



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

RAFAEL ELIAS MARTINS

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM GÉIS DE QUITOSANA

SÃO CARLOS - SP

2007

RAFAEL ELIAS MARTINS

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE CELULASE EM GÉIS DE QUITOSANA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Profa.Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

SÃO CARLOS - SP

2007

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

M386ei

Martins, Rafael Elias.

Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana / Rafael Elias Martins. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
97 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Tecnologia de enzimas. 2. Celulase. 3. Imobilização. 4. Quitosana. 5. Bagaço de cana. I. Título.

CDD: 660.634 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
RAFAEL ELIAS MARTINS, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 29 DE JANEIRO DE 2007.

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, PPG-EQ/UFSCar



Dr^a. Célia Maria Araújo Galvão
CTC-Piracicaba



Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Zangirolami
PPG-EQ/UFSCar

Dedico este trabalho a Deus, a minha mãe Elizabeth, meu irmão Luciano, minha esposa Josiane e às pessoas amadas que já foram: meu pai Eurípides e meu sobrinho Allan.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela persistência a execução deste trabalho.

À Professora Raquel de Lima Camargo Giordano que tanto contribuiu para meu crescimento humano e profissional durante a orientação desta dissertação e por sua paciência e confiança no meu trabalho. O meu muito obrigado.

Ao Professor Roberto Giordano pelas contribuições dadas para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos Professores do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, pelas disciplinas oferecidas.

Ao Professor e amigo Enrique J.Mammarella pelas valiosas discussões.

Aos meus amigos do laboratório de Tecnologia Enzimática: Adriano, Dasciana, Dany, pelo companheirismo e ajuda.

Ao amigo Wellington em especial, por todas as orientações e discussões dadas no decorrer desse trabalho, ajuda essa valiosa para meu crescimento profissional e acadêmico.

A CNPq pelo apoio financeiro de fundamental importância para realização deste trabalho.

*"A satisfação de uma conquista só é plena se for realizada através de muito esforço;
portanto, não desanime".*

(João Cardoso Pereira Netto)

Resumo

Celulases catalisam hidrólise de celulose à glicose e a imobilização e estabilização da mesma podem viabilizar o processo enzimático, pois reduz custos em sua utilização. Neste trabalho, Celluclast 1.5L (Novozymes A/S, Denmark) e CG 200 (Genencor) foram imobilizadas em géis de quitosana e quitosana-alginato ativados com glutaraldeído e glicidol para posterior hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. O processo de imobilização foi acompanhado medindo-se proteína e atividade hidrolítica da enzima em papel de filtro. Avaliaram-se rendimento de imobilização, atividade recuperada, estabilidade térmica, temperatura e pH ótimo de atividade enzimática. Os melhores derivados foram obtidos com quitosana-alginato, ativados com glicidol com temperatura de imobilização de 27°C e pH 7,0 sendo 11,2 vezes mais estáveis que a enzima livre, com rendimento em torno de 40,6% e atividade recuperada em torno de 56,3%. A temperatura ótima para os derivados foi cerca de 10 graus maior que a da enzima livre (50°C), enquanto que o pH deslocou-se de 4,2 (enzima livre) para a região entre 2,5 e 3, para os derivados. Com o melhor derivado, realizou-se a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, que apresentou conversão de 1,8 vezes (70,0%) superior à enzima livre (38,9%).

PALAVRAS-CHAVE: celulase; imobilização; quitosana; alginato de sódio, bagaço da cana-de-açúcar.

Abstract

Cellulases are enzymes that catalyze the hydrolysis of cellulose producing glucose. Immobilization and stabilization of these enzymes could improve enzymatic process making it more attractive by reducing costs during their use. In this work, Celluclast (Novozymes A/S, Denmark) and CG 200 (Genencor) were immobilized into chitosan and into a chitosan/alginate hybrid support, after activation of the support with glutaraldehyde and glycidol under different conditions of immobilization such as temperature and pH. Immobilization process was evaluated by calculating the immobilization yield, coupling yield and thermal stability at 65°C. Temperature and pH optimum of enzymatic activity were analyzed as well. The best derivatives were obtained with chitosan – alginate activated with glycidol, after immobilization at 27°C, pH 7.0, for 16 hours. The biocatalyst presented 56.3% of immobilization yield, 40.6% of coupling yield and it 11.2 – fold more stable than free enzyme at 65°C. The temperature and pH for maximum activity of the derivatives and soluble enzyme was 60°C and 50°C, pH 2.5-3.0 and 4.2, respectively. Finally, the performance of the best biocatalyst developed in this work in the hydrolysis of sugarcane bagasse was compared to one observed using soluble enzyme. Although a higher conversion has been obtained with soluble enzyme in the beginning of the reaction, the immobilized enzyme allowed to reach a higher final conversion, 70%, than the one obtained with free Celluclast, 38.9%.

KEY – WORDS: cellulase; immobilization; chitosan, sodium alginate, sugarcane bagasse.

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução.....	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Combustível Fóssil: Petróleo com fonte de energia.....	4
2.2 Biocombustível: Uso da biomassa na geração de energias renováveis.....	5
2.3 Processamento das frações lignocelulolíticas produzidas por biorrefinaria	9
2.4 Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima Lignocelulolítico	11
2.5 Catalisadores enzimáticos.....	12
2.6 Enzimas celulolíticas.....	15
2.7 Microrganismos produtores de celulase.....	20
2.8 Aplicações Biotecnológicas da enzima celulase.....	21
2.9 Tecnologia enzimática em processos biotecnológicos: Imobilização de Enzimas.....	22
2.10 Classificação de sistemas de imobilização de enzimas.....	24
2.11 Imobilização por ligação covalente multipontual.....	26
2.12 Parâmetros da imobilização.....	27
2.13 Suportes para imobilização.....	29
2.14 Quitosana.....	30
2.15 Alginato de sódio.....	35
2.16 Princípio de formação de hidrogéis de quitosana com diferentes copolímeros.....	36
2.17 Modificação química do suporte.....	37
Capítulo 3 - Material e Métodos.....	42
3.1 Enzimas.....	42
3.2 Suportes e ativadores.....	42
3.1.3 Substratos	42

3.2	Metodologia experimental.....	42
3.2.1	Metodologia de preparação dos géis de quitosana e quitosana – alginato..	42
3.2.1.1	Preparação das partículas de quitosana.....	42
3.2.1.2	Preparação das partículas de quitosana – alginato.....	43
3.3	Ativação dos suportes.....	43
3.3.1	Ativação dos suportes utilizando glutaraldeído.....	43
3.3.2	Preparação do suporte quitosana – glioxil pré-ativados com glutaraldeído	44
3.3.3	Preparação do suporte quitosana – glioxil - amino pré-ativados com glutaraldeído.....	45
3.4	Imobilização covalente multipontual de celulase em matrizes de quitosana e quitosana – alginato.....	45
3.5	Determinação da Atividade celulolítica.....	45
3.6	Determinação da concentração de proteína.....	46
3.7	Caracterização das propriedades cinéticas da celulase livre e imobilizadas.....	46
3.7.1	Influência do pH.....	46
3.7.2	Influência da temperatura	47
3.7.3	Estabilidade térmica.....	47
3.8	Cálculo dos parâmetros de imobilização.....	48
3.8.1	Cálculo do rendimento de imobilização.....	48
3.8.2	Cálculo da atividade recuperada.....	49
3.8.3	Cálculo do fator de estabilidade.....	49
3.9	Avaliação do enlace enzima – suporte.....	50
3.10	Tratamento térmico do bagaço de cana-de-açúcar.....	50
3.11	Ensaio de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase imobilizada em híbridos de quitosana.....	50

Capítulo 4 - Resultados e Discussão.....	51
4.1 Caracterização das enzimas livres estudadas Celluclast 1.5 L e Genencor (CG 200).....	51
4.2 Influência do pH.....	53
4.3 Influência da temperatura.....	54
4.4 Preparação dos suportes de quitosana e estudo dos parâmetros de imobilização.....	54
4.5 Influência da adição de alginato de sódio e de diferentes condições de imobilização de celulase em quitosana.....	56
4.6 Influência dos métodos de ativação na imobilização da celulase em híbridos de quitosana.....	59
4.6.1 Ativados com glutaraldeído.....	59
4.6.2 Ativados com glicidol.....	60
4.6.3 Ativados com glicidol-amino.....	62
4.7 Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática.....	63
4.8 Testes de Dessorção Enzimática.....	64
4.9 Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.....	64
Capítulo 5 - Conclusões.....	67
Referências Bibliográficas.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema geral de uma biorrefinaria utilizando diferentes tipos de biomassa (Giordano,2004).....	8
Figura 2.2: Esquema de uma biorrefinaria utilizando materiais lignocelulósicos (Giordano, 2004).....	9
Figura 2.3: Produção de produtos químicos por diferentes vias reacionais a partir da hidrólise da celulose (Schuchardt,2000).....	10
Figura 2.4: Formação de vários produtos a partir a hemicelulose, utilizando a hidrólise e explosão a vapor (Schuchardt, 2000).....	11
Figura 2.5: Síntese de novos produtos a partir da lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos (Schuchardt, 2000).....	12
Figura 2.6: Representação da estrutura geral de um aminoácido.....	14
Figura 2.7: Ligação peptídica entre as moléculas de aminoácidos formadores das enzimas..	14
Figura 2.8: Célula vegetal, representando as fibras de celulose, hemicelulose em estrutura..	17
Figura 2.9: Cadeia linear polimérica da celulose, mostrando as ligações β -1,4 das unidas β -D-glicopiranosil.....	17
Figura 2.10: Celulase de <i>Trichoderma reesei</i> (Sandgren <i>et al</i> , 2005).....	17
Figura 2.11: Fibras cristalinas de celulose, ilustrando a influência das pontes de hidrogênio	18
Figura 2.12: Mecanismo da degradação da celulose e o sinergismo do complexo enzimático.....	19
Figura 2.13: Clivagem da celobiose catalisada pela enzima β -glicosidase.....	20
Figura 2.14. Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose.....	32
Figura 2.15: Estrutura química do alginato de sódio.....	37
Figura 2.16: Reação de ativação entre glutaraldeído e quitosana.....	40
Figura 2.17: Reação de ativação do gel utilizando glicidol	41

Figura 3.1: Aparato utilizado para preparação das partículas de quitosana (Galvão, 2004)...	45
Figura 3.2: Quitosana ativada com glutaraldeído.....	46
Figura 4.1: Inativação térmica da Celluclast 1,5 L a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	55
Figura 4.2: Inativação térmica da CG 200 a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	55
Figura 4.3: Influência do pH na atividade hidrolítica da celulase livre (Celluclast 1,5 L).....	55
Figura 4.4: Influência do pH na atividade hidrolítica da celulase livre (CG 200).....	55
Figura 4.5: Influência da temperatura na atividade hidrolítica da celulase livre (Celluclast 1.5L).....	57
Figura 4.6: Influência da temperatura na atividade hidrolítica dos derivados livre (CG 200)	57
Figura 4.7: Inativação térmica do derivado de celulase (Celluclast 1,5 L) a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	58
Figura 4.8: Inativação térmica do derivado de celulase (CG 200) a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	58
Figuras 4.9: Estabilidade térmica a 65 °C para as celulase livre e imobilizada ativados com glutaraldeído a 4 °C (A), (▲) enzima livre, (■) enzima imobilizada em quitosana 2,5% – alginato 2,5%, (●) enzima imobilizada em quitosana 2,5%.....	61
Figuras 4.10: Estabilidade térmica a 65 °C para as celulase livre e imobilizada ativados com glutaraldeído a 27 °C (B), (▲) enzima livre, (■) enzima imobilizada em quitosana 2,5% – alginato 2,5%, (●) enzima imobilizada em quitosana 2,5%.....	61
Figura 4.11: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glutaraldeído. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	63
Figura 4.12: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% - alginato 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glutaraldeído. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	63
Figura 4.13: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtido.....	64

Figura 4.14: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% - alginato 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	64
Figura 4.15: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol-amino. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	66
Figura 4.16: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% - alginato 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol-amino. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.....	66
Figura 4.17 Influência do pH na atividade enzimática (A), (●) enzima livre enzima imobilizada (■).....	67
Figura 4.18: Influência da temperatura na atividade enzimática (B), (●) enzima livre enzima imobilizada (■).....	67
Figura 4.19. Conversão do bagaço da cana-de-açúcar (60 °C e pH 4,8), enzima solúvel a 350 mg/L (■); enzima solúvel a 700 mg/L (●); enzima imobilizada em quitosana 2,5%-alginato 4,5% ativados com glicidol (1,7 mg de proteína/ grama de gel (▲).....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Composição de alguns resíduos lignocelulósicos.....	9
Tabela 2.2: Classificação dos suportes conforme a composição (Pereira, 1996).....	30
Tabela 2.3: Estabilidade térmica de enzimas imobilizadas em suportes de quitosana.....	36
Tabela 4.1: Valores das atividades enzimática (FPU/mL de extrato) e específica (FPU/mg de proteína) das enzimas livres, em pH 4,8 a 50°C em tampão citrato 50 mM por 1 hora de incubação (Mendels, 1969).....	54
Tabela 4.2: Valores de meia-vida e fator de estabilidade térmica (65 °C) para as enzimas comerciais utilizadas na forma livre.....	54
Tabela 4.3: Parâmetros de imobilização de celulase em quitosana 2,5% pH 7,0 a 27°C em suportes ativados com glutaraldeído 2,5% v/v com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel.....	58
Tabela 4.4: Parâmetros de imobilização de celulase em pH 7,0 a 4°C em suportes ativados com glutaraldeído com carga enzimática de 10 mg de enzima.g ⁻¹ de gel.	59
Tabela 4.5: Parâmetros de imobilização de celulase em pH 7,0 a 27°C em suportes ativados com glutaraldeído com carga enzimática de 10 mg de enzima.g ⁻¹ de gel.....	59
Tabela 4.6: Valores de meia-vida e fator de estabilidade (65 °C) para os suportes ativados com glutaraldeído com carga enzimática de 10 mg de enzima.g ⁻¹ de gel e enzima livre.....	60
Tabela 4.7 Influencia do pH durante imobilização da celulase ativada com glutaraldeído 2,5% v/v a 27°C com carga enzimática de 10mg de proteína /g de gel.....	62
Tabela 4.8: Caracterização dos derivados de celulase imobilizada a 27°C e pH 7,0 usando diferentes suportes com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel.....	62
Tabela 4.9: Caracterização dos derivados de celulase imobilizada a 27°C e pH 7,0 usando diferentes suportes com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel.....	64
Tabela 4.10: Caracterização dos derivados de celulase imobilizada a 27°C e pH 7,0 usando diferentes suportes com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel.....	65
Tabela 4.11: Conversão do bagaço de cana-de-açúcar a pH 4.8 a 50 °C.....	69

1 – Introdução

A crescente demanda por energia no mundo, que acelera o inevitável esgotamento das reservas petrolíferas mundiais, principal fonte de energia na Terra, tem como consequência o aumento no preço dos combustíveis fósseis, particularmente o petróleo. Assim, antes de se atingir o limite físico da exaustão, o uso do petróleo se verá inviabilizado pelo alto custo. Acrescente-se a isso o risco de colapso ambiental: a natureza vem sendo transformada em uma velocidade muito maior com que consegue se recompor. Torna-se premente, pois, em todos os países, a busca de fontes alternativas e renováveis de energia, as chamadas energias limpas. Nesse cenário, o uso de etanol produzido por fermentação de matérias-primas renováveis aparece como uma atraente fonte substitutiva aos combustíveis fósseis. (Schuchardt, 2001; Giordano, 2004).

Resíduos lignocelulósicos como o bagaço-de-cana e a palha de cereal moída são abundantemente produzidos no Brasil e estão disponíveis para utilização biotecnológica (Coelho *et al.*; 2001, Ramos, 2003). 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 cogeração de energia, uma prática muito utilizada nas usinas, com produção média em torno de 30 kW/h/tonelada de cana moída (MAPA, 2005).

Bagaço de cana é constituído basicamente de três polímeros: celulose (polímero de glicose), hemicelulose (cadeias ramificadas de açúcares, maioria aldopentoses, principalmente xilose) e lignina (polímero de fenilpropano) na proporção aproximada de 50:30:20. Uma tonelada de bagaço gera 192 kg de lignina, 500 kg de celulose e 250 kg de hemicelulose. (Coelho *et al.* 2001).

Celulose é um polissacarídeo constituído por cerca de quarenta cadeias glicosídicas unidas em um feixe compacto. Cada cadeia tem grau de polimerização em torno de 10000 unidades de glicose, unidas por ligações β -1,4. As muitas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares presentes na estrutura da celulose tornam esse polímero muito recalcitrante à hidrólise. A hemicelulose mais comumente encontrada na parede celular de plantas terrestres é a xilana, composta de resíduos de ligações β (1-4) D-xilopiranosídicas e que se apresentam na forma

de heteropolissacarídeos, contendo diferentes grupos substituintes nas cadeias centrais e laterais, sendo os mais comuns os grupos acetil, arabinosil e glucuronosil (Adsul *et al.*, 2004).

Dentro do moderno conceito de **'biorrefinaria'** a separação seletiva de frações constituintes de uma dada biomassa permite a utilização de cada fração para geração de produtos de alto valor agregado. Dessa forma, a celulose, hemicelulose e lignina presentes nos resíduos lignocelulósicos poderão gerar glicose, pentoses, principalmente xilose, e fenilpropano, os quais poderão ser transformados em diferentes novos produtos (Laser *et al.*, 2002; Lynd *et al.*, 1999; Garrote *et al.*, 2002; Giordano, 2004). A produção de etanol por fermentação da celulose requer sua separação dos outros dois componentes presentes e posterior hidrólise para geração de glicose.

Vários pré-tratamentos vêm sendo estudados para separação dos componentes do bagaço da cana e/ou hidrólise dos polímeros, os quais podem ser utilizados individualmente ou de forma combinada, pois todos têm aspectos positivos e negativos. Cozimento sob pressão hidrata nas regiões da celulose mais resistentes ao ataque ácido ou enzimático e descompressão rápida separa e expõe as fibras, mas pode induzir excessiva degradação da hemicelulose a furfural e derivados dependendo das condições operacionais utilizadas (Sasaki *et al.*, 2003); hidrólise ácida em condições severas é eficiente, mas gera produtos inibidores para o microrganismo que irá fermentar os açúcares (Gurgel *et al.*, 1998). Lignina é solúvel em solvente orgânico ou álcali a quente, mas esse tratamento envolve altos custos, preocupações ambientais adicionais e pode, no caso do tratamento alcalino, degradar a hemicelulose, gerando furfural, inibidor da fermentação. Tratamento mecânico por moagem facilita a separação das fibras, mas é caro, energeticamente intensivo. Por outro lado, celulases, um complexo de enzimas, podem hidrolisar celulose em condições suaves sem gerar subprodutos tóxicos. A hidrólise enzimática é, portanto, uma alternativa recomendável para a fermentação de materiais lignocelulósicos, após separação das frações. Nesse sentido, hidrólise controlada com ácido diluído pode romper ligações lignina-hemicelulose, extraindo hemicelulose e disponibilizando celulose para o ataque enzimático. Assim, cozimento rápido sob pressão de bagaço impregnado com ácido diluído com descompressão rápida parece ser uma alternativa promissora para disponibilizar os polímeros para o ataque enzimático (Emmel *et al.* 2003).

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 e xilanases, um complexo de endo e exoenzimas envolvidas na degradação de celulose e xilanas (Philippidis & Hatzis, 1997). Estudos indicam que até 60% do custo operacional do processo enzimático corresponde à reposição do complexo enzimático de celulasas, e muito esforço vem sendo investido na obtenção de enzimas mais baratas. Além disso, um dos principais problemas na hidrólise enzimática reside na necessidade de alta estabilidade térmica das enzimas para se trabalhar com altas temperaturas e assim atingir altas velocidades de reação e solubilidade dos reagentes.

A imobilização/estabilização de celulasas e xilanases 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 (Tyagi *et al.*, 1995, Naby-Abdel *et al*, 1997, Gama *et al*, 2002, Shen & Xia, 2004, Gu *et al*, 2005). A insolubilização das enzimas é tema que vem sendo estudado há vários anos. Messing, em 1975, por exemplo, já enumerava numerosas técnicas de imobilização então desenvolvidas tais como confinamento, adsorção, encapsulação, intercruzamento, união covalente, copolimerização. Essas eram soluções para a recuperação das enzimas e sua posterior reutilização. Não obstante, se mantinha o problema da baixa resistência à desativação, o que requeria um processo de estabilização adicional do derivado enzimático (enzima ligada a suporte insolúvel), etapa chave para estender sua aplicação na indústria.

A obtenção de derivados enzimáticos estabilizados é possível mediante o projeto de estratégias racionais de estabilização. A união da enzima ao suporte pode realizar-se através de seus grupos carboxílicos ou de aminos, sendo estes últimos os mais adequados pela sua reatividade, abundância e presença majoritária na superfície enzimática (Guisan, 1988). Aumentos maiores que 200 vezes na meia-vida da enzima imobilizada em relação à enzima solúvel podem ser obtidos (Tardioli *et al*, 2003 a, b). Assim, hidrólise do bagaço usando enzima imobilizada poderá atingir conversões superiores às obtidas com igual concentração inicial de enzima livre, pois enquanto esta última se desativa com o tempo a imobilizada continuará catalisando a reação de hidrólise.

A literatura reporta inúmeros suportes para imobilização de enzimas. Agarose vem sendo amplamente utilizada devido a sua alta área superficial e resistência mecânica. A

quitosana é um biopolímero obtido através da desacetilação da quitina, possuindo dois grupos funcionais reativos, amino e hidroxila, sendo utilizados como sítios de reação e coordenação. Na busca de melhores suportes para imobilização, os géis híbridos aparecem como alternativas interessantes (Taqiuddin *et al.* 2002). Híbridos de quitosana-alginato são relatados na literatura como suportes para imobilização de enzimas (Villalonga *et al.*, 2006). Alginato de sódio é um polissacarídeo extraído de algas marrons capazes de encapsular biomoléculas ou células (Dellacheire *et al.* 1996). Sendo a quitosana um polímero policatiônico e o alginato um polianiónico, as interações iônicas entre eles permitem formar géis rígidos (Huguet & Dellacherie, 1996).

Uma vez que no uso da enzima imobilizada para hidrólise de bagaço substrato e catalisador são insolúveis, o processo irá requerer ou o uso conjunto de parte da enzima livre, ou uma prévia liquefação, química ou enzimática do bagaço, como já ocorre na produção de etanol a partir de amido (Silva, 1980, Giordano *et al.*, 2000). O tratamento prévio a ser utilizado dependerá da estratégia global a ser utilizada para produção de etanol a partir do bagaço de cana.

Visando, pois, colaborar com o desenvolvimento de um processo economicamente viável de produção de etanol a partir de bagaço de cana, este projeto de dissertação teve como objetivo desenvolver um biocatalisador para hidrólise da celulose presente em compostos lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar. Procurou-se desenvolver um derivado imobilizado de celulase que fosse, ao mesmo tempo, estável e de baixo custo. Diante desta realidade, este trabalho se propôs a estudar a imobilização de celulase em quitosana e em suporte híbrido quitosana-alginato, usando diferentes métodos de ativação dos suportes e condições de imobilização.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Combustível fóssil: Petróleo com fonte de energia

As reservas mundiais de petróleo totalizam 1.147,80 bilhões de barris e o consumo deste combustível fóssil está estimado em 80 milhões de barris/dia (Padua, 2005). Importante ressaltar que nesse cálculo não foi contabilizada a tendência do crescimento no consumo dessa matéria-prima, o que leva à conclusão de que se não houver descobertas de novas reservas de petróleo este acabará dentro de 100 anos (Campbell, 1998). Portanto, é de se prever que antes do esgotamento das reservas o preço do petróleo ficará tão elevado que a sua utilização como combustível não seria mais interessante, denotando uma necessidade da obtenção de alternativas de recursos energéticos que permitam a substituição do petróleo (Shushardt, 2000; Ramos, 2003; Giordano, 2004). Além disso, as questões sociais (emprego, renda, fluxos migratórios) e ambientais (mudanças climáticas, poluição) reforçam a necessidade do uso de combustíveis produzidos a partir de biomassa.

Estudos já apontam que, a utilização da biomassa para fins energéticos vem tendo uma participação crescente na matriz energética mundial, estimando-se que até o ano de 2050 deverá dobrar o uso mundial de biomassa disponível (Fischer, 2001), considerando-se que o crescimento da demanda por agroenergia nos países desenvolvidos ocorrerá principalmente em função da exigência da sociedade pela substituição de combustíveis fósseis, fundamentada em questões ambientais.

As pesquisas mostram que a concentração de CO₂ atmosférico teve um aumento de 31% nos últimos 250 anos. Os números tendem a aumentar significativamente se as fontes emissoras de gases que causam efeito estufa sendo uma das mais importantes a queima de combustíveis fósseis não forem controladas. Um dos avanços para tomada de decisão foi à criação do Protocolo de Kyoto, discutido e negociado no Japão em 1997, que estabelece o compromisso de diversos países de, a partir de 2005, reduzir a emissão dos gases que provocam o efeito estufa em cerca de 5,2% até 2012 em relação aos níveis mensurados em 1990.

Outros acordos, como a Diretiva para Obtenção de Eletricidade de Fontes Renováveis do Parlamento Europeu, são instrumentos indutores do uso da bioenergia. Assim a exaustão de fontes não renováveis e as exigências devido a aspectos ambientais devem acarretar maior

aproveitamento energético de biomassa, matéria orgânica de origem animal ou vegetal que é considerada uma fonte de energia renovável e menos poluente que as de origem fóssil.

2.2 – Biocombustível: Uso da biomassa na geração de energias renováveis

A utilização de combustíveis renováveis tem despertado um interesse cada vez maior em todo o mundo. Os impactos positivos do uso dos combustíveis renováveis, em substituição aos fósseis, não se restringem apenas ao campo econômico, mas também a questões estratégicas e ambientais. Além de reduzir a dependência externa de petróleo e os gastos com energia, o uso de tais combustíveis resulta em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera. Esse último aspecto constitui um apelo cada vez maior para a substituição dos derivados de petróleo pelos assim chamados "biocombustíveis". A procura por substitutos para o petróleo e matéria-prima para a indústria química é tema de projetos entre vários centros de pesquisas. O preço do barril de petróleo no segundo semestre de 2006 era cerca de US\$ 70, este alto preço torna o etanol e biodiesel economicamente viáveis no setor energético. Segundo previsões, o consumo de petróleo irá aumentar significativamente até por volta do ano 2014, quando então o preço do barril deverá subir tanto que forçará a diminuição do consumo (Evans, 1999). Nesse contexto, busca-se tecnologias para a substituição do petróleo como fonte de insumos e energia. Em princípio, os combustíveis fósseis, como o gás natural e o carvão mineral, podem ser utilizados e poderiam substituir o petróleo (Campbell, 1998). Porém, eles são de difícil transformação em matéria-prima para a indústria química e não iriam resolver o outro grande problema relacionado com o petróleo: o impacto ambiental devido à formação de CO₂ e gases sulfurados na sua queima ou transformação. Para um país tropical como o Brasil, o substituto natural para o petróleo é a biomassa (Schuchardt, 2000).

As principais fontes de biomassa provêm dos resíduos agrícolas, madeira e plantas como a cana-de-açúcar e palha de cereais. Portanto materiais lignocelulósicos se tornam interessantes para produção de energias renováveis reduzindo a poluição, pois são formadas a partir de CO₂ e H₂O, aproveitando a energia solar (Cortez, 1997). Considerando-se que 1 tonelada de biomassa corresponde a aproximadamente 2,9 barris de petróleo (valor calorífico médio do petróleo = 10000 kcal/kg; biomassa base seca = 4000 kcal/kg) (Compet, 1999), o Brasil precisa atualmente de 1.800.000 barris de petróleo por dia (90 x 10⁶ toneladas de

petróleo por ano) (Compet, 1999; Amoco, 1999). Isso poderia ser suprido por 225×10^6 toneladas de biomassa por ano. Levando em conta que no mundo são produzidas cerca de 100×10^9 toneladas de biomassa por ano (Kuhad, 1993), e que a produção no Brasil é da ordem de 21×10^9 toneladas de biomassa por ano, seria necessário somente 1% da biomassa produzida anualmente no Brasil para substituir o petróleo, não exigindo devastação ou qualquer outra forma de agressão às florestas (Cortez, 1997). Os recursos renováveis representam cerca de 20% do suprimento total de energia no mundo, sendo 14% proveniente de biomassa e 6% de fonte hídrica. Segundo dados do Balanço Energético Nacional (edição 2003), a participação da biomassa na matriz energética brasileira é de 27% - incluindo lenha e carvão vegetal (11,9%), bagaço de cana-de-açúcar (12,6%) e outros (2,5%). Na Europa e América do Norte a preocupação com fontes alternativas de insumos é muito grande. Como exemplo, citamos a realização da conferência Biomass for Energy and Industry, que ocorre a cada dois anos na Europa. Isso envolve principalmente países onde a fotossíntese é desfavorecida em função da localização geográfica (Kyritsis, 2000).

Os componentes da biomassa precisam ser separados antes da sua transformação em substâncias químicas para geração de produtos de altos valores agregados. Neste contexto, o conceito de '**biorefinaria**' tem por base a separação seletiva de frações constituintes de uma dada matéria prima, *a Biomassa*, de acordo com suas características químicas e dos produtos a serem obtidos (Laser *et al.*, 2002; Lynd *et al.*, 1999; Garrote *et al.*, 2002). A figura 2.1, apresenta um esquema geral de uma biorrefinaria ilustrando novas rotas e transformações, aplicação de novas tecnologias, surgindo assim o conceito 3R, que significa: **Reduzir (R1)**, o impacto ambiental através de novos processos, novos catalisadores e projetos de novos equipamentos com o intuito de otimizar e aumentar a eficiência de processos "clássicos", pois maiores conversões implicam menores volumes de rejeito; **Reutilizar (R2)**, toda a forma de matéria-prima, desde as nobres até os rejeitos industriais para geração de novos produtos e energia, fazendo que gradativamente a matriz energética seja acrescida de mais fontes renováveis; **Reciclar (R3)**, não apenas o produto, mas a também a própria biosfera, utilizando a bioremediação frente aos impactos ambientais (Giordano, 2004).

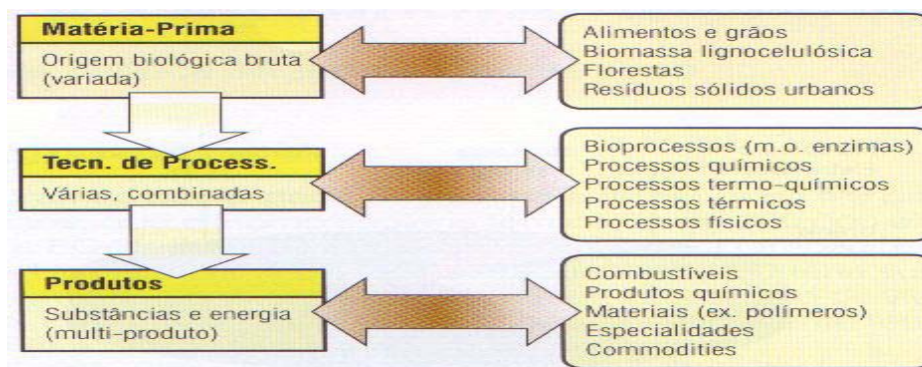


Figura 2.1: Esquema geral de uma biorrefinaria utilizando diferentes tipos de biomassa (Giordano, 2004).

Entre as matérias-primas renováveis de grande interesse tecnológico, encontram-se os materiais lignocelulósicos, principalmente sob a forma de resíduos agroindustriais e florestais, constituídos por três frações fundamentais. A fração mais abundante é a celulose, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose. O grau de ordenação da celulose resulta numa alta cristalinidade, que se traduz na resistência ao ataque hidrolítico. Uma segunda fração, denominada hemicelulose, apresenta composição heteropolissacarídica e é constituído por vários açúcares, cujas proporções dependem da origem do material. No entanto, na hemicelulose da maioria dos resíduos agroindustriais verifica-se a presença de pentoses, em particular xilose e arabinose, configuradas numa cadeia facilmente hidrolisável. Por último encontram-se álcoois aromáticos polimerizados, constituindo a fração denominada lignina, que unida à hemicelulose envolve a matriz celulósica (Sun, 2002). A figura 2.2, apresenta uma biorrefinaria utilizando materiais lignocelulósicos para produção de vários de produtos de interesse.

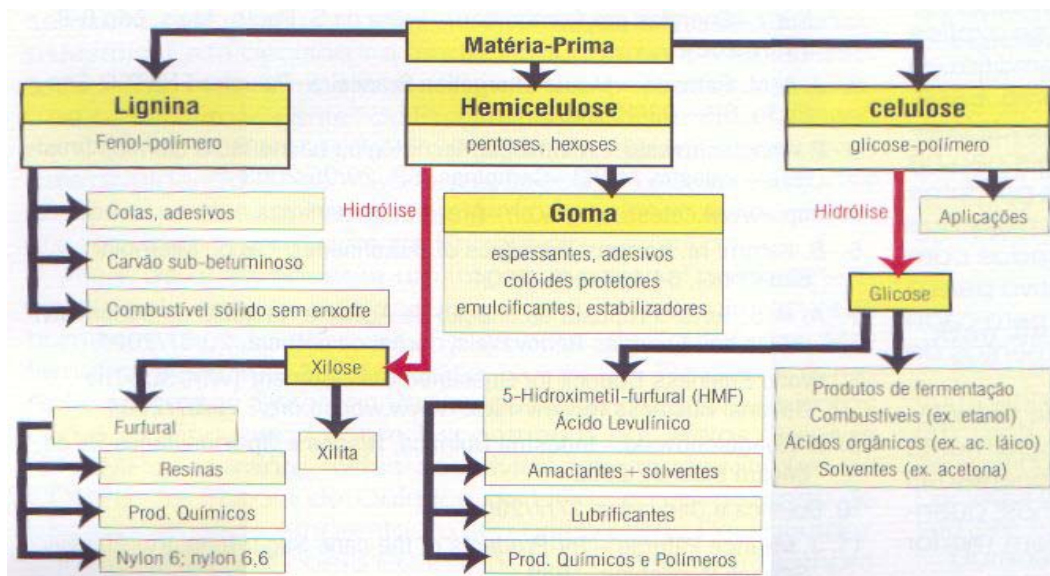


Figura 2.2: Esquema de uma biorrefinaria utilizando materiais lignocelulósicos (Giordano, 2004).

Como observado na figura 2.2, os compósitos lignocelulósicos constituem uma matéria-prima renovável e abundante para produção de produtos químicos e seus recursos disponíveis (celulose, hemicelulose e lignina) como discutidos, a Tabela 2.1, ilustra a composição de celulose, hemicelulose e lignina de algumas fontes lignocelulolíticas (Rodrigues, 1988).

Tabela 2.1: Composição de alguns resíduos lignocelulósicos.

Fonte	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Lixo urbano	61	2	9
Madeira mole	45 a 50	25 a 35	25 a 35
Madeira dura	40 – 55	24 a 40	18 a 25
Bagaço de cana-de-açúcar	25 a 40	25 a 50	10 a 30

2.3. Processamento das frações lignocelulolíticas produzidas por biorrefinaria

A celulose é utilizada na produção de polpas celulolíticas e na obtenção de fibras naturais como algodão, rayon e tencel. Sua transformação em insumos químicos ocorre a partir da glicose obtida pela sua hidrólise. Esta glicose pode ser fermentada para etanol, e por sucessivas reações químicas fornece etileno, buteno (dimerização de etileno), propileno (metátese de buteno com etileno), butadieno (via acetaldeído, processo da Coperbo) e ácido acrílico (via ácido láctico). Através de outros processos de fermentação pode-se ainda obter butanol, isopropanol, 2,3-butadienol, glicerol, acetona, ácido acético e ácido butírico. A hidrólise da glicose com ácidos diluídos leva ainda ao hidroximetilfurfural, que pode ser clivado em ácido levulínico (ácido g-ceto-pentanóico) e ácido fórmico. O ácido levulínico pode ser um interessante insumo para poliésteres (Schuchardt, 2000). A figura 2.3, ilustra a utilização da fração celulósica produzindo vários produtos químicos por diferentes vias reacionais.

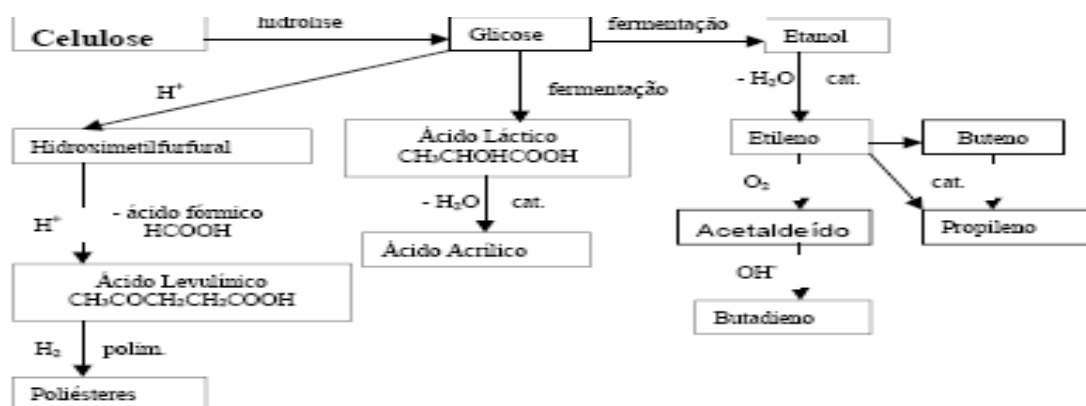


Figura 2.3: Produção de produtos químicos por diferentes vias reacionais a partir da hidrólise da celulose. (Schuchardt, 2000)

A pré-hidrólise em condições suaves hidrolisa as hemiceluloses em açúcares, formando principalmente pentoses que podem ser fermentados, obtendo-se etanol. Se as hemiceluloses forem separadas por explosão a vapor (tratamento com vapor superaquecido e despressurização rápida), obtém-se furfural como produto principal, que forma resinas com fenol ou uréia, ou pode ser hidrolisado a ácido maleico (Silva, 1995; Mckillip, 1989). Pode-se

ainda produzir, por hidrogenação catalítica, xilitol (umectante, adoçante, plastificante, aditivo de alimentos) a partir de xilose (Melaja, 1977), manitol (adoçante, plastificante, secante) a partir de manose (Dwivedi, 1991). A figura 2.4, mostra as etapas de transformação da hemicelulose em produtos de valores agregados através de vários processos.

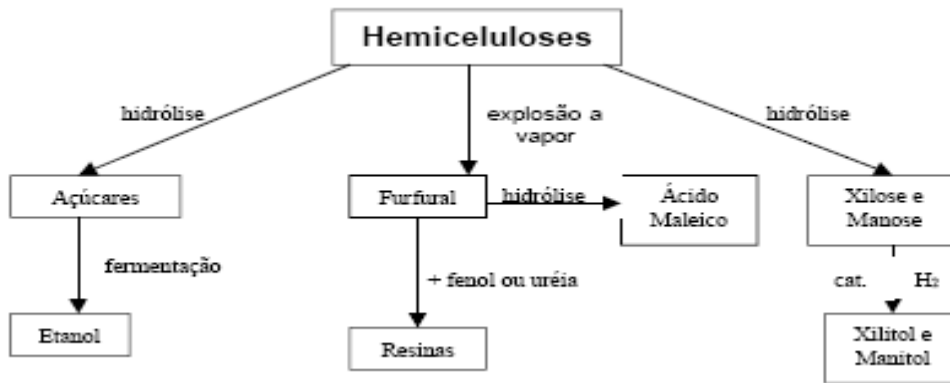


Figura 2.4: Formação de vários produtos a partir a hemicelulose, utilizando a hidrólise e explosão a vapor (Schuchardt, 2000).

As ligninas são mais hidrofóbicas e podem ser transformadas em óleos com características semelhantes ao petróleo através da hidrogenólise (Costa, 1989). Processos pirolíticos, que fornecem fenol e ácido acético como produtos principais, são provavelmente mais interessantes para a indústria química (Greudenberg, 1941). Processos oxidativos também fornecem fenol, vanilina e lignina oxidada como produtos principais (Gonçalves, 1995). Ligninas podem ainda ser utilizadas com vantagem na produção de resinas fenol-formaldeído (Benar, 1996). Ligninas também são adequadas para gaseificação com oxigênio (Schuchardt, 2000), fornecendo gás de síntese, que é essencial na produção de metanol, que pode ser utilizado como composto chave para a produção de uma grande variedade de produtos químicos. A figura 2.5 mostra a síntese de vários produtos de alto valor agregado como fonte os resíduos lignocelulósicos a partir da lignina através de várias vias reacionais.

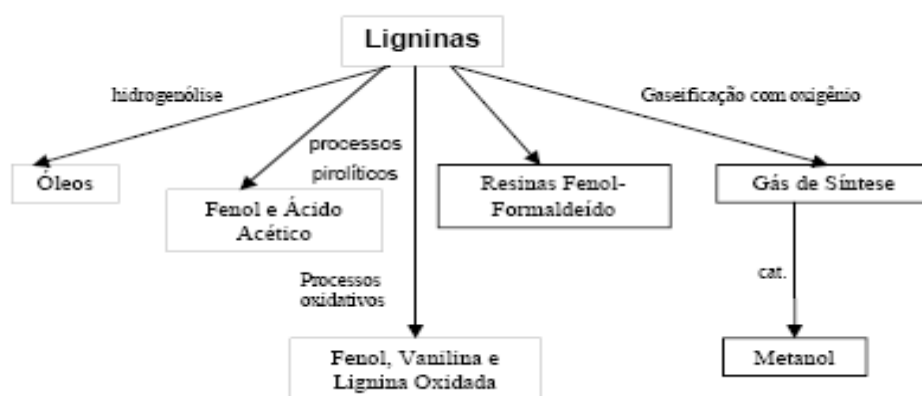


Figura 2.5: Síntese de novos produtos a partir da lignina proveniente de resíduos lignocelulósicos (Schuchardt, 2000).

2.4 – 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 oriunda da indústria sucroalcooleira. Nas últimas safras a produção superou os 100 milhões de toneladas. Destes, entre 6% e 10% não tem uma destinação apropriada (MAPA, 2005). Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 230 kg de bagaço (Santana e Souza,1984). A composição química do bagaço integral é de 46,0% de celulose, 25,2% de hemicelulose e 20,7% de lignina (Bofo, 2005).

Uma das formas de utilização desse resíduo é cogeração de energia através da queima do bagaço em caldeira, sendo uma prática tradicional em todo o mundo. No Brasil para cada 1 tonelada de cana moída é produzida cerca de 30 kW/h de energia. A cogeração de energia através do bagaço irá certamente melhorar a economicidade da produção sucroalcooleira, aumentando a competitividade do álcool carburante. Portanto existe um excedente de 16 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar que podem ser utilizado para produção de produtos de interesse como o biocombustível (bioetanol), tecnologia desenvolvida pela Dedini com parceria da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP. A “DHR”, Dedini Hidrolise Rápida como é chamada, baseada na hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de etanol. Em palestra proferida por José Luiz Olivério, vice-

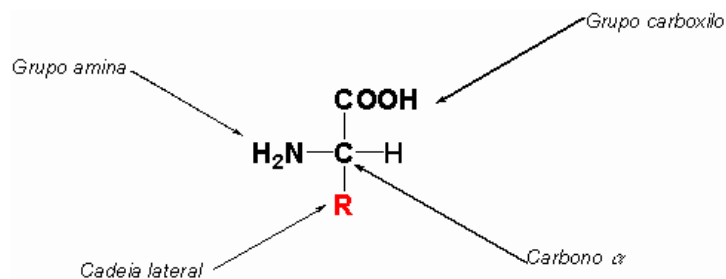
presidente de operações da Dedini, em uma palestra proferida no Seminário Internacional de Biocombustíveis, em Brasília, em abril de 2006, como exemplo do potencial da tecnologia, foi detalhado: com um hectare de cana, é colhido 80 toneladas de cana limpa, Essas 80 toneladas produzem, pelo processo convencional, 6.400 litros do etanol hidratado. 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 linina a quente com solvente orgânico ou álcali, entre outros. Dependendo da severidade do processo utilizado o tratamento pode gerar grande quantidade de sub-produtos tóxicos aos microrganismos que irão utilizar os açúcares produzidos. Por outro lado um complexo de enzimas, celulasas e xilanasas, pode catalisar essa hidrólise em condições suaves de reação, sem geração de sub-produtos.

Evidentemente, será necessário um pré-tratamento do material para facilitar a ação das enzimas, mas esse deve ser suave. Ramos (2003) 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.

2.5 - Catalisadores enzimáticos

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações bioquímicas. Enzimas em sua totalidade são proteínas, com exceção de alguns grupos de moléculas de RNA (Gama, 2003). As figuras 2.6 e 2.7 ilustram consecutivamente a estrutura geral de um aminoácido e formação uma proteína. Para formar proteínas, os aminoácidos se ligam através das chamadas *ligações peptídicas*, ligação dos grupos amino de um aminoácido e carboxila de outro, com eliminação de uma molécula de água. As propriedades funcionais das enzimas dependem essencialmente do número dos resíduos desses aminoácidos e a sua atividade catalítica, da integridade conformacional da proteína ativa. Portanto, a atividade é perdida caso esta enzima sofra alterações em sua conformação estrutural. Para serem ativas, algumas não requerem nenhum outro grupo químico além de seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem componentes químicos denominados cofatores. Um cofator pode ser um ou mais íons inorgânicos tais como: Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} ou um grupamento orgânico chamado de coenzimas. Algumas enzimas requerem ambos para exercer sua atividade. Uma enzima completa, cataliticamente ativa, unida a sua coenzima e/ou grupo inorgânico é chamada holoenzima, já a parte exclusivamente protéica é denominada apoenzima (Lehninger, 1999).



2.6: Representação da estrutura geral de um aminoácido.

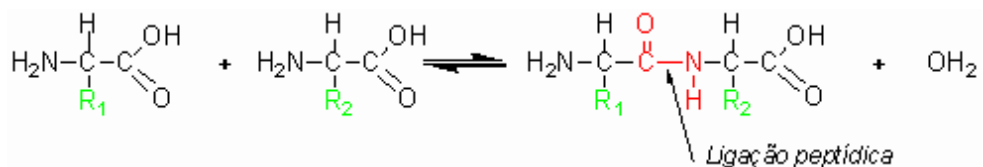


Figura 2.7: Ligação peptídica entre as moléculas de aminoácidos formadores das enzimas.

Enzimas como catalisadores biológicos são extremamente eficientes, podendo acelerar em média de 10^9 até 10^{12} vezes a velocidade da reação. Essa velocidade é função da concentração de substrato e geralmente seguem cinética de Michaelis-Menten, onde a velocidade da reação é função hiperbólica da concentração de substrato. Dessa forma, torna-se importante medir a atividade da enzima sob condições padrão, ou seja, mesmo pH, temperatura, força iônica e concentração de substrato de modo a permitir a análise comparativa de resultados (Gonçalves, 2001).

Para que esses processos sejam possíveis, a enzima é dotada de um ambiente específico em sua estrutura tridimensional na qual a reação é energeticamente mais favorável. A reação catalisada pela enzima ocorre confinada numa espécie de “bolso” denominado sítio ativo, ao qual se liga o substrato para formar o complexo enzima-substrato, servindo-se de alto grau de especificidade da enzima. A estrutura molecular alterada muda a conformação do sítio ativo e conseqüentemente inibe a atividade catalítica da enzima. As enzimas têm um pH ótimo de atividade, então, a alteração deste para cima ou para baixo, alterará a conformação de cadeias laterais de aminoácidos que agem como ácido ou base fracos que modificam diretamente o sítio ativo da molécula. Temperaturas altas, geralmente acima de 37°C modificam a estrutura de cadeia dos aminoácidos constituintes das enzimas. A força iônica é muitas vezes ignorada, mas está intimamente ligada ao pH. Portanto, a força iônica de uma solução tampão deve ser utilizada usando sais neutros e não inibitórios como o KCl ou NaCl. Geralmente, sais que aumentam a solubilidade de aminoácidos facilitam a inativação da enzima (Gonçalves, 2001).

A introdução de novas técnicas de engenharia de proteínas e pela tecnologia do DNA recombinante através da grande área da Biotecnologia têm revolucionado o desenvolvimento de novas enzimas industriais permitindo a modificação de propriedades cinéticas e da estabilidade, o desenvolvimento de novas soluções ao nível da tecnologia de reatores enzimáticos e das técnicas de imobilização. A utilização de enzimas vem de encontro aos pressupostos da chamada Química Verde. O crescimento no mercado de enzimas é de aproximadamente 4-5% ao ano, acompanhada pela redução de preço devido ao grande número de empresas que vem comercializando enzimas com preços mais competitivos. 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 (Rajan, 2004)

2.6 – Enzimas celulolíticas

Celulases são capazes hidrolisar a celulose, que é a matéria-prima mais abundante do planeta, a principal fonte de carbono (Zhang, 2006), sendo encontradas nas paredes celulares de vegetais. Apresenta-se na forma amorfa e cristalina (Ramos, 2003). A figura 2.8, ilustra uma célula vegetal evidenciando a forma estrutural da celulose, polímero em maior quantidade na composição de uma célula vegetal.

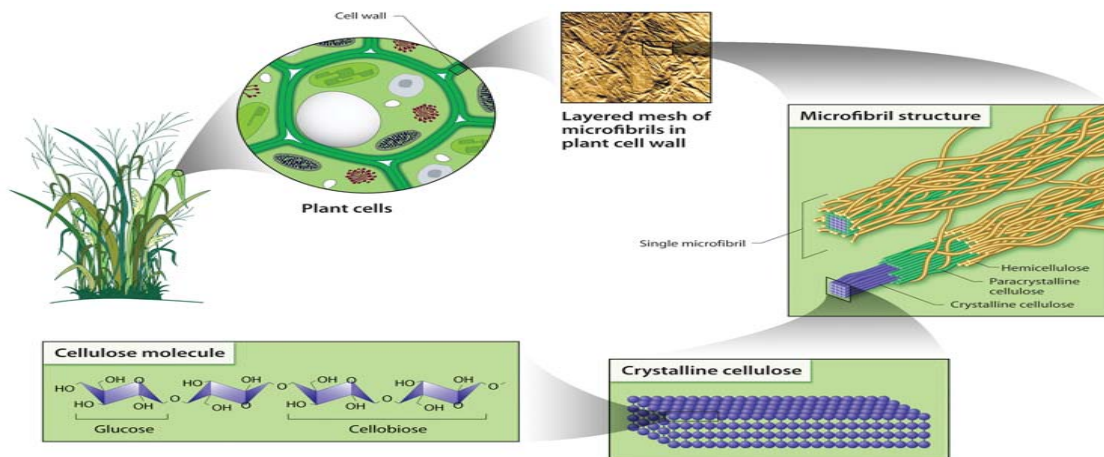
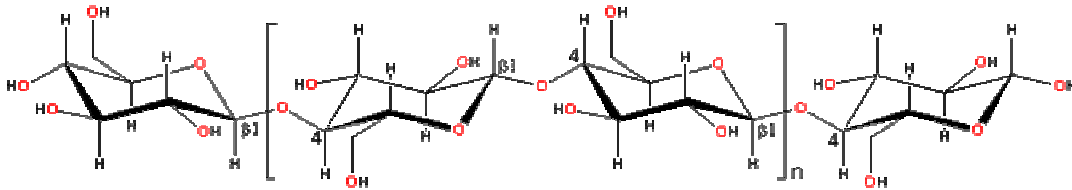


Figura 2.8: Célula vegetal, representando as fibras de celulose, hemicelulose em estrutura.

Do ponto de vista químico, a celulose é um polissacarídeo composto de unidades β -D-glicopiranosil, ligados por pontes β -(1,4), formando um polímero linear (Ramos, 2003; Lynd, 2004). A figura 2.9 apresenta a estruturas linear da celulose.



2.9: Cadeia linear polimérica da celulose, mostrando as ligações β -1,4 das unidas β -D-glicopiranosil.

A celulase é classificada como sendo uma hidrolase e segundo a nomenclatura enzimática (E.C. 3.2.1), hidrolases *O*-glicosídicas são baseadas em sua especificidade ao substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. De acordo com a nomenclatura, o número 3 refere-se à hidrolases; 3.2 glicosilases e 3.2.1. glicosidases, isto é, enzimas que hidrolisam compostos *O*-glicosil ou *S*-glicosil. Atualmente as hidrolases glicosídicas são agrupadas em 87 famílias (Wulff, 2002). A figura 2.10, apresenta a estrutura de uma celulase de *Trichoderma reesei*.



Figura 2.10: Celulase de *Trichoderma reesei* (Sandgren et al, 2005).

A conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa árdua, devido à natureza física do substrato. Na sua forma nativa, a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, chamadas de microfibrilas, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Essas fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz a acessibilidade às enzimas celulolíticas (Béguin, 1990). A figura 2.11, ilustra as pontes de hidrogênio formando redes/fibras cristalinas insolúveis.

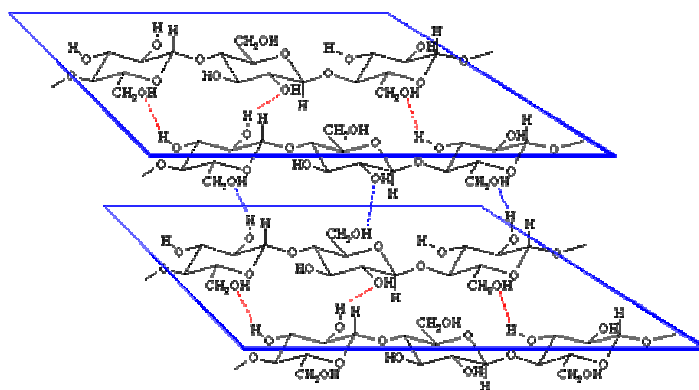


Figura 2.11: Fibras cristalinas de celulose, ilustrando a influência das pontes de hidrogênio (www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/26a.htm).

Na hidrólise da celulose é necessário um consórcio de enzimas: endoglucanase, exocelulases, β -glucosidase, descritas na literatura como tendo uma ação sinérgica entre elas (Monti, 1989; Nidtzky *et al.*, 1994; Tanner, 2002; Wulff, 2002). Este grupo reúne:

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

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

III - β -Glicosidases (EC 3.2.1.21), conhecida como celobiasas . Catalisa a hidrólise de resíduos β -D-glicose terminais não redutoras, liberando β -D-glicose. Apresentam ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -galactosídeos, α -L-arabinosídeos, β -D-xilanosídeos.

As endoglucanases e as celobiohidrolases degradam celodextrinas solúveis e celulose amorfa, enquanto somente as celobiohidrolases, com notáveis exceções, degradam a celulose cristalina eficientemente (Shülein, 1998 apud Wulff, 2002).

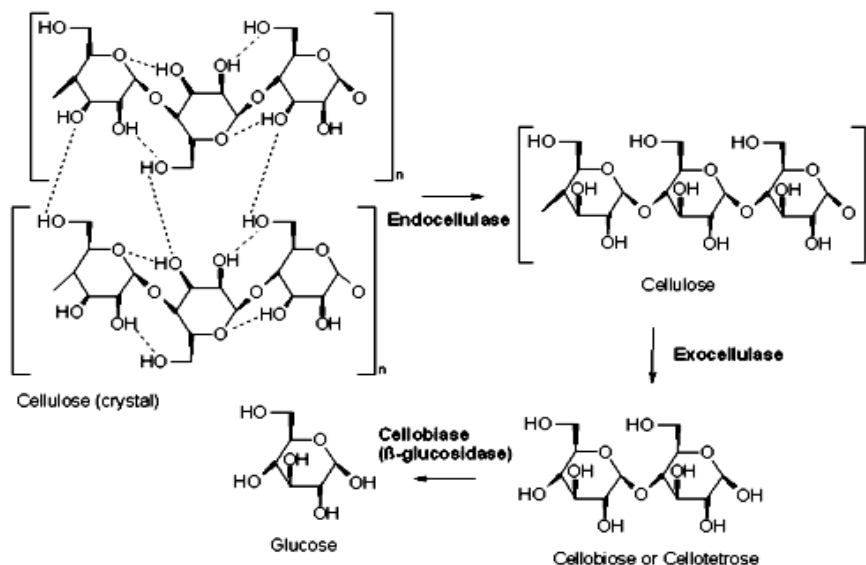


Figura 2.12: Mecanismo da degradação da celulose e o sinergismo do complexo enzimático.

Na figura 2.12, é representado o mecanismo da degradação da celulose e pode verificar o sinergismo das enzimas. A endocelulase quebra aleatoriamente a cadeia polimérica, posteriormente a exocelulase quebra o final dessa cadeia em um dímero de glicose

(Celobiose). Por último, a β – glicosidase converte a celobiose em glicose (Saddler, 1986 apud Wulff, 2002).

As hidrolises enzimáticas das pontes glicosídicas ocorrem através de catálise ácida geral, onde são necessários dois aminoácidos críticos, um doador de prótons (ácido) e um nucleófilo. A catálise ácida é usualmente promovida pelos resíduos aspartato ou glutamato, ou em ambos resíduos (Gilkes *et al.*, 1991 apud Wulff, 2002). Nesta catálise, ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando em inversão ou retenção da configuração anomérica do átomo de carbono do glicosídeo hidrolisado (Davies *et al.*, 1995 apud Wulff, 2002). A figura 2.13, apresenta o esquema reacional da β -glicosidase.

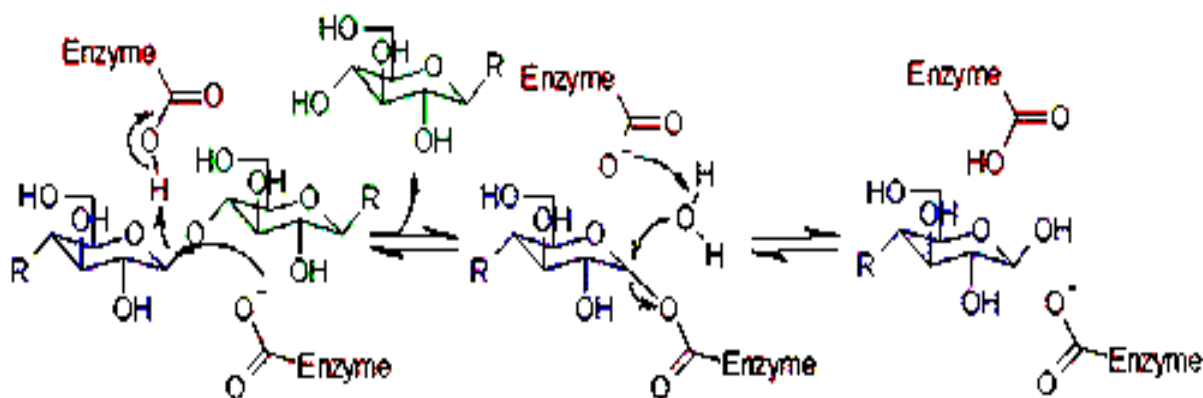


Figura 2.13: Clivagem da celobiose catalisada pela enzima β -glicosidase.

As celulasas apresentam múltiplos domínios, podendo possuir domínios catalíticos ligadores de celulosas e seqüenciadores de ligações (Gilkes *et al.*, 1991 apud Wulff, 2002). As enzimas dos domínios são menos variáveis do que as dos domínios com atividade catalítica, pois nos domínios com atividade catalítica conferem diferenças sutis na especificidade e no mecanismo (Gilkes *et al.*, 1991 apud Wulff, 2002). Embora os domínios ligadores de celulose não sejam essenciais para a atividade catalítica, eles modulam a atividade específica das enzimas em substrato celulolíticos solúveis e insolúveis. Segundo Tomme *et al.*, 1995 apud Wulff, 2002 os domínios ligadores de celulose são identificados como módulos ligadores de carboidrato e são definidos como uma seqüência de aminoácidos avizinados, dentro de uma enzima ativa sobre carboidrato e sua estrutura terciária independe da estrutura do domínio catalítico.

Enzimas com seqüências similares às dos domínios catalíticos apresentam diferentes especificidade (exo ou endo), o que sugere que a atividade seja consequência de detalhes na estrutura tridimensional da proteína (Wulff, 2002). Gilkes *et al.*, 1991 apud Wulff, 2002 pesquisou a produção de hidrolases glicosídicas de *Caldocellun saccharolyticum* e observou que para as endoglicanase CelB tem-se um domínio exoglicanase N-terminal e outro domínio C-terminal, na qual pertencem a diferentes famílias, tornado-a uma enzima bifuncional. Estudos realizados por Béguin, 1990 mostraram que os microrganismos degradadores de celulose cristalina secretam sistemas complexos de celulasas e tais sistemas são compostos de uma variedade de enzimas com especificidade e modo de ação diferenciada, as quais agem em sinergia hidrolisando a celulose. Henrissat *et al.*, 1985 afirmaram que as enzimas endoglicanases e celobiohidrolases mostram diferentes tipos de sinergias na hidrólise da celulose cristalina, verificando outros tipos de ações sinérgicas das endoglicanas e β -(1,4)-celobiohidrolases enquanto Béguin, 1990, estudou os mecanismos de síntese de celulasas demonstrando dois tipos de mecanismos que controlam a síntese e secreção da celulase. Na maioria dos organismos, a produção é reprimida na presença de altas concentrações de fonte de carbono prontamente metabolizáveis. Em diversos sistemas, a síntese de celulase é regulada pela celobiose, que são geradas a partir da degradação da celulose por pequenas quantidades de celulasas. Pesquisas a respeito da capacidade hidrolítica das celulasas, observaram que algumas são capazes de efetuar transglicosilação que é a formação de trímeros e tetrâmeros a partir de celobiose, verificando a capacidade transglicosídica de uma celulase de *Trichoderma viride* (Naby-Abdel,1997)

2.7- Microrganismos produtores de celulase

A literatura reporta vários microrganismos produtores de celulase, portanto o trabalho de seleção mais idôneo para produção de celulase extracelular foi desenvolvido pelo grupo de Natick da U.S Army Research and Development Comand em Natick, laboratório norte americano que se interessou nos estudos de microrganismos celulolíticos (Monti, 1989). Esse grupo destacou como o principal microrganismo promissor para produção de celulase o fungo filamentoso *Trichoderma viride* (Resse, 1976 apud Monti, 1989; Agbhevor, 2004). Os estudos se basearam em comparações como diversas espécies produtoras na qual o grupo de Nitick possuía um acervo de mais de 14.000 cepas de microrganismos isolados de materiais

celulolíticos em decomposição e relataram ao final do estudo que a celulase não era uma entidade simples, mas um complexo de enzimas.

Alguns microrganismos poderiam consumir rapidamente todas as formas de celulose, enquanto que outro não. Foi verificado também, que a produção dessa enzima é relativa, muitos microrganismos produzem grandes quantidades outros pouquíssimas. Verificou-se que das enzimas extracelulares produzidas, algumas poderiam degradar apenas algodão e derivados solúveis de celulose enquanto outras enzimas poderiam somente degradar apenas derivados de celulose (Resse, 1976 apud Monti,1989). Wen *et al.*, (2004) utilizaram *Trichoderma reesei* para produção de celulase. O estudo teve interesse na degradação da forragem pela indústria leiteira através da digestão anaeróbica para conversão de produtos bioenergéticos. Alguns trabalhos apresentam como produtores de celulase *Aspergillus niger*, por exemplo, Kim *et al.*, (2004) pesquisaram a produção de celulase e hemicelulase em fermentação em estado sólido usando como substrato diferentes concentrações de palha de arroz e farelo de trigo.

2.8 - Aplicações biotecnológicas da enzima celulase

Há várias aplicações da celulase em processos biotecnológicos na qual em sua grande maioria são utilizados fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* para degradação de materiais lignocelulolíticos e a enzima livre comercialmente disponível (Wen *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2004). As indústrias de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, medicina, química fina, agroindústria e de alimentação animal e silagem vem 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 lignocelulolítica atrai as atenções de pesquisadores em busca de energia alternativa (Sheng, 1998; Agbhevor, 2004). Kim *et al.*, (2004), propuseram a fermentação em meio sólido da palha de arroz e farelo de trigo por *Aspergillus niger* para produção de etanol. Tal processo consiste em hidrolisar os materiais lignocelulolíticos reduzindo-os principalmente em glicose e xilose e transformá-los posteriormente em caldo de açúcares para bioconversão em etanol (Heleng, 2001 apud Kim, 2004). Outras aplicações da hidrólise enzimática são descritas por Kuhard e Singh (1993), que

pesquisaram o uso de vários substratos para a produção de produtos químicos (polifenóis, ácido orgânicos) e solventes orgânicos (acetona, butanol) (Sheng, 1998).

As enzimas celulolíticas são usadas como aditivos biológicos na preparação de silagem (Islan, 2001). Mühlbach *et al.*, (2000), utilizaram celulase como aditivo biológico para melhoramento da fermentação da alfafa e na melhoria da qualidade da silagem. Lopes *et al.*, (2002) complementou celulases em rações animais para melhoramento da digestibilidade de leitões utilizando como fonte farelo de arroz integral.

Na indústria têxtil as celulases são capazes de tornar os tecidos mais lisos e macios, degradando as fibras da superfície. Também são usadas no tratamento de jeans para dar a aparência nos tecido Denim (Dienes, 2004).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam ainda dos processos de produção de vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (Orbeg, 1981 apud Rugger, 2004). Estudos voltados à ação e produção da celulase também são verificados na literatura. Xia *et al.*, (2003) estudou o pré-tratamento de resíduos de derivados de milho como fonte de substrato, Kansoh *et al.*, (1998), utilizou bagaço da cana-de-açúcar na preparação de novos derivados celulolíticos. Resíduos fibrosos de soja são aproveitados como substrato para a produção de enzimas celulolíticas e produtos de valor agregado *por Lactobacillus subtilis* isolados da água e do solo da região amazônica (Ayab *et al.*, 2002).

2.9 - Tecnologia enzimática em processos biotecnológicos: Imobilização de enzimas

O elevado custo das enzimas torna difícil viabilizar-se economicamente a utilização de enzima livre em bioprocessos industriais, portanto, os processos biotecnológicos utilizando microrganismos produtores de enzimas celulolíticos se tornam atraentes, mas devido à biota nele existente a contaminação microbiológica é um fator predominante na escolha do bioprocessos (Xia, 2003; Wen, 2004; Kim, 2004; Nako, 2006). Trabalhos para otimizações de processos enzimáticos vêm sendo explorados por inúmeros centros de pesquisa, e uma das tecnologias empregada é a imobilização de enzimas e células. As principais vantagens obtidas

pelo processo de imobilização 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, bem como o aumento de sua estabilidade. 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 (Arroyo, 1998; Vitolo, 2001; Gama, 2003). Portanto a 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 (Bickerstaff, 1995).

A prática de se imobilizar enzimas e células vem se expandindo extensivamente nos últimos 30 anos na medida em que seus benefícios vêm sendo reconhecidos para aplicações analíticas, médicas e em biotransformações. Demonstra-se que nos casos onde o uso de enzima imobilizada foi possível, os custos de processo diminuíram em cerca de 50%, tal como observado por Chibata *et al.*, 1976, na separação de racemados de aminoácidos com aminoacilase imobilizada em DEAE-Sephadex-A-25; Sheng (1998) imobilizou a enzima celulase em membrana polimérica como o objetivo de diminuir os custos operacionais modificando a celulase com PAN, observando ganhos nas estabilidades frente ao pH e temperatura; Villalonga, 2001 estudou a estabilização de celulase conjugada com quitosana ativada com periodato; Xia 2003 imobilizou celulase (esporos de *A. niger*) em géis se alginato de sódio para conversão de materiais lignocelulósicos em açúcar solúveis. Sheng, 2004 estudou a imobilização da celulase em nanofibras de PVA. Gu *et al.*, 2005 imobilizou a celulose em géis de quitosana obtendo valores significativos de fator de estabilidade térmica. Nakao, 2006 imobilizou 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.

Em conseqüência disso houve a expansão das técnicas de imobilização, que buscam melhor adaptar-se às variabilidades individuais de cada enzima (Bickerstaff, 1995). Apesar de muita pesquisa realizada nos últimos anos acerca das variadas formas utilizadas para imobilizar enzimas, não se chegou a uma padronização de qual método ou material é o ideal

para cada tipo de imobilização. O uso e a aplicação da enzima imobilizada irão definir as características requeridas ao conjunto suporte e método de imobilização, mensuradas de acordo com os seguintes aspectos:

- *físicos*: área superficial disponível, forma, porosidade, volume de poro, densidade;
- *químicos*: disponibilidade de grupos reativos, hidrofobicidade;
- *estabilidade*: estocagem, atividade recuperada, estabilidade mecânica;
- *resistência*: ataque de fungos, pH, temperatura, solventes orgânicos;
- *segurança*: toxicidade de reagentes, segurança de utilização;
- *econômicos*: disponibilidade e custo de suporte e reagentes, equipamentos, impacto ambiental;
- *reacionais*: cinética de reação, tipo de reator a ser utilizado, limitações difusionais.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (Malcata *et al.*, 1990).

2.10 - Classificação de sistemas de imobilização de enzimas

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser separados em duas grandes classes: método químico e método físico.

O químico envolve a formação de pelo menos uma ligação covalente entre uma ou mais moléculas de enzima e um polímero insolúvel. O processo é irreversível e a enzima geralmente não pode ser recuperada posteriormente. No método físico a imobilização não depende de formação de ligação covalente e sim de forças físicas, como a eletrostática, iônica, interação proteína – proteína. Esses métodos em geral são completamente reversíveis (Zaborsky, 1977).

A ligação covalente da enzima ao suporte é o método mais interessante de imobilização sob ponto de vista industrial, pois envolvem grupos amino e carboxílicos superficiais da enzima, normalmente não relacionados com seu sítio ativo. Nesse método, o primeiro passo é a ativação do suporte e o segundo o acoplamento da enzima ao suporte ativado (Sinisterra, 1997).

Nos métodos químicos, depende-se da ligação covalente formada e essa ligação pode ocorrer de diferentes maneiras a seguir:

- **Ligação covalente:** Envolve normalmente grupos amino dos aminoácidos da enzima (NH_2), que cedem elétrons ao suporte fortemente eletrofílico (+). A escolha do suporte se deve em função da máxima preservação da atividade. A ligação não pode envolver sítio ativo da enzima.
- **Ligação cruzada:** Ligação intercruzada das moléculas de enzima para formação de uma estrutura tridimensional complexo. Uso de reagente multifuncional, normalmente relacionado a baixas estabilidades.
- **Copolimerização:** Incorporação da enzima em uma cadeia polimérica crescente.

Nos métodos físicos, podemos citar:

- **Adsorção:** Forças de interação entre suporte e enzima: van der Waals, iônica, pontes de hidrogênio. Ligações fracas, porém numerosas. Pode ocorrer dessorção devido a mudanças no meio (pH, agitação) – contaminação do produto pela enzima.
- **Aprisionamento:** Moléculas de enzima livres, mas restritas em movimento, presas à estrutura do gel. Sérios efeitos difusivos.
- **Encapsulação:** Enzima contida em uma microcápsula de membrana porosa semipermeável, por onde permeiam substrato e produtos. Limitações difusionais presentes. Possibilidade de co-imobilização de enzimas e células
- **Membrana:** Enzima contida em uma membrana semipermeável, por onde permeiam substrato e produtos.

2.11 - Imobilização por ligação covalente multipontual

O método de ligação covalente multipontual consiste na imobilização e estabilização da enzima através da formação de ligação covalente entre grupos amino da enzima ($-NH_2$), e grupos aldeído do suporte. Esses grupos aldeído que se encontram ligeiramente afastados da superfície do suporte, são introduzidos através de sua ativação prévia, e tornam o suporte fortemente eletrofílico para se ligar aos grupos doadores de elétrons dos aminoácidos da superfície da enzima (Guisán, 1988)

O ligeiro distanciamento dos grupos aldeído provocado pela ativação permite a formação de ligações multipontuais – *bases de Schiff* - entre enzima e suporte, ligações adicionais que são menos estáveis, porém que aumentam consideravelmente a estabilidade do derivado obtido, em relação à enzima livre. A possibilidade de que ligações adicionais sejam efetivadas aumenta consideravelmente com o aumento da densidade superficial de grupos aldeídos ativados no suporte.

Normalmente, a primeira ligação que ocorre entre a enzima e o suporte é rápida e reversível, pois existe um equilíbrio entre as formas ligadas e não ligadas do sistema enzima-suporte. A estabilidade do derivado cresce significativamente com a efetivação da segunda ligação entre enzima e suporte, pois havendo agora duas ligações semelhantes, mas reversíveis, essas funcionam na prática como uma única ligação irreversível no derivado. Além disso, tornam alinhados os grupos amino presentes na enzima e os grupos aldeído da superfície do suporte, facilitando, dessa forma, o processo de efetivação de outras ligações.

Essa estratégia é um importante e adequado sistema de insolubilização e estabilização de enzimas, cujas principais características são: ausência de impedimento estérico para a reação química do grupo amino com o grupo ativado no suporte, alta estabilidade dos grupos aldeído até em pH mais alcalinos, e reversibilidade de cada reação individual amino-aldeído. Essas características favorecem a formação de ligação multipontual enzima-suporte sem causar mudanças conformacionais dramáticas na estrutura da enzima (Guisán, 1988).

Ao contrário da primeira ligação formada (amino), as demais ligações (Bases de Schiff) demandam de tempo para se efetivar. É importante, portanto, que a estabilidade do composto aldeído utilizado na ativação do suporte seja alta (Guisán, 1988; Blanco *et.al.*, 1989).

A finalização do processo se dá através da redução das *bases de Schiff* formadas na reação amino-aldeído por borohidreto de sódio (NaBH₄), que atua sobre as *bases de Schiff* rapidamente reduzindo-as a estáveis ligações amino secundárias, o que pode controlar a intensidade das interações enzimas-suporte que, quando muito fortes, podem causar distorções da enzima (Blanco *et al.*, 1989). Os grupos aldeído remanescentes são convertidos a grupos hidroxila inertes.

A imobilização de enzimas com ligação covalente multipontual tem sido citada por diversos autores, como uma maneira de aumentar a estabilidade em relação à enzima livre (Otero, 1995; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1995; Mateo, 2000), sendo também capaz de alterar a especificidade e seletividade. Por serem moléculas mais rígidas, têm mais resistência a mudanças conformacionais induzidas por calor e solventes orgânicos (Guisán, 1988; Mozahev *et al.*, 1999) e outras espécies de desnaturação, como quebra de ligação peptídica, oxidação do grupo funcional (Wu *et al.*, 2001).

A escolha de um sistema de imobilização e estabilização adequado deve considerar, inicialmente, a morfologia da estrutura porosa do suporte, o grupo funcional da enzima e o método de ativação a ser usado (Blanco, 1989) sendo fundamental que se evite o envolvimento dos aminoácidos do sítio catalítico da enzima no processo de insolubilização da enzima (Zaborsky, 1977).

Por outro lado, algumas propriedades da enzima e seu comportamento podem mudar com a imobilização. Muitos fatores levam a alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação à livre, diminuindo o rendimento do processo de imobilização. A literatura nos reporta vantagens e desvantagens em relação aos métodos de imobilização (Zaborsky, 1977; Bickerstaff, 1995).

2.12 -Parâmetros da imobilização

Algumas propriedades da enzima e seu comportamento podem mudar com a imobilização. Muitos fatores levam a alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação à livre, diminuindo o rendimento do processo de imobilização. A literatura nos reporta vantagens e desvantagens em relação aos métodos de imobilização (Zaborsky, 1977, Bickerstaff, 1995).

Dentre as características que descrevem os diversos sistemas de imobilização de enzimas, merecem destaque quando se investiga uma nova metodologia para imobilizar enzimas, o Rendimento da Imobilização, que é definido como a razão entre a atividade oferecida ao suporte e a atividade desaparecida do sobrenadante; a Atividade da enzima imobilizada (atividade do derivado); Atividade Recuperada (razão entre a atividade medida do derivado e a atividade desaparecida do sobrenadante e teoricamente imobilizada) e o Fator de Estabilidade (relação entre a meia-vida da enzima imobilizada e a da enzima livre).

Algumas propriedades da enzima e seu comportamento podem mudar com a imobilização. Muitos fatores levam à alteração dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, em relação aos valores da enzima livre (intrínsecos):

- Efeito conformacional: a conformação tridimensional da molécula de enzima pode ser modificada durante o processo de imobilização, ocasionando a alteração dos valores dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada. Este efeito não pode ser alterado, e, portanto, é característico de cada sistema enzima-suporte. Os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada descontados de seus efeitos eletrostáticos e difusionais são denominados parâmetros inerentes.
- Efeitos eletrostáticos: a concentração de espécies químicas importantes (íons H^+ , moléculas de substrato) no micro-ambiente da enzima imobilizada pode ser diferente das concentrações no *bulk* devido a propriedades físico-químicas do suporte e de efeitos difusionais.
- Efeitos difusionais: a cinética observada da enzima imobilizada pode não estar sendo governada apenas por interações entre enzima e substrato, mas pode também estar sendo limitada pela taxa de difusão do substrato à superfície do suporte, ou internamente, por entre os poros do suporte. Nesse caso a concentração real de substrato que está em equilíbrio com a enzima imobilizada (sistema heterogêneo) é menor que a que haveria caso reagente e catalisador fossem solúveis (sistema homogêneo). Em consequência, a velocidade de reação com enzima imobilizada (velocidade real, aparente ou observada) é menor que a que se obteria para a mesma concentração de reagente no *bulk*.

Os efeitos eletrostáticos e difusionais, apesar de influenciar bastante nos parâmetros observados da enzima, podem ser calculados ao se aplicar princípios básicos de engenharia de reações químicas que, ao serem solucionados, permitirão a determinação dos parâmetros

cinéticos inerentes da enzima imobilizada, que podem ou não serem iguais aos intrínsecos, dependendo da existência ou não de efeitos conformacionais e eletrostáticos.

2.13 - Suportes para imobilização

Segundo Messing (1975), 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 (Pereira, 1996).

ORGÂNICOS		INORGÂNICOS		
NATURAIS		SINTÉTICOS	MINERAIS	FABRICADOS
POLISSACARÍDEOS	PROTEÍNAS	POLIESTIRENO	AREIA	VIDRO DE POROSIDADE CONTROLADA
CELULOSE	COLÁGENO	POLIACRILATOS	BETONITA	CÊRAMICA DE POROSIDADE CONTROLADA
ÁGAR	ALBUMINA	POLIVINILOS	HOMEBLERDA	SÍLICA DE POROSIDADE CONTROLADA
AMIDO	SEDA	NYLON	PEDRA-POME	ÓXIDO DE FERRO

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 força 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 é obtida com matrizes orgânicas, provavelmente, devido a grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos (Kennedy, 1987).

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 (Pereira, 1996).

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.

Os polímeros naturais e sintéticos são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis não causando danos ao meio ambiente. Dentre os suportes orgânicos naturais têm sido extensamente utilizados como matrizes para a insolubilização de enzimas e os mais utilizados são agarose, alginato e quitosana, visto pelo grande número de trabalhos relatados na literatura (Bastida *et al.*, 1999; Palomo *et al.*, 2002; López-Gallego *et al.*, 2005; Tardioli *et al.*, 2003a,b; Martins *et al.*, 2006; Desai *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006).

2.14 - Quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (George e Abraham, 2006). É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. As carapaças de crustáceos são resíduos abundantes e rejeitados pela indústria pesqueira, que em muitos casos as consideram poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (Krajewska, 2004). Grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH₂) na estrutura da quitosana.

Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (Berger *et al.*, 2004). A Figura 2.14 mostra a estrutura química dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose.

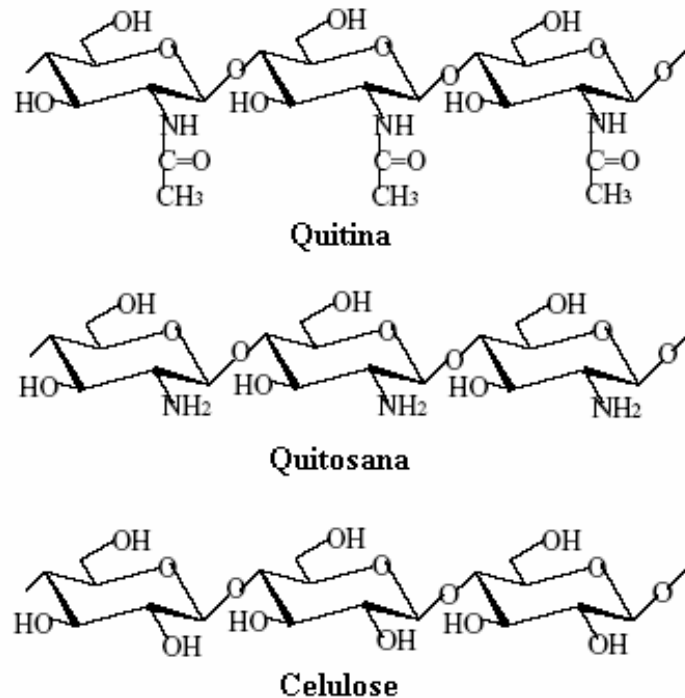


Figura 2.14. Estrutura dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose.

A quitina é frequentemente obtida de exoesqueletos de crustáceos como, por exemplo, de caranguejo e camarão. O biopolímero é adicionado em uma solução aquosa fria de HCl 2% para a remoção de compostos minerais como carbonato de cálcio. Em seguida, é realizada hidrólise alcalina a quente em solução aquosa de NaOH 5% (w/w) para remoção de proteínas. Após esta etapa, obtém-se a quitina com um grau de acetilação superior a 50% (Gupta e Jabrail, 2006). Para a obtenção da quitosana, a quitina é desacetilada empregando solução de NaOH a 50% (w/w) a 60°C (Krajewska, 2004). O grau de desacetilação da quitosana é controlado por esta etapa, podendo atingir total desacetilação empregando hidrólise alcalina em etapas consecutivas.

Na etapa de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil da quitina são rompidas com formação de unidades de D-glucosamina que contém um grupo amínico livre. Entretanto,

a quitosana não é uma macromolécula quimicamente uniforme, porque apresenta diferente grau de desacetilação acima de 30% já podem ser considerados como quitosana, sendo que as aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e tamanho da cadeia polimérica (Berger *et al.*, 2004). Este biopolímero tem três tipos de grupos reativos funcionais, um grupo amino na posição C-2 e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6, respectivamente (Li e Bai, 2005). É solúvel em diversos ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos (Kumar *et al.*, 2000a).

Devido a suas propriedades: hidrofiliçidade, biocompatibilidade, biodegenerabilidade, atividade antimicrobiana, entre outras, apresenta inúmeras possibilidades de aplicação industrial, como na clarificação de sucos, agente emulsificante, agente floculante na purificação de água, formação de filmes biodegradáveis, além de ser usado como fibra dietética em alimentos devido a seu efeito hipocolesterolêmico (Arruda, 1999). Além disso, esse polímero reaproveitado do processamento da indústria pesqueira tem sido fortemente investigado como suporte para imobilização de enzimas (Braun *et al.*, 1989), mostrando ser a melhor opção dentre muitos suportes testados para imobilização com fim industrial da enzima β -Galactosidase (Martino *et al.*, 1996ab).

A quitina pode ser encontrada naturalmente de três formas: α , β , e γ . A forma α é encontrada em carapaças de crustáceos, insetos e na parede celular de fungos, tendo como característica uma estrutura onde há um arranjo alternado de cadeias paralelas e anti-paralelas. Na forma β , predominante em lulas e algas marinhas microscópicas, há um arranjo de cadeias paralelas. A forma γ não foi ainda bem estudada. Wu *et al.*, (2001); cita a forma β da quitina como a que gerou um derivado de quitosana de maior intumescimento, devido à presença de poros de maior volume no derivado, melhorando sua capacidade de adsorção de íons metálicos, em comparação com o derivado obtido da quitina na forma α .

A presença de grupos amino livres na quitosana proporciona a maior solubilidade e reatividade que a quitina e a celulose (Monteiro e Airoidi, 1999). É atraente economicamente, por ser o segundo polímero natural mais abundante, atrás apenas da celulose (Wu *et al.*, 2001).

Alguns exemplos de aplicações da quitosana em diversas áreas são mostrados a seguir:

- **Tratamento de Efluentes:** Remoção de íons metálicos, floculante e coagulante de proteínas e pigmentos;
- **Indústria de Alimentos:** Remoção de sólidos suspensos, agente conservante, estabilização de cores e aditivo de alimento animal;
- **Medicina-Farmacêutica:** Controle de taxa de colesterol sanguíneo, controle de liberação de drogas, queimadura de pele e lentes de contato;
- **Biotecnologia:** Imobilização de enzimas, separação de proteínas, recuperação e imobilização de células e cromatografia;
- **Agricultura:** Cobertura de sementes e fertilizante;
- **Cosméticos:** Condicionador, cremes de face e mãos e loção de banho;
- **Papel e Papelão:** Tratamento de superfície;
- **Membranas:** Controle de permeabilidade e osmose reversa

Dentro do vasto campo da Biotecnologia, destacamos o uso da quitosana como suporte para imobilizar enzimas. Encontram-se na literatura vários trabalhos, com diferentes enzimas:

Martino *et al.*, (1996), após explorar diferentes suportes, otimizou a quitosana para imobilizar β -Galactosidase e utilizá-la para o melhoramento de vinhos. O método de imobilização foi adsorção, seguido de crosslinking com glutaraldeído e os resultados obtidos foram rendimentos de imobilização entre 55 e 85% e aumento de estabilidade térmica de 5 vezes em relação a enzima livre a temperatura ambiente.

Spagna *et al.*, (1998), estudou a imobilização da enzima α -L-arabinofuranosidase em quitosana por conjugação e crosslinking com glutaraldeído. Foram observados rendimentos de imobilização de até 30% e ganhos de estabilidade de 4 vezes em relação a enzima livre a uma temperatura de 57°C.

Cetinus *et al.*, (2000), imobilizou a enzima Catalase® em filme de quitosana ativado com glutaraldeído e obteve a 5°C um aumento de estabilidade térmica de apenas 1,4 vezes em relação a enzima em sua forma solúvel.

Adriano *et al.*, (2003), obtiveram ganhos de estabilidade da Penicilina G Acilase imobilizada em pellets de quitosana ativados com glutaraldeído de cerca de 5 vezes em relação a enzima livre em ensaios realizados a uma temperatura de 50°C. Os rendimentos de imobilização chegaram a 82%.

Gu *et al.*, (2005) imobilizaram celulase em géis de quitosana obtendo um ganho na estabilidade térmica de 1,7 vezes em relação à enzima livre em ensaios realizados a 65 °C. Para a mesma enzima e condições de ensaio, Martins *et al.*, (2006), obtiveram valor para o fator de estabilidade térmica de 1,9 vezes. Portanto, quando utilizaram híbridos de quitosana com copolímeros (quitosana – alginato), o valor obtido para o fator de estabilidade térmica foi de 2,9 com rendimento de imobilização de 55,8%.

Os exemplos citados sugerem que, apesar de estar sendo bastante explorada como suportes para imobilizar enzimas, ainda não foram alcançados 100% de rendimento e não foram atingidos altos valores de estabilização térmica. Apesar disso, é fundamental que se continue com a exploração deste material e o aperfeiçoamento dos métodos de imobilização de enzimas em quitosana, visto que é um material bastante barato.

Os exemplos descritos encontram-se resumidos na tabela 2.3, em que se destaca a estabilização térmica.

Tabela 2.3: Estabilidade térmica de enzimas imobilizadas em suportes de quitosana.

Referência	Enzima	Método de Imobilização	Temp. °C	Ganho de estab. em relação a E. livre
Martino <i>et al.</i> , 1996	β -Galactosidase	Quitosana crosslinking com glutaraldeído	25	5 vezes
Spagna <i>et al.</i> , 1998	α -arabinofura-nosidase	Quitosana conjugação com glutaraldeído	57	4 vezes
Cetinus <i>et al.</i> , 2000	Catalase	Filme de quitosana ativado com glutaraldeído	5	1,4 vezes
Adriano, 2003	Penicilina G Acilase	Quitosana (pellets) ativada com glutaraldeído	50	5 vezes
Gu <i>et al.</i> , 2003	Celulase	Gel de Quitosana ativada com glutaraldeído	65	1,7 vezes
Martins <i>et al.</i> , 2006	Celulase	Gel de Quitosana ativada com glutaraldeído	65	1,9 vezes
Martins <i>et al.</i> , 2006	Celulase	Gel de Quitosana ativada com glutaraldeído	65	2,9 vezes

2.15 – Alginato de sódio

Alginato é um polímero amplamente usado para imobilização e tecnologias de microencapsulação (Funduenanu *et al.*, 1999; Velten *et al.*, 1999). Alginato é um extrato de alga composto por cadeias alternadas de ácido α -L-gulurônico e resíduos ácidos de β -D-manurônico (Sriamornsak, 1998). Suportes de alginato normalmente são feitos por entrecruzamento do grupo carboxil do ácido α -L-gulurônico com uma solução catiônica geleificante como cloreto de cálcio, cloreto de bário (Draget *et al.*, 1997; Smidsrod *et al.*, 1990). O alginato de sódio, ou algina, é o carboidrato purificado extraído de vegetais marítimos pelo uso de uma diluição 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 alga é constituída principalmente pelo sal sódico do ácido algínico, polímero linear do ácido L-gulurônico e do ácido D-manurônico. Este último é o principal componente, mas há alguma variação, dependendo a alga de origem (figura 2.15).

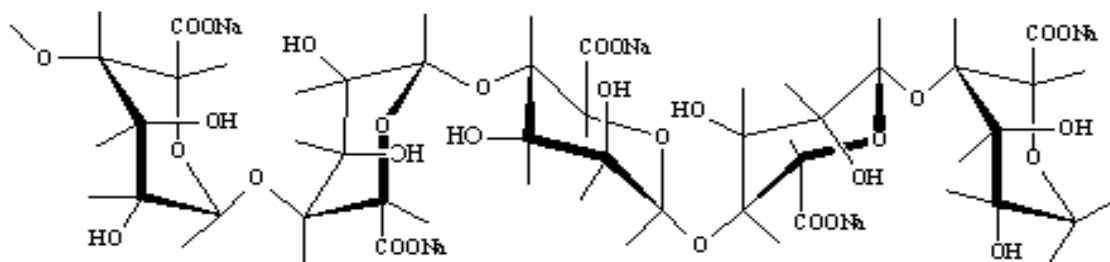


Figura 2.15: Estrutura química do alginato de sódio.

A molécula de ácido algínico 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. Trata-se de um agente suspensor. 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 algínico têm propriedades úteis para formação de géis. O alginato de sódio tem aplicação na geleificação para vários fins como imobilização enzimática, formação de membranas, encapsulação de drogas.

2.16 -Princípio de formação de hidrogéis de quitosana com diferentes copolímeros

Hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, capazes de sorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação químicos ou físicos (Berger *et al.*, 2004). Este fato se deve aos grupos ionizáveis presentes na estrutura dos biopolímeros como grupos amino, carboxílicos e hidroxilas que possuem afinidade com a molécula de água. Os hidrogéis têm uma vasta aplicação no campo biomédico e farmacêutico como sistemas de liberação controlada de fármacos. Uma vez que os hidrogéis podem ser preparados com uma vasta gama de tamanhos de poros eles podem ser utilizados tanto na liberação de fármacos de pequeno peso molecular como, por exemplo, agentes antiinflamatórios, anti-sépticos e solutos de elevado peso molecular, como proteínas, fatores de crescimento, entre outros (Kumar, 2000b). Os hidrogéis podem ser constituídos de um ou mais biopolímeros (Berger *et al.*, 2004).

De acordo com a literatura, a quitosana é um dos principais compostos empregados na síntese de hidrogéis, como também alginato, carragenina, gelatina e outros (George e Abraham, 2006). Os compósitos quitosana-copolímeros são formados com o objetivo de obter hidrogéis mais versáteis, com diferentes estruturas química e física, o que pode melhorar sua atuação em uma determinada aplicação. Uma outra importante aplicação dos hidrogéis é na imobilização de enzimas para diversas aplicações, principalmente no desenvolvimento de biossensores (Oliveira *et al.*, 2006). Sua estrutura é mantida por interações iônicas ou covalentes. As ligações iônicas são fortemente influenciadas pelo pH do meio reacional, influenciando também na capacidade de retenção de água no hidrogel.

Alginato tem sido utilizado como veículo para a liberação de fármacos e proteínas, juntamente com a quitosana, complexo quitosana-alginato (Tapia *et al.*, 2004). O complexo quitosana-alginato é formado por interações iônicas entre os grupos carboxílicos do alginato e os grupos amino da quitosana (Tapia *et al.*, 2004). O hidrogel formado sofre redução de porosidade, reduzindo o tempo de liberação do fármaco encapsulado (Huguet *et al.*, 1996). A elevada solubilidade da quitosana é minimizada na presença de alginato, pois este biopolímero é insolúvel em pH ácido e em pH alcalino é facilmente solubilizado, o que não é

observado para a quitosana. Deste modo, o complexo quitosana-alginato pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH (George e Abraham, 2006).

No intuito de aumentar a estabilidade química e física dos hidrogéis de quitosana e quitosana-copolímeros, diversas alternativas têm sido utilizadas. Dentre elas, a modificação química do hidrogel empregando agentes bifuncionais é a mais utilizada (Monteiro e Airoidi, 1999; Li e Bai, 2005; Oliveira *et al.*, 2006; Altun e Etinus, 2007).

2.17 - Modificação química do suporte

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 localizados 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 (Pereira, 1996).

Esta modificação química, ou seja, ativação, objetiva aumentar a resistência mecânica, alterar a hidrofobicidade, biocompatibilidade e estabilidade química tornando-a mais resistente (Vieira, 2004). 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 (Guisán, 1988) 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 (Monteiro e Airoidi, 1999). Esses grupos podem reagir com vários grupos laterais das proteínas, como hidroxila, carbonila, amino e sulfidril (Arruda, 1999). Suas características são a alta reatividade dos grupos aldeídicos com aminas primárias

inclusive a pH inferiores ao 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 (Cardias, 1999). 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 (Tardioli 2003a). Outra característica é a produção de derivados com baixa estabilidade e alta restrição difusional. A figura 2.16, mostra a ligação formada entre o grupo aldeído e o grupo amino da quitosana.

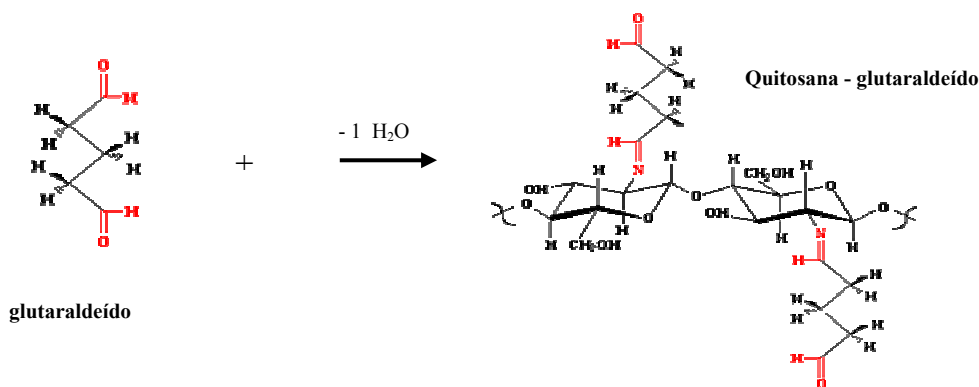


Figura 2.16: Reação de ativação entre glutaraldeído e quitosana.

Suportes contendo apenas grupos hidroxila, tais como agarose, não podem ser ativados diretamente com glutaraldeído. Nesse caso ativação com epóxidos, glicidol ou epiclоридrina, seguida de oxidação com periodato, gerando grupos aldeído glioxil, é uma boa alternativa. Outras possíveis ativações partindo-se do grupo aldeído glioxil são reação com etilenodiamina para gerar grupos amino reativos com grupos ácidos da enzima, por exemplo, ou ainda, reação desse grupo amino obtido com etilenodiamina com glutaraldeído e gerando assim novamente grupo aldeído, mas com diferente distância do suporte e com a grande reatividade típica do glutaraldeído.

Suportes glioxil 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 (Blanco *et al.*, 1988). Suportes ativados com glicidol e epícloridrina não são capazes de promover imobilização de proteínas a pH neutro sendo necessário um pH moderadamente alcalino cerca de 10,0. A pH alcalinos, 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, de acordo com a figura 2.17.

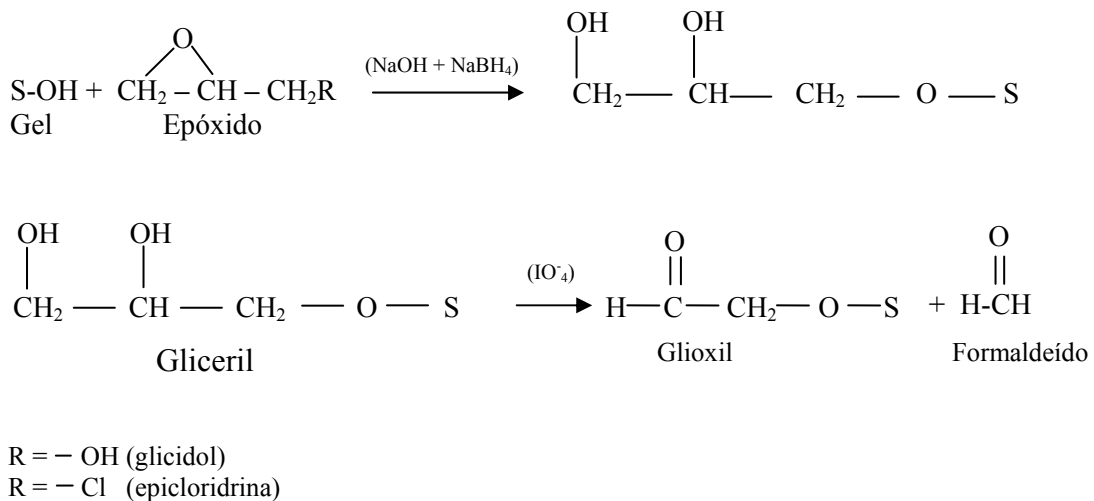


Figura 2.17: Reação de ativação do gel utilizando glicidol .

Mateo *et al.*, (2005) descobriram a possibilidade do grupo glioxil permitir a imobilização de proteínas mesmo em pH neutro, isto é, algum resíduo da molécula de enzima pode estar exposto com significativa reatividade.

Vieira (2004) 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 (1999) estudou a adsorção de β -amilase em quitosana ativada com glutaraldeído, concluindo ser um agente bifuncional de boa eficácia e fácil aplicação.

Tiller *et al.*, (1999) ativou 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 *et al.*, (1999) estudou 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 *et al.*, (2002) 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, gerou o derivado menos estável em relação à enzima solúvel.

Eldin *et al.*, (2000) estudaram a influência da concentração de glutaraldeído e do tempo de ativação durante imobilização de PGA em partículas de nylon amino alquiladas e observaram que um aumento na concentração de glutaraldeído aumentou a atividade enzimática numa concentração máxima de 2,5%, 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.

Ichikawa *et al.*, (2002) imobilizaram quitosanase em gel agar 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 4,8 molar de glicidol, obtinha-se rendimento de 82%, contudo, em concentração de glicidol de 0,25 molar, 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.

3 – MATERIAL E MÉTODO

3.1 – Materiais

3.1.1 - Enzimas

Foram utilizadas preparações de celulases de origem microbiana de *Trichoderma reesei* gentilmente fornecidas pelas empresas **Novozymes A/S, Denmark** (Celluclast 1.5 L) e Genencor (CG 220);

3.1.2 - Suportes e ativadores

Foram utilizados como suporte para a imobilização: quitosana 85% de desacetilação adquirida da Polymar S. A. (Ceará, Brasil) e alginato de sódio, adquirido comercialmente da Vetec (São Paulo, Brasil). Os agentes de ativação empregados foram glicidol (Sigma-Aldrich), e glutaraldeído 25% (Vetec). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1.3 - Substratos

Foram utilizados como substratos para a dosagem da atividade hidrolítica da celulase, Papel de filtro Whatman nº1 e bagaço de cana-de-açúcar previamente tratado com vapor sob pressão.

3.2 - Metodologia experimental

3.2.1 - Metodologia de preparação dos géis de quitosana e quitosana – alginato

3.2.1.1 - Preparação das partículas de quitosana

Quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% (v/v) nas seguintes concentrações: 1,0%; 2,5% e 5,0% (m/v). As soluções resultantes foram deixadas em homogeneização por 10 minutos. Os sistemas solubilizado foram aspergidos em NaOH

100mM em uma razão de 1:10 (v/v) e deixado em repouso por 24h à temperatura ambiente. Após este tempo, foram lavadas com água destilada até a neutralidade como pode ser observado na figura 3.1.

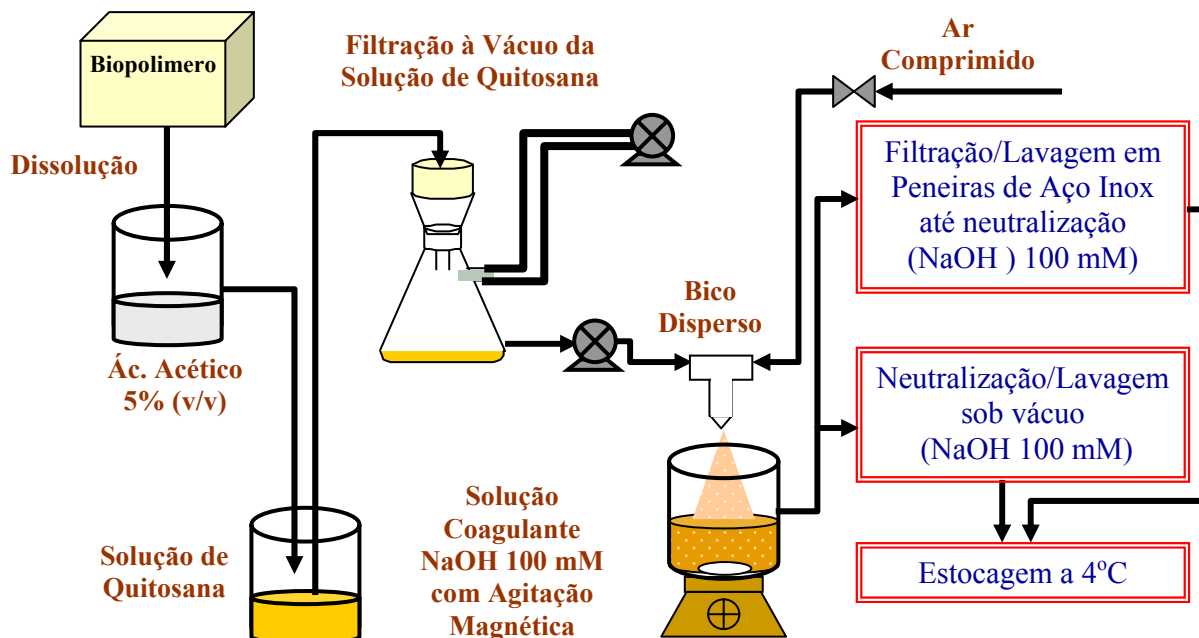


Figura 3.1: Aparato utilizado para preparação das partículas de quitosana (Galvão, 2004).

3.2.1.2 - Preparação das partículas de quitosana - alginato

Quitosana em pó foi dissolvida em ácido acético 5% (v/v) e a esta solução foi adicionado o alginato de sódio. A solução resultante foi deixada em homogeneização por 30 minutos. O sistema solubilizado foi aspergido em NaOH 100mM em uma razão 1:10 (v/v) e deixado em repouso por 24h. Após este tempo, as partículas foram lavadas com água destilada. Os seguintes suportes foram preparados: quitosana 1,0% - alginato 1,0 %; quitosana 2,5% - alginato 2,5%; quitosana 5,0% - alginato 5,0%; sendo todas as concentrações em percentagem massa: volume. O aparato utilizado está representado na figura 3.1.

3.3 Ativação dos suportes

3.3.1 - Ativação do suporte utilizando glutaraldeído

A ativação do suporte foi realizada com glutaraldeído 5% (v:v) em tampão fosfato 100mM, pH 7,0 por 1h a 25°C sob agitação branda (razão $m_{gel}: V_{total}$ 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 tampão fosfato 100mM pH 7,0 para retirar o excesso de glutaraldeído. A Figura 3.2, mostra a ligação formada entre o grupo aldeído e o grupo amino da quitosana.

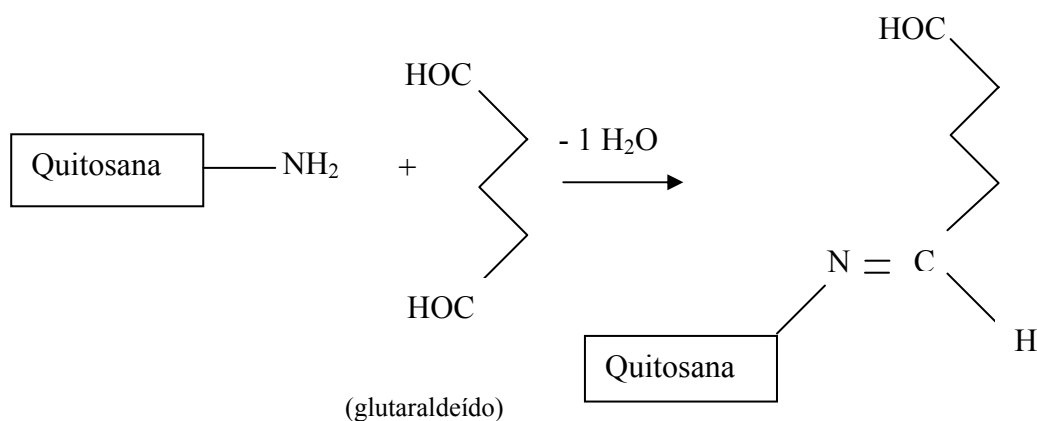


Figura 3.2: Quitosana ativada com glutaraldeído.

3.3.2 – Preparação do suporte quitosana – glioxil pré-ativados com glutaraldeído

O suporte já fora ativado com glutaraldeído como descrito no item 3.3.1. Este novo suporte foi obtido por eterificação com glicidol e posterior oxidação com periodato de sódio. Para cada grama de suporte adicionava-se 10mL de água destilada, 0,33mL de NaOH 1,7 M contendo borohidreto de sódio 0,75M e 0,24 mL de glicidol em banho de gelo. A suspensão era mantida sob agitação branda a temperatura ambiente por 24 horas e depois lavado em excesso com água destilada e resuspenso em uma proporção de 1:10 (razão $m_{gel}: V_{total}$ de 1:10) para posterior oxidação a glioxil. Para cada grama de suporte eram adicionados 2,0 mL de uma solução de periodato de sódio 100mM e deixado em reação por 2 horas à temperatura

ambiente. Oxidado o suporte, este era lavado e utilizado para posterior imobilização enzimática.

3.3.3 – Preparação do suporte quitosana – glioxil - amino pré-ativados com glutaraldeído

Gel quitosana-glioxil fora preparado conforme descrito no item 3.3.2. Ao gel foi acrescentada solução de etilenodiamina 2M, pH 10. Suspensão essa, que foi mantida em agitação por 2 horas em temperatura ambiente, e depois reduzida com NaBH₄ (5,71% da massa inicial do gel) por mais duas horas. O gel foi lavado com 1L de solução tampão acetato 100mM a pH 4,0 para eliminação do borohidreto residual, em seguida, com tampão borato 100mM a pH 9,0 para o restabelecimento das cargas e, finalmente, com água destilada. Após esse período, o gel foi lavado e usado imediatamente para imobilização de celulase.

3.4 - Imobilização covalente multipontual de celulase em matrizes de quitosana e quitosana - alginato

Foram empregados como suportes, os géis de quitosana e quitosana alginato ativados com glutaraldeído, glicidol e glicidol-amino para a imobilização da celulase. Foi utilizado um carregamento de proteína de 10 mg por grama de gel. A imobilização da celulase foi realizada em tampão fosfato 100mM, pH 7,0 (razão $m_{gel}:V_{total}$ de 1:10). O gel foi lavado com água destilada em abundância para a remoção de enzima residual e tampão até pH neutro. Após a imobilização, foi quantificada no sobrenadante, a concentração de proteína e atividade hidrolítica residual.

3.5 - Determinação da Atividade celulolítica

A atividade celulolítica das preparações enzimáticas foram determinadas pelo método de hidrólise do papel, conforme metodologia de Mendels (Mendels *et al.*, 1969). O substrato foi preparado cortando-se papel de filtro Whatman n° 1 sob medida de 1,0 cm de largura x 6,0 cm comprimento. Os tubos foram incubados a 50°C por 60 min sob agitação. A liberação de açúcar redutor foi quantificado pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller,

1956). A unidade utilizada foi a FPU (Filter Paper Unit). Uma unidade FPU é dada pela produção de um μmol de açúcar redutor por minuto nas condições descritas, conforme descrito na equação 3.1.

$$At_{(FPU/mL)} = \left(\frac{C_{Ar} \times V_R}{V_{SE} \times t_H} \right) \times 5,5 \cdot 10^3 \quad (3.1)$$

Sendo C_{Ar} a concentração de açúcar redutor (g/L), V_R o volume reacional (L), V_{SE} o volume da solução enzimática (mL), t_H o tempo da hidrólise (min) e $5,5 \cdot 10^3$, o fator para conversão em μmol de açúcar redutor.

3.6 - Determinação da concentração de proteína

O teor de proteína das amostras de preparações enzimáticas foi dosado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), baseado na ligação do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Este método foi o selecionado em função de não sofrer interferências significativas de cátions e carboidratos, presentes em algumas das amostras de enzimas. Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0,0 a 0,6 mg/mL.

3.7 - Caracterização das propriedades cinéticas da celulase livre e imobilizada

A cinética enzimática lida com os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas, nos quais os principais fatores são: concentração de enzima, concentração de ligantes (substratos, inibidores e ativadores), pH, força iônica e temperatura. Quando esses fatores são analisados apropriadamente, é possível conhecer a natureza da reação enzimática. Foram estudadas a influência do pH, temperatura e estabilidade térmica.

3.7.1 - Influência do pH

A atividade da celulase livre e imobilizada foi estudada utilizando-se a reação de hidrólise do papel de filtro Whatman nº 1 na faixa de pH entre 2,0 a 8,0 com incremento de 1,0. Foi empregada a metodologia descrita no item 3.5 variando o pH do tampão na temperatura de 50°C, conforme metodologia proposta por Mendels, 1969. Foram utilizados tampão citrato 50mM na faixa de pH de 2,0 a 5,0 e tampão fosfato 50mM na faixa de pH de 7,0 a 8,0.

3.7.2 - Influência da temperatura

Foi verificada a influência da temperatura sobre a atividade da celulase livre e imobilizada empregando a reação de hidrólise do papel de filtro Whatman nº 1, conforme metodologia descrita no item 3.5, na faixa de temperatura entre 20 a 80 °C.

3.7.3 - Estabilidade térmica

Celulase livre e imobilizada foi suspensa em tampão citrato 50mM, pH 4,8. A atividade enzimática no início foi denominada 100%. Tanto a solução de enzima livre quanto os derivados imobilizados foram incubados a 65°C e em intervalos de tempo pré-determinados, mediu-se a atividade enzimática, expressa como porcentagem da atividade inicial. O modelo de desativação enzimática proposta por Sadana-Henley (Tardioli *et al.*, 2003 a) foi empregado para estimativa do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$). Fatores de estabilidade (F_E) foram obtidos como a razão entre o tempo de meia vida dos derivados e o tempo de meia vida da celulase livre. A constante de desativação térmica foi calculada pela equação 3.2, utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987).

$$AR = (1 - \alpha) \cdot e^{-k_d \cdot t} + \alpha \quad (3.2)$$

Em que: AR é a atividade relativa (A/A_0); α é a razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A_0); K_d é a constante de inativação térmica de primeira ordem (h^{-1}) e t é o tempo de incubação da solução enzimática (h).

O tempo de meia-vida da enzima, definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, foi calculado pela equação 3.3.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{kd \cdot (1 - \alpha)} \quad (3.3)$$

Em que: $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida da enzima (h).

3.8 - Cálculo dos parâmetros de imobilização

3.8.1 - Cálculo do rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização foi estimado com base na atividade enzimática oferecida e a atividade enzimática presente no meio reacional após o processo de imobilização, como mostrada na equação (3.4).

$$RI (\%) = \frac{U_0 - U_f}{U_0} \cdot 100 \quad (3.4)$$

Em que: RI é a porcentagem de proteína imobilizada (%); U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização (FPU/g de gel) e U_f é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (FPU/g de gel).

3.8.2 - Cálculo da atividade recuperada

O cálculo da atividade recuperada foi determinado pela relação entre a atividade hidrolítica contida no gel e as atividades inicial e final presentes no sobrenadante, conforme mostrada na equação 3.5.

$$AR (\%) = \frac{U_{gel}}{U_0 - U_f} \cdot 100 \quad (3.5)$$

Em que: AR é a atividade recuperada (%); U_{gel} é a atividade hidrolítica contida no gel (FPU/g de gel); U_0 é a atividade oferecida no início da imobilização (FPU/g de gel) e U_f é a atividade residual presente no sobrenadante após a imobilização (FPU/g de gel).

3.8.3. Cálculo do fator de estabilidade

O fator de estabilidade (FE) foi calculado pela relação entre o tempo de meia-vida da celulase imobilizada e a celulase livre, medidos a 65°C através da hidrólise do papel de filtro Whatman nº1, como mostrado na equação 3.6.

$$FE = \frac{t_{1/2} \textit{ imobilizada}}{t_{1/2} \textit{ livre}} \quad (3.6)$$

Em que: FE é o fator de estabilidade; $t_{1/2}$ livre é o tempo de meia-vida para a Celulase livre e $t_{1/2}$ imobilizada é o tempo de meia-vida para a celulase imobilizada.

3.9 – Avaliação do enlace enzima – suporte

O tipo de enlace enzima suporte (ligação covalente ou simplesmente adsorção física) foi avaliado incubando-se os derivados em meio fortemente iônico (NaCl 200 mM) sob suave agitação por 24 horas. Caso a enzima estivesse interagindo com o suporte por interações iônicas, esta dessorveria ao passar do tempo. Com a formação de ligações de natureza covalente entre enzima e suporte, a celulase permaneceria imobilizada nos suportes devido à natureza irreversível destas ligações.

3.10 – Tratamento térmico 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 as 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 (Ramos, 2003).

O tratamento foi conduzido medindo-se 100 g do bagaço de cana lavado e moído, que foi autoclavado (121°C; 30 minutos) com 2L de solução de hidróxido de sódio a 4%. O material recuperado após filtração foi neutralizado com ácido fosfórico a 10% e seco em estufa a 65°C. Ao bagaço obtido, foi adicionado a mesma quantidade de água destilada, autoclavado em seguida a 121°C por 30 minutos. A suspensão foi filtrada e o material sólido seco a 65°C até massa constante (Menezes E Aguiar, 2002).

3.11 – Ensaio de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando celulase imobilizada em híbridos de quitosana

Os ensaios de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com enzima livre e imobilizada foram feitos em frascos adequados e incubados em tampão citrato 50mM, pH 4,8 a 50 °C. A conversão da reação foi determinada através do método de DNS para quantificação dos açúcares redutores ao longo do tempo. A conversão da hidrólise foi calculada de acordo com a equação 3.7

$$X \% = \frac{C_{AR} \times V_R}{0,521 \times Mb} \times 100 \quad (3.7)$$

Em que: X é a conversão celulose em glicose; C_{AR} é a concentração de açúcar redutor (g/L); V_R é o volume reacional (L); 0,521 fator de conversão; Mb é a massa do bagaço de cana-de-açúcar.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pretendeu-se nesta dissertação realizar a produção de derivados estabilizados de celulase por imobilização covalente multipontual da enzima em quitosana e quitosana-alginato utilizando glutaraldeído e glicidol como agentes ativantes. A seguir são apresentados e discutidos os resultados obtidos e organizados dentro dos seguintes tópicos:

- Caracterização das enzimas livres estudadas;
- Preparação dos suportes 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 e glicidol na imobilização da celulase em híbridos de quitosana;
- Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática;
- Performance do melhor derivado obtido na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

4.1 - Caracterização das enzimas livres estudadas: Celluclast 1.5 L e Genencor (CG 200)

Para a caracterização das enzimas livres foram investigadas a atividade enzimática (FPU/mL de extrato) e atividade específica (FPU/mg de proteína) bem como a influência da temperatura e pH. Celulases comerciais de diferentes fornecedores: Celluclast 1.5 L da Novozymes A/S, Denmark e Genencor (CG 200) foram estudadas. A tabela 4.1 fornece os valores das atividades enzimáticas e específicas das respectivas enzimas analisadas.

Tabela 4.1: Valores das atividades enzimática (FPU/mL de extrato) e específica (FPU/mg de proteína) das enzimas livres, em pH 4,8 a 50°C em tampão citrato 50 mM por 1 hora de incubação (Mendels, 1969).

Enzima	Atividade enzimática	Atividade Específica
	FPU/mL de extrato	FPU/mg proteína
Celluclast 1.5	37,2	1,04
CG 200	68,8	1,12

Observa-se que os valores para a atividade enzimática e específica foram maiores para a enzima CG 200, ou seja, esta possui maior quantidade de proteínas com atividade catalítica e está mais pura em termos de proteína.

Quanto à estabilidade térmica a 65°C, a enzima CG 200 apresentou-se cerca de 5 vezes mais estável que a Celluclast 1.5 L, possivelmente devido à presença de agentes estabilizantes que tornam a molécula protéica mais resistente. A tabela 4.2, fornece os valores de meia-vida e fator de estabilidade para as enzimas livres. As figuras 4.1 e 4.2 mostram os ajustes dos pontos experimentais segundo modelo de Sadana- Henly.

Tabela 4.2: Valores de meia-vida e fator de estabilidade térmica (65 °C) para as enzimas comerciais utilizadas na forma livre.

Biocatalisador	$t_{1/2}$ (min)	Kd	α
Celluclast 1.5 L	18,9	$0,0426 \pm 0,0095$	$0,0306 \pm 0,0613$
CG 200	90,7	$0,0077 \pm 0,0003$	0 ± 0

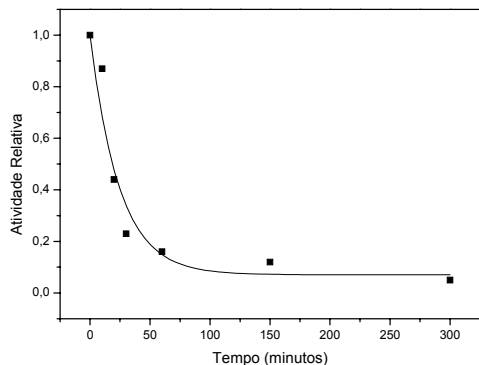


Figura 4.1: Inativação térmica da Celluclast 1,5 L a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

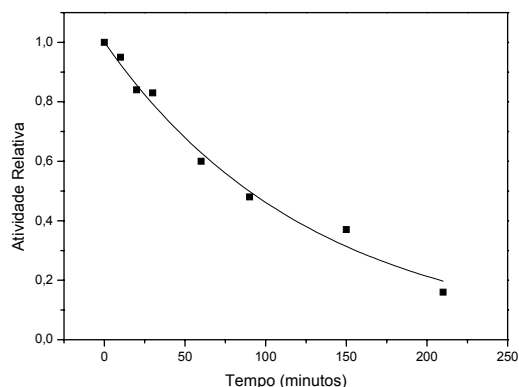


Figura 4.2: Inativação térmica da CG 200 a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

4.2 – Influência do pH

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH ótimo, no qual sua atividade é máxima. Acima ou abaixo desse valor, a atividade é reduzida. O pH do meio determina as cargas dos resíduos de aminoácidos que constituem enzima e a alteração dessas cargas pode induzir alterações conformacionais nas moléculas do biocatalisador. Além disso os aminoácidos que formam o sítio ativo precisam estar num estado iônico específico para realizarem a catálise, o mesmo podendo ocorrer com os substratos, se ionizáveis, estado esse que depende do pH do meio. A inter-relação da atividade enzimática com o pH, para qualquer enzima, depende do comportamento ácido-básico do meio, natureza do substrato, ponto isoelétrico, estado de pureza da enzima e força iônica (Gama, 2003). Os resultados apresentados na figura 4.3 e 4.4 mostram que as celulasas apresentaram valores de pH ótimos em meio ácido .

Pode-se observar que para a enzima Celluclast a melhor atividade relativa ocorreu próxima do pH 4,8 e para a GC200 a pH 4,0. Resultados semelhantes são encontrados na literatura, Villalonga *et al* (2001) encontraram a máxima atividade em pH 3,0. Gu *et al* (2005) obtiveram o maior valor da atividade relativa em pH próximo a 4,5.

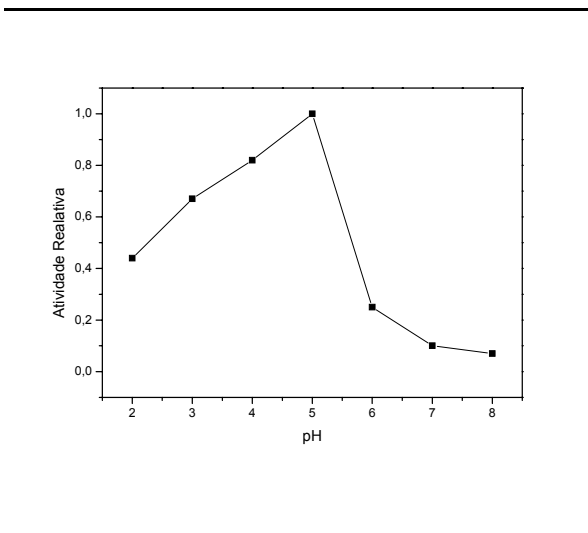


Figura 4.3: Influência do pH na atividade hidrolítica da celulase livre (Celluclast 1,5 L).

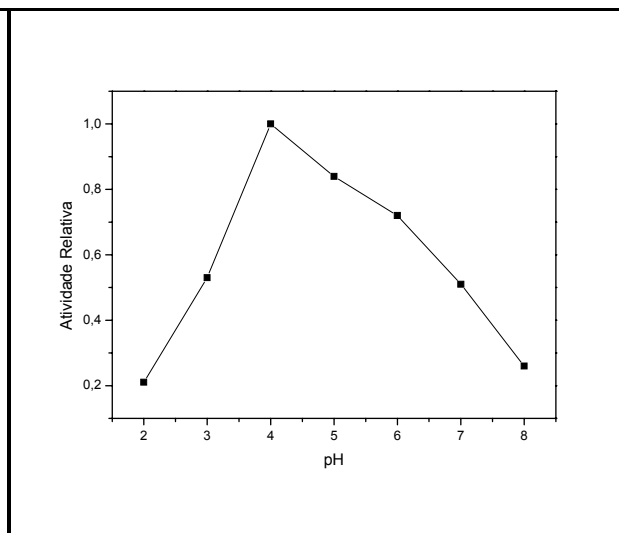


Figura 4.4: Influência do pH na atividade hidrolítica da celulase livre (CG 200).

4.3 – Influência da temperatura

A atividade hidrolítica da celulase em função da temperatura é demonstrada nas figuras 4.5 e 4.6 que mostra o comportamento da enzima em pH 4,8 em todas as temperaturas avaliadas. Pode-se observar pelos valores de atividade relativa que a enzima livre atua bem em temperatura de aproximadamente 55°C. Entretanto a 70°C, a enzima perdeu 60% da sua capacidade hidrolítica, demonstrando que temperaturas acima de 60°C não são recomendáveis para a atuação da celulase.

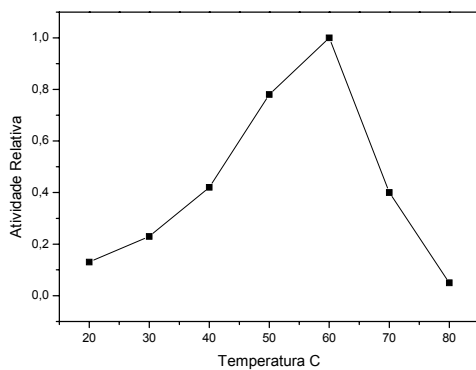


Figura 4.5: Influência da temperatura na atividade hidrolítica da celulase livre (Celluclast 1,5 L).

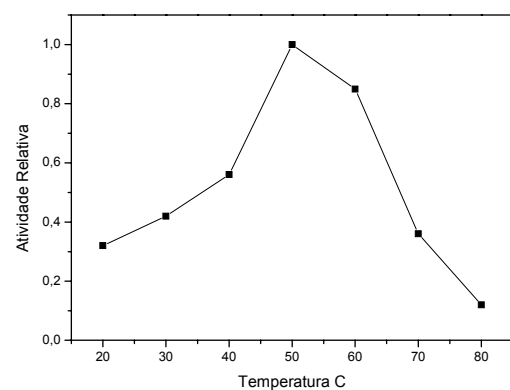


Figura 4.6: Influência da temperatura na atividade hidrolítica dos derivados livre (CG 200).

4.4 - Preparação dos suportes de quitosana e estudo dos parâmetros de imobilização

Foram preparados dois diferentes tipos de derivados utilizando as duas preparações enzimáticas aqui analisadas. A tabela 4.3 apresenta os parâmetros de imobilização para estes derivados de celulase obtidos. Pode-se observar que para a Celluclast 1,5 L, o derivado apresentou 37,3% de rendimento de imobilização com 35,9% de atividade recuperada sendo 1,9 vezes mais estável que a enzima solúvel. Valores semelhantes foram obtidos para CG 200. Entretanto, quanto ao tempo de meia-vida, este se apresentou 2 vezes menor quando comparado à primeira enzima. Essa diminuição deve ter sido devido à presença de estabilizantes existentes na composição do consórcio enzimático CG 200 que não foram imobilizados no suporte. Uma alternativa seria dialisar a enzima para eliminar esses estabilizantes e se poder estudar a possível estabilização obtida pela imobilização da enzima. Contudo, purificar celulase não é trivial (as membranas comerciais são de celulose) e como não era esse o objetivo deste trabalho decidiu-se continuar a pesquisa com a Celluclast 1.5L nos demais ensaios ao decorrer deste trabalho. As figuras 4.7 e 4.8 mostram o comportamento da inativação pelo modelo de Sadana-Henley.

Tabela 4.3: Parâmetros de imobilização de celulase em quitosana 2,5% pH 7,0 a 27°C em suportes ativado com glutaraldeído 2,5% v/v com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel.

Biocatalisador	R _I (%)	A _R (%)	t _{1/2} (min)	F _E
Com Celluclast 1.5 L	37,3	35,9	35,7	1,9
Com CG 200	33,7	37,6	17,2	0,2

4.5 - Influência da adição de alginato de sódio e de diferentes condições de imobilização de celulase em quitosana

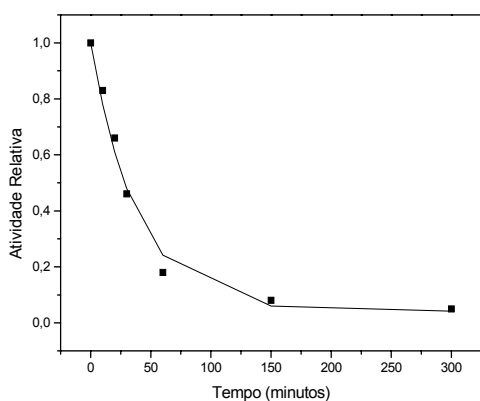


Figura 4.7: Inativação térmica do derivado de celulase (Celluclast 1,5 L) a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

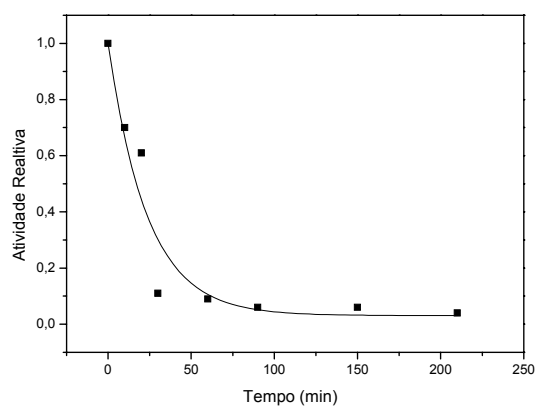


Figura 4.8: Inativação térmica do derivado de celulase (CG 200) a 65°C e pH 4,8. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

Foram preparados dois tipos de suporte para posterior ativação com glutaraldeído e duas temperaturas de imobilização foram propostas (4°C e 27°C) a pH 7,0.

Tabela 4.4: Parâmetros de imobilização de celulase em pH 7,0 a 4°C em suportes ativados com glutaraldeído com carga enzimática de 10 mg de enzima.g⁻¹ de gel.

Suporte	R _I (%)	A _R (%)
Quitosana 1,0%	48,4	45,0
Quitosana 2,5% - alginato 2,5%	54,8	39,7

A tabela 4.4, apresenta os parâmetros de imobilização para estes derivados de celulase obtidos em temperatura de imobilização de 4°C. Pode-se observar que o melhor resultado apresentou 54,8% de rendimento de imobilização com 39,7% de atividade recuperada. Na tabela 4.5, observa-se que o melhor resultado apresentou 55,8% de rendimento de imobilização com 39,1% de atividade recuperada.

Tabela 4.5: Parâmetros de imobilização de celulase em pH 7,0 a 27°C em suportes ativados com glutaraldeído com carga enzimática de 10 mg de enzima.g⁻¹ de gel.

Suporte	R _I (%)	A _R (%)
Quitosana 1,0%	53,7	35,5
Quitosana 2,5% - alginato 2,5%	55,8	39,1

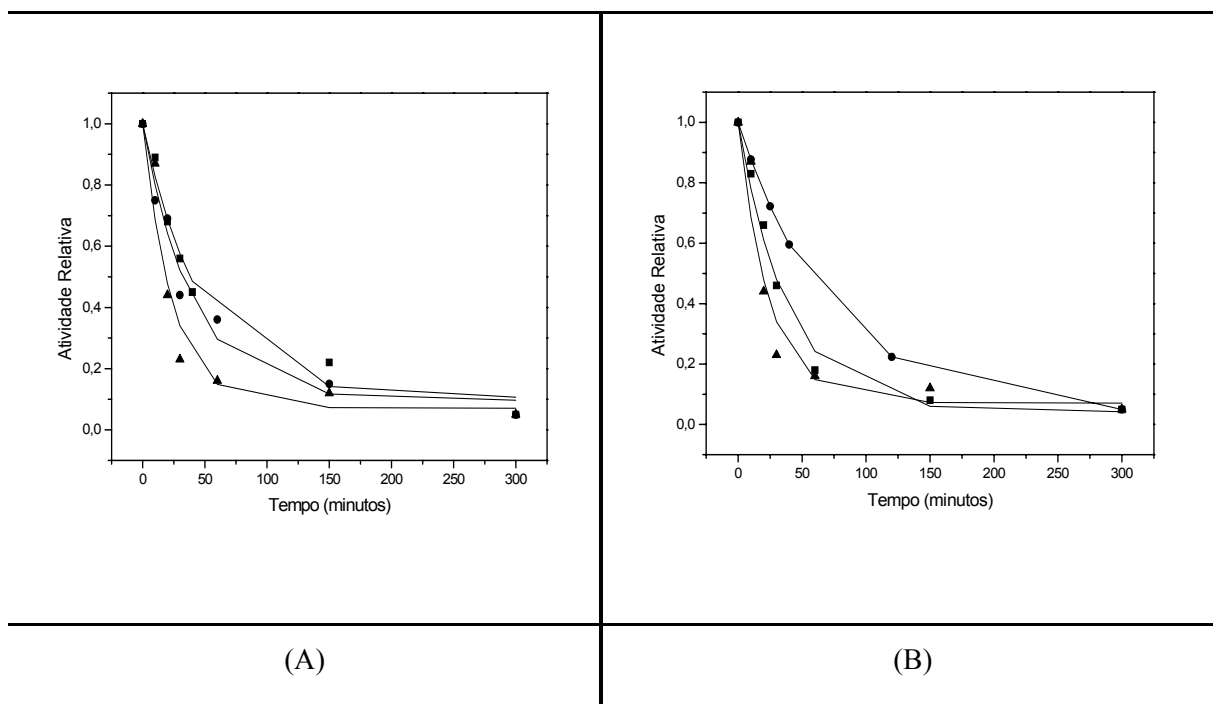
A quitosana interage formando pontes de hidrogênio com alginato. Essa interação dificulta o entrecruzamento entre grupos amino da quitosana e glutaraldeído, funcionando o alginato como uma espécie inerte e diminuindo a grande e incontável reatividade do agente ativador. A presença desse polímero deve assim melhorar as condições intra-partícula para interação entre enzima e suporte ativado, aumentando a porosidade do suporte. A temperatura de imobilização não afetou o rendimento, isso se deve a alta reatividade do glutaraldeído mesmo em baixas temperaturas em longo tempo de incubação. O glutaraldeído também permite a imobilização de proteínas mesmo em pH neutro, isto é, algum resíduo da molécula de enzima pode estar exposto com significativa reatividade (Mateo *et al.* 2005). Vale ressaltar

que os valores de rendimentos de imobilização foram baixos para o suporte de quitosana em comparação aos híbridos, devido à concentração no preparo dos géis. Suportes com maiores quantidades de grupos funcionais estarão propensos a um maior grau de ativação, conseqüentemente mais moléculas de proteína serão imobilizadas. Esses são, portanto resultados iniciais que poderão assim ainda ser otimizados. Observa-se na tabela 4.6 que o derivado quitosana-alginato foi o melhor, com valores de F_E de 2,9 vezes a mais em relação à enzima livre quando imobilizada a 27°C.

Tabela 4.6: Valores de meia-vida e fator de estabilidade (65 °C) para os suportes ativado com glutaraldeído com carga enzimática de 10 mg de enzima.g⁻¹ de gel e enzima livre.

Biocatalisador	Temperatura de imobilização (°C)	t _{1/2} (min)	F _E
Enzima Livre	-	18,9	1,0
Quitosana 2,5% - alginato 2,5%	4°C	40,4	2,1
Quitosana 2,5% - alginato 2,5%	27°C	53,7	2,9
Quitosana 1%	4°C	32,1	1,7
Quitosana 1%	27°C	35,7	1,9

Observa-se também que as estabilidades térmicas para os derivados com quitosana foram baixas em relação aos compósitos de alginato conforme as figuras 4.9 e 4.10 as quais apresentaram um bom ajuste do modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos. Essa baixa estabilidade pode ser devido à protonação dos grupos amino da quitosana em pH ácido de hidrólise (pH 4,8), somando com a temperatura elevada, fazendo com que o gel de quitosana fosse dissolvido nestas condições drásticas de pH e temperatura (Fávere *et al*, 2006). Com os compósitos (quitosana-alginato), a interação entre os polímeros permitiu que houvesse mais enlaces 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. Quanto ao aumento da estabilidade dos derivados imobilizados a 27°C comparados a 4°C é devido ao aumento de ligações multipontuais formadas entre enzima-suporte (Berger *et al.*, 2005).



Figuras 4.9: Estabilidade térmica a 65 °C para as celulase livre e imobilizada ativados com glutaraldeído a 4 °C (A), (▲) enzima livre, (■) enzima imobilizada em quitosana 2,5% – alginato 2,5%, (●) enzima imobilizada em quitosana 2,5%. Figuras 4.10: Estabilidade térmica a 65 °C para as celulase livre e imobilizada ativados com glutaraldeído a 27 °C (B), (▲) enzima livre, (■) enzima imobilizada em quitosana 2,5% – alginato 2,5%, (●) enzima imobilizada em quitosana 2,5%.

De acordo com a tabela 4.7, pode-se observar que os melhores valores para o rendimento de imobilização, atividade recuperada e estabilidade térmica foram durante a imobilização em pH 7,0 a 27°C. Isso pode ser devido à alta reatividade do glutaraldeído em pH neutro/básico, bem como a desprotonação de alguns aminoácidos da proteína que favorecem a formação de bases de Schiff fazendo que haja maior rendimento de imobilização e estabilidade do derivado.

Por outro lado, em pH 4,8 há uma possível protonação de resíduos proteicos e a diminuição da reatividade do agente ativante desfavorecendo assim a formação de ligações covalentes e conseqüentemente uma diminuição na estabilidade do derivado

Tabela 4.7 Influencia do pH durante imobilização da celulase ativada com glutaraldeído 2,5% v/v a 27°C com carga enzimática de 10mg de proteína /g de gel.

Suporte	pH de imobilização (7,0)			pH de imobilização (4,8)		
	R _I (%)	A _R (%)	F _E	R _I (%)	A _R (%)	F _E
Quitosana 2,5 %	49,2	33,5	1,3	34,2	29,5	1,8
Quitosana 2,5%-Alginato 2,5 %	42,2	46,3	5,5	36,5	31,4	2,1

4.6 - Influência dos métodos de ativação na imobilização da celulase em híbridos de quitosana

4.6.1 – Ativados com glutaraldeído:

Com base nos ensaios anteriores foram preparados dois suportes para posterior ativação com glutaraldeído e esses derivados foram caracterizados quanto ao rendimento de imobilização R_I (%), atividade recuperada A_R (%) e fator de estabilidade (F_E). A tabela 4.8 apresenta os resultados obtidos para estes derivados de celulase.

Tabela 4.8: Caracterização dos derivados de celulase imobilizada a 27°C e pH 7,0 usando diferentes suportes com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel.

Suporte	R _I (%)	A _R (%)	F _E
Quitosana 2,5%	49,2	33,5	1,3
Quitosana 2,5% – Alginato 2,5 %	42,2	46,3	5,5

Pode-se observar que o melhor derivado foi o híbrido de quitosana 2,5% - alginato 2,5% que apresentou 42,2 % de rendimento de imobilização com 46,3% de atividade recuperada sendo 5,5 vezes mais estável que a enzima livre. Observa-se uma melhora no resultado quando comparado aos valores obtidos na tabela 4.8, mostrando que a concentração de quitosana disponibilizou mais sítios de imobilização permitindo uma melhor congruência

geométrica entre enzima e suporte, bem como tornando mais fortes as interações entre os polímeros. As figuras 4.11 e 4.12 apresentam o ajuste da inativação térmica pelo modelo de Sadana-Henley.

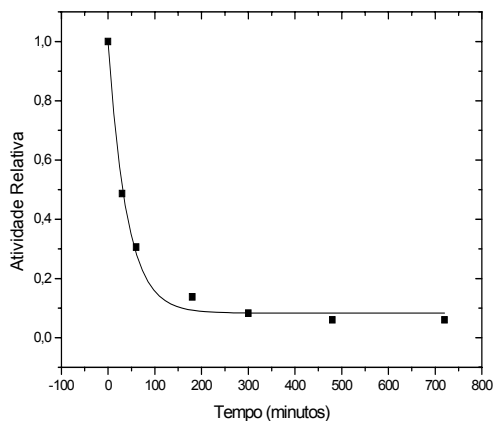


Figura 4.11: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glutaraldeído. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

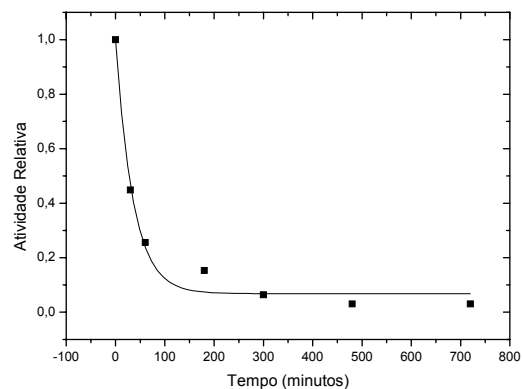


Figura 4.12: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% - alginato 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glutaraldeído. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

4.6.2 – Ativados com glicidol:

Para as ativações com glicidol, foram experimentados somente dois suportes cuja de acordo com a tabela 4.9. Pode-se observar que o melhor derivado obtido foi quitosana 2,5% – alginato 2,5 %. Ao se utilizar o glicidol, houve um processo de formação de interações enzima-suporte mais lento e ordenado de modo a formar mais ligações multipontuais. Ao aumentar o número de enlaces favorece uma maior estabilização da enzima (Cardias *et al.*, 1999).

Tabela 4.9: Caracterização dos derivados de celulase imobilizada a 27°C e pH 7,0 usando diferentes suportes com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel ativado com glicidol.

Suporte	R _I (%)	A _R (%)	F _E
Quitosana 2,5%	25,8 ± 7,9	62,0 ± 10,0	13,6 ± 3,1
Quitosana 2,5% – Alginato 2,5 %	40,6 ± 8,0	56,3 ± 5,5	11,2 ± 0,6

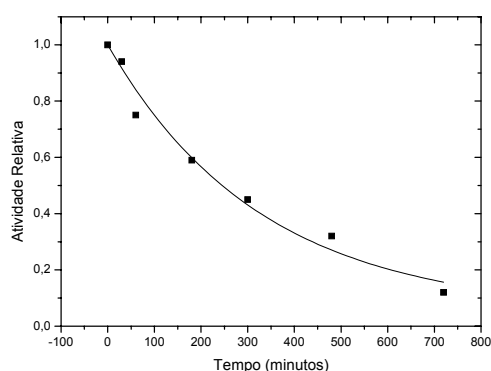


Figura 4.13: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

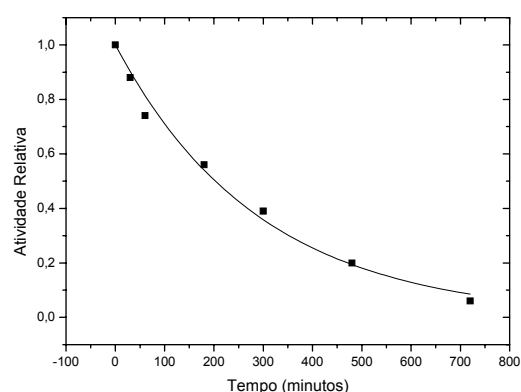


Figura 4.14: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% - alginato 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

Nota-se um bom ajuste pelo modelo de Sadana-Henley dos pontos experimentais dos obtidos (figuras 4.13 e 4.14).

4.6.3 – Ativados com glicidol-amino:

As ativações com glicidol – amino apresentaram bons valores, observando a tabela 4.10, o melhor resultado para os parâmetros de imobilização foi o derivado híbrido de quitosana 2,5% - alginato 2,5%. Esse incremento nos parâmetros pode ser devido aos grupos aminos provenientes da ativação com glicidol - amino, favorecendo uma conformação geométrica mais estável ao sítio ativo da enzima e conseqüentemente mais ligações multipontuais se formaram entre os copolímeros.

Tabela 4.10: Caracterização dos derivados de celulase imobilizada a 27°C e pH 7,0 usando diferentes suportes com carga enzimática de 10 mg de proteína/g de gel ativado com glicidol-amino.

Suporte	R _I (%)	A _R (%)	F _E
Quitosana 2,5%	36,5 ± 10,0	53,0 ± 10,0	8,7 ± 0,5
Quitosana 2,5 %- Alginato 2,5 %	39,7 ± 2,3	42,5 ± 3,0	12,7 ± 1,0

As figuras 4.15 e 4.16 apresentam os ajustes da estabilidade térmica de acordo com Sadana Henley.

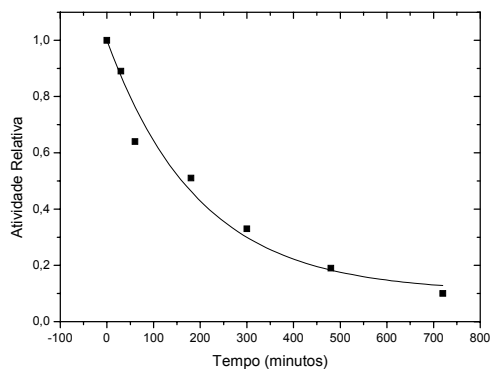


Figura 4.15: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol-amino. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

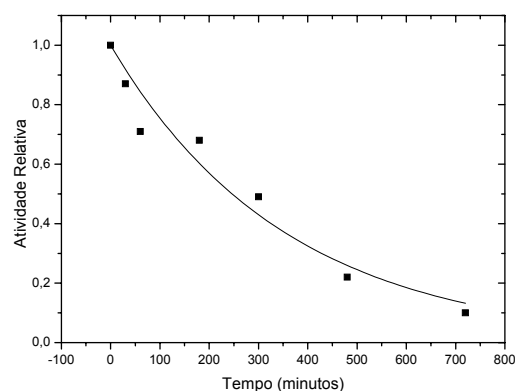


Figura 4.16: Inativação térmica do derivado de celulase em quitosana 2,5% - alginato 2,5% a 65°C e pH 4,8 ativados com glicidol-amino. A curva foi obtida ajustando o modelo de Sadana-Henley aos pontos experimentais obtidos.

4.7 - Influência da temperatura e do pH na atividade enzimática dos derivados imobilizados em gel de quitosana

Nas figuras 4.17 e 4.18 apresentam as atividades enzimáticas relativas das enzimas livres e imobilizadas (gel de quitosana 2,5%) em função do pH e temperatura do meio.

Observa-se que a partir de 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 imobilizada. Gu *et al.*, (2005) também obteve valor máximo da atividade relativa a 60°C para derivados imobilizados de celulase. Observamos um acréscimo no valor da temperatura e um decréscimo no valor do pH para os derivados em suas máximas atividades, isso acontece devido às modificações conformacionais nas moléculas do biocatalisador devido aos efeitos causados pela imobilização (Vitolo, 2001; Gama, 2003).

Pode-se observar que para a enzima livre a maior atividade relativa da enzima livre ocorreu próxima do pH 4,5 e para o derivado imobilizado próximo de pH 3,5. Resultados semelhantes são encontrados na literatura, Villalonga (2001) encontraram a máxima atividade em pH 3,0. Gu *et al* (2005) obtiveram o maior valor da atividade relativa em pH próximo ao 4,5.

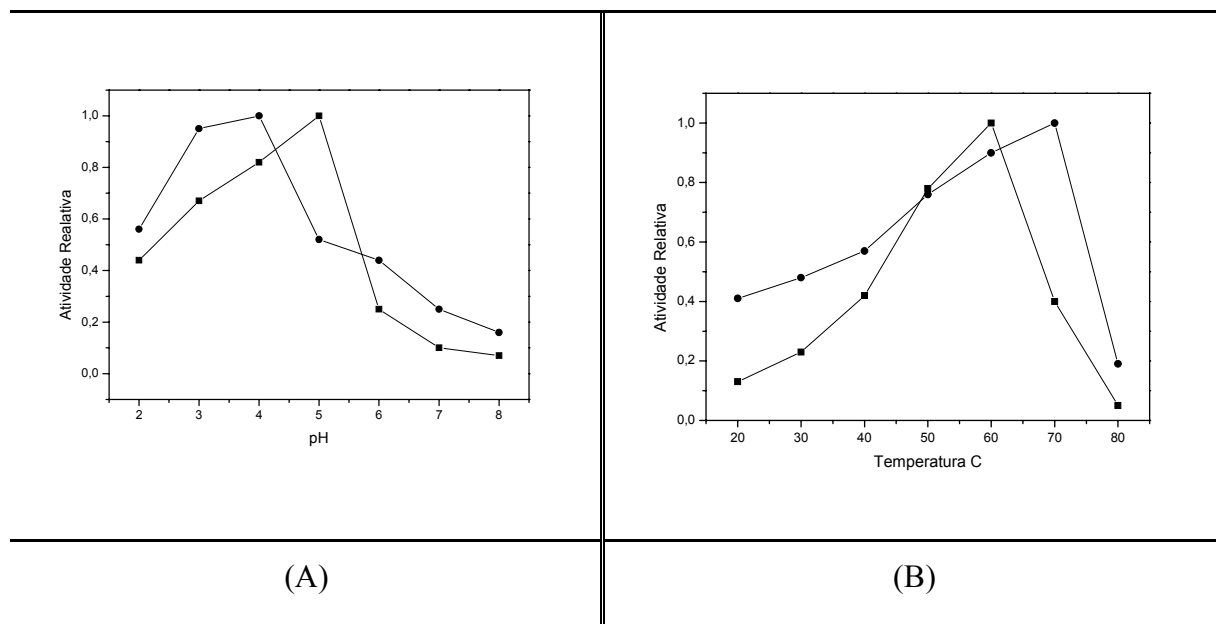


Figura 4.17 Influência do pH na atividade enzimática: (A), (■) enzima livre, enzima imobilizada (●). Figura 4.18: Influência da temperatura na atividade enzimática (B), (■) enzima livre, enzima imobilizada (●).

4.8 - Testes de Dessorção Enzimática

Depois de finalizada a reação de imobilização, os derivados de celulase foram submetidos a testes de dessorção, com longos períodos de lavagem com tampão fosfato de sódio 0,2M ou com longos tempos de incubação e agitação em solução salina de 0,2 e 0,4M. O teste de dessorção tem por finalidade a eliminação de toda enzima eventualmente apenas adsorvida no suporte, que não tenha estabelecido ligação com os grupos reativos deste. Com altas cargas iônicas presentes na solução de lavagem, moléculas de enzima soltas migrariam para a solução, dessorvendo do suporte.

Nenhuma atividade foi detectada nas soluções de lavagem dos derivados, o que indica que a enzima efetivamente ligou-se ao suporte covalentemente.

4.9 – Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

Os resultados apresentados na figura 4.19 mostram os perfis de conversão em função do tempo de hidrólise para enzima livre e imobilizada em híbridos de quitosana-alginato ativado com glicidol. Nota-se que a enzima livre apresentou velocidade de reação maior no início, conduzindo a 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 de difusão e talvez ao fenômeno de impedimento estérico do substrato. Assim sendo a enzima deve ter sido imobilizada de uma maneira que dificultou o acesso do substrato ao centro catalítico. 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 aproximadamente 12 vezes menor que o biocatalisador. Assim, com o passar das horas a enzima livre vai inativando enquanto que a imobilizada permanece ativa. A figura 5 e a

Tabela 4.11 mostram os valores para as conversões da enzima livre e imobilizada durante oito dias de processo em batelada sob agitação e temperatura controlada de 50 °C e pH 4,8 (tampão citrato 50 mM).

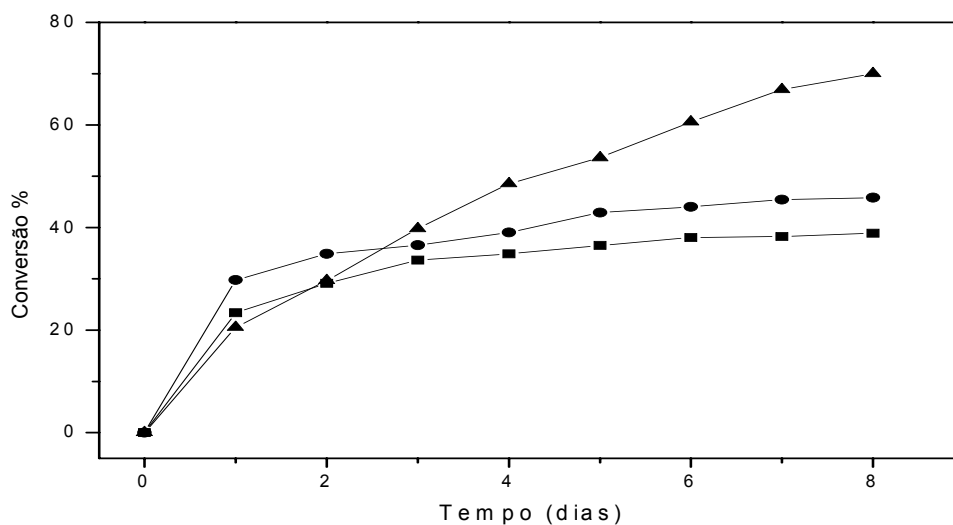


Figura 4.19. Conversão do bagaço da cana-de-açúcar (60 °C e pH 4,8), enzima solúvel a 350 mg/L (■); enzima solúvel a 700 mg/L (●); enzima imobilizada em quitosana 2,5%-alginate 2,5% ativados com glicidol (1,7 mg de proteína/ grama de gel) (▲).

Tabela 4.11: Conversão do bagaço de cana-de-açúcar a pH 4.8 a 50 °C.

Tempo (horas)	Conversão enzimática (%) do bagaço de cana-de-açúcar		
	Enzima livre (350 mg/L)	Enzima livre (700mg/L)	Enzima imobilizada (1,7 mg de proteína/g de gel)
0	0	0	0
24	23,39	29,76	20,56
48	29,10	34,88	29,67
72	33,10	36,58	39,18
96	34,88	39,03	48,67
120	36,51	42,89	53,64
144	38,07	44,07	60,61
168	38,22	45,41	66,92
192	38,88	45,85	70,02

6 – CONCLUSÃO E SUGESTÃO

6.1 – Conclusões

Em geral, a celulase imobilizada em quitosana e quitosana-alginato ativada com glutaraldeído mostram 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 compósito quitosana-alginato apresentou melhores resultados com rendimento de imobilização de 42,2%, atividade recuperada de 46,3% , estabilidade térmica de 5,5 vezes em relação à enzima solúvel a 65°C enquanto para o glicidol, com rendimento de imobilização de 40,6%, atividade recuperada de 56,3% e estabilidade térmica de 11,2 vezes em relação à enzima solúvel a 55°C.

As estabilidades térmicas das enzimas imobilizadas foram melhores que a obtida para enzima livre, os resultados foram superiores ao obtido por Gu et al. (2005) que obteve um aumento de 1,7. Villalonga et al. (2001), obtiveram um valor de F_E de 1,5. Embora os valores de estabilidade térmica e atividade enzimática sejam baixos em comparação com as demais enzimas reportadas na literatura, para a celulase os valores são considerados satisfatórios. Gu et al. (2005) citam que a celulase possui baixa atividade em relação à amilase, portanto estudos são realizados para se obter um acréscimo na utilização da enzima em processo industrial.

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.

Trata-se de um suporte de fácil obtenção e o processo de imobilização é simples, tornam-se 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.

6.2 – Sugestões

Como continuidade deste trabalho, pode-se sugerir:

- Desenvolver novos protocolos de imobilização em busca de se melhorar os parâmetros de imobilização e capazes de reduzir as limitações difusivas;
- Pesquisar as atividades enzimáticas entre as celulasas em relação aos específicos substratos: carboximetilcelulose, avicel, celobiose;
- Otimização dos protocolos de imobilização utilizados neste trabalho;
- Realizar modelagem matemática da cinética de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar catalisada por celulase imobilizada em quitosana e quitosana-alginato.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 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.
- ADSUL M.G., GHULE J.E., SINGH R., SHAIK H., BASTAWDE K.B., GOKHALE D.V., VARMA A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*. 57, 67-72, 2004.
- AGBLEVOR, F.A. JOST. WEBER. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochemistry*, v. 40. p. 669-679. 2004
- ALTUN, G. D.; ETINUS, S. A. (2007). Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, v. 100, p. 964–971
- AMOCO, B.P. Statistical *Review of World Energy*, 1999.
- ARROYO, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, v. 39, n. 2, p. 23-29.
- ARRUDA, E.J. Concentração e Purificação de β -amilase de Extrato de Soja por Adsorção em Gel de Afinidade Quitosana-fenilboronato.1999.*Tese* (Doutorado – Engenharia Química) Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas, 1999.
- AYUAB. A.Z. et al. Cellulase and Xylanase production by isolated Amazon bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 33.p. 231-218. de 2002.
- BASTIDA, A.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; PAGANI, G.; TERRINI, M. (1999). Regioselective hydrolysis of peracetylated α -D-glucopyranose catalyzed by immobilized lipases in aqueous medium. A facile preparation of useful intermediates for oligosaccharide synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 9, n. 4, p. 633-636.
- BÉLGUIN, P. Molecular biology of cellulase degradation. *Annual Review of Microbiology*, v. 44. p. 219-248, 1990
- BENAR, P. *Tese de Doutorado* – Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, 1996.

- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19-34.
- BICKERSTAFF, G. Immobilization of Enzymes and Cells – *Some Practical Considerations*, *Methods in Biotechnology* 1995, pp.1-9
- BLANCO, R. E GUISÁN, J.M. Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme – activated support multipoint attachments: trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system, *Enzyme Microb. Technol.* 10, pp. 227-232, 1988.
- BLANCO, R.; CALVETE, J.; E GUISÁN, J.M. Immobilization – Stabilization of Enzymes - Variables that control the intensity of trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment, *Enzyme Microb. Technol.* 11, pp. 353-359, 1989.
- BOFO, et al: Comparação da eficiência de imobilização das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* CB-IX (osmotolerante) e *S. cerevisiae* ATCC 9763, em bagaço de cana-de-açúcar. *Braz. J. Food Technol.*, 5º SIPAL, março, 2005 121 - 124
- BRAUN, J.; CHANU, P.L. E GOFFIC, F.L. The immobilization of Penicillin G Acylase on Chitosan, *Biotechnology and Bioengineering* 33, pp. 242-246, 1989.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* v.72 (1-2), p.248-254, 1976.
- CAMPBELL, C. J.; Laherrère, *J. H.*; *Sci. Am.*, Março 1998, 60.
- CARDIAS, H.C.T.; GRININGER, C.C.; TREVISAN, H.C.; GUISAN, J.M. e 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.
- CETINUS, S.A e ÖZTOP, H.N. Immobilization of Catalase on Chitosan Film. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p.497-501, 2000.

- CHIBATA, I., TOSA, T., SATO, T., MORI, T. Production of L-aminoacids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. In: MOSBACH, K. *Methods in enzymology: immobilized enzyme*. New York , Academic Press, 1976.p.746-759.v.44.
- COELHO, M. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; Furtado. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde. *CEPP* v.19, n1, p.33- 42, 2001.
- COMPET – Petrobrás; *Balanco Energético Nacional* – MME, julho 1999.
- CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. S.; Tecnologia de Conversão de Biomassa, Universidade do Amazonas – EFEI, Manaus, 1997.
- COSTA, J. L. M.; *Tese de Doutorado* – Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, 1989.
- DELLACHERIE, E.; HUGUET, M, Calcium-alginate beads coated with chitosan: effect of structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochemistry* v. 31(8), p.745-751, 1996.
- DESAI, P. D.; DAVE, A. M.; DEVI, S. (2006). Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. *Food Chemistry*, v. 95, p. 193-199.
- DIENES, D. Treatment of recycled fiber with Trichoderma cellulases. *Industrial Crops And Products an International Journal*.v.20.p. 11-21 2003.
- DWIVEDI, B. K. Sorbitol and Mannitol In: *Alternative Sweeteners, L. O. Nabors & R.C. Gelardi* (eds), MarcelDekker, 2nd. ed, New York, 1991.
- DRAGET, K.I.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD O. Alginate based new materials. *International Journal Biological Macromolecules*, v.21, p.47–55,1997.
- ELDIN, M.S.M.; SCHRÖEN, C.G.P.H.; JANSSEN, A.E.M.; MITA, D.G e TRAMPER, J. Immobilization of Penicillin G acylase onto Chemically Grafted nylon Particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.10, p.445-451, 2000.
- EMMEL, A, MATHIAS, A.L., WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresource Technology*,V.86, 2, p. 105-115, 2003.
- EVANS, J.; *Chemistry in Britain*, August 1999, 38.

- 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 (1), p. 1, 34-39, 2006.
- FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; COWAN, D. A.; WOOD, A. N. P. (1995). Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 366–372.
- FISCHER, G.; SCHRATTENHOLZER, L. Global bioenergy potentials through 2050. *Biomass & Bioenergy, Pergamon*, v.20, n.3, p. 151-159, mar., 2001.
- 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.
- GALVÃO, C. M. A. (2004). Hidrólise controlada do soro láctico usando tripsina e quimotripsina imobilizadas em diferentes suportes. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos.
- GAMA, F. M.; MOTA, M.; BASTOS, M.; DOURADO, F. Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate. *Journal of Biotechnology* v. 99, p. 121-131, 2002.
- GAMA, F. M. AIRES-BARROS, M.R. CABRAL, J.M.S. *ENGENHARIA ENZIMÁTICA*. Lisboa, Portugal, Lidel, 2003.
- GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *J. Food Eng.*, n. 52, p. 211-218, 2002.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14.

- GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B.; HIRANO, P.N.; SCHMIDELL NETTO, W. Study of a biocatalyst to produce ethanol from starch: Co-immobilization of glucoamylase and yeast in gel. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 84-86, 643-654, 2000.
- GIORDANO, R.L.C.; Perspectiva e desafios para a engenharia química no século XXI em busca do equilíbrio , ou uma política 3R para o planeta Terra. *Revista Brasileira de Engenharia Química*; v 21, n. 3, p. 26-30, 2004.
- GONÇALVES, L.R.B. Estudo Cinético da Síntese de Amoxicilina Catalisada por Penicilina G Acilase Imobilizada em glioxil-agarose.2001. *Tese* (Doutorado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2001.
- GONÇALVES, A. R.; *Tese de Doutorado* – Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, 1995.
- GREUDENBERG, K.; Adam, K.; Berichte 1941, 74, 387.
- GU, L.;MAO, X.; GUO, G.; HUANG, J.; DU, Z.; HUANG, Z.; MA, L.; LI, P. A novel methodo to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization. *Journal Chem Technol Biotechnol* (in press). 2005.
- GUISÁN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology* 10, 375-382, 1988.
- GUPTA, K.C.; JABRAIL, F. H. (2006). Effects of degree od deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrates Polymers*, in press.
- GURGEL, P.V., FURLAN, S.A., MARTINEZ, S.E.R., MANCILHA, I.M.. Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolyzate treatments for xylitol production. *Braz. J. Chem. Eng.*, 15, 3,1998.
- HENRISSAT B.et al., Synergism of cellulases from *Trichoderme reesei* in the degradation of cellulose . *Biotechnology*.v.3.p. 722-726, 1985.
- HUGUET, M. L.; DELLACHERIE, E. (1996). Calcium-alginate beads coated with chitosan: effect of the structure of encapsulated materials on their release. *Process Biochemistry*, v. 31, p. 745-751.

- ICHIKAWA, S.; TAKANO, K.; KUROIWA, T.; HIRUTA, O.; SATO, S e 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.
- ISLAM, M. et al. Energy and protein utilization by goats fed Italian ryegrass silagem trated with molasses, urea, cellulase or cellulase + lactic acid bacteria. *Small Ruminat Research*. v. 42. p. 49-60.Jlho 2001.
- KANSOH, A.L et al. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polymer Degradation and Stability*. v. 63. p. 373-278. 1998.
- KENNEDY, J.F. Enzyme Technology. *Biotechnology*, VHC Alemanha, v.7a,1987.
- KIM, S. W. Production of cellulase and hemicellulase by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v. 91. p. 153-156. 2004.
- KRAJEWSKA, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 126-139.
- KUHAD, R.C.; SINGH, A.; *Critical Reviews in Biotechnology*, Cleveland, 1993, 13, 151.
- KUMAR, M. N. V. R. (2000a). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, v. 46, p. 1-27.
- KUMAR, G.; BRISTOW, J.F.; SMITH, P.J. Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan. *Polymer* v.41, n.6, p.2157-2168, 2000b.
- KYRITSIS, S; CARRASCO, J.E. First *World Conference and Exhibition on Biomass for Energy and Industry*, Sevilha-Espanha, junho 2000.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Tech.*, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.
- LI, N.; BAI, R. (2005). A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 44, p. 6692-6700.
- LEHNINGER, A.L. Princípios De Bioquímica. Traduzido por W.R. Lodi, A.A. Simmes, São Paulo, Sarvier, 1999.

- LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. (2004). Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads. *Journal of Biotechnology*, v. 111, p. 219–227.
- LOPES, J. et al. Fitase e/ou celulase sobre a redução de nitrogênio de fósforo na excreta , em dieta de suínos contendo 50% de farelo de arroz integral.UFRGS. Porto Alegre, 2002.
- LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. *Biocommodity engineering. Biotech. Progress*, n. 17, p. 777- 793, 1999.
- LYND. R.L., ZHANG. P. H.Y. (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems (Review).*Wiley Periodics*, Inc. <http://www.interscience.wiley.com>.
- MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL Jr, C. G.; AMUNDSON, C. H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A review. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, v. 67, n. 12, p. 890-910.
- MAPA (Ministério de agricultura, pecuária e abastecimento). *Estatísticas de produção*.Departamento de cana-de-açúcar e agroenergia, www.agricultura.gov.br, 2005.
- MARTINO, A; DURANTE, M.; PIFFERI, P.G.; SPAGNA, G.; BIANCHI, G. Immobilization of β -Glucosidase from Commercial Preparation Part 1. A Comparative Study of Natural Supports, *Process Biochemistry* 31, nº3, pp. 281-285, 1996a.
- MARTINO, A.; PIFFERI, P.G.; SPAGNA, G.; Immobilization of β -Glucosidase from Commercial Preparation Part 2. Optimization of the Immobilization Process on Chitosan, *Process Biochemistry* 31, nº3, pp. 287-293, 1996b.
- MARTINS, E, M; ADRIANO,W,S;GIORDANO, R,L,C. Obtenção de derivados imobilizados de celulasas em géis de quitosana. *XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2005. Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, 2005.

- MATEO, C.; Increase in conformational stability of enzymes on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment, *Enzyme Microb. Technol.* 26, pp. 509-515, 2000.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; ERNEDO, M.B. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology* v.37 (4), p. 456-462, 2005.
- MCKILLIP, W. J.; COLLIN, G.; HÖKE, H; ULLMANN'S. *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH, Weinheim 1989; Vol. A12, p.119.
- MELAJA, A. J.; HAMALAINEN, L. Process for making xylitol. US Patent 4.008.285 Dep. 18/6/75, Publ. 15/2/77.
- MENEZEZ e AGUIAR, Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Biotecnologia, Pesquisa e Desenvolvimento*. n.26.maio/junho, 2002.
- MENDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulase. *Advance in Chemistry Series* v. 95. p. 391-414, 1969.
- MESSING R. A. Immobilized enzymes for industrial reactors, Ed. Messing R.A., *Academic Press*, p.63, 1975.
- MILLER, G, L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* v. 31(3), p. 426-428, 1959.
- 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. *Pós-Graduação em Bioquímica-FMRP-USP-Ribeirão Preto*, 1989.
- MONTEIRO Jr., O. A. C.; AIROLDI, C. (1999). Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. International *Journal of Biological Macromolecules*, v. 26, p. 119-128.
- MOZAHEV, V.V.; MELIK-NUBAROV, N.S.; SERGEEVA, M.V.; SIKSNIS, V.; MARTINEK, K.; Strategy for stabilizing enzymes- Part 1: Increasing Stability of Enzymes via their multipoint.

- MÜHLBACH, P.R.F. et al. Silagem de alfafa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchimento e à ação de aditivos biológicos. *Revista brasileira de zootecnia*, v. 29, p. 349-356.2000.
- NABY-ABDEL, M, A.; NABY-ABDEL, A, F.; OSMAN M, Y.; Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* A20. *Chemical Engineering Journal*. v. 68, p. 189-196, 1997.
- NAKO, K., LI. C., YOSHIMIMOTO. Y., FUKUNAGA. K. (2006) Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Bioresource Technology*. in press.
- NIDETZKY, B. STNEINER, W. HAYN, M. CLAEYSSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochim. J.* 298. 705-710.1994.
- OTERO, C.; ROBLEDO, L.; ALCANTARA, A. R. (1995). Study of the stabilization of pure lipases: comparison of two different lipase-microgel derivates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 1, p. 23-28
- OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. (2006). Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 366-372.
- PADUA, A. D. et al. Biodiesel: Uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira?
- PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J. M. (2002). Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19-20, p. 279-286.
- PEREIRA, G.H.A. Estudo da Imobilização Multipontual da Penicilina G Acilase em Sílica Ativada com Grupos Glioxil. 1996. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

- PHILIPPIDIS, G. P.; HATZIS, C. Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. *Biotechnology Progress* 13:33, 222-231, 1997
- RAMOS, L.P. et al. Biodiesel: Um Projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Revista biotecnologia & desenvolvimento*, São Paulo, v. 31, jul./dez., 2003.
- RAMOS, L.P. THE CHEMISTRY INVOLVED IN THE STEAM TREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS. *Quimica. Nova*, Vol. 26, No. 6, 863-871, 2003.
- RAJAN, M. (2004). Global market for industrial enzymes to reach \$2.4 million by 2009 Business Communications Company, Inc. RC-147U Enzymes for Industrial Applications. <http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html>. Acessado em 29 de outubro de 2006.
- RODRIGUEZ, J.L.R. Contribuição ao estudo de aproveitamento de resíduos lignocelulósicos. *Tese* (Doutorado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.
- RUEGGER, J.S. et al. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia – Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 27 n.2 p. 205-211. Junho 2004.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. (1987). Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, p. 717-723.
- SANDRENA, M.; J.S, MITCHINSON. Structure and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complex. *Process in Biophysics and Molecular Biology*. 8. 9246-291, 2005.
- SANTANA, J.; SOUZA, S.O. Subproduto da cana-de-açúcar. *Informe Agropecuário*, 10:22-26, 1984.
- SASAKI, M., ADSCHIRI, T. AND ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. *Bioresource Technology*, Vol.86, Issue 3, Pages 301-304, 2003.
- SHEN XL, XIA LM. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU 07. *Process Biochemistry* 39, 1363-1367, 2004.

- SHENG JING et al. Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of membrane science*. v. 155. p. 101-106. 1998.
- SILVA G.H. Processamento em batelada e contínuo de material amiláceo para produção de etanol. *Boletim Técnico Petrobrás* 23, 49-57, 1980
- SILVA, F. T.; *Tese de Doutorado* – Instituto de Química - UNICAMP, Campinas, 1995.
- SINISTERRA, J.; Immobilization of enzymes on inorganic supports by covalent methods, Immobilization of Enzymes and cells pp.331, 1997
- SHUSHARDT, U. et al. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 2, 247-251, 2001
- SMIDSROD, O.; SKAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends of Biotechnology* v.8, p.71-78, 1990.
- SPAGNA, G.; ANDREANI, F.; SALATELLI, E. Immobilization of alpha-L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan, *Process Biochemistry* v.33, n.1, p.57-62, 1998.
- SRIAMORNSAK P. Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. *European Journal Pharm Biopharm* v.46, p. 233–226,1998.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a *review*. *Bioresource Tech.*, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.
- TAQIEDDIN, E.; LEE, C.; AMIJI, M. Perm-selective chitosan-alginato hibrid microcapsules for enzyme immobilization technology. *Journal of ISPE Reprinted from Pharmaceutical Engineering* v. 22(6), p.1-3, 2002.
- TAPIA, C.; ESCOBAR, Z.; COSTA, E.; SAPAG-HAGAR, J.; VALENZUELA, F.; BASUALTO, C.; GAI, M. N.; YAZDANI-PEDRAM, M. (2004). Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 65-75.
- TANNER, D.R. et al. The effect of pH on the foam fractionation of β -glucosidase and cellulase. *Bioresource Technology*.v.87.p. 247-253. 2002.

- TARDIOLI, P. T.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÓSÁN, J. M. (2003 a). Hydrolysis of proteins by immobilized–stabilized alcalase-glyoxyl agarose. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 352–360.
- TARDIOLI, P. T.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÓSÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. (2003 b). Design of new immobilized–stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. *Biotechnology Progress*, v. 19, p. 565–574.
- TARDIOLI, P. W.; JUSTO PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; e GUIÓSÁN, J. M. Estabilização de Alcalase por Imobilização Covalente Multipontual sobre Suportes com uma Alta Concentração de Grupos Glioxil. In: *XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2002*. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, 2002.
- TILLER, J.; BERLIN, P e KLEMM, D. A Novel Efficient Enzyme-Immobilization Reaction on NH₂ Polymers by Means of L-Ascorbic Acid, *Biotechnology Applied Biochemistry*, v.30, p. 155-162, 1999.
- TYAGI R, GUPTA MN. Immobilization of aspergillus niger xylanase on magnetic latex beads. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 21, 217-222, 1995.
- VELTEN F, LAUE C, SCHREZENMEIR J. The effect of alginate and hyaluronate on the viability and function of immunisolated neonatal rat islets. *Biomaterials* v. 20, p. 2161–7, 1999.
- VIEIRA, R.S. Remoção e Recuperação de Hg (II) Utilizando Quitosana Natural e Reticulada. 2004. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- VILLALONGA, R.; GÓMEZ, L.; RAMÍREZ, H, L.; VILLALONGA, M,L.; HERNÁNDEZ, J. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. *Enzyme and Microbial Technology* v. 38 (1-2), p. 22-27, 2006.
- VILLALONGA, R.; DARIA, R. Function stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan. *Journal Chem Technol Biotechnol* v. 76, p. 489-493, 2001.

- VITOLO, M. *Biotechnologia Industrial-Processos Fermentativos e Enzimáticos*, São Paulo:Edgard Blücher, 2001. Cap.18, v.3
- XIA. L., SHEN. X. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. *Process Biochemistry*. V. 39.p. 1363-1367.(2004).
- WEN, ZHIYOU et al. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*. v. 96. p. 491-499. 2004.
- WU, F-C.; TSENG, R-L; JUANG, R-S.; Enhanced abilities of highly swollen chitosan beads for colour removal and tyrosinase immobilization, *Journal of Hazardous Materials* 81, pp. 167-177, 2001.
- 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 *Escherichia coli*. *Pós-graduação em Agronomia* , Área de Concentração em Microbiologia Agrícola-(Doutorado).Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiros”-USP. Piracicaba, São Paulo,2002
- ZABORSKY, O.R.; Immobilized Enzymes, National Science Foundation CRC Press inc., 2nd edition, 1977.
- 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.