M. N. Immobilizaion of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for biocatalysis of macromolecular substrate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.5, p.289-294. **1997**.
- [10] Dalev, P. G. Utilization of waste whey as a protein source for production of iron proteinate: An antianemic preparation. *Bioresource Technology*, v.48, p.75-77. **1994**.
- [11] Kennedy, J. F. *Enzyme technology*. Alemanha: Biotechnology. **1987**.
- [12] Tardioli, P. W. *Hidrólise controlada de proteínas de soro de queijo usando carboxipeptidase A e Alcalase® imobilizadas multipontualmente em agarose*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2003**.
- [13] Stryer, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA. **1991**.
- [14] Kishan, K. V. R. Molecular structure of D-hydantoinase from bacillus sp. AR9: Evidence for mercury inhibition. *Journal of Molecular Biology*, v.347, p.95-105. **2005**.
- [15] Williams, R. J. P. A comparison of types of catalyst: The quality of metallo-enzymes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.08.012. **2007**.
- [16] Whitaker, J. R. *Principles of enzymology for the food sciences*. New York: Marcel Dekker Inc. **1994**.

- [17] Suckling, K. E. *Mechanisms of enzyme catalysis*. Oxford: Pergamon Press Ltd, v.1. **1985**.
- [18] Santana, J.; Souza, S. O. Subproduto da cana-de-açúcar. *Informe Agropecuário*, v.10, p.22-26. **1984**.
- [19] Martins, R. E. *Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana*. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2007**.
- [20] Ramos, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, n.6, p.863-871. **2003**.
- [21] Zhang, P. H. Y.; Himmel, M. E.; Mielenz, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v.24, p.452-481. **2006**.
- [22] Wulff, N. A. Caracterização enzimática das celulases XF-810, XF-818 e XF-2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína XF-818 expressas em *E.coli*. (Doutorado). Agronomia, USP, Piracicaba-SP, **2002**.
- [23] Monti, R. Produção de celulase e xilanase pelo fungo termófilo *Humicola grisea* variedade *Thermoidea* RP-17: Fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas. (Doutorado). Bioquímica, USP, Ribeirão Preto, **1989**.
- [24] Nidetzky, B.; Steiner, W.; Hayn, M.; Claeysens, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: A new model for synergistic interaction. *Biochemistry Journal*, v.298, p.705-710. **1994**.
- [25] Tanner, D. R. The effect of ph on the foam fractionation of  $\beta$ -glucosidase and cellulase. *Bioresource Technology*, v.87, p.247-253. **2002**.
- [26] Heikinheimo, L. *Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton. (Doutorado). Espoo, Finlândia, **2002**.
- [27] Wood, T. M. Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. London: Elsevier. **1989**.
- [28] Irwin, D.; Spezio, M.; Walker, L.; Wilson, D. Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism and binding domain efforts. *Biotechnology and Bioengineering*, v.42, p.1002 – 1013. **1993**.
- [29] Vrsanská, M.; Biely, P. The cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei* QM 9414: Action and cello-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, v.227, p.19 – 27. **1993**.
- [30] Chanzy, H.; Henrissat, B. Undirection degradation of valonia cellulose microcrystals subjected to cellulase action. *FEBS Letters*, v.184, p.285 – 288. **1985**.
- [31] Vasconcelos, A. J. C. *Obtenção de tecidos de poliéster de baixo peso por tratamento enzimático*. (Mestrado). Química Têxtil, Universidade do Minho, Minho-Portugal, **2005**.

- [32] Nidetzky, B.; Hayn, M.; Macarrón, R.; Steiner, W. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. *Biotechnology Letters*, v.15, n.1, p.71– 76. **1993**.
- [33] Wen, Z. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*, v.96, p.491-499. **2004**.
- [34] Kim, S. W. Production of cellulase and hemicellulase by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.91, p.153-156. **2004**.
- [35] Internet: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/default.asp>.
- [36] Agblevor, F. A. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochemistry*, v.40, p.669-679. **2004**.
- [37] Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.35, p.126-139. **2004**.
- [38] Messing, R. A. *Immobilized enzymes for industrial reactors*. London: Academic Press, Inc. LTD. **1975**.
- [39] Guisán, J. M. *Immobilization of enzymes and cells*. New Jersey: Humana Press Inc. **2006**.
- [40] Pereira, G. H. A. Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **1996**.
- [41] Gonçalves, L. R. B. Estudo cinético da síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em glioxil-agarose. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2001**.
- [42] Rosell, C. M. Reacciones de química fina catalizadas por derivados estabilizados de penicilina G acilase. (Doutorado). Instituto de Catalisis y Petroleoquímica-C.S.I.C, UAM, Madri-Espanha, **1993**.
- [43] Muzzarelli, R. A. A. *Natural chelating polymers*. New York: Pergamon Press. **1973**.
- [44] Zikakis, J. P. *Chitin, chitosan and related enzymes*. Orlando: Academic Press, Inc. LTD. **1984**.
- [45] Santos, J. E. D. Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre. (Doutorado). Química, UFSCar, São Carlos, **2004**.
- [46] Kumar, M. N. V.; Singh, P.; Dutta, P. K. Effect of swelling on chitosan-amine oxide gel in extended drug delivery. *Indian Drugs*, v.36, p.393. **1999**.
- [47] Craveiro, A. A.; Craveiro, A. C.; Queiroz, D. C. *Quitosana - a fibra do futuro*. Fortaleza: PADETEC, v.1. **1999**. 122 p.

- [48] Baxter, A.; Dillon, M.; Taylor, K. D. A.; Roberts, G. A. F. Improved method for IR determination of the degree of n-acetylation of chitosan. *International Journal Biological Macromolecule*, v.14, p.166. **1992**.
- [49] Maghami, G. A.; Roberts, G. A. F. Studies on the adsorption of anionic dyes on chitosan. *Makromoleculare Chemistry*, v.189, p.2239. **1988**.
- [50] Domard, A. Circular dichroism study on n-acetylglucosamine oligomers. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.8, p.243. **1986**.
- [51] Wei, Y. C.; Hudson, S. M. Binding of sodium dodecyl sulfate to a polyelectrolyte based chitosan. *Macromolecules*, v.26, p.4151. **1993**.
- [52] Wu, A. C. M. Determination of molecular weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology*, v.161, p.447. **1988**.
- [53] Vieira, R. S. *Remoção e recuperação de Hg (II) utilizando quitosana natural e reticulada*. (Mestrado). Engenharia Química, Unicamp, Campinas, **2004**.
- [54] Funduenanu, G.; Nastruzzi, C.; Carpov, A.; Desbrieres, J.; Rinaudo, M. Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced by different methods. *Biomaterials*, v.20, p.1427-1435. **1999**.
- [55] Velten, F.; Laue, C.; Schrezenmeir, J. The effect of alginate and hyaluronate on the viability and function of immuno isolated neonatal rat islets. *Biomaterials*, v.20, p.2161-2167. **1999**.
- [56] Sriamornsak, P. Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. *European Journal Pharmacology and Biopharmacy*, v.46, p.233-226. **1998**.
- [57] Draget, K. I.; Skjak-Braek, G.; Smidsrod, O. Alginate based new materials. *International Journal Biological Macromolecules*, v.21, p.47-55. **1997**.
- [58] Smidsrod, O.; Skak-Braek, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends of Biotechnology*, v.8, p.71-78. **1990**.
- [59] Barbotin, J. N.; Nava Saucedo, J. E. *Polysaccharides*. Dekker, New York. **1998**.
- [60] Vary, P. S.; Biedendieck, R.; Fuerch, T.; Meinhardt, F.; Rohde, M.; Deckwer, W. D.;Jahn, D. *Bacillus megaterium* —from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.76, n.5, p.957-967. **2007**.
- [61] Scherrer, R.; Gerhardt, P. Molecular Sieving by the *Bacillus megaterium* Cell Wall and Protoplast. *Journal of Bacteriology*, v.107, n.3, p.718-735. **1971**.
- [62] Dechastellier, C.; Hellio, R.; Riter, A. Study of cell wall growth in *Bacillus megaterium* by high-resolution autoradiography. *Journal of Bacteriology*, v.123, n.3, p.1184-1196. **1975**.

- [63] Tyson, C. B.; Lord, P. G.; Wheals, A. E. Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *Journal of Bacteriology*, v.138, n.1, p.92-98. **1979**.
- [64] Kolla'R, R.;Reinhold, B. B.;Petra'Kova, E.;Yeh, H. J. C.;Ashwell, G.;Drgonova, R.;Kapteyn, J. C.;Klis, F. M.;Cabib, E. Architecture of the yeast cell wall. (16)-glucan interconnects mannoprotein, (13)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, n.28, p.17762-17775. **1997**.
- [65] Beppu, M. M.; Arruda, E. J.; Vieira, R. S.; Santos, N. N. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. *Journal of Membrane Science*, v.240, p.227-235. **2004**.
- [66] Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.50, p.27-46. **2000**.
- [67] Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, n.1, p.19-34. **2004**.
- [68] Guisán, J. M. Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Enzyme and Microbial Technology*, v.10, p.375-382. **1987**.
- [69] Gómez, L.; Ramirez, H. L.; Villalonga, M. L. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.38, n.1-2, p.22-27. **2006**.
- [70] Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazú, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B. C. C.; Hidalgo, A.; Fernandez-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.274–280. **2006**.
- [71] Cardias, H. C. T.; Grininger, C. C.; Trevisan, H. C.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, p.141-148. **1999**.
- [72] Blanco, R. M.; Calvete, J. J.; Guisán, J. M. Immobilization–stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v.11, p.353–359. **1988**.
- [73] Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p.509-515. **2000**.

- [74] Grazú, V.; Abian, O.; Mateo, C.; Batista-Viera, F.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromolecules*, v.4, p.1495-1501. **2003**.
- [75] Grazú, V.; Abian, O.; Mateo, C.; Batista-Viera, F.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. *Biotechnology and Bioengineering*, v.90, n.5, p.597-605. **2005**.
- [76] Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Tam, A.; Daminati, A. Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, v.18, p.629-634. **2002**.
- [77] Mateo, C.; Grazú, V.; Palomo, J. M.; López-Gallego, F.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature*, v.2, n.5, p.1022-1033. **2007**.
- [78] Fangkangwanwong, J.;Yoksan, R.;Chirachanchai, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. *Polymer*, v.47, p.6438-6445. **2006**.
- [79] Mateo, C.;Abian, O.;Bernedo, M.;Cuenca, E.;Fuentes, M.;Fernandez-Lorente, G.;Palomo, J. M.;Grazú, V.;Pessela, B. C. C.;Giacomini, C.;Irazoqui, G.;Villarino, A.;Ovsejevi, K.;Batista-Viera, F.;Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, n.4, p.456-462. **2005**.
- [80] Arruda, E. J. *Concentração e purificação de  $\alpha$ -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato*. (Doutorado). Engenharia Química, Unicamp, Campinas, **1999**.
- [81] Oliveira, B. F. *Preparação de microesferas de quitosana por spray drying com diferentes tipos de reticulação para uso na vacinação gênica*. (Mestrado). Engenharia Química, Unicamp, Campinas, **2005**.
- [82] Rodrigues, D. S.; Mendes, A. A.; Adriano, W. S.; Gonçalves, L. R. B.; Giordano, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.51, p.100–109. **2008**.
- [83] Eldin, M. S. M.; Schröen, C. G. P. H.; Janssen, A. E. M.; Mita, D. G.; Tramper, J. Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.10, p.445-451. **2000**.



- [84] Cetinus, S. A.; Öztop, H. N. Immobilization of catalase on chitosan film. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p.497-501. **2000**.
- [85] Ichikawa, S.; Takano, K.; Kuroiwa, T.; Hiruta, O.; Sato, S.; Mukataka, S. Immobilization and stabilization of chitosanase by multipoint attachment to agar gel suport. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.93, n.2, p.201-206. **2002**.
- [86] Yi, Y.; Wang, Y.; Ye, F. Synthesis and properties of diethylene triamine derivative of chitosan. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.277, p.69-74. **2006**.
- [87] Vitolo, M. *Biotecnologia industrial-processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, v.3. **2001**.
- [88] Gama, M.; Taipa, M. A. *Engenharia enzimática*. Lisboa: Lidel. **2003**.
- [89] Bicherstaff, G. Immobilization of enzymes and cells - some practical considerations. *Methods in Biotechnology*, p.1-9. **1995**.
- [90] Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, v.39, n.2, p.23-29. **1998**.
- [91] Guisán, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.10, p.375-382. **1988**.
- [92] Klibanov, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, v.29, p.1-28. **1983**.
- [93] Hong, J.; Gong, P.; Xu, D.; Dong, L.; Yao, S. Stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel. *Journal of Biotechnology*, v.128, p.597-605. **2007**.
- [94] Spagna, G.; Andreani, F.; Salatelli, E.; Romagnoli, D.; Casarini, D.; Pifferi, P. G. Immobilization of the glycosidases:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* on a chitosan derivative to increase the aroma of wine. Part ii. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.413-421. **1998**.
- [95] Martino, A.; Pifferi, P. G.; Spagna, G. Immobilization of  $\beta$ -glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan. *Process Biochemistry*, v.31, n.3, p.287-293. **1995**.
- [96] Dinçer, A.; Telefoncu, A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.45, p.10-14. **2007**.
- [97] Xia, L.; Shen, X. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. *Process Biochemistry*, v.39, p.1363-1367. **2004**.

- [98] Gu, L.; Mao, X.; Guo, G.; Huang, J.; Du, Z.; Huang, Z.; Ma, L.; Li, P. A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, n.2, p.189-195. **2006**.
- [99] Li, C.; Yoshimoto, M.; Fukunaga, K.; Nakao, K. Characterization and Immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Bioresource Technology*, v.98, n.7, p.1366-1372. **2007**.
- [100] Vértési, A.; Simona, L. M.; Kiss, I.; Szajáni, B. Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, p.73–79. **1999**.
- [101] Ye, W.; Combes, D.; Monsan, P. Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, v.10, p.498-502. **1988**.
- [102] Inada, Y.; Yoshimoto, T.; Matsushima, A.; Saito, Y. Engineering physicochemical and biological properties of proteins by chemical modification. *Trends in Biotechnology*, v.4, p.68-73. **1986**.
- [103] Sundaram, P.; Venkatesh, R. Retardation of thermal and urea induced inactivation of  $\alpha$ -chymotrypsin by modification with carbohydrate polymers. *Protein Engineering*, v.11, p.699-705. **1998**.
- [104] Katchalski-Katzir, E. Immobilized enzymes: Learning from past successes and failures. *Trends in Biotechnology*, v.11, p.471-478. **1993**.
- [105] López-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuentes, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, v.116, p.1-10. **2005**.
- [106] Bianchi, D.; Golini, P.; Bortolo, R.; Cesti, P. Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports. *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, p.592-596. **1996**.
- [107] Prabune, A.; Sivaraman, J. Immobilization of penicillin G acylase in porous beads of polyacrylamine gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.30, p.265-272. **1990**.
- [108] Van Langen, L. M.; Janssen, M. H. A.; Oosthoek, N. H. P.; Pereira, S. R. M.; Svedas, V. K.; Rantwijk, F. V.; Sheldon, R. A. Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase. *Biotechnology and Bioengineering*, v.79, n.2, p.224-228. **2002**.
- [109] Pedroche, J.; Yust, M. D. M.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J.; Guisán, J. M.; Millan, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose

supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.1160-1166. **2007**.

# *Capítulo 3*

## *Materiais e Métodos*

## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Suportes:

Quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,2 % adquirido junto a POLYMAR IND LTDA, Fortaleza, Ceará; gelatina comercial da marca Oetker<sup>®</sup>; alginato de sódio (Vetec – São Paulo) e  $\kappa$ -carragenana adquiridos junto a Sigma Chemical Company (St Louis, MO).

#### 3.1.2 Microorganismos:

*Bacillus megaterium* ATCC 14945 doado pela Fundação Tropical (Brasil); *Saccharomyces cerevisiae* (fermento úmido para panificação) da marca Fleischmann<sup>®</sup>.

#### 3.1.3 Reagentes usados para tratamento dos suportes:

Dodecilsulfato de sódio (SDS), Alcalase<sup>®</sup>, sabão em pó de marca comercial.

#### 3.1.4 Enzimas:

Quimotripsina (EC 3.4.21.1) 120 U<sub>BTEE</sub>.mg<sup>-1</sup> de enzima liofilizada (0,92 ± 0,01mg de proteína.g<sup>-1</sup> de enzima liofilizada) da marca Sigma Chemical Company (St Louis, MO).

Carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) tipo II: de pancreas bovino (44 ± 2 U<sub>H-PHE</sub>.mg<sup>-1</sup> de proteína e 22 ± 0,5 mg de proteína. mL<sup>-1</sup> de suspensão) da marca Sigma Chemical Company (St Louis, MO).

Alcalase<sup>®</sup> 2,4L FG (EC 3.4.21.62) 28 U<sub>BTEE</sub>.mg<sup>-1</sup> de proteína e contendo 32 mg de proteína.mL<sup>-1</sup> de extrato enzimático doada pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark).

Celluclast<sup>®</sup> 1,5L (110,4 ± 0,5 U<sub>FP</sub>; 30,4 ± 0,8 U<sub>Avicel</sub>; 21,0 ± 0,2 U<sub>CMC</sub> e 5,0 ± 0,3 U<sub>Celobiose</sub>) por mililitro de extrato enzimático e contendo 41,3 ± 0,5 mg de proteína.mL<sup>-1</sup> de extrato enzimático doada pela Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark).

#### 3.1.5 Agentes ativantes:

Glutaraldeído a 25% (v/v) comercializado pela Vetec - São Paulo; glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) e epícloridrina (1-cloro-2,3-epóxido) adquiridos junto a Sigma Chemical Company (St Louis, MO).

### 3.1.6 Substratos:

Éster etílico de N-benzoil-L-tirosina (BTEE), hipuril-L-fenilalanina (H-PHE) adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO) foram usados para as proteases estudadas neste trabalho. Para a Celluclast<sup>®</sup> 1,5L, foram utilizados papel de filtro Whatman n° 1, Avicel<sup>®</sup> (PH 101) e carboximetilcelulose obtidos da Fluka Chemie AG (Suíça) e celobiose adquirido da Sigma Chemical Company (St Louis, MO).

Neste trabalho, foram usados ainda soro de queijo prato doado pela Cooperativa de Laticínios de São Carlos para ensaios de efetividade de quimotripsina livre e imobilizada, bem como, bagaço de cana gentilmente doado pelo Professor Doutor Adílson Gonçalves da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) em ensaios de sacarificação utilizando celulase livre e imobilizada.

### 3.1.7 Reagentes para análise de proteínas, açúcares e teor de celulose:

Azul brilhante de Coomassie G 250, ácido dinitro-salicílico e antrona da marca Vetec - São Paulo, kit enzimático para determinação de glicose da marca Solab-São Paulo. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e de diferentes empresas comerciais.

### 3.1.8 Preparação das partículas de quitosana:

Quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% v/v. A solução resultante foi deixada em homogeneização por 30 minutos. O sistema solubilizado foi adicionada lentamente em NaOH 0,1M em uma razão de 1/10 e deixado em agitação moderada por 4h a temperatura ambiente. Depois, foram lavadas exaustivamente com água destilada até a neutralidade.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparação das partículas de híbridos de quitosana:

Quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% v/v e a esta solução foram adicionados os seguintes polímeros separadamente: gelatina comercial, alginato de sódio ou carragenana. A solução resultante foi deixada em homogeneização por 30 minutos. O sistema solubilizado foi adicionado lentamente em NaOH 0,1M em uma razão 1/10 sobre agitação moderada e deixado em repouso por 4h. Após este tempo, as partículas foram lavadas com

água destilada e Milli-Q. Os seguintes suportes foram preparados: quitosana 2,5% e 5,0%, bem como, quitosana 2,5% - alginato 2,5%, quitosana 2,5% - carragenana 2,5% e quitosana 4,0% - gelatina 3,0% sendo todas as concentrações em percentagem massa/volume. Concentrações mais altas de quitosana e outros polímeros não foram testados devido à alta viscosidade das soluções dificultando o manuseio do gel obtido.

### **3.2.2 Preparação das partículas de híbridos de quitosana contendo microorganismos:**

Quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% v/v e a esta solução foram adicionados os seguintes polímeros separadamente: gelatina comercial, alginato de sódio ou carragenana. Posteriormente, os respectivos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ou *Bacillus megaterium* (Bm) foram adicionados. A solução resultante foi deixada em homogeneização por 30 minutos. O sistema solubilizado foi adicionado lentamente em NaOH 0,1M em uma razão 1/10 sobre agitação moderada e deixado em repouso por 4h. Após este tempo, as partículas foram tratadas com uma solução alcalina composta por 20% de NaOH 1M, 10% de dodecilsulfato de sódio 1% e 70% de água destilada por 24h a temperatura ambiente numa proporção de 0,3mL por miligrama de microrganismo utilizado. A última etapa consistia de um ataque com Alcalase<sup>®</sup> 0,05% v/v em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 8,0 a temperatura ambiente por 24h e conseqüente lavagem com água destilada e Milli-Q. Esse tratamento foi utilizado visando à retirada e a lise das células para formação de possíveis poros e aumento da capacidade de imobilização dos suportes.

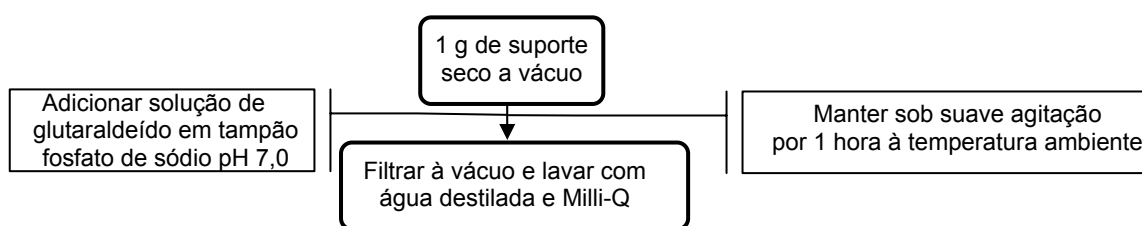
Visando à diminuição de tempo e custos, optou-se por uma segunda metodologia de lise celular bem mais rápida, prática e barata pelo uso de sabão em pó comercial o qual contém SDS, proteases, lipases secretadas por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* [1]. Após coagulação do gel em NaOH, o pH da solução coagulante era ajustado em 9,0 e a temperatura a 40°C. Adicionava-se sabão em pó de modo a se alcançar uma concentração de 1% m/v e o sistema era mantido sob agitação por 24h, sendo depois o gel lavado com água destilada e Milli-Q. Os suportes preparados por essa metodologia foram: quitosana 5,0% - Sc 5,0%, quitosana 2,5% - alginato 2,5% - Sc 1,75%, quitosana 2,5% - alginato 2,5% - Bm 5,0%, quitosana 2,5% - carragenana 2,5% - Sc 1,25%, quitosana 2,5% - carragenana 2,5% - Sc 5,0%, quitosana 2,5% - carragenana 2,5% - Bm 5,0%, quitosana 4,0% - gelatina 3,0% - Sc 1,75%, quitosana 4,0% - gelatina 3,0% - Bm 5,0%, sendo todas as concentrações em percentagem massa/volume.

### 3.2.3 Preparação de quitosana-alginato-epoxilado:

Dez gramas de quitosana 2,5% (m/v) foram dissolvidos em 400mL de solução de ácido acético 5% (v/v) e mantidos sob agitação mecânica. Em seguida, foram adicionados 40mL de metanol e 4mL de anidrido acético para uma acetilação parcial da quitosana. Após 1h, foram adicionados 10g de alginato de sódio 2,5% (m/v) ao sistema e mantido sob agitação por 1h. Esta solução foi adicionada em 3,6 L de solução de NaOH 0,1 M para a formação do gel e mantidos sob moderada agitação por 4h e depois lavado com água destilada. Para cada 10g de gel obtido, foram adicionados 100 mL de dimetilformamida e mantido por 30min a 60°C. Em seguida, foram adicionados 0,8 g de KOH dissolvido em 3mL de isopropanol e, ao final, 10mL de epícloridrina, conforme metodologia adaptada de Fangkangwanwong e colaboradores [2]. O sistema foi mantido sob agitação branda a 60°C por 12h. Após a epoxilação, o gel foi lavado com água destilada e Milli-Q até neutralidade.

### 3.2.4 Ativação dos suportes utilizando glutaraldeído:

A ativação dos suportes foi realizada com glutaraldeído 5% v/v em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 por 1h a 25°C (razão  $V_{gel}/V_{total}$  de 1/10). O glutaraldeído funciona como agente ativante para facilitar a imobilização da enzima e para evitar a dessorção da mesma. Depois da ativação, as partículas foram lavadas com excesso de água destilada e Milli-Q para retirar o excesso de glutaraldeído (Figura 3.1).



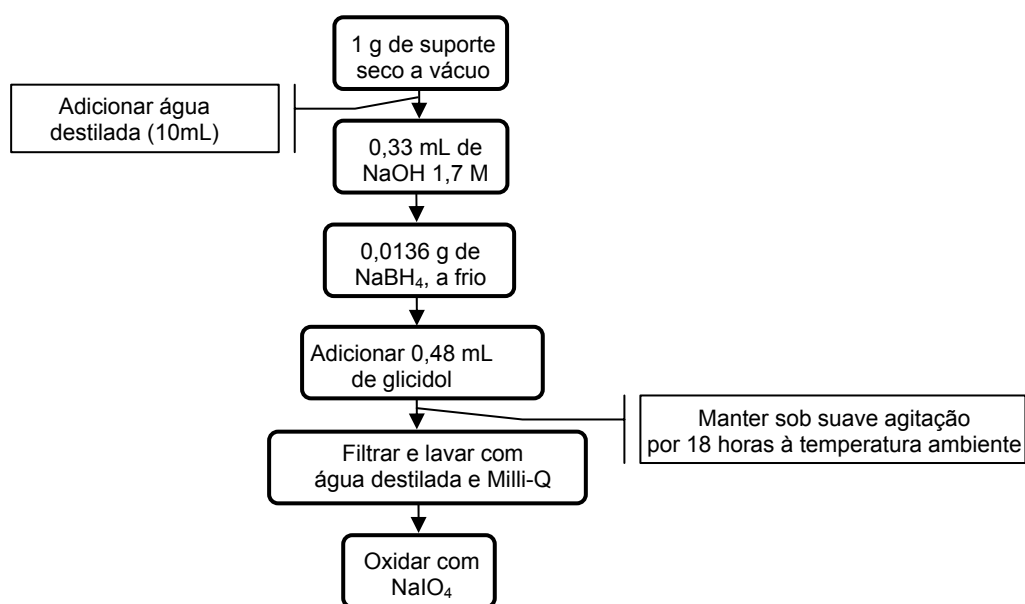
**Figura 3.1** Fluxograma mostrando a ativação via glutaraldeído dos géis preparados.

### 3.2.5 Ativação dos suportes utilizando glicidol:

Os suportes ativados foram obtidos por eterificação deste com glicidol e posterior oxidação com periodato de sódio [3]. Para cada grama de suporte adicionava-se 10mL de água destilada, 0,33mL de NaOH 1,7M contendo borohidreto de sódio 0,75M e 0,48mL de glicidol lentamente em banho de gelo. A suspensão era mantida sob agitação a temperatura ambiente por 18 a 24 horas e depois lavado em excesso com água destilada e resuspenso em



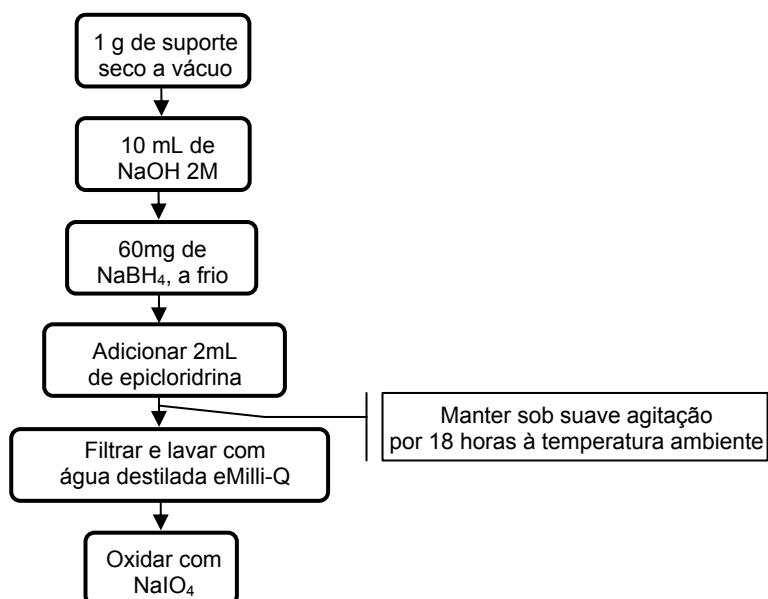
uma proporção ( $V_{\text{gel}}/V_{\text{total}}$  de 1/10) para posterior oxidação a glioxil. Para cada grama de suporte eram adicionados 2mL de uma solução de periodato de sódio 0,1M. Deixava-se reagir por 2 horas à temperatura ambiente. Oxidado o suporte, este era lavado com água destilada e Milli-Q e utilizado para posterior imobilização enzimática. No estudo da celulase, alguns suportes foram previamente ativados com glutaraldeído e em seguida ativados com glicidol com posterior oxidação com periodato de sódio (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Fluxograma mostrando a ativação via glicidol dos géis preparados.

### 3.2.6 Ativação dos suportes utilizando epicloridrina:

Utilizando epicloridrina, a metodologia consistia na adição de 10mL de NaOH 2M contendo 60mg de NaBH<sub>4</sub> e 2mL de epicloridrina por grama de gel [4]. A ativação se dava em banho de gelo sob agitação por 18 horas. O processo de oxidação do suporte era o mesmo utilizado para ativação por meio do glicidol gerando grupos glioxil/epóxidos (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Fluxograma mostrando a ativação via epicloridrina dos géis preparados.

### 3.2.7 Determinação da quantidade de aldeídos nos suportes:

Dez miligramas de suporte foram adicionados a 1 mL de reagente de Schiff contendo fucsina básica 0,67% m/v, bissulfito de sódio 0,67% m/v e pH 4,5, ajustado com HCl concentrado para evitar qualquer solubilização dos suportes a base de quitosana previamente ativadas com grupos amino bloqueados. Amostras eram mantidas em repouso por 24h e, posteriormente, 2 mL de água destilada eram adicionados à suspensão. Após decantação de aproximadamente 10 minutos, a absorbância do sobrenadante era lida em comprimento de onda de 450 nm. A concentração de grupos aldeídos em glioxil agarose pode ser calculada através do consumo de periodato de sódio durante oxidação. Entretanto, essa metodologia para glioxil-quitosana não é precisa, pois o periodato é consumido na própria reação com a quitosana.

Dessa maneira, as concentrações de aldeído em suportes a base de quitosana foram obtidas comparando as absorbâncias durante a reação do reagente de Schiff com àquelas obtidas pelo glioxil-agarose [3] com diferentes concentrações conhecidas de aldeído por grama de gel obtendo-se, assim, uma curva de calibração da absorbância em função da concentração de aldeídos em glioxil-agarose. Deste modo, calculava-se a concentração de aldeídos em géis de quitosana com base na absorbância encontrada utilizando a curva de calibração obtida para o gel glioxil-agarose.

### 3.2.8 Determinação da quantidade de epóxidos nos suportes:

Quantificação de grupos epóxidos (oxirano) foi realizada de acordo com Sundberg e Porath [5] com pequenas modificações. A liberação de íons hidroxila foi acompanhada por titulação de neutralização com HCl 0,1M. O suporte contendo epóxidos (100mg) era adicionado a 15mL de tiosulfato de sódio 1,3M a pH 7,0 (adição de HCl) até todo consumo de epóxidos pelo tiosulfato de sódio. A quantidade de epóxidos presentes na solução foi calculado a partir do volume de HCl adicionado para manter a neutralidade da reação.

### 3.2.9 Microscopia eletrônica de varredura:

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para observar a morfologia de alguns híbridos de quitosana obtidos neste trabalho. Amostras foram liofilizadas para extração de água sem colapsar suas estruturas porosas. As partículas foram imersas em nitrogênio líquido usando o equipamento Heto FD 2.5 a  $5 \times 10^{-3}$  mBar de vácuo e - 45°C. Após liofilização, as amostras foram recobertas com uma delgada camada de ouro (10nm) usando um revestidor (Veeco VE-300) e então observadas através de um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-35C (20 kV).

### 3.2.10 Determinação de proteínas:

A concentração de proteínas de preparações enzimáticas comerciais e dos sobrenadantes durante as imobilizações foi determinada pelo método de Bradford [6] utilizando curva de calibração do padrão soro albumina bovina (BSA) válida numa faixa de concentração de 0 a 0,6 g.L<sup>-1</sup>.

### 3.2.11 Ensaios de atividade enzimática:

As atividades enzimáticas foram determinadas espectrofotometricamente, medindo-se o aumento de absorbância devido à formação do produto de hidrólise dos substratos. Os ensaios eram realizados em cubeta de vidro (região visível) ou de quartzo (região UV) de 1cm de caminho óptico em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Amersham Pharmacia Biotech , EUA) adaptado com agitação magnética e circulação de água para possível termostatização do sistema.

**Quimotripsina e alcalase:** 140µL de enzima livre ou suspensão de enzima imobilizada (retirada com ponteira cortada), convenientemente diluídas eram adicionados à mistura reacional contendo 2,8mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 e 140µL de éster etílico

de N-benzoil-L-tirosina (BTEE) 8mM preparado em etanol a 25°C [7]. O aumento de absorvância medido a 258nm era acompanhado através do software Swift<sup>®</sup> de modo a se determinar a tangente da região linear. A atividade era calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 870 L / (mol.cm). Uma unidade BTEE ( $U_{BTEE}$ ) hidrolisava 1 $\mu$ mol de BTEE por minuto nas condições descritas. Durante todos os ensaios era verificada a interferência do gel (suspensão) nas leituras espectrofotométricas usando somente suspensão e tampão apropriado. O cálculo de atividade foi realizado de acordo com a equação 3.1.

$$U_{BTEE} / mL = \frac{Abs / min \times diluição \times V_{cubeta} (mL)}{0,87 \times V_{enzima} (mL)} \quad (3.1)$$

**Carboxipeptidase A (CPA):** 100 $\mu$ L de enzima livre ou suspensão de enzima imobilizada (retirada com ponteira cortada), convenientemente diluídas eram adicionados à mistura reacional contendo 2,9mL de hipuril-L-fenilalanina (H-PHE) 1mM preparado em tampão tris/HCl 25mM (pH 7,5) contendo NaCl 500mM a 25°C [8]. O aumento de absorvância medido a 254nm era acompanhado através do software Swift<sup>®</sup> de modo a se determinar a tangente da região linear. A atividade era calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 360 L / (mol.cm). Uma unidade H-PHE ( $U_{H-PHE}$ ) hidrolisava 1 $\mu$ mol de H-PHE por minuto nas condições descritas. Durante todos os ensaios era verificada a interferência do gel (suspensão) nas leituras espectrofotométricas usando somente suspensão e tampão apropriado. O cálculo de atividade foi realizado de acordo com a equação 3.2.

$$U_{H-PHE} / mL = \frac{Abs / min \times diluição \times V_{cubeta} (mL)}{0,36 \times V_{enzima} (mL)} \quad (3.2)$$

### **Celulases (Celluclast<sup>®</sup>):**

A Celluclast<sup>®</sup> é uma preparação enzimática que contem enzimas com características distintas: endocelulases, exocelulases e  $\beta$ -glicosidase. Assim era necessário medir as diferentes atividades para as respectivas enzimas.

As atividades de celulase total foram determinadas pela hidrólise de papel de filtro

Whatman N°1 [9]. A reação foi conduzida em frascos de vidro de 10 mL contendo 1,5 mL de tampão citrato de sódio 0,05M (pH 4,8), 50 mg de papel de filtro picado Whatman N°1 (3,0% m/v) e 100 µL de amostra previamente diluída (enzima livre) ou 200mg de derivado (enzima imobilizada). A reação foi mantida a 50 °C por 1h sob agitação de modo que a concentração de açúcar redutor não passasse de 3g.L<sup>-1</sup>. Após 1 h, a reação foi interrompida pela adição de 2mL de reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico). A mistura reacional foi aquecida a 100 °C por 5 min e depois de esfriar mediu-se a absorbância em 540 nm [10]. Para o branco, substituiu-se a amostra por tampão citrato de sódio 0,05M (pH 4,8) e também não houve adição de papel de filtro.

As atividades de endocelulases foram determinadas pela hidrólise de carboximetilcelulose (CMC) [11]. A reação foi conduzida em frascos de vidro de 10 mL contendo 1,5mL de CMC 0,44 % m/v em tampão acetato de sódio 0,05 mM (pH 5,0) e 100 µL de amostra previamente diluída (enzima livre) ou 200mg de derivado (enzima imobilizada). A reação foi mantida a 50°C por 1h sob agitação de modo que a concentração de açúcar redutor não passasse de 0,4g.L<sup>-1</sup>. Após 1 h, a reação foi interrompida pela adição de 2mL de reagente DNS (ácido 3,5-dinitro-salicílico). A mistura reacional foi aquecida a 100 °C por 5 min e após resfriamento, mediu-se a absorbância em 540nm. Para o branco, substituiu-se a amostra por tampão acetato de sódio não contendo CMC.

As atividades de exocelulases foram determinadas utilizando Avicel (PH 101) 0,5 % m/v como substrato. Para determinação dessas atividades, foi feito procedimento semelhante às endocelulases, mantendo a reação de hidrólise por 2h de modo que a concentração de açúcar redutor não passasse de 0,5g.L<sup>-1</sup>. Uma unidade de celulase total ( $U_{FP}$ ), endo ( $U_{CMC}$ ) ou exo ( $U_{AVI}$ ) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o respectivo substrato para gerar 1µmol de glicose por minuto nas condições descritas acima. As atividades podem ser calculadas de acordo com a equação 3.3 [12].

$$U / mL = \frac{ART (mg / mL) \times V_T (mL)}{T_H \times 0,18mg \times V_E (mL)} \quad (3.3)$$

sendo  $ART$  (concentração de açúcar redutor);  $V_T$  (volume do reator);  $T_H$  (tempo de hidrólise em minutos);  $V_E$  (volume de enzima) e 0,18mg (1µmol de glicose).

As atividades β-glicosidase (celobiase) foram determinadas pela hidrólise de celobiose 0,015M. A reação foi conduzida em frascos de vidro de 10 mL contendo 2mL de celobiose

em tampão citrato de sódio 0,05 mM (pH 5,0) e 100  $\mu$ L de amostra previamente diluída (enzima livre) ou 200mg de derivado (enzima imobilizada). A reação foi mantida a 50°C por 30 minutos sob agitação de modo que a concentração de açúcar redutor não passasse de 0,5g.L<sup>-1</sup>. Após 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de NaOH e a glicose produzida foi quantificada através de um kit enzimático. Uma unidade celobiose ( $U_{CEL}$ ) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o respectivo substrato para gerar 2 $\mu$ mol de glicose por minuto nas condições descritas acima. A atividade pode ser calculada de acordo com a equação 3.4.

$$U / mL = \frac{CG(mg / mL) \times V_T (mL)}{T_H \times 0,36mg \times V_E (mL)} \quad (3.4)$$

sendo  $CG$  (concentração de glicose);  $V_T$  (volume do reator);  $T_H$  (tempo de hidrólise em minutos);  $V_E$  (volume de enzima) e 0,36mg (2 $\mu$ mol de glicose).

### 3.2.12 Estabilidade térmica:

Eram preparadas soluções das enzimas solúveis (quimotripsina, CPA ou celulase) e suspensões das enzimas imobilizadas em tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 8,0 (para quimotripsina a 55°C e 65°C) ou tampão tris/HCl 0,025M, pH 7,5 contendo NaCl 0,5M (para a CPA a 55°C) ou tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,8 (para celulase a 65°C). As soluções e suspensões eram incubadas em frascos fechados. De acordo com a velocidade de inativação térmica da enzima nas condições ensaiadas, eram coletadas amostras em intervalos pré-determinados de tempo e as atividades residuais eram medidas. Para casos onde a inativação térmica fosse muito rápida, as amostras eram colocadas imediatamente em banho de gelo e em seguida as atividades eram mensuradas.

Um modelo de dois parâmetros proposto por Sadana e Henley [13] foi ajustado aos dados experimentais de inativação térmica. O modelo admite decaimento segundo uma reação de 1ª ordem para a fração (1- $\alpha$ ) da enzima, sendo  $\alpha$  uma constante conforme mostra a equação 3.5.

$$a_R = (1 - \alpha) \times \exp(-kt) + \alpha \quad (3.5)$$

sendo  $a_R$  atividade relativa (adimensional);  $\alpha$  é a relação entre a atividade específica no estado final  $A$  e no estado inicial  $A_I$ ;  $k$  constante de desativação de primeira ordem ( $\text{tempo}^{-1}$ ). O parâmetro  $k$  descreve o processo de desdobramento ou inativação enzimática e  $\alpha$ , o nível de estabilização da atividade [14]. Fatores de estabilidade (FE) foram obtidos como a razão entre o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) dos derivados e o tempo de meia vida da enzima livre nas mesmas condições do ensaio. No entanto, para quimotripsina, devido à rápida desativação a 65°C, o fator de estabilidade do derivado mais ativo foi obtido da seguinte maneira: ( $t_{1/2}$  do derivado /  $t_{1/2}$  do derivado de referência)  $\times$  FE do derivado de referência a 55°C. O emprego desta equação para quimotripsina será explicado mais detalhadamente nos resultados e discussões.

### 3.2.13 Ensaio de temperatura – atividade enzimática:

Para quimotripsina, foram preparadas soluções de enzima livre ou suspensões contendo enzima imobilizada em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 8,0. As atividades eram medidas em uma faixa de temperatura de 30 a 70°C com BTEE como substrato.

Para CPA, foi usado tampão tris/HCl 0,025M, pH 7,5 contendo NaCl 0,5M. As atividades eram obtidas numa faixa de temperatura de 25 a 70°C com H-PHE como substrato.

Para a celulase, foi usado tampão citrato de sódio 0,05M, pH 4,8. As atividades eram obtidas numa faixa de temperatura de 20 a 80°C com papel de filtro como substrato.

Atividade relativa foi definida como a razão entre a atividade inicial enzimática medida a uma determinada temperatura e a atividade inicial enzimática máxima.

### 3.2.14 Ensaio de pH – atividade enzimática:

As atividades para quimotripsina foram medidas a 25°C com BTEE como substrato variando o pH do meio reacional. Sendo tampão fosfato de sódio 0,1M, pH (6,0 a 8,5) e tampão bicarbonato sódico 0,1M, pH 9,0 a 10,0.

Com a CPA, utilizou-se H-PHE como substrato a 25°C com tampão fosfato de sódio 0,025M, pH (6,4 a 8,5), tampão tris/HCl 0,025M com NaCl 0,5M, pH (7,5) e tampão bicarbonato sódico 0,025M, pH 10,0 e 11,0.

Para a celulase, mediu-se a atividade com papel de filtro a 50°C com tampão citrato de sódio 0,05M, pH (2,0 a 5,0), tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,0 e 8,0.

Atividade relativa foi definida como a razão entre a atividade inicial enzimática medida a um determinado pH e a atividade inicial enzimática máxima.

### 3.2.15 Avaliação da interação enzima-suporte:

A avaliação da interação enzima-suporte foi realizada incubando-se os diversos derivados obtidos em soluções de NaCl 0,5M durante 24h a temperatura ambiente. Após incubação, verificou-se a atividade enzimática na suspensão, bem como a concentração de proteína pelo método de Bradford.

### 3.2.16 Análise de aminoácidos de enzima livre e imobilizada:

Enzima livre e imobilizada (ambos contendo aproximadamente 2mg de proteína) foram hidrolisados em HCl (6,8M) a 105°C por 24h. A mistura foi seca a 75°C por 24h. O extrato de aminoácidos foi dissolvido em tampão citrato de sódio 0,2M, pH 2,2 e a suspensão foi centrifugada a 10.000×g por 4 minutos. Diluiu-se a parte líquida em ácido tricloroacético 10% v/v em 1/1 e centrifugou-se novamente.

A análise de aminoácidos em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) seguiu o método da Waters Pico-Tag<sup>®</sup>. Antes da separação em coluna, os aminoácidos presentes na amostra reagiram com fenilisotiocianato (PITC) formando derivados de feniltiocarbamil (PTC). O sistema era HPLC modelo 717 mais detector 486 UV-Vis (Waters, Milford, MA) com uma coluna de fase reversa de 300mm×3,9mm (Pico Tag<sup>®</sup>; Waters) a 50°C. Foi utilizado um gradiente de duas fases móveis (A): 0,14M acetato de sódio contendo 0,5µM EDTA e 6% acetonitrila (pH 5,7) e (B): 60% acetonitrila. Utilizou-se uma vazão de 1,0-1,5 mL.min<sup>-1</sup> para as fases móveis: 0,0 –12,0 min, gradiente linear de A/B (99:1) a A/B (0:100); 12,0-12,5 min, eluição com A/B (99:1).

### 3.2.17 Acompanhamento do processo de imobilização através do rendimento e atividade recuperada:

A caracterização da enzima, primeiramente, dava-se pela obtenção da atividade enzimática (U.mL<sup>-1</sup> de extrato ou U.mg<sup>-1</sup> de enzima liofilizada) e a massa de proteína.mg<sup>-1</sup> de enzima liofilizada ou massa de proteína.mL<sup>-1</sup> de extrato através de metodologias padrões de atividade enzimática (3.2.12) e método de Bradford [7].

Ao iniciar a imobilização, era conhecida a carga enzimática oferecida (U.g<sup>-1</sup> de gel e mg de proteína.g<sup>-1</sup> de gel).

O rendimento de imobilização era calculado medindo-se as concentrações de proteína, bem como atividade enzimática no branco (contendo somente tampão apropriado e enzima),



na suspensão para verificar efeito de diluição devido à adição de gel e no sobrenadante ao decorrer do processo de imobilização.

Atividades medidas no branco nas mesmas condições de imobilização sempre preservaram 100% de sua atividade inicial ao decorrer deste trabalho. A percentagem de enzima não imobilizada (%*NI*) era calculada dividindo-se a atividade remanescente no sobrenadante ( $A_{TF}$ ) pela atividade enzimática no branco ao final da imobilização ( $A_{BF}$ ), tendo em conta a diluição devido à adição do suporte, que era determinada pela razão entre atividade no branco inicial ( $A_{B0}$ ) e atividade na suspensão ( $A_{Susp}$ ). Assim, conhecendo-se o número de unidades enzimáticas oferecidas por grama de gel, obtinha-se a quantidade de enzima remanescente, isto é, que não fora imobilizada de acordo com a equação 3.6.

$$\%NI = \frac{\frac{A_{B0}}{A_{Susp}} \times A_{TF}}{A_{BF}} \times 100 \quad (3.6)$$

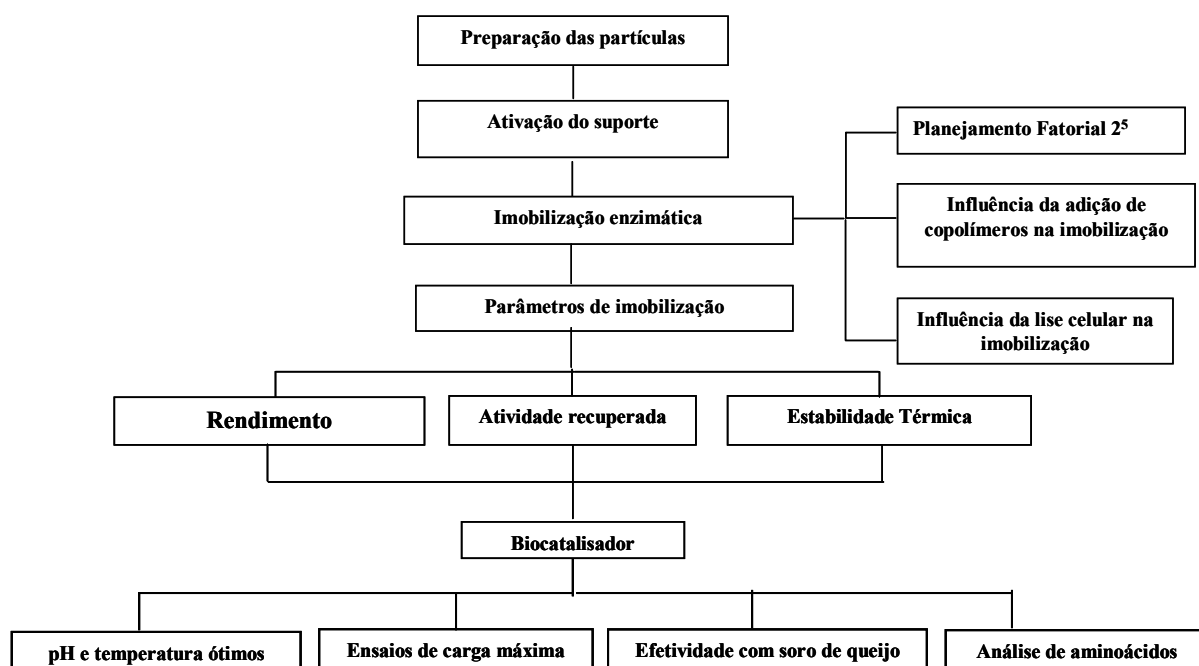
Logo, a atividade teoricamente imobilizada ( $At_{Teórica}$ ) foi obtida como (100-*NI*)%. Ao finalizar a imobilização, a atividade aparente do gel era medida ( $At_{Gel}$ ) e comparada à atividade teoricamente imobilizada ( $At_{Teórica}$ ). A atividade recuperada ( $At_{Recuperada}$ ) foi então a razão entre atividade aparente obtida no gel pela atividade teoricamente imobilizada de acordo com a equação 3.7.

$$\%At_{Recuperada} = \frac{At_{Gel}}{At_{Teórica}} \times 100 \quad (3.7)$$

Vale ressaltar que o rendimento de imobilização também era acompanhado pelo desaparecimento de proteína no processo através do método de Bradford.

### 3.3 Estudos de imobilização e estabilização de quimotripsina

A Figura 3.4 representa todas as etapas do estudo de imobilização de quimotripsina em diversos suportes ativados em diferentes condições. Cada etapa é descrita detalhadamente ao longo do capítulo.



**Figura 3.4** Fluxograma representativo das etapas dos estudos de imobilização e estabilização de quimotripsina.

### 3.3.1 Planejamento fatorial 2<sup>5</sup>:

Ao começar esse projeto de pesquisa, buscavam-se alternativas para se alcançar bons rendimentos de imobilização com boa retenção de atividade e estabilização para quimotripsina. Assim, optou-se por utilizar um estudo através de planejamento fatorial, usando como suporte, híbridos de quitosana apenas com gelatina e glutaraldeído como ativante. A partir destes resultados, prosseguiu-se com o emprego de outros polímeros com diferentes ativações.

Então, realizou-se a imobilização multipontual de quimotripsina com o objetivo de se chegar ao melhor derivado quitosana-gelatina ativado com glutaraldeído em condições de imobilização de pH 10,05 por 2h. O processo foi estudado através de um planejamento fatorial 2<sup>5</sup> [15] e se utilizou o *software Statistica*<sup>®</sup> 7.0 para tratamento dos dados. Esta metodologia permitiu pesquisar os principais efeitos e interações entre os parâmetros analisados reduzindo o número e custos de experimentos [16,17]. De acordo com a Tabela 3.1, os parâmetros selecionados para este estudo foram concentração de quitosana (A), gelatina (B), NaOH (C), temperatura da solução de NaOH (D) e concentração de glutaraldeído (E). As respostas escolhidas foram: rendimento do processo de imobilização, atividade recuperada e estabilidade dos derivados obtidos em relação à enzima livre a 55°C. Todos os experimentos foram feitos nos níveis (-1) e (+1) com a execução de quatro experimentos no ponto central (zero) para estimativa de erros experimentais.

**Tabela 3.1** Variáveis e níveis do planejamento fatorial  $2^5$ , sendo (A) concentração de quitosana, (B) concentração de gelatina, (C) concentração de NaOH, (D) temperatura de coagulação e (E) concentração de glutaraldeído.

Variável	Nível	-1	0	+1
concentração de quitosana (%)		2	3	4
concentração de gelatina (%)		1	2	3
concentração de NaOH (mol.L <sup>-1</sup> )		0,1	0,5	1,0
temperatura de coagulação (°C)		0,0	20,0	40,0
concentração de glutaraldeído (%)		2,5	5,0	7,5

### 3.3.2 Imobilização multipontual de quimotripsina em suportes ativado com glutaraldeído:

Quimotripsina (600 U<sub>BTEE</sub> .g<sup>-1</sup> de gel ou 5mg de enzima liofilizada .g<sup>-1</sup> de gel) foi adicionada ao suporte ativado (razão m/v de 1/10) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 a 4°C ou tampão bicarbonato sódico 0,1M, pH 10,05 a 25°C por 2h. Os derivados incubados em pH 10,05 foram reduzidos com NaBH<sub>4</sub> (0,1% m/v) sob branda agitação por 30 minutos a temperatura ambiente sendo lavados com água destilada para eliminação do borohidreto residual e em seqüência água Milli-Q.

### 3.3.3 Imobilização multipontual de quimotripsina em suportes ativado com glicidol ou epiclorigrina:

Quimotripsina (600 ou 1200 U<sub>BTEE</sub> .g<sup>-1</sup> de gel, isto é, 5 ou 10mg de enzima liofilizada .g<sup>-1</sup> de gel) foram adicionadas ao suporte ativado (razão m/v de 1/10) em tampão bicarbonato sódico 0,1M, pH 10,05 a 25°C. Os derivados foram mantidos sob branda agitação por diferentes tempos de contato enzima-suporte (24, 48, 72 e 96 horas), Em seguida, o melhor derivado obtido foi reduzido com NaBH<sub>4</sub> (0,1% m/v) sob branda agitação por 30 minutos a temperatura ambiente [3,8] sendo lavados com água destilada para eliminação do borohidreto residual e em seqüência com água Milli-Q.

### 3.3.4 Ensaios de capacidade máxima de imobilização:

Ensaios de capacidade máxima de imobilização de quimotripsina foram realizados para os melhores derivados ativados com glutaraldeído, glicidol e epícloridrina. As cargas enzimáticas oferecidas variaram de 5 a 200mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup> de gel.

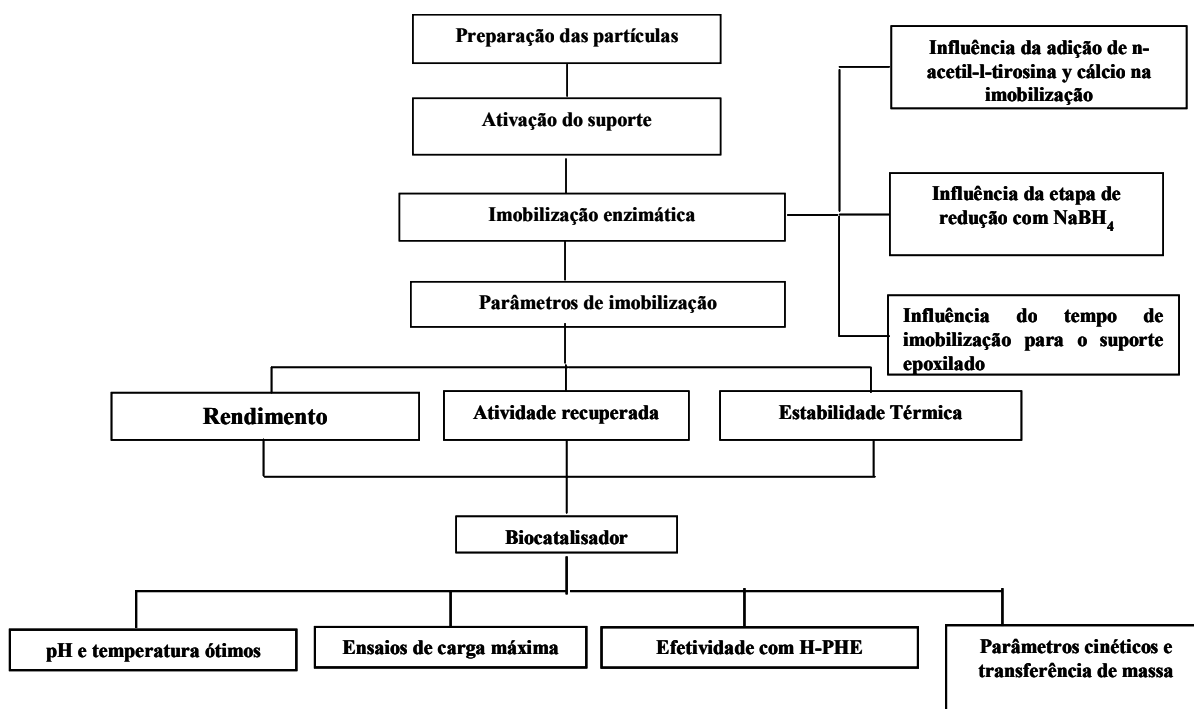
### 3.3.5 Ensaios de hidrólise de soro de queijo utilizando quimotripsina imobilizada:

Os ensaios de hidrólise de soro de queijo com quimotripsina livre e imobilizada foram feitos com auxílio de um titulador automático e em reator com controle de temperatura. As velocidades iniciais de hidrólise foram determinadas através do consumo de hidróxido de sódio ao longo do tempo para manter o pH da reação constante e igual a 8,0. As condições experimentais foram: soro de queijo 46g.L<sup>-1</sup>, NaOH 0,05M, 55°C, tempo de hidrólise de 1 a 5 minutos. O cálculo para efetividade ( $\eta$ ) é a razão entre a velocidade de reação da enzima imobilizada ( $V_{deriv}$ ) e enzima livre ( $V_L$ ) sendo ( $C_{deriv}$ ) e ( $C_L$ ) concentração de enzima imobilizada e de enzima livre no reator, equação 3.8.

$$\eta = \frac{V_{deriv}}{V_L \times \frac{C_{deriv}}{C_L}} \quad (3.8)$$

## 3.4 Estudos de imobilização e estabilização de carboxipeptidase A (CPA)

A Figura 3.5 representa todas as etapas do estudo de imobilização de CPA em diversos suportes ativados em diferentes condições, bem como, ensaios cinéticos e determinação de parâmetros de transferência de massa. Cada etapa é descrita detalhadamente ao longo do capítulo.



**Figura 3.5** Fluxograma representativo das etapas dos estudos de imobilização e estabilização da CPA.

### 3.4.1 Imobilização multipontual de CPA em suporte ativado com glutaraldeído:

Uma solução de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M, pH 10,05 ( $44 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}^{-1}$  de gel ou  $1 \text{ mg}$  de enzima  $\cdot \text{g}^{-1}$  de gel) contendo ou não N-acetil-L-tirosina 0,01M, foi adicionado ao suporte ativado (razão m/v de 1/10). A preparação foi mantida sob agitação moderada a  $25^\circ\text{C}$  por 3h. Após imobilização, alguns derivados foram reduzidos com  $\text{NaBH}_4$  (0,1% m/v). Na etapa de redução, avaliou-se a influência de alguns compostos: a) L-tirosina, de modo a se obter concentração de 0,01M, e íons zinco 0,001M; b) somente L-tirosina 0,01M e c) somente íons zinco 0,001M, que foram adicionados à suspensão já contendo  $\text{NaBH}_4$  (0,1% m/v). A suspensão foi mantida sob branda agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. Passado este tempo, os derivados foram lavados com água destilada para eliminação do borohidreto residual, água Milli-Q e com tampão tris/HCl 0,025M, pH 7,5 contendo NaCl 0,5M para remoção de alguma proteína não ligada covalentemente. Em algumas imobilizações, após ativação, o suporte foi submetido a um tratamento com  $\text{CaCl}_2$  1% m/v por 1h em água Milli-Q a temperatura ambiente para verificar a influência do cálcio na imobilização.

### 3.4.2 Imobilização multipontual de CPA em suporte ativado com epiclorigrina:

A imobilização multipontual de CPA foi estudada através de oito experimentos onde os fatores escolhidos a se observar foram: (i) uma prévia reticulação com glutaraldeído 5% v/v em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 por 1h e redução com NaBH<sub>4</sub> 0,12M por 2h [18]. (ii) um prévio contato do suporte ativado, mas não oxidado, com CaCl<sub>2</sub> 1% m/v por 1h e depois oxidado com periodato de sódio e (iii) a presença ou não de N-acetil-L-tirosina 0,01M durante a imobilização. A Tabela 3.2 mostra a matriz experimental. As respostas analisadas foram: rendimento de imobilização (R<sub>I</sub>), atividade recuperada (A<sub>R</sub>) e estabilidade térmica a 55°C (F<sub>E</sub>).

**Tabela 3.2** Imobilização de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C por 3h em suporte ativado com epiclorigrina (quitosana – carragenana) em diferentes condições com carga enzimática de 1mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (44U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup>gel); (+) indica presença e (-) ausência.

Ensaio	Glutaraldeído + NaBH <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	N-acetil-L – tirosina
1	+	+	-
2	+	+	+
3	+	-	-
4	+	-	+
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	-	-
8	-	-	+

Uma solução de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M, pH 10,05 (44 U<sub>H-PHE</sub> .g<sup>-1</sup> de gel ou 1mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel) foi adicionada ao suporte ativado (razão m/v de 1/10). A preparação foi mantida sob agitação moderada a 25°C por 3h. Após imobilização, o melhor derivado entre os oito estudados foi reduzido com NaBH<sub>4</sub> (0,1% m/v) contendo L-tirosina 0,01M e íons zinco 0,001M. A suspensão foi mantida sob branda agitação por 30 minutos a temperatura ambiente sendo lavados com água destilada para eliminação do borohidreto residual, água Milli-Q e com tampão tris/HCl 0,025M, pH 7,5 contendo NaCl 0,5M para remoção de alguma proteína não ligada covalentemente.

### 3.4.3 Imobilização multipontual de CPA em suporte epoxilado:

Uma solução de CPA em tampão bicarbonato 0,02M e pH 10,05 (44 U<sub>H-PHE</sub> .g<sup>-1</sup> de gel ou 1mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel) foi adicionada ao suporte ativado (razão m/v de 1/10). A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida sob branda agitação a 25°C por

um período de 24 a 96 horas na presença de 0,01M de N-acetil-L-tirosina. Ao final, os derivados foram incubados em solução 3M de glicina pH 8,0 por 24 h [19] e lavados com água destilada, água Milli-Q e tampão tris-HCl 0,025M e pH 7,5 contendo NaCl 0,5M.

#### 3.4.4 Ensaio de capacidade máxima de imobilização:

Ensaio de capacidade máxima de imobilização de CPA foram realizados para os melhores derivados ativados com glutaraldeído, epícloridrina e epoxilado. As cargas enzimáticas oferecidas variaram de 1 a 4mg de CPA.g<sup>-1</sup>gel.

#### 3.4.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da hidrólise de hipuril-L-fenilalanina:

O efeito da concentração de H-PHE na velocidade inicial da reação de hidrólise por CPA livre e imobilizada foi estudada numa faixa de 0,1 a 0,7mM a pH 7,5 e 37°C. Experimentos foram realizados com os melhores derivados obtidos para cada agente ativante em tampão tris-HCl 0,025M, pH 7,5 contendo NaCl 0,5M. Ajustou-se modelo cinético de Michaelis-Menten (equação 3.9) aos pontos experimentais obtidos.

$$V = \frac{V_{\max} \times C_S}{K_m + C_S} \quad (3.9)$$

sendo ( $V$ ) velocidade da reação, ( $V_{\max}$ ) velocidade máxima, ( $K_m$ ) constante de Michaelis-Menten e ( $C_S$ ) concentração de substrato.

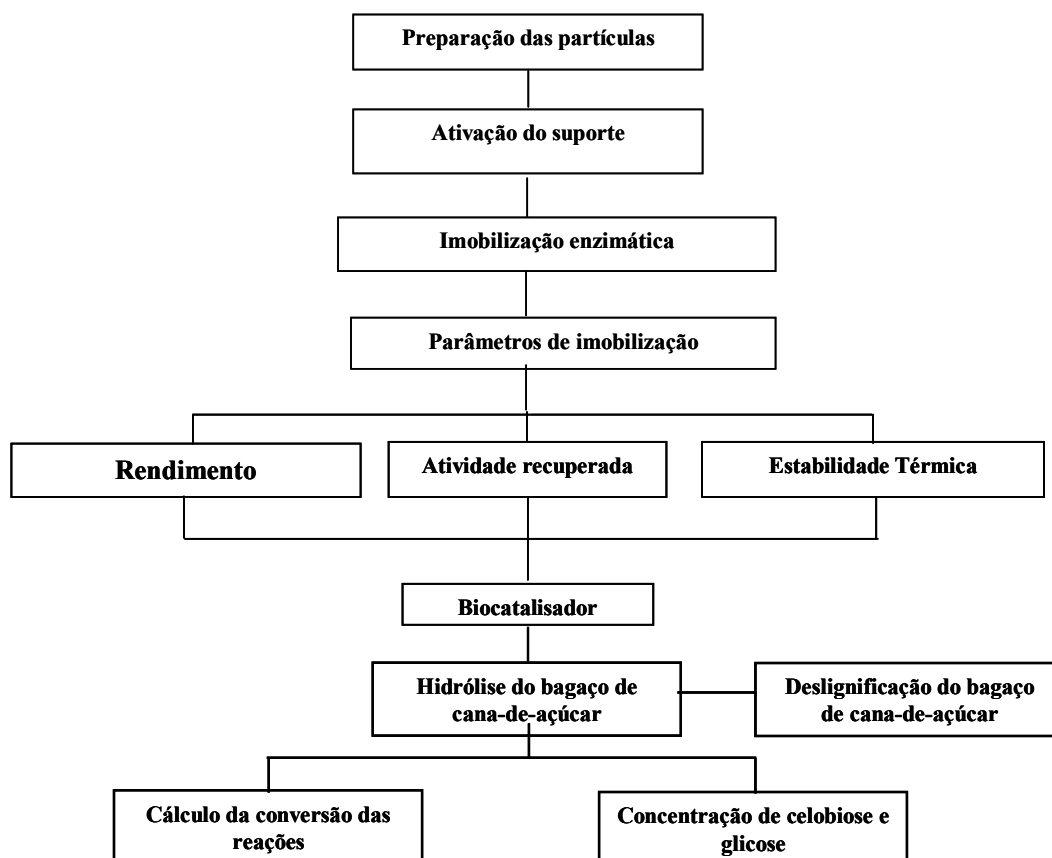
#### 3.4.6 Determinação dos parâmetros de transporte de massa na hidrólise de hipuril-L-fenilalanina:

Depois de calculados os parâmetros cinéticos da reação usando CPA livre e imobilizada, foi estimada a efetividade experimental através da equação 3.8 (3.3.5). Deste modo, usando um ábaco que correlaciona efetividade experimental interna com módulo de Thiele observado ( $\Phi$ ) para um determinado adimensional  $\beta$  ( $K_m/C_S$ ) foi possível determiná-lo [20]. A equação 3.10 correlaciona coeficiente de difusão efetiva do substrato ( $D_{eff}$ ) e módulo de Thiele observado ( $\Phi$ ), sendo ( $R$ ) raio da partícula, ( $V$ ) velocidade da reação e ( $C_S$ ) concentração de substrato.

$$\Phi = \left(\frac{R}{3}\right)^2 \times \frac{V}{D_{eff} \times C_S} \quad (3.10)$$

### 3.5 Estudos de imobilização e estabilização de celulase

A Figura 3.6 representa todas as etapas do estudo de imobilização de celulase em diversos suportes ativados em diferentes condições e ensaios de hidrólise do bagaço de cana. Cada etapa é descrita detalhadamente ao longo do capítulo.



**Figura 3.6** Fluxograma representativo das etapas dos estudos de imobilização de celulases e hidrólise do bagaço de cana.

#### 3.5.1 Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com glutaraldeído e/ou glicidol:

Celulase (10mg de proteína.g<sup>-1</sup> de gel ou 27 U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de gel) foi adicionada a quitosana-alginato com diferentes ativações e condições de imobilização, (i) ativado com glutaraldeído, (ii) ativado com glicidol, (iii) ativado com glicidol com imobilização na presença de ditioneitol (DTT) 0,05M, (iv) pré ativado com glutaraldeído e depois com glicidol (razão m/v de 1/10) em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 a 25°C por 24h. Depois foram reduzidos



com  $\text{NaBH}_4$  por 30 minutos ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de suspensão). Os derivados foram lavados com tampão fosfato sódico  $0,2\text{M}$ , pH 7,0 água destilada e em seqüência água Milli-Q.

Vale ressaltar que o derivado utilizado em bateladas seqüenciais de hidrólise de bagaço de cana foi preparado com a ativação (iv) de acordo com a metodologia proposta por Martins [21], com carga oferecida de ( $100\text{mg}$  de proteína. $\text{g}^{-1}$  de gel ou  $270\text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de gel) obtendo-se uma atividade teórica imobilizada de  $68\text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de gel e atividade aparente de  $15\text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de gel.

### 3.5.2 Imobilização covalente de celulase em suporte epoxilado:

Uma solução de celulase em tampão fosfato de sódio  $0,02\text{M}$  e pH 7,0 ( $10\text{mg}$  de enzima. $\text{g}^{-1}$  de gel ou  $27\text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de gel) foi adicionado ao suporte ativado (razão m/v de 1/10). A suspensão contendo solução enzimática e suporte foi mantida sob branda agitação a  $25^\circ\text{C}$  por um período de 5h a pH 7,0 e a pH 8,5 até completar 24h. Ao final, os derivados foram lavados com água destilada e água Milli-Q.

### 3.5.3 Imobilização de celulase por encapsulação e conseqüente reticulação com glutaraldeído:

Preparou-se uma solução de quitosana  $1\%$  m/v em ácido acético  $1\%$  v/v ( $40\text{mL}$ ). A esta solução foi adicionada celulase, de modo a se obter uma concentração de  $1\text{mg}$  de proteína por mililitro de solução de quitosana. Como o pH de solução de quitosana era de 4,3, não havia desnaturação enzimática, não existindo inconveniente para a enzima.

A solução (enzima-quitosana) foi homogeneizada e adicionada lentamente em  $200\text{mL}$  de tampão tris/HCl  $0,1\text{M}$ , pH 8,0, acompanhando-se o pH em banho de gelo por 30 minutos e depois adicionado glutaraldeído lentamente, de modo a atingir uma concentração de  $0,1\%$  v/v. Depois disto, a suspensão foi mantida sob agitação branda por 24h a temperatura ambiente.

O gel já contendo enzima imobilizada foi filtrado e lavado com água destilada e tampão fosfato de sódio  $0,1\text{M}$ , pH 7,0. A massa de gel lavado e seco foi medida para calcular rendimento de imobilização e atividade recuperada do processo.

O branco foi acompanhado (enzima e tampão tris/HCl, pH 8,0) durante o processo, não havendo perda de atividade enzimática. Calculou-se a atividade e concentração de proteína no tampão de coagulação do gel durante a imobilização.

Sabendo-se o quanto de atividade enzimática e proteína desaparecida no processo e a massa de gel produzida, calculou-se a quantidade de enzima teoricamente imobilizada ( $\text{U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$

<sup>1</sup>gel ou mg proteína.g<sup>-1</sup>gel). Com estes dados, foi possível obter o rendimento de imobilização e atividade recuperada.

## **3.6 Hidrólise do bagaço de cana utilizando celulase livre e imobilizada**

### **3.6.1 Deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar:**

O tratamento foi conduzido medindo-se 100 g do bagaço de cana, o qual foi autoclavado (121°C; 30 minutos) em 2L de solução de hidróxido de sódio a 4% m/v. O material recuperado (celulignina) foi lavado e filtrado até pH 5,5 e seco em estufa a 50°C por 24h [22].

### **3.6.2 Determinação do teor de celulose no bagaço de cana-de-açúcar:**

O reagente antrona foi preparado pela dissolução de 0,4g de antrona em 200mL de ácido sulfúrico 72% v/v e permanecendo em repouso por 45 minutos devendo ser uma solução fresca e usada no mesmo dia do ensaio. Cuidados devem ser tomados no manuseio do ácido, bem como nas diluições por se tratar de reações altamente exotérmicas.

Uma amostra (10mg) de bagaço seco foi submetida à hidrólise com ácido sulfúrico 72% v/v (15mL) em banho de gelo com agitação intermitente por 1h. Tomou-se 0,1mL e diluiu-se para 1mL com água destilada e se adicionou em 5mL do reagente antrona. Agitou-se lentamente e levou-se à fervura por 10 minutos e se resfriou em banho de gelo. Posteriormente, leu-se a absorbância em 620nm de comprimento de onda [23]. A curva de calibração foi elaborada a partir de alíquotas de 0,1mL, utilizando-se como padrão celulose cristalina (Avicel). O padrão foi preparado dissolvendo-se 10mg em ácido sulfúrico 72% v/v (3mL) e completando-se o volume para 100mL com água destilada seguindo a mesma metodologia acima. As concentrações de celulose variaram de 0,02 a 0,1 g.L<sup>-1</sup>.

### **3.6.3 Ensaio de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase livre e imobilizada:**

Perfis de conversão foram obtidos em sacarificações usando enzima livre ou imobilizada de modo a compará-los ao longo de oito dias de reação a 50°C e pH 5,0.

A uma suspensão 8,8% m/v de celulignina com 88% de celulose em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0 foi adicionada enzima livre em duas concentrações distintas (4,3 e 8,6 U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de celulignina) ou enzima imobilizada (4,3 U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de celulignina). O derivado

apresentava atividade teoricamente imobilizada de  $7,7 \text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de gel e atividade aparente de  $4,3 \text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de gel. A conversão da reação foi determinada através do método de DNS para quantificação dos açúcares redutores ao longo do tempo.

Ensaio de sacarificação também foram realizados em reator batelada e termostatizados a  $47^{\circ}\text{C}$  durante 10h passando a  $37^{\circ}\text{C}$  até completar 36h de reação. As condições foram similares às utilizadas por Vásquez e colaboradores [22] durante ensaios de sacarificação e fermentação simultâneas para produção de etanol.

Bateladas seqüenciais foram realizadas utilizando-se celulase livre e imobilizada de modo a avaliar a reusabilidade do biocatalisador contendo enzima imobilizada.

A uma suspensão 10% m/v de celulignina com 88% de celulose em tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0 foi adicionada enzima livre ( $20 \text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de celulignina). Já para bateladas com enzima imobilizada, adicionaram-se 2g de derivado, isto é,  $15 \text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de celulignina mais 0,1mL de enzima livre ( $5 \text{ U}_{\text{FP}}\cdot\text{g}^{-1}$  de celulignina).

No sistema contendo celulase imobilizada, após cada batelada, a celulignina e o catalisador do meio eram lavados e filtrados e adicionados de volta ao reator com a adição de 0,1mL de enzima livre, tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,0 e celulignina fresca 10% m/v. Em intervalos de tempo, amostras eram coletadas, centrifugadas, diluídas e analisadas quanto à concentração de glicose e celobiose.

A concentração de glicose foi medida através de kit enzimático específico para glicemia. Celobiose foi analisada em HPLC usando uma coluna de troca iônica para açúcares Shodex KS 801 (300mm×8mm ; Shoko Co.,Ltd., Tóquio) a  $50^{\circ}\text{C}$  tendo como fase móvel água Milli-Q numa vazão de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

### 3.6.4 Cálculo da conversão da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase livre e imobilizada:

De posse dos valores da concentração de glicose e celobiose, pôde-se calcular a conversão das hidrólises de bagaço através das equações (3.11 a 3.13).

$$M_{\text{Glicose}} = \frac{M_{\text{Amostra}} - M_{\text{Sólido}}}{D_4^{20} \times 1000} \times C_{\text{Glicose}} \quad (3.11)$$

$M_{\text{Glicose}}$  = massa de glicose na amostra, (mg);

$M_{\text{Amostra}}$  = massa de amostra retirada do reator, (mg);

$M_{\text{Sólido}}$  = massa de sólido na amostra (massa seca a  $50^{\circ}\text{C}$ ), (mg);

$C_{Glicose}$  = concentração de glicose no sobrenadante, (g.L<sup>-1</sup>);

$D_4^{20}$  = densidade relativa da glicose em relação à água a 4°C, (Kg. L<sup>-1</sup>).

$$M_{GlicReator} = \frac{M_{Glicose} \times M_0}{M_{Sólido}} \quad (3.12)$$

$M_{GlicReator}$  = massa de glicose no reator, (mg);

$M_{Glicose}$  = massa de glicose na amostra, (mg);

$M_0$  = massa inicial de sólido, (mg);

$M_{Sólido}$  = massa de sólido na amostra (massa seca a 50°C), (mg);

$$X_{(Glicose)} = \frac{M_{GlicReator}}{M_0(celulose)} \quad (3.13)$$

$X_{(Glicose)}$  = conversão em glicose;

$M_{GlicReator}$  = massa de glicose no reator, (mg);

$M_0(celulose)$  = massa inicial de celulose (0,88 × 2 × 1,1), (mg).

A conversão em celobiose seguiu o mesmo raciocínio seguido acima, bem como a conversão em açúcar redutor que neste trabalho foi considerada como a soma de glicose e celobiose.

### 3.7 Referências bibliográficas

- [1] Wiseman, A. *Manual de biotecnología de los enzimas*. Zaragoza: Acribia. **1985**. 444 p
- [2] Fangkangwanwong, J.; Yoksan, R.; Chirachanchai, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. *Polymer*, v.47, p.6438-6445. **2006**.
- [3] Guisán, J. M. Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Enzyme and Microbial Technology*, v.10, p.375-382. **1987**.
- [4] Beppu, M. M.; Arruda, E. J.; Vieira, R. S.; Santos, N. N. Adsorption of Cu(II) on porous chitosan membranes functionalized with histidine. *Journal of Membrane Science*, v.240, p.227-235. **2004**.
- [5] Sundberg, L.; Porath, J. Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *Journal of Chromatography*, v.90, p.87-98. **1974**.
- [6] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254. **1976**.
- [7] Galvão, C. M. A. *Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2004**.
- [8] Tardioli, P. W.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. Design of new immobilized stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, v.19, p.565-574. **2003**.
- [9] Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, v.6, p.2-34. **1976**.
- [10] Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428. **1959**.
- [11] Wood, T. M.; Bhat, K. M. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, v.160, p.87-113. **1988**.
- [12] Martins, L. F. *Caracterização do complexo celulásico de Penicillium echinulatum*. (Mestrado). Química, UFPR, Curitiba, **2005**. 121 p.

- [13] Sadana, A.; Henley, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, v.30, p.717-723. **1987**.
- [14] Pedroche, J.; Yust, M. D. M.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J.; Guisan, J. M.; Millan, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.1160-1166. **2007**.
- [15] Box, G. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. *Statistics for experiments: An introduction to design, data analysis, and model building*. New York: John Wiley and Sons. **1986**.
- [16] Barros Neto, B. N.; Scarminio, I. P.; Bruns, R. E. *Planejamento experimental e otimização de experimentos*. São Paulo: Editora Unicamp, v.3. **1995**.
- [17] Torres-Bacete, J.; Arroyo, M.; Torres-Guzmán, R.; De La Mata, I.; Castellón, M. P.; Acebal, C. Optimization of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) production by using a new immobilized penicillin acylase. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v.32, p.173-177. **2000**.
- [18] Guibal, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Separation and Purification Technology*, v.38, p.43-74. **2004**.
- [19] Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Tam, A.; Daminati, A. Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, v.18, p.629-634. **2002**.
- [20] Pitcher, W. H. *Design and operation of immobilized enzyme reactors*. New York: Academic Press. **1975**. 151-199 p.
- [21] Martins, R. E. *Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana*. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2007**.
- [22] Vásquez, M. P.; Silva, J. N. C. D.; Júnior, M. B. D. S.; Júnior, N. P. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136, p.141-153. **2007**.
- [23] Yemm, E. W.; Willis, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. *Biochemistry*, v.57, p.508-514. **1954**.

# *Capítulo 4*

*Resultados: Preparação e  
Caracterização de Derivados  
de Quimotripsina*

## **4 Resultados: Preparação e caracterização de derivados de quimotripsina**

Pretende-se neste capítulo discutir a estabilização de quimotripsina, por imobilização covalente multipontual em quitosana e em híbridos contendo copolímeros com ou sem microrganismos utilizando diferentes protocolos de ativação (glutaraldeído, glicidol e epícloridrina). A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

### **4.1 Planejamento Fatorial 2<sup>5</sup>**

Ao começar a imobilização de quimotripsina, buscavam-se alternativas para se alcançar bons rendimentos de imobilização com boa retenção de atividade e estabilização. Assim, optou-se por utilizar um estudo através de planejamento fatorial e usando híbridos de quitosana apenas com gelatina e somente glutaraldeído como ativador e a partir destes resultados obtidos através deste planejamento preliminar, prosseguiu-se com o emprego de outros polímeros com diferentes ativações.

As cinco variáveis pesquisadas em dois níveis em torno do ponto central foram: concentração de quitosana (A), gelatina (B), NaOH (C), temperatura da solução de NaOH (D) e concentração de glutaraldeído (E). As variáveis respostas utilizadas para avaliar a influência das variáveis pesquisadas na imobilização de quimotripsina foram: rendimento de imobilização, atividade recuperada e fator de estabilidade a 55°C. A matriz experimental e os resultados dos trinta e seis experimentos realizados permitiram estimar os efeitos principais e as interações entre eles (Tabela 4.1).



**Tabela 4.1** Matriz experimental e resultados obtidos através do planejamento fatorial  $2^5$ , sendo  $R_I$  (rendimento de imobilização),  $A_R$  (atividade recuperada) e FE ( fator de estabilidade a 55°C).

Ensaio	Variáveis de estudo					Respostas		
	Quitossana	Gelatina	NaOH	T (°C)	Glutaraldeído	$R_I$ (%)	$A_R$ (%)	FE
1	1	1	1	1	1	81	36	24
2	1	1	1	1	-1	67	37	199
3	1	1	1	-1	1	98	33	58
4	1	1	1	-1	-1	85	16	118
5	1	1	-1	1	1	99	26	63
6	1	1	-1	1	-1	97	8	14
7	1	1	-1	-1	1	87	22	163
8	1	1	-1	-1	-1	92	18	80
9	1	-1	1	1	1	78	31	83
10	1	-1	1	1	-1	83	26	189
11	1	-1	1	-1	1	67	8	273
12	1	-1	1	-1	-1	88	36	72
13	1	-1	-1	1	1	77	31	15
14	1	-1	-1	1	-1	73	28	22
15	1	-1	-1	-1	1	95	3	130
16	1	-1	-1	-1	-1	92	11	16
17	-1	1	1	1	1	62	19	18
18	-1	1	1	1	-1	75	3	91
19	-1	1	1	-1	1	99	9	70
20	-1	1	1	-1	-1	95	52	50
21	-1	1	-1	1	1	82	6	26
22	-1	1	-1	1	-1	91	14	18
23	-1	1	-1	-1	1	91	8	123
24	-1	1	-1	-1	-1	97	5	80
25	-1	-1	1	1	1	68	37	149
26	-1	-1	1	1	-1	69	11	58
27	-1	-1	1	-1	1	93	31	134
28	-1	-1	1	-1	-1	94	9	14
29	-1	-1	-1	1	1	99	2	98
30	-1	-1	-1	1	-1	98	3	15
31	-1	-1	-1	-1	1	91	31	118
32	-1	-1	-1	-1	-1	95	25	110
33	0	0	0	0	0	94	35	221
34	0	0	0	0	0	92	34	224
35	0	0	0	0	0	97	30	202
36	0	0	0	0	0	88	34	208

Como pode ser observado, o rendimento, atividade recuperada e estabilidade variaram de 62 a 99%, de 2 a 52% e de 15 a 273, respectivamente. Observa-se que a interação quitosana-gelatina foi importante nas três respostas analisadas. Com o aumento da concentração de quitosana, aumenta-se o número de grupos aldeído formado durante ativação, pois a área superficial disponível para a ativação é proporcional à concentração de polímero. Isso implica em mais ligações multipontuais que podem ser formadas, aumentando a estabilidade do derivado. De um modo semelhante, a gelatina contribui com mais grupos aminos e sua presença permite a formação de poros maiores quando comparados ao gel de quitosana sem a proteína. Uma malha interna é formada no híbrido quitosana-gelatina, causado pela ação do glutaraldeído entre as moléculas de quitosana e gelatina [1]. Este comportamento pode ser notado pela interação dos dois fatores (Figura 4.1-C), pois existiu um aumento na estabilidade dos derivados obtidos quando a concentração dos dois polímeros empregados foi aumentada, quando comparado com o aumento de apenas quitosana ou gelatina.

As análises estatísticas para cada resposta analisada são apresentadas na Tabela 4.2. De acordo com os resultados do teste “*t*” de Student’s, o fator mais importante para as três respostas como já explicado, foi a interação entre quitosana-gelatina.

**Tabela 4.2** Efeitos estimados, teste *t* de Student’s para o planejamento fatorial 2<sup>5</sup>, sendo (A) concentração de quitosana, (B) concentração de gelatina, (C) concentração de NaOH, (D) temperatura de coagulação e (E) concentração de glutaraldeído.

Fatores	Rendimento		Fatores	Atividade Recuperada		Fatores	Fator de Estabilidade	
	Efeitos	<i>t</i>		Efeitos	<i>t</i>		Efeitos	<i>t</i>
Média	86,98	60,16	Média	20,63	7,75	Média	95,72	6,79
C: NaOH	-9,68 <sup>a</sup>	-3,16 <sup>a</sup>	A: Quitosana	8,22 <sup>b</sup>	1,45 <sup>b</sup>	C: NaOH	38,17 <sup>b</sup>	1,28 <sup>b</sup>
D: T (°C)	-9,96 <sup>a</sup>	-3,25 <sup>a</sup>	C: NaOH	11,01 <sup>b</sup>	1,95 <sup>b</sup>	AB	2,42 <sup>c</sup>	0,08 <sup>c</sup>
AB	4,20 <sup>b</sup>	1,37 <sup>b</sup>	AB	1,91 <sup>c</sup>	0,34 <sup>c</sup>	BE	-44,22 <sup>b</sup>	-1,48 <sup>b</sup>
AD	3,82 <sup>b</sup>	1,24 <sup>b</sup>	AD	7,75 <sup>b</sup>	1,37 <sup>b</sup>	DE	-47,43 <sup>b</sup>	-1,59 <sup>b</sup>
CE	-6,93 <sup>a</sup>	-2,26 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>  $p < 0,05$ ;

<sup>b</sup>  $(0,15 < p < 0,25)$ ;

<sup>c</sup>  $p > 0,25$ .

O efeito da concentração de base está relacionado provavelmente ao processo de coagulação. Quanto maior a concentração de NaOH, mais rápida será a coagulação,

resultando em poros menores e bem definidos com uma estrutura externa do gel mais fibrosa [2]. Assim, espera-se que quanto menor a concentração de NaOH, maior será a porosidade do gel, o que resulta em menores efeitos de difusão e, por conseguinte, uma atividade recuperada mais próxima ao verdadeiro valor e um melhor rendimento de imobilização. Entretanto, o NaOH apresentou efeito positivo na atividade recuperada e estabilidade. A concentração de glutaraldeído, na faixa estudada, apresentou efeito negativo nas variáveis de resposta testadas quando em interação com NaOH (rendimento), gelatina e temperatura (fator de estabilidade) estando possivelmente em excesso mesmo para a menor concentração testada. Logo, concentração de glutaraldeído de 2,5% já é bastante para preparar o suporte para imobilização da enzima.

Para um estudo inicial das variáveis de processo, baixos valores de  $p$  ( $p < 0,05$ ) não é o objetivo principal quando na verdade, interessa a importância da variável e não encontrar uma equação ou superfície resposta que descreva o processo. Assim, selecionando os efeitos com valores maiores de  $p$  haverá uma maior facilidade de detectar um efeito importante e não resultando em um resultado falso negativo.

O teste estatístico foi feito usando o método do ponto central. A Tabela 4.3 mostra as médias e desvios padrões calculados no ponto central.

**Tabela 4.3** Análise de significância do planejamento fatorial  $2^5$  através do ponto central.

$Y_m$ , média do ponto central; $S_x$ , desvio padrão.			
Número de experimentos	36		
<b>Análise do ponto central; nível de confiança (95%).</b>			
$Y_m$	80,31	33,08	257
$S_x$	0,9	1,8	12,6

A Tabela 4.3 mostra que o importante é além do *screening* de variáveis de estudo para a imobilização de quimotripsina em híbridos de quitosana-gelatina, a reprodutibilidade do processo na quadruplicata do ponto central. Mesmo não se obtendo modelos estatísticos em nível de 95% de confiança, observaram-se quais os fatores que deveriam ser modificados e quais poderiam ser aprofundados nos ensaios seguintes.

O estudo permitiu encontrar a influência de todas as variáveis de estudo na imobilização de quimotripsina em quitosana-gelatina ativado com glutaraldeído e mostrou que a presença do copolímero permitiu um melhor controle do processo de imobilização. Podendo assim ser realizados estudos futuros para se obter superfícies de resposta e

eliminando fatores que se mostraram desprezíveis neste estudo como temperatura do banho de coagulação e concentração de glutaraldeído.

Observando-se que as condições utilizadas na preparação e ativação dos suportes quitosana-gelatina não foram otimizadas e sim, feito apenas um screening, resolveu-se adotar as condições utilizadas anteriormente ao planejamento, como NaOH 0,1M à temperatura ambiente, glutaraldeído 5% v/v como ativação e concentrações máximas de quitosana e gelatina de 4 e 3% m/v, respectivamente. Concentrações maiores de quitosana e gelatina não foram empregadas devido à alta viscosidade do gel e conseqüente manuseio, mantendo-se uma menor concentração de quitosana pura 2,5% para validar resultados anteriores ao planejamento.

Assim, notando-se que os polímeros influenciariam positivamente no processo, resolveu-se utilizar outros compostos e diferentes protocolos de ativação os quais serão discutidos nas sessões a seguir, mas mantendo NaOH 0,1M e glutaraldeído 5% v/v, pois não se sabia o comportamento do processo com outros polímeros e se tornaria inviável um planejamento para cada suporte.

## **4.2 Preparação e caracterização de híbridos de quitosana**

### **4.2.1 Ativados com glutaraldeído:**

Géis de quitosana puro e híbrido foram preparados na presença e ausência de células de microorganismos. Os suportes foram ativados com glutaraldeído e usados para imobilização de quimotripsina a pH 7,0 e 4°C. A Tabela 4.4 apresenta os parâmetros de imobilização para estes derivados. Observa-se que a variável mais significativa foi a concentração de polímero. O aumento da concentração de quitosana de 2,5% a 5,0% levou a um aumento no rendimento de imobilização de 24% para 78% e o fator de estabilidade passou de 29 para 132.

**Tabela 4.4** Parâmetros de imobilização de quimotripsina em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 a 4°C em suportes ativadas com glutaraldeído 5% (v/v) com carga oferecida de 5 mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (600U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel) por 2h, sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.

Biocatalisador	R <sub>I</sub> (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> U <sub>BTEE</sub> .g <sup>-1</sup> gel	t <sub>1/2</sub> (horas)	FE
enzima livre	-	-	-	0,02	1
quitosana 2,5%	24	51	73	0,57	29
quitosana 5,0%	78	17	80	2,63	132
quitosana 4,0%-gelatina 3,0%	65	29	113	3,34	167
quitosana 2,5%-alginato 2,5%	62	59	219	4,32	216
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%	82	58	285	2,84	142

Estes resultados podem ser explicados pelo aumento de grupos aldeído capaz de gerar bases de Schiff com os grupos amino da enzima. Quanto maior a concentração de polímeros, maior número de grupos amino e outros grupos químicos capazes de reagir com glutaraldeído. Entretanto, a alta reatividade deste aldeído também levou a uma excessiva reticulação na matriz e a formação de pequenos poros. Em consequência, a atividade aparente da enzima imobilizada não aumentou.

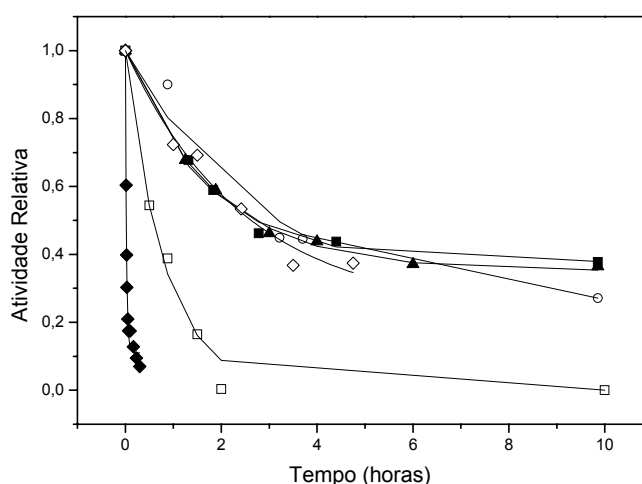
Tabela 4.4 também mostra que a formação de híbridos pela mistura de quitosana com κ-carragenana, alginato ou gelatina, para uma mesma concentração total de polímeros (5,0 %) deve ter melhorado a estrutura interna do suporte, pois derivados obtidos a partir de suportes híbridos apresentaram maior atividade recuperada e estabilidade térmica quando comparados à quitosana pura.

A interação entre os polímeros permitiu que houvesse mais ligações e mais poros que serviram como uma malha que favoreceu a estabilização da enzima, bem como, tornou o suporte mais resistente às altas temperaturas. A quitosana interage formando pontes de hidrogênio com alginato e κ-carragenana. Portanto, a porosidade torna-se diferente modificando a conformação espacial da quitosana tornando o composto mais resistente às condições drásticas de temperatura e pH [1]. Quitosana também forma polieletrólitos estáveis com alginato sendo apenas dissociados sob condições severas de temperatura e pH [3].

Assim, o derivado mais ativo foi obtido usando  $\kappa$ -carragenana, com  $285 U_{BTEE.g^{-1}gel}$  e FE igual a 142, enquanto o mais estável foi usando alginato, 216 vezes mais estável que a enzima livre e atividade aparente de  $219 U_{BTEE.g^{-1}gel}$ .

A estabilidade térmica dos derivados produzidos foi analisada a  $55^{\circ}C$  e pH 8,0. O modelo de Sadana-Henley de desativação foi ajustado aos pontos experimentais (atividades relativas de quimotripsina para diferentes tempos de incubação a  $55^{\circ}C$ ). A Figura 4.1 mostra os resultados do modelo ajustado aos pontos experimentais. Percebe-se que o modelo ajustou-se bem para todos os derivados preparados e para enzima livre. Os tempos de meia-vida para os biocatalisadores preparados são mostrados na Tabela 4.4.

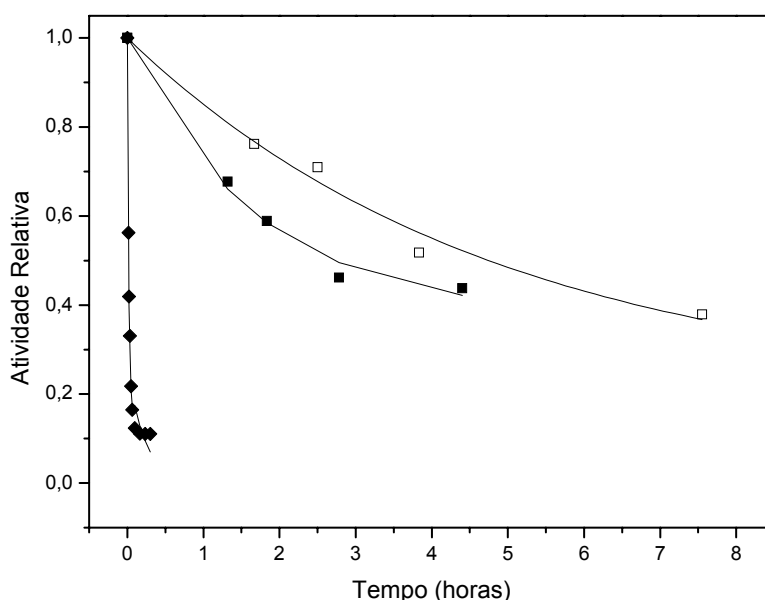
Os tempos de meia-vida para derivados feitos a partir de quitosana apresentados na Tabela 4.4 foram muito mais baixos quando comparados a derivados de quimotripsina em agarose durante 3h de imobilização a  $25^{\circ}C$  [4]. Estes valores estão relacionados com as condições de imobilização usadas nestes ensaios a pH 7,0,  $4^{\circ}C$  e 2h de tempo de contato enzima-suporte. Neste pH, a concentração de grupos amino das lisinas protonados é alta. Assim, a possibilidade de formação de ligações covalentes multipontuais via bases de Schiff não é muito alta. Além disso, o alinhamento correto da proteína para formar multipontuais requer tempo de imobilização mais longo que 2h e a uma temperatura maior que  $4^{\circ}C$  promoveriam interações mais intensas.



**Figura 4.1** Inativação térmica de derivados ativados com glutaraldeído e com imobilização a pH 7,0 e  $4^{\circ}C$  por 2h, com carga oferecida de  $5mg$  enzima liofilizada. $g^{-1}gel$  ( $55^{\circ}C$  e pH 8,0) de (◆) quimotripsina solúvel, (□) quitosana 2,5%; (◇) quitosana 5,0%; (○) quitosana 4,0%-gelatina 3,0%; (■) quitosana 2,5%-alginato 2,5%; (▲) quitosana 2,5%-carragenana 2,5%. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

Buscando melhorar a multi-interação entre a quimotripsina e os suportes, foram realizadas imobilizações a pH 10,05 por 24h a 25°C, ainda que a estabilidade do suporte não fosse boa devido às propriedades químicas do glutaraldeído [5].

O suporte escolhido para verificar a influência do pH foi quitosana 2,5%-alginate 2,5%. De acordo com a Figura 4.2, percebe-se que a pH 10,05 o fator de estabilidade foi 240, enquanto que para pH 7,0 foi de 216. Em pH 10,05, um maior número de grupos amino de lisinas deveriam estar desprotonados e prontos para reagir com os aldeídos do suporte, todavia parece não ter havido uma maior formação proporcional de novas bases de Schiff. O rendimento de imobilização foi de 65% a pH 7,0 e 100% em menos de 2h de contato a pH 10,05 indicando que mais moléculas de enzima deveriam estar ligadas ao suporte através das lisinas. Por outro lado, atividade recuperada mais baixa de 12,2% a pH básico já era esperada devido à alta reatividade do glutaraldeído com maior grau de reticulação e polimerização do suporte aumentando os problemas nos efeitos de transferência de massa. Apesar de a imobilização ter sido de 24h, a atividade recuperada e estabilidade térmica foram estimadas com 2h de reação.



**Figura 4.2** Inativação térmica de derivados ativados com glutaraldeído com carga oferecida de 5mg enzima liofilizada.g<sup>-1</sup> gel (55°C e pH 8,0), (◆) quimotripsina solúvel; (■) quitosana 2,5%-alginate 2,5% imobilização a pH 7,0; (□) quitosana 2,5%-alginate 2,5% imobilização a pH 10,05 ambos a 25°C. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

### 4.2.2 Ativados com glicidol:

Tabela 4.5 apresenta os parâmetros de imobilização para quimotripsina livre e imobilizada em quitosana pura e seus híbridos ativados com glicidol e oxidados com periodato de sódio. Ativação via glicidol levou a um aumento de quase 100% na estabilização da enzima quando comparada à ativação com glutaraldeído. A imobilização enzimática através da reação entre glioxil (aldeídos) do suporte com grupos amino da enzima necessita de pelo menos duas ligações simultâneas as quais agem de modo sinérgico.

Este comportamento pode explicar-se pelo aumento observado no fator de estabilidade de derivados glioxil-quitosana. Provavelmente, imobilização via glutaraldeído foi unipontual e com glioxil através de pelo menos duas ligações. Pode-se observar que o melhor derivado obtido foi quitosana-carragenana ao apresentar 34% de rendimento de imobilização com 76% de atividade recuperada e um fator de estabilidade de 243 vezes. Isso implica em menor volume de catalisador gasto em reator, pois apresenta uma maior carga de enzima imobilizada mesmo com a estabilidade sendo aproximadamente a metade do derivado quitosana-alginato que foi 425 vezes mais estável que a enzima solúvel, mas apresentou baixa capacidade de imobilização expressa em seu rendimento de 17%.

**Tabela 4.5** Parâmetros de imobilização de quimotripsina em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C em suportes ativados com glicidol com carga oferecida de 10mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (1200 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel) por 24h, sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.

Biocatalisador	R <sub>I</sub> (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> U <sub>BTEE</sub> .g <sup>-1</sup> gel	t <sub>1/2</sub> (horas)	FE
enzima livre	-	-	-	0,02	1
quitosana 5,0%	50	13	78	1,89	95
quitosana 2,5%-alginato 2,5%	17	43	88	8,50	425
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%	34	76	310	4,90	243

### 4.2.3 Ativados com epicloridrina:

Resultados da Tabela 4.6 mostram que a ativação de quitosana pura e seus híbridos com epicloridrina, posteriormente, oxidado com periodato de sódio levaram a uma significativa melhora na estabilidade térmica dos derivados quando comparados aos outros agentes



ativantes. Com glicidol, quitosana 2,5% - alginato 2,5% teve um fator de estabilidade maior que a quitosana 5% (Tabela 4.5). Quitosana pura foi mais estável que o híbrido quitosana-alginato. Entretanto, o derivado mais estável usando epicloridrina foi quitosana 2,5%-carragenana 2,5%.

A presença de diferentes grupos reativos em cada polímero e a diferença de reatividade dos ativadores permite diferentes interações enzima-suporte. O mesmo híbrido não foi melhor nas três ativações empregadas devido às características químicas de cada um de acordo com cada ativação. Além de grupos hidroxila, os polímeros apresentam outras funções reativas: grupos amino da quitosana, grupos ácidos no alginato e grupos sulfatos na carragenana. O glutaraldeído reagirá preferencialmente com grupos amino da quitosana e grupo reativos do alginato (hidroxilas), essa reação é rápida e de difícil controle, explicando a alta velocidade de imobilização com baixa recuperação e estabilização.

A reação de aminos da quitosana com epicloridrina além de gerar glioxil também formará epóxidos, os quais estão disponíveis para se ligarem à enzima. Glicidol apresenta em sua estrutura um anel oxirano e uma hidroxila, diferenciando-se da epicloridrina apenas pelo átomo de cloro que esta apresenta em sua cadeia e por isso sendo mais reativo.

Como epicloridrina é mais reativa que glicidol, mais grupos aldeídos serão formados no suporte além de grupos oxirano, o que permitiria a formação de mais ligações enzima-suporte, explicando assim o aumento no fator de estabilidade. Os melhores resultados obtidos foram quitosana 2,5%-carragenana 2,5% com uma estabilização de 517 vezes a 55°C. As diferentes reatividades de grupos funcionais envolvidos e a conformação helicoidal da carragenana devem ter promovido a formação de uma maior malha de poros internos [6].

**Tabela 4.6** Parâmetros de imobilização de quimotripsina em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C em suportes ativados com epicloridrina com carga oferecida de 10 mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (1200 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup> gel) por 24h, sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.

Biocatalisador	R <sub>I</sub> (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> U <sub>BTEE</sub> .g <sup>-1</sup> gel	t <sub>1/2</sub> (horas)	FE
enzima livre	-	-	-	0,02	1
quitosana 5,0%	77	19	176	9,00	455
quitosana 2,5%-alginato 2,5%	65	24	187	6,70	335
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%	71	22	187	10,34	517

#### 4.2.4 Influência da adição de microorganismos durante a preparação do suporte:

A influência da presença de células durante a preparação de suportes e conseqüente formação de poros foi estudada para quitosana pura e seus híbridos produzindo os melhores derivados de quimotripsina após ativação com glutaraldeído, glicidol ou epícloridrina. A adição de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ou *Bacillus megaterium* (Bm) foi estudada em duas concentrações distintas. A Tabela 4.7 apresenta os resultados obtidos.

Esperava-se que a presença de células promoveria uma significativa melhora nas condições intra-partícula do suporte com conseqüente aumento de porosidade e permitindo que uma maior quantidade de moléculas de quimotripsina se ligaria ao suporte ativado. No entanto, os parâmetros de imobilização não foram afetados consideravelmente quando ativados via glutaraldeído. A alta reatividade deste composto pode ser responsável por esses resultados. Reações laterais devem formar produtos de cadeias laterais hidrofóbicas que dificultariam um correto alinhamento enzima-suporte diminuindo a estabilização da enzima [7]. Tabela 4.7 também mostra que usando glicidol, os parâmetros de imobilização foram afetados ao utilizar células. Os melhores resultados obtidos foram para o suporte quitosana-carragenana-Sc 5,0% com 72% de rendimento, 31% de recuperação de atividade e 442 vezes mais estável a 55°C. O uso de *Saccharomyces cerevisiae* conduziu à melhores resultados que *Bacillus megaterium*. Os microorganismos estudados têm tamanhos similares, *S. cerevisiae* com aproximadamente  $40\mu\text{m}^3$  de volume [8] *B. megaterium* com cerca de  $60\mu\text{m}^3$  de volume [9].

**Tabela 4.7** Influência da adição de células na preparação de suportes durante imobilização de quimotripsina ativadas com glutaraldeído (GLU), glicidol (GLI) e epícloridrina (EPI) nas mesmas condições de imobilização usadas nas Tabelas (4.4; 4.5 e 4.6), respectivamente. Sendo ( $R_I$ ) rendimento de imobilização, ( $A_R$ ) atividade recuperada, ( $A_{ap}$ ) atividade aparente, ( $t_{1/2}$ ) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 55°C.

Biocatalisador	Ativação	$R_I$ (%)	$A_R$ (%)	$A_{ap}$ (U. g <sup>-1</sup> gel)	$t_{1/2}$ (h)	FE
enzima livre	-	-	-	-	0,02	1
quitosana 5,0%	GLU	78	17	80	2,63	132
quitosana 2,5%-alginato2,5%	GLU	62	59	219	4,32	216
quitosana 5,0% -Sc 5,0%	GLU	88	17	90	2,25	114
quitosana 2,5%-alginato2,5%-Sc 5,0%	GLU	54	37	120	3,38	169
quitosana 2,5%-alginato2,5%-Bm 5,0%	GLU	69	38	157	5,22	261
quitosana 4,0%-gelatina 3,0% - Bm 1,75%	GLU	69	41	170	4,02	201
quitosana 5,0%	GLI	50	13	78	1,89	95
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%	GLI	34	76	310	4,90	243
quitosana 5,0%-Sc 5,0%	GLI	54	10	65	3,50	177
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc1,25%	GLI	38	47	214	8,38	419
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5%	GLI	72	31	268	8,84	442
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Bm 5%	GLI	20	46	110	6,90	345
quitosana 5,0%	EPI	77	19	176	9,00	455
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%	EPI	71	22	187	10,34	517
quitosana 5,0%-Sc 5,0%	EPI	76	17	155	12,00	610
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 1,25%	EPI	82	49	482	21,04	1052
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5,0%	EPI	91± 2	57±10	622 ± 62	26,8 ±1,4	1379 ± 44
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Bm5,0%	EPI	69	33	273	8,30	415

Entretanto, diferenças entre a composição das paredes celulares destas duas espécies podem explicar estes resultados. *B. megaterium* é uma bactéria gram-positiva e sua parede celular é composta por uma camada delgada de ácido teicóico e um complexo de peptídeoglicanas sem lipídios [10] com espessura entre 24 e 37nm [11]. Já a parede da espécie *S. cerevisiae*, contem  $\beta(1\rightarrow3)$ -D-glicana,  $\beta(1\rightarrow6)$ -D-glicana, quitina, e manoproteína(s). Kolla'r e colaboradores [12] estudaram a parede celular de *S. cerevisiae* e reportaram que os

polissacarídeos parecem ter uma função estrutural, considerando que manoproteína(s) podem agir como protetoras e são importantes para a permeabilidade da parede celular.

Neste trabalho, a lise da parede celular do fungo foi mais eficiente devido a sua estrutura de parede ser mais rica em macromoléculas levando às melhores configurações internas de poros. Mesmo após a lise celular e lavagem do gel, parte de biomoléculas existentes nas células poderiam estar retidas no gel contribuindo com grupos funcionais reativos capazes de reagir com glicidol ou epícloridrina.

Os melhores resultados de estabilização com a adição de células foram obtidos com ativação via epícloridrina apresentando rendimento de imobilização de 91%, atividade recuperada de 57% e 1335 vezes mais estável a 55°C.

#### **4.2.5 Influência do grau de ativação ao usar epóxidos como ativador:**

Fragmentos de células devem ter aumentado a concentração de polímeros susceptíveis a serem ativados com epóxidos. Como bons resultados foram obtidos com derivados ativados com epóxidos, um estudo das condições de ativação com glicidol e epícloridrina foi realizado.

Usando o suporte quitosana 2,5%-carragenana 2,5-Sc 5,0%, foram testadas diferentes concentrações de glicidol e  $\text{NaIO}_4$  com uma carga enzimática oferecida de 50mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel. A concentração de glicidol variou de 0,48 a 0,96mL.g<sup>-1</sup>gel e periodato de 2 a 4mL.g<sup>-1</sup>gel (Tabela 4.8). Rendimentos de imobilização variaram de 44 a 46% e atividade recuperada de 19 a 22%, mostrando que as condições empregadas já eram adequadas (0,48mL de glicidol e 2mL de periodato). Para epícloridrina, concentrações acima de 2mL.g<sup>-1</sup>gel não melhoraram significativamente os parâmetros de imobilização e as concentrações de periodato acima de 2mL.g<sup>-1</sup>gel levou a géis mecanicamente mais frágeis não interessando no desenvolvimento de biocatalisadores.

**Tabela 4.8** Parâmetros de imobilização de quimotripsina em pH 10,05 a 25°C em suportes ativado com glicidol e oxidado com NaIO<sub>4</sub> 0,1M, carga enzimática oferecida de 50 mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (6000 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel).

Condição de ativação	R <sub>i</sub> (%)	A <sub>R</sub> (%)
0,48mL de glicidol.g <sup>-1</sup> de gel e oxidado com NaIO <sub>4</sub> 100mM (2mL.g <sup>-1</sup> de gel)	44	19
0,72mL de glicidol.g <sup>-1</sup> de gel e oxidado com NaIO <sub>4</sub> 100mM (3mL.g <sup>-1</sup> de gel)	46	19
0,96mL de glicidol.g <sup>-1</sup> de gel e oxidado com NaIO <sub>4</sub> 100mM (4mL.g <sup>-1</sup> de gel)	46	22

#### 4.2.6 Ensaios de carga máxima de imobilização:

A capacidade máxima de imobilização é uma propriedade importante de um suporte. Ensaios visando à saturação de suportes com diferentes protocolos de ativação foram realizados. Na Tabela 4.9, observa-se que o derivado com maior quantidade de proteína imobilizada foi quitosana 2,5%-alginato 2,5-Bm 5,0% ativado com glutaraldeído com 52mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel. O derivado que apresentou maior estabilidade, quitosana 2,5%-carragenana 2,5-Sc 5,0% (epicloridrina) atingiu a saturação com 40mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel, Já o derivado obtido via glicidol, alcançou 20mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel.

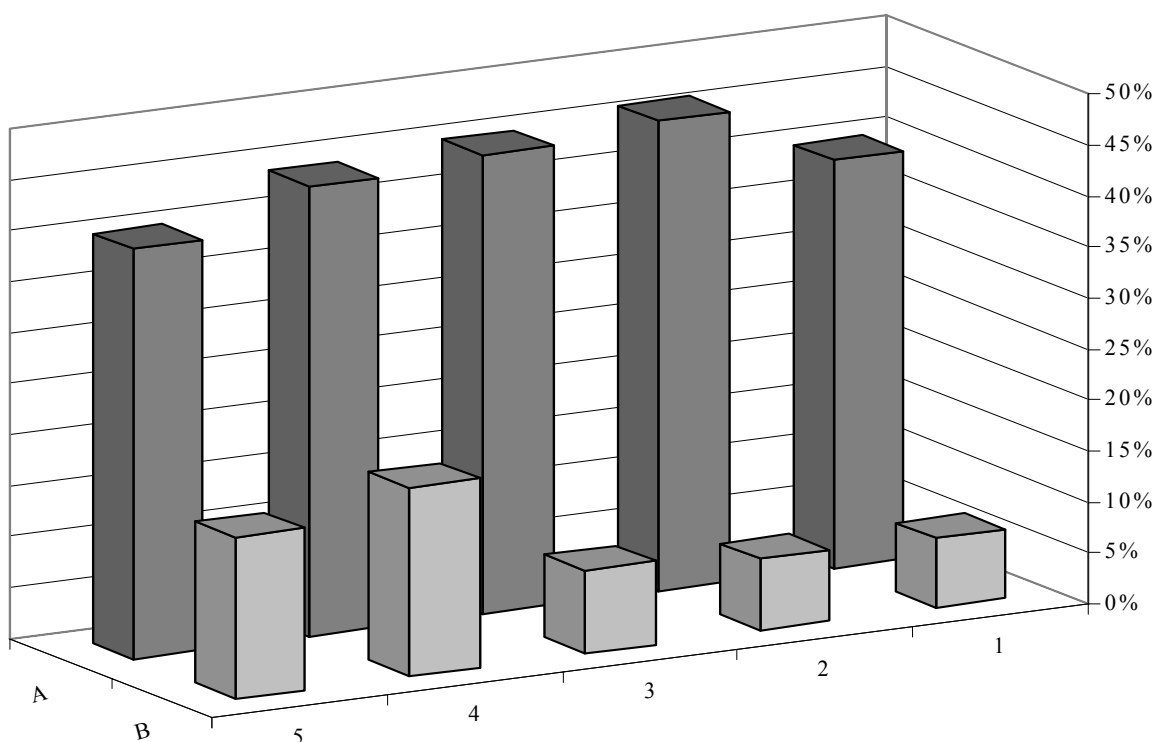
**Tabela 4.9** Quantidade máxima de quimotripsina teoricamente imobilizada (C<sub>MAX</sub>: mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel) para diferentes processos de ativação. A<sub>R</sub>: atividade recuperada, A<sub>teórica</sub>: atividade teórica, A<sub>ap</sub>: atividade aparente. (1mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel corresponde a 120 U<sub>BTEE</sub>.g<sup>-1</sup>gel).

Suporte	Ativante	*C <sub>MAX</sub>	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>teor</sub> (U <sub>BTEE</sub> .g <sup>-1</sup> gel)	A <sub>ap</sub> (U <sub>BTEE</sub> .g <sup>-1</sup> gel)
quitosana 2,5%- alginato 2,5%	GLUT	42	nd	nd	nd
quitosana 2,5%- alginato 2,5%-Bm 5%	GLUT	52	14,2	6240	886
quitosana 2,5%- carragenana 2,5%	GLI	22	6,0	2640	158
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5,0%	GLI	21	18,0	2520	454
quitosana 2,5%- carragenana 2,5%	EPI	30	17,0	3600	612
quitosana 2,5%- carragenana 2,5%-Sc 5,0%	EPI	40	35,0	4800	1680

#### 4.2.7 Influência do tratamento de lise celular:

A adição de células durante a preparação do suporte seguida da lise, teve como objetivo principal a obtenção de uma estrutura de gel mais aberta. O suporte foi submetido a uma seqüência de diferentes tratamentos químico e enzimático para eliminar a maior quantidade possível do conteúdo celular existente no processo. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4.3 e 4.4 para os suportes ativados com glicidol e epicloridrina, respectivamente.

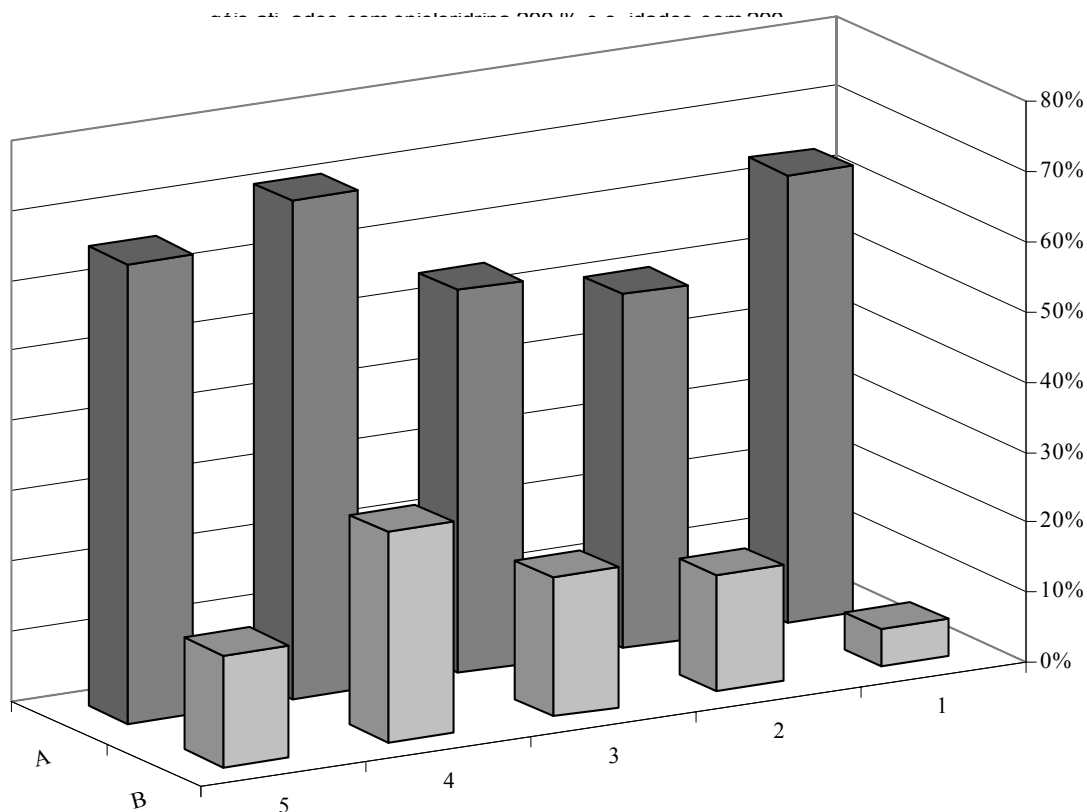
Ofereceu-se uma carga de 50mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel ao suporte quitosana 2,5%-carragenana 2,5-Sc 5,0%. Figura 4.3 mostra a influência de diferentes protocolos durante o tratamento do suporte ativado com glicidol nos parâmetros de imobilização de quimotripsina. Nota-se que o rendimento de imobilização variou somente 7% para todas as condições testadas, um efeito não muito expressivo. No entanto, a atividade recuperada melhorou após a utilização de SDS e Alcalase<sup>®</sup> indicando que a presença de células durante a formação do gel seguida de lise celular pode melhorar as características do gel.



**Figura 4.3** Influência do tratamento de lise celular no rendimento de imobilização (A) e na atividade recuperada (B), para gel ativado com glicidol, nos seguintes casos: 1: sem levedura; 2: gel com levedura e sem tratamento; 3: tratamento com SDS antes de ativar o gel; 4: tratamento com SDS e alcalase antes de ativar o gel; 5: tratamento de lise celular após ativação.

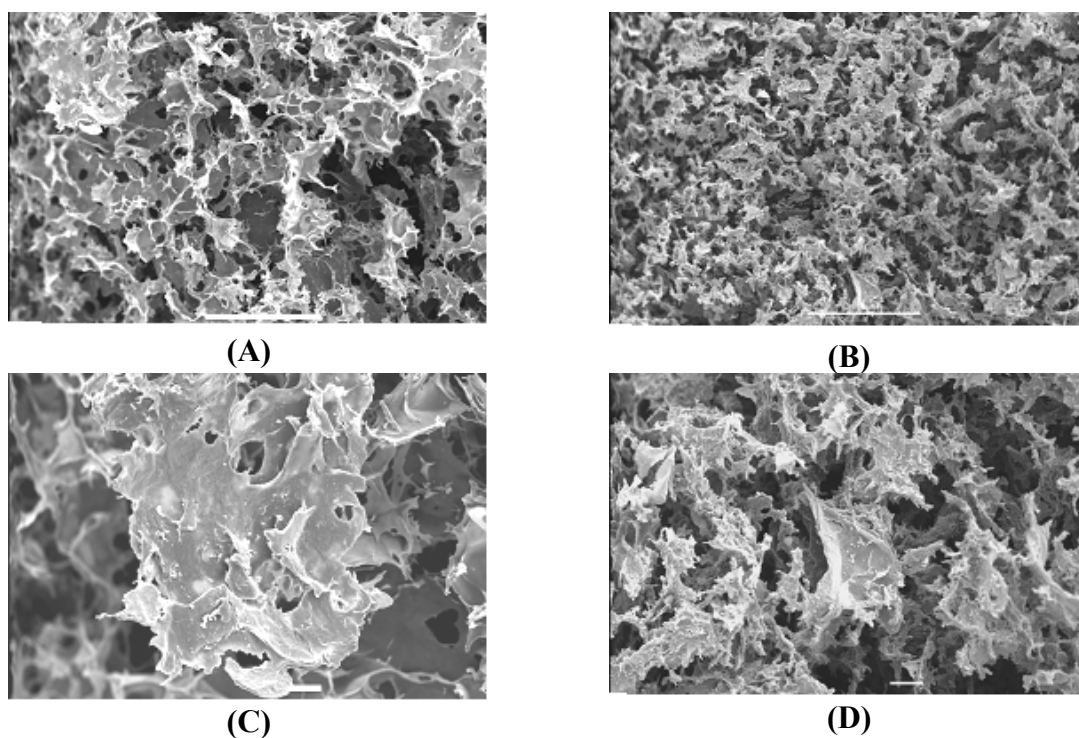
Resultados da Figura 4.4 mostram que a adição de células e lise em suportes ativados com epícloridrina melhorou rendimento e atividade recuperada. Deve ser uma consequência do maior número de grupos reativos no suporte quando comparados ao glicidol. Contudo, observa-se que o tratamento é importante para aumentar a atividade recuperada da enzima imobilizada.

Outra metodologia foi estudada buscando simplificar o procedimento de lise celular. O gel contendo células foi submetido a um tratamento mais barato, rápido e fácil usando sabão em pó comercial a pH 9,0 e 40°C por 24h, seguido de lavagem abundante com água destilada e Milli-Q antes do processo de ativação. Os parâmetros de imobilização resultantes foram muito similares ao obtido usando SDS e enzima como apresentado nas Figuras 4.3 e 4.4, sendo este novo procedimento que está descrito no item 3.2.3, usado durante o restante do trabalho para imobilização de quimotripsina.



**Figura 4.4** Influência do tratamento de lise celular no rendimento de imobilização (A) e na atividade recuperada (B), para gel ativado com epícloridrina, nos seguintes casos: 1: sem levedura; 2: gel com levedura e sem tratamento; 3: tratamento com SDS antes de ativar o gel; 4: tratamento com SDS e alcalase antes de ativar o gel; 5: tratamento de lise celular após ativação.

Para observar a modificação da estrutura do gel após o tratamento de lise celular com remoção de seus fragmentos, quitosana 2,5%-carragenana 2,5% preparados na presença e ausência de microorganismos (seguido da remoção de fragmentos celulares) foram observados junto a um microscópio eletrônico de varredura (MEV). A Figura 4.5 mostra as micrografias sem (A e C) e com adição de células seguido da remoção (B e D). A partir destas fotos, percebe-se que os poros dos suportes são irregulares em forma e tamanho, tornando-se difícil estimar um tamanho médio dos poros com significância estatística. No entanto, observa-se que a presença de células levou a uma clara mudança na estrutura do gel. Os géis preparados na ausência de células (A e C) apresentaram uma menor disponibilidade de área superficial interna que os géis preparados com células (B e D), resultados este que estão de acordo com os melhores resultados de imobilização obtidos.



**Figura 4.5** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície de uma fratura de quitosana 2,5%-carragenana 2,5% (A e C) e quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% (B e D) com resolução de 36.000× (A e B) e 100.000× (C e D).

#### 4.2.8 Influência do tempo de imobilização:

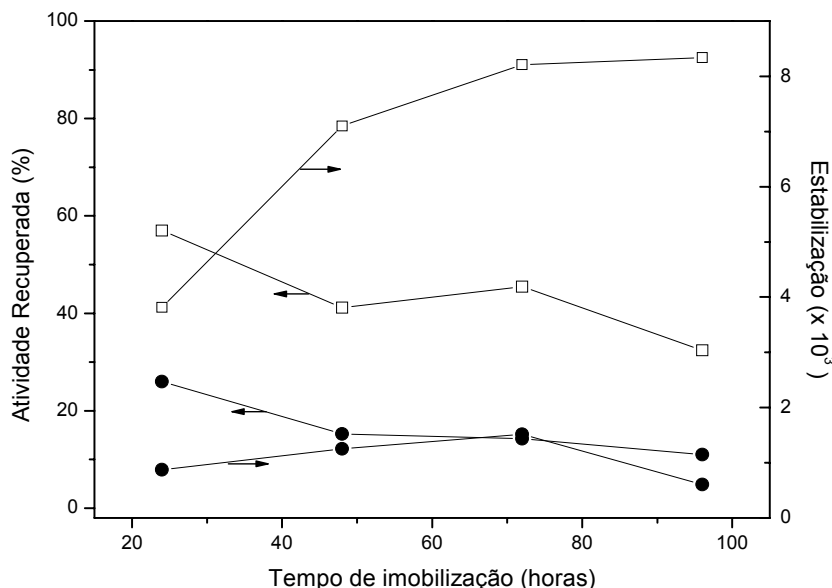
A multi-interação enzima-suporte não é um processo rápido. Quanto maior o tempo de imobilização, maior será o número de ligações covalentes formadas e, conseqüentemente, uma maior estabilidade do biocatalisador é esperada. Os derivados obtidos pela imobilização em suportes ativados com reagentes epóxidos a pH 10,05 são mais susceptíveis a promover multi-interação devido ao comportamento dos aminoácidos lisina neste pH. Todos os



derivados ativados com glicidol ou epiclorigrina previamente apresentados foram preparados com 24h de tempo de contato enzima-suporte.

Os resultados de novos ensaios para verificar a influência do tempo de imobilização estão na Figura 4.6. Como esperado, para o mesmo derivado, maior estabilização e uma diminuição na recuperação de atividade foi observada ao longo do tempo. Derivados preparados usando ativações usando glicidol ou epiclorigrina apresentaram o mesmo comportamento. Entretanto, a influência do tempo foi mais significativa para a epiclorigrina. Com este ativante, o derivado foi cerca de 8000 vezes mais estável com 72h de imobilização. A influência do tempo de reação na estabilização e sua correlação com o número de ligações formadas entre enzima-suporte já foi estudada para a tripsina [13], lipase [14], quimotripsina [15].

Estes dados também mostram que quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% ativado com epiclorigrina alcançou uma maior estabilidade e recuperação que o ativado com glicidol. Logo, o primeiro deve ter formado mais ligações multipontuais explicando que o decréscimo na recuperação de atividade foi devido à distorção do centro ativo da enzima, pois não havia nenhum substrato ou inibidor para a proteção deste sítio catalítico ao longo da imobilização.



**Figura 4.6** Influência do tempo de imobilização na estabilização e atividade recuperada de derivados de quimotripsina. Tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) determinado a 65°C, pH 8,0. Carga oferecida: 5mg enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel. (□) quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% epiclorigrina e (●) quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% glicidol.

A Figura 4.6 indica que 72h já é o tempo de contato adequado, uma vez que tempos mais longos não melhoraram significativamente a estabilização, tão pouco a atividade

recuperada. Finalmente, faltava verificar o comportamento do melhor catalisador após a etapa de redução com borohidreto de sódio (Tabela 4.10). A redução diminuiu a atividade da enzima imobilizada. No entanto, aumentou a estabilidade. Outros autores [15,16] já reportaram a perda de atividade depois desta etapa, mostrando que o borohidreto exerce ação deletéria na estrutura terciária da enzima, o que foi comprovado também neste trabalho.

**Tabela 4.10** Influência da redução com NaBH<sub>4</sub> após a imobilização em pH 10,05 e 25°C nos parâmetros de imobilização: quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5,0%, ativado com epícloridrina. Carga oferecida: 5mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel (600 U<sub>BTEE</sub>. g<sup>-1</sup>gel).

Derivado	R <sub>I</sub> (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> U <sub>BTEE</sub> . g <sup>-1</sup> gel	t <sub>1/2</sub> (h) a 65°C	FE
derivado referência <sup>a</sup>	100	12	72	0,19	240 <sup>b</sup>
sem redução	100	45	270	6,50	8211 <sup>c</sup>
reduzido	100	34	204	7,80 ± 0,5	9853± 631 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> quitosana 2,5%-alginato 2,5% glutaraldeído a pH 10,05.

<sup>b</sup> fator de estabilidade do derivado referência a 55°C.

<sup>c</sup> (t<sub>1/2</sub> do derivado a 65°C / t<sub>1/2</sub> referência a 65°C) × fator de estabilidade do derivado referência a 55°C.

#### 4.2.9 Análise de aminoácidos de quimotripsina livre e imobilizada:

A Tabela 4.11 apresenta os resultados da análise de aminoácidos de hidrolisados de enzima livre e imobilizada. A quantidade de lisinas varia de acordo com a ativação e as condições de imobilização empregadas. O melhor catalisador obtido apresentou a maior percentagem de lisinas envolvidas na imobilização multipontual, cerca de 55% do total.

**Tabela 4.11** Análise de aminoácidos de hidrolisados de quimotripsina livre e imobilizada.

Derivados	Quantidade Relativa de Aminoácido ( $\pm \sigma$ )				
	Asp	Glu	Pro	Phe	Lys
quimotripsina solúvel	1,00 $\pm$ 0,1	1,00 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,1	1,00 $\pm$ 0,1
quit 2,5%-algin 2,5% glutaraldeído a pH 7,0	0,84 $\pm$ 0,1	0,89 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,1	0,90 $\pm$ 0,1
quit 2,5%- algin 2,5% glutaraldeído a pH 10,05	0,88 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,1	0,65 $\pm$ 0,1
quit 2,5%-carrag 2,5%-SC 5% glicidol	0,93 $\pm$ 0,1	0,93 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,1	0,64 $\pm$ 0,1
quit 2,5%- carrag 2,5%-SC 5% epícloridrina	1,10 $\pm$ 0,1	0,95 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,1	0,45 $\pm$ 0,1

Este é um claro indício que o aumento na estabilidade estava correlacionado com a formação de ligações covalentes. A quimotripsina tem 14 lisinas em sua estrutura por molécula e a enzima usada neste trabalho tem um grau de pureza de 92%, logo, aproximadamente 7 a 8 resíduos de lisina por molécula de proteína estavam ligados ao suporte.

Derivados preparados a pH 7,0 e 10,05 com glutaraldeído tiveram 1 e 5 resíduos de lisina por molécula ligados ao suporte, respectivamente, enquanto que quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% ativado com glicidol apresentou 5 lisinas por molécula.

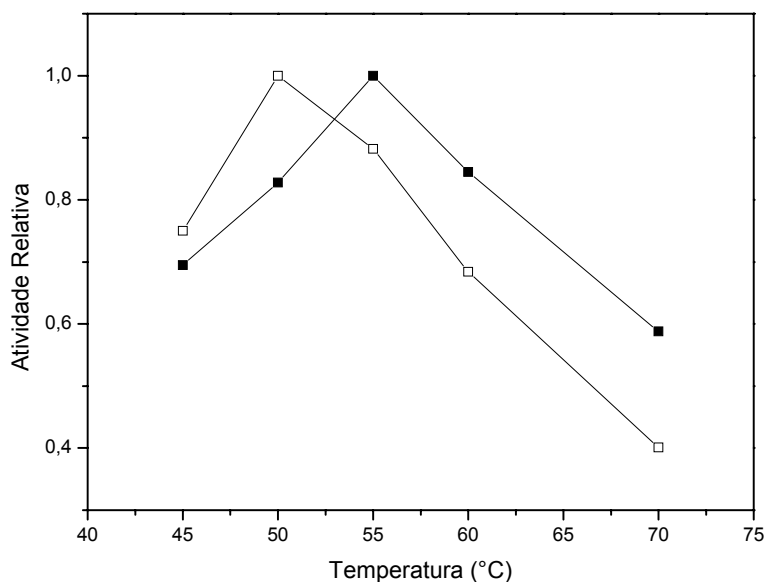
Estes resultados para os catalisadores preparados com glutaraldeído, confirmam a importância do pH durante a imobilização: a pH 10,05, a multipontualidade é favorecida quando comparado ao pH 7,0. Já para aqueles ativados com os epóxidos mostrados na Tabela 4.9, estão de acordo com o número de grupos reativos gerados no suporte (Tabela 4.12).

**Tabela 4.12** Concentração de grupos aldeído e oxirano nos melhores derivados obtidos.

Suporte Ativado	$\mu\text{mol de aldeído.g}^{-1} \text{ gel}$	$\mu\text{mol de oxirano.g}^{-1} \text{ gel}$
quitosana 2,5%-alginato 2,5% glutaraldeído	83 $\pm$ 1.0	-
quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% glicidol	49 $\pm$ 5.0	-
quitosana 2,5%- carragenana 2,5%-Sc 5% epícloridrina	66 $\pm$ 0.5	68 $\pm$ 2.5

#### 4.2.10 Ensaio de temperatura – atividade enzimática:

Figura 4.7 apresenta os perfis de temperatura/atividade para quimotripsina livre e estabilizada nas melhores condições obtidas neste trabalho. As atividades foram mensuradas a pH 7,0 com BTEE 8mM como substrato.



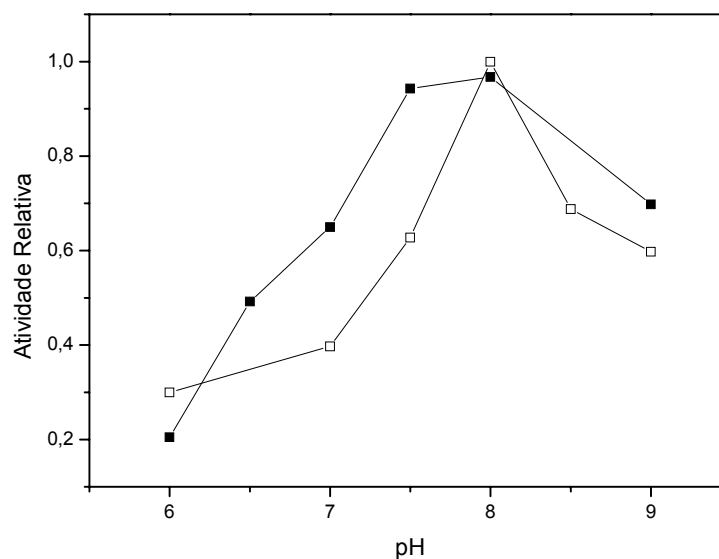
**Figura 4.7** Efeito da temperatura na atividade da (□) quimotripsina livre e (■) imobilizada em quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% ativado com epícloridrina. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0.

Observa-se que a enzima livre apresentou uma atividade máxima a 50°C e o derivado a 56°C. A imobilização não somente deslocou a temperatura para valores maiores como também protegeu a enzima, pois o decréscimo de atividade foi muito menor quando comparado com a livre. Enquanto a quimotripsina livre reteve aproximadamente 40% de sua atividade máxima a 70°C, o biocatalisador reteve 58%.

#### 4.2.11 Ensaio de pH – atividade enzimática:

O perfil de pH/atividade da quimotripsina foi modificado como um efeito de proteção devido à imobilização, contudo o pH ótimo para atividade da quimotripsina imobilizada foi de 8,0 sendo praticamente idêntico ao obtido para a enzima livre. A faixa de pH ótimo para a atividade da quimotripsina foi deslocada para valores mais básicos tanto para a enzima livre

quanto para imobilizada (Figura 4.8). Enquanto a quimotripsina livre reteve aproximadamente 60% de sua atividade máxima a pH 9,0, o biocatalisador reteve 70%.



**Figura 4.8** Efeitos do pH na atividade da (□) quimotripsina livre e (■) imobilizada em quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% ativado com epícloridrina, medido a 25°C com BTEE como substrato.

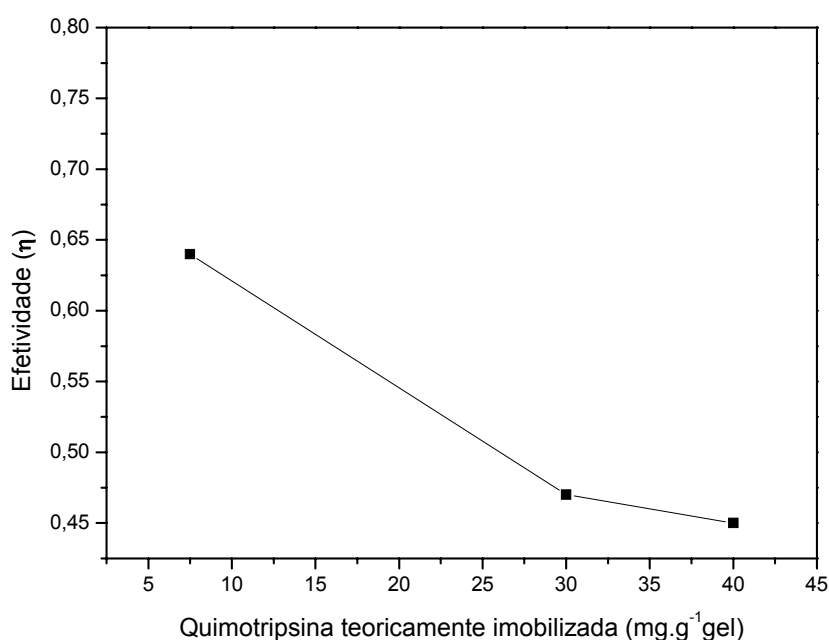
#### 4.2.12 Ensaio de hidrólise de soro de queijo utilizando quimotripsina imobilizada:

Neste ensaio, foi usado o suporte quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% ativado com epícloridrina com diferentes cargas de quimotripsina imobilizadas. Derivados com menores quantidades de enzima imobilizada não deveriam apresentar problemas difusionais, pois a reação ocorreria na superfície do catalisador, de modo que as moléculas de substrato não reagiriam no interior dos poros do gel (Figura 4.9).

Na hidrólise do soro de queijo, nota-se que os atrasos reacionais aparecem também para géis com baixa carga, o que significa que o atraso difusional devido ao tamanho da proteína está sendo muito importante. Contudo, é possível que no caso da hidrólise das proteínas sejam os efeitos estéricos os maiores responsáveis pela queda na velocidade aparente da reação. Nos derivados com baixa carga, a maior parte das moléculas de enzima está imobilizada na parte mais externa do suporte, assim o substrato não precisaria difundir até o interior dos poros para reagir. A menor efetividade observada nesses casos indica existência de severos efeitos estéricos e/ou conformacionais, devido ao tamanho do substrato. Isso mostra que o tamanho do substrato é de extrema importância para a reação heterogênea na qual ocorrem efeitos estéricos e difusivos que tornam a reação mais lenta. À medida que se aumenta a carga

enzimática, esses efeitos estéricos se combinam com os atrasos difusivos decorrentes do tamanho das partículas, tornando a reação mais lenta [17].

Além disso, mesmo que haja uma quantidade alta de enzima não mensurável nas condições de reação usadas, é importante em operações industriais usar suportes altamente carregados permitindo uma alta estabilidade operacional ao catalisador e, conseqüentemente, aumentando sua reusabilidade. [18].



**Figura 4.9** Efetividade de quimotripsina imobilizada na hidrólise de soro de queijo a 55°C, pH 8,0 como função da carga de enzima teoricamente imobilizada.

#### 4.2.13 Imobilização de quimotripsina – comparação com trabalhos da literatura

A Tabela 4.13 apresenta comparação dos resultados obtidos neste trabalho com aos obtidos na literatura. Observa-se que Mateo e colaboradores [19] obteve uma estabilização de apenas 6 vezes usando Eupergit C<sup>®</sup> para imobilizar quimotripsina. Entretanto, Galvão [15] e Pedroche e colaboradores [17] ao utilizarem glioxil-agarose 6% BCL conseguiram uma estabilização de 14235 e 1620, respectivamente. Foram boas estabilizações de quimotripsina imobilizada, entretanto, trata-se de suporte caro, aproximadamente 2000 reais por 1Kg de suporte.

Por outro lado, neste trabalho conseguiu-se uma estabilização de 9900 vezes utilizando suportes de baixo custo e fácil manuseio e preparados no próprio laboratório “home-made”, apresentando excelentes resultados na imobilização e estabilização de quimotripsina em híbridos de quitosana. Ressalta-se que 1Kg de quitosana em pó custa 90 reais tornando-se,

assim, bastante viável sua utilização para imobilização de quimotripsina para fins industriais na hidrólise das proteínas de soro de queijo.

**Tabela 4.13** Imobilização de quimotripsina – comparação com trabalhos da literatura.

<b>Condições de Imobilização</b>				
<b>pH</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Tempo de contato (h)</b>	<b>Estabilização</b>	<b>Referência</b>
10	20	96	6	[19]
10,05	25	24	14535	[17]
10,05	25	3	1620	[15]
<b>10,05</b>	<b>25</b>	<b>72</b>	<b>9900</b>	<b>Neste trabalho</b>

### 4.3 Conclusões parciais

O planejamento fatorial permitiu escolher os melhores fatores para uma futura otimização da imobilização de quimotripsina em glutaraldeído-quitosana-gelatina e mostrou que a presença do copolímero (gelatina) permitiu maior controle do processo de imobilização, com aumento da estabilidade térmica do derivado. O planejamento serviu também para mostrar a reprodutibilidade do processo através dos experimentos no ponto central. Este estudo também possibilitou a aplicação de novos polímeros na produção de suportes com quitosana visando ao aumento da estabilidade térmica e a melhoria na obtenção de derivados de quimotripsina.

Os resultados obtidos permitiram verificar que há uma influência positiva na adição de copolímeros e de diferentes métodos de ativação no protocolo de imobilização de quimotripsina em quitosana. Para géis ativados com glutaraldeído, o compósito quitosana-alginato apresentou melhores resultados com rendimento de imobilização de 62%, atividade recuperada de 59% , estabilidade térmica de 216 vezes em relação à enzima solúvel a 55°C e capacidade máxima de imobilização de 42 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel.

Para o glicidol, o melhor derivado foi quitosana-carragenana com rendimento de imobilização de 34%, atividade recuperada de 76% , estabilidade térmica de 243 vezes em relação à enzima solúvel a 55°C e capacidade máxima de imobilização de 22 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel sendo este o melhor também ao se utilizar epiclorigrina com rendimento de imobilização de 71%, atividade recuperada de 22% , estabilidade térmica de 517 vezes em

relação à enzima solúvel a 55°C e capacidade máxima de imobilização de 30 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel.

A adição de microrganismos e conseqüente lise celular incrementaram os parâmetros de imobilização para os três agentes ativantes empregados. Para o glutaraldeído, o melhor derivado foi quitosana 2,5% - alginato 2,5% - Bm 5% com 69% de rendimento de imobilização, 38% de atividade recuperada sendo 261 vezes mais estável que a enzima solúvel a 55°C e capacidade máxima de imobilização de 52 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel; enquanto para o glicidol, o melhor derivado foi quitosana 2,5% - carragenana 2,5%-Sc 5% e apresentou 72% de rendimento de imobilização com 31% de atividade recuperada sendo 442 vezes mais estável que a enzima solúvel a 55°C e capacidade máxima de imobilização de 21 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel e para epiclorigrina o melhor derivado foi quitosana 2,5% - carragenana 2,5%-Sc 5% apresentando 91% de rendimento de imobilização com 57% de atividade recuperada sendo 1379 vezes mais estável que a enzima solúvel a 55°C e capacidade máxima de imobilização de 40 mg de enzima.g<sup>-1</sup> de gel.

O tratamento de lise celular por meios químico e enzimático apresentou efeito positivo nos parâmetros de imobilização e a substituição por um método mais prático, barato e eficiente, utilizando sabão em pó, mostrou-se bastante satisfatório uma vez que foram obtidos resultados semelhantes aos resultados obtidos pelo tratamento empregando SDS e alcalase.

Assim, um aumento significativo na estabilização de quimotripsina foi alcançado após imobilização covalente multipontual em híbridos de quitosana. O tempo de meia vida de derivados de quimotripsina aumentou de 0,57h a 55°C a 7,8h a 65°C.

O derivado mais instável foi quitosana 2,5% ativado com glutaraldeído a pH 7,0 por 2h de imobilização a 4°C sem redução com NaBH<sub>4</sub>. O mais estável foi quitosana 2,5%-carragenana 2,5%-Sc 5% seguido de lise celular para remoção de fragmentos de células depois da preparação do gel sendo a ativação com epiclorigrina, tempo de contato enzima-suporte de 72h a pH 10,05 e 25°C com redução com NaBH<sub>4</sub>. Obteve-se uma estabilização de 9900 vezes em relação à enzima livre. Este suporte obteve uma saturação de imobilização de 40mg de enzima liofilizada.g<sup>-1</sup>gel, sendo uma boa propriedade para usos industriais.

Os excelentes resultados obtidos podem ser justificados pela determinação de número de aldeídos e oxiranos formados no suporte e de aminoácidos lisina da enzima envolvidos na imobilização multipontual, bem como, imagens de MEV das estruturas do gel.



## 4.4 Referências bibliográficas

- [1] Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, n.1, p.19-34. **2004**.
- [2] Arruda, E. J. *Concentração e purificação de  $\alpha$ -amilase de extrato de soja por adsorção em gel de afinidade quitosana-fenilboronato*. (Doutorado). Engenharia Química, Unicamp, Campinas, **1999**.
- [3] Gómez, L.; Ramirez, H. L.; Villalonga, M. L. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology*, v.38, n.1-2, p.22-27. **2006**.
- [4] Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazú, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B. C. C.; Hidalgo, A.; Fernandez-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.274–280. **2006**.
- [5] López-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuentes., R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, v.116, p.1-10. **2005**.
- [6] Boissière, M.; Tourrette, A.; Devoisselle, J. M.; Di Renzo, F.; Quignard, F. Pillaring effects in macroporous carrageenan-silica composite microspheres. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.294, p.109-116. **2006**.
- [7] Pereira, G. H. A. *Estudo da imobilização multipontual da penicilina G acilase em sílica ativada com grupos glioxil*. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **1996**.
- [8] Tyson, C. B.; Lord, P. G.; Wheals, A. E. Dependency of size of *Saccharomyces cerevisiae* cells on growth rate. *Journal of Bacteriology*, v.138, n.1, p.92-98. **1979**.
- [9] Vary, P. S.; Biedendieck, R.; Fuerch, T.; Meinhardt, F.; Rohde, M.; Deckwer, W. D.; Jahn, D. *Bacillus megaterium* —from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.76, n.5, p.957-967. **2007**.

- [10] Scherrer, R.;Gerhardt, P. Molecular Sieving by the *Bacillus megaterium* Cell Wall and Protoplast. *Journal of Bacteriology*, v.107, n.3, p.718-735. **1971**.
- [11] Dechastellier, C.; Hellio, R.; Riter, A. Study of cell wall growth in *Bacillus megaterium* by high-resolution autoradiography. *Journal of Bacteriology*, v.123, n.3, p.1184-1196. **1975**.
- [12] Kolla'R, R.; Reinhold, B. B.; Petra'Kova, E.; Yeh, H. J. C.; Ashwell, G.; Drgonova, R.; Kapteyn, J. C.; Klis, F. M.; Cabib, E. Architecture of the Yeast Cell Wall.  $\beta$ (1-6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$  (1-3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*, v.272, n.28, p.17762-17775. **1997**.
- [13] Blanco, R. M.; Calvete, J. J.; Guisán, J. M. Immobilization–stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v.11, p.353–359. **1988**.
- [14] Rodrigues, D. S.; Mendes, A. A.; Adriano, W. S.; Gonçalves, L. R. B.; Giordano, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.51, p.100–109. **2008**.
- [15] Pedroche, J.; Yust, M. D. M.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J.; Guisan, J. M.; Millan, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.1160-1166. **2007**.
- [16] Tardioli, P. W.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. Design of new immobilized stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, v.19, p.565-574. **2003**.
- [17] Galvão, C. M. A. *Hidrólise controlada de proteínas do soro láctico usando tripsina e quimotripsina immobilizadas em diferentes suportes*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2004**.
- [18] Adriano, W. S.; Filho, E. H. C.; Silva, J. A.; Gonçalves, L. R. B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.22, p.529-538. **2005**.
- [19] Mateo, C.; Abian, O.; Fernández-Lafuente, R.;Guisán, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional

multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p.509-515.  
**2000.**

# *Capítulo 5*

*Resultados: Preparação e  
Caracterização de Derivados  
de Carboxipeptidase A*

## 5 Resultados: Preparação e caracterização de derivados de carboxipeptidase A

Pretende-se neste capítulo discutir a estabilização de carboxipeptidase A, por imobilização covalente multipontual em híbridos de quitosana contendo copolímeros utilizando diferentes protocolos de ativação (glutaraldeído e epícloridrina). A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

Para a CPA, escolheu-se o suporte quitosana 2,5%-alginate 2,5% para a imobilização com ativação através do glutaraldeído ( $83\mu\text{mol}$  de aldeídos. $\text{g}^{-1}\text{gel}$ ). Isto foi devido ao prévio estudo feito com quimotripsina que mostrou que esse suporte apresentou os melhores resultados quando ativado com glutaraldeído. Deste modo, não se realizou um novo escalonamento de suportes para tentar se buscar o melhor derivado. O mesmo raciocínio foi seguido para o glicidol e epícloridrina. Em ensaios preliminares, foram também preparados derivados com quitosana-carragenana-Sc, mas os resultados foram similares aos obtidos pelo suporte quitosana-carragenana, não se observando assim melhoria nos parâmetros de imobilização de CPA com a adição de microrganismos durante a preparação do gel. Quanto à ativação, os ensaios preliminares mostraram que o glicidol na ativação conduzia a derivados com baixa retenção de atividade. Ativação com epícloridrina ( $66\mu\text{mol}$  de aldeídos. $\text{g}^{-1}\text{gel}$  e  $63\mu\text{mol}$  de oxiranos. $\text{g}^{-1}\text{gel}$ ) apresentou os melhores resultados e, como o mesmo comportamento havia sido observado no estudo de quimotripsina, resolveu-se estudar apenas a ativação via glutaraldeído e epícloridrina.

Diferentemente da quimotripsina, a CPA é uma metaloenzima e sua imobilização em quitosana está limitada pela afinidade que tem esse suporte por íons bivalentes [1,2,27] prejudicando sua estabilização devido à adsorção de íons zinco que estão coordenados em seu centro catalítico. Assim, buscou-se investigar condições de imobilização que minimizassem esse problema. A seguir, são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

### 5.1 Preparação e caracterização de híbridos de quitosana

#### 5.1.1 Ativados com glutaraldeído:

Algumas estratégias para imobilização de CPA usando quitosana-alginate ativado com glutaraldeído foram estudadas usando agentes protetores durante o processo de imobilização, inclusive na etapa de redução com  $\text{NaBH}_4$ . A Tabela 5.1 mostra todos os resultados obtidos.

A primeira estratégia foi usar agentes protetores durante a imobilização e a segunda, proteger a enzima na etapa de redução.

**Tabela 5.1** Parâmetros de imobilização de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M, pH 10,05 a 25°C por 3h (quitosana – alginato) com glutaraldeído 5% (v/v) em diferentes condições com carga oferecida de 1mg de enzima. g<sup>-1</sup> gel ou (44U<sub>H-PHE</sub> CPA.g<sup>-1</sup> gel), sendo atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 55°C.

Agente protetor durante imobilização	Redução com NaBH <sub>4</sub>	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> U <sub>H-PHE</sub> .g <sup>-1</sup> gel	t <sub>1/2</sub> (min)	FE
----	---	48	22,4	6,12	1,7
	<b>tirosina</b>	49	22,9	8,20	2,3
	<b>zinco</b>	44	20,7	15,19	4,2
<b>N-acetil-L-tirosina</b>	----	60	16,7	10,14	2,8
	<b>tirosina</b>	63	17,5	6,95	1,9
	<b>zinco</b>	73	13,4	15,17	4,2
<b>Cálcio</b>	----	70	29,0	6,63	1,8
	<b>tirosina</b>	71	29,3	10,17	2,8
	<b>zinco</b>	43	17,8	14,49	4,0
<b>Cálcio e N-acetil-L-tirosina</b>	----	50	22,0	8,74	2,4
	<b>tirosina e zinco</b>	48	21,2	19,14	5,3

Estes agentes protetores (N-acetil-L-tirosina e íons cálcio previamente adsorvidos no suporte) tinham a função de inibir a adsorção zinco do centro catalítico da CPA pelo suporte com conseqüente perda de atividade. Ativantes como glutaraldeído reagiriam com aminos da quitosana e conseqüentemente, esses grupos já estariam disponíveis em menor quantidade para a formação de complexos e sua capacidade de adsorção diminuiria [3,4]. Somado isso ao efeito da N-acetil-L-tirosina e cálcio, buscavam-se alcançar melhores resultados.

Quanto à redução, utilizou-se o protocolo desenvolvido para a CPA por Tardioli [5] no qual se usava L-tirosina como inibidor enzimático para proteger o centro catalítico e, neste trabalho, resolveu-se também adicionar íons zinco de modo a verificar sua influência na etapa de redução.

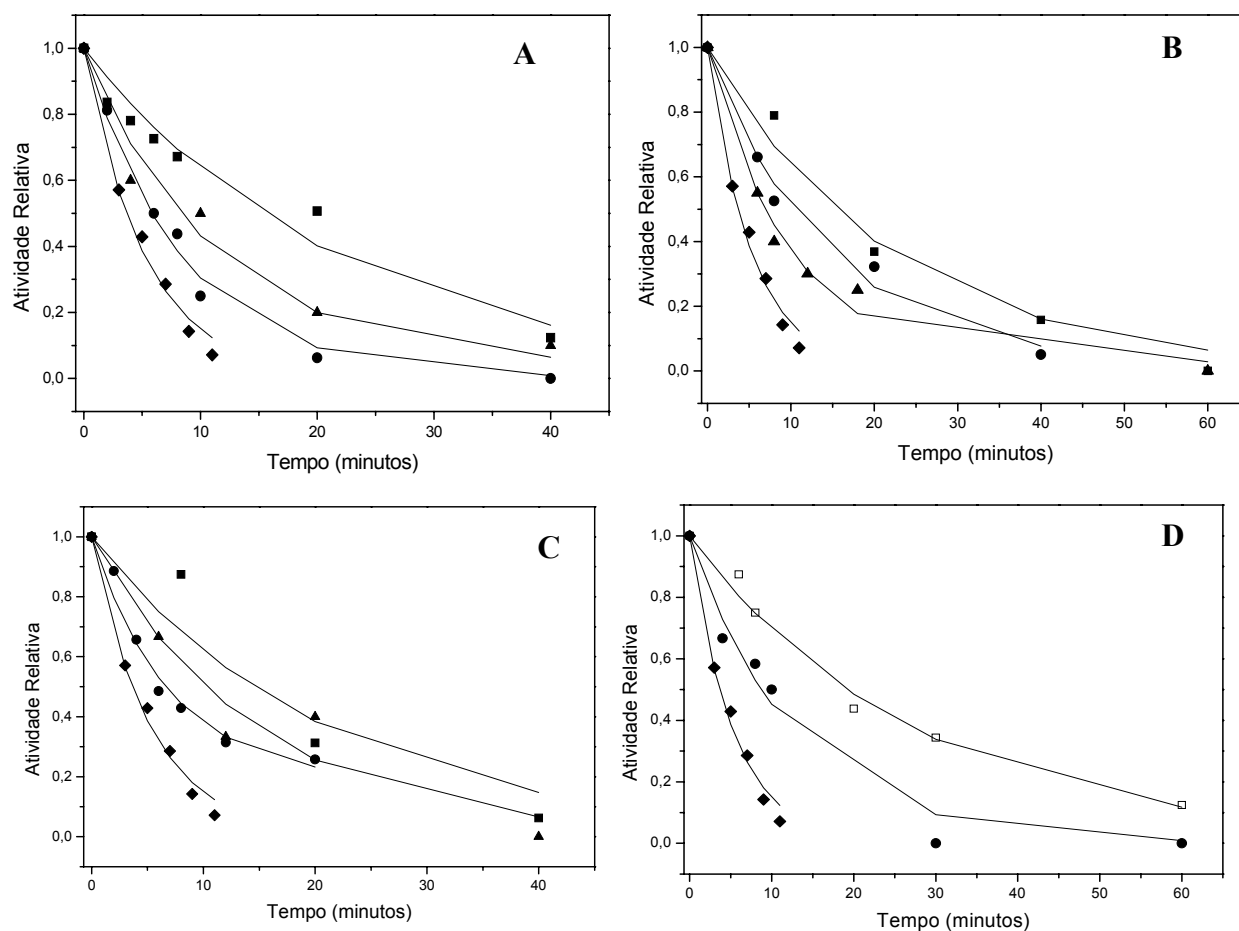
Quanto à atividade recuperada, um decréscimo é notado após a redução usando L-tirosina, zinco ou ambos. No derivado preparado com cálcio durante imobilização e não reduzido ( $29,0 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ gel}$ ), quando comparado ao reduzido usando zinco ( $17,8 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ gel}$ ) é observado uma diminuição de 30%. Este fenômeno está relacionado ao efeito redutor do borohidreto sobre os íons zinco existentes no sítio catalítico da enzima necessário à função catalítica. Esta redução foi realizada para transformar as bases de Schiff em ligações aminos secundários mais estáveis e grupos aldeídos remanescentes em hidroxilas [6]. Mesmo na presença de zinco, a etapa de redução resultou na perda de atividade enzimática. No entanto, na presença de N-acetil-L-tirosina e cálcio na etapa de imobilização com L-tirosina e zinco na redução, a perda de atividade do derivado não reduzido ( $22,0 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ gel}$ ) quando comparado ao reduzido ( $21,2 \text{ U}_{\text{H-PHE}} \cdot \text{g}^{-1} \text{ gel}$ ) foi somente 2%, mostrando o efeito positivo destes compostos utilizados visando à estabilização da CPA.

Cálcio promoveu algumas modificações químicas, principalmente nas moléculas de alginato e diminuindo a afinidade do suporte pelo zinco. Reporta-se na literatura [7,8] que íons cálcio se ligam em regiões mais seletivas contendo blocos homogêneos de poliguluronato, assim géis de alginato contendo cálcio formarão géis mais porosos facilitando assim a imobilização de proteínas.

Estes resultados estão de acordo aos obtidos por Tardioli e colaboradores [6] que perderam cerca de 10% de atividade usando glioxil-agarose como suporte e L-tirosina como inibidor na etapa de redução.

Quanto ao fator de estabilidade dos derivados comparados à CPA livre, nota-se que, mesmo o zinco não evitando a perda de atividade na redução, melhorou as estabilidades em todos os ensaios realizados. Logo, na presença de L-tirosina e zinco na redução, foi possível inibir a perda de atividade catalítica e incrementar a estabilidade (5,25) a  $55^\circ\text{C}$ . O zinco funcionou como um protetor ao competir com o metal do sítio ativo pelo suporte e diminuiu os efeitos deletérios do  $\text{NaBH}_4$  na enzima junto com a L-tirosina agindo sinergicamente e aumentando a estabilidade e diminuindo a perda de atividade.

As estabilidades dos derivados preparados foram realizadas a  $55^\circ\text{C}$ , pH 7,5 e se ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos. Os tempos de meia-vida foram calculados através dos parâmetros obtidos a partir do modelo de desativação. Neste caso, a temperatura foi mantida a  $55^\circ\text{C}$  até os derivados perderem mais de 50% de sua atividade inicial. Os ajustes do modelo aos pontos experimentais são exibidos na Figura 5.1. O modelo se adequou bem para todos os ensaios realizados. Os tempos de meia-vida são apresentados na Tabela 5.1.



**Figura 5.1** Inativação térmica (55°C e pH 7,5) de (◆) carboxipeptidase A solúvel, (●) sem redução, (▲) redução na presença de tirosina 0,02M (■) redução na presença de íons zinco (□) redução na presença tirosina 0,02M e zinco. (A) Imobilização sem agente protetor, (B) presença de N-acetil-L-tirosina, (C) com cálcio, (D) com N-acetil-L-tirosina e cálcio. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

Os baixos tempos de meia-vida para os derivados de CPA em quitosana-alginato ativado com glutaraldeído podem ser explicados pelo curto tempo de imobilização (3 horas) e o número de ligações formadas entre enzima-suporte não serem muitas [9], bem como, a baixa congruência geométrica entre a CPA e o suporte. Na literatura, reporta-se que quanto melhor esse arranjo entre a molécula de proteína e o suporte, maiores são as possibilidades de se atingir uma melhor estabilização [10,11]. O curto tempo de imobilização para a CPA foi necessário a fim de se evitar ou inibir qualquer adsorção de zinco pela quitosana, de modo que fosse possível obter bons parâmetros de imobilização. Períodos mais longos foram testados, mas ao final do processo de imobilização, nenhuma atividade era detectada no derivado.



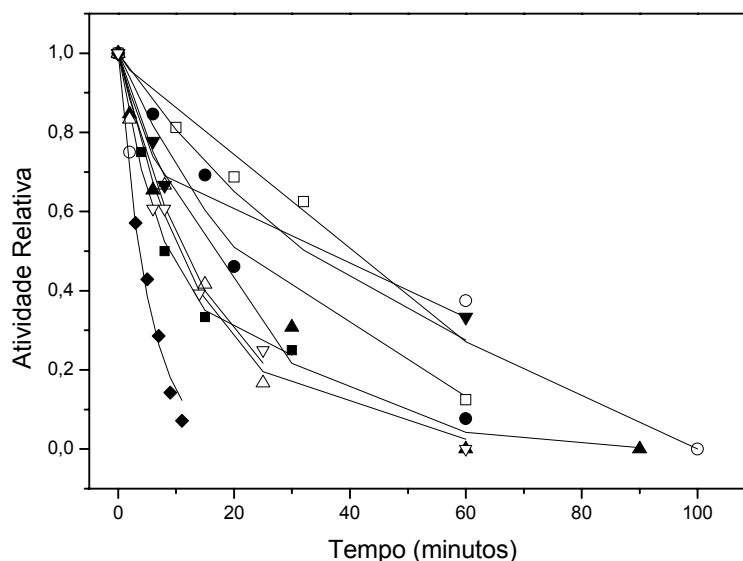
### 5.1.2 Ativados com epiclorigrina:

Tabela 5.2 apresenta os resultados obtidos dos oito ensaios realizados utilizando quitosana-carragenana. As respostas analisadas foram: rendimento de imobilização ( $R_I$ ), atividade recuperada ( $A_R$ ), e fator de estabilidade a 55°C (FE).

**Tabela 5.2** Parâmetros de imobilização de CPA em tampão bicarbonato sódico 0,1M pH 10,05 a 25°C por 3h de imobilização no suporte (quitosana – carragenana) com epiclorigrina em diferentes condições com carga de enzima oferecida de 1mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (44U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> gel), sendo rendimento de imobilização ( $R_I$ ), atividade recuperada ( $A_R$ ), atividade aparente ( $A_{ap}$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilidade (FE) a 55°C.

Ensaio	Glutaraldeído e NaBH <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	N-acetil-L-tirosina	$R_I$ (%)	$A_R$ (%)	$A_{ap}$ U <sub>HPHE</sub> .g <sup>1</sup> gel	$t_{1/2}$ (min)	FE
1	+	+	-	65	37	16	11,32	3,1
2	+	+	+	52	33	14	17,60	4,8
3	+	-	-	49	29	14	8,67	2,4
4	+	-	+	48	30	15	20,61	5,7
5	-	+	+	58	44	18	10,55	2,9
6	-	+	-	81	56	25	31,88	8,8
7	-	-	-	55	22	8	32,26	8,9
8	-	-	+	60	47	22	13,82	3,8

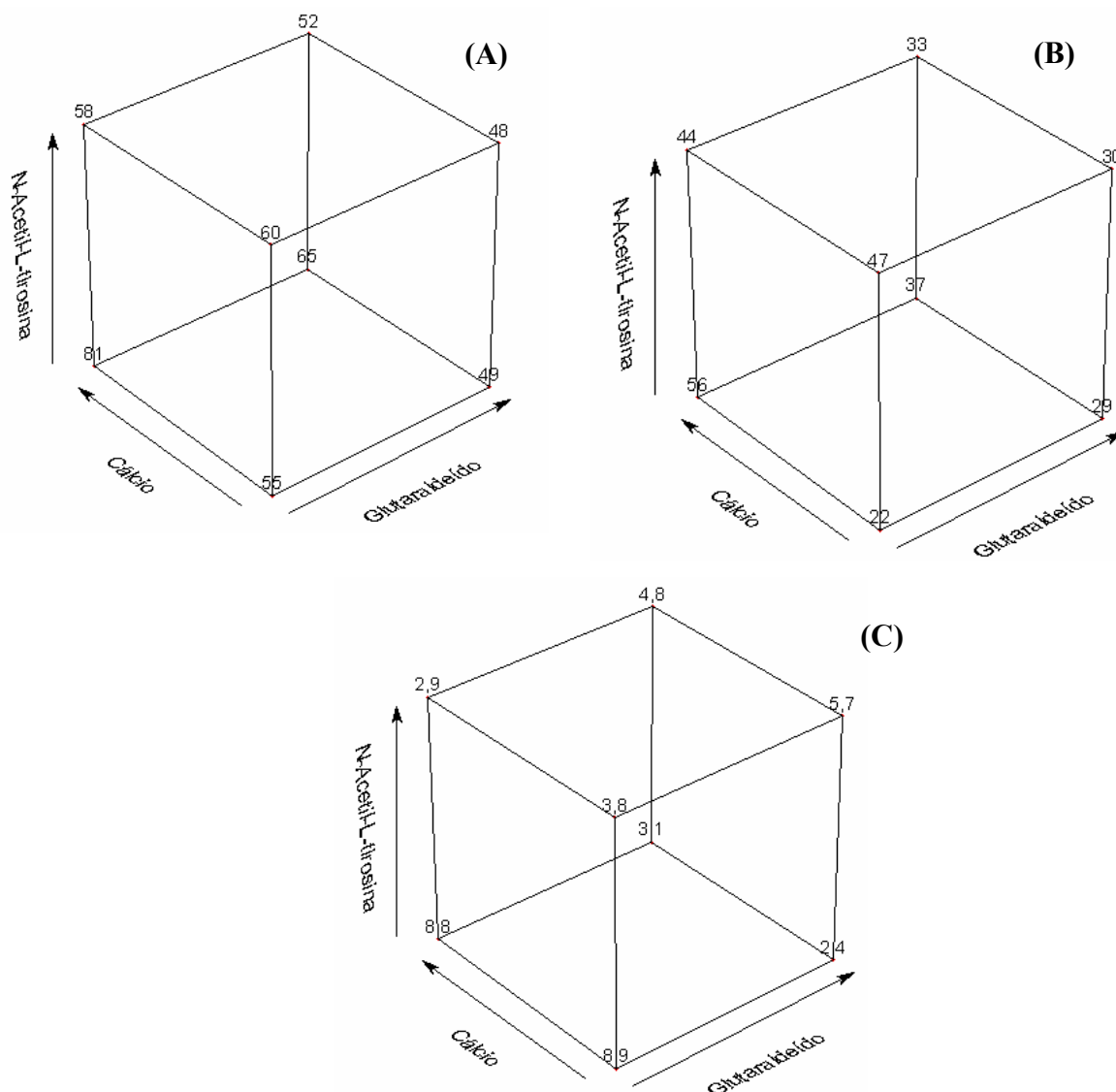
O modelo de Sadana-Henley foi ajustado aos pontos experimentais conforme ilustrado na Figura 5.2



**Figura 5.2** Inativação térmica (55°C e pH 7,5) de (◆) CPA livre e ensaios: (△) 1, (▼) 2, (■) 3, (●) 4, (▽) 5, (○) 6, (□) 7 e (▲) 8. Todos derivados foram preparados após 3h de imobilização entre enzima-suporte a 25°C e pH 10,05 com carga oferecida de 1mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel (44U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> gel) e ativado com epicloridrina sem redução por NaBH<sub>4</sub>. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

Observou-se que dentre os experimentos feitos, a melhor condição foi o sexto. Os efeitos mais importantes foram interpretados por contrastes geométricos e quando três respostas são consideradas, a figura representativa é um cubo. Os experimentos realizados da matriz experimental correspondem ao vértice do cubo, enquanto as diagonais mostram as interações entre os fatores e se analisam mais facilmente os efeitos nos parâmetros de imobilização. Interações e efeitos principais para cada resposta obtida são ilustrados na Figura 5.3 (A, B e C). Quanto ao rendimento de imobilização, a influência mais importante foi a presença de cálcio durante a imobilização.

Percebe-se que a presença do cálcio antes da ativação foi positiva, aumentando o rendimento de imobilização (Figura 5.3-A), deve ser devido às modificações na estrutura do suporte que contribuíram para um aumento da afinidade do suporte pela enzima. Quanto ao N-acetil-L-tirosina, durante imobilização teve um efeito negativo, pois este funcionou como um competidor com a enzima pelos sítios reativos do suporte.



**Figura 5.3** Análise cúbica para os oito ensaios realizados para cada resposta obtida. A) Rendimento de imobilização (R<sub>I</sub>); B) Atividade recuperada (A<sub>R</sub>) e C) Fator de estabilidade a 55°C (FE).

Na atividade recuperada (Figura 5.3-B), a interação entre N-acetil-L-tirosina e o cálcio foi positiva, bem como o efeito principal de cada um deles. A velocidade de imobilização via epiclorigrina é mais lenta quando comparada ao glutaraldeído, assim as moléculas de CPA foram imobilizadas na superfície devido ao bloqueio parcial ou total das entradas dos poros devido ao pré-tratamento com glutaraldeído e NaBH<sub>4</sub>. A enzima, provavelmente, não perderá atividade enzimática devido à presença de cálcio e N-acetil-L-tirosina que protegerão indiretamente o centro ativo da CPA durante a imobilização.

Por outro lado, estes derivados apresentaram uma melhora na atividade recuperada e baixa estabilidade térmica (Figura 5.3-C), pois, ao mesmo tempo em que esta interação entre glutaraldeído e N-acetil-L-tirosina foi positiva na atividade recuperada, apresentou-se

negativa no fator de estabilidade. Um fator muito importante é a congruência geométrica entre enzima-suporte.

Geralmente, quanto maior a congruência, maior a possibilidade de se alcançar uma multipontualidade durante a imobilização aumentando a estabilização da enzima [11]. No entanto, esta alta estabilização não foi verificada durante a imobilização. Esses ensaios foram realizados sem redução com  $\text{NaBH}_4$  após a imobilização, de modo que era necessário realizá-la e observar o comportamento destes derivados, mas a redução promoveu a perda total de atividade do catalisador tornando inviável determinar atividade recuperada e fator de estabilidade.

Redução com borohidreto de sódio pode causar efeitos deletérios na estrutura de proteínas, causada pela clivagem de pontes dissulfeto e/ou ligações peptídicas. Este efeito pode ser mais pronunciado em metaloenzimas como a CPA por ter um átomo de zinco coordenado no seu centro catalítico, tornando-a mais sensível. Analisando os derivados obtidos com ativação pelo glutaraldeído e os produzidos com ativação por epícloridrina, é possível discutir algumas hipóteses: (i) glutaraldeído é mais reativo que a epícloridrina e após a imobilização grupos aldeídos remanescentes podem ser reduzidos a hidroxilas inertes, de modo que a estrutura da enzima não seja tão prejudicada, enquanto a epícloridrina não gerará tantos aldeídos quanto o primeiro. Logo, a concentração do redutor empregada de  $1\text{mg.mL}^{-1}$  de suspensão poderia ser alta e reduzir importantes regiões da enzima com conseqüente perda de atividade, pois  $\text{NaBH}_4$  estaria em excesso nesta situação e seria de, certo modo, menos prejudicial com o glutaraldeído. Adriano e colaboradores [12] notaram um efeito negativo na etapa de redução durante imobilização de penicilina G acilase em quitosana e Manrich [13] que concluiu a indiferença da redução no sistema de imobilização de tripsina em quitosana.

Deste modo, seria necessário um estudo da melhor concentração de redutor e tempo de reação nestes derivados de CPA em híbridos de quitosana.

### 5.1.3 Ativados com epícloridrina (epoxilado):

Uma nova estratégia foi estudada. A imobilização multipontual através de epóxidos gerados no suporte e não via bases de Schiff. Em geral, a imobilização de enzimas em suportes epóxido deve apresentar dois tipos de grupos funcionais (i) para promover a adsorção física de proteínas e (ii) grupos capazes de imobilizar covalentemente a enzima (grupos epóxido). O uso de suportes heterofuncionais se torna importante para a imobilização/estabilização de enzimas [14,15]. O desenvolvimento do suporte foi dividido em

duas partes: (i) uma acetilação parcial dos grupos aminos da quitosana com anidrido acético, pois isso diminuiria a capacidade de adsorção do zinco, diminuindo a perda de atividade de CPA durante imobilização e (ii) geração de grupos oxiranos através de reação com epícloridrina com metodologia desenvolvida por Fangkangwanwong e colaboradores [16] com pequenas modificações. O gel obtido apresentou um caráter altamente hidrofóbico com 230  $\mu$ moles de epóxido.g<sup>-1</sup>gel. O híbrido escolhido foi quitosana-alginato, provou-se quitosana-carragenana, mas devido à alta hidrofiliabilidade da carragenana, não se obteve um gel de fácil manuseio. Carboxipeptidase A foi imobilizada em quitosana 2,5% - alginato 2,5% - epoxilado em diferentes tempos de contato enzima-suporte como se pode observar na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3** Influência do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização da CPA quitosana 2,5%-alginato 2,5%-epoxilado. Carga enzimática oferecida de 1mg de CPA.g<sup>-1</sup> de gel (44 U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup> de gel) sendo rendimento de imobilização (R<sub>I</sub>), atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 55°C a pH 10,05 e 25°C. Rendimento de imobilização foi de 100% em 2h de imobilização.

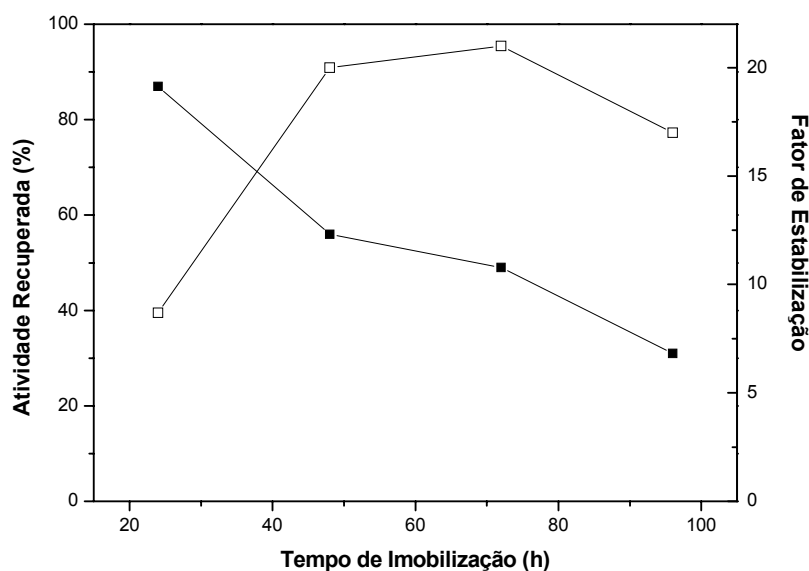
Tempo (h)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> (U <sub>H-PHE</sub> .g <sup>-1</sup> gel)	t <sub>1/2</sub> (minutos)	FE
CPA solúvel	-	-	3,64	1
3	100	44	-	-
24	87	38	32	8,8
48	57	26	72	20,0
72	49	22	76	21,0
96	31	14	62	17,0

Observa-se que com 3h de imobilização, toda atividade era recuperada (100%) diferentemente dos demais derivados produzidos ao longo deste estudo da CPA. Mostrando que melhores condições de imobilização tinham sido alcançadas através da acetilação de 53% dos grupos amino calculados por titulação potenciométrica [16,17]. A velocidade de imobilização devido à adsorção foi muito rápida, atingindo 100% de imobilização e por isso deixou-se por tempos maiores de modo a realizar a formação de mais ligações covalentes multipontuais [14,15].

O mais interessante foi um aumento do fator de estabilidade de 2,3 vezes quando comparado ao melhor derivado obtido (8,8) e que depois de 48h de imobilização o derivado apresentava ainda 57% de atividade recuperada.

Ao aumentar o tempo de contato enzima-suporte, mais ligações covalentes se formaram e, conseqüentemente, houve um decréscimo da atividade recuperada e aumento do fator de estabilidade. Entretanto, para tempos mais longos, a interação já começa a distorcer a molécula enzimática de modo a cair a estabilização alcançada (Figura 5.4). Comportamento semelhante aconteceu com Tardioli e colaboradores [6], estudando imobilização de CPA em glioxil-agarose.

Esta estratégia permitiu trabalhar por tempos mais longos de imobilização sem grandes perdas de atividade catalítica, pois o decréscimo de atividade pode estar relacionado ao número de ligações covalentes formadas e não ao efeito deletério dos aminos da quitosana sobre os íons zinco da estrutura enzimática.



**Figura 5.4** Influência do tempo de imobilização nos parâmetros de imobilização da CPA quitosana 2,5%-alginate 2,5%-epoxilado. Carga enzimática oferecida de  $1\text{mg de CPA}\cdot\text{g}^{-1}\text{gel}$  ( $44\text{ U}_{\text{H-PHE}}\cdot\text{g}^{-1}\text{gel}$ ) a pH 10,05 e  $25^{\circ}\text{C}$ : (■) Atividade recuperada e (□) Fator de estabilização

Os resultados destas imobilizações foram comparados com os obtidos da literatura e são apresentados na Tabela 5.4. Percebe-se que dentre as condições de imobilizações estudadas [18,19], a imobilização desenvolvida nesta tese logrou a melhor estabilização em menor tempo. O mais importante é que se utilizou um suporte de baixo custo quando comparados aos demais que imobilizaram penicilina G acilase e quimotripsina em resina comercial Eupergit C<sup>®</sup> [18] que é bastante onerosa em relação à quitosana-alginate. Apesar de serem enzimas diferentes, mostra o avanço na imobilização de CPA em quitosana, pois trata-se de uma metalo enzima quando comparadas à quimotripsina e PGA que são enzimas bem mais

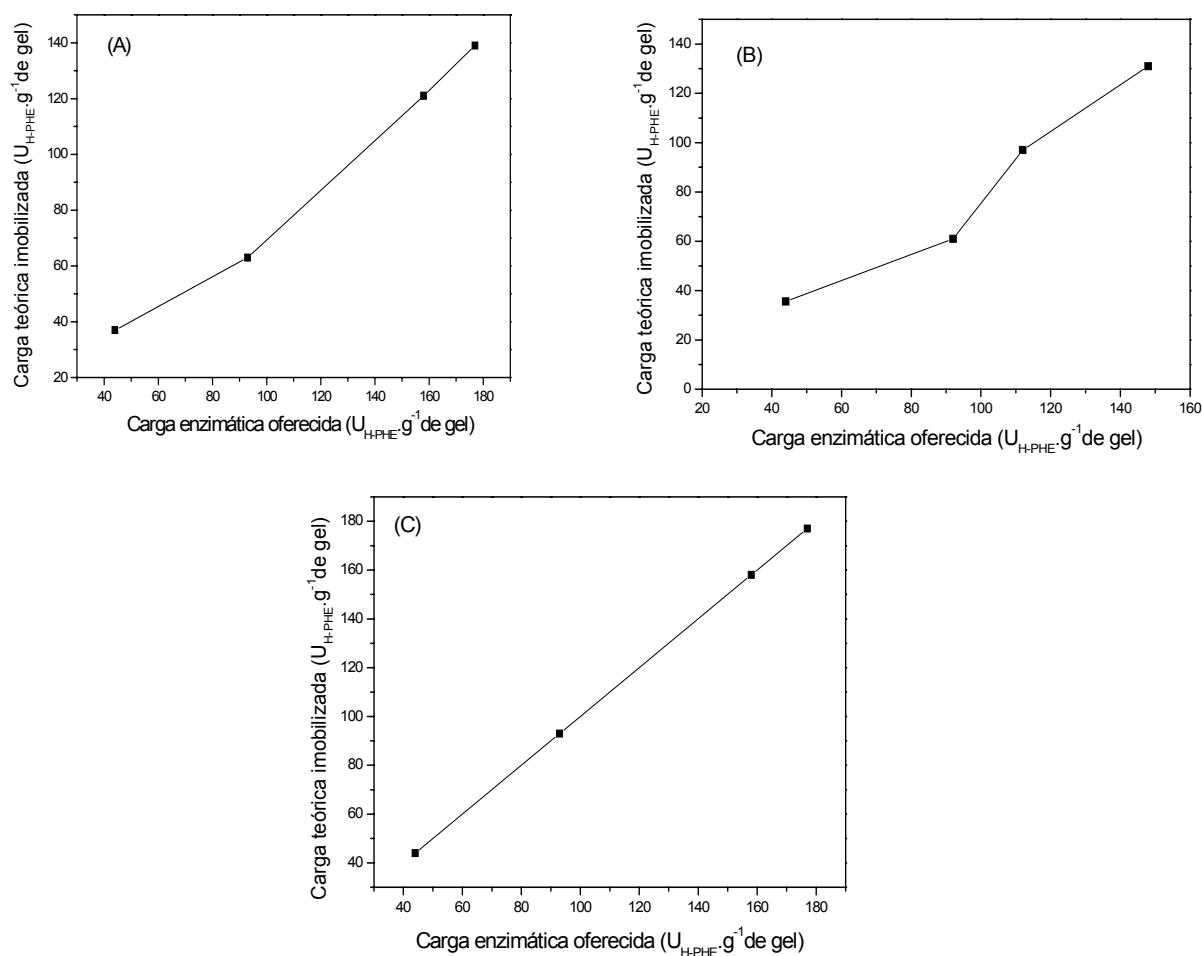
estudadas e resistentes à mudanças conformacionais durante diferentes condições de imobilização.

**Tabela 5.4** Comparação de diferentes derivados de enzimas industriais obtidos por imobilização em suportes epoxilados.

<b>Condições de Imobilização</b>				
<b>pH</b>	<b>T(°C)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Enzima</b>	<b>Estabilização</b>
10	20	96	quimotripsina	6
10	20	120	PGA	18
<b>10,05</b>	<b>25</b>	<b>48</b>	<b>CPA</b>	<b>20</b>

#### **5.1.4 Efeito da concentração de enzima oferecida no rendimento de imobilização e na atividade recuperada:**

Híbridos de quitosana com utilizando diferentes protocolos de ativação; glutaraldeído, epícloridrina (glioxil) e epoxilado foram preparados utilizando diferentes quantidades iniciais de enzima oferecida, variando de 1,0 a 4,0mg.g<sup>-1</sup>gel (44 a 180U<sub>H-PHE</sub>.g<sup>-1</sup>gel). Resultados mostrados na Figura 5.5 indicam que não houve saturação do suporte em nenhum dos três casos. Isto já era esperado, visto que para quimotripsina estes suportes apresentaram uma capacidade máxima de imobilização de aproximadamente 40mg de enzima.g<sup>-1</sup>gel. Outro fator a ser levado em consideração é o alto custo da CPA que não permitiu realizar ensaios para saturação do suporte.



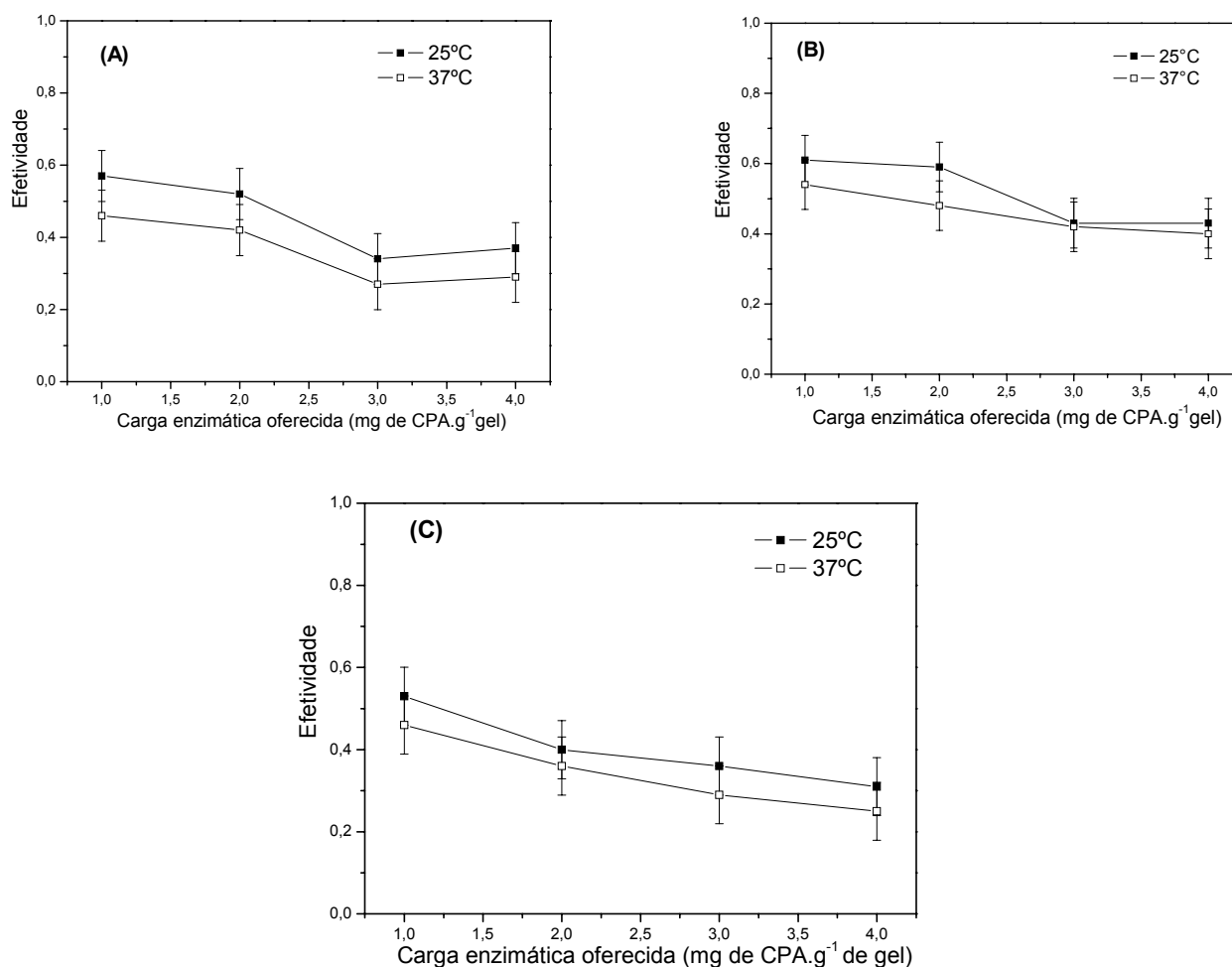
**Figura 5.5** CPA teoricamente imobilizada ( $U_{H-PHE} \cdot g^{-1}$  gel) como função da carga enzimática oferecida. (A) glutaraldeído, (B) epicloridrina e (C) epoxilado.

Quando são oferecidas quantidades de enzima mais altas, outro fenômeno acontece. Durante um tempo fixo de imobilização, uma diminuição significativa no rendimento de imobilização é obtida quando a concentração de enzima em solução é aumentada. Este comportamento pode ser creditado a uma combinação de difusão e exclusão existentes na entrada dos poros.

Quando suportes altamente ativados são mantidos em contato com uma alta carga enzimática, a imobilização é muito rápida causando um bloqueio parcial ou total das entradas dos poros do suporte o que afetará a difusão do substrato. Este fenômeno torna-se mais evidente em suportes ativados com glutaraldeído [19] e epoxilado. Entretanto, esse comportamento não foi tão evidente para a CPA, pois se utilizaram baixas cargas de enzima para imobilização.



Figura 5.6 mostra o comportamento da reação de hidrólise (relação entre a atividade aparente imobilizada e a atividade de CPA teoricamente imobilizada) como uma função da CPA teoricamente imobilizada (desapareceu do sobrenadante), em duas temperaturas.



**Figura 5.6** Relação entre atividade aparente e teórica em função da carga enzimática em duas temperaturas (A) glutaraldeído, (B) epicloridrina e (C) epoxilado.

Estes experimentos serviram para avaliar os efeitos de difusão nas velocidades iniciais da reação. A velocidade intrínseca da reação aumenta exponencialmente com o aumento da temperatura (segundo Arrhenius) e a difusividade molecular varia linearmente. A efetividade teórica da reação diminui com o aumento do módulo de Thiele observado e este é diretamente proporcional à velocidade intrínseca da reação e inversamente proporcional à difusividade do substrato [20,21]. Assim, o módulo de Thiele observado aumenta com a temperatura e, em consequência, diminui a efetividade da reação. Ainda, se a atividade aparente da enzima estiver limitada pela taxa de transferência de massa, mais alta a quantidade de enzima teoricamente imobilizada, maior será a velocidade da reação intrínseca.

Em catálise heterogênea, trabalha-se com velocidade da reação por volume de catalisador - no caso volume de gel e, por conseguinte, maior a carga enzimática e a temperatura, mais visível será o efeito do atraso difusional. Os resultados mostrados na Figura 5.6 confirmam a presença de fortes efeitos difusivos na medida da atividade da enzima. Pode-se observar que a efetividade experimental da reação (atividade da enzima imobilizada/atividade enzimática desaparecida do sobrenadante) é inversamente proporcional à quantidade de CPA teoricamente imobilizada a 25 e 37°C, sendo este efeito mais pronunciado para a temperatura mais alta.

Esses resultados, portanto, indicam que a enzima imobilizada está ativa e a baixa recuperação de atividade a 37°C é realmente devido aos efeitos de difusão. Os valores de atividade recuperada (efetividade x 100) medidos a 25°C são mais altos. Embora a efetividade em temperaturas altas seja baixa, é importante em operação industrial usar derivados com uma alta carga de enzima imobilizada. Quanto maior a carga de enzima imobilizada, maior será a estabilidade operacional aparente deste catalisador permitindo operar em reatores contínuos por tempos prolongados [1].

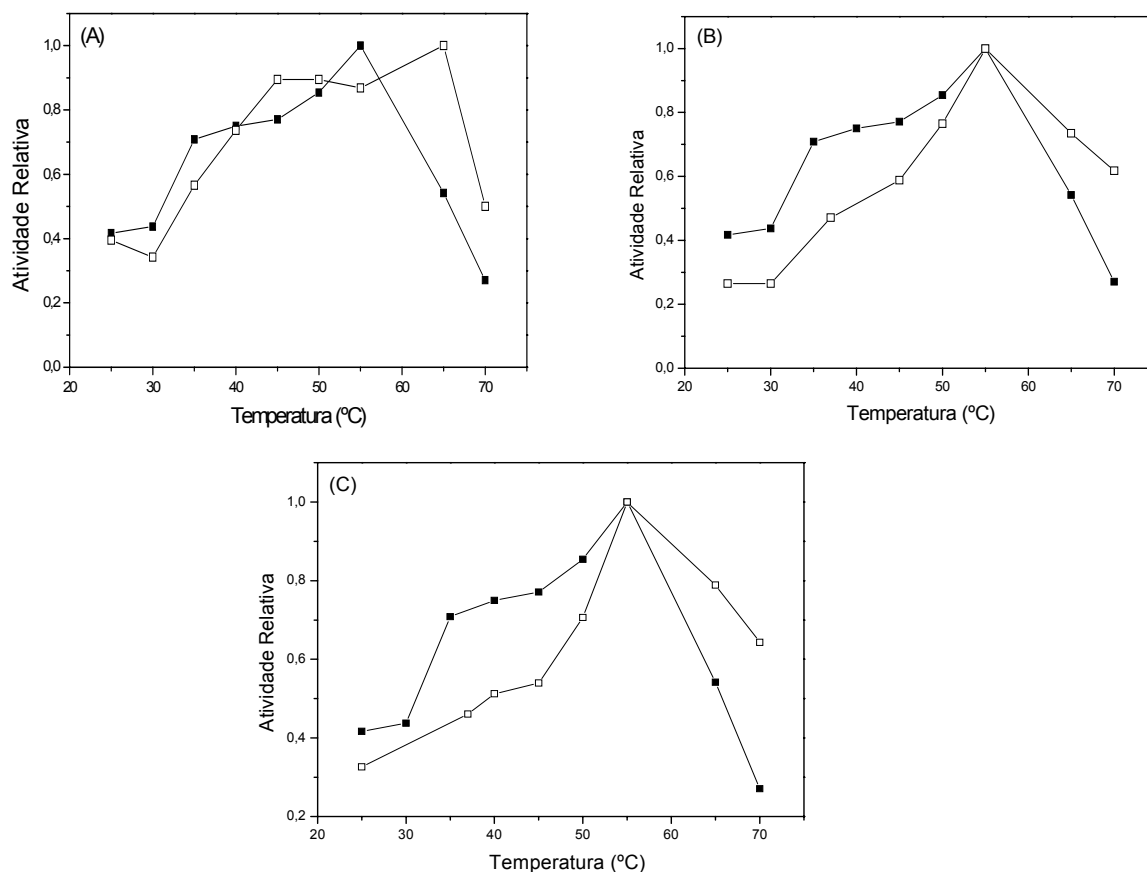
Através da Figura 5.6, nota-se que para todos os derivados obtidos a limitação difusional é bem pronunciada para cargas enzimáticas maiores. Isso pode ser observado através da efetividade em duas temperaturas. Para derivados ativados com epiclorigrina, a proximidade de efetividade entre duas temperaturas foi menor, deve-se talvez ao erro experimental na medição de atividade enzimática que foi de aproximadamente 4,5%.

### **5.1.5 Influência da temperatura na atividade enzimática:**

Figura 5.7 mostra os perfis de temperatura/atividade de CPA solúvel e imobilizada em suportes ativados com glutaraldeído (A), epiclorigrina (B) e epoxilado (C), medido em pH 7,5 com hipuril-L-fenilalanina como substrato. Observa-se que a enzima solúvel apresentou máxima atividade a 55°C, enquanto o derivado de CPA (glutaraldeído) apresentou atividade máxima a 65°C e não somente apresentou atividade maior, mas também a diminuição da atividade foi menor a altas temperaturas. Em temperaturas mais baixas, a enzima livre apresentou maior atividade devido à ausência de problemas difusionais quando comparada aos derivados. Entretanto a 70°C, a enzima livre perdeu 85% de sua atividade e aproximadamente 40% quando imobilizada, demonstrando que o processo de imobilização conferiu uma maior proteção à molécula de proteína.

O aumento na atividade enzimática com incremento da temperatura foi parcialmente compensado pela diminuição da difusão do substrato através dos poros. Além disso, a 65°C

(A) e 55°C (B e C), a resistência interna ao transporte de massa do substrato atingiu o máximo valor envolvendo um decréscimo no coeficiente de difusividade efetivo do substrato. Assim, esse fator foi, provavelmente, mais dominante que o aumento da atividade enzimática nestas temperaturas, impedindo o aumento na velocidade aparente da reação e conseqüentemente não havendo um deslocamento à direita da temperatura (B e C) [22].

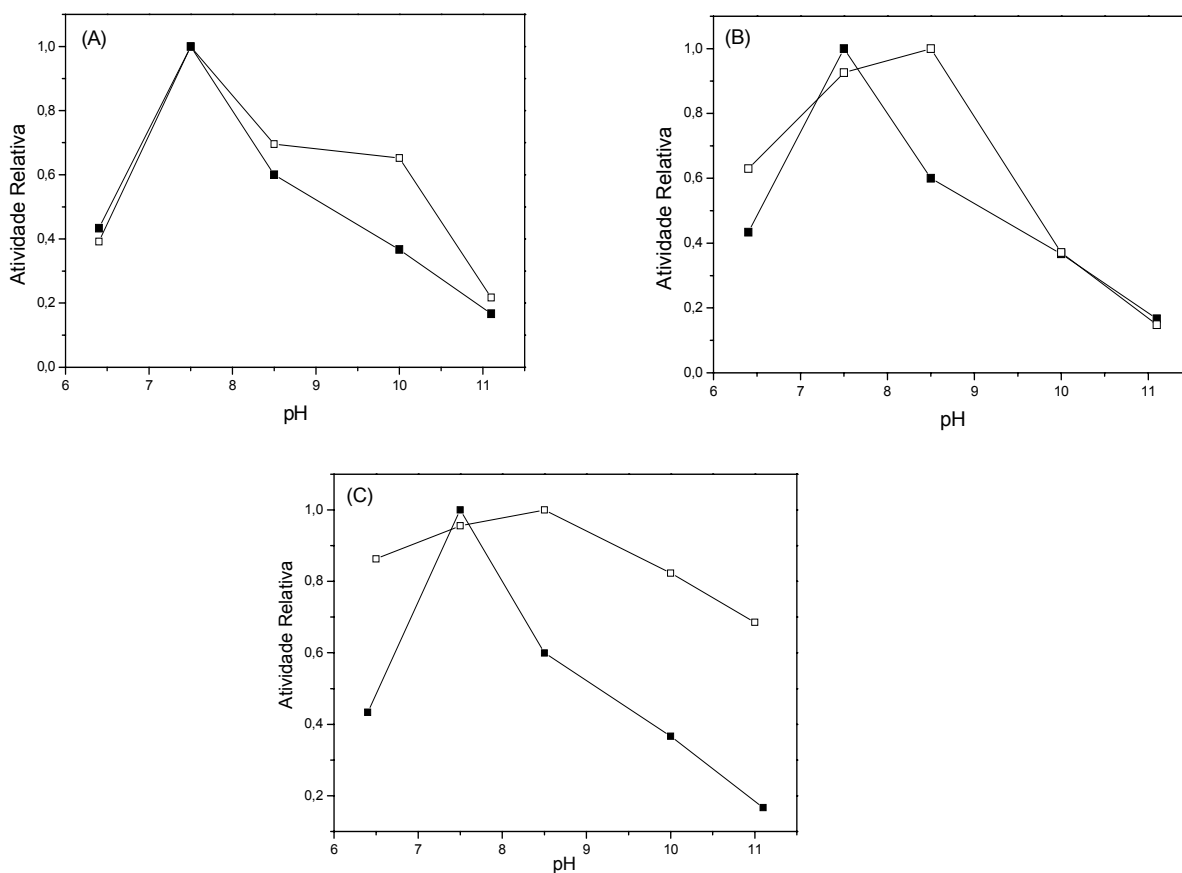


**Figura 5.7** Efeito da temperatura na atividade de (■) solúvel CPA e (□) imobilizada: (A) glutaraldeído, (B) epicloridrina e (C) epoxilado. Experimentos foram realizados em tampão tris/HCl 0,025M Tris/HCl (NaCl 0,5M) a pH 7,5.

### 5.1.6 Influência do pH na atividade enzimática:

A Figura 5.8 apresenta as atividades enzimáticas relativas em função do pH do meio. Pode-se observar que a maior atividade relativa da enzima livre ocorreu próxima do pH 7,5 e para os derivados obtidos com epicloridrina e epoxilado, próximo de pH 8,5. Resultados semelhantes são encontrados na literatura [6,19]. Observa-se um acréscimo no valor do pH para os derivados em suas máximas atividades com exceção daquele obtido com glutaraldeído. Para valores de pH mais ácidos, o suporte epoxilado apresentou-se bem estável após ativação e essa tendência se manteve depois da imobilização da enzima como se pode

ver na Figura (C). Isto acontece devido às modificações conformacionais nas moléculas do biocatalisador devido aos efeitos causados pela imobilização [23,24].

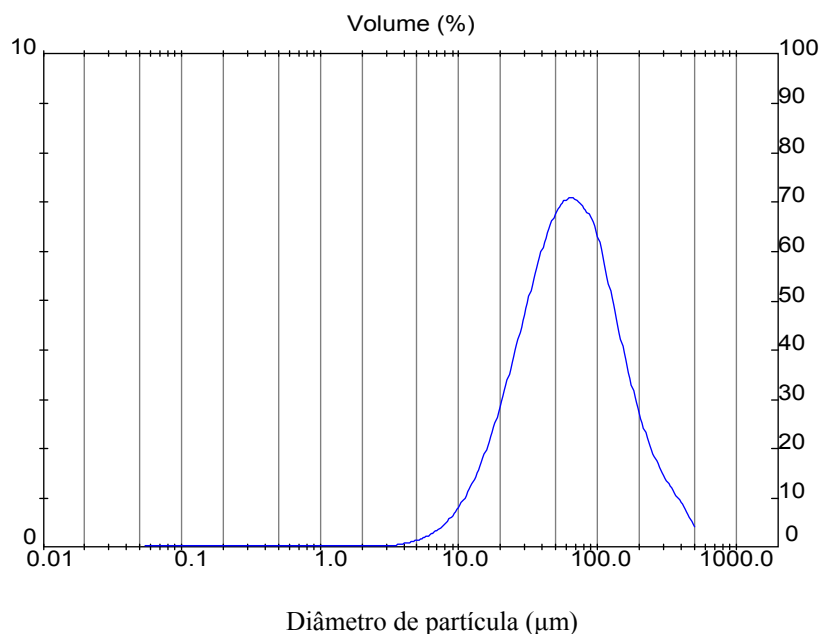


**Figura 5.8** Efeito do pH na atividade de (■) solúvel CPA e (□) imobilizada: (A) glutaraldeído, (B) epícloridrina e (C) epoxilado. Experimentos foram realizados a 25°C.

### 5.1.7 Determinação dos parâmetros cinéticos e de transferência de massa:

Uma caracterização resumida foi realizada das partículas de híbridos de quitosana apresentando um diâmetro médio Sauter de 62  $\mu\text{m}$ , com densidade aparente de 1,007  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , com área superficial de 0,13  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  e porosidade de 0,90. A distribuição de tamanho de partículas pode ser observada na Figura 5.9.

Essa caracterização foi importante, de modo a se obter o raio da partícula, o qual será usado nos cálculos dos parâmetros de transferência de massa.

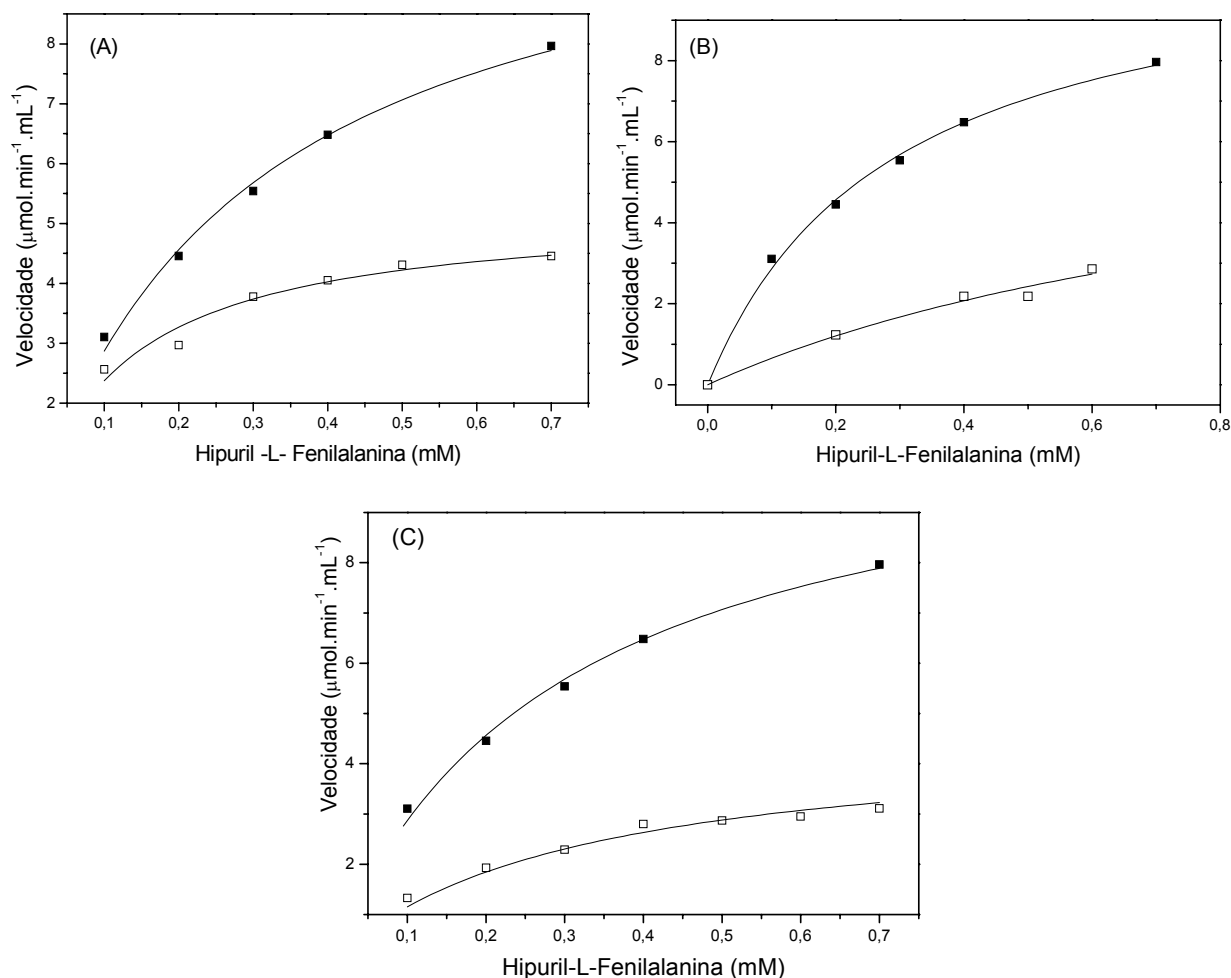


**Figura 5.9** Distribuição do tamanho de partícula para híbridos de quitosana (quitosana-alginato) e (quitosana-carragenana).

O modelo cinético de Michaelis-Menten foi usado para ajustar-se aos pontos experimentais obtidos durante a hidrólise de hipuril-L-fenilalanina em diferentes concentrações, utilizando CPA livre e imobilizada a 37°C. A Figura 5.10 mostra um bom ajuste, permitindo uma satisfatória estimativa dos parâmetros cinéticos intrínsecos e aparentes.

Obtidos os valores de velocidade máxima e constante de Michaelis-Menten ( $V_{\max}$  e  $K_M$ ) intrínsecas e efetividade experimental ( $\eta$ ), foi possível calcular o coeficiente de difusão efetivo ( $D_{eff}$ ) do derivado obtido neste trabalho calculando o módulo de Thiele observado ( $\Phi$ ) através de um ábaco que o correlaciona com a efetividade experimental [20].

Parâmetros aparentes (derivado com alta carga de CPA) tiveram como referência parâmetros intrínsecos obtidos da CPA livre. Vale ressaltar que foram utilizadas as mesmas quantidades de enzima em todas as reações, tanto para enzima livre quanto para imobilizada. Assim, foi assumido que todos os problemas usando enzima imobilizada foram devido a efeitos difusionais.



**Figura 5.10** Curvas de pontos experimentais e cinéticas de acordo com modelo de Michaelis-Menten para CPA livre (■); (A) glutaraldeído 4mg CPA.g<sup>-1</sup>gel, (B) epiclorigidrina 4mg CPA.g<sup>-1</sup>gel e (C) epoxilado 4mg CPA.g<sup>-1</sup>gel (□) a pH 7,5 e 37°C.

A hidrólise foi limitada pela difusão do substrato no interior dos poros e não pela reação enzima-substrato, mostrando a natureza rígida e restrita dos géis preparados. Assim, pode ter havido um sinergismo entre limitação difusional e impedimento estérico. Os valores de difusividade efetiva calculados foram inferiores aos obtidos para L-fenilalanina em água a 25°C  $7,00\cdot 10^{-11} \text{ m}^2\cdot\text{s}^{-1}$  [25] mostrando a dificuldade maior do substrato em difundir nos poros dos géis preparados. Isto já era esperado devido ao efeito de reticulação do glutaraldeído, bem como da epiclorigidrina que como consequência fecha a malha de poros do suporte. Resultados semelhantes foram obtidos com quitosana na adsorção de amoxicilina [26] e na reação de hidrólise da caseína utilizando tripsina imobilizada em quitosana [27].

Observa-se na Tabela 5.5 que os valores de difusividade efetiva observados para os três derivados foram baixos indicando um sistema com alta limitação difusional, o qual pode ser

comprovado pela baixa efetividade e um decréscimo na velocidade máxima quando comparados à enzima livre.

**Tabela 5.5** Determinação dos parâmetros cinéticos e de transferência de massa para diferentes derivados de CPA preparados utilizando hipuril-L-fenilalanina como substrato a pH 7,5 e 37°C.

Parâmetros cinéticos e de transferência de massa	Biocatalisadores			
	CPA solúvel	Quitosana-alginato (glutaraldeído)	Quitosana-carragenana (epicloridrina)	Quitosana-alginato-epoxilado
Efetividade	-	0,29	0,40	0,25
$V_{\max}$ ( $U_{H-PHE} \cdot mg^{-1}$ proteína)	7588	2183	3095	1921
$K_m$ (mM)	0,28	0,12	1,03	0,30
$\Phi$	-	2,1	1,5	1,6
$D_{eff}$ ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ). $10^{12}$	-	5,41	5,59	5,10

## 5.2 Conclusões parciais

Algumas estratégias para imobilização de CPA usando quitosana-alginato ativado com glutaraldeído foram estudadas usando agentes protetores durante o processo, bem como, a etapa de redução com  $NaBH_4$ . Quanto à atividade recuperada, um decréscimo foi notado após a redução usando L-tirosina, zinco ou ambos. No derivado preparado com cálcio durante imobilização e não reduzido quando comparado ao reduzido usando zinco foi observado uma diminuição de 30%.

A presença de N-acetil-L-tirosina e cálcio na etapa de imobilização com L-tirosina e zinco na redução, apresentaram efeito positivo quanto à atividade recuperada.

Quanto ao fator de estabilidade dos derivados comparados à CPA livre, o zinco, mesmo não evitando a perda de atividade na redução, melhorou a estabilidade da enzima em todos os ensaios realizados. Assim, as melhores condições para esta ativação foram: imobilização na presença de cálcio e N-acetil-L-tirosina e redução com borohidreto na presença de L-tirosina e zinco.

Algumas estratégias para imobilização de CPA usando quitosana-carragenana ativado com epicloridrina foram analisadas. Os resultados mostraram que o melhor derivado foi sem pré-tratamento com glutaraldeído e redução por borohidreto com incubação em cálcio e

ausência de N-acetil-L-tirosina durante a etapa de imobilização com rendimento de 81% e atividade recuperada de 56% sendo 8,8 vezes mais estável que a enzima livre a 55°C.

Os baixos tempos de meia-vida para os derivados de CPA em quitosana-alginato ativado com glutaraldeído e quitosana-carragenana ativado com epiclorigrina podem ser explicados pelo curto tempo de imobilização (3 horas) e o número de ligações formadas entre enzima-suporte não serem muitas, bem como, a limitação do uso de quitosana nestas condições de imobilização de CPA devido à presença de grupos amino que adsorverão o zinco localizado no centro catalítico da enzima, inativando-a.

Derivados epoxilados na presença de N-acetil-L-tirosina durante incubação, apresentaram bons resultados nos parâmetros de imobilização. O tempo ideal de imobilização foi 48h com rendimento de imobilização de 100%, atividade recuperada 57% sendo 20 vezes mais estável que a enzima livre a 55°C. O protocolo de imobilização mostrou-se simples e barato sendo promissor para futuros avanços na imobilização de CPA em híbridos de quitosana, pois apresentou melhores resultados quando comparados a PGA e quimotripsina imobilizadas em Eupergit C<sup>®</sup> nas mesmas condições de imobilização deste trabalho.

Quanto aos testes de dessorção dos derivados preparados com ativação por glutaraldeído, epiclorigrina e epoxilado, não apresentaram liberação de proteína quando incubados a altas forças iônicas, mostrando a natureza covalente das interações enzima-suporte.

Os derivados preparados apresentaram problemas difusionais na hidrólise do hipuril-L-fenilalanina sendo os coeficientes de difusividade efetiva de  $5,41 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (glutaraldeído);  $5,59 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (epiclorigrina) e  $5,10 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  (epoxilado).



### 5.3 Referências bibliográficas

- [1] Guibal, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Separation and Purification Technology*, v.38, p.43–74. **2004**.
- [2] Bhatia, S. C.; Ravi, N. A Mössbauer study of the interaction of chitosan and D-glucosamine with iron and its relevance to other metalloenzymes. *Biomacromolecules*, v.4, p.723-727. **2003**.
- [3] Becker, T.; Schlaak, M.; Strasdeit, H. Adsorption of nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) by new chitosan derivatives. *Reactive & Functional Polymers*, v.44, p.289–298. **2000**.
- [4] Muzarelli, R. R. *Natural chelating polymers*. Oxford: Pergamon Press. **1973**.
- [5] Tardioli, P. W. *Hidrólise controlada de proteínas de soro de queijo usando carboxipeptidase A e Alcalase<sup>®</sup> imobilizadas multipontualmente em agarose*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2003**.
- [6] Tardioli, P. W.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. Design of new immobilized stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, v.19, p.565-574. **2003**.
- [7] McDowell, R. H. *Properties of alginates*. London: Alginate Industries Ltd. **1977**
- [8] Gray, C. J.; Dowsett, J. Retention of insulin in alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, v.31, p.607-612. **1987**.
- [9] López-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. *Journal of Biotechnology*, v.116, p.1-10. **2005**.
- [10] Medin, A. S. (Ph.D Thesis). Uppsala University, Uppsala, Sweden, **1995**.
- [11] Pedroche, J.; Yust, M. D. M.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J.; Guisán, J. M.; Millan, F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.1160-1166. **2007**.

- [12] Adriano, W. S.;Filho, E. H. C.;Silva, J. A.;Gonçalves, L. R. B. Optimization of penicillin g acylase multipoint immobilization onto glutaraldehyde–chitosan beads. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v.41, p.201–207. **2005**.
- [13] Manrich, A. *Preparação de diferentes derivados de tripsina em quitosana e comparação com outros suportes e protocolos de ativação*. (Mestrado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2004**.
- [14] Mateo, C.;Torres, R.;Fernández-Lorente, G.;Ortiz, C.;Fuentes, M.;Hidalgo, A.;López-Gallego, F.;Abian, O.;Palomo, J. M.;Betancor, L.;Pessela, B. C. C.;Guisán, J. M.;Fernández-Lafuente, R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules*, v.4, p.772-777. **2003**.
- [15] Grazú, V.;Abian, O.;Mateo, C.;Batista-Viera, F.;Fernández-Lafuente, R.;Guisán, J. M. Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromolecules*, v.4, p.1495-1501. **2003**.
- [16] Adriano, W. S.;Filho, E. H. C.;Silva, J. A.;Gonçalves, L. R. B. Stabilization of penicillin g acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.22, p.529-538. **2005**.
- [17] Vieira, R. S. *Remoção e recuperação de Hg (II) utilizando quitosana natural e reticulada*. (Mestrado). Engenharia Química, Unicamp, Campinas, **2004**.
- [18] Guisán, J. M. *Immobilization of enzymes and cells*. New Jersey: Humana Press Inc. **2006**.
- [19] Vértési, A.;Simona, L. M.;Kiss, I.;Szajáni, B. Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enzyme and Microbial Technology*, v.25, p.73–79. **1999**.
- [20] Pitcher, W. H. *Design and operation of immobilized enzyme reactors*. New York: Academic Press. **1975**. 151-199 p.
- [21] Blanch, H. W.;Clark, D. S. *Biochemical engineering*. USA: Marcel Dekker Inc. **1997**.
- [22] Çiçek, H.;Tuncel, A. Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin in thermally reversible isopropylacrylamide-hydroethylmethacrylate copolymer gel. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v.36, p.543-552. **1998**.

- [23] Vitolo, M. *Biotecnologia industrial-processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, v.3. **2001**
- [24] Gama, M.;Taipa, M. A. *Engenharia enzimática*. Lisboa: Lidel. **2003**.
- [25] Paduano, L. Transport and thermodynamics properties of (D,L) norleucine-water and (L) phenylalanine-water, at 25°C. *Journal of Molecular Liquids*, v.47, p.193-202. **1990**.
- [26] Adriano, W. S.;Veredas, V.;Santana, C. C.;Gonçalves, L. R. B. Adsorption of amoxicillin on chitosan beads: Kinetics, equilibrium and validation of finite bath models. *Biochemical Engineering Journal*, v.27, p.132–137. **2005**.
- [27] Mendonça, D. B.;Adriano, W. S.;Giordano, R. L. C. *Casein hydrolysis using trypsin soluble and immobilized into glutaraldehyde - chitosan: Determination of kinetic and mass transport parameters*. XXII Chemical Engineering Interamerican Congress. Buenos Aires-Argentina, **2006**.

# *Capítulo 6*

*Resultados: Preparação e  
Caracterização de Derivados  
de Celulase*

## 6 Resultados: Preparação e caracterização de derivados de celulase

Até então, trabalhou-se nesta tese com enzimas que apresentam pH ótimo de atividade na região alcalina (proteases) e, portanto, estáveis a pH 10,0. Essa propriedade facilita a imobilização multipontual em diversos suportes com diferentes protocolos de ativação em pH 10,05, pH esse em que haverá vários grupos amino dos resíduos de lisina desprotonados e disponíveis para reagir com o suporte.

Entretanto, buscou-se imobilizar e estabilizar a celulase, um consorcio enzimático complexo, composto por quatro classes de enzima e que apresentam seus pHs ótimos de atividade na região ácida. Assim, torna-se mais complicado realizar uma imobilização multipontual “padrão”, isto é, em pH 10,05, pois a enzima não suporta essa condição perdendo sua atividade catalítica rapidamente.

Pretende-se neste capítulo discutir várias estratégias de produção de derivados estabilizados de celulase por imobilização covalente da enzima em quitosana e quitosana-alginato utilizando glutaraldeído, glicidol e epiclorigrina (epoxilado) como agentes ativantes.

O único híbrido de quitosana utilizado na imobilização de celulase foi quitosana 2,5%-alginato 2,5% por ter sido o suporte que apresentou os melhores resultados na ativação com glutaraldeído na imobilização de quimotripsina e apresentar boas características físico-químicas para se trabalhar em pH ácido [1,2]. Quitosana 1% m/v somente foi utilizada como suporte na encapsulação da celulase seguida de reticulação com glutaraldeído.

A seguir, são apresentados e discutidos os resultados obtidos e organizados dentro dos seguintes tópicos:

- Caracterização da preparação enzimática utilizada;
- Preparação dos suportes de híbridos de quitosana e estudo dos parâmetros de imobilização;
- Influência da adição de alginato de sódio e de diferentes condições de imobilização de celulase em quitosana;
- Influência dos métodos de ativação utilizando glutaraldeído, glicidol e epiclorigrina na imobilização da celulase em quitosana e híbridos;

- Desempenho do melhor derivado obtido na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para verificar a viabilidade da utilização de celulase imobilizada no processo em bateladas seqüenciais.

## 6.1 Preparação e caracterização de derivados de celulase

### 6.1.1 Caracterização da Celluclast<sup>®</sup> (celulase) livre:

A Celluclast<sup>®</sup> (celulase) é uma preparação enzimática que além de conter as enzimas principais: endo e exocelulases e  $\beta$ -glicosidase, contem uma série de outras pequenas proteínas que funcionam como impurezas no processo de imobilização. Além disso, a solução enzimática comercial apresenta agentes estabilizantes (cloreto de sódio e sorbitol) e conservantes (sorbato de potássio) de acordo com a Novozymes, protegendo a enzima contra autólise ou inativação. Estes compostos, mesmo não possuindo grupos aminos livres que poderiam formar ligações covalentes com o suporte, podem se adsorver a ele, bloqueando centros ativos possíveis de ligação com a enzima.

As endocelulases hidrolisam majoritariamente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo novas cadeias terminais, logo causam uma diminuição considerável no grau de polimerização da celulose. As exocelulases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose e as  $\beta$  - glicosidades completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glicose. As atividades enzimáticas em função de diferentes substratos são apresentadas na Tabela 6.1.

**Tabela 6.1** Valores das atividades enzimática e específica do consórcio enzimático (Celluclast<sup>®</sup>) contendo  $41,4 \pm 0,5$  mg de proteína. mL<sup>-1</sup> de extrato frente a diferentes substratos.

Celluclast <sup>®</sup>		
Substrato	Atividade.mL <sup>-1</sup> de extrato	Atividade específica .mg <sup>-1</sup> proteína
<b>Papel de filtro</b>	$110,4 \pm 0,5$ U <sub>FP</sub>	2,7 U <sub>FP</sub>
<b>Avicel</b>	$30,4 \pm 0,8$ U <sub>Avicel</sub>	0,74 U <sub>Avicel</sub>
<b>CMC</b>	$21,0 \pm 0,2$ U <sub>CMC</sub>	0,51 U <sub>CMC</sub>
<b>Celobiose</b>	$5,0 \pm 0,3$ U <sub>Celobiose</sub>	0,12 U <sub>Celobiose</sub>

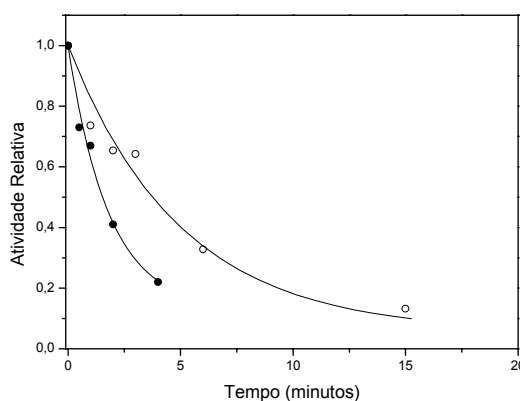
Pode-se observar que a atividade do complexo quando se utiliza celobiose, substrato específico de  $\beta$ -glicosidase ( $5,0$ U<sub>Celobiose</sub>) é muito baixa. Portanto, uma das principais limitações deste extrato enzimático é a baixa quantidade de  $\beta$ -glicosidase ( $5,0$ U<sub>Celobiose</sub>). Esta

enzima é importante na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, pois ela é responsável pela etapa final da hidrólise, hidrolisando celobiose a glicose. Celobiose é um inibidor da exocelulase, responsável pela remoção de celobiose das extremidades das cadeias de celulose. Assim, baixas quantidades de  $\beta$ -glicosidase conduzirão a baixas conversões de celulose em glicose.

A estabilidade térmica do extrato foi a seguir avaliada. A presença dos estabilizantes e conservantes no extrato enzimático não permite a correta avaliação da estabilidade térmica da enzima imobilizada, pois estes não estarão presentes ao se medir a atividade do derivado, prejudicando a interpretação dos resultados. Portanto seria necessária a eliminação destes compostos por diálise para se obter a real estabilização dos derivados obtidos ao longo do trabalho.

A diálise da preparação enzimática comercial teve assim por objetivo eliminar impurezas e preservantes, a fim de se poder comparar a estabilidade térmica da enzima imobilizada (livre de conservantes e estabilizantes) com a enzima solúvel dialisada.

O processo de diálise foi realizado em membrana celulose regenerada com tamanho de corte de 3,000 Daltons (Millipore<sup>®</sup>, Ireland) usando como diluente água Milli-Q e centrifugado por 10 minutos a  $10.000 \times g$ . Soluções enzimáticas dialisadas e não-dialisadas foram incubadas em tampão citrato 0,05M, pH 4,8 a 65°C e as atividades residuais foram medidas utilizando papel de filtro como substrato. O valor do parâmetro  $k$  do modelo de inativação (equação 3.5) ajustado aos dados experimentais (Figura 6.1) foi de  $0,557 \text{ min}^{-1}$  para a enzima dialisada e  $0,200 \text{ min}^{-1}$  para não-dialisada. As meias-vidas, calculadas pela equação 3.8 para celulase dialisada e não-dialisada foram de 1,51 e 3,75 minutos, respectivamente, mostrando que a enzima dialisada era 2,48 vezes mais estável que o extrato comercial não dialisado.

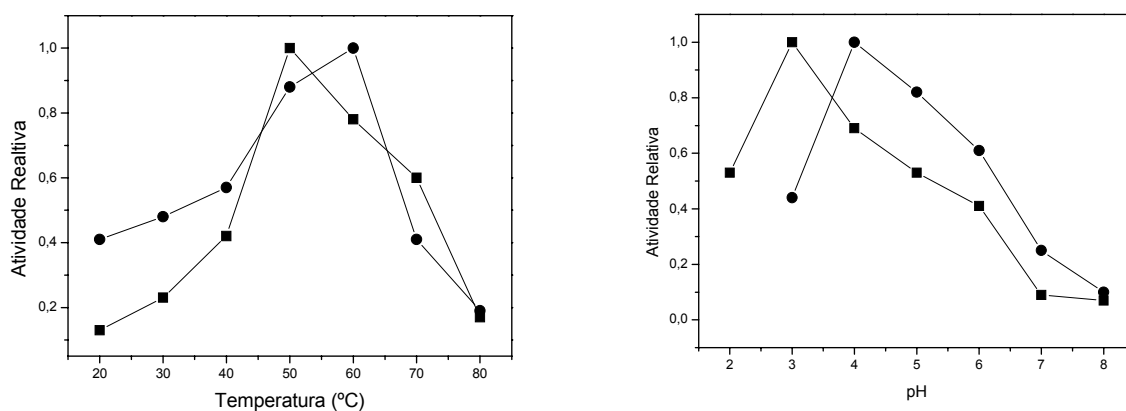


**Figura 6.1** Inativação térmica de Celluclast<sup>®</sup> solúvel, (●) dialisada e (○) não-dialisada, a 65°C e pH 4,8 (tampão citrato 0,05M). As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

Estes resultados estão coerentes com Tardioli [3] que dialisou a Alcalase<sup>®</sup> em membranas de celulose para retirada de impurezas e adjuvantes, sendo a enzima comercial 4,3 vezes mais estável que a dialisada. A preparação enzimática apresentou uma temperatura de atividade máxima de 50°C e pH 4,5 usando como substrato papel de filtro (Figura 6.2).

Pode-se observar que para a Celluclast<sup>®</sup>, a maior atividade relativa ocorreu próxima do pH 4,5. Resultados semelhantes são encontrados na literatura, Villalonga e colaboradores [4] encontraram a máxima atividade em pH 3,0. Gu e colaboradores [5] obtiveram o maior valor da atividade relativa em pH próximo a 4,5.

Quanto à temperatura, observa-se pelos valores de atividade relativa que a enzima imobilizada atua bem em temperatura de aproximadamente 60°C. Entretanto a 70°C, a enzima perdeu boa parte da sua capacidade hidrolítica, demonstrando que temperaturas acima de 60°C não são recomendáveis para a atuação da celulase.



**Figura 6.2** Influência da temperatura e pH na atividade hidrolítica da celulase livre (Celluclast<sup>®</sup>) (●) e imobilizada (■).

### 6.1.2 Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com glutaraldeído e/ou glicidol:

Prepararam-se derivados utilizando quitosana-alginato ativado com glutaraldeído (83  $\mu\text{mol}$  de aldeído. $\text{g}^{-1}$ gel) ou pré-ativado com glutaraldeído e depois com glicidol sendo oxidado com periodato de sódio (70  $\mu\text{mol}$  de aldeído. $\text{g}^{-1}$ gel). Os resultados são apresentados na Tabela 6.2.



**Tabela 6.2** Parâmetros de imobilização de celulase em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 a 25°C em suporte ativado com glutaraldeído 5% (v/v) ou pré-ativado com glutaraldeído e depois com glicidol com carga oferecida de 10 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel (27U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup>gel) por 24h, sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 65°C.

Biocatalisador	Ativação	R <sub>I</sub> (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> U <sub>FP</sub> .g <sup>-1</sup> gel	t <sub>1/2</sub> (minutos)	FE
enzima livre		-	-	-	1,51	1
quit 2,5%-algin2,5%	GLU	56	39	5,9	8,60	5,6
quit 2,5%-algin2,5%	GLU/GLI	58	20	3,1	30,80	20,1

A quitosana interage formando pontes de hidrogênio com alginato. Essa interação permite um melhor entrecruzamento entre os polímeros e formando uma malha interna que facilita a imobilização e permite uma melhor congruência geométrica entre enzima-suporte melhorando os parâmetros de imobilização. O glutaraldeído também permite a imobilização de proteínas mesmo em pH 7,0, isto é, algum resíduo da molécula de enzima pode estar exposto com significante reatividade [6]. Quanto ao rendimento de imobilização, ambas as ativações apresentaram, praticamente, o mesmo comportamento. Ambos continham quantidades semelhantes de grupos aldeídos. O suporte ativado com glicidol apresentou menor formação de aldeídos, pois grupos remanescentes da pré-ativação com dialdeído sofreram modificações após tratamento com glicidol e periodato.

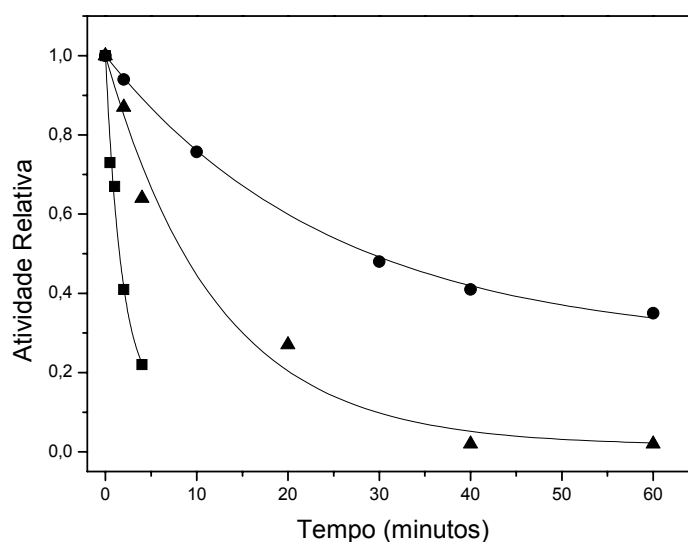
Outro fator que pode ter contribuído para não se atingir 100% de rendimento de imobilização é a quantidade de proteínas menores (impurezas) que competiram com as moléculas maiores e também uma provável adsorção de adjuvantes presentes na preparação enzimática [3].

Em relação à atividade recuperada, eram esperados baixos valores de atividade aparente, pois a reação é sólido-sólido, tornando a difusão do substrato muito difícil ao interior dos poros do suporte. Esta limitação aconteceu em todos os derivados preparados ao longo deste capítulo. Agitação vigorosa foi empregada de modo a facilitar a reação substrato-catalisador.

A interação entre os polímeros permitiu que houvesse mais ligações e mais poros que serviram como uma malha que favoreceu a estabilização da enzima, bem como, tornou o suporte mais resistente a altas temperaturas e pH [1]. Nota-se que a estabilidade do suporte ativado com glicidol foi 3,6 vezes maior quando comparado ao suporte ativado somente com glutaraldeído. A imobilização com ativação através de glutaraldeído acontece de maneira

rápida e desorganizada, assim, a configuração enzima-suporte não é favorecida de modo a se atingir uma boa estabilidade. Por outro lado, na ativação com glicidol, os aldeídos gerados são menos reativos e a reação acontece de maneira mais lenta, havendo uma interação enzima-suporte mais organizada e isso é evidente quando se analisa a estabilização da enzima alcançada.

Mesmo sendo a imobilização realizada em pH 7,0 algumas interações covalentes formaram-se, pois não houve dessorção de proteína quando estes derivados foram incubados em alta força iônica (NaCl 0,5M). A estabilização alcançada até aqui para celulase é muito relevante considerando a complexidade da enzima e das condições limitadas de imobilização que esta molécula suporta. A Figura 6.3 mostra o ajuste do modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos durante inativação térmica.



**Figura 6.3** Inativação térmica de quitosana 2,5%-alginate 2,5% com diferentes ativações. Carga oferecida de 10mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) ativados com glutaraldeído e (●) ativados com glutaraldeído e glicidol. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

Como já descrito, o derivado quitosana 2,5%-alginate 2,5% ativado com glutaraldeído e glicidol foi o melhor obtido com uma boa estabilização. Então, decidiu-se utilizá-lo para ensaios de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar em comparação com a enzima livre, bem como, bateladas seqüenciais utilizando o mesmo catalisador para analisar sua reusabilidade no processo. Estes resultados serão discutidos mais detalhadamente posteriormente. Em paralelo, seriam realizadas a preparação e caracterização de novos derivados buscando maior estabilização da celulase.

### **6.1.3 Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com glicidol e a influência do ditioneitol (DTT) na etapa de imobilização:**

Resolveu-se então imobilizar a celulase em suportes ativados somente com glicidol, sem a pré-ativação com glutaraldeído. Essa estratégia dividiu-se em duas. A primeira na ausência de DTT e a segunda na presença do mesmo. A imobilização ocorreu em pH 7,0 e nessa condição, a formação de ligações covalentes multipontuais não é favorecida, pois os grupos amino da lisina estarão protonados em pH 7,0 [7].

A imobilização enzimática através da reação entre agarose-glioxil (aldeídos) do suporte com grupos amino da enzima necessita de pelo menos duas ligações simultâneas as quais agem de modo sinérgico [7]. Portanto, imobilização de enzimas em agarose-glioxil requer uso de pH acima de 10, condição essa onde os resíduos lisinas das enzimas estarão desprotonados e disponíveis para reagir com grupos aldeído do suporte e assim fazer a ligação pelo menos bipontual. Contudo, em quitosana-alginato-glioxil, foi possível a imobilização de celulases a pH 7.0. Possivelmente, a presença de grupos amino carregados positivamente no suporte gerava uma atração iônica de moléculas da enzima através de resíduos ácidos carregados negativamente nesse pH. Dessa forma a enzima se mantinha presa ao suporte até que a redução com borohidreto transformava as bases de Schiff reversíveis em ligações covalentes estáveis. O caráter covalente da ligação enzima-suporte foi testado através de lavagem do derivado com solução de alta força iônica (tampão fosfato 0,2M, pH 7,0), não se observando qualquer atividade enzimática no sobrenadante da água de lavagem. Contudo, durante a medida de atividade a enzima imobilizada está novamente sob força iônica baixa e a atração iônica entre enzima e suporte volta a se estabelecer, aumentando a estabilidade térmica do derivado.

Esta imobilização promoveu um aumento de estabilidade quando comparado ao pré-ativado com glutaraldeído (20,1). Ao se utilizar o glicidol, houve um processo de formação de interações enzima-suporte mais lento e ordenado de modo a estabilizar a enzima [8], além de um melhor alinhamento entre enzima-suporte e um braço espaçador enzima suporte também favorável à estabilização [9]. Com a presença de glutaraldeído, essa reação se dá de maneira rápida e desorganizada (Tabela 6.2).

O efeito do glutaraldeído pode ser observado ao comparar os rendimentos de imobilização, pois houve um decréscimo de 14% sem a pré-ativação com glutaraldeído.

A utilização do DTT (agente redutor) durante a imobilização de penicilina G acilase em glioxil-agarose em pH 7,0 e depois passando a 10,05 surgiu no grupo do Dr. Jose M. Guisán

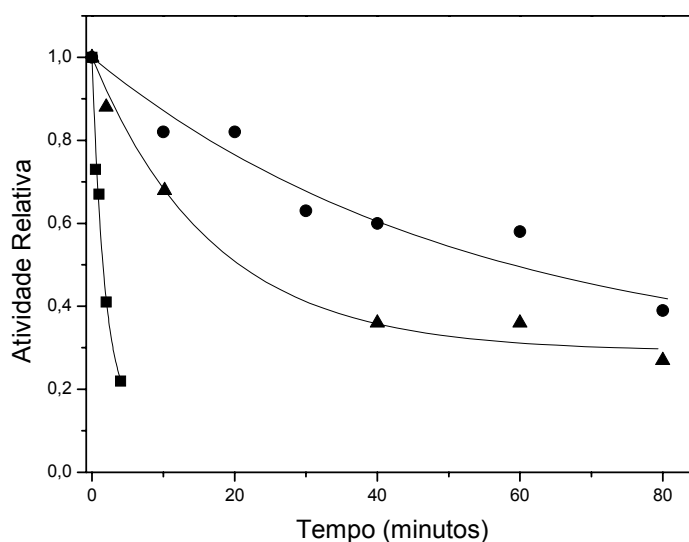
(ICP-Madri). O mecanismo pelo qual o DTT funciona ainda não está esclarecido, entretanto, aumentou significativamente a estabilidade da penicilina G acilase. Assim, tentou-se através de ensaios preliminares, verificar a influência do DTT no sistema de imobilização de celulase. Uma das principais limitações para seguir a metodologia foi o aumento do pH de 7,0 a 10,05, pois a enzima não resistiu mesmo com uso de inibidores (celobiose e glicose), curtos tempos de contato (30 minutos) e baixas temperaturas (4°C). Assim, somente foi possível estudar o uso do DTT a pH 7,0 (Tabela 6.3). Os resultados mostraram que se atingiu um fator de estabilidade de 13,5. Uma vez que ainda não é compreendido o efeito estabilizante de DTT na imobilização de PGA, torna-se difícil explicar por que não funcionou para as celulasas.

O DTT também promoveu uma diminuição do rendimento e da atividade aparente. Este composto deve competir com os sítios de imobilização com a enzima e, possivelmente, sua natureza redutora distorceu o centro catalítico da enzima, havendo decréscimo da atividade aparente do derivado. Fenômeno semelhante ao ocorrido com a CPA durante a etapa de redução com borohidreto de sódio.

**Tabela 6.3** Parâmetros de imobilização de celulase em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 a 25°C em suporte ativado com glicidol na presença e ausência de DTT com carga oferecida de 10 mg de proteína.g<sup>-1</sup>gel (27U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup>gel) por 24h, sendo (R<sub>I</sub>) rendimento de imobilização, (A<sub>R</sub>) atividade recuperada, (A<sub>ap</sub>) atividade aparente, (t<sub>1/2</sub>) tempo de meia-vida e (FE) fator de estabilização a 65°C.

Biocatalisador	DTT	R <sub>I</sub> (%)	A <sub>R</sub> (%)	A <sub>ap</sub> U <sub>FP</sub> .g <sup>-1</sup> gel	t <sub>1/2</sub> (minutos)	FE
enzima livre		-	-	-	1,51	1
quit 2,5%-algin2,5%	ausente	42	13	1,5	59,00	38,5
quit 2,5%-algin2,5%	presente	33	9	0,8	20,65	13,5

A Figura 6.4 mostra os ajustes do modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos durante inativação térmica da enzima e derivados a 65°C.



**Figura 6.4** Inativação térmica de celulase livre e immobilizada em quitosana 2,5%-alginato 2,5% ativados com glicidol. Carga oferecida de 10mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) presença de DTT e (●) ausência de DTT. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

#### 6.1.4 Imobilização covalente de celulase em suporte ativado com epícloridrina (epoxilado):

Uma nova estratégia foi estudada. A imobilização através de epóxidos gerados no suporte. O gel obtido apresentou um caráter altamente hidrofóbico com 230  $\mu$ moles de epóxido.g<sup>-1</sup>gel e foi preparado de acordo com metodologia desenvolvida por Fangkangwanwong e colaboradores [10] com pequenas modificações.

Em geral, a imobilização de enzimas em suportes epóxido deve apresentar dois tipos de grupos funcionais (i) para promover a adsorção física de proteínas e (ii) grupos capazes de imobilizar covalentemente a enzima (grupos epóxido). O uso de suportes heterofuncionais se torna importante para a imobilização/estabilização de enzimas [11,12].

A imobilização foi dividida em duas partes: (i) adsorção física da celulase em tampão fosfato de sódio 0,02M e pH 7,0 por 5h (ii) imobilização covalente elevando o pH de imobilização para 8,5 por 19h. A segunda etapa foi mais longa, pois a formação de ligações covalentes neste suporte precisa de tempos longos de contato enzima-suporte. O pH 8,5 não prejudicou a enzima, pois esta já estava adsorvida no suporte.

Observa-se na Tabela 6.4 que houve 88% de rendimento de imobilização, 20% de atividade recuperada e a enzima imobilizada foi 5,6 vezes mais estável que a enzima livre. A

atividade recuperada deste derivado foi relativamente alta. Isto se deve ao fato da celulase estar localizada na superfície do suporte. Assim, o substrato teve seu acesso à enzima facilitado. Por outro lado, a estabilidade não foi alta quando comparada aos demais derivados obtidos neste capítulo.

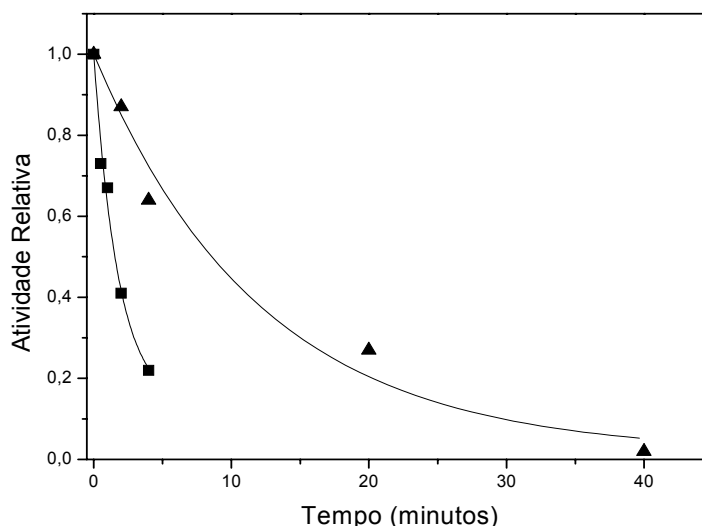
Quanto à estabilização, a imobilização é muito rápida (adsorção), contudo a segunda etapa é mais lenta. Deste modo, a enzima se liga ao suporte em uma conformação não muito favorável a estabilizá-la, necessitando tempos mais longos de incubação. Neste trabalho, apenas 24h de incubação foi analisado. Outro fator importante são os braços espaçadores curtos deste suporte epoxilado que promovem uma rigidificação da estrutura da celulase, diminuindo sua estabilidade.

Fato parecido aconteceu na sessão 6.1.2 no suporte ativado com glutaraldeído. Garcia III e colaboradores [13] verificaram o mesmo efeito ao imobilizar celulase em óxido de ferro (III) e melhoraram os parâmetros de imobilização através de silanização do óxido com inserção de um ligante com alta massa molecular.

**Tabela 6.4** Parâmetros de imobilização de celulase em quitosana 2,5%-alginate 2,5%-epoxilado. Carga enzimática oferecida de 10mg de proteína.g<sup>-1</sup> de gel (27 U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> de gel) sendo rendimento de imobilização (R<sub>I</sub>), atividade recuperada (A<sub>R</sub>), atividade aparente (A<sub>ap</sub>), tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>) e fator de estabilidade (FE) a 65°C.

<b>Biocatalisador</b>	<b>R<sub>I</sub> (%)</b>	<b>A<sub>R</sub> (%)</b>	<b>A<sub>ap</sub> U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup>gel</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (minutos)</b>	<b>FE</b>
enzima livre	-	-	-	1,51	1
quit 2,5%-algin2,5%	88	20	2,4	8,58	5,6

A Figura 6.5 mostra o ajuste de Sadana-Henley aos pontos experimentais. Observa-se um decréscimo de atividade nos primeiros minutos de incubação, dando indício que a maior parte da celulase imobilizada estava apenas adsorvida precisando, talvez, maior tempo de incubação para formar mais interações covalentes e lograr uma melhor estabilização.



**Figura 6.5** Inativação térmica de celulase livre e imobilizada em quitosana 2,5%-alginato 2,5% ativados com epícloridrina (epoxilado). Carga oferecida de 10mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) imobilizada. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.

### 6.1.5 Encapsulação de celulase seguida de reticulação com glutaraldeído:

A última estratégia analisada neste trabalho foi a imobilização da celulase por encapsulação seguida de reticulação com glutaraldeído. Esta estratégia foi baseada na metodologia de Martino e colaboradores [14] que imobilizaram  $\beta$ -glicosidase em quitosana por adsorção seguida de reticulação com glutaraldeído. Por se tratar de uma enzima pertencente ao consórcio enzimático comercial, resolveu-se fazer um teste utilizando a celulase.

Os resultados são apresentados na Tabela 6.5. Observa-se uma relevante estabilização para uma metodologia tão simples e barata quando comparada às demais analisadas neste capítulo. A imobilização pode ser dividida em duas etapas. A primeira consiste em interações eletrostáticas entre  $NH_3^+$  da quitosana e  $COO^-$  da enzima mais ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals em pH 4,5 (enzima em solução de quitosana 1% m/v em ácido acético 1% v/v) [15] com encapsulação da enzima na coagulação da quitosana em tampão tris/HCl 0,1M pH 8,0.

Já a segunda, consiste nas interações descritas acima e ligações entre glutaraldeído e a celulase (bases de Schiff) durante a reticulação formando uma rede porosa de gel que impede a liberação da enzima já imobilizada. Possivelmente, muitas das interações eletrostáticas

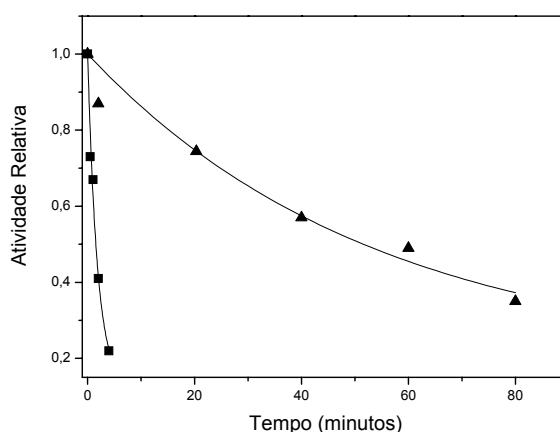
enzima-suporte são substituídas por outras ligações covalentes [14]. Esta seria uma possível explicação da estabilidade deste derivado (33,7) em relação à enzima livre.

Quanto ao rendimento de imobilização, pode ser melhorado aumentando-se a concentração de quitosana e glutaraldeído, sendo necessário uma otimização deste processo de modo a imobilizar a maior quantidade de proteína possível sem prejudicar o processo de estabilização da enzima. Entretanto, estes resultados conseguidos são animadores por se tratar de uma metodologia simples e não onerosa.

**Tabela 6.5** Parâmetros de imobilização de celulase em quitosana 1% m/v por encapsulação seguida de reticulação com glutaraldeído. Carga oferecida 40mg de proteína (108U<sub>FP</sub>) sendo rendimento de imobilização ( $R_I$ ), quantidade de proteína imobilizada ( $P_I$ ), atividade recuperada ( $A_R$ ), atividade aparente ( $A_{ap}$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e fator de estabilidade (FE) a 65°C (massa de gel obtida de 2,0g).

Biocatalisador	$R_I$ (%)	$P_I$ mg.g <sup>-1</sup> gel	$A_R$ (%)	$A_{ap}$ U <sub>FP</sub> .g <sup>-1</sup> gel	$t_{1/2}$ (minutos)	FE
enzima livre	-	-	-	-	1,51	1
quit 1%	75	14,5	5,4	2,1	51,56	33,7

A Figura 6.6 mostra o ajuste do modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos durante inativação térmica da enzima livre e derivados a 65°C.



**Figura 6.6** Inativação térmica de celulase livre e encapsulada em quitosana 1% m/v reticulado com glutaraldeído. Carga teórica imobilizada de 14,5mg proteína.g<sup>-1</sup> gel (65°C e pH 4,8), (■) celulase solúvel; (▲) imobilizada. As linhas indicam ajuste do modelo de inativação de Sadana-Henley aos pontos experimentais.



## 6.2 Hidrólise de bagaço de cana utilizando celulase livre e imobilizada

### 6.2.1 Tratamento térmico e alcalino do bagaço de cana-de-açúcar:

O pré-tratamento por explosão a vapor é uma das técnicas mais viáveis de pré-tratamento de biomassa para aumentar sua susceptibilidade à conversão biotecnológica. Na parede celular das plantas, as fibras de celulose estão reticuladas em uma matriz extremamente rígida, composta majoritariamente por hemicelulose e lignina. Portanto, para hidrolisar a celulose e a hemicelulose, é preciso despolimerizar, solubilizar ou remover a lignina presente nos materiais lignocelulósicos. Dos métodos de pré-tratamento, o processo de explosão a vapor seguido de deslignificação alcalina, tem se revelado um dos mais promissores para o fracionamento dos três constituintes principais da fitobiomassa, paralelamente a um aumento significativo da susceptibilidade da celulose à sacarificação enzimática [16]. A Tabela 6.6 mostra os teores de celulose após deslignificação de bagaços em diferentes condições.

**Tabela 6.6** Teores de celulose quantificados pelo método antrona em bagaço de cana-de-açúcar em diferentes etapas de tratamento.

Bagaço de cana-de-açúcar	Teor de celulose (%)
explodido e não lavado	14
explodido lavado e seco	61
explodido lavado, seco e tratamento alcalino	88

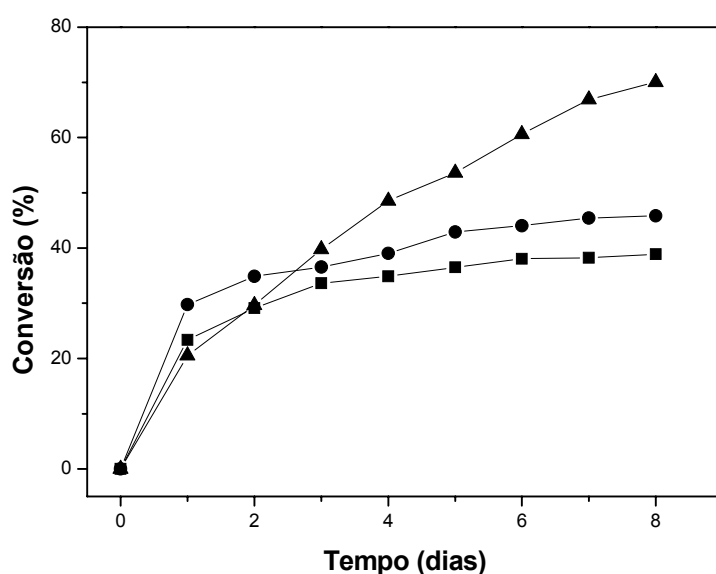
Observa-se que à medida que se explode o bagaço e depois o lava (retirada da hemicelulose) e seca e por último, a etapa de deslignificação, o teor de celulose aumenta, facilitando o ataque enzimático e reduzindo as quantidades de hemicelulose e lignina.

### 6.2.2 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando enzima livre e imobilizada:

Os resultados apresentados na Figura 6.7 mostram os perfis de conversão em função do tempo de hidrólise para enzima livre e imobilizada. Nota-se que a enzima livre apresentou velocidade de reação maior no início, conduzindo a uma maior conversão quando comparada ao derivado até pouco mais de dois dias de reação. Esse comportamento é devido à ausência

de efeitos difusionais na reação catalisada pela enzima solúvel, isso pode ser percebido pelo rápido aumento na conversão e depois na redução da velocidade da reação.

Já para o derivado obtido, a conversão foi mais lenta no início do processo devido ao problema da alta resistência ao transporte de massa externo e interno. É importante ressaltar, contudo, que apesar da maior conversão no início, a enzima livre conduz a menor conversão final, devido a sua menor estabilidade operacional, pois sua estabilidade térmica é aproximadamente 20 vezes menor que o derivado utilizado. Assim, com o passar das horas a enzima livre foi inativando enquanto que a imobilizada permaneceu ativa.



**Figura 6.7** Conversão do bagaço da cana-de-açúcar (50°C e pH 5,0) com 8,8% m/v de celulignina. Enzima solúvel 4,3U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> celulignina (■); enzima solúvel 8,6U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> celulignina (●); enzima imobilizada em quitosana 2,5%-alginate 2,5% pré-ativados com glutaraldeído e ativado com glicidol 4,3U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup> celulignina (▲).

Através de estudos cinéticos das celulasas na hidrólise de celulose com enzimas solúveis, sabe-se que a ação da endocelulase é muito mais rápida que a das exocelulasas. Sabe-se também que embora seja esperado haver sérios problemas difusivos no processo (a reação é heterogênea, com a celulose insolúvel e enzima solúvel em água), esses parecem não limitar o processo global devido à baixa velocidade intrínseca das enzimas.

A imobilização da enzima aumenta ainda mais a dificuldade de acesso do substrato à enzima. Contudo, esse problema só é muito grave no início da reação e a ação da endoenzima

é rápida, reduzindo o tamanho dos oligossacarídeos e assim tornando mais fácil o acesso deles à enzima imobilizada. Além disso, a baixa velocidade intrínseca minimiza esse efeito negativo. Como resultado final, vê-se que a maior estabilidade operacional da enzima imobilizada deverá compensar a maior resistência ao transporte de massa, tornando economicamente compensador seu uso em processos de sacarificação de celulose.

### 6.2.3 Hidrólises seqüenciais do bagaço de cana-de-açúcar utilizando enzima livre e imobilizada:

A viabilidade da reutilização de celulase imobilizada foi analisada durante uma seqüência de três bateladas. Utilizou-se o derivado composto por quitosana-alginato pré-ativado com glutaraldeído e seguido de ativação com glicidol. Imobilizaram-se 25mg de proteína.g<sup>-1</sup> de gel com atividade aparente de 15U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup>gel.

Ao iniciar cada batelada, 5U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup>celulignina eram adicionados junto com o derivado, tampão e bagaço de cana (celulignina). Durante o tempo de reação, foram analisados os perfis de concentrações de glicose, celobiose, açúcar redutor total (Figura 6.8). Era de se prever que o aumento na resistência ao transporte de massa nas reações de hidrólise seria especialmente grave no início devido à insolubilidade da celulose, o que implicava substrato e catalisador sólido. Decidiu-se por isso adotar estratégia similar à utilizada na hidrólise de amido, também um polímero de glicose, cuja hidrólise é efetuada industrialmente usando ação sinérgica de  $\alpha$ -amilase (endoenzima) e glicoamilase (exoenzima). A primeira quebra rapidamente o polímero em várias frações, diminuindo a viscosidade do meio reacional e gerando terminações para a ação mais lenta da exoenzima. Imaginou-se, assim, que a adição de parte da enzima livre permitiria superar a desvantagem do sistema imobilizado por ser um processo sólido-sólido. Utilizou-se assim, um total de 20U<sub>FP</sub>.g<sup>-1</sup>celulignina, sendo 5U<sub>FP</sub> livres e 15U<sub>FP</sub> imobilizadas.

Observa-se na Figura 6.8-C que a amostragem iniciou-se depois de 10h. Isto foi devido à alta viscosidade do meio nas primeiras horas de reação provocada pela alta concentração de sólidos presentes no reator (celulignina) que dificultou a agitação do meio reacional.

Para todos os perfis (Figura 6.8), nota-se um aumento da concentração de celobiose maior que a de glicose durante aproximadamente 10h. Depois, a velocidade de produção de celobiose diminui e a de glicose aumenta. Isto era esperado devido à menor proporção de  $\beta$ -glicosidase no extrato e ao efeito inibitório da celobiose na ação da celobiohidrolase e da glicose na ação da  $\beta$ -glicosidase. O efeito inibitório da glicose pode ser minimizado se for

utilizado processo com sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), limitado pela fermentação, onde a glicose assim que produzida será metabolizada a etanol pelo microrganismo. Visando estudar o sistema imobilizado já nessa condição mais promissora de processo, após 10 horas a 47°C, reduziu-se a temperatura para 37°C, um valor de compromisso entre a atividade enzimática e a sobrevivência do microrganismo.

As Figuras 6.8 mostram os resultados obtidos com toda a enzima livre (Figura 6.8-A) e com 75% da carga enzimática oferecida na forma imobilizada, em três bateladas sequenciais (Figura 6.8-B,C,D). As baixas conversões em glicose atingidas nos dois sistemas, mostrados na Figura 6.10, se devem à redução da temperatura para 37 °C, à pequena proporção de  $\beta$ -glicosidase e também menor proporção de celobiohidrolase em reação à endocelulase no extrato, além do efeito inibitório dos produtos celobiose e glicose na ação das respectivas enzimas geradoras dessas substâncias.

É conhecido na literatura [16-18] que uma das limitações do processo de hidrólise está na baixa atividade  $\beta$ -glicosidásica do complexo enzimático comercial utilizado neste trabalho (Celluclast<sup>®</sup>). Essa enzima é a geradora de glicose, deve ter ação mais lenta que a endo e é fortemente inibida pelo seu produto glicose. Assim altas conversões de celulose a glicose requerem forçosamente altas proporções dessa enzima no extrato.

Resultados semelhantes foram verificados por Martins [18] ao estudar a percentagem de glicose e celobiose liberada na hidrólise de papel de filtro durante 1h de reação. Observou-se que a hidrólise com uso da Celluclast<sup>®</sup> produziu 27% de glicose e 73% de celobiose enquanto a mesma reação utilizando celulase de *P.echinulatum* produziu 57% dos açúcares redutores na forma de glicose e 43% na forma de celobiose.

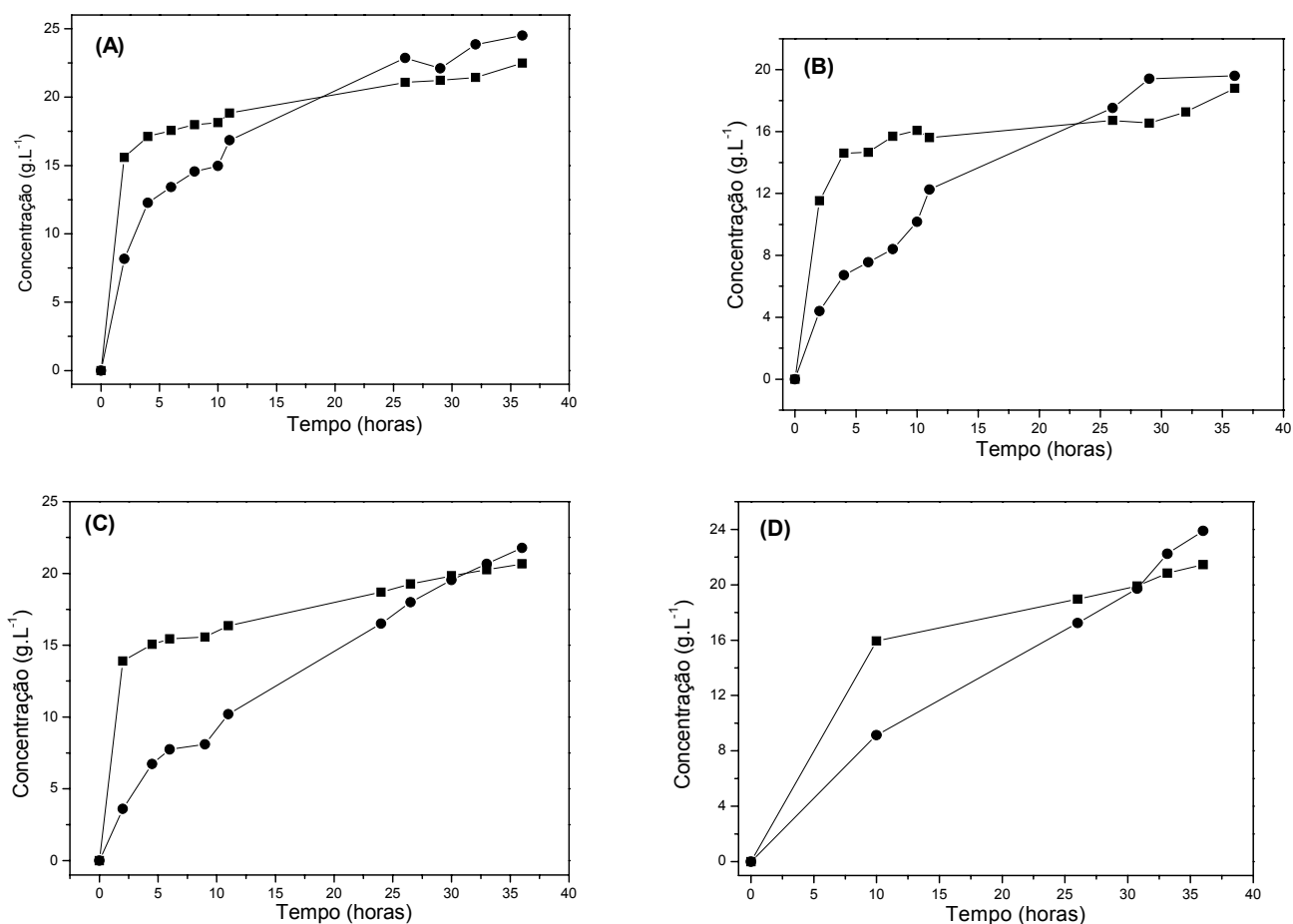
Comparando-se o desempenho do sistema livre com a primeira batelada imobilizada, observam-se concentrações de celobiose e de glicose inferiores no sistema imobilizado, diferenças essas menores nas horas iniciais e que se torna um pouco mais significativa na medida em que aumenta a concentração de glicose no meio, o que inibe a ação da  $\beta$ -glicosidase. É evidente que a ação da  $\beta$ -glicosidase foi mais afetada pela imobilização. Uma possível explicação é que por ser a terceira a agir, ela tenha sentido mais os efeitos difusivos. Outra explicação é que a sua baixa concentração no extrato tenha ocasionado uma menor proporção ainda dessa enzima no derivado, ou seja, as 15 U<sub>FP</sub> de enzima imobilizada contenham ainda menos  $\beta$ -glicosidase e celobiohidrolase que as 15U<sub>FP</sub> livres. As três proteínas concorrem pelos sítios ativos do suporte durante a imobilização e a velocidade de

imobilização será maior para a proteína presente em mais alta concentração, ou seja, a endocelulase e a exocelulase.

Uma vez que a conversão a celobiose e glicose depende das exoenzimas, uma menor proporção dessas no extrato irá provocar um pior desempenho do sistema imobilizado. Possivelmente, um aumento na proporção das exoenzimas irá levar a um desempenho similar do sistema imobilizado.

É importante notar também o excelente desempenho das duas bateladas repetidas, que mostram que a enzima imobilizada continua ativa. As concentrações de celobiose e glicose inclusive aumentam da primeira para a segunda e para a terceira batelada devido ao aumento da concentração de substrato. Uma vez que a conversão é parcial, ao se reciclarem os sólidos, celulose não convertida é retornada ao sistema. Estes dados estão de acordo com Vasquez e colaboradores [17] que observaram um aumento de 4,5 vezes na concentração de glicose quando variaram a percentagem em celulignina de 2 para 10% m/v para uma mesma carga enzimática e mesmas condições operacionais.

Vale ressaltar que, na segunda e terceira bateladas, são também adicionados as mesmas  $5U_{FP}.g^{-1}$  celulignina de enzima livre calculados para 10% de celulignina no reator, tal como utilizada na primeira batelada.

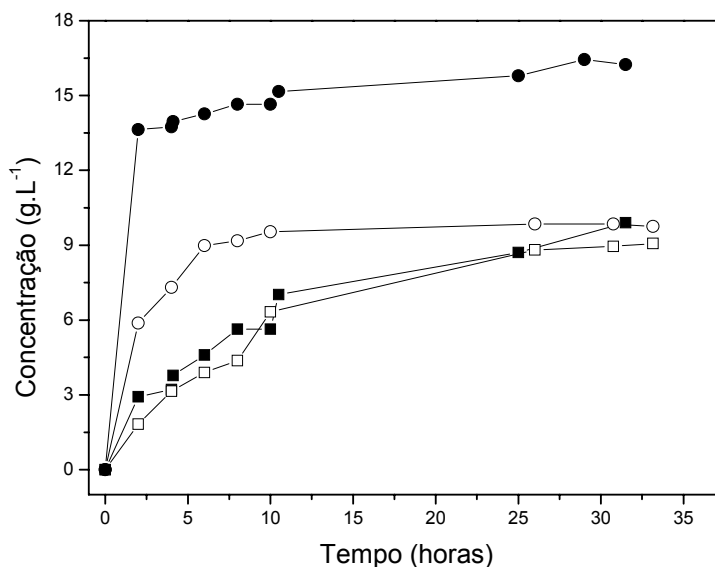


**Figura 6.8** Perfis de concentração de glicose (●) e celobiose (■) na hidrólise de bagaço de cana utilizando enzima livre (A) e bateladas seqüenciais com enzima imobilizada. 1ª batelada (B), 2ª batelada (C) e 3ª batelada (D). Todos os ensaios foram realizados a 47°C durante 10h e 37°C até completar 36h em pH 5,0.

Realizou-se a seguir um outro ensaio visando entender qual a participação relativa da enzima livre e imobilizada na geração de celobiose e glicose, cujos resultados são mostrados na Figura 6.9. Pode ser observada a diferença de perfil entre as duas bateladas, uma realizada apenas com enzima livre,  $5U_{FP}.g^{-1}$  de celulignina, e a outra realizada apenas com enzima imobilizada,  $15U_{FP}.g^{-1}$  de celulignina. Os dois ensaios foram realizados nas mesmas condições operacionais. Os resultados mostrados na Figura 6.9 confirmam que a principal limitação no sistema imobilizado se deve à baixa concentração de  $\beta$ -glicosidase. Sendo a terceira a agir, essa enzima é quem mais sofre a restrição dos efeitos difusivos. Nota-se que a concentração de celobiose é muito maior na batelada com enzima imobilizada, sem a adição de enzima livre, enquanto que a concentração de glicose é muito similar nos dois sistemas. Por outro lado, a concentração de celobiose para enzima livre foi menor que a imobilizada e observa-se

que a glicose ao passar do tempo alcançará uma concentração maior que a celobiose, fato este que não é observado na enzima imobilizada. O efeito inibitório de celobiose e glicose ficam claros nesse ensaio, pois a soma das concentrações dos dois produtos liberada nas duas bateladas é superior às obtidas na batelada onde havia 5U<sub>FP</sub> livres e 15U<sub>FP</sub> imobilizadas.

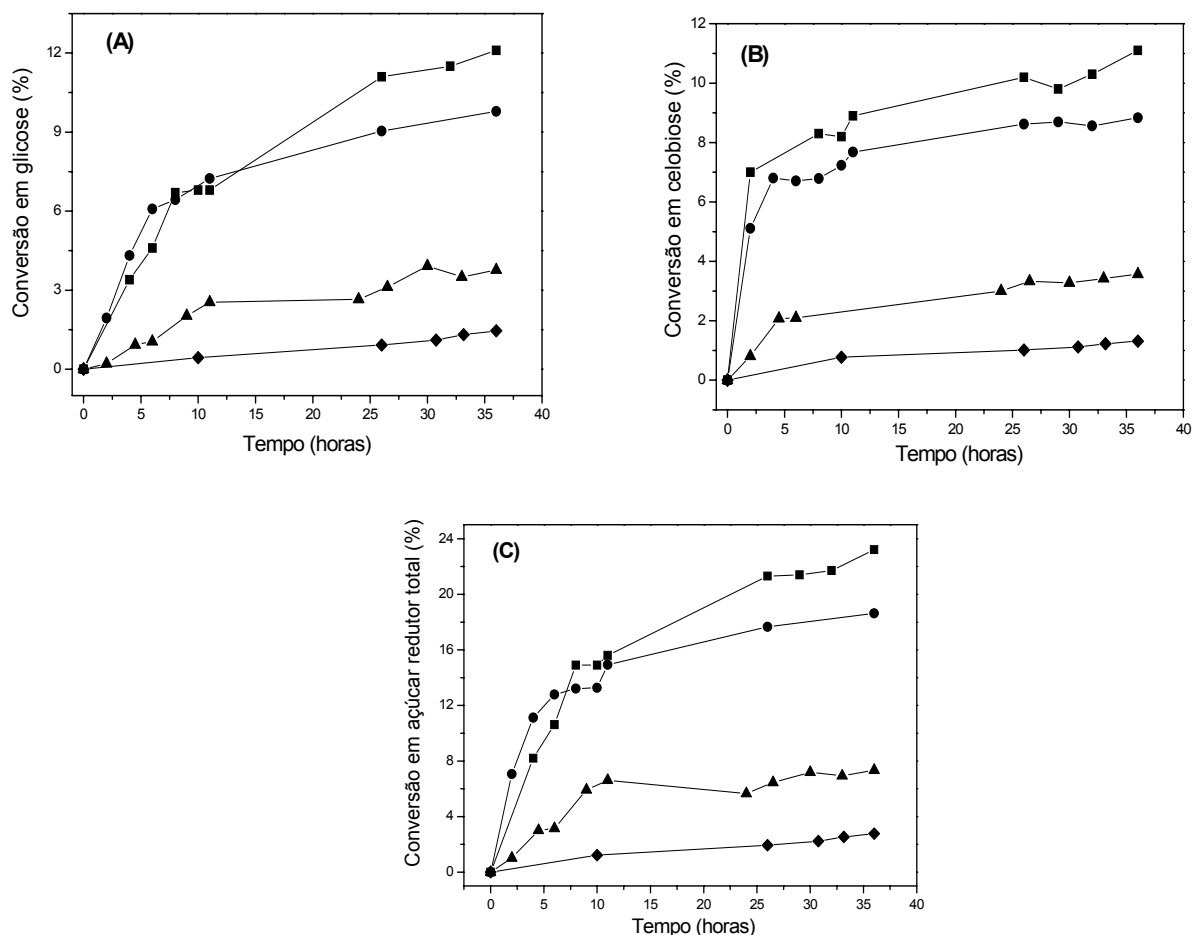
Os resultados mostrados aqui de hidrólise de celulose com enzimas imobilizadas comprovam a viabilidade técnica do uso de celulases imobilizadas na hidrólise de celulose. Evidentemente, a viabilidade econômica só poderá ser definida após estudos de otimização do processo de imobilização. Assim, o aumento na proporção entre exocelulases e endocelulases deverá favorecer o desempenho do complexo imobilizado, assim como a imobilização preferencial da endocelulase nas camadas mais externas do suporte. Quanto maior a estabilidade térmica da enzima solúvel, mais vantajosa sua imobilização e reutilização. Assim, as imobilizações de extratos produzidos por microrganismos termoestáveis deverão conduzir a derivados ainda mais promissores. Por outro lado, o uso de diferentes técnicas de imobilização pode aumentar ainda mais a estabilidade operacional da enzima. O aumento na proporção entre exocelulases e endocelulases também deverá favorecer o desempenho do complexo imobilizado, bem como a imobilização preferencial da endo nas camadas mais externas do suporte. No limite, se a imobilização do complexo não se revelar ao final viável economicamente devido à insolubilidade inicial da celulose, essa restrição deixa de existir para as exocelulases, ou pelo menos para a  $\beta$ -glicosidase. Assim, hidrólise de celulose com celulases imobilizadas requer ainda muitos estudos para otimização do uso delas, mas os resultados aqui mostrados são promissores e justificam continuidade dos estudos nessa direção.



**Figura 6.9** Perfis de concentração de celobiose: (●) enzima imobilizada sem adição de livre;  $15U_{FP}.g^{-1}$  de celulignina (○) enzima livre  $5U_{FP}.g^{-1}$  de celulignina. Glicose: (■) enzima imobilizada sem adição de livre; (□) enzima livre  $5U_{FP}.g^{-1}$  de celulignina na hidrólise de bagaço de cana utilizando Todos os ensaios foram realizados a  $47^{\circ}C$  durante 10h e  $37^{\circ}C$  até completar 33h em pH 5,0.

Quanto aos perfis de conversão (Figura 6.10) para as três bateladas repetidas, conforme já discutido, embora a concentração de produto em um mesmo tempo de reação aumente, observa-se um decréscimo na conversão, devido ao aumento gradual da concentração inicial de celulose da primeira para a terceira bateladas. Esses resultados, portanto, indica ser bastante promissor o uso de enzimas imobilizadas para redução de custos com catalisador, pois a enzima imobilizada ainda estava ativa e produzindo glicose e celobiose, na terceira batelada. Esse experimento mostrou também que a reutilização da enzima pode ser feita de forma bastante simples, requerendo apenas uma separação sólido-líquido entre o líquido contendo celulose hidrolisada e os sólidos (lignina, celulose não convertida e enzima imobilizada), uma operação unitária muito simples industrialmente. No caso do processo SSF seria separado apenas o vinho contendo etanol, com reciclo de todos os sólidos até que a perda gradual de atividade da enzima imobilizada não justifique mais seu reciclo.





**Figura 6.10** Perfis de conversão em glicose (A), celobiose (B) e açúcar redutor total (C) na hidrólise de bagaço de cana utilizando enzima livre (■) e bateladas seqüenciais com enzima imobilizada. 1ª batelada (●), 2ª batelada (▲) e 3ª batelada (◆). Todos os ensaios foram realizados a 47°C durante 10h e 37°C até completar 36h em pH 5,0.

### 6.3 Conclusões parciais

Celulase imobilizada em quitosana-alginato ativada com (i) glutaraldeído, (ii) glicidol, (iii) glutaraldeído e glicidol, (iv) epoxilado mostraram vantagens significantes quando comparadas à enzima livre. Os resultados obtidos permitiram verificar que há uma influência positiva na adição de copolímeros e de diferentes métodos de ativação no protocolo de imobilização de celulase em quitosana. Para géis ativados com glutaraldeído, o composto quitosana-alginato apresentou rendimento de imobilização de 56%, atividade recuperada de 39% , estabilidade térmica de 5,6 vezes em relação à enzima solúvel a 65°C e ativados com glicidol e pré-ativados com glutaraldeído, com rendimento de imobilização de 58%, atividade recuperada de 20% e estabilidade térmica de 20,1 vezes em relação à enzima solúvel a 65°C.

Entretanto, para derivados preparados ativados com glicidol e sem DTT na imobilização, a estabilização da enzima foi a melhor obtida neste trabalho (38,5 vezes). Tempo de imobilização de 24h e pH 7,0 a 25°C.

No método de imobilização de celulase por conjugação seguida de reticulação com glutaraldeído, o rendimento de imobilização (75%) e a estabilização atingida de 33,7 vezes foram satisfatórios, visto que se trata de uma metodologia mais simples, barata e rápida.

Embora os valores de estabilidade térmica e atividade enzimática sejam baixos em comparação com as demais enzimas reportadas na literatura [4,5] para a celulase os valores são considerados satisfatórios.

A conversão da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando o derivado de celulase mostrou ser promissor no desenvolvimento de um processo industrial, os resultados mostraram uma conversão de 1,8 vezes em relação à enzima livre, viabilizando um custo mais acessível em bioprocessos industriais para hidrólise de produtos lignocelulósicos.

O derivado de celulase mostrou que pode ser usado em bateladas seqüenciais sem perder sua eficiência catalítica podendo esse processo de sacarificação ser melhorado de modo a realizar a fermentação simultânea para produção de etanol.

Portanto, trata-se de um suporte de fácil obtenção e o processo de imobilização simples, isto torna estes biocatalisadores promissores na aplicação e desenvolvimento de processos industriais envolvendo a biocatálise de materiais celulolíticos e estimula a continuidade dos estudos visando sua otimização.

## 6.4 Referências bibliográficas

- [1] Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, n.1, p.19-34. **2004**.
- [2] Fávere, T. V.; Laus, R.; Laranjeira, M. C. M.; Martins, A. O.; Pedrosa, R.; Benassi, J.; Geremias, R. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. *Química Nova*, v.29, n.1, p.34-39. **2006**.
- [3] Tardioli, P. W. *Hidrólise controlada de proteínas de soro de queijo usando carboxipeptidase A e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose*. (Doutorado). Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, **2003**.
- [4] Villalonga, R.; Daria, R. Function stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.76, p.489-493. **2001**.
- [5] Gu, L.; Mao, X.; Guo, G.; Huang, J.; Du, Z.; Huang, Z.; Ma, L.; Li, P. A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, n.2, p.189-195. **2006**.
- [6] Mateo, C.; Abian, O.; Bernedo, M.; Cuenca, E.; Fuentes, M.; Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Grazú, V.; Pessela, B. C. C.; Giacomini, C.; Irazoqui, G.; Villarino, A.; Ovsejevi, K.; Batista-Viera, F.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, n.4, p.456-462. **2005**.
- [7] Guisán, J. M. Immobilization and stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by covalent attachment to aldehyde-agarose gels. *Enzyme and Microbial Technology*, v.10, p.375-382. **1987**.
- [8] Cardias, H. C. T.; Grininger, C. C.; Trevisan, H. C.; Guisán, J. M.; Giordano, R. L. C. Influence of activation on the multipoint immobilization of penicillin G acylase on macroporous silica. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.16, p.141-148. **1999**.
- [9] Spagna, G.; Andreani, F.; Salatelli, E.; Romagnoli, D.; Casarini, D.; Pifferi, P. G. Immobilization of the glycosidases:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* on a chitosan derivative to increase the aroma of wine. Part II. *Enzyme and Microbial Technology*, v.23, p.413-421. **1998**.

- [10] Fangkangwanwong, J.; Yoksan, R.; Chirachanchai, S. Chitosan gel formation via the chitosan-epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. *Polymer*, v.47, p.6438-6445. **2006**.
- [11] Mateo, C.; Torres, R.; Fernández-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Hidalgo, A.; López-Gallego, F.; Abian, O.; Palomo, J. M.; Betancor, L.; Pessela, B. C. C.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules*, v.4, p.772-777. **2003**.
- [12] Grazú, V.; Abian, O.; Mateo, C.; Batista-Viera, F.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M. Novel bifunctional epoxy/thiol-reactive support to immobilize thiol containing proteins by the epoxy chemistry. *Biomacromolecules*, v.4, p.1495-1501. **2003**.
- [13] III Garcia, A.; Oh, S.; Engler, C. R. Cellulase immobilization on Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and characterization. *Biotechnology and Bioengineering*, v.33, p.321-326. **1989**.
- [14] Martino, A.; Pifferi, P. G.; Spagna, G. Immobilization of β-glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan. *Process Biochemistry*, v.31, n.3, p.287-293. **1995**.
- [15] Delanoy, G.; Li, Q.; Yu, J. Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.35, p.89-95. **2005**.
- [16] Ramos, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, n.6, p.863-871. **2003**.
- [17] Vásquez, M. P.; Silva, J. N. C. D.; Júnior, M. B. D. S.; Júnior, N. P. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.136, p.141-153. **2007**.
- [18] Martins, L. F. *Caracterização do complexo celulásico de Penicillium echinulatum*. (Mestrado). Química, UFPR, Curitiba, **2005**. 121 p.

*Capítulo 7*

*Conclusões*

## 7 Conclusões

Este projeto de pesquisa preparou e caracterizou diversos derivados de enzimas industriais como quimotripsina, carboxipeptidase A e celulase, em quitosana pura e híbridos de quitosana com outros polímeros de baixo custo utilizando diferentes protocolos de ativação e vários métodos de imobilização, e estudaram-se os melhores derivados obtidos nas respectivas reações de interesse de cada enzima.

Esta tese de doutorado apresentou resultados significantes na imobilização de enzimas industriais em quitosana.

Observou-se uma melhora em todos os parâmetros de imobilização ao longo da discussão dos resultados para todas as enzimas imobilizadas, mostrando uma evolução no estudo da imobilização de cada enzima utilizando suportes e ativações de baixo custo logrando resultados muito significantes quando comparados a outros métodos de imobilização e utilizando suportes onerosos quando comparados à quitosana.

A partir desta tese, buscaram-se, além de promover uma alternativa de aproveitamento de produtos nacionais como suportes de imobilização, contribuir para a expansão e diversificação da tecnologia enzimática, trazendo potenciais benefícios sócio-econômicos através do desenvolvimento de uma tecnologia inovadora, bem como, contribuir com o desenvolvimento do grupo de pesquisa em tecnologia enzimática a respeito da imobilização de diversas enzimas em quitosana.

*Capítulo 8*  
*Sugestões*

## 8 Sugestões

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho, sugerem-se algumas atividades para que possam ser executadas.

- ⇒ Imobilizar quimotripsina em suportes híbridos de quitosana epoxilados e verificar sua eficácia;
- ⇒ Imobilizar quimotripsina na presença de DTT para verificar incremento de estabilidade durante o processo;
- ⇒ Verificar estabilidade operacional do melhor derivado obtido;
- ⇒ Preparar o melhor derivado de quimotripsina e realizar bateladas longas de hidrólise de soro de queijo e levantar parâmetros cinéticos como base de comparação com outros trabalhos desenvolvidos no grupo;
- ⇒ Aplicar os melhores suportes desenvolvidos para imobilização de outras enzimas estudadas no grupo;
- ⇒ Melhorar o suporte epoxilado bem como, as condições de imobilização de CPA de modo a estabilizá-la;
- ⇒ Investigar a capacidade máxima de imobilização no suporte quitosana-alginato epoxilado, caracterizá-lo e aplicá-lo em hidrólises de soro de queijo para remoção de fenilalanina e comparações com outros estudos desenvolvidos no grupo;
- ⇒ Imobilizar CPA através de outros protocolos de imobilização como conjugação seguida de reticulação;
- ⇒ Utilizar dextranas após imobilização de modo a melhorar a estabilidade e reduzir a perda de atividade catalítica;
- ⇒ Verificar a influência dos íons zinco com a quitosana, bem como a influência do zinco na enzima durante a imobilização;
- ⇒ Estudar as condições ótimas na etapa de redução para não prejudicar a enzima e melhorar sua estabilização;



- ⇒ Aprofundar a metodologia de imobilização de celulase por conjugação e reticulação com glutaraldeído. Modificar a concentração de quitosana ou usar híbridos, verificar capacidade máxima de imobilização e tempo de contato enzima-suporte;
- ⇒ Desenvolver derivados de  $\beta$ -glicosidase e usá-los juntamente com os de celulase, de modo a diminuir a inibição por celobiose;
- ⇒ Imobilizar celulases de outras fontes que contenham maior quantidade de  $\beta$ -glicosidase;
- ⇒ Imobilização simultânea de celulase e  $\beta$ -glicosidase de modo a obter um derivado com alta atividade das duas enzimas;
- ⇒ Realizar estudos de sacarificação utilizando um derivado que contenha celulase e  $\beta$ -glicosidase e otimizar parâmetros de reação como a percentagem de sólido, agitação, relação enzima-substrato
- ⇒ Testar diferentes bagaços obtidos por diferentes tratamentos para retirada de hemiceluloses e lignina.