

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

**SÍNTESE E ATIVAÇÃO SUPERFICIAL DE NOVOS SUPORTES MAGNÉTICOS
PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**

Willian Kopp

SÃO CARLOS

2013

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

**SÍNTESE E ATIVAÇÃO SUPERFICIAL DE NOVOS SUPORTES MAGNÉTICOS
PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS**

Willian Kopp

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano e Prof. Dr. Fernando Manuel Araújo-Moreira

SÃO CARLOS

2013

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

K83sa Kopp, Willian.
Síntese e ativação superficial de novos suportes magnéticos para imobilização de enzimas / Willian Kopp. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
198 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Tecnologia de enzimas. 2. Materiais magnéticos. 3. Penicilina G acilase. 4. Celulase. I. Título.

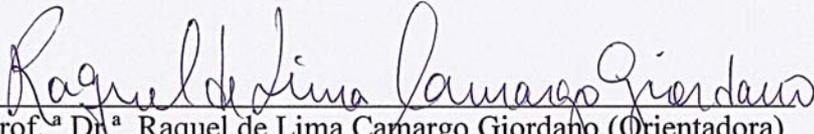
CDD: 660.634 (20^a)

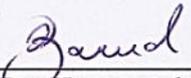
Willian Kopp

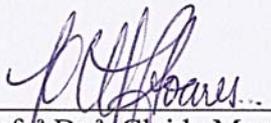
Tese de doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor
em Biotecnologia.

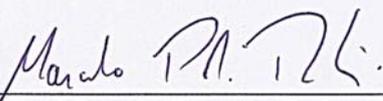
Aprovado em: 16/10/2013

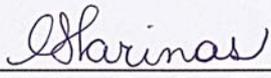
BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Raquel de Lima Camargo Giordano (Orientadora)
(Universidade Federal de São Carlos)


Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
(Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho"/Araraquara)


Prof.^a Dr.^a Cleide Mara Faria Soares
(Universidade Tiradentes)


Prof. Dr. Marcelo Perecin de Arruda Ribeiro
(Universidade Federal de São Carlos)


Prof.^a Dr.^a Cristiane Sanchez Farinas
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)

Dedico aos meus, todos eles.

AGRADECIMENTOS

Agradecer... queria agradecer a todos. São tantos nomes, tantos rostos, formas. Queria agradecer à criança que certa vez me sorriu em um domingo pela manhã quando caminhava em direção ao laboratório após semanas de experimentos frustrados, ao velinho que mora na esquina que com seu bom dia entusiasmado dá ânimo ao meu dia, à pessoa que inventou o cappuccino e ao cappuccino em si... tanta gente, tanta coisa que faz tanta diferença. Apesar da vontade de agradecer a tudo e a todos que permeiam minha vida dando força e condição para fazer meu trabalho da melhor maneira possível... trabalho cujo fruto é esta tese, não posso... não há papel suficiente. Sendo assim agradeço:

aos meus pais, ambos...

aos meus irmãos, ambos...

aos meus familiares, todos...

aos meus amigos, todos...

aos meus colegas, todos...

aos meus amores, todos...

aos meus mestres, todos...

ao cappuccino.

Agradeço em especial:

À Professora Raquel L. C. Giordano, que é mais do que uma orientadora, é minha mãe científica;

Ao Professor Fernando M.. Araújo-Moreira que sempre confiou em mim;

Ao Professor Roberto C. Giordano, que mesmo sem a obrigação formal sempre contribuiu para minha formação;

Ao meu abuelo científico Professor José M. Guisán;

Ao Professor Cesar Mateo, um exemplo, um amigo;

A todos agradeço.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa (processo nº 2008/56572-4), de fundamental importância para a realização deste trabalho, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado sanduíche que viabilizou a realização de grande parte desta pesquisa.

Nada me inspira mais na ciência do que a ciência de minha própria insignificância. Sagan, certa vez, expressou isso de forma brilhante.

"Look again at that dot. That's here. That's home. That's us. On it everyone you love, everyone you know, everyone you ever heard of, every human being who ever was, lived out their lives. The aggregate of our joy and suffering, thousands of confident religions, ideologies, and economic doctrines, every hunter and forager, every hero and coward, every creator and destroyer of civilization, every king and peasant, every young couple in love, every mother and father, hopeful child, inventor and explorer, every teacher of morals, every corrupt politician, every "superstar," every "supreme leader," every saint and sinner in the history of our species lived there – on a mote of dust suspended in a sunbeam."

- Carl Sagan, 1934-1996



You are here

The Earth as imaged from the the Voyager 1 spacecraft, as it exited the solar system in 1990. Earth is nearly 4 billion miles away in this image.

RESUMO

Enzimas são potentes catalisadores, porém frágeis operacionalmente, caras e solúveis. Aplicações industriais desses catalisadores, muitas vezes, são possíveis apenas com o uso de enzima imobilizada. Estudos indicam que o uso de suportes magnéticos para imobilizar enzimas pode permitir a recuperação seletiva do derivado através da aplicação de um campo magnético externo mesmo em meios complexos contendo outros sólidos em suspensão. Apesar de existirem muitos estudos empregando suportes magnéticos para imobilização de enzimas, não existem enzimas imobilizadas em materiais magnéticos disponíveis comercialmente. Nestes estudos geralmente são utilizados suportes magnéticos com características não ideais para aplicações em bioprocessos. O presente estudo teve como principal objetivo o desenvolvimento de novos suportes magnéticos e métodos para imobilização de enzimas nestes suportes, a enzima penicilina G acilase (PGA) e celulasas foram utilizadas como modelo. O estudo foi dividido em cinco partes, no Capítulo 1 é apresentada uma introdução indicando o estado da arte. O Capítulo 2 apresenta o preparo de novos suportes magnéticos robustos, baratos e com características ótimas para aplicações em bioprocessos. Nesta etapa foi testada a síntese de micro-partículas magnéticas de sílica (SMMps) em micro-emulsão água-em-óleo, empregando silicato de sódio como fonte de sílica e nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro como núcleo magnético. Os materiais obtidos apresentaram excelentes propriedades magnéticas, alta área de superfície e estrutura mesoporosa. A partir da caracterização físico-química e morfológica das SMMps foi possível controlar a estrutura final do material de acordo com as condições de síntese. No Capítulo 3 foi avaliado um novo conceito em imobilização de enzimas empregando materiais magnéticos. Neste estudo etiquetas magnéticas foram co-agregadas com PGA e entrecruzadas com glutaraldeído, gerando agregados enzimáticos entrecruzados com propriedades magnéticas (M-CLEAs). Várias condições reacionais foram testadas rendendo M-CLEAs com diferentes características e com resposta robusta a campos magnéticos externos. Derivados imobilizados com boa atividade recuperada e incremento na estabilidade térmica e frente a metanol 50% (v/v) foram obtidos. M-CLEAs apresentaram desempenho superior ao observado para a enzima livre em experimentos de hidrólise de penicilina G, sendo reutilizados por três ciclos reacionais sem perda de atividade. No Capítulo 4 foi avaliada a imobilização do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* em 17 suportes, empregando 60

diferentes condições de imobilização. Os experimentos de imobilização realizados empregando técnicas de imobilização por união covalente ocasionaram perda total de atividade enquanto métodos de imobilização por adsorção permitiram conservar boa atividade enzimática, porém a enzima desorveu do suporte com o aumento na força iônica do meio. Os melhores resultados foram alcançados para adsorção em MANAE-agarose seguido de entrecruzamento com glutaraldeído. Experimentos de hidrólise de substratos insolúveis mostraram que é possível hidrolisar este tipo de substrato mesmo com enzima imobilizada em suportes porosos. O derivado foi reutilizado por dez ciclos (hidrólise de papel filtro) conservando mais de 90% de sua atividade. Por fim, no Capítulo 5, o complexo celulolítico de *T. reesei* foi imobilizado por adsorção em SMMp ativado com grupos amino seguido de entrecruzamento com glutaraldeído apresentando bons resultados em termos de atividade recuperada.

Palavras chave: Suportes magnéticos; nanopartículas magnéticas; recuperação magnética; imobilização de enzimas; penicilina G acilase; complexo celulolítico.

ABSTRACT

Enzymes are potent catalysts, but operationally fragile, expensive and soluble. Industrial applications of enzymes, often, are possible only using immobilized enzyme. Nowadays, various studies have been performed aiming to immobilize enzymes onto magnetic carriers, which allow the selective recovery of the derivative by applying an external magnetic field even in complex reaction media containing other suspended solids. There are many studies using magnetic carriers in enzymes immobilization procedures, however there are no commercially available enzymes immobilized onto magnetic materials. In these studies usually are used carriers with not ideal characteristics for applications in industrial processes. The present study aimed to develop new magnetic carriers and methods for immobilization of enzymes in these carriers, penicillin G acylase (PGA) and cellulases have been used as model enzymes. The thesis was divided into five parts, in the first part (Chapter 1) the state-of-art is presented. The second part (Chapter 2) describes the synthesis of magnetic carriers robust, cheap and with good characteristics for applications in bioprocesses. For this purpose were tested the synthesis of silica magnetic microparticles (SMMps) in water-in-oil micro-emulsion using sodium silicate as silica source and superparamagnetic iron oxide nanoparticles as magnetic core. Materials with good magnetic properties, high surface area and mesoporous structure were obtained. SMMps structure was characterized, it was possible to control the final structure of the material according to the synthesis conditions. In the third part of this study (Chapter 3) was evaluated a new concept in enzymes immobilization using magnetic materials. Magnetic tags were co-aggregated with PGA and cross-linked with glutaraldehyde, producing magnetic cross-linked enzymes aggregates (M-CLEAs). Several reaction conditions were tested producing M-CLEAs with different characteristics and strong response to external magnetic fields. Derivatives with good recovered activity and increased thermal and methanol 50% (v/v) stabilities were obtained. M-CLEAs presented superior performance, in comparison with the free enzyme, in penicillin G hydrolysis experiments, being reused for three reaction cycles without loss of activity. In the fourth part of this study (Chapter 4) the immobilization of the *Trichoderma reesei* cellulolytic complex onto 17 carriers using 60 different immobilization conditions was evaluated. Covalent methods to cellulases immobilization resulted in total loss of the enzymatic activity. The immobilization by adsorption allowed preserving a portion of the enzymatic activity, however, the enzyme was

desorbed from the carrier with the increase in the ionic strength. The best results were achieved for adsorption in MANAE-agarose followed by cross-linking with glutaraldehyde. Hydrolysis experiments using insoluble substrates showed that it is possible to hydrolyze such substrates even using immobilized enzyme onto porous carriers. The derivative was reused for ten reaction cycles (hydrolysis of filter paper) saving more than 90% of its activity. Finally, in Chapter 5, the *T. reesei* cellulolytic complex was immobilized by adsorption onto SMMp activated with amino groups followed by glutaraldehyde cross-linking achieving good results in terms of recovered activity.

Keywords: Magnetic carriers, magnetic nanoparticles, magnetic recovery, enzymes immobilization, penicillin G acylase; cellulolytic complex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Variáveis que influenciam no processo de engenharia de um biocatalisador imobilizado.....	13
Figura 2.2 – Análises de DRX para SPION e SMMPs	23
Figura 2.3 – Análises de FT-IR para SPION e SMMPs.....	25
Figura 2.4 – Curva de $M \times H$ para de SPION	26
Figura 2.5 - Imagens de MEV obtidas para SMMPs (a)	28
Figura 2.6 - Imagens de MEV obtidas para SMMPs (b).....	29
Figura 2.7 - Magnetização de saturação para SMMPs obtidas empregando diferentes condições de reação	30
Figura 2.8 - Comparação do resultado de magnetização de saturação obtido para a amostra SMMP-7 com resultados encontrados na literatura.....	30
Figura 2.9 - Resultados de magnetização de saturação para SMMPs	33
Figura 2.0 - Mecanismo proposto para a síntese de SMMPs	34
Figura 2.11 - Resultados de análises de TGA para SMMPs	36
Figura 2.12 - Isotermas de adsorção-dessorção de N_2 para SMMPs.....	38
Figura 2.13 - Efeito da concentração molar de silicato de sódio na distribuição de tamanho de partícula de SMMP-1, SMMP-2 e SMMP-3.....	39
Figura 2.14 - Efeito da concentração molar de silicato de sódio na distribuição de diâmetro de poros de SMMP-1, SMMP-2 e SMMP-3.....	40
Figura 2.15 - Efeito da relação surfactante/água (w) na distribuição de tamanho de partícula de SMMP-4, b) SMMP-2 e SMMP-5	42
Figura 2.16 - Efeito da relação surfactante/água (w) na distribuição de diâmetro de poros de SMMP-4, SMMP-2 e SMMP-5	44
Figura 2.17 - Efeito da relação SPION/silicato de sódio (S) na distribuição de tamanho de partícula de SMMP-2 e SMMP-6.	45

Figura 2.18 - Efeito conjunto da relação mássica SPION/silicato de sódio (<i>S</i>) e da relação surfactante/água (<i>w</i>) na distribuição de tamanho de partícula de SMMp-5, SMMp-6 e SMMp-7	46
Figura 2.19 - Efeito conjunto da relação mássica SPION/silicato de sódio (<i>S</i>) e da relação surfactante/água (<i>w</i>) na distribuição de diâmetro de poros de SMMp-2, SMMp-5, SMMp-6 e SMMp-7	47
Figura 3.1 - Métodos para obtenção de enzimas imobilizadas livres de suporte	59
Figura 3.2 - Imagens de MET de amino-SPION	69
Figura 3.3 - Análises de DRX de SPION e posições teóricas para fases de magnetita.....	70
Figura 3.4 - Análise de FT-IR para amino-SPION.....	71
Figura 3.5 - Esquema de obtenção de M-CLEAs e CLEAs	73
Figura 3.6 - Estabilidade térmica para M-CLEAs e CLEAs	77
Figura 3.7 - Estabilidade em metanol 50% (v/v) para M-CLEAs e CLEAs	78
Figura 3.8 - Histograma da atividade recuperada para M-CLEAs obtidos empregando TBA como agente precipitante e entrecruzados com diferentes concentrações de glutaraldeído.....	80
Figura 3.9 - Imagens de MEV para M-CLEAs e CLEAs.....	82
Figura 3.10 - Imagens de MEV de agregados obtidos empregando TBA como agente precipitante	83
Figura 3.11 - Distribuição de freqüência de tamanho de partícula.....	85
Figura 3.12 - Log de diâmetro de partículas ($\log Pd_{\mu m}$) versus volume relativo de partícula .	86
Figura 3.13 – Derivado M-CLEA-TBA-G75 EDS “line-scan”	87
Figura 3.14 – Derivado M-CLEA-DME EDS “line-scan”.....	88
Figura 3.15 - Derivado M-CLEA-TBA EDS “line-scan”	89
Figura 3.16 – Derivado M-CLEA-PEG EDS “line-scan”	89
Figura 3.17 - Derivado M-CLEA-TBA–G150 EDS “line-scan”	90
Figura 3.18 - Velocidade de recuperação magnética do derivado CLEA-TBA-G75.....	91
Figura 3.19 – Hidrólise de PG potássica 5% empregando enzima livre e M-CLEA-TBA-G150	92

Figura 4.1 - Organização sistemática da celulose	102
Figura 4.2 – Mecanismo sinérgico de hidrólise enzimática de celulose	104
Figura 4.3 – Imobilização do complexo NS50013 em glioxil-agarose	127
Figura 4.4 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo os ácidos carboxílicos aminados em glioxil-agarose a pH 9.0 e 25 °C	132
Figura 4.5 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo ácidos carboxílicos aminados em glioxil-agarose a pH 8.5 e 25 °C.....	129
Figura 4.6 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo açúcares aminados em glioxil-agarose a pH 8.5 e 25 °C	130
Figura 4.7 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxido a pH 7.0 e 25 °C na presença de NaCl 1M.....	130
Figura 4.8 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxido a pH 8.0 e 25 °C na presença de NaCl 1M	133
Figura 4.9 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxido a pH 7.0 e 25 °C empregando tampão fosfato 1.0 M	133
Figura 4.10 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo açúcares oxidados e oxidados-reduzidos em sepabeads-epóxido a pH 7.0 e 25 °C empregando tampão fosfato 1 M.....	134
Figura 4.11 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo a camada de glicosilação aminada em sepabeads-epóxido a pH 7.0 e 25 °C empregando tampão fosfato 1 M	135
Figura 4.12 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em agarose-glioxil-IDA-Cu ⁺ a pH 7.0 e 25 °C.....	143
Figura 4.13 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em MANAE-epóxido a pH 7.0 e 25 °C	146
Figura 4.14 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em MANAE-10-glutaraldeído a pH 7.0 e 25 °C.....	148
Figura 4.15 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em MANAE-20-glutaraldeído a pH 7.0 e 25 °C.....	149

Figura 4.16 - Estabilidade térmica dos derivados preparados por adsorção do complexo NS50013 em MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino	157
Figura 4.17 - Estabilidade térmica dos derivados preparados por adsorção do complexo NS50013 em MANAE-40 seguido de entrecruzamento com glutaraldeído ou aldeído dextrana em diferentes concentrações	158
Figura 4.18 – Hidrólise enzimática de derivado MANAE-40 frente a diferentes substratos	160
Figura 4.19 – Hidrólise enzimática longa empregando 46.66 mg/mL de papel filtro Whatman como substrato	163
Figura 4.20 – Hidrólise enzimática longa empregando 4.66 mg/mL de papel filtro Whatman como substrato	164
Figura 4.21 – Reciclo de derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15%	165
Figura 4.22 - Estrutura tridimensional do domínio catalítico (CD) da celobiohidrolase Cel7A contendo uma cadeia de celulose contínua unida ao seu sítio ativo.	168
Figura 4.23 - Estrutura tridimensional do domínio catalítico (CD) da celobiohidrolase Cel6A contendo O1-Metil-Glicose, 4-Deoxy-4-Tio-Beta-D-Glucopiranosose e alfa-D-Glucose unidos ao sítio ativo	169
Figura 4.24 - Estrutura do domínio catalítico (CD) da endolucanase Cel7B.....	170
Figura 4.25 - Estrutura do domínio catalítico (CD) da endolucanase Cel5A.....	171
Figura 4.26 - Representação esquemática da imobilização de celulasas por união covalente multipontual	172
Figura 4.27 - Representação esquemática da imobilização de celulasas por adsorção iônica em suportes carregados positivamente	173
Figura 4.28 - Representação esquemática da imobilização de celulasas por adsorção iônica em suportes Agarose-PEI	174
Figura 4.29 - Representação esquemática da imobilização de celulasas por adsorção iônica em suportes MANAE-agarose seguido de entrecruzamento com glutaraldeído em baixas concentrações	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Condições experimentais empregadas na síntese de SMMps e resultados médios obtidos	27
Tabela 2.2 - Concentração relativa de silício e ferro na estrutura final das SMMps.....	43
Tabela 3.1 - Resultados de atividade recuperada e atividade (<i>R%</i>) específica para M-CLEAs e CLEAs	75
Tabela 3.2 - Efeito da temperatura nas atividades (velocidades iniciais) da enzima livre, M-CLEA-PEG e CLEA-PEG.....	76
Tabela 3.3 - Resultados relativos de estabilidade térmica e em metanol 50% para M-CLEAs e CLEAs	78
Tabela 4.1 - Lista de suportes empregados na imobilização do complexo celulolítico NS50013	122
Tabela 4.2 - Influência da modificação química na estrutura das proteínas presentes no complexo NS50013 na atividade celulolítica	123
Tabela 4.3 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em glioxil-agarose	126
Tabela 4.4 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxido.....	132
Tabela 4.5 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em agarose-bromocianógeno.....	135
Tabela 4.6 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em agarose-IDA-Cu ⁺	135
Tabela 4.7 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em trocadores catiônicos.....	136
Tabela 4.8 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em trocadores aniônicos.....	136

Tabela 4.9 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes mistos contendo grupos reativos e grupos IDA-Cu+	142
Tabela 4.10 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes mistos baseados em grupos amino	145
Tabela 4.11 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes MANAE-80 seguido de entrecruzamento com glutaraldeído	150
Tabela 4.12 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em suportes MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino	152
Tabela 4.13 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes MANAE contendo diferentes densidades de grupos amino seguido de diferentes estratégias de entrecruzamento	153
Tabela 4.14 – Tempo de meia vida e incremento no tempo meia vida do complexo celulolítico NS50013 imobilizado	159
Tabela 4.15 – Atividade enzimática para o derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% (v/v) empregando diferentes substratos na condição padrão (tampão citrato 50 mM pH 4.8 e 50 °C).	162
Tabela 5.1 – Resultados para a imobilização do complexo celulolítico de <i>T. reesei</i> em suportes SMMp-amino	191
Tabela 5.2 – Resultados para a etapa de entrecruzamento com glutaraldeído 0.15% (v/v) do complexo celulolítico de <i>T. reesei</i> adsorvido em suportes SMMp-amino ativados com APTS 1.0 mM/grama de material.....	192

LISTA DE ABREVIACÕES

6-APA - ácido 6-aminopenicilânico;

A_E - Atividade efetivamente imobilizada;

A_f - Atividade medida no sobrenadante/suspensão ao final do processo de imobilização;

AFA - Ácido fenilacético;

amino-SPION - Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (*iron oxide magnetic nanoparticles*) ativados com grupos amino;

A_o - Atividade medida no sobrenadante/suspensão no início do processo de imobilização

APTES – aminopropiltriétoxissilano;

A_r – Atividade residual;

ART – Açúcares redutores totais;

AT - Atividade teórica;

At_d - Atividade total observada no derivado ao final do processo de imobilização;

At_f - Atividade enzimática total observada no sobrenadante da solução de imobilização ao final do processo de imobilização;

At_i - Atividade enzimática total observada no sobrenadante da solução de imobilização ao início do processo de imobilização;

BET - Modelo matemático de Brunauer–Emmett–Teller;

BG- Beta-glicosidase;

BJH – Modelo matemático de Barrett-Joyner-Halenda;

BSA – Albumina de soro bovino, bovine serum albumin;

CBD - Domínio de ligação ao substrato de celulases, *cellulose binding domain*;

CBH – Celobiohidrolase;

CD - Domínio catalítico de celulases, *catalytic domain*;

Cdii - N,N'-Diciclohexilcarbodiimida;

CLEA - Agregados enzimáticos entrecruzados, cross-linked enzymes aggregates;

CLECs – Cristais enzimáticos entrecruzados, cross-linked enzymes crystals;

CLEs – Enzimas dissolvidas entrecruzadas, *cross-linked dissolved enzymes*;

CMC – Carboximetilcelulose;

CSDEs – Enzimas secas por spray-dry entrecruzadas, cross-linked spray-dried enzymes;

DME – dimetoxietano;

DNS - Ácido 6-dinitrosalicílico;

DRX – Difração de raios X;

DS - sulfato de dextrana, *dextran sulfate*;

EDA – etilenodiamina;

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva de raios X, *dispersive energy spectroscopy*;

EG – Endoglucanase;

FT-IT - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho;

IDA - Iminodiacetato de sódio;

$M \times H$ – Magnetização (emu.g^{-1}) versus campo magnético aplicado (Oe);

MANAE – Mono-amino-N-aminoetil;

M-CLEA – Agregados enzimáticos entrecruzados com propriedades magnéticas, magnetic cross-linked enzymes aggregates;

MET – Microscopia eletrônica de Transmissão;

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura;

NABA - Ácido 5-amino-2-nitrobenzóico;

NIPAB - Ácido 6-nitro-3(fenilacetamido) benzóico

PDAB - p-dimetilbenzaldeído;

PEG - polietilenoglicol 600;

PEI – polietilenoimina;

P_f - Concentração de proteínas totais no sobrenadante ao decorrer do processo de imobilização;

PG - Penicilina G potássica;

PGA - penicilina G acilase;

P_o - Concentração de proteínas totais no sobrenadante ao início do processo de imobilização;

P_r - Proteínas residuais;

$R\%$ - Atividade recuperada;

R_f - Rendimento de imobilização;

S.QU.I.D - Dispositivo supercondutor de interferência quântica, *Superconducting Quantum Interference Device*;

SA – Solução A;

SB – Solução B;

SMMp – Micro-partículas magnéticas de sílica, *silica magnetic microparticles*;

SPION - Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, *iron oxide magnetic nanoparticles*;

SX – Solução X;

TBA - álcool tec-butílico;

TEOS- tetraetilortossilicato;

TGA - Análise termogravimétrica;

U_{AVICEL} – Atividade frente a avicel;

U_{CMC-4.8} – Atividade frente a carboximetilcelulose em pH 4.8 a 50 °C;

U_{CMC-7.0} – Atividade frente a carboximetilcelulose em pH 7.0 a 25 °C;

UI - unidades internacionais;

U_{PF} – Atividade frente a papel filtro Whatman.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	ix
ABREVIACÕES	xi
SUMÁRIO	xiv

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Justificativa	1
1.2 Referências	7

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE NOVOS SUPORTES MAGNÉTICOS PARA APLICAÇÕES EM BIOPROCESSOS

2.1 Conhecimento Base	12
2.2 Materiais e Métodos	18
2.2.1 Materiais	18
2.2.2 Métodos.....	18
2.2.2.1 Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro	18
2.2.2.2 Síntese de Micro-partículas Magnéticas de Sílica.....	18
2.2.2.3 Análises Instrumentais.....	19
2.3 Resultados e Discussão	21
2.3.1 Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro (SPION)	21
2.3.2 Recobrimento de Nanopartículas Magnéticas com Sílica	24
2.3.3 Efeito da Concentração Molar de Silicato de Sódio	34
2.3.4 Efeito da Relação Água/Surfactante (<i>w</i>)	39
2.3.5 Efeito da relação Mássica SPION/Silicato de Sódio (<i>S</i>)	44
2.4 Conclusão	49
2.5 Referências	51

CAPÍTULO 3: SÍNTESE DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS LIVRES DE SUPORTE COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS (MAGNETIC CROSS-LINKED ENZYMES AGGREGATES – M-CLEAS): ESTUDOS EMPREGANDO PGA COMO ENZIMA MODELO

3.1 Conhecimento Base	58
3.2 Materiais e Métodos	64
3.2.1 Materiais	64
3.2.2 Métodos.....	64
3.2.2.1 Síntese e Funcionalização de Amino-SPION.....	64
3.2.2.2 Caracterização de Amino-SPION.....	65
3.2.2.3 Obtenção de M-CLEAs	65
3.2.2.4 Obtenção de CLEAs	66
3.2.2.5 Medida de Atividade de PGA.....	66
3.2.2.6 Medidas de proteínas Totais	66
3.2.2.7 Medidas de Estabilidade Térmica	67
3.2.2.8 Medidas de Estabilidade em Metanol 50%	67
3.2.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) de Raios X no Modo “Line-Scan”	67
3.2.2.10 Experimentos de Recuperação Magnética.....	67
3.2.2.11 Experimento de Hidrólise de PG	68
3.3 Resultados de Discussão	69
3.3.1 Amino-SPION Síntese e Funcionalização	69
3.3.2 Síntese de M-CLEAs	72
3.3.3 Efeito da Concentração de Glutaraldeído na Preparação de M-CLEAs	79
3.3.4 Estrutura de M-CLEAs e CLEAs	81
3.3.5 Distribuição de Tamanho de Partícula.....	83
3.3.6 EDS “Line-Scan”	86
3.3.7 Experimentos de Recuperação Magnética	88
3.3.8 Hidrólise de Penicilina G	91
3.4 Conclusão	93
3.5 Referências	95

CAPÍTULO 4: SELEÇÃO DE MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *Trichoderma reesei* EMPREGANDO AGAROSE E SEPABEADS-EPÓXIDO COMO SUPORTES MODELO

4.1 Conhecimento Base	101
4.2 Materiais e Métodos	109
4.2.1 Materiais	109
4.2.2 Métodos.....	109
4.2.2.1 Atividade Hidrolítica do Complexo Celulolítico	109
4.2.2.2 Análise de Proteínas Totais	110
4.2.2.3 Diálise do Complexo Celulolítico	110
4.2.2.4 Modificação Química na Estrutura das Enzimas do Complexo Celulolítico .	111
4.2.2.5 Preparação de Aldeído-Dextrana.....	112
4.2.2.6 Preparação de Suportes.....	112
4.2.2.7 Procedimentos de Imobilização.....	115
4.2.2.8 Cálculo de Rendimento de Imobilização, Atividade Recuperada e Atividade Efetivamente Imobilizada.....	117
4.2.2.9 Avaliação da Estabilidade Térmica	6
4.2.2.10 Experimentos de Hidrólise Longa de Papel	6
4.2.2.11 Experimentos de Hidrólise de Papel Filtro e Reciclo de NS50013 Imobilizada	6
4.3 Resultados e Discussão	120
4.3.1 Modificação Química do Complexo Celulolítico	121
4.3.2 Imobilização em Suportes Ativados com Grupos Glioxil e Epóxido	124
4.3.2.1 Grupos Glioxil.....	124
4.3.2.2 Grupos Epóxido	128
4.3.3 Imobilização em Suporte Agarose-Bromocianógeno	135
4.3.4 Imobilização por Adsorção	136
4.3.5 Imobilização por Adsorção Seguida de União Covalente	140
4.3.6 Otimização da Imobilização em Suportes MANAE-Agarose	151
4.3.7 Estabilidade Térmica	155
4.3.8 Derivado MANAE-40 Entrecruzado com Glutaraldeído 0.15% (v/v): Hidrólise de CMC, Papel Filtro Whatman e Avicel	158

4.3.9 Derivado MANAE-40 Entrecruzado com Glutaraldeído 0.15% (v/v): Experimentos de Hidrólise Longa e Reciclo Empregando Papel Filtro Whatman como Substrato.....	161
4.3.10 Discussão	165
4.4 Conclusão	176
4.5 Referências	177

CAPÍTULO 5: IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *Trichoderma reesei* EM SMMPS ATIVADAS COM GRUPOS AMINO

5.1 Conhecimento Base	186
5.2 Materiais e Métodos	188
5.2.1 Materiais	188
5.2.2 Métodos.....	188
5.2.2.1 Ativação de SMMp com Grupos Amino.....	188
5.2.2.2 Imobilização do Complexo Celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i>	188
5.3 Resultados e Discussão.....	190
5.3.1 Ativação de SMMp com Grupos Amino	190
5.3.2 Imobilização do Complexo Celulolítico de <i>Trichoderma reesei</i>	190
5.4 Conclusão	193
5.5 Referências	194
SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS	198

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO



1.1 Justificativa

Atualmente um dos grandes desafios da indústria é o desenvolvimento de produtos e processos menos agressivos em termos ambientais, contribuindo para o desenvolvimento de um modo produtivo sustentável. Nesse sentido, a tecnologia enzimática é apontada como rota alternativa para substituição gradativa de processos tradicionais por oferecer vantagens necessárias ao estabelecimento de processos tecnologicamente limpos. No entanto, o elevado custo das enzimas, dificuldade de separação destas do produto final e a inativação térmica e por solventes orgânicos muitas vezes impossibilitam a sua aplicação em escala industrial. Uma das principais alternativas para diminuir o custo de processos enzimáticos industriais é a imobilização de enzimas em suportes insolúveis. A imobilização de enzimas permite a recuperação e reuso do biocatalisador além de, em muitos casos, aumentar a estabilidade térmica, estabilidade frente a solventes orgânicos e estabilidade operacional de determinadas enzimas. Neste contexto a imobilização de enzimas pode tornar factível a utilização de biocatalisadores em inúmeros processos industriais.

As características físico-químicas, morfológicas e de superfície do suporte empregado em um procedimento de imobilização determina, juntamente com alguns outros fatores, as propriedades finais das enzimas imobilizadas, comumente chamadas de derivado. A escolha de um suporte para a imobilização de enzimas depende de alguns fatores que os tornam interessantes para aplicações industriais, entre eles: resistência microbiológica, estabilidade térmica, durabilidade química, caráter hidrofóbico e hidrofílico, facilidade de regeneração capacidade de carga e custo (MALCATA *et al.*, 1990; VILLENEUVE, MUDERHWA e GRAILLE, 2000). Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos, orgânicos ou inorgânicos com diferentes características de tamanho, forma e densidade, têm sido estudados para a imobilização de uma série de enzimas (GUISAN, 1988; OLIVEIRA, ALVES e CASTRO, 2000; PEREIRA *et al.*, 2001, TARDIOLI, 2003a,b; MARTINS, ADRIANO e GIORDANO, 2006; MARTINS, 2007).

Atualmente um novo tipo de suporte vem sendo amplamente investigado para aplicações em bioprocessos, inclusive para a imobilização de enzimas, estes suportes são conhecidos como suportes magnéticos. Este tipo de suporte pode ser manipulado remotamente através da aplicação de um campo magnético externo (BAUER, BIRENBAUM

e MEYER, 2004).

A tecnologia de suportes magnéticos é utilizada para permitir a separação magnética de materiais ou substâncias que não são naturalmente magnéticas. Ela foi desenvolvida no início da década de 40 com o objetivo de adsorver matéria orgânica em pequenas partículas de magnetita (Fe_3O_4) e separá-las da solução através da aplicação de um campo magnético externo seguido de uma floculação para separação por sedimentação, esta técnica é geralmente conhecida como magnetofloculação. A partir de meados da década de 70 muitos esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de suportes magnéticos em diversos campos (MOFFAT *et al.*, 1994).

Suportes magnéticos são de enorme interesse para separação de substâncias cujo tamanho diminuto torna sua separação laboriosa, lenta e custosa através de métodos clássicos. Técnicas de separação custo-efetivas são um fator crucial para o desenvolvimento da indústria biotecnológica e em procedimentos de rotina em biologia molecular. A principal característica de partículas magnéticas é sua resposta a forças magnéticas externas, característica esta que tem sido aplicada em muitos campos da biotecnologia.

Atualmente muita atenção tem sido focada em tecnologias enzimáticas com alternativas à síntese orgânica tradicional tendo como meta o desenvolvimento de tecnologias limpas e sustentáveis para a fabricação de compostos químicos e compostos químicos finos. Esses esforços têm conduzido a rotas sintéticas mais curtas, que geram poucos resíduos, e conseqüentemente, são ambientalmente e economicamente atrativas. Neste contexto muita atenção é dedicada à síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos através da acilação enzimática do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e do ácido 7-amino-3-deacetoxi cefalosporânico (7-ADCA). Estes antibióticos semi-sintéticos, quando comparados à penicilina G, possuem estabilidade superior, são mais facilmente absorvidos pelo organismo e possuem menor número de efeitos colaterais (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2004).

As sínteses por via química dos antibióticos semi-sintéticos ampicilina e amoxicilina envolvem várias etapas custosas e solventes orgânicos tóxicos. A síntese enzimática, operando em meio aquoso, a temperatura próxima da ambiente e pH próximo do neutro, reduz o número de etapas de reações e a quantidade de resíduos por quilo de produto, sendo, portanto muito interessantes industrialmente, concordando desta maneira com o apelo da “química verde” (GONÇALVES, GIORDANO e GIORDANO, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005).

A Penicilina G Acilase – PGA (EC 3.5.1.11) é a enzima chave utilizada na produção de antibióticos β -lactâmicos. Esta enzima hidrolisa regiosseletivamente a cadeia lateral da

penicilina G e demais antibióticos β -lactâmicos, liberando o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), o qual é o bloco de construção empregado na obtenção de penicilinas semi-sintéticas. O grande potencial desta enzima na química orgânica deriva da larga faixa de nucleófilos que podem ser reconhecidos como substratos por ela (ex. amino ácidos, núcleos antibióticos, alcoóis, açúcares, dentre outros) (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2004).

A PGA apresenta baixa estabilidade quando empregada em temperaturas superiores a 35 °C, além de apresentar baixa tolerância a solventes orgânicos e valores elevados de pH, fazendo necessária a sua estabilização operacional frente a estes fatores (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2004). O desenvolvimento de procedimentos de imobilização tornou possível a utilização de PGA em processos industriais a partir de 1980, através de uma redução dramática nos custos da enzima, devido a sua reutilização e uma melhora substancial na sua estabilidade térmica e tolerância a solventes orgânicos. De acordo com a literatura, PGA imobilizada responde por 88% da produção mundial de 6-APA, o restante é obtido utilizando penicilina V acilase, também imobilizada (RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2004). Essa enzima não é empregada em processos industriais em sua forma livre, sendo comercializada apenas na sua forma imobilizada geralmente em suportes com granulometria entre 0.1 e 0.5 mm (VAN ROON, 2005). No DEQ-UFSCar foi desenvolvido um processo de síntese de ampicilina através da reação entre éster metílico de fenilglicina e 6-APA (GIORDANO *et al.*, 2005a; GIORDANO *et al.*, 2005b; GIORDANO *et al.*, 2005c; GIORDANO *et al.*, 2005d), no referido processo opera-se com cristalização do produto *in situ* o que dificulta a separação do biocatalisador e do produto ao final do processo. A utilização de PGA imobilizada em materiais magnéticos poderia solucionar este problema operacional.

Outro processo extremamente investigado, no Brasil e no mundo, é a produção de etanol a partir de materiais ligno-celulósicos. No Brasil, estuda-se especialmente o uso de bagaço de cana de açúcar já que a produção de açúcar e álcool no país gera atualmente um excedente de aproximadamente 16 milhões de toneladas que não são queimados nas caldeiras (PEREIRA Jr., 2007). O bagaço de cana é constituído basicamente por três polímeros: celulose (polímero de glicose), hemicelulose (cadeias ramificadas de açúcares, em sua maioria aldopentoses, principalmente xilose) e lignina (macromolécula fenólica), na proporção aproximada de 50:30:20 (em massa). Uma tonelada de bagaço gera cerca de 500 Kg de celulose, 250 Kg de hemicelulose e 200 Kg de lignina (COELHO *et al.*, 2001). Desta forma a hidrólise da celulose, que é o principal componente do bagaço da cana, é peça chave no

processo de obtenção de álcool a partir de ligno-celulósicos. Vários estudos têm demonstrado que a hidrólise enzimática é a alternativa mais promissora para a degradação de materiais ligno-celulósicos (OGIERL, 1999; YU e ZHANG, 2004, SHEEHA *et al.*, 2006). Entretanto, os resultados obtidos até agora por inúmeros pesquisadores indicam que a hidrólise enzimática ainda não é viável em razão dos altos custos das enzimas, celulasas e xilanasas, os complexos de endo- e exo-enzimas envolvidas na degradação de celulose e xilanas.

Desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a redução dos custos com a aplicação de complexos celulolíticos. Neste contexto, a imobilização pode permitir a recuperação e estabilização do biocatalisador, além do uso de temperaturas mais elevadas de reação, com consequente incremento das velocidades de reação e solubilidade dos substratos, reduzindo assim o custo global de todo o processo (TYAGI *et al.*, 1995; NABY-ABDEL *et al.*, 1997; GAMA *et al.*, 2002; MESTA *et al.*, 2003; SHEN e XIA, 2004;).

Tanto na natureza quanto em processos industriais os sistemas celulolíticos são constituídos por enzimas que atuam nas extremidades (exoglucanases) e que atuam no meio (endoglucanases) das cadeias de celulose, de uma forma sinérgica (WOOD, 1992). As endoglucanases hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular, as celodextrinas e celobiose (dissacarídeo). As exoglucanases ou celobiohidrolases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, liberando celobiose. Finalmente, a celobiose é hidrolisada pelas β -glicosidades ou celobiases, gerando glicose.

A celulose é insolúvel em fase aquosa e a enzima solúvel, mesmo com enzima livre a reação já ocorrerá em duas fases. A velocidade da hidrólise enzimática de celulose dependerá fortemente da facilidade de encontro entre o substrato sólido e a enzima solúvel, que deverá se adsorver à superfície de celulose. O uso de enzima imobilizada, uma reação sólido-sólido, portanto, pareceria em princípio ser inviável. Contudo estudos realizados no DEQ-UFSscar mostraram ser possível imobilizar celulasas covalentemente em quitosana conservando atividade enzimática (ADRIANO, 2008). O derivado obtido foi utilizado, com sucesso, para hidrolisar bagaço de cana previamente submetido a tratamento alcalino a quente, para redução do conteúdo de lignina. Os experimentos mostram conclusivamente que a hidrólise pode ser efetuada com enzima imobilizada e atingir conversões maiores que as obtidas com enzima livre devido a um aumento na estabilidade da enzima imobilizada (MARTINS, ADRIANO e GIORDANO, 2006; MARTINS, 2007). Porém ao final da reação era impossível separar

seletivamente o suporte dos subprodutos da hidrólise como lignina e xilana, mesmo em escala de bancada. Uma possível estratégia para resolução deste problema operacional é a imobilização de celulases em materiais magnéticos, o que permitiria a recuperação do biocatalisador de forma seletiva.

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo desenvolver novos suportes magnéticos e novas técnicas de imobilização de enzimas em suportes magnéticos tendo como modelo as enzimas penicilina G acilase e celulases. Tendo em vista as necessidades reais de processos industriais empregando enzimas imobilizadas tentamos desenvolver suportes magnéticos robustos, custo efetivos e com real aplicabilidade em bioprocessos, bem como técnicas para imobilização de enzimas nestes suportes que confirmam aos derivados incrementos em sua estabilidade operacional. O capítulo 2 possui enfoque no desenvolvimento de novos suportes magnéticos robustos e baratos com características ótimas para aplicações em bioprocessos; O Capítulo 3 descreve um novo método de imobilização de enzimas através da co-agregação entre etiquetas magnéticas e proteínas seguido de entrecruzamento com glutaraldeído, nesta etapa do trabalho PGA foi empregada como enzima modelo; O Capítulo 4 descreve a seleção de métodos para imobilização do complexo celulolítico de *Trichoderma reesei* empregando suportes agarose e sepabeads-epóxido como modelo, a utilização de suportes modelo foi necessária uma vez que a imobilização de celulases se mostrou uma tarefa extremamente árdua; O Capítulo 5, por fim, descreve brevemente a imobilização de celulases nos suportes magnéticos desenvolvidos no Capítulo 2 empregando as estratégias investigadas no Capítulo 4.

1.2 Referências

ADRIANO, W. S. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2008.

BAUER, L. A.; BIRENBAUM, N. S.; MEYER, G. J. Biological applications of high aspect ratio nanoparticles. **Journal Of Materials Chemistry**, v. 14, p. 517-526, 2004.

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, n. 1, p. 33-42, 2001.

FABER, K. Biotransformations in **Organic Chemistry: A Textbook**. 3rd ed., Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, 1997.

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.

GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; FERREIRA, A. L. A. Chin. **Patent Application** 200380107752-8, 2005d.

GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; FERREIRA, A. L. A. **European Patent Application** 03 773 360-7, 2005b.

GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; FERREIRA, A. L. A. **Indian Patent Application** 2272/DELNP/2005, 2005c.

GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; FERREIRA, A. L. A. **U.S. Patent Application** 10/536,426, 2005a.

GONÇALVES, R. B.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Mathematical modeling of batch and semibatch reactors for the enzymic synthesis of amoxicillin. **Process Biochem.**, v. 40; p. 247-276; 2005.

HONG, J.; GONG, P. J.; YU, J. H.; XU, D. M.; SUN, H. W.; YAO, S. Conjugation of α -chymotrypsin on a polymeric hydrophilic nanolayer covering magnetic nanoparticles. **J. of Mol. Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 99-105, 2006.

MALCATA, F. X.; RYES, H. R.; GARCIA, H. S. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review. **Journal of the American Chemical Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.

MARTINS, R. E. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

MARTINS, R. E., ADRIANO, W. S., GIORDANO, R. L. C. Obtenção de derivados imobilizados de celulases em géis de quitosana. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Santos, 2006.

MOFFAT, G.; WILLIAMS, R. A.; WEBB, C.; STIRLING, R. Selective separation in environmental and industrial processes using magnetic carrier technology. **Minerals Engineering**, v. 7; n. 8; p. 1039-1056, 1994.

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

OGIER, J. C. Ethanol production from lignocellulosic biomass. **Oil Gas Sci Technol**, v. 54, p. 67-94, 1999.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochem Eng. J.**, v.5, p. 63-71, 2000.

PEREIRA Jr N. Biotecnologia de lignocelulósicos para a produção de etanol e o contexto de biorrefinaria. Conferência Plenária, **I Simpósio de biotecnologia da UFSCar**, São Carlos, 2007.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase

from *Cândida rugosa*: A comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads. **Ap. Biochem. Biotechnol.**, v. 91-93, p. 739-752, 2001.

PHILIPPIDIS, G. P.; HATZIS, C.; Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 33, p. 222-231, 1997.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Recente biotechnological interventions for developing improved penicillin G acilase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2004.

RIBEIRO, M. P. A.; PÁDUA, T. F.; LEITE, O. D.; GIORDANO, R. L. C., GIORDANO, R. C. Multivariate calibration methods applied to the monitoring of the enzymes synthesis of ampicilin. **Chemometrics and Intelligent laboratory Systems**, n. 90, p. 169-177, 2005.

SHEEHA, J.; HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol-the fuel of tomorow from residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549- 556, 2001.

SHEN X. L.; XIA L. M. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1363-1367, 2004.

TAKAHASHI, K.; TAMAMURA, Y.; KODERA, Y.; MIHAMA, T.; SAITO, Y.; INADA, Y. Magnetic lipase active in organic solvents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 142, n. 2, p. 291-296, 1987.

TARDIOLI, P. W.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; Giordano, R. L. C. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 565-574, 2003a.

TARDIOLI, P. W.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 352-360, 2003b.

TYAGI R.; GUPTA M. Immobilization of *aspergillus-niger* xylanase on magnetic latex beads. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 21, p. 217-222, 1995.

VAN ROON, J. L. **Heterogeneity and scale in the rational design of an immobilized biocatalyst**. Doctoral Thesis, Wageningen University, 224p, 2005.

VARLAN, A. R.; SANSEN, W.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. Covalent enzyme immobilization on paramagnetic polyacrolein beads. **Biosensors Bioelectronics**, v. 11, n. 4, p. 443-448, 1996.

VILLENEUVE, P. MUDERHWA, J. M. GRAILLE, J. Customizing lipases or biocatalysis: A survey of chemical physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WOOD, T. M. Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: Coughlan, M. P. (Ed). **Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation**. Elsevier, London. p. 17 – 35. 1989.

YOSHIMOTO, T.; MIHAMA, T.; TAKAHASHI, K.; SAITO, Y.; TAMAMURA, Y.; INADA, Y. Chemical modification of enzymes with activated magnetic modifier. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 145, n. 2, 908-914, 1987.

YU, Z.; ZHANG, H. X. Ethanol Fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 199-204, 2004.

CAPÍTULO 2:

DESENVOLVIMENTO DE NOVOS SUPORTES MAGNÉTICOS PARA APLICAÇÕES EM BIOPROCESSOS



2.1 Conhecimento Base

As características finais de uma determinada enzima imobilizada, comumente chamada de derivado, dependem de inúmeros fatores como:

1) Características da enzima que se pretende imobilizar - Estrutura tridimensional, aminoácidos presentes na superfície da molécula, estrutura do sítio ativo, necessidade de coenzimas e/ou co-fatores, tamanho e natureza química do substrato/s e dos produto/s, estabilidade térmica, estabilidade frente a diferentes valores de pH, estabilidade frente a solventes orgânicos, etc.;

2) Protocolo de imobilização – Tampão empregado, pH e força iônica do processo de imobilização, temperatura do processo de imobilização, tempo de imobilização, concentração de proteína, concentração da enzima que se pretende imobilizar, presença e concentração de aditivos, etc.;

3) Método de imobilização – União covalente, interação iônica, adsorção hidrofóbica, adsorção por afinidade, interações mistas (ex. iônica e covalente, hidrofóbica e covalente), etc;

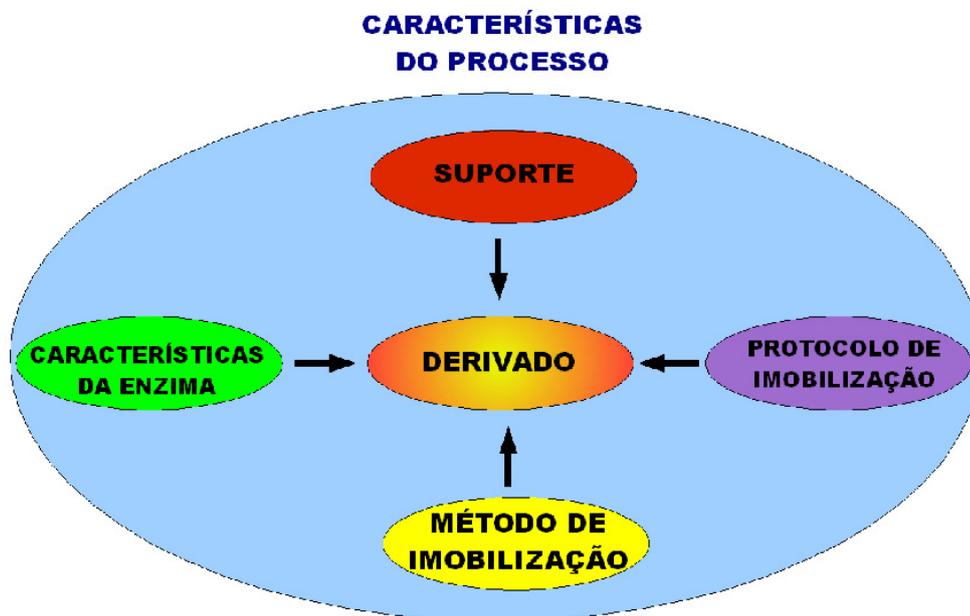
4) Suporte empregado – Natureza do suporte (orgânico, inorgânico ou híbrido orgânico-inorgânico), área de superfície, diâmetro de poros, tamanho de partícula, geometria dos poros, natureza do(s) grupo(s) reativo(s) presente(s) na superfície do material, densidade de grupos reativos na superfície do material, distribuição de grupos reativos na superfície do material, etc.

Além destes fatores, é importante levar em consideração quais são as características do processo em que a enzima será aplicada, por exemplo, se uma enzima for utilizada em reações de hidrólise em meio aquoso é interessante aumentar a estabilidade térmica dessa enzima favorecendo sua utilização em temperaturas elevadas. Se a mesma enzima for utilizada em reações de síntese em solventes orgânicos é importante aumentar sua estabilidade frente a solventes orgânicos e ao mesmo tempo evitar que o suporte carregue água para reação o que poderia interferir no rendimento do processo. A Figura 2.1 exemplifica o processo de engenharia de um biocatalisador imobilizado.

Neste contexto é crucial para o sucesso de um procedimento de imobilização ter em conta as características do suporte empregado na imobilização de uma determinada enzima visando à aplicação em um determinado processo. A escolha de um suporte para imobilização de enzimas depende de alguns fatores que os tornam interessantes para aplicações industriais, entre eles: resistência microbológica, estabilidade térmica, durabilidade química, alta área de superfície, estrutura mesoporosa ou macroporosa, possibilidade de controle preciso da

química de superfície, facilidade de regeneração, capacidade de carga e custo (MALCATA *et al.*, 1990; VILLENEUVE, MUDERHWA e GRAILLE, 2000). Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos, orgânicos ou inorgânicos; com diferentes características de tamanho, forma e densidade, foram estudados visando imobilizar uma série de enzimas (MARTINS, ADRIANO e GIORDANO, 2006; MARTINS, 2007; PEREIRA *et al.*, 2001, TARDIOLI, 2003a,b).

Figura 2.1 – Variáveis que influenciam no processo de engenharia de um biocatalisador imobilizado.



Atualmente um novo tipo de suporte vem sendo amplamente investigado para aplicações em bioprocessos, inclusive para a imobilização de enzimas, são os chamados suportes magnéticos. Estes suportes permitem manipulação remota através da aplicação de um campo magnético externo e vem sendo aplicados nos mais diversos ramos da biotecnologia (BAUER, BIRENBAUM e MEYER, 2004). A tecnologia de suportes magnéticos vem sendo utilizada para permitir a separação magnética de materiais ou substâncias que não são naturalmente magnéticas. O método foi desenvolvido no início da década de 40 com o objetivo de adsorver matéria orgânica em pequenas partículas de magnetita (Fe_3O_4) e separá-las de uma solução através da aplicação de um campo magnético externo seguido de floculação para separação por sedimentação, esta técnica é geralmente conhecida como magneto-floculação (BROOMBERG, 1998).

Partículas magnéticas contendo grupos funcionais em sua superfície altamente específicos ao produto de interesse podem tornar a separação magnética factível para virtualmente qualquer sistema (YAVUZ *et al.*, 2009). A resposta magnética natural de tais absorventes permite sua manipulação seletiva e separação mesmo na presença de outros sólidos em suspensão. Desta forma é possível separar espécies alvo diretamente de soluções crus de processos biológicos (ex. caldos de fermentação, células lisadas, plasma, leite, soro e extrato de plantas) apenas ligando-os a adsorventes magnéticos antes da aplicação de um campo magnético externo (FRANZREB *et al.*, 2006). Este método de separação pode substituir várias operações unitárias na purificação de produtos biotecnológicos, simplificado vários tipos de processos industriais. A imobilização de enzimas em suportes magnéticos pode facilitar a recuperação de biocatalisadores a partir do meio reacional em processos que empreguem enzimas imobilizadas.

Comparado com materiais magnéticos em escala macrométrica nanopartículas magnéticas possuem uma propriedade única chamada de superparamagnetismo. Esta propriedade faz com que estas nanopartículas sejam atraídas por um campo magnético externo, mas não apresentem magnetismo remanescente após a remoção do campo. A anisotropia magnética que, de forma simplificada, é o que mantém um determinado material magnetizado é, geralmente, proporcional ao volume da partícula (HARRIS, 2002). Quando o tamanho de partícula de materiais ferromagnéticos diminui para escalas menores que algumas dezenas de nanômetros estas partículas passam a apresentar um único domínio magnético. Na presença de um campo magnético externo todos os spins deste domínio se orientam na direção do campo fazendo esta partícula apresentar comportamento ferromagnético. Quando o campo magnético é removido a energia presente no meio (em temperaturas próximas a temperatura ambiente) é suficiente para desalinhar os spins do material, em questão de milissegundos o material passa a apresentar comportamento típico paramagnético, ou seja deixa de comportar-se como um ímã (HARRIS, 2002; SUH *et al.*, 2009). Desta maneira nanopartículas superparamagnéticas dispersas em uma determinada solução podem ser removidas utilizando um magneto externo sem demonstrar problemas com aglomeração após a remoção do campo magnético. Quanto maior a magnetização de saturação de um determinado material maior será sua resposta a campos magnéticos externos. Magnetização de saturação é a magnetização máxima, dada geralmente em unidades eletromagnéticas por grama (emu.g^{-1}), alcançada por um determinado material na presença de um campo magnético externo.

Partículas magnéticas capazes de formar dispersões superparamagnéticas em um

fluidos são geralmente compostas de metais ou óxidos de metais com escalas entre 1 e 100 nm. Estes metais e óxidos de metais incluem Ni, Co, Fe, Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, dentre outros. Metais puros possuem maior susceptibilidade magnética, contudo, são altamente tóxicos e extremamente susceptíveis a oxidação sob condições atmosféricas ou fisiológicas, gerando materiais antiferromagnéticos. A susceptibilidade frente à oxidação em conjunto com a alta área de superfície apresentada por nanopartículas magnéticas dificulta sua utilização em ambientes ricos em oxigênio (SUN *et al.*, 2008). O óxido de ferro magnetita ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ou Fe_3O_4) é o material comumente empregado como núcleo magnético na preparação de suportes magnéticos para aplicações em bioprocessos e em biomedicina, opcionalmente maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) também pode ser utilizada. A magnetita pode ser sintetizada a partir de soluções aquosas de sais de ferro di e tri-valentes. O tamanho e a forma dos núcleos magnéticos, bem como a natureza do material de recobrimento, podem ser variados através do processo de obtenção produzindo materiais com diferentes propriedades. Magnetita e maghemita são similares em suas propriedades físicas e em sua estrutura cristalina, ambas apresentam ferrimagnetismo, contudo a maghemita demonstra menor magnetização de saturação (HARRIS, 2002).

O método mais comum para a preparação de magnetita é a co-precipitação de Fe^{2+} e Fe^{3+} hidratados na presença de uma base forte. Este método, conhecido como co-precipitação homogênea, consiste na reação de misturas estequiométricas de hidróxidos férricos e ferrosos em um meio aquoso gerando magnetita ou maghemita. Através deste método é possível controlar o tamanho das nanopartículas em uma faixa entre 2 e 15 nm através do controle do pH e força iônica do meio (TARTAJ *et al.*, 2005).

Um dos principais problemas relacionados às nanopartículas magnéticas para aplicações em biomedicina e em bioprocessos advém justamente de seu tamanho. Nanopartículas magnéticas possuem alta relação área de superfície/volume e conseqüentemente apresentam alta energia de superfície o que favorece sua agregação quando em solução, além de sua alta reatividade química. Isso faz com que nanopartículas magnéticas, de óxido de ferro, como magnetita e maghemita, sejam rapidamente oxidadas a óxidos de ferro não magnéticos quando na presença de oxigênio (WU, HE e JIANG, 2008). Desta forma, o recobrimento de nanopartículas magnéticas se faz necessário para garantir a estabilidade do material e evitar a formação de agregados. Além disso, para aplicações biotecnológicas é interessante, e em alguns casos necessário, recobrir nanopartículas com capas poliméricas, não somente para obter estabilidade química e mecânica, mas também para introduzir funcionalidades na superfície do material modulando sua especificidade de ligação.

O recobrimento de uma nanopartícula magnética, por si só, configura a síntese de um suporte magnético. A abordagem de sintetizar suportes magnéticos pelo simples recobrimento de nanopartículas magnéticas gerando materiais em escala nanométrica tem sido amplamente utilizada para preparação de suportes com aplicações em biomedicina e em purificação de proteínas/imobilização de enzimas em escala de bancada (BAUER, BIRENBAUM e MEYER, 2004; BETANCOR *et al.*, 2005; FRANZREB *et al.*, 2006 GAMARRA *et al.*, 2005). No entanto, quando objetiva-se empregar um suporte magnético para aplicação em bioprocessos em escala industrial é necessário levar em conta alguns outros aspectos. Um bom suporte magnético para aplicações em bioprocessos precisa, primeiramente, apresentar todas as características ótimas de um bom suporte não magnético para aplicações em bioprocessos, como discutido anteriormente (ex. alta estabilidade, alta área de superfície, baixo custo, etc.). Como características adicionais um bom suporte magnético deve apresentar: 1) Propriedades superparamagnéticas, o que pode ser alcançado através da utilização de um núcleo magnético com esta propriedade (ex. magnetita e maghemita); 2) Alta magnetização de saturação; 3) Ausência de agregação não magnética (ex. agregação por interação iônica ou hidrofóbica); 4) Separação rápida e eficiente através da aplicação de um campo magnético externo moderado, mesmo quando em soluções viscosas e com outros sólidos em suspensão.

Na grande maioria dos trabalhos descritos na literatura que tratam sobre a aplicação de suportes magnéticos em bioprocessos são empregadas nanopartículas magnéticas recobertas com algum polímero orgânico, ou sílica. A força magnética que age sobre uma determinada partícula em um determinado gradiente de campo é proporcional ao volume da partícula. Se uma partícula é muito pequena sua força de tração em um determinado gradiente de campo magnético não será suficiente para superar o movimento Browniano e a separação não irá ocorrer (YAVUZ *et al.*, 2009). Quanto menor a partícula a ser separada maior terá que ser o campo magnético empregado ou maior será o tempo de exposição das partículas a um determinado campo magnético para que a separação seja eficiente. A construção de equipamentos industriais que utilizam campos magnéticos potentes (campos maiores que 2.0 Tesla) é cara e complexa, o que torna a utilização de suportes magnéticos em escala nanométrica em bioprocessos industriais algo inviável (YAVUZ *et al.*, 2009). Desta forma, suportes magnéticos à escala micrométrica são melhor escolha para aplicações em bioprocessos.

Diferentes metodologias para síntese de suportes magnéticos foram desenvolvidas utilizando inúmeras propostas (OSAKA *et al.*, 2006). Segundo Bozhinova (2004) suportes magnéticos podem ser preparados de três maneiras: 1) Recobrindo um núcleo magnético com

polímeros naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos; 2) Encapsulação de sólidos magnéticos em géis ou polímeros (naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos); 3) Infiltração de matrizes porosas com nanopartículas magnéticas ou misturas aquosas de alguns íons (ex. Fe^{3+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) seguindo de indução à nucleação e crescimento de nanopartículas magnéticas no interior destas matrizes. Dentre estes o mais interessante e versátil é o recobrimento do núcleo magnético com polímeros.

Dentre os métodos de recobrimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro o mais amplamente utilizado é a cobertura com silanos, que possibilita a inserção de grupos orgânicos funcionais (geralmente grupos amino e epóxido) na superfície das partículas. Muitos suportes magnéticos comercialmente disponíveis são clusters de óxido de ferro (magnetita ou maghemita) recobertos com organosilanos como, por exemplo, BioMag, Magnesil e SiMag (FRANZREB *et al.*, 2006). A cobertura de nanopartículas de magnetita com sílica possibilita tornar as nanopartículas dispersíveis em um determinado meio e permitir a interação do suporte com biomoléculas de forma altamente específica.

Micro-suportes magnéticos contendo enzimas imobilizadas são utilizados para facilitar a manipulação e recuperação do derivado. Apesar disso ainda não existem enzimas imobilizadas em suportes magnéticos disponíveis comercialmente. Um dos principais impedimentos para a aplicação de materiais magnéticos em bioprocessos em escala industrial são as características não ótimas dos suportes geralmente empregados para esta proposta. Apesar do grande número de suportes magnéticos disponíveis comercialmente, a maioria destes suportes foram desenvolvidos para aplicações em biomedicina, diagnósticos e aplicações biotecnológicas em escala de bancada, não existem suportes magnéticos comerciais desenvolvidos para aplicações em bioprocessos (FRANZREB *et al.*, 2006). Isso mostra que este campo da ciência ainda necessita de muitos avanços. Desta forma se faz necessário o desenvolvimento de novos suportes magnéticos com características como alta capacidade de carga, reusabilidade, disponibilidade em altas quantidades, com baixo custo de produção e que possam ser ativados com diferentes grupos funcionais visando diferentes aplicações. Neste contexto esta etapa do trabalho teve como objetivo a síntese de suportes magnéticos com características ótimas para aplicações em bioprocessos, sobretudo na imobilização de enzimas. Micropartículas magnéticas de sílica porosa foram sintetizadas através do recobrimento de nanopartículas supermagnéticas de óxido de ferro com sílica em micro-emulsões *w/o*, utilizando silicato de sódio como fonte de sílica.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Materiais

Para preparo de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram empregados: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich) e NH_4OH 28% (Vetec). Já para a síntese de micropartículas magnéticas de sílica porosa foram empregados os reagentes silicato de sódio (Na_2SiO_3), Triton-X 100, ciclohexano, fornecidos pela Vetec e sulfato de amônio (NH_4SO_4) fornecido pela JT Baker.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro (SPION)

Um litro de uma solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 350 mM foi preparada em água quente previamente fervida por 20 minutos, de uma forma similar um litro de uma solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200 mM foi preparado em água quente, também previamente fervida por 20 minutos. Logo após a preparação as duas soluções foram mescladas em um reator encamisado agitado mecanicamente especialmente construído para a realização destes experimentos. A solução foi rapidamente aquecida até 60 °C, em seguida 250 mL de NH_4OH 28% (m/m) foram adicionados ao reator, utilizando bomba peristáltica, sob agitação de 1000 RPM. Após a adição completa da solução de NH_4OH 28% a reação foi conduzida por uma hora. As nanopartículas formadas foram então recuperadas magneticamente, lavadas com água destilada e armazenadas até o momento do uso.

2.2.2.2 Síntese de Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMps)

Para a síntese de micropartículas magnéticas de sílica (SMMps – *Silica magnetic microparticles*) foi empregada a mescla de duas soluções. A solução A (SA) foi preparada através da adição de 100 mL de uma solução de silicato de sódio (0.5, 1.0 ou 1.75 M) em 350 mL de ciclohexano contendo 25, 50 ou 100 mL de Triton X 100. A solução B (SB) foi preparada pela adição de 100 mL de uma solução de sulfato de amônio 0.5, 1.0 ou 1.75 M (a molaridade empregada foi sempre igual a molaridade da solução silicato de sódio empregada) em 350 mL de ciclohexano contendo 25, 50 ou 100 mL de Triton X 100. À SA foi adicionada

uma determinada massa de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, a solução resultante foi então agitada até a obtenção de uma emulsão estável que por fim foi transferida para o reator através de bomba peristáltica. Em seguida uma emulsão, também estável, de *SB* foi lentamente adicionada ao reator empregando-se bomba peristáltica. Após a adição completa da *SB* a *SA* a mistura resultante foi mantida sob agitação de 1000 RPM a 25 °C por uma hora. As SMMps formadas foram então separadas através da aplicação de um campo magnético externo e lavadas com uma mistura de etanol e acetona 1:1 para retirada do Triton X 100 residual. As micropartículas foram armazenadas até o uso.

2.2.2.3 Análises Instrumentais

Os difratogramas de raios-X (DRX) foram obtidos empregando difratômetro Shimadzu LabX XRD-600 CuK α 1 ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$) operando a 30 kV e 30 mA. A amostra foi escaneada no intervalo 2θ de 20° a 80° com velocidade de varredura de 2°/min em etapas de 0.02° e tempo de permanência de 3 segundos.

Para as análises de Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR) foi empregado um aparelho modelo FTIR-8400S da Shimadzu. As amostras foram diluídas em KBr (1:300) e prensadas na forma de pastilhas. Os espectros no infravermelho foram registrados no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} e 16 varreduras.

A magnetização em função do campo ($M \times H$) foi medida empregando um Dispositivo Supercondutor de Interferência Quântica (*Superconducting Quantum Interference Device* ou S.Q.U.I.D) modelo XL-200 (Quantum Design). Os loops de histerese foram medidos empregando campo magnético (H) de aproximadamente 70 kOe, a 300 K. Os dados experimentais foram normalizados pela massa empregada nas medidas.

A morfologia das amostras foi investigada empregando microscópio eletrônico Philips XL30 FEG operando a 25 kV. Para realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) as amostras, apropriadamente diluídas, foram dispersas em água. Cerca de 2-3 gotas da suspensão foram depositadas sobre porta amostras de alumínio e metalizadas com ouro após secagem lenta à temperatura ambiente. O diâmetro de partícula (diâmetro de Feret) foi calculado através do programa para análise de imagens ImageJ. Análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) foram realizadas no mesmo equipamento empregando um detector Oxford Tretra Link.

Análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas empregando um equipamento TA SDT 2960 da TA Instruments. As amostras foram aquecidas em porta amostras de

alumina da temperatura ambiente até 600 °C sob atmosfera de nitrogênio (taxa de fluxo: 70 mL.min⁻¹) e taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹.

As isotermas de adsorção-desorção de N₂ foram obtidas empregando um aparelho ASAP 2010 das Micrometrics. As isotermas, na faixa apropriada, foram empregadas para a determinação da área superficial do material através da aplicação do modelo matemático de Barrett-Joyner-Halenda - BJH (BARRETT, JOYNER e HALENDA, 1951) e diâmetro de poros, empregando o modelo de Brunauer–Emmett–Teller - BET (BRUNAUER, EMMETT e TELLER, 1938).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro (SPION)

Devido a suas propriedades nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (*iron oxide magnetic nanoparticles* – SPION) foram eleitas como núcleo magnético para a síntese de SMMps. O método de co-precipitação tem sido amplamente empregado na síntese de SPION (MASSART, 1981), geralmente este método tem como objetivo sintetizar magnetita, devido as suas propriedades magnéticas superiores, no entanto geralmente maghemita também é formada no processo como contaminante. Para a formação de magnetita é ideal uma relação molar de $Fe^{2+}/Fe^{3+} = 0.5$, porém em ambientes ricos em oxigênio o íon Fe^{2+} é rapidamente convertido a Fe^{3+} diminuindo a relação molar Fe^{2+}/Fe^{3+} o que favorece a formação de maghemita, além de outros óxidos de ferro não magnéticos (BOZHINOVA, 2004). Em processos de síntese de SPION em escala de bancada geralmente é borbulhado nitrogênio na solução para evitar a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} . Com o objetivo de obter magnetita de uma forma barata e de fácil escalonamento duas modificações foram realizadas no método comumente empregado. Primeiramente, uma relação molar de $Fe^{2+}/Fe^{3+} = 0.57$ foi utilizada, nesta condição o oxigênio presente no meio reacional oxida parcialmente Fe^{2+} a Fe^{3+} gerando uma relação Fe^{2+}/Fe^{3+} próxima de 0.5, estratégias similares foram empregadas em estudos anteriores (KHALAFALLA e REIMERS, 1980). A segunda estratégia empregada foi ferver previamente a água utilizada na preparação das soluções de sais de ferro com o objetivo de retirar o excesso de oxigênio dissolvido na solução.

Para a síntese de SPIONs foram empregados os sais $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (que libera o íon Fe^{3+}) e $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (que libera o íon Fe^{2+}), estes sais de ferro foram selecionados porque são os mais amplamente empregados para a obtenção de SPIONs por co-precipitação homogênea. Eram preparados 1000 mL de solução de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 350 mM e 1000 mL de solução de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 200mM em água destilada previamente fervida por 20 minutos. As soluções de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 350mM e $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 200 mM foram mescladas em reator encamisado com agitação mecânica especialmente construído para realização do experimento. Após a mistura das soluções a concentração final de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ era alterada para 175 mM e a concentração final de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ era alterada para 100 mM, gerando a relação molar de $Fe^{2+}/Fe^{3+} = 0.57$. A solução de sais de ferro era aquecida a 60 °C em seguida foram rapidamente adicionados 250 mL de NH_4OH 28% atingindo pH final de aproximadamente 10.5, a adição da base

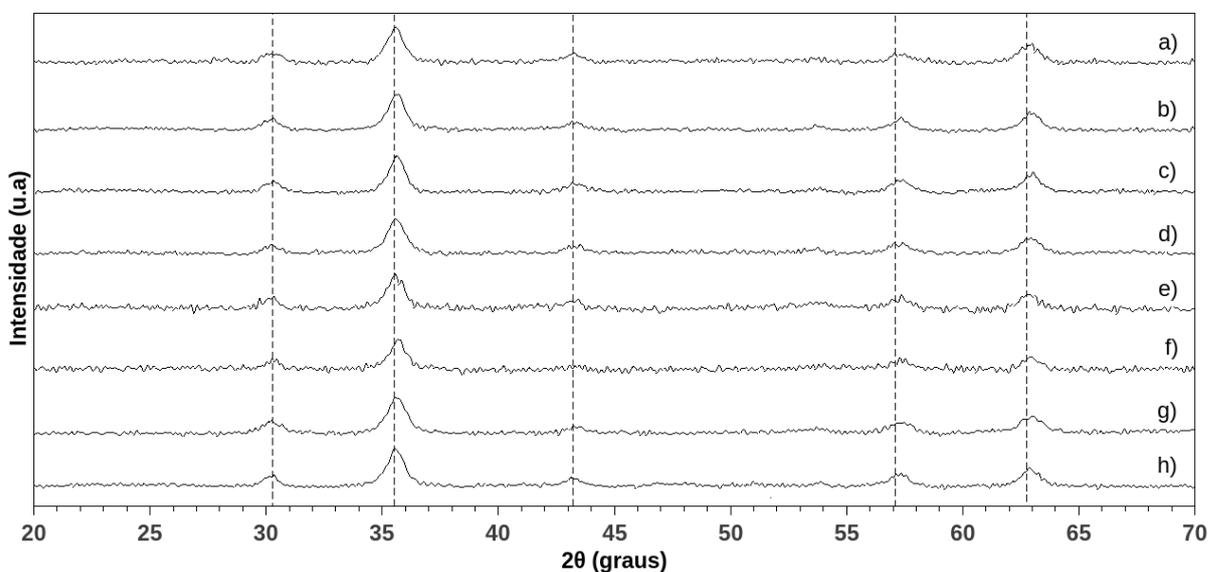
ocasionava, imediatamente, alteração na coloração da solução que passava de vermelho alaranjado para preto indicando formação de nanopartículas magnéticas (HARRIS, 2002). Outras bases como NaOH, KOH e LiOH também podem ser empregadas neste processo porém a utilização de NH_4OH gera nanopartículas magnéticas com propriedades magnéticas superiores. A reação foi conduzida a $60\text{ }^\circ\text{C}$ com uma agitação de 1000 RPM por uma hora. As nanopartículas foram então separadas através da aplicação de um campo magnético externo, lavadas por repetidas vezes com água destilada (previamente aquecida) para retirada do NH_4OH residual e apropriadamente armazenadas até sua utilização. Cada batelada rendia aproximadamente 40 gramas (massa seca) de nanopartículas magnéticas.

As nanopartículas magnéticas produzidas nesta etapa do trabalho foram caracterizadas empregando DRX, FT-IR e S.Q.U.I.D. Os dados de DRX mostram padrões de difração e intensidades relativas que condizem com a estrutura cristalina da magnetita e maghemita (Figura 2.2a). Podem ser observados picos relacionados à estrutura da magnetita e maghemita em $2\theta = 30.1^\circ, 35.5^\circ, 43.1^\circ, 57.0^\circ, 62.6^\circ$ (CHIANG e SUNG, 2006). A estrutura exata do cristal não pode ser determinada a partir destes dados bem como a presença de maghemita como contaminante. Existe uma pequena diferença teórica entre as posições dos picos no difratograma para magnetita e maghemita que é obscurecida por picos largos como os observados neste estudo (CHASTELLAIN, PETRI E HOFMANN, 2004). Com base nas condições reacionais utilizadas, acreditamos que no decorrer da reação foi formado majoritariamente magnetita e uma pequena quantidade de maghemita como contaminante. Outro indício da presença majoritária de magnetita em nossa amostra foi a intensa coloração negra observada, nanopartículas de maghemita possuem coloração avermelhada enquanto nanopartículas de magnetita possuem coloração negra. As análises de DRX foram empregadas para calcular o tamanho médio de partícula através da equação de Debye-Scherrer empregando o pico situado em $2\theta = 35.5^\circ$. O tamanho de partícula obtido foi de 10.9 nm (± 0.2 nm), este tamanho está em concordância com o esperado para SPIONs obtidos por co-precipitação (BOZHINOVA, 2004).

A Figura 2.3a mostra o espectro de FT-IR obtido para as nanopartículas magnéticas produzidas durante este trabalho. No espectrograma podem ser observadas três fortes bandas localizadas a 447, 590, e 630 cm^{-1} correspondente as vibrações de estiramento dos átomos de ferro ($\nu\text{Fe-O}$) localizados no sítio tetraédrico do cristal de magnetita (GUPTA e GUPTA, 2005; MA *et al.*, 2007; MAITY e AGRAWAL, 2007). Na região correspondente aos comprimentos de onda localizados a 1450 e 1630 cm^{-1} podem ser observadas duas pequenas bandas correspondentes a vibração de moléculas de água fortemente unidas a superfície do

material ($\delta\text{O-H}$) (JUNG, 1995; MAITY e AGRAWAL, 2007). Na região entre 3100 e 3600 cm^{-1} é possível verificar uma banda larga centralizada em 3420 cm^{-1} que também corresponde à vibração de moléculas de água unidas a superfície do material ($\delta\text{O-H}$) (CHENG *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2007). Estas bandas referentes a presença de água são esperadas uma vez que as nanopartículas, tanto de magnetita quando de maghemita, possuem uma camada de hidratação que recobre toda sua superfície formando uma camada magneticamente morta de FeOH (CHENG *et al.*, 2005; JUNG, 1995).

Figura 2.2 – Análises de DRX para as amostras de SPION e SMMPs. a) SPION; b) SMMp-1; c) SMMp-2; d) SMMp-3; e) SMMp-4; f) SMMp-5; g) SMMp-6; h) SMMp-7. (----) Picos referentes à magnetita e maghemita ($2\theta = 30.1^\circ, 35.5^\circ, 43.1^\circ, 57.0^\circ, 63.0^\circ$).



As propriedades magnéticas de SPION foram avaliadas empregando S.Q.U.I.D. Na Figura 2.4 é possível visualizar a curva de magnetização-desmagnetização à temperatura ambiente (300 K) da amostra em função do campo magnético aplicado ($M \times H$). Neste experimento um campo magnético externo (medido em Oe) é aplicado sobre a amostra induzindo sua magnetização que é medida pelo S.Q.U.I.D. Através desta técnica é possível medir a magnetização de saturação do material (dada em unidades eletromagnéticas – emu.g^{-1} de material) e também determinar o comportamento magnético apresentado pelo material. A magnetização de saturação obtida para a amostra foi de 70.34 emu.g^{-1} . O valor obtido é um excelente resultado uma vez que a magnetização de saturação usualmente obtida para óxidos de ferro em escala nanométrica é cerca de 62 emu.g^{-1} (ANDERSON *et al.*, 2007). Desta forma é possível concluir que a adaptação realizada no processo convencional de co-

precipitação homogênea buscando a redução de custos permitiu a obtenção de partículas magnéticas com excelente susceptibilidade magnética, qualidade crucial para aplicação deste material em bioprocessos. Através da curva de magnetização do material (Figura 2.4) é possível verificar que a amostra não apresenta histerese, coercividade (H_c) e nem remanescência magnética (M_r), ou seja, a amostra apresenta típico comportamento superparamagnético. A propriedade de superparamagnetismo é de extrema importância para aplicação de materiais magnéticos em bioprocessos já que materiais magnéticos permanentemente magnetizados podem ocasionar problemas operacionais como formação de clusters e adesão em determinadas partes metálicas de certos equipamentos industriais.

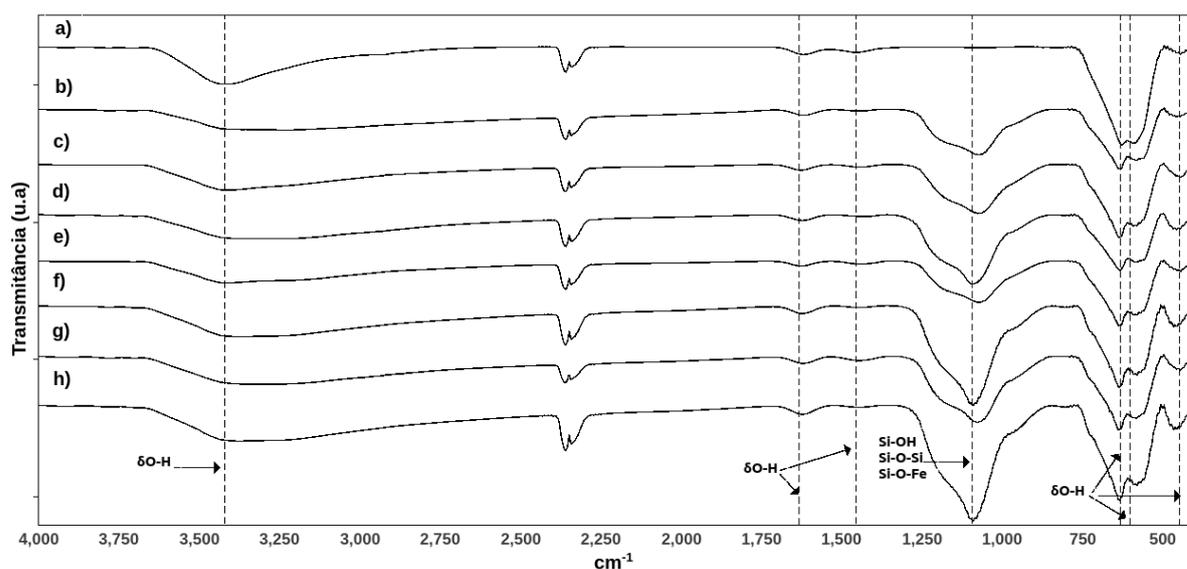
2.3.2 Recobrimento de Nanopartículas Magnéticas com Sílica

Nanopartículas magnéticas de magnetita e maghemita possuem boas características para aplicações em bioprocessos como alta magnetização de saturação (que garante uma boa resposta a campos magnéticos), propriedades superparamagnéticas e biocompatibilidade (TARTAJ *et al.*, 2005). No entanto, é necessário o recobrimento com uma camada protetora para evitar a oxidação destes materiais a formas não magnéticas. O recobrimento também permite inserir grupos funcionais na superfície do material, permitindo a interação seletiva com biomoléculas de interesse como anticorpos, enzimas, células, proteínas diversas, etc.

Um dos principais fatores que limitam a utilização de partículas magnéticas em bioprocessos é o alto custo praticado na venda destes materiais. Este alto custo se deve, principalmente, ao fato de que nanopartículas de óxido de ferro são desenvolvidas para aplicações biomédicas, passando por rigoroso controle da qualidade que encarece seu custo final. Além disso, suportes magnéticos desenvolvidos para aplicações biomédicas apresentam inúmeras características não ótimas para aplicações em bioprocessos em escala industrial. Esta etapa do trabalho foi realizada com o intuito de testar um novo conceito em obtenção de suportes magnéticos com características voltadas para aplicações em bioprocessos, sobretudo para imobilização de enzimas. Para tanto foram produzidas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro pelo método de co-precipitação homogênea, que foram recobertas com sílica gerando micropartículas de sílica porosa contendo nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em seu interior chamadas de SMMps (*Silica Magnetic Microparticles*). Sílica porosa é amplamente utilizada para imobilização de enzimas, com a vantagem de possuir boas propriedades mecânicas, rigidez, estabilidade química além da facilidade de ativação de sua superfície com diferentes grupos funcionais. (MA *et al.*, 2006).

Na literatura existem muitos trabalhos que descrevem o recobrimento de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro empregando organosilanos, sobretudo TEOS (tetraetilortossilicato) e γ -APTES (aminopropiltriétoxissilano), porém este método é desinteressante do ponto de vista industrial devido ao alto custo de organosilanos, do tempo necessário e também do número de etapas utilizadas para realizar este procedimento (LEE *et al.*, 2006). Com o objetivo de diminuir o custo do processo foi testada a obtenção de micropartículas magnéticas de sílica utilizando reações de condensação do ácido ortossilícico em meio alcalino. Alguns estudos demonstraram que o ácido ortossilícico recobre a superfície de nanopartículas magnéticas com maior eficiência quando comparado ao recobrimento com TEOS (MA *et al.*, 2006).

Figura 2.3 – Análises de FT-IR obtidas para as amostras de SPION e SMMPs preparadas neste estudo. a) SPION; b) SMMp-1; c) SMMp-2; d) SMMp-3; e) SMMp-4; f) SMMp-5; g) SMMp-6; h) SMMp-7. As amostras foram cuidadosamente preparadas na forma de pastilhas diluídas em KBr (diluição de 1:300) com o objetivo de produzir resultados semi-quantitativos. Os difratogramas foram normalizados e a linha de base foi corrigida.



É descrito na literatura que a obtenção de micropartículas de sílica empregando ácido ortossilícico gera partículas grandes e com larga distribuição de tamanho de poros. Para superar este problema alguns pesquisadores têm empregado o método de síntese em emulsões com o objetivo de controlar o tamanho de partícula, distribuição de tamanho de poros e morfologia das partículas obtidas (LEE *et al.*, 2006). Nestes casos micelas reversas, formadas em emulsões água-em-óleo (*water-in-oil* - *w/o*), funcionam como micro-reatores nos quais as reações podem ser conduzidas (LEE *et al.*, 2006). Experimentos de síntese em emulsão *w/o*

de micropartículas de sílica contendo nanopartículas magnéticas de óxido de ferro como núcleo magnético foram conduzidos utilizando reações de condensação do ácido ortosilícico. Sulfato de amônio foi empregado na reação como trocador de íons para retirada do sódio resultante da dissolução do silicato de sódio em água e principalmente para controle preciso do pH no interior das nano-gotas. A Tabela 2.1 mostra as variações nas condições experimentais empregadas na síntese de SMMps. Após a síntese e antes da realização de todas as análises instrumentais todas as amostras de SMMps preparadas foram incubadas em HCl 0.5 M para remoção de SPION não recoberto com sílica, garantido a estabilidade magnética dos materiais e a reprodutibilidade nas análises.

As Figuras 2.5 e 2.6 mostram imagens de MEV para SMMps obtidas empregando diferentes condições reacionais. Nas figuras com aumento de 800x é possível observar que as amostras são formadas por partículas de tamanho micrométrico e forma irregular. Quando a imagem é ampliada para um aumento de 50.000x (inserções na Figura 2.5) é possível observar que as partículas micrométricas são formadas por partículas de tamanho nanométrico unidas em uma complexa estrutura. As características dessas nanopartículas fundamentais definem a estrutura morfológica das SMMps, e conseqüentemente sua estrutura de poros, diâmetro de poros e área de superfície.

Figura 2.4 – Curva de magnetização-desmagnetização em função do campo magnético ($M \times H$) a 300 k para SPIONs.

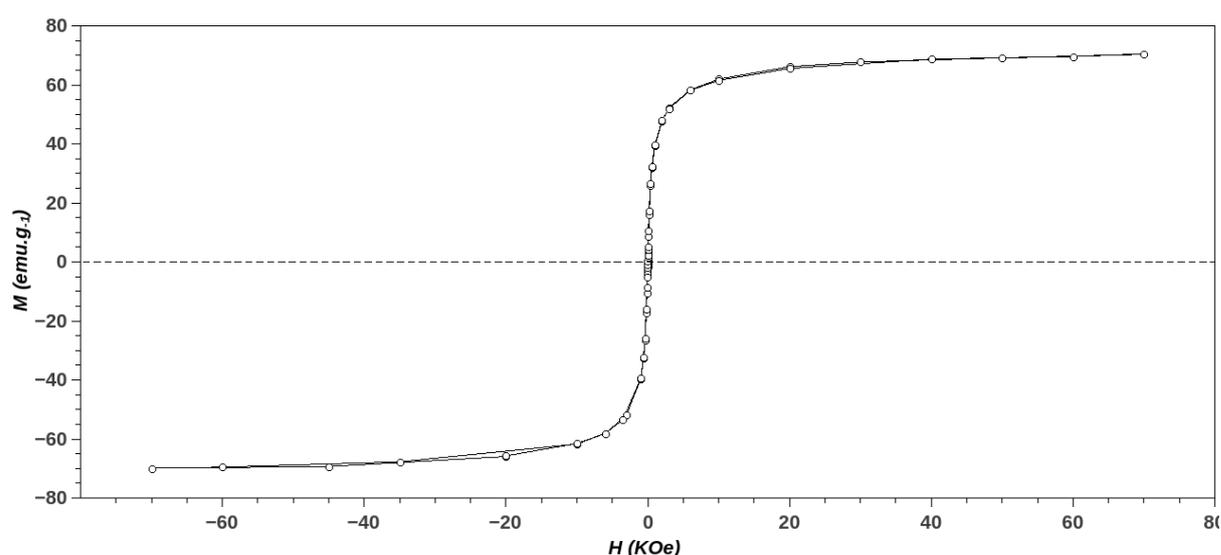


Tabela 2.1 – Condições experimentais empregadas na síntese de SMMps e resultados obtidos. Todas as amostras foram preparadas ao menos em duplicata, a amostra SMMP-2 (ponto central) foi preparada em triplicata. Todas as análises instrumentais foram realizadas de forma independente empregando amostras diferentes preparadas empregando uma mesma condição.

Condições					Resultados				
Concentração					Tamanho médio de partícula (μm)*	Área de superfície ($\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)	Volume de poro ($\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$)	Tamanho médio de poros (nm)	Magnetização de saturação ($\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$)
molar de Na_2SiO_3	w	S	w/o						
SMMP-1	0.50	2.0	0.5	0.28	11.2 (+/- 0.6)	94.2 (+/- 2.5)	0.25 (+/- 0.02)	10.6 (+/- 0.6)	63.7 (+/- 0.2)
SMMP-2	1.00	2.0	0.5	0.28	12.5 (+/- 0.9)	88.9 (+/- 3.4)	0.22 (+/- 0.07)	14.9 (+/- 1.1)	61.4 (+/- 0.1)
SMMP-3	1.75	2.0	0.5	0.28	11.2 (+/- 0.2)	68.9 (+/- 3.8)	0.22 (+/- 0.01)	17.5 (+/- 1.3)	53.5 (+/- 0.2)
SMMP-4	1.00	4.0	0.5	0.28	13.5 (+/- 1.1)	48.6 (+/- 5.6)	0.21 (+/- 0.02)	12.3 (+/- 0.8)	63.4 (+/- 0.4)
SMMP-5	1.00	1.0	0.5	0.28	11.8 (+/- 1.3)	93.2 (+/- 1.2)	0.31 (+/- 0.05)	16.6 (+/- 1.1)	45.8 (+/- 1.2)
SMMP-6	1.00	2.0	1.0	0.28	15.3 (+/- 0.4)	78.4 (+/- 2.2)	0.21 (+/- 0.00)	12.8 (+/- 0.5)	59.2 (+/- 0.7)
SMMP-7	1.00	1.0	1.0	0.28	15.9 (+/- 1.3)	103.2 (+/- 0.9)	0.30 (+/- 0.00)	10.2 (+/- 0.4)	64.6 (+/- 1.3)

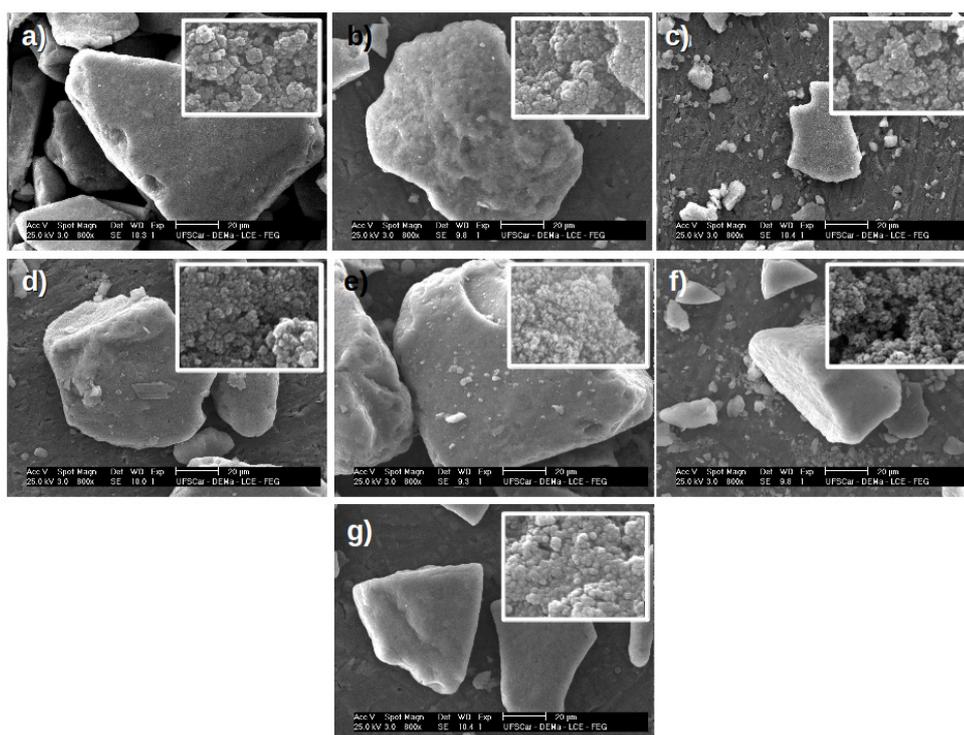
w – relação água/Triton-X 100; S relação SPION/silicato de sódio; w/o – relação fase aquosa (água)/fase orgânica (ciclohexano).

*O diâmetro estatístico geométrico de Feret (MERKUS, 2009) foi calculado a partir de imagens de MEV empregando o software ImageJ.

A Figura 2.7 apresenta os resultados de magnetização de saturação por grama de material a 25 °C para SMMps. Todas as amostras obtidas apresentaram alta magnetização de saturação quando comparadas com nanopartículas de óxido de ferro puras (SPION). Algumas amostras apresentaram resultados muito próximos da magnetização de saturação obtida para SPION não recoberto com sílica, indicando alto conteúdo de material magnético na estrutura final do material. Todas as amostras preparadas conservaram o comportamento superparamagnético do SPION como pode ser observado na Figura 2.9. Os melhores resultados neste parâmetro foram alcançados para as amostras SMMp-1, SMMp-4 e SMMp-7. A magnetização de saturação da amostra SMMp-7 foi de $64.6 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$, este valor é equivalente a 92% do observado para as amostras de SPION não recobertas com sílica. A Figura 2.8 compara os resultados de magnetização de saturação obtidos para a amostra SMMp-7 com os melhores resultados obtidos em outros trabalhos descritos na literatura que tratam do recobrimento de SPION com sílica. Por meio desta comparação é possível observar que os suportes magnéticos produzidos durante esta pesquisa possuem propriedades magnéticas excelentes. A maioria dos trabalhos publicados empregam organossilanos como fonte de sílica (ABRAMSON *et al.*, 2011; BUTTERWORTH *et al.*, 1996; HUANG *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2009; SANTRA *et al.*, 2001; ZHANG, *et al.* 2008), apenas alguns destes trabalhos utilizam silicato de sódio como fonte de sílica. Butterworth *et al.* (1996) produziram

nano-esferas magnéticas de sílica empregando ácido ortosilícico como fonte de sílica, este reagente era preparado pela passagem de uma solução de silicato de sódio por coluna de troca iônica para retirada de sódio. Neste trabalho foram obtidas partículas com um diâmetro de 10-30 nm e magnetização de saturação de 23.1 emu.g^{-1} . Ma *et al.* (2006) prepararam nanopartículas magnéticas de sílica com aproximadamente 200 nm de diâmetro e magnetização de saturação de 18.0 emu.g^{-1} . Setyawan *et al.* (2012) sintetizaram nanopartículas recobertas com sílica de 22 nm e magnetização de saturação de 18.0 emu.g^{-1} empregando um método eletroquímico e silicato de sódio como fonte de sílica. Diferentemente destes trabalhos nós preparamos micropartículas magnéticas robustas com alta magnetização de saturação.

Figura 2.5 – Imagens de MEV obtidas para SMMPs. a) SMMp-1, b) SMMp-2, c) SMMp-3, d) SMMp-4, e) SMMp-5, f) SMMp-6, g) SMMp-7. As imagens possuem um aumento de 800x e as inserções um aumento de 50.000x.



A Figura 2.10 apresenta o esquema proposto para explicar o processo de síntese de SMMPs. *SA* e *SB* são preparados pela adição de soluções de silicato de sódio (contendo uma determinada massa de SPION) e sulfato de amônio, respectivamente, a ciclohexano contendo Triton-X 100. A mistura resultante foi agitada até a formação de uma emulsão estável. A relação *w/o* empregada em todos os experimentos foi de 0.28 e a relação molar de silicato de sódio e sulfato de amônio foi fixada em 1.0. Micro-emulsões *w/o* apresentam uma fase

simples e estável, formada por uma fase aquosa, uma fase hidrofóbica (fase óleo) estabilizadas por moléculas anfipáticas, o surfactante (CAPEK *et al.*, 2004; SANTRA *et al.*, 2001). Em uma micro-emulsão *w/o* as moléculas de surfactante se auto-organizam ao redor das moléculas de água formando micelas reversas estáveis e de tamanho nanométrico. Neste sistema o núcleo de água, ou nano-gota, pode ser empregado como um nano-reator onde substâncias polares solúveis em água podem ser dispersas e reações envolvendo estas moléculas podem ocorrer (MATHEW e JUANG, 2007). O uso de micelas permite o controle do crescimento de partículas através do controle do tamanho da micela, que pode ser ajustado através da variação dos componentes da micro-emulsão (MATHEW e JUANG, 2007). O surfactante eleito para uso nesta pesquisa foi o Triton-X 100, um surfactante não-iônico muito comum e barato. O Triton-X 100 possui concentração crítica de micela (CMC) de 0.22-0.24 mM. A relação água/surfactante (*w*) usada em todos os experimentos gerou uma concentração molar de Triton-X 100 muito superior ao CMC, favorecendo a formação de gotas de água de tamanho nanométrico.

Figura 2.6 – Imagens de MEV obtidas para SMMPs. a) SMMp-1, b) SMMp-2, c) SMMp-3, d) SMMp-4, e) SMMp-5, f) SMMp-6, g) SMMp-7. As imagens possuem um aumento de 200x.

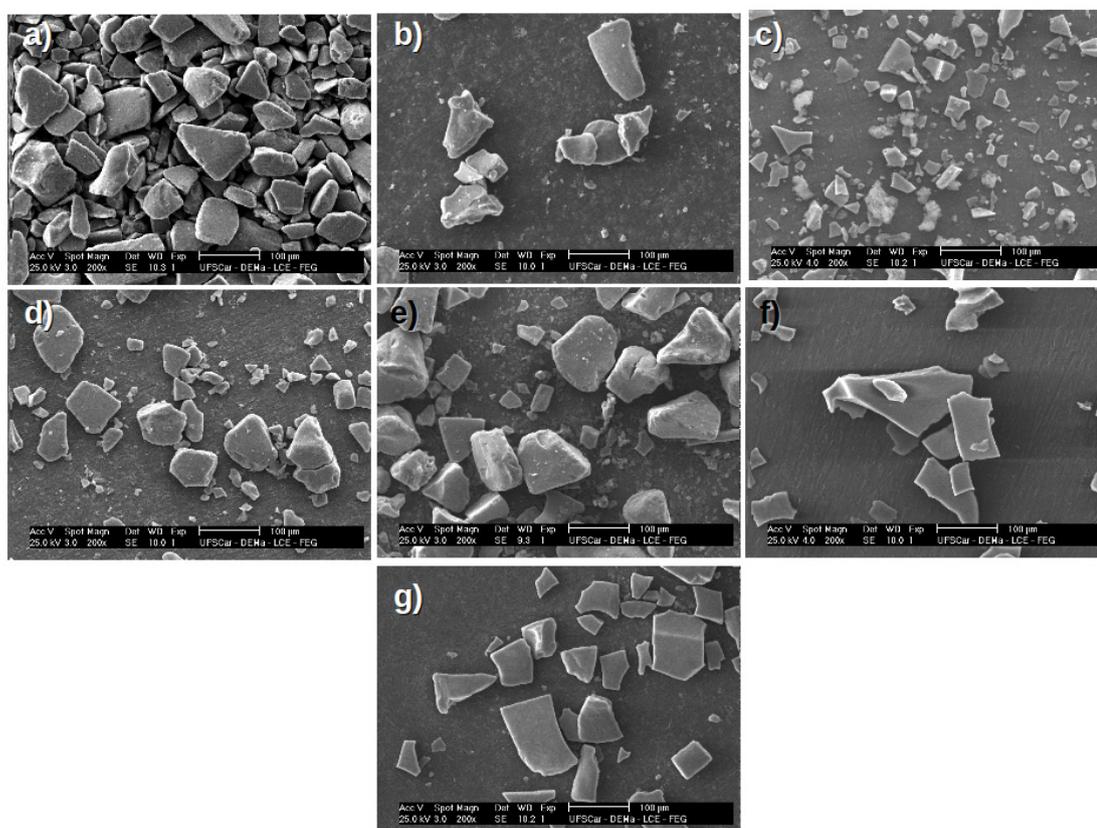


Figura 2.7 - Resultados de magnetização de saturação para SMMps obtidas empregando diferentes condições de reação.

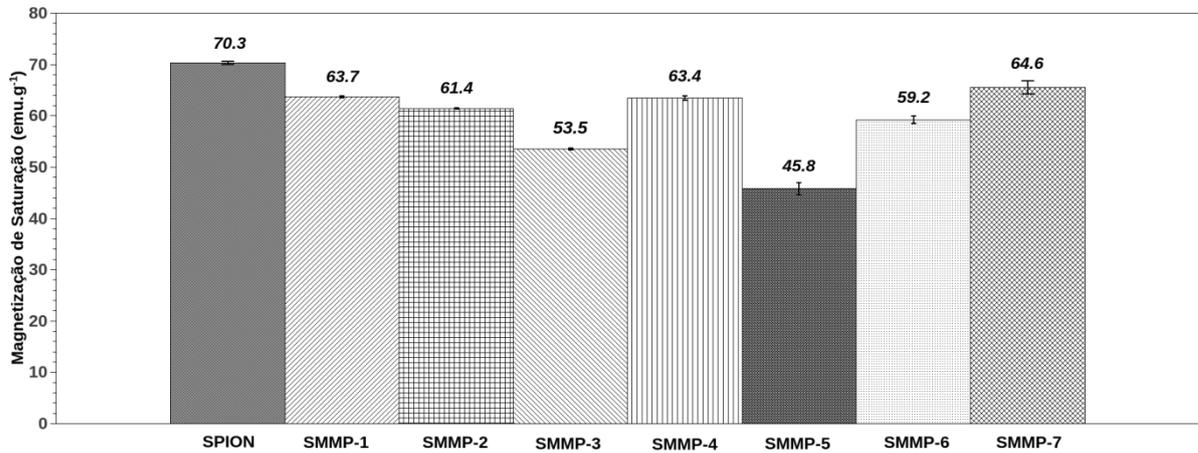
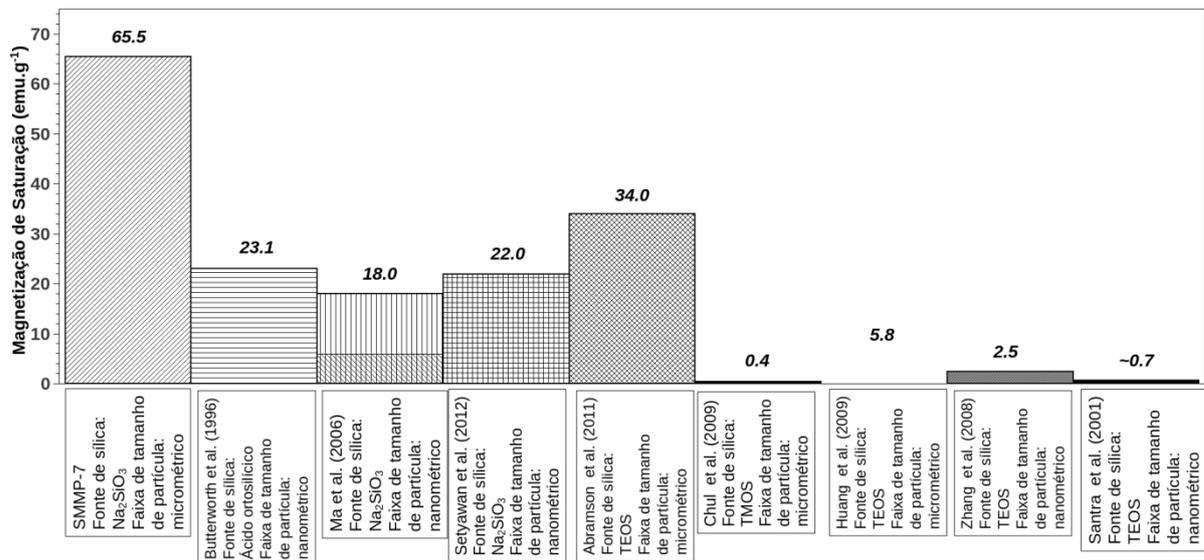


Figura 2.8 - Comparação do resultado de magnetização de saturação obtido para a amostra SMMp-7 com resultados encontrados na literatura para micro e nanopartículas magnética de sílica.



A Figura 2.10a exemplifica a formação de micelas em *SA* e *SB*. O valor de pH medido na fase aquosa, dependendo da concentração molar de reagentes empregadas, foi entre 13.2 e 13.6 para *SA* e 5.8-6.7 para *SB*. A dissolução de silicato de sódio em água gera o íon sódio e o

altamente reativo ácido ortosilícico. Acima de pH 10.7 o ácido ortosilícico não polimeriza (ILER, 1979), contudo devido a alta concentração em *SA* deste reagente é possível que tenha ocorrido a deposição de ácido ortosilícico e seus oligômeros na superfície das partículas de SPION, formando uma fina camada em equilíbrio com o ácido ortosilícico em solução (BERGNA, 1994). Esta camada pode proteger as partículas de SPION contra oxidação em estágios iniciais de reação. Uma vez que *SA* e *SB* foram misturadas no reator, sob agitação, as duas populações distintas de micelas podem colidir formando agregados transientes, que em seguida são revertidos a nano-gotas isoladas (CAPEK *et al.*, 2004; MATHEW e JUANG, 2007), essas nano-gotas foram nomeadas como *SX* (Figura 2.10b). Embora a meia vida destas nano-gotas transientes seja de apenas alguns milissegundos (BUTTERWORTH *et al.*, 1996; CAPEK *et al.*, 2004), é tempo suficiente para ocorrer a mescla de seu conteúdo. A troca de substâncias hidrofílicas através da fase aquosa dificilmente ocorre devido à solubilidade restrita destes compostos em meios orgânicos apolares (CAPEK *et al.*, 2004). Em estudos preliminares determinamos que a mistura de silicato de sódio e sulfato de amônio de igual volume e concentração equimolar gera soluções com pH 10.3, em todos os casos, alguns minutos após a mistura destas soluções era possível observar a formação de uma fase geleiforme contínua. Da mesma maneira a troca de soluções entre as micelas de *SA* e *SB* diminui o pH da solução para um valor próximo a 10.3, neste pH o ácido ortosilícico se torna extremamente reativo e sua polimerização favorável. A alta concentração de ácido ortosilícico, alta concentração de SPION e o pH no interior de *SX* favorece rápida nucleação e crescimento da partícula (ILER, 1979). Uma vez que o ácido ortosilícico é extremamente reativo frente óxidos de metais (BERGNA, 1994) é provável que a superfície de SPION seja rapidamente recoberta nas condições empregadas na síntese, ao mesmo tempo em que o ácido ortosilícico é polimerizado no interior de *SX*. O ácido ortosilícico possui tendência a se condensar maximizando o número de ligações Si-O-Si (ILER, 1979), desta forma, partículas densas crescem no interior de *SX* até alcançar o tamanho máximo da nano-gota. Os íons SO_4^{2-} , liberados pela dissolução de sulfato de amônio, por sua vez, se associam aos íons Na^{2+} , liberados pela dissolução de silicato de sódio, formando Na_2SO_4 . O uso de sulfato de amônio como trocador de íons possibilita a obtenção de SMMps livres de sódio (LEE *et al.*, 2006).

A troca de substâncias entre *SA* e *SB* ocorre até que o conteúdo das micelas das duas micro-emulsões seja distribuído de forma homogênea em toda a população de micelas presentes no reator. Acreditamos que este processo seja rápido devido a alta velocidade de agitação empregada no reator durante a síntese de SMMps. Uma vez que as partículas no interior de *SX* alcançam o volume máximo das nano-gotas as moléculas de surfactante

permanecem unidas à superfície da partícula. As densas partículas formadas, ou em formação, em *SX* colidem de forma energética. Essas colisões podem abrir a camada de surfactante que recobre a partícula permitindo o contato direto entre duas partículas (CAPEK *et al.*, 2004). Quando estas partículas colidem pode ocorrer adesão entre elas devido a reação entre grupos silanol neutros e ionizados na superfície das partículas formando ligações Si-O-Si. A presença de ácido ortosilícico livre no ponto de contato também pode promover a formação de união química covalente entre duas partículas transientes (ILER, 1979). Desta forma, nanopartículas densas no interior de *SX* foram unidas em agregados de tamanho micrométrico, representados na Figura 2.10d, onde nanopartículas formam a estrutura de poros do material e as moléculas de surfactante preenchem os espaços entre estas nanopartículas agregadas. Após o processo de síntese Triton-X 100 residual, SPION não recoberto com sílica e Na₂SO₄ foram removidos através de processo de lavagem com uma mistura de acetona e etanol (1:1 – v/v) seguido de lavagem com água. Análises de TGA (Figura 2.11) mostram que o processo de lavagem foi eficiente na remoção do surfactante (não foi observada perda de massa significativa na faixa de 25-200 °C para todas as amostras analisadas). A Figura 2.10e representa a estrutura final das SMMps. O tamanho e morfologia de *SX* em conjunto com o efeito de “templating” do surfactante determina a estrutura de poros e a área de superfície das SMMps. O volume de poros, diâmetro de poros e área de superfície das amostras obtidas foram determinados por adsorção-dessorção de N₂. Todas as amostras preparadas apresentaram isotermas do tipo IV, típicas de sólidos mesoporosos, alta área de superfície e baixa quantidade de microporos como pode ser observado na Tabela 2.1 e Figura 2.12. Os resultados de adsorção-desorção de N₂ confirmam que SMMps são formadas por densas nanopartículas fundamentais que unidas formam uma estrutura mesoporosa.

Com o objetivo de controlar as características físicas, químicas e morfológicas de SMMps inúmeras variáveis foram investigadas durante o processo de síntese: 1) concentração molar de silicato de sódio; 2) Relação volumétrica entre Triton-X 100/água (*w*); 3) Relação mássica SPION/silicato de sódio (*S*). Nas próximas seções os efeitos destas variáveis sobre a estrutura final das SMMps obtidas serão discutidos.

Figura 2.9 – Resultados de magnetização de saturação ($M \times H$) as SMMPs. a) SMMp-1; b) SMMp-2; c) SMMp-3; d) SMMp-4; e) SMMp-5; f) SMMp-6; g) SMMp-7.

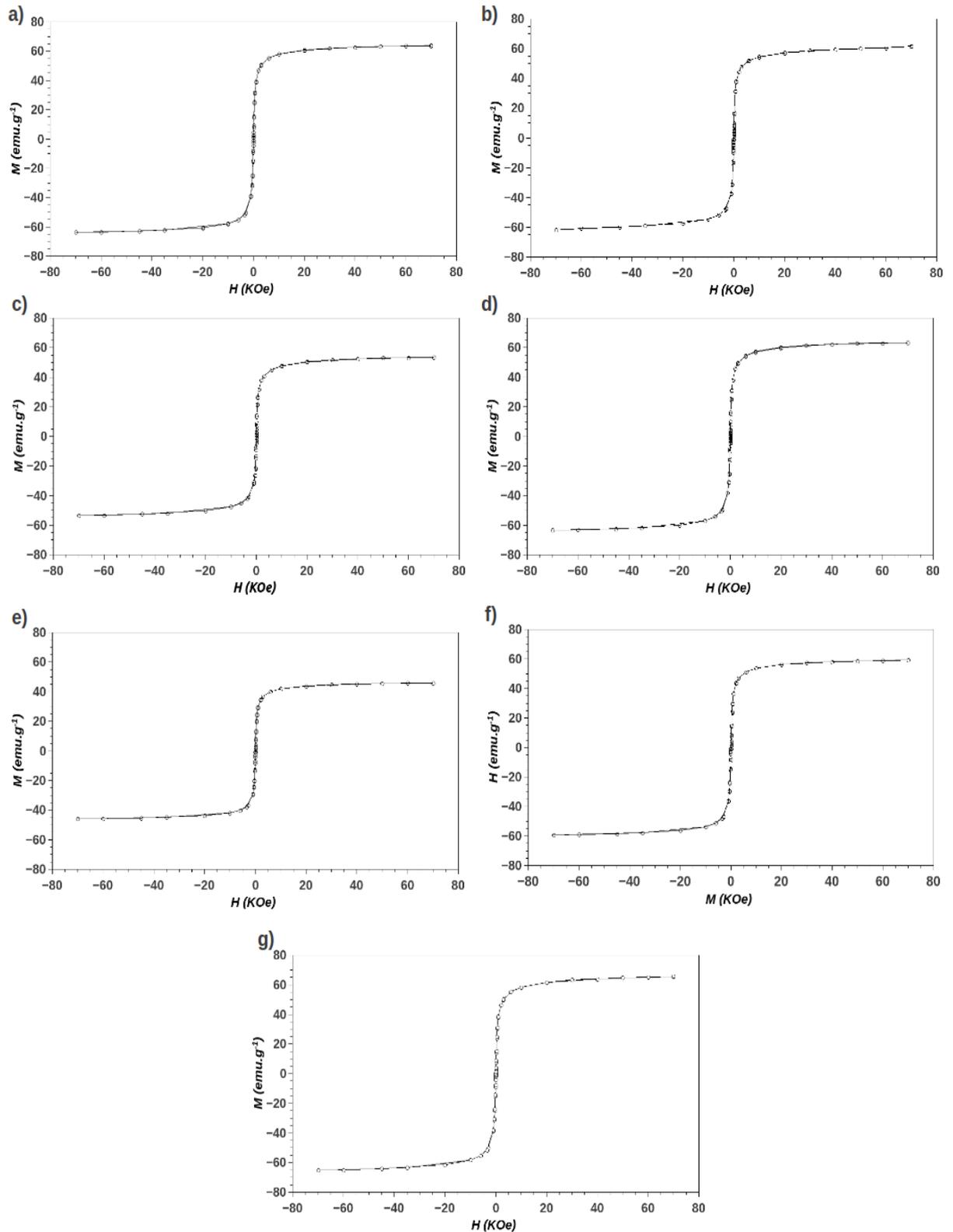
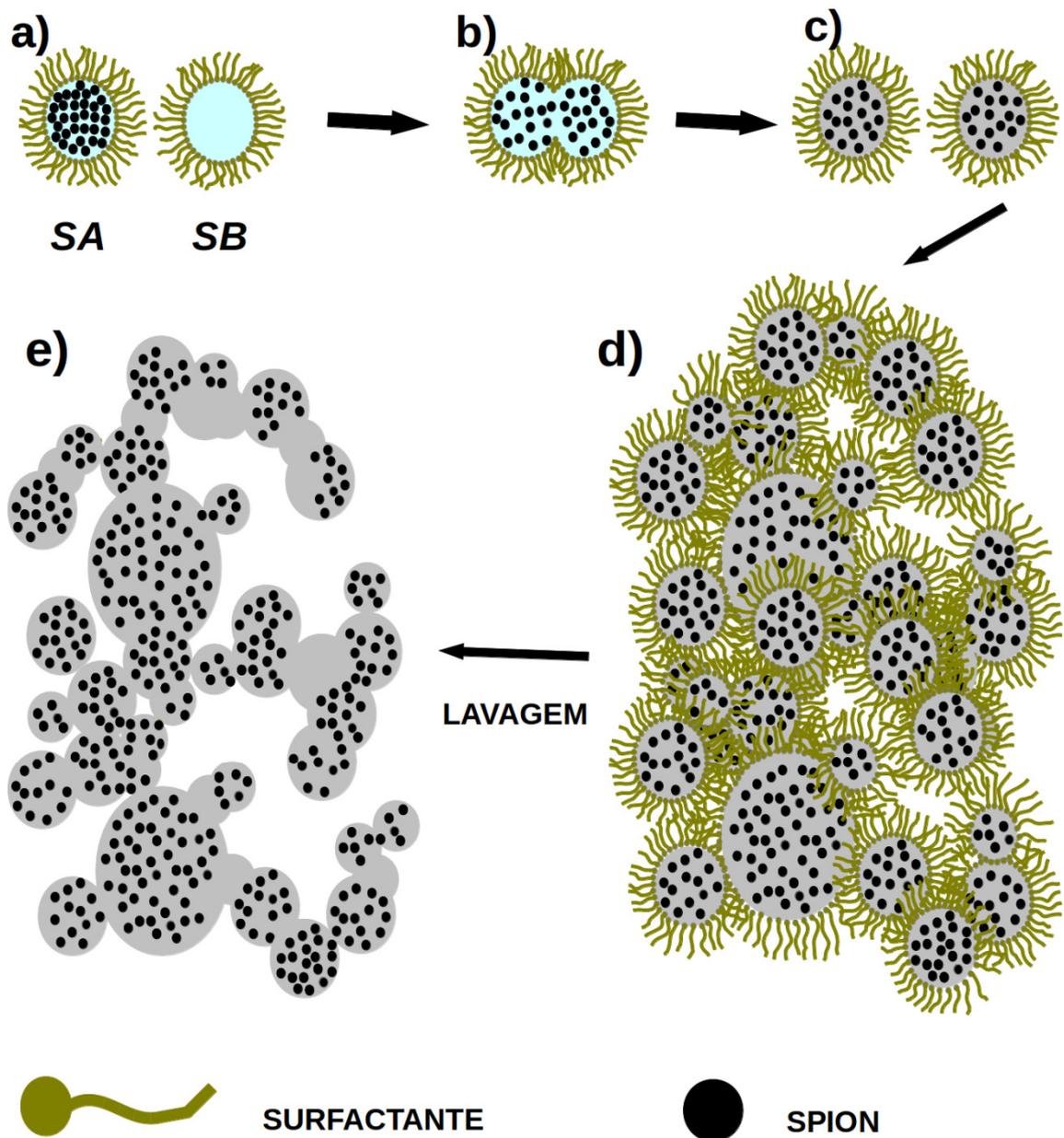


Figura 2.10 – Mecanismo proposto para a síntese de SMMps. a) Formas isoladas da emulsão A (*SA*) e emulsão B (*SB*); b) Dímero transitório formado pela mistura de *SA* e *SB*; c) Emulsão X (*SX*) formada pela troca dos conteúdos entre *SA* e *SB* contendo ácido ortosilícico parcialmente polimerizado; d) Micropartículas formadas pela adesão de *SX*; e) Micropartículas após processo de lavagem para remoção do surfactante.



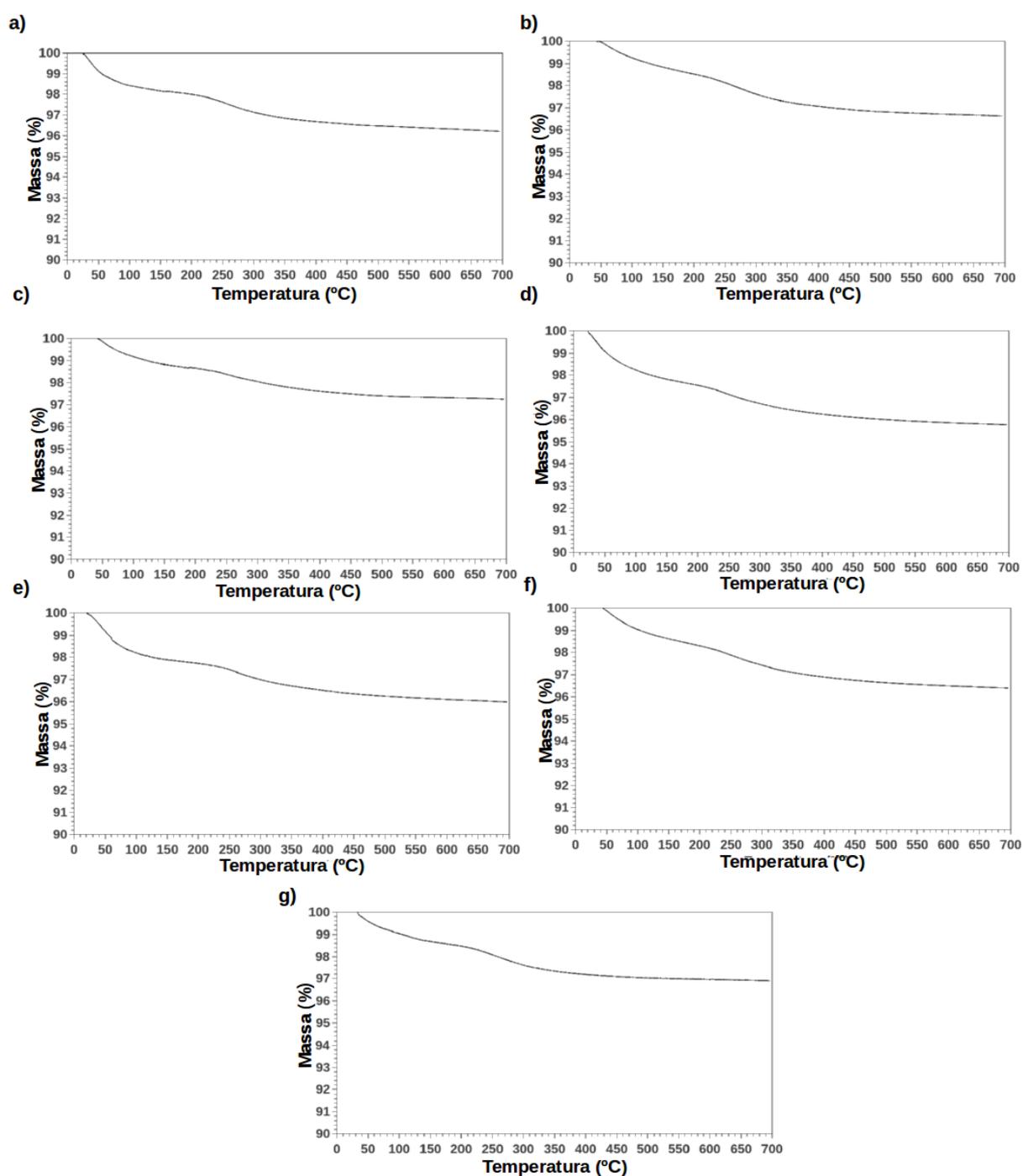
2.3.3 Efeito da Concentração Molar de Silicato de Sódio

A polimerização do ácido ortossilícico é fortemente influenciada pela concentração molar deste reagente. A velocidade de reação aumenta com o aumento na concentração de ácido ortossilícico (ILER, 1979), da mesma forma o tamanho de micela de uma micro-emulsão pode ser afetado pela concentração de reagentes dissolvidos na fase polar (MATHEW e JUANG, 2007; PATIST *et al.*, 2002). Com o objetivo de verificar o efeito da concentração molar de silicato de sódio na síntese de SMMps foram empregadas três concentrações molares distintas deste reagente: 0.5 M (SMMp-1), 1.0 M (SMMp-2) e 1.75 M (SMMp-3). A relação molar silicato de sódio/sulfato de amônio foi ajustada para 1.0 em todos os experimentos, isso foi feito com o objetivo de ajustar o pH final no interior de *SX* para algum valor próximo a 10.3. A massa de SPION foi aumentada com a concentração molar de silicato de sódio mantendo a relação mássica SPION/silicato de sódio (S) = 0.5, w/o foi fixado em 0.28 e w em 2.0 (veja Tabela 2.1).

As análises de DRX para as amostras SMMp-1, SMMp-2 e SMMp-3 são mostradas na Figura 2.2 (b-d). Através desta análise é possível identificar todos os picos relacionados com a estrutura cristalina da magnetita e maghemita ($2\theta = 30.1^\circ, 35.5^\circ, 43.1^\circ, 53.4^\circ, 57.0^\circ, 62.6^\circ$). A similaridade entre o difratograma de SPION (Figura 2.2a) e de SMMps sugere que todas as amostras possuem alto conteúdo de SPION em seu interior, a ausência de um pico largo entre 2θ 20° e 28° sugere a presença de baixa quantidade de sílica amorfa na estrutura final do material (OH *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2007), independentemente da concentração de silicato de sódio empregada. Na Figura 2.3 podem ser observados os resultados para as análises de FT-IR das amostras SMMp-1, SMMp-2 e SMMp-3. Em todas as amostras é possível visualizar as bandas localizadas a 447, 590, e 630 cm^{-1} correspondentes as vibrações de estiramento dos átomos de ferro ($\nu\text{Fe-O}$) do sítio tetraédrico do cristal de magnetita (GUPTA E GUPTA, 2005; MA *et al.*, 2007; MAITY e AGRAWAL, 2007). É possível visualizar o aparecimento de uma nova banda centrada em 1095 cm^{-1} , que pode ser designada a sobreposição de vibrações de estiramento relacionadas às ligações Si-OH, Si-O-Si e Si-O-Fe (BRUCE e SEN, 2005; HUANG *et al.*, 2009; WOO, HONG e AHN, 2005). Como esperado, pode ser observado aumento na intensidade de bandas relacionadas com sílica e diminuição em bandas relacionadas com ferro devido ao aumento na concentração de silicato de sódio empregada. Na região correspondente aos comprimentos de onda 1456 e 1620 cm^{-1} podem ser vistas duas bandas correspondentes à vibração de moléculas de água ($\delta\text{O-H}$) unidas à superfície das partículas (JUNG, 1995; MAITY e AGRAWAL, 2007),

vibrações correspondentes às moléculas de água também podem ser vistas na região entre 3100 e 3600 cm^{-1} formado uma banda larga centralizada a 3420 cm^{-1} ($\delta\text{O-H}$) (CHENG *et al.*, 2005; MA *et al.*, 2007).

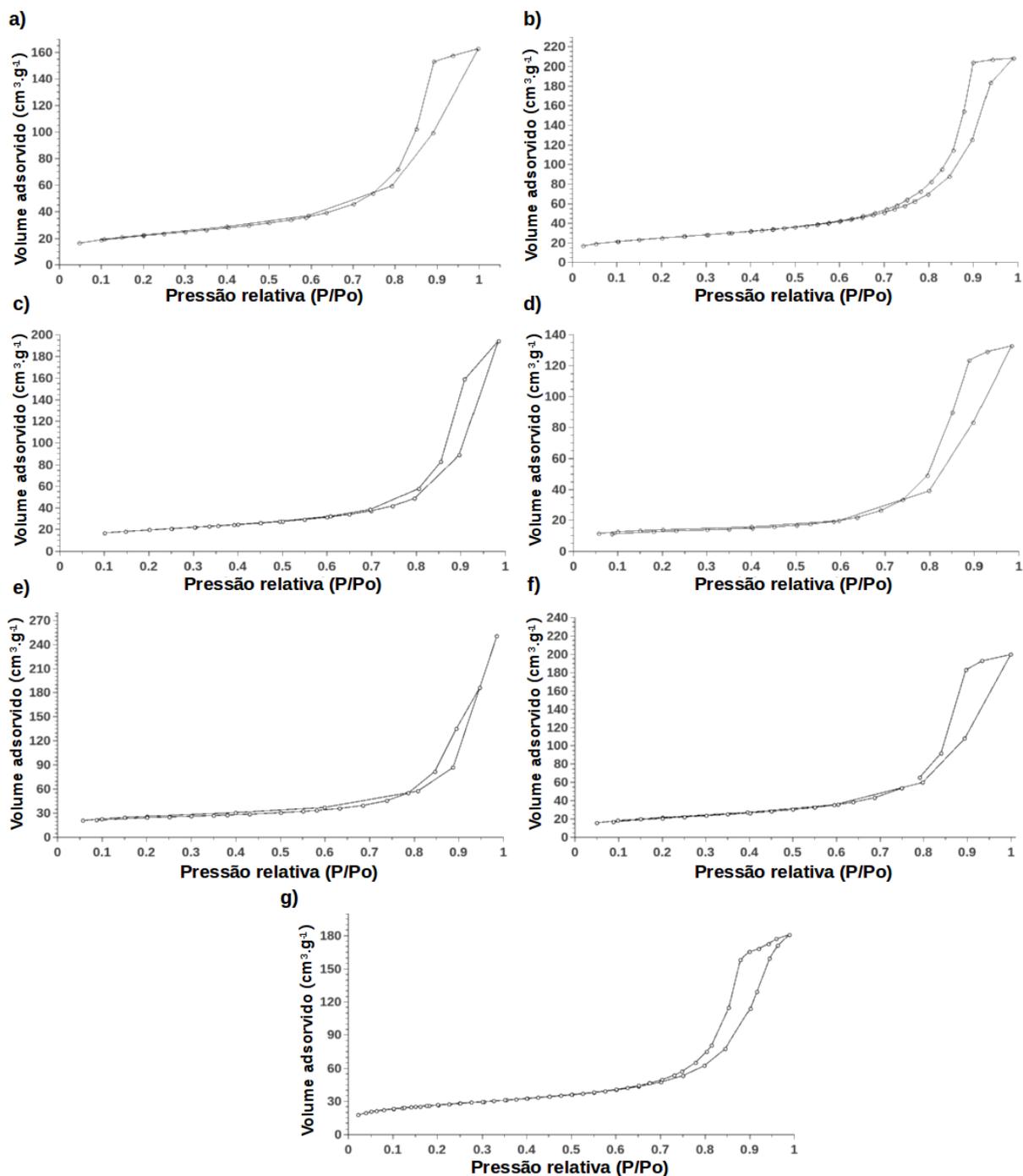
Figura 2.11 – Resultados de análises de TGA para SMMps. a) SMMp-1; b) SMMp-2; c) SMMp-3; d) SMMp-4; e) SMMp-5; f) SMMp-6; g) SMMp-7.



As Figuras 2.5 (a-c) e 2.6 (a-c) mostram imagens de MEV para as amostras SMMp-1, SMMP-2 e SMMp-3. As imagens de MEV foram empregadas para calcular a distribuição de tamanho de partícula para estas amostras. O diâmetro estatístico geométrico de Feret (MERKUS, 2009) foi calculado a partir de imagens de MEV apropriadas empregando o software ImageJ, os resultados para o diâmetro médio de partícula podem ser visualizadas na Tabela 2.1. A Figura 2.13 mostra os gráficos de distribuição de tamanho de partícula para SMMp-1, SMMP-2 e SMMp-3. É possível observar que a maioria das partículas apresenta diâmetro menor que 70 μm embora algumas partículas com mais de 100 μm possam ser encontradas. O perfil similar para a distribuição de tamanho de partícula observado para as três amostras sugere que não houve modificação significativa na distribuição de tamanho de partícula com o aumento na concentração molar de silicato de sódio. As isotermas de adsorção-dessorção de N_2 (Figura 2.12) foram empregadas para calcular a distribuição de diâmetro de poros para as amostras SMMp-1, SMMP-2 e SMMp-3 (Figura 2.14), a área de superfície das amostras também foi calculada e os resultados encontram-se na Tabela 2.1. É possível observar que a área de superfície e o diâmetro de poros diminuíam com o aumento na concentração de silicato de sódio empregada. Através da análise dos gráficos de distribuição de tamanho de poros é possível observar diferentes perfis para as amostras; SMMp-1 apresentou poros na faixa de 2-32 nm e tamanho médio de poros de 10.6 nm; SMMP-2 teve a distribuição de poros desviada para valores mais altos apresentando poros na faixa de 4-41 nm e diâmetro médio de poros de 14.9 nm; SMMp-3, por sua vez, apresentou distribuição de diâmetro de poros larga na faixa de 5-45 nm com tamanho médio de 17.5 nm.

Como pode ser visto na Figura 2.7 o aumento na concentração de silicato de sódio diminuiu a magnetização de saturação para as amostras; de SMMp-1 para SMMP-2 a diminuição na magnetização de saturação foi inexpressiva, porém para SMMp-3 a diminuição se tornou significativa quando comparada com SMMp-1 e SMMP-2. Os resultados em termos de magnetização de saturação obtidos para SMMps superam em muito os resultados encontrados na literatura para micropartículas magnéticas de sílica. Zhang *et al.* (2008) sintetizou micropartículas de sílica contendo óxido de ferro em seu interior empregando hidrólise alcalina de TEOS e obteve magnetização de saturação de apenas 2.49 emu.g^{-1} . Butterworth *et al.* (1996), por sua vez, produziram micropartículas magnéticas de sílica empregando silicato de sódio e obtiveram magnetização de saturação de 23.1 emu.g^{-1} enquanto Santra *et al.* (2001) obtiveram apenas 1.0 emu.g^{-1} .

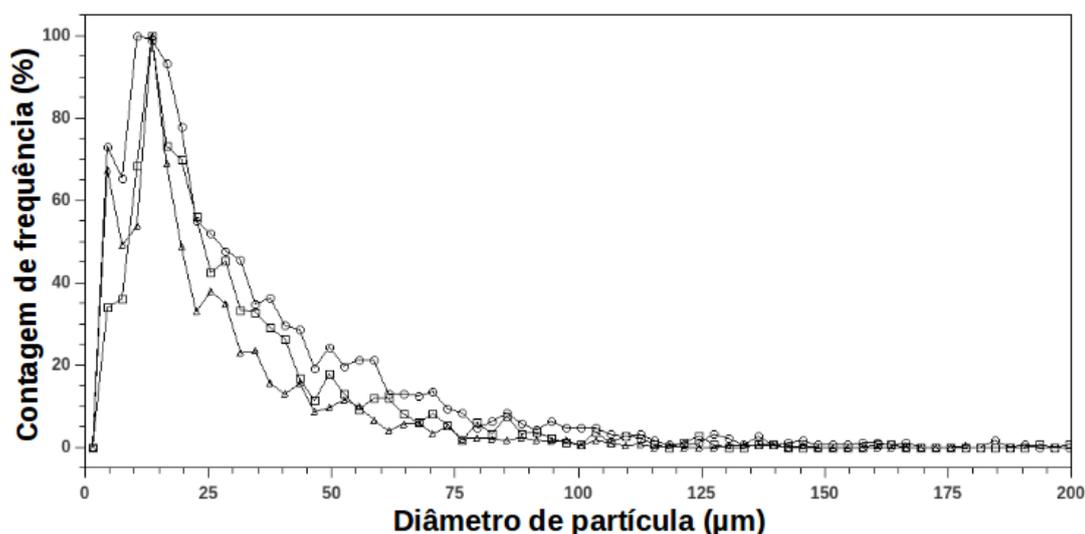
Figura 2.12 – Isotermas de adsorção-dessorção de N₂. a) SMMp-1; b) SMMp-2; c) SMMp-3; d) SMMp-4; e) SMMp-5; f) SMMp-6; g) SMMp-7. Todas os materiais apresentaram isotermas do tipo IV que são típicas de sólidos mesoporosos.



A Tabela 2.2 mostra os resultados de Análise Elementar para os elementos Fe e Si realizada empregando EDS, esta técnica permite quantificar elementos químicos presentes em

uma determinada amostra através da emissão de raios-X gerada pela interação destes elementos com um feixe de elétrons de alta energia. Os resultados de Análise Elementar estão em concordância com os resultados obtidos por FT-IR, indicando que o aumento na concentração de silicato de sódio aumenta a concentração relativa de Si e diminui a de Fe, e consequentemente de SPION, na estrutura final de SMMps. Esta análise confirma também a tendência observada através das análises de magnetização de saturação que indica diminuição na concentração de SPION na estrutura final de SMMps com o aumento na concentração molar de silicato de sódio empregada durante a síntese.

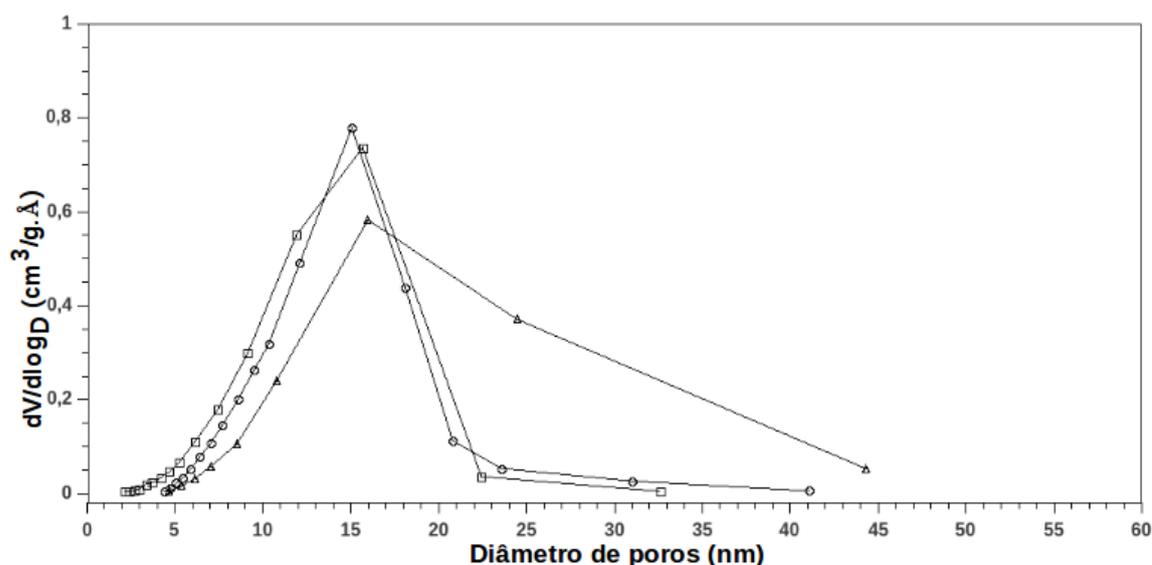
Figura 2.13 – Efeito da concentração molar de silicato de sódio na distribuição de tamanho de partícula de SMMps. a) SMMp-1 (□), b) SMMp-2 (○), c) SMMp-3 (△).



Os resultados obtidos sugerem que o aumento na concentração molar de silicato de sódio, juntamente com o aumento na concentração de SPION, favorece a formação de partículas fundamentais mais densas. Isto pode explicar a diminuição no número de microporos, diminuição na área de superfície e diminuição no volume de poros para SMMp-2 e SMMp-3 em comparação com SMMp-1. O perfil de distribuição de diâmetro de poros apresentado por SMMp-3 sugere que esta amostra possui partículas fundamentais menos uniformes, uma vez que a estrutura de poros é determinada pelo espaçamento entre as cadeias de partículas interconectadas (ILER, 1979). Outra possível explicação para a estrutura de poros observada em SMMp-3 é o efeito de “templating” gerado pela alta concentração de SPION nesta amostra, em conjunto com o surfactante, esse efeito será discutido em mais detalhes na seção seguinte. Como discutido anteriormente, não existem trabalhos que

descrevem a síntese de suportes magnéticos de tamanho micrométrico empregando silicato de sódio como fonte de sílica. Lee *et al.* (2006) prepararam micropartículas de sílica em emulsões *w/o*. Os autores empregaram na preparação do material soluções de silicato de sódio na faixa de 0.1 a 1.0 M, eles verificaram que com o aumento da concentração deste reagente ocorria também aumento do tamanho médio da partícula de 0.1 para 2.3 μm . Segundo o autor isso ocorreu devido ao aumento de tamanho das micro-gotas, que funcionam como reatores para a síntese das partículas. A forma esférica das partículas obtidas no experimento de Lee *et al.* indica que o tamanho das micelas geradas neste experimento são muito maiores do que as geradas durante a síntese de SMMps.

Figura 2.14 – Efeito da concentração molar de silicato de sódio na distribuição de diâmetro de poros de SMMps. a) SMMp-1 (\square), b) SMMp-2 (\circ), c) SMMp-3 (\triangle).



2.3.4 Efeito da Relação Água/Surfactante (w)

Uma micro-emulsão é uma fase simples, termodinamicamente estável formada por três principais componentes: água, óleo e surfactante (SANTRA *et al.*, 2001). Em um sistema de micro-emulsão reversa nano-gotas de água estabilizadas por uma camada de surfactante encontram-se dispersas em uma fase óleo (solvente apolar). Estas nano-gotas podem ser empregadas como nano-reatores permitindo o controle do crescimento de partículas em seu interior. Desta forma o tamanho destas nano-gotas determina a distribuição de tamanho de partículas em um sistema em que não ocorre aglomeração de nano-gotas. Em um sistema

onde há choque e aglomeração de nano-gotas, como o empregado neste trabalho, o tamanho das nano-gotas determina a estrutura de poros e a área de superfície do material. Variáveis como temperatura, natureza da fase apolar/orgânica, relação fase aquosa/fase óleo, natureza de substâncias solubilizadas na fase aquosa e, principalmente, a concentração de surfactante podem ser empregados para controlar o tamanho das nano-gotas (PATIST *et al.*, 2002). Com o objetivo de investigar o efeito da concentração de surfactante na síntese de SMMps a relação água/Triton-X 100 (w) foi variada. Foram empregadas as relações de $w = 4.0$ (SMMp-4), $w = 2.0$ (SMMp-2) e $w = 1.0$ (SMMp-5). A concentração de silicato de sódio e sulfato de amônio foram fixadas em 1.0 M, S foi fixado em 0.5 e w/o foi fixado em 0.28 (Tabela 2.1).

Tabela 2.2 – Concentração relativa de silício e ferro na estrutura final das SMMps. Resultados obtidos através de análises de espectroscopia de energia dispersiva (EDS).

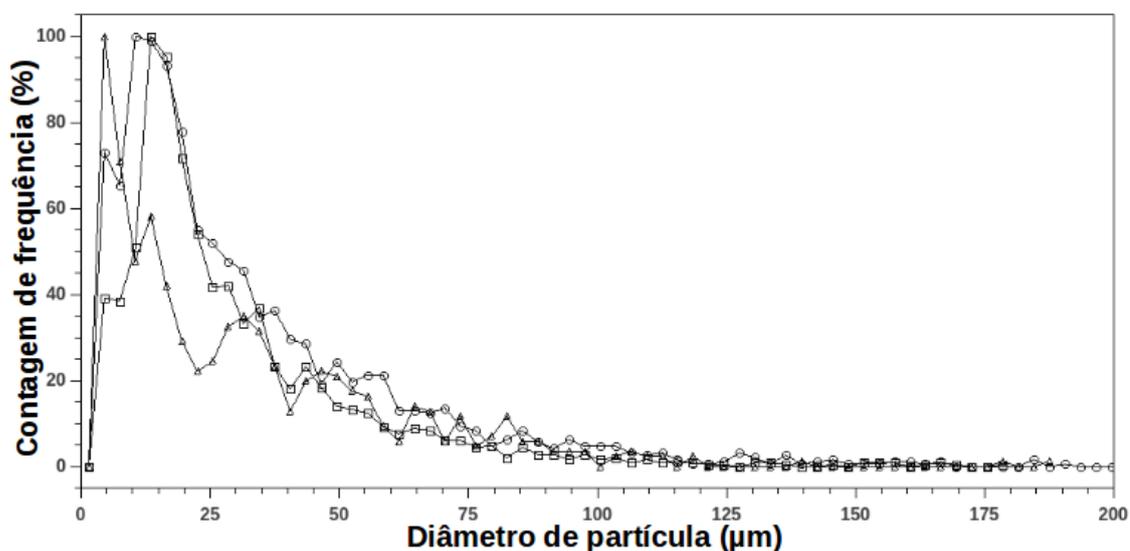
Concentração relativa (%)	SMMp-1	SMMp-2	SMMp-3	SMMp-4	SMMp-5	SMMp-6	SMMp-7
Silício	11.61	10.8	18.5	10.32	74.14	8.81	8.55
Ferro	88.39	89.2	81.5	89.68	25.86	91.19	91.45

As análises de DRX para as amostras SMMp-2, SMMp-4 e SMMp-5 (Figura 2.2) apresentam todos os picos relativos à estrutura cristalina da magnetita e maghemita ($2\theta = 30.1^\circ, 35.5^\circ, 43.1^\circ, 53.4^\circ, 57.0^\circ, 62.6^\circ$) confirmando a presença de SPION na estrutura das micropartículas. Através das análises de DRX é possível, também, confirmar o baixo conteúdo de sílica amorfa nas amostras (OH *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2007). Através das análises de FT-IR (Figura 2.3) é possível visualizar bandas localizadas a 447, 590, e 630 cm^{-1} correspondentes às vibrações de estiramento dos átomos de ferro ($\nu\text{Fe-O}$) (GUPTA e GUPTA, 2005; MAITY e AGRAWAL, 2007; MA *et al.*, 2007), as bandas correspondentes à vibração de moléculas de água ($\delta\text{O-H}$) nos comprimentos de onda 1456 e 1620 cm^{-1} e a banda larga entre 3100 e 3600 cm^{-1} (CHENG *et al.*, 2005; JUNG, 1995; MA *et al.*, 2007; MAITY e AGRAWAL, 2007). Pode ser encontrada também uma banda larga entre 875 e 1300 cm^{-1} centralizada em 1095 cm^{-1} , relacionada com as vibrações de estiramento $\nu\text{Si-O-Si}$ e $\nu\text{Si-O-H}$ (BRUCE e SEN, 2005; MORNET, PORTIER e DUGUET, 2005; WOO, HONG e AHN, 2005). Enquanto as bandas relacionadas com a presença de ferro praticamente não são alteradas com a variação de w , a intensidade das bandas relacionadas com o silício aumenta com a diminuição de w . Isto é um indicativo que a diminuição de w favorece o aumento na concentração de sílica na estrutura final das SMMps. Este comportamento foi

mais pronunciado para SMMp-5 ($w = 1.0$) em comparação com SMMp-4 ($w = 4.0$) e SMMp-2 ($w = 2.0$).

Na Figura 2.15 é possível visualizar os resultados obtidos para a distribuição de tamanho de partícula para as amostras SMMp-2, SMMp-4 e SMMp-5. A Figura 2.16 mostra, por sua vez, o perfil de distribuição de diâmetro de poros para estas amostras. A distribuição de tamanho de partículas para SMMp-2 e SMMp-4 apresenta perfil similar. A amostra SMMp-5, no entanto, apresentou diminuição em seu tamanho médio de partícula. Estes resultados indicam que a diminuição de w para 1.0 favorece a obtenção de partículas menores e com uma distribuição estreita de tamanho. A área de superfície e o volume de poros aumentaram com a diminuição de w , a área de superfície para SMMp-5 era quase duas vezes a observada para SMMp-4. A estrutura de poros também foi fortemente influenciada por w , SMMp-4 apresentou estreita distribuição de tamanho de poros (2-43 nm) e diâmetro médio de poros de 12.3 nm. SMMp-5, por sua vez, apresenta poros na faixa de 4-44 nm, porém sem muitos poros grandes como os observados para SMMp-2.

Figura 2.15 – Efeito da relação surfactante/água (w) na distribuição de tamanho de partícula de SMMps. a) SMMp-4 (\square), b) SMMp-2 (\circ), c) SMMp-5 (\triangle).



A magnetização de saturação apresentada por SMMp-4 foi um pouco maior que a observada para SMMp-2, porém a magnetização de saturação de SMMp-5 foi muito menor (Figura 2.7), este resultado claramente indica que a diminuição em w causa diminuição na magnetização de saturação das amostras no sistema investigado. As análises de EDS para estas amostras (Tabela 2.2) indicam que SMMp-4 e SMMp-2 possuem alto conteúdo do

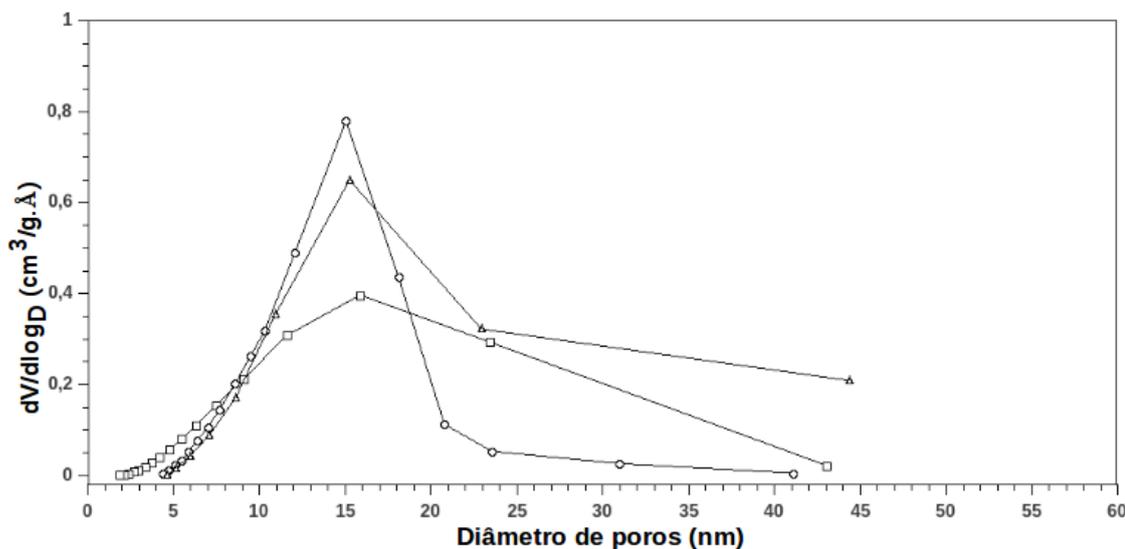
elemento ferro e baixo conteúdo de silício quando comparadas com SMMp-5, logo SMMp-5 possui uma menor concentração relativa de SPION em sua estrutura. Estes resultados concordam com as análises de FT-IR e com os resultados de magnetização de saturação, indicando que a diminuição em w favorece a presença de sílica na estrutura final da partícula e desfavorece a presença de SPION, este efeito foi mais significativo quando $w = 1$.

Em sistemas de micro-emulsões, usualmente, baixos valores de w conduzem a diminuição no tamanho de micela (CAPEK *et al.*, 2004; EASTOE e WARNE, 1996; SANTRA *et al.*, 2001), desta forma em processos de síntese de partículas usando micelas reversas como nano-reatores, é esperado uma diminuição no tamanho de partícula dos materiais com a diminuição de w . No processo de síntese de SMMps as nanopartículas formadas no interior das micelas se unem em um cluster micrométrico, desta forma o tamanho das micelas determina a estrutura de poros de SMMps. Como esperado, a diminuição de w favorece a formação de partículas fundamentais menores conduzindo à: aumento na área de superfície e no volume de poros; diminuição no tamanho de poros e a uma distribuição de tamanho de poros mais estreita. Para as amostras SMMp-4 e SMMp-2 não foram observadas alterações significativas na concentração relativa de SPION na estrutura final das amostras, e conseqüentemente não foram observadas grandes diferenças nos resultados de magnetização de saturação para estas amostras. Embora a área de superfície e o diâmetro de poros tenham aumentado em SMMp-5 quando comparado com SMMp-2, esta amostra apresenta distribuição de tamanho de poros mais larga que a observada para SMMp-2. Em adição o baixo conteúdo de SPION em SMMp-5 indica que esta amostra possui uma estrutura diferenciada das demais.

Uma emulsão w/o constitui um sistema dinâmico onde as micelas estão em equilíbrio com as moléculas individuais de surfactante, continuamente se desintegrando e se remontando (PATIST *et al.*, 2002). Desta forma é factível que devido a alta concentração de surfactante empregada no processo de síntese de SMMp-5 algumas moléculas de surfactante se coordenem ao redor de nanopartículas de óxido de ferro formando uma camada que as protege da reação com o ácido ortossilícico. Após a síntese SPION recoberto com Triton-X 100 era lavado e retirado da estrutura de SMMp-5 deixando poros grandes em seu lugar. Este comportamento pode explicar a diminuição na concentração de SPION observada para SMMp-5. Abramson *et al.* (2011) observaram comportamento similar para micropartículas magnéticas de sílica preparadas usando SPION como núcleo magnético e TEOS como fonte de sílica. Neste trabalho os autores sugeriram que as partículas de SPION juntamente com o surfactante tem um efeito de “templating” na estrutura final da partícula. É importante

salientar que embora este efeito de “templating” seja mais acentuado para SMMp-5 ele apresentou importante papel durante a preparação de todas as amostras.

Figura 2.16 – Efeito da relação surfactante/água (w) na distribuição de diâmetro de poros na síntese de SMMps. a) SMMp-4 (\square); b) SMMp-2 (\circ); c) SMMp-5 (\triangle).



2.3.5 Efeito da Relação Mássica SPION/Silicato de Sódio (S)

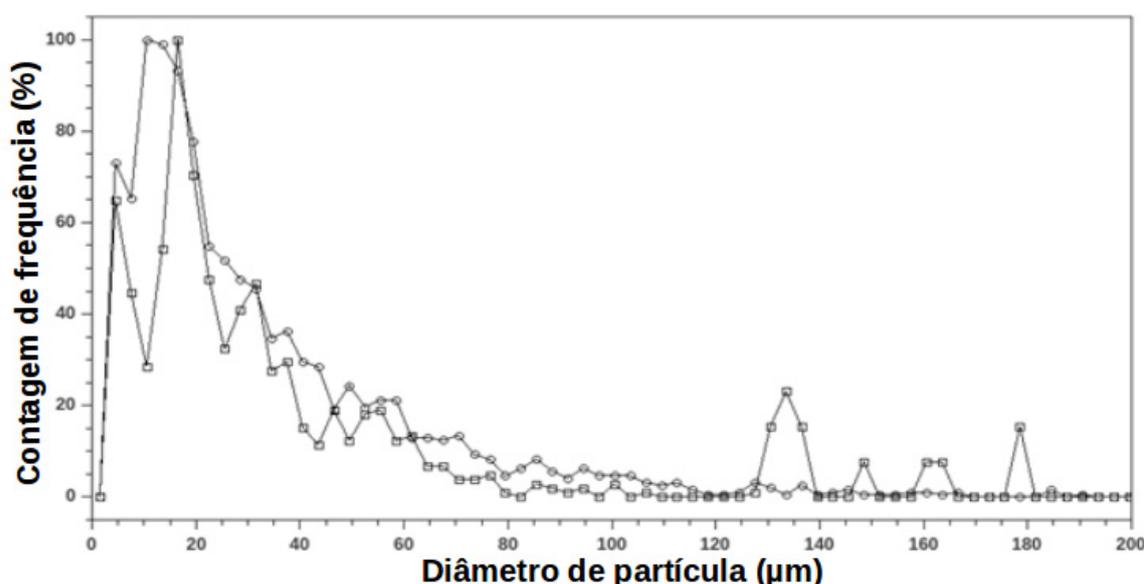
A eficiência na recuperação de suportes magnéticos dispersos em um meio líquido está diretamente relacionada ao tamanho de partícula e à magnetização de saturação do suporte (YAVUZ *et al.*, 2006; YAVUZ *et al.*, 2009). Desta forma com o objetivo de verificar o efeito do aumento na concentração mássica de SPION durante o processo de obtenção de SMMps a relação SPION/silicato de sódio (S) foi variada (SMMp-2 e SMMp-6 na Tabela 2.1). O efeito combinado do aumento de S e a diminuição de w ($w = 1$) também foram avaliados (SMMp-7 na tabela 2.1). A concentração molar de silicato de sódio e sulfato de amônio foram fixadas em 1.0 M e w/o foi fixado em 0.28.

Análises de DRX em SMMp-2 (Figura 2.2c), SMMp-6 (Figura 2.2-g) e SMMp-7 (Figura 2.2-h) mostraram a mesma tendência observada para as amostras anteriores: presença de alta concentração de magnetita e baixo conteúdo de sílica amorfa. Na Figura 2.3 (c, g e h) estão os resultados de FT-IR para as amostras SMMp-2, SMMp-6 e SMMp-7, respectivamente. É possível verificar todos os picos relacionados à presença de SPION, silício e água adsorvida na superfície do material para todas as amostras. O perfil de FT-IR das

amostras SMMp-2 e SMMp-6 é muito similar indicando que não houve mudança significativa na concentração relativa de SPION e sílica na estrutura dos materiais com o aumento de S . SMMp-7 mostrou um tendência um pouco diferente, nesta amostra é possível observar aumento nas bandas relacionadas com a presença de ferro ($\text{cm}^{-1} = 447, 590 \text{ e } 630$) (MAITY e AGRAWAL, 2007) em comparação com SMMp-5, sugerindo que a combinação entre aumento de S e diminuição de w conduz ao aumento na concentração de SPION na estrutura final do material.

Comparando a distribuição de tamanho de partículas para SMMp-2 (Figura 2.17a) e SMMp-6 (Figura 2.17b) é possível observar a existência de um número significativo de partículas maiores que $100 \mu\text{m}$ para SMMp-6. Abaixo de $100 \mu\text{m}$ a distribuição de tamanho de partículas para as duas amostras foi muito similar, este resultado indica que o aumento em S favoreceu o aparecimento de partículas maiores durante a síntese de SMMps. A amostra SMMp-7, onde foi avaliado o efeito conjunto de aumento S e diminuição de w , apresentou larga distribuição de tamanho de partículas, porém não foram encontradas partículas maiores que $120 \mu\text{m}$ (Figura 2.18c). O perfil de distribuição de tamanho de partículas para SMMp-7 foi totalmente distinto do observado para SMMp-5 ($w = 1.0, S = 0.5$) e SMMp-6 ($w = 2.0, S = 1.0$).

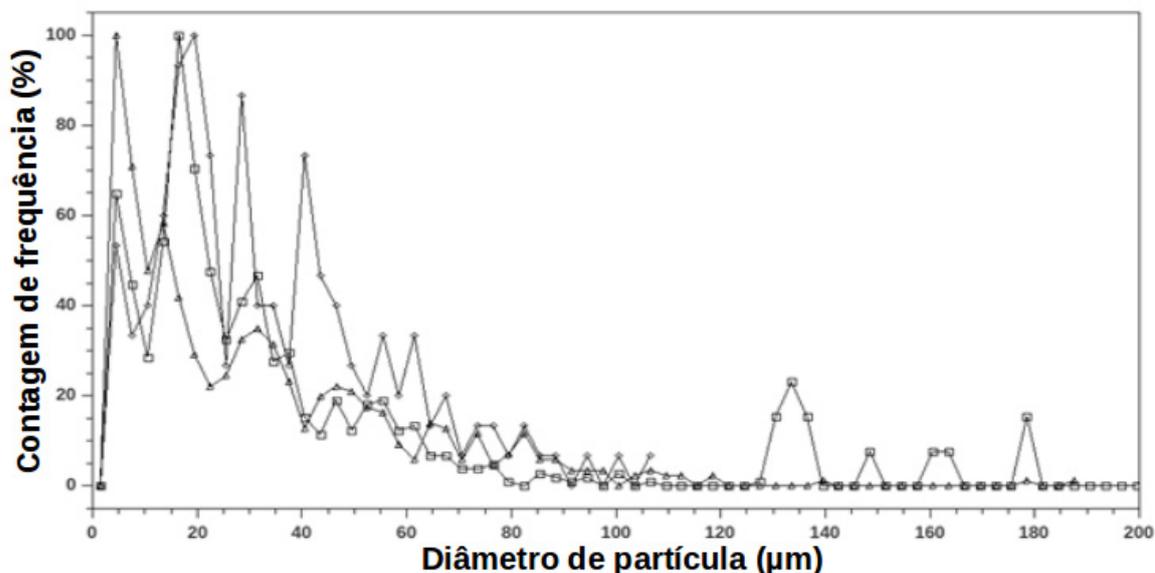
Figura 2.17 – Efeito da relação SPION/silicato de sódio (S) na distribuição de tamanho de partícula de SMMps. a) SMMp-2 (○); b) SMMp-6 (□).



SMMp-6 apresentou diminuição em sua área de superfície, volume de poros e

diâmetro de poros quando comparado com SMMp-2 (Tabela 2.1). A distribuição de tamanho de poros para estas amostras apresentou perfil similar. SMMp-6 não apresenta poros maiores que 31 nm enquanto SMMp-4 possui poros com até 41 nm (Figura 2.19). Comparando SMMp-5 com SMMp-7 é possível observar aumento na área de superfície e diminuição no diâmetro de poro médio do material com o aumento de S , o volume de poros era praticamente o mesmo para ambas amostras. A distribuição de diâmetro de poros para SMMp-7 é muito diferente da observada para SMMp-5, em SMMp-7 a maioria dos poros possuem tamanho entre 5 e 22 nm, embora poros de até 60 nm possam ser observados. SMMp-5 apresenta significativa concentração de poros grandes, na faixa de 5-45 nm. Estas diferenças entre SMMp-2/SMMp-5/SMMp-6 e SMMp-7 sugerem que o aumento de S em conjunto com a diminuição de w causou mudanças estruturais significativas nas amostras.

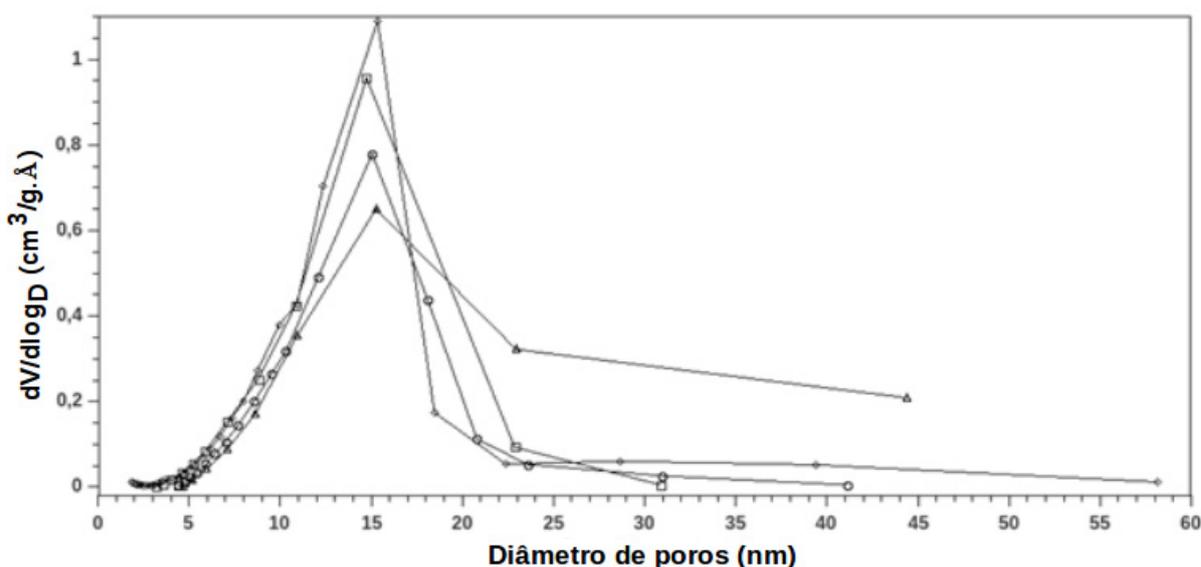
Figura 2.18 – Efeito conjunto da relação mássica SPION/silicato de sódio (S) e da relação surfactante/água (w) na distribuição de tamanho de partícula de SMMps. a) SMMp-5 (Δ); b) SMMp-6 (\square); c) SMMp-7 (\diamond).



O valor de magnetização de saturação para SMMp-2 e SMMp-6 foi praticamente o mesmo (Figura 2.7). Já a magnetização de saturação para amostra SMMp-7 foi muito maior do que para SMMp-5. SMMp-7 apresentou o maior valor de magnetização de saturação para SMMps sintetizadas neste trabalho. A análise Elementar para ferro e silício realizada por EDS (Tabela 2.2) mostra que SMMp-2 possui concentração relativa de SPION (ferro) um pouco maior que SMMp-6. SMMp-7, por sua vez, apresentou grande aumento na concentração relativa de ferro quando comparado com SMMp-5, porém apresentou resultados muito

similares aos observados para SMMp-6 neste parâmetro. O aumento relativo na concentração de SPION observado para SMMp-7 em comparação com SMMp-5 confirma os resultados de FT-IR e de magnetização de saturação indicando que quando $w = 1$ o aumento de S favorece o aumento de SPION na estrutura final da micro-partícula.

Figura 2.19 – Efeito conjunto da relação mássica SPION/silicato de sódio (S) e da relação surfactante/água (w) na distribuição de diâmetro de poros de SMMps. a) SMMp-2 (○); b) SMMp-5 (△); c) SMMp-6 (□); d) SMMp-7 (◇).



SPION possui alta área de superfície externa e muitos grupos hidroxila em sua superfície, que são capazes de reagir com o ácido ortosilícico formando uniões covalentes. Em adição, o ácido ortosilícico possui forte tendência a se depositar na superfície de metais e óxidos de metais (BERGNA, 1994; ILER, 1979). Desta forma é provável que a presença de SPION favoreça a polimerização do ácido ortosilícico, como observado por Abramson *et al.* (2011). A magnetização de saturação observada para a maioria das SMMps preparadas foi próxima à observada para SPION puro (Figura 2.7) indicando que as condições empregadas no processo favorecem a alta concentração de SPION na estrutura final dos materiais. Desta forma, era esperado que o aumento na concentração de SPION aumentasse a magnetização de saturação da amostra, isso de fato aconteceu como pode ser observado para SMMp-2 e SMMp-6, ainda que a diferença na magnetização de saturação não tenha sido tão grande para estas amostras. O que de fato foi observado é que o aumento na concentração de SPION ($S = 1.0$) empregada gerou SMMps com características muito similares as preparadas empregando

concentrações menores de SPION ($S = 0.5$), porém a massa de micropartículas obtidas ao final do experimento aumentou. Em experimentos de síntese de micropartículas não magnéticas de sílica realizadas nas mesmas condições, mas sem a presença de SPION, foi obtida apenas uma pequena massa de micropartículas. Estes resultados sugerem que a presença de SPION tem grande influência sobre o processo de formação de SMMps. Na síntese da amostra SMMp-7 a concentração de SPION na estrutura final das partículas foi fortemente influenciada pela concentração de SPION empregada no processo conduzindo a valores de magnetização de saturação e concentração relativa de ferro maiores do que a observada para a amostra SMMp-5. A área de superfície e o diâmetro de poros para SMMp-7 foram similares aos observados para SMMp-5, porém o diâmetro médio de poros diminuiu. A distribuição de diâmetro de poros para essas amostras ilustra mais claramente estas mudanças (Figura 2.19). A alta concentração de poros largos observada em SMMp-5 desapareceu em SMMp-7 gerando uma distribuição de poros mais estreita com uma quantidade maior de poros com menos de 25 nm. Novamente é possível observar o efeito de “templating” de SPION e surfactante na morfologia final das SMMps.

2.4 Conclusão do Capítulo

Com o objetivo de preparar suportes magnéticos robustos, baratos e com características ótimas para aplicações em bioprocessos, sobretudo na imobilização de enzimas, investigamos a síntese de micropartículas magnéticas de sílica (SMMps) em micro-emulsão *w/o* empregando silicato de sódio como fonte de sílica. Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) foram utilizadas como núcleo magnético. Para síntese de SPION empregamos um método de co-precipitação homogênea modificado que gerou nanopartículas com alta magnetização de saturação. O processo de síntese empregado gerou altas quantidades de SMMps com alta magnetização de saturação, alta área de superfície e estrutura mesoporosa. Todas as SMMps preparadas responderam fortemente a campos magnéticos externos, e foram prontamente separadas quando em solução. SMMps foram caracterizadas por DRX, FT-IR, isoterma de adsorção-dessorção de N₂, TGA, MEV, EDS e S.Q.U.I.D. Uma teoria para o processo de síntese foi proposta (Figura 2.10) onde nanopartículas de sílica contendo alta concentração de SPION crescem no interior das nano-gotas da emulsão *w/o* e em seguida se unem formando agregados de tamanho micrométrico dando origem às SMMps. Com o objetivo de entender melhor o processo e modular as características finais do material foram empregadas distintas condições de síntese. O aumento na concentração molar de silicato de sódio empregado no processo gerou aumento na concentração de sílica em relação à concentração de SPION na estrutura final das partículas o que diminuiu levemente a magnetização de saturação obtida. Concentrações maiores de silicato de sódio também conduziram à diminuição da área de superfície e diâmetro de poros do material, a distribuição de tamanho de partículas não foi alterada. O aumento na concentração relativa de surfactante empregado no processo (diminuição de *w*) gerou aumento na área de superfície e diâmetro de poros das SMMps, o tamanho médio de partícula diminuiu quando a concentração de surfactante aumentou. O uso de concentrações maiores de surfactante favoreceu a formação de partículas com maior quantidade relativa de sílica e menor quantidade de SPION, com isso a magnetização de saturação também diminuiu. Quando concentrações maiores de SPION foram empregadas no processo a massa final de SMMps obtida aumentou, contudo não houve alteração significativa na distribuição de tamanho de partícula, na concentração de SPION e na magnetização de saturação das amostras. O uso de concentrações maiores de SPION favoreceu a formação de SMMps mais densas com menor área de superfície e menor diâmetro de poros. Quando a concentração de surfactante e SPION foram aumentadas, de forma conjunta, durante a preparação de SMMps as micropartículas obtidas apresentaram

características muito distintas das demais. Os resultados indicam que o surfactante em conjunto com SPION tem efeito de “templating” de forma que a concentração destas substâncias influencia significativamente a estrutura final das SMMps. Desta forma suportes magnéticos com grande potencial para aplicação em bioprocessos foram obtidos e caracterizados, a estrutura final do material pôde ser controlada de acordo com as condições de síntese empregadas.

2.5 Referências

ABRAMSON, S.; SAFRAOU, W.; MALEZIEUX, B.; DUPUIS, V.; BORENSZTAJN, S.; BRIOT, E.; BÉE, A. An eco-friendly route to magnetic silica microspheres and nanospheres. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 324-332, 2011.

ANDERSON, N.; CORKERY, R. W.; ALBERIUS, P. C. One-pot synthesis of well ordered mesoporous magnetic carriers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, p. 2700-2705, 2007.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. computations from nitrogen isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, p. 373-380, 1951.

BAUER, L. A.; BIRRENBAUM, N. S., MEYER, G. J. Biological applications of high aspect ratio nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, p. 517-526, 2004.

BERGNA, H. **The Colloid Chemistry of Silica**. Washington, DC: National Meeting of the American Chemical Society, 718p, 1994.

BETANCOR, L.; FUENTES, M.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; LOPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, C.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 32, p. 97-101, 2005.

BOZHINOVA, D. P. **Synthesis, modification and characterisation of magnetic micro-matrices for covalent immobilisation of biomolecules: Model investigations with penicillin amidase from E.coli**. 161p., Tese de doutorado - Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg, Regensburg, 2004.

BROOMBERG, J. **Development of magnetic carriers for metal ion removal**. 122p., Tese de Doutorado - Department of Mining and Metallurgical Engineering, McGill University, Montreal, 1998.

BRUCE, I. J. SEN, T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations. **Langmuir**, v. 21, p. 7029-7035, 2005.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular

Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309-319, 1938.

BUTTERWORTH, M. D.; BELL, S. A.; ARMES, S. P.; SIMPSON, A. W. Synthesis and characterization of polypyrrole-magnetite-silica particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 183, p. 91-99, 1996.

CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (*w/o*) microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 110, p. 49-74, 2004.

CHASTELLAIN, A.; PETRI, A.; HOFMANN, H. Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 278, p. 353-360, 2004.

CHENG, F. Y.; SU, C. H.; YANG, Y. S.; YEH, C. S.; TSAI, C. Y.; WU, C. L.; WU, M. T. SHIEH, D. B. Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 729-738, 2005.

CHIANG, C. L.; SUNG, C. S. Purification of transfection-grade plasmid DNA from bacterial cells with superparamagnetic nanoparticles. **Journal Of Magnetism And Magnetic Materials**. v. 302, p. 7-13, 2006.

EASTOE, J.; WARNE, B. Nanoparticle and polymer synthesis in microemulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 1, p. 800-805, 1996.

FRANZEREB, M.; SIEMANN-HERZBERG, M.; HOBLEY, T. J.; THOMAS, O. R. T. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 505-516, 2006.

GAMARRA, L. F.; BRITO, G. E. S.; PONTUSCHKA, W. M.; AMARO, E.; PARMA, A. H. C.; GOYA, G. F. Biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for contrast agents: a structural and magnetic study. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, p. 439-441, 2005.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. **Biomaterials**, v. 26, p. 1565-1573, 2005.

HARRIS, L. A. **Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and oly(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks**. 173p. Tese de doutorado - Polytechnic Institute, Faculty of the Virginia, Charlottesville, 2002.

HUANG, S.; FAN, Y.; CHENG, Z.; KONG, D.; YANG, P.; QUAN, Z.; ZHANG, C.; LIN, J. Magnetic Mesoporous Silica Spheres for Drug Targeting and Controlled Release. **Journal of Physical Chemistry C, Amer. Chemical Soc.**, v. 113, p. 1775-1784, 2009.

ILER, R. **The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica**. Hoboken: Wiley-Interscience, 866p., 1979.

JUNG, C. W. Surface-properties of superparamagnetic iron-oxide Mr contrast agents - ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 13, p. 675-691, 1995.

KHALAFALLA, S.; REIMERS, G. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 16, p. 178-183, 1980.

LEE, S. G.; JANG, Y. S.; PARK, S. S.; KANG, B. S.; MOON, B. Y., PARK, H. C. Synthesis of fine sodium-free silica powder from sodium silicate using *w/o* emulsion. **Materials Chemistry And Physics**, v. 100, p. 503-506, 2006.

MA, H. L.; QI, X. T.; MAITANI, Y.; NAGAY, T. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 333, p. 177-186, 2007.

MA, Z. Y.; LIU, X. Q.; GUAN, Y. P., LIU, H. Z. Synthesis of magnetic silica nanospheres with metal ligands and application in affinity separation of proteins. **Colloids And Surfaces A-Physicochemical And Engineering Aspects**, v. 275, p. 87-91, 2006.

MAITY, D.; AGRAWAL, D. C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. **Journal Of Magnetism And Magnetic Materials**, v. 308, p. 46-55, 2007.

MALCATA, F. X.; RYES, H. R.; GARCIA, H. S. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – A review. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.

MARTINS, R. E. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

MARTINS, R. E., ADRIANO, W. S., GIORDANO, R. L. C. Obtenção de derivados imobilizados de celulasas em géis de quitosana. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Santos, 2006.

MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 17, p. 1247-1248, 1981.

MATHEW, D. S.; JUANG, R. S. An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions. **Chemical Engineering Journal**, v. 129, p. 51-65, 2007.

MATTEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LOPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274-280, 2006.

MERKUS, H. **Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality**. New York: Springer, 536p., 2009.

MORNET, S.; PORTIER, J., DUGUET, E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 127-134, 2005.

OH, C.; LEE, Y.G.; JON, C.U.; OH, S.G. Synthesis and characterization of hollow silica microspheres functionalized with magnetic particles using *w/o* emulsion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 337, p. 208-212, 2009.

PATIST, A.; KANICKY, J.; SHUKLA, P.; SHAH, D. Importance of micellar kinetics in relation to technological processes. **Journal Of Colloid And Interface Science**, v. 245, p. 1-15, 2002.

PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F.; MORAES, F.F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Cândida rugosa*: A comparative study between free and enzyme immobilized onto porous chitosan beads. **Ap. Biochem. Biotechnol.**, v. 91-93, p. 739-752, 2001.

SANTRA, S.; TAPEC, R.; THEODOROPOULOU, N.; DOBSON, J.; HEBARD, A.; TAN, W. H. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of nonionic surfactants. **Langmuir**, v. 17, p. 2900-2906, 2001.

SETYAWAN, H.; FAJAROH, F.; WIDIYASTUTI, W.; WINARDI, S.; LENGGORO, I. W.; MUFTI, N. One-step synthesis of silica-coated magnetite nanoparticles by electrooxidation of iron in sodium silicate solution. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, 2012.

SUH, W. H.; SUSLICK, K. S.; STUCKY, G. D.; SUH, Y. H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Progress in Neurobiology**, v. 87, p. 133-170, 2009.

SUH, W. H.; SUSLICK, K. S.; STUCKY, G. D.; SUH, Y. H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. **Progress In Neurobiology**, v. 87, p. 133-170, 2009.

SUN, J. B.; ZHAO, F.; TANG, T.; JIANG, W.; TIAN, J. S.; LI, Y., LI, J. L. High-yield growth and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 79, p. 389-397, 2008.

TAKAHASHI, K.; TAMAMURA, Y.; KODERA, Y.; MIHAMA, T.; SAITO, Y.; INADA, Y. Magnetic lipase active in organic solvents. **Biochem. Bioph. Res. Communications**, v. 142, n. 2, p. 291-296, 1987.

TARDIOLI, P. W.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Design of new immobilized-stabilized carboxypeptidase A derivative for production of aromatic free hydrolysates of proteins. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 565-574, 2003a.

TARDIOLI, P. W.; PEDROCHE, J.; GIORDANO, R. L. C.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized Alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 352-360, 2003b.

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; GONZALEZ-CARRENO, T.; VENTEMILLAS-VERDAGUER, S.; SERNA, C. J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. **Journal Of Magnetism And Magnetic Materials**, v. 290, p. 28-34, 2005.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? **Trends Biotechnol.** v. 17, p. 326-335, 1999.

VILLENEUVE, P. MUDERHWA, J. M. GRAILLE, J. Customizing lipases or biocatalysis: A survey of chemical physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

WOO, K.; HONG, J.; AHN, J. P. Synthesis and surface modification of hydrophobic magnetite to processible magnetite@silica-propylamine. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 177-181, 2005.

WU, W.; HE, Q. G.; JIANG, C. Z. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, p. 397-415, 2008.

YAMAMURA, M.; CAMILO, R. L.; SAMPAIO, L. C.; MACEDO, M. A.; NAKAMURA, M.; TOMATO, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 279, p. 210-217, 2004.

YANG, Z. P.; SI, S. H.; ZHANG, C. J. Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activity and stability. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 367, p. 169-175, 2008.

YAVUZ, C. T.; MAYO, J. T.; YU, W. W.; PRAKASH, A.; FALKNER, J. C.; YEAN, S.; CONG, L. L.; SHIPLEY, H. J.; KAN, A.; TOMPSON, M.; NATELSON, D.; CONVIN, V. L. Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. **Science**, v. 314, p. 964-967, 2006.

YAVUZ, C. T.; PRAKASH, A.; MAYO, J. T.; CONVIN, V. L. Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v. 64, p. 2510-2521, 2009.

YU, C. H.; TAM, K. Y.; LO, C. C. H.; TSANG, S. C. Functionalized silica coated magnetic nanoparticles with biological species for magnetic separation. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 43, p. 2436-2438, 2007

YU, Z.; ZHANG, H. X. Ethanol Fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 199-204, 2004.

ZHANG, L.; QIAO, S. Z.; CHENG, L.; YAN, Z.; LU, G. Q. M. Fabrication of a magnetic helical mesostructured silica rod. **Nanotechnology**, v. 19, 2008.

CAPÍTULO 3:

SÍNTESE DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS (MAGNETIC CROSS- LINKED ENZYMES AGGREGATES – M-CLEAS): ESTUDOS EMPREGANDO PGA COMO ENZIMA MODELO



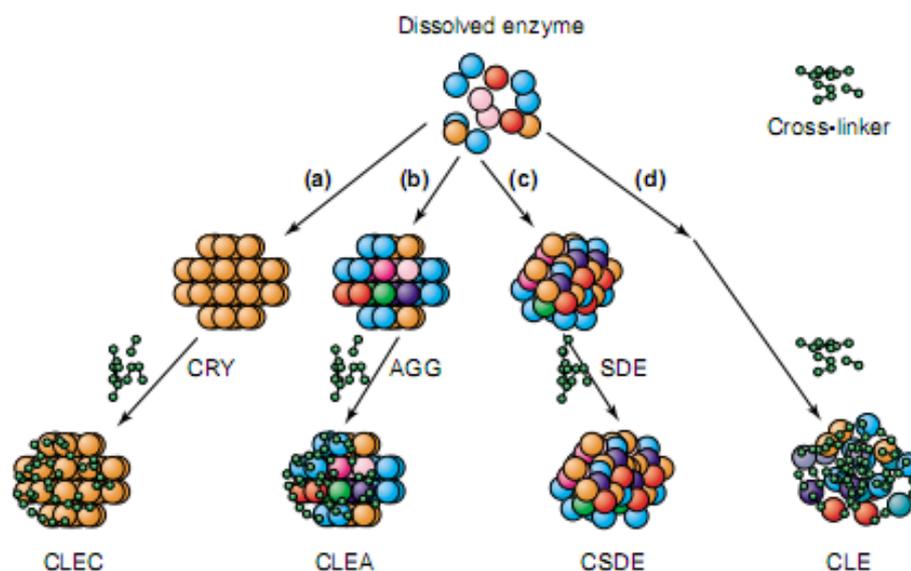
3.1 Conhecimento Base

Apesar das grandes vantagens conferidas à maioria dos biocatalisadores através da sua imobilização em suportes insolúveis, infelizmente, o uso de suportes conduz a diluição da atividade de enzimas imobilizadas. Isso ocorre devido à introdução de uma grande porção de massa não catalítica na faixa de 90.0 a 99.9% do peso total do derivado, o que conduz à queda na produtividade do derivado (massa de produto/massa de derivado/hora) (TISCHER e KASCHE, 1999). Esta queda de produtividade causa dificuldades na aplicação de enzimas imobilizadas em alguns processos devido à alta quantidade de derivado necessária para a realização de um processo tempo-efetivo. Além disso, a preparação de enzimas imobilizadas em suportes, geralmente, consome muito tempo no desenvolvimento de protocolos de imobilização ideais, os métodos empregados são em sua maioria muito laboriosos e o resultado é praticamente imprevisível, uma vez que é muito difícil relacionar a natureza do suporte selecionado ao desempenho esperado para uma determinada enzima em um determinado processo após um procedimento de imobilização (BOLLER *et al.*, 2002). Estas desvantagens são contrabalanceadas através da possibilidade de recuperar a enzima a partir do meio reacional e reutilizá-la por inúmeros ciclos reacionais e em alguns casos pelo aumento da estabilidade operacional alcançada após o procedimento de imobilização. Consequentemente o desenvolvimento e exploração de suportes universais que são capazes de alcançar alto carregamento de enzimas e reter alta atividade tem se tornado foco de recente atenção.

No início da década de 60, estudos com proteínas em fase sólida conduziram à descoberta de que cristais enzimáticos ou enzimas dissolvidas unidas por ligações cruzadas através da utilização de um agente bifuncional, como o glutaraldeído, poderia formar o que hoje é conhecido como “cross linked enzymes crystals” (CLEC) (QUIOCHO e RICHARDS, 1964) e “cross linked enzymes” (CLE) (QUIOCHO e RICHARDS, 1966). Estas formas insolúveis de enzimas possuem a capacidade de reter atividade catalítica. Desta forma nasceu um novo conceito em imobilização de enzimas conhecido como “carrier-free immobilized enzymes” (enzimas imobilizadas livres de suporte). Estes derivados são geralmente preparados por entrecruzamento direto de diversas preparações enzimáticas (Figura 3.1) como enzimas dissolvidas, enzimas secas por spray-dry, enzimas cristalizadas e enzimas fisicamente agregadas, resultando na formação de “cross-linked dissolved enzymes” (CLEs) “cross-linked spray-dried enzymes” (CSDEs), “cross-linked enzymes crystals” (CLECs) e “cross-linked enzymes aggregates” (CLEAs). Desta maneira, estes derivados são discriminados somente

pelo precursor no qual são efetuadas as ligações cruzadas. Estas metodologias oferecem claras vantagens para aplicações industriais como atividade enzimática altamente concentrada (10 a 1000 vezes mais atividade volumétrica que enzimas imobilizadas em suportes), simplicidade de preparação, flexibilidade, larga faixa de aplicação, aumento na estabilidade operacional dos derivados e baixos custos de obtenção devido à exclusão de um suporte adicional (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003; GOVARDHAN, 1999; SHELDON, SCHOEVAART e VAN LANGEN, 2005). Dentre as classes de “carrier-free immobilized enzymes” as mais empregadas industrialmente são os CLECs e, mais recentemente, os CLEAs. Glutaraldeído é o agente bifuncional utilizado, na maioria das vezes, para realização das ligações cruzadas.

Figura 3.1 – Métodos para obtenção de enzimas imobilizadas livres de suporte. a) Cristalização; b) Agregação; c) Spray-Drying; d) Entrecruzamento direto. CRY, cristais; AGG, agregados; SDE, enzimas secas por spray-dry (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003).



O uso de enzimas imobilizadas livres de suporte pode ser benéfico em processos onde alta produtividade é requerida. Devido sua alta atividade volumétrica o uso de enzimas imobilizadas livres de suporte pode incrementar a velocidade de uma determinada reação e/ou permitir a diminuição do volume reacional sem perdas na produtividade por permitir o uso de concentrações maiores de enzima no reator, já que geralmente é recomendável que o derivado ocupe no máximo 20% do volume útil do reator. Além da alta atividade volumétrica enzimas imobilizadas livres de suporte podem ser altamente estáveis termicamente e, principalmente, na presença de solventes orgânicos. Este incremento na estabilidade operacional se deve à chamada imobilização enzimática tri-dimensional a qual combina vários fatores de

estabilização como confinamento, ligações multipontuais e múltiplas interações não covalentes como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e iônicas que são frequentemente envolvidas em processos de agregação e cristalização (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003; SHELDON, SCHOEVAART e VAN LANGEN, 2005).

O entrecruzamento direto de proteínas em solução é utilizado na preparação de CLEs, a obtenção de CLEs é simples, rápida, barata e, em alguns casos, pode conferir aumento na estabilidade da enzima (SHELDON, SCHOEVAART e VAN LANGEN, 2005). No entanto, a preparação de CLEs rende derivados com atividade recuperada extremamente baixa, pouca estabilidade mecânica, estrutura geleiforme e tamanho de partícula extremamente variável (fatores que dificultam seu manuseio e recuperação) (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003). Alguns poucos estudos tem avaliado o entrecruzamento de proteínas secas por spray-dry (CLSDs) na preparação de enzimas imobilizadas livres de suporte, este método gera derivados com atividade recuperada baixa e geralmente sem incremento em sua estabilidade operacional (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003). Entre os métodos de imobilização de enzimas livres de suporte o que mais se destaca, ao lado dos CLEAs, são os CLECs. CLECs são obtidos através do entrecruzamento de cristais de enzimas altamente compactos rendendo derivados com alta atividade volumétrica, alta estabilidade térmica, alta estabilidade frente a solventes orgânicos, estabilidade mecânica e alta atividade recuperada (SHELDON, 2011; LALONDE *et al.*, 1995; QUIOCHO e RICHARDS, 1964; ROY e ABRAHAM, 2006). Como principal desvantagem dos CLECs é possível citar a necessidade de se trabalhar com soluções enzimáticas de alta pureza para permitir a obtenção de cristais e a laboriosa etapa de determinação das condições de cristalização (SHELDON, 2011).

Na última década derivados enzimáticos chamados de “cross linked enzymes aggregates” (CLEAs) foram adicionados a família das enzimas imobilizadas livres de suportes (CAO *et al.*, 2000). Através da variação nas condições de uma determinada solução aquosa contendo enzimas solúveis é possível alterar a solubilidade das proteínas induzindo a formação de agregados físicos, que após a realização de ligações cruzadas utilizando agentes bifuncionais ou multifuncionais se tornam os chamados CLEAs. Sabe-se que a agregação física de moléculas de proteínas em complexos supramoleculares pode ser induzida pela adição de sais, solventes orgânicos, polímeros iônicos e polímeros não iônicos a uma determinada solução de proteínas sem a perturbação de sua estrutura tridimensional, este método tem sido amplamente utilizado para purificação e concentração de proteínas (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003). De forma análoga ao processo de obtenção de CLECs, estes agregados físicos podem ser subsequentemente unidos por ligações cruzadas com

agentes bifuncionais que evitam a re-dissolução do agregado quando o agente precipitante é retirado. CLEAs podem exibir atividade e estabilidade comparáveis a dos CLECs e em alguns casos até maiores (CAO *et al.*, 2001; SHELDON, SCHOEVAART e VAN LANGEN, 2005).

Uma vez que a agregação seguida de precipitação é um dos métodos mais frequentemente utilizados em etapas iniciais de processos de purificação de proteínas, a preparação de CLEAs, portanto, não exige uma preparação enzimática altamente purificada e nem a laboriosa etapa de cristalização observada na preparação de CLECs. Desta maneira virtualmente qualquer enzima, mesmo com diferentes graus de pureza, pode ser induzida a formar agregados físicos sob condições não desnaturantes (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003; SHELDON, SCHOEVAART e VAN LANGEN, 2005). Desta forma as desvantagens apresentadas pelos CLECs, como a necessidade de preparações enzimáticas altamente puras e a laboriosa etapa de otimização das condições de cristalização podem ser facilmente contornadas na preparação de CLEAs.

Como principais vantagens de CLEAs em comparação com CLECs podemos citar: CLEAs dispensam a necessidade de utilizar preparações enzimáticas de elevada pureza; este método combina purificação e imobilização em uma única etapa; o procedimento é extremamente simples, rápido e barato; CLEAs, assim como CLECs, são derivados enzimáticos formados por quase 100% de proteína conduzindo a altas atividades volumétricas (CAO *et al.*, 2001; CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003); O método permite a co-agregação de enzimas com qualquer outra macromolécula (WILSON *et al.*, 2004a); é possível estabilizar a estrutura quaternária de enzimas multiméricas de uma maneira superior a aquela alcançada com a imobilização em suportes insolúveis (WILSON *et al.* 2004b); permite a co-imobilização de enzimas para reações em cascata formando os chamados Combi-CLEAs (DALAL, KAPOOR e GUPTA, 2007).

De forma interessante, foi verificado que o comportamento de CLEAs difere em função das propriedades dos agentes precipitantes utilizados e também da presença de determinados aditivos que causam mudanças conformacionais que são então “congeladas” por ação dos agentes entrecruzantes. CLEAs de penicilina G acilase precipitados empregando sulfato de amônio apresentam comportamento similar ao observado para a enzima livre na síntese de ampicilina, enquanto os CLEAs preparados utilizando terc-butanol como precipitante apresentam seletividade constante durante o curso da reação (CAO, VAN RANTWIJK e SHELDON, 2000). Wilson *et al.* (2004a) desenvolveram um CLEA co-precipitado com sulfato de dextrana contendo grupos aldeído chamado de CLEA-GDP que quando comparado com CLEA entrecruzado utilizando glutaraldeído (CLEA-G) demonstrou

significativo aumento na estabilidade frente a solventes orgânicos graças a formação de um ambiente mais hidrofílico. Seguindo este conceito CLEAs de várias lipases (*Candida antártica* lipase A (CAL-A), *Candida antártica* lipase B (CAL-B) e *Candida rugosa* lipase (CRL) foram preparadas com alta retenção da atividade variando a concentração e o tipo de precipitante ou utilizando aditivos como dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X, ou éteres de coroa (LOPEZ-SERRANO, *et al.* 2002).

Os principais fatores que dificultam as aplicações industriais de CLEAs não são suas propriedades catalíticas e sim suas propriedades não catalíticas, pois eles são usualmente muito pequenos e possuem baixa estabilidade mecânica, o que torna difícil seu manuseio e recuperação (WILSON, *et al.*, 2004a). Essas características são especialmente problemáticas quando eles são aplicados em sistemas reacionais heterogêneos, no qual grandes partículas de enzimas imobilizadas (partículas geralmente maiores que 100 μm) são frequentemente escolhidas por facilitarem a separação através de processos de filtração e centrifugação. Assim, a recuperação de CLEAs por filtração é mais eficiente se estes são maiores, no entanto quanto maior forem as partículas maiores também serão os efeitos difusionais apresentados pelo derivado, que causará diminuição na velocidade aparente da reação, quando comparada com a obtida com partículas menores (CAO, VAN LANGEN e SHELDON, 2003; GIORDANO *et al.*, 2000).

Wilson *et al.* (2004c) encapsularam CLEAs de PGA em partículas de álcool polivinílico conhecidas como LentiKats com o objetivo de melhorar as características mecânicas do derivado e facilitar sua recuperação. O encapsulamento diminuiu a atividade do derivado em 40%, considerando as possíveis limitações difusionais criadas, porém obteve-se aumento na estabilidade frente a solventes orgânicos no microambiente altamente hidrofílico criado no interior da partícula.

Os efeitos de transferência de massa na velocidade da reação catalisada por enzima imobilizada são fenômenos importantes que precisam ser claramente compreendidos e levados em conta ao se estudar sistemas heterogêneos. A eliminação do efeito difusivo intra-partícula requer diminuir o tempo de percurso dentro dos poros do catalisador ou diminuir a relação entre velocidade de reação e velocidade de difusão. Isso pode ser obtido ou diminuindo o diâmetro da partícula ou diminuindo a carga de enzima imobilizada. (GIORDANO *et al.*, 2000).

Experimentos típicos para confirmação da presença ou ausência de limitação difusional intra-partícula na medida da atividade da enzima são as determinações das velocidades iniciais da reação ou atividades da enzima (velocidades iniciais/concentração da

enzima), para derivados com uma mesma alta carga imobilizada, mas com diferentes diâmetros de partícula (GIORDANO *et al.*, 2000).

Outro tipo de experimento é a comparação entre velocidade da enzima imobilizada com a da enzima livre, em diferentes temperaturas. Sabe-se que a velocidade de reação aumenta exponencialmente com a temperatura. A velocidade de difusão também aumenta, mas linearmente. Assim, para um mesmo degrau de aumento de temperatura, a relação entre velocidade de reação e velocidade de difusão aumenta, devendo se esperar aumento do efeito difusivo e, portanto, diminuição entre velocidade medida para enzima imobilizada/velocidade com enzima livre (GIORDANO *et al.*, 2000).

Em estudos preliminares realizados no DEQ-UFSCar, foi possível observar que as partículas de CLEAs formam suspensões estáveis que são difíceis de recuperar através de métodos tradicionais de separação como centrifugação e filtração mesmo em meios de baixa viscosidade e sem outros sólidos em suspensão. Outros autores têm reportado dificuldades similares na recuperação de CLEAs (PCHELINTSEV *et al.*, 2009; SHELDON, SCHOEVAART e VAN LANGEN, 2005).

Para superar os problemas de recuperação verificados em CLEAS foi desenvolvido um novo método de imobilização de enzimas livre de suporte que combina a metodologia de obtenção de CLEAS com separação magnética. Esta etapa do trabalho descreve a síntese de agregados enzimáticos livres de suporte com propriedades magnéticas chamados de M-CLEAs (magnetic cross-linked enzymes aggregates). M-CLEAs foram obtidos através da co-agregação entre uma enzima modelo, a penicilina G acilase - PGA e etiquetas superparamagnéticas constituídas de nano-partículas superparamagnéticas de óxido de ferro – SPION (do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) recobertas com uma fina camada de sílica e ativadas com grupos amino (NH_3^+). A PGA foi escolhida como enzima modelo uma vez que se trata da enzima mais estudada na preparação de CLEAs (CAO, VAN RANTWIJK e SHELDON, 2000; PCHELINTSEV, YOUSKO e SVEDAS, 2006; PCHELINTSEV *et al.*, 2009; MATTEO *et al.*, 2004; SHAH, SHARMA e GUPTA, 2006; RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2007; WILSON *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2009). As propriedades catalíticas e morfológicas de M-CLEAs e CLEAs de PGA preparadas utilizando metodologias similares foram extensivamente estudadas. A eficiência de recuperação magnética de M-CLEAs e a performance deste derivado na hidrólise de penicilina G também foram avaliadas.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Materiais

Na síntese e funcionalização de amino-SPION foram empregados os seguintes reagentes: brometo de ferro (II) e (III), aminopropiltriétoxissilano (APTES) e metanol, todos adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. A PGA de *Escherichia coli* empregada neste trabalho é um produto da Antibióticos S/A (Leon, Espanha) que foi doada pelo Prof. Jose M. Guisán (*Instituto de Catálisis y Petroleoquímica*, Madrid, Spain), a solução estoque de enzima empregada neste trabalho apresentava 120 UI (unidades internacionais) e 26 miligramas de proteína por mL de solução. Para a síntese de M-CLEAs e CLEAs, bem como para avaliação de suas propriedades foram empregados os reagentes dimetoxietano (DME) (Fluka), álcool tec-butílico (TBA) (Vetec), polietilenoglicol 600 (PEG) (Synth), glutaraldeído 25% (m/m) (Vetec), borohidreto de sódio (Vetec), “6-nitro-3(phenylacetamido) benzoic acid” (NIPAB) (Sigma-Aldrich), penicilina G potássica - PG (doada pela Prodotti Laboratório Farmacêutico Ltda), p-dimetilbenzaldeído (PDAB) (Sigma-Aldrich), albumina de soro bovino fração 5 (BSA) (Sigma-Aldrich) e metanol (J. T. Baker).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Síntese e Funcionalização de Amino-SPION

A síntese e a funcionalização das nano-partículas de óxido de ferro recobertas com grupos amino (amino-SPION) empregadas nesta etapa do trabalho foi realizada através da metodologia desenvolvida por Marques *et. al.* (2007) e refinada por Bini *et al.* (2012). SPION foi sintetizado utilizando um método de sonoprecipitação empregando brometo de ferro II e brometo de ferro III como reagentes de partida. O recobrimento e a funcionalização de SPION foram realizados utilizando reações de hidrólise e condensação do organossilano APTES. SPIONs foram adicionados a uma solução aquosa contendo APTES e etanol e refluxados a 125 °C por duas horas. As amostras foram então recuperadas magneticamente e lavadas várias vezes com água deionizada, por fim o amino-SPION foi re-suspendido em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 e armazenado até o uso.

3.2.2.2 Caracterização de Amino-SPION

Micrografias eletrônicas de transmissão (MET) foram realizadas empregando um microscópio Philips CM 120. Suspensões de amino-SPION em água e álcool isopropílico foram gotejadas sobre porta-amostras recobertos com fita de carbono e secas a temperatura ambiente em dessecador. Análises de difração de raios-X (DRX) foram efetuadas em um difratômetro Philips modelo PW 3040/60 operando com radiação Cu K α . Análises de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR) foram realizadas na faixa de 4000-400 cm⁻¹ empregando um aparelho da Nicolet Instruments Corporation.

3.2.2.3 Obtenção de M-CLEAs

M-CLEAs foram preparados através da adição de 16 mL de precipitante (dimetoxietano, *tert*-butanol ou polietileno glicol 600) a uma solução contendo PGA (40 mg de proteína) e amino-SPION (40 mg de massa seca) em tampão fosfato 100 mM pH 7.0. Imediatamente após a adição do precipitante, glutaraldeído 25% (v/v) foi adicionado a solução gerando uma concentração final de 25 mM, 75 mM ou 150 mM. A reação foi conduzida em reator encamisado com agitação mecânica a 2 °C. Após 3 horas o volume do meio reacional foi dobrado através da adição de tampão bicarbonato 200 mM pH 10.0 e mantido sob agitação por 30 minutos então foram adicionados 25 mg de boroidreto de sódio, a solução foi deixada para reagir por mais 30 minutos. Finalmente as partículas de M-CLEAs foram recuperadas do meio reacional através da aplicação de um campo magnético externo, lavadas várias vezes com tampão fosfato 100 mM pH 7.0 e re-suspendidas neste mesmo tampão. A atividade recuperada ao final do processo de imobilização ($R\%$) foi calculada empregando a equação 3.1:

$$R\% = \left(\frac{At_d}{At_i} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

Onde At_i é a atividade total medida na solução de imobilização antes da adição do precipitante e At_d é a atividade total medida no derivado ao final do processo e imobilização.

3.2.2.4 Obtenção de CLEAs

CLEAs foram preparados como referência empregando as mesmas condições reacionais usadas na obtenção de M-CLEAs, 16 mL de precipitante foram adicionados a 8 mL de uma solução de PGA contendo 80 mg de proteína em tampão fosfato 100 mM pH 7.0. Glutaraldeído 25% foi adicionado logo após a adição do precipitante para uma concentração final de 25 mM. A solução foi mantida sob agitação por 3 horas a 2 °C, então o volume racional foi duplicado através da adição de tampão bicarbonato 200 mM pH 10.0. Após 30 minutos 25 mg de boroidreto de sódio foram adicionados e a reação foi conduzida por mais 30 minutos. As partículas de CLEAs foram recuperadas por filtração empregando papel filtro Whatman nº 5, lavadas várias vezes com tampão fosfato 100 mM pH 7.0 e re-suspendidas neste mesmo tampão. A atividade recuperada para CLEAs foi calculada empregando a equação 3.1:

3.2.2.5 Medida de Atividade de PGA

A atividade hidrolítica de PGA foi medida espectrofotometricamente empregando o substrato sintético “6-nitro-3(phenylacetamido) benzoic acid” (NIPAB) e o substrato natural penicilina G (PG). Uma unidade de atividade NIPAB foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol of NIPAB para “5-amino-2-nitrobenzoic acid” (NABA) por minuto em pH 7.5 e temperatura de 25 °C. A formação do NABA foi medida a 405 nm (o coeficiente de extinção molar para o NABA é $9.09 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A hidrólise de PG foi monitorada por método colorimétrico empregando paradimetilbenzaldeído (PDAB). O produto da hidrólise de PG 4% (m/v) em tampão fosfato 0.1 M pH 8.0 a 37 °C, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), reage com PDAB gerando um composto colorido que absorve luz fortemente a 415 nm. Uma unidade internacional UI corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de PG (4% m/v) por minuto a pH 8.0 e 37 °C.

3.2.2.6 Medidas de Proteínas Totais

A concentração de proteínas foi medida empregando o método de Bradford (1976), 25 μL de solução contendo proteína foram adicionados a 1 mL de reagente de Bradford. Após 5 minutos a solução resultante foi medida em espectrofotômetro a 595 nm, a concentração de

proteínas foi calculada a partir da absorbância obtida empregando uma curva de calibração previamente preparada usando albumina de soro bovino fração V como padrão.

3.2.2.7 Medidas de Estabilidade Térmica

Soluções contendo M-CLEAs, CLEAs ou enzima livre foram encubadas a 55 °C em tampão fosfato 100 mM pH 7.0, alíquotas foram retiradas e a atividade residual (A_r) foi medida em função do tempo. O tempo de meia vida foi considerado o tempo necessário (em horas) para que as amostras alcançassem 50% de sua atividade inicial.

3.2.2.8 Medidas de Estabilidade em Metanol 50%

M-CLEAs, CLEAs ou enzima livre foram incubados em uma solução contendo tampão fosfato 300 mM pH 6.5 e metanol em uma relação 1:1 (v/v). Alíquotas foram retiradas e A_r medido em função do tempo. O tempo de meia vida, em horas, foi considerado o tempo necessário para a solução contendo o biocatalisador alcançar 50% de sua atividade inicial nas condições do processo.

3.2.2.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X (EDS) no Modo “Line-Scan”

A morfologia de M-CLEAs e CLEAs foi investigada empregando microscópio eletrônico Philips XL30 FEG operando a 25 kV. Amostras, apropriadamente diluídas, foram dispersas em água e cerca de 2-3 gotas da suspensão foram depositadas sobre porta amostras de alumínio e metalizadas com ouro após secagem lenta a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas em diferentes ampliações. A distribuição de diâmetro de partículas foi calculada através de análise de imagens empregando o software ImageJ. A análise de EDS no modo “line-scan” foi executada empregando o mesmo equipamento através de um detector Oxford Tetra Link.

3.2.2.10 Experimentos de Recuperação Magnética

Um frasco de vidro contendo 10 mL de uma solução de M-CLEA-TBA-G150 foi colocado sob um magneto N35 NdFeB (22 mm de diâmetro x 20 mm de espessura). A

velocidade de recuperação da amostra foi monitorada com respeito ao tempo através da medida da atividade enzimática (NIPAB). A atividade foi medida em dois diferentes pontos, a 2.0 cm da superfície do magneto e a 1.0 cm da superfície do magneto. O campo magnético no centro do frasco foi de aproximadamente 0.11 Tesla a 2.0 cm da superfície do magneto e 0.51 Tesla a 1.0 cm da superfície do magneto. A velocidade de recuperação dos agregados foi expressa em termos de atividade residual (A_r). Com o objetivo de verificar a estabilidade da suspensão em respeito ao campo magnético da terra um frasco de referência foi preparado e deixado longe do campo magnético e da mesma forma amostras foram retiradas em função do tempo.

3.2.2.11 Experimento de Hidrólise de PG

Em um reator encamisado agitado mecanicamente contendo 7 mL de uma solução de PG potássica 5% foi adicionada uma determinada massa de derivado M-CLEA-TBA-G150 contendo 1.6 UI de atividade. A reação foi conduzida a 37 °C por 600 minutos e o pH foi continuamente ajustado para 8.0 através da adição de alíquotas de NaOH 1M empregando um pHstato Titrino modelo 718 (Metrohm AG). A hidrólise de PG foi monitorada através de titulação dos grupos H^+ liberados no decorrer da reação. Após o ciclo de hidrólise de PG o derivado M-CLEA-TBA-G150 foi recuperado magneticamente, lavado uma vez com água destilada e 1 vez com solução de PG 5%, a reação foi então reiniciada. Com finalidade de comparação a hidrólise de PG empregando PGA livre (1.6 UI) foi realizada nas mesmas condições reacionais empregadas no experimento usando enzima imobilizada.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Amino-SPION Síntese e Funcionalização

Nano-partículas de óxido de ferro ativadas com grupos amino (amino-SPION) foram preparadas empregando um método desenvolvido por Marques *et al.* (2007). Neste método SPIONs foram obtidos empregando a técnica de sono-precipitação usando brometo de ferro II e III como reagentes de partida. SPION foi então funcionalizado empregando reações de hidrólise e condensação de APTES em um meio reacional composto por etanol e água. A Figura 3.2 mostra a imagem obtida para o amino-SPION usando microscopia eletrônica de transmissão. Nesta imagem é possível verificar que as amostras apresentam morfologia esferoidal com diâmetro aproximado de 10 nm. A Figura 3.3 mostra as análises de difração de raios-X para a amostra de SPION não funcionalizado (Figura 3.3a) e as posições teóricas para as fases cristalinas do óxido de ferro magnetita (Fe_3O_4) (Figura 3.3b, incluída para comparação). O tamanho médio de partículas foi calculado através do alargamento dos picos de difração empregando a equação de Scherer (LANGFORD e WILSON, 1978), o tamanho aproximado calculado para SPION foi de 11.6 nm, concordando com o tamanho estimado através da análise das imagens de MET.

Figura 3.2 – Imagens de MET de amino-SPION. É possível verificar que as nano-partículas apresentam morfologia esferoidal e uniforme, com uma estreita distribuição de tamanho.

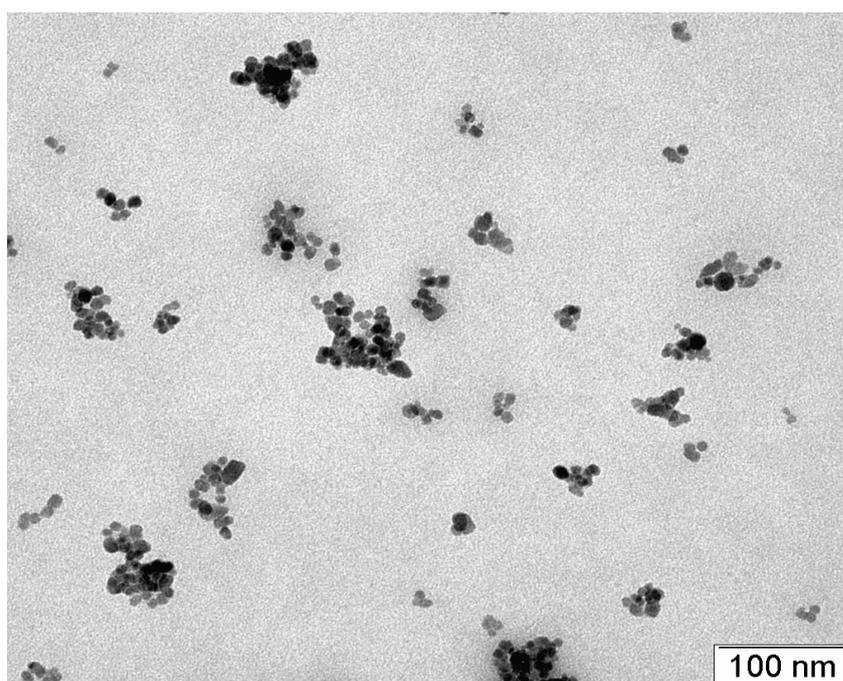
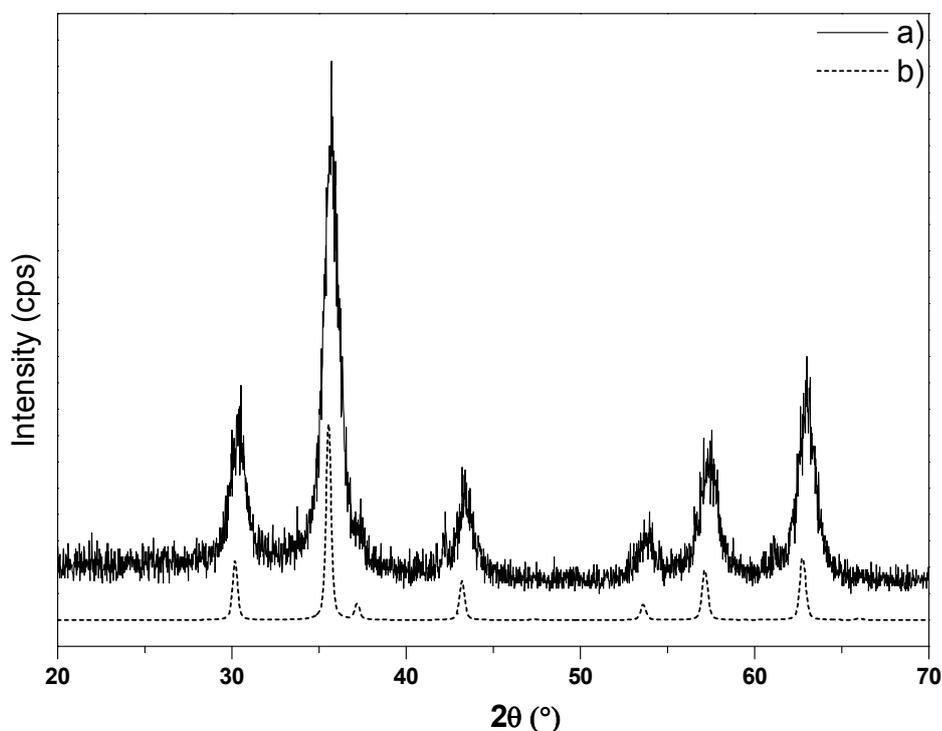


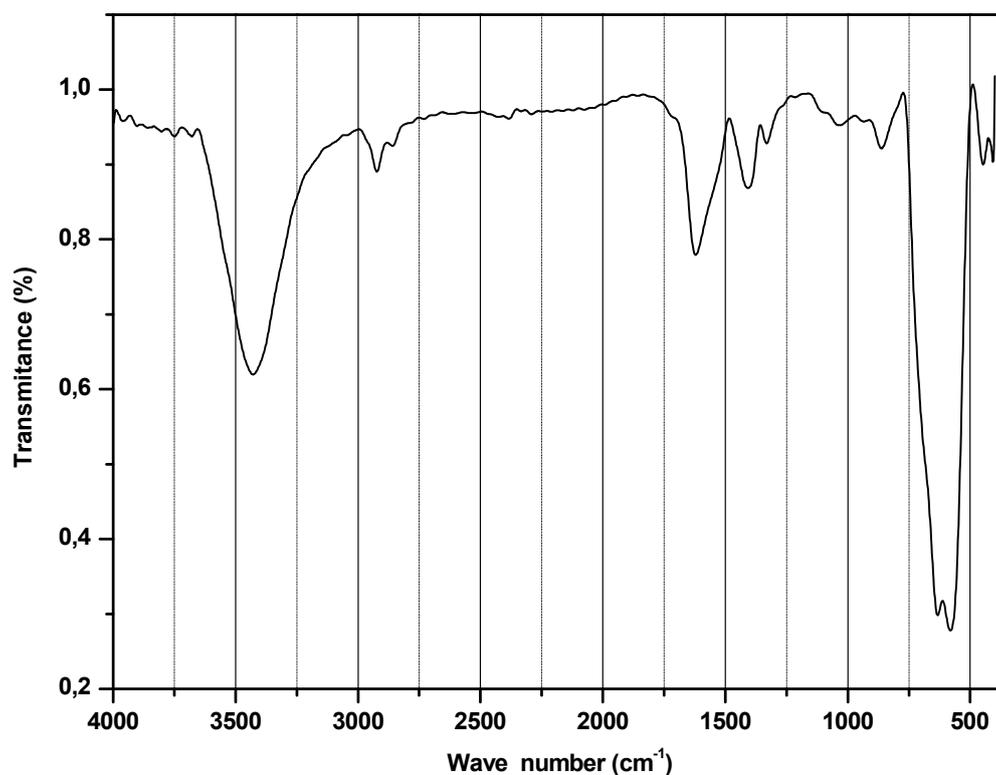
Figura 3.3 – Análises de DRX de SPION (a) e posições teóricas para as fases da magnetita (Fe_3O_4) (b).



A Figura 3.4 apresenta as análises de FT-IR para amino-SPION. Bandas referentes às ligações Fe-O correspondentes às frequências ν_1 e ν_2 , características da magnetita, podem ser visualizadas em 570 e 375 cm^{-1} , respectivamente. Quando o tamanho das partículas de magnetita torna-se nanométrico estas frequências são alteradas para comprimentos de onda maiores (YAMAMURA *et al.*, 2004; SMITH, 1985). Desta forma, as duas bandas verificadas em 632 e 580 cm^{-1} resultam do aumento nas frequências de absorção para as frequências ν_1 e ν_2 da magnetita. As fortes bandas de absorção verificadas a 1100 e 1035 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento das ligações Si-O-Si dos grupos siloxanos (WHITE e TRIPP, 2000). As bandas localizadas a 938 e a 864 cm^{-1} são atribuídas as vibrações de estiramento da ligação Si-O presente no grupo Si-O-OH (WHITE e TRIPP, 2000), já as bandas localizadas a 2921 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} podem ser atribuídas ao modo de estiramento do grupo propil presente na molécula de APTES. A banda localizada a 1330 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação C-N relativa ao grupo amino primário presente na molécula de APTES (WHITE e TRIPP, 2000). Os dados de FT-IR confirmam o recobrimento de SPION com APTES.

O método de sono-precipitação empregado para a síntese de SPION e o método de recobrimento com APTES permite a síntese de amino-SPION com propriedades superparamagnéticas. O gráfico de $M \times H$ de amino-SPION (300 k) exibe típico comportamento superparamagnético (histerese, coercividade ou remanescência magnética não foram detectadas) além de alta magnetização de saturação (68 emu.g^{-1}) (BINI *et al.*, 2012). Além das excelentes propriedades magnéticas apresentadas pelo amino-SPION, seu tamanho encontra-se na mesma faixa das proteínas ($\sim 11 \text{ nm}$). O recobrimento com APTES conferiu ao amino-SPION alta densidade de grupos amino em sua superfície (8.7 nmol/g) além de pKa de 10.05 (resultado obtido através de medidas de potencial zeta) (Bini *et al.*, 2012), o mesmo pKa dos grupos amino das lisinas. Estas características fazem deste material um candidato ideal para experimentos de co-agregação com proteínas.

Figura 3.4 – Análise de FT-IR para amino-SPION.



3.3.2 Síntese de M-CLEAs

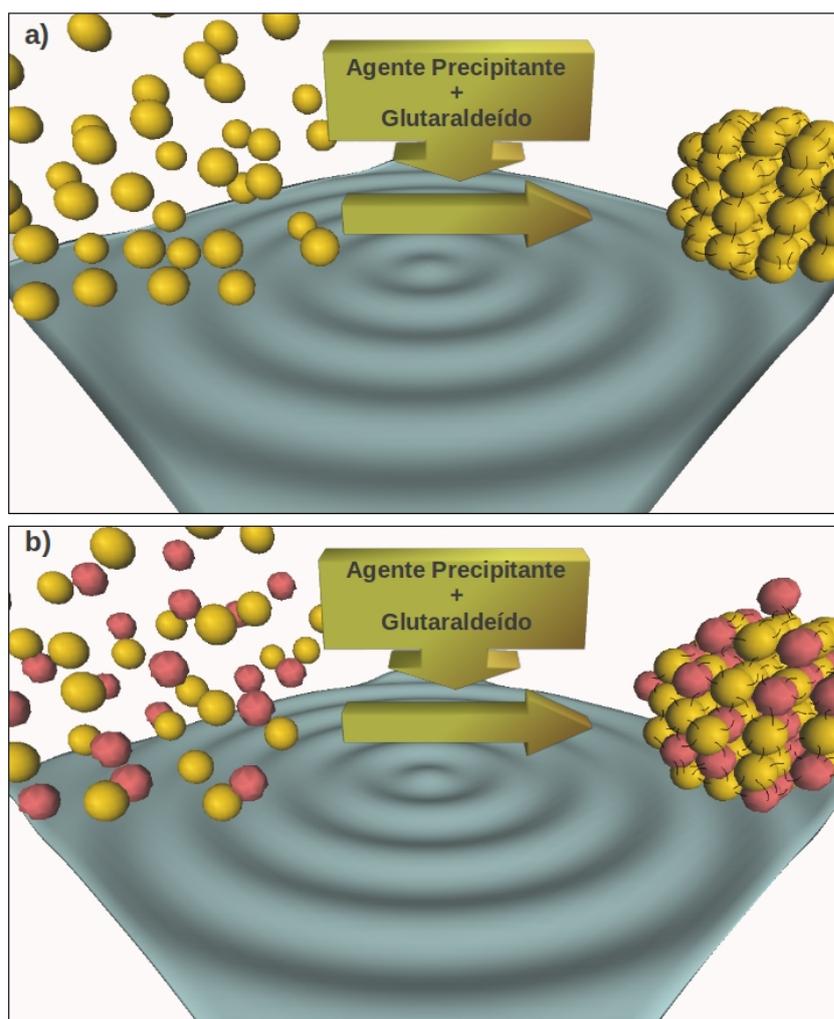
Para testar o conceito de que etiquetas superparamagnéticas (amino-SPION), propriamente ativadas com grupos funcionais, podem formar agregados cataliticamente ativos com proteínas permitindo a manipulação do derivado através da aplicação de um campo magnético externo, optamos por empregar PGA como enzima modelo. A PGA é uma enzima versátil capaz de hidrolisar seletivamente PG gerando 6-APA, bem como catalisar a acilação de 6-APA na síntese de antibióticos semi-sintéticos. Além disso, a PGA é a enzima mais extensivamente empregada na obtenção de CLEAs (CAO, VAN RANTWIJK e SHELDON, 2000; PCHELINTSEV, YOUSHKO e SVEDAS, 2006; PCHELINTSEV *et al.*, 2009; MATTEO *et al.*, 2004; SHAH, SHARMA e GUPTA, 2006; RAJENDHRAN e GUNASEKARAN, 2007; WILSON *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2009), estas características fazem da PGA um excelente modelo para a aplicação proposta neste trabalho.

M-CLEAs foram preparados usando três diferentes precipitantes, 2,2-dimetoxietano (DME), álcool tert-butilico (TBA) e polietileno glicol 600 (PEG). De maneira geral o precipitante era adicionado à solução contendo proteína e amino-SPION, em uma relação 1:1 (m/m). Imediatamente após a adição do precipitante glutaraldeído 25% era adicionado a solução rendendo uma concentração final de 25 mM. A solução resultante era mantida sob agitação a 2 °C por 3 horas, em seguida o pH da solução era aumentado para 10.0 empregando tampão bicarbonato. Depois de 30 minutos era então adicionado o reagente boroidreto de sódio. CLEAs referência foram preparados empregando as mesmas condições reacionais. Em todas as condições reacionais estudadas 100% de proteína e atividade enzimática foram precipitados (rendimento de imobilização de 100%), tanto para M-CLEAs quanto para CLEAs. A Figura 3.5 ilustra o procedimento geral de obtenção de M-CLEAs e CLEAs.

M-CLEAs obtidos em todas as condições reacionais empregadas foram recuperados a partir do meio reacional de forma rápida e eficiente através da aplicação de um campo magnético externo. Depois da remoção do campo magnético as partículas de M-CLEAs foram prontamente re-dispersadas em solução formando suspensões estáveis. CLEAs por sua vez formavam suspensões extremamente estáveis, como as observadas por Pchelintsev *et al.* (2009) para CLEAs de PGA, que foram extremamente difíceis de recuperar a partir do meio reacional. Inicialmente foi tentado empregar centrifugação a ~10000 xg para recuperação dos CLEAs, porém pequenos agregados ainda podiam ser visualizados e sua atividade podia ser

medida no sobrenadante, tendo isto em conta foi escolhido filtração como método para recuperação dos CLEAs. A filtração permitiu a recuperação completa dos agregados (não foi possível medir atividade enzimática no filtrado), mas após o processo os agregados uniam-se formando “clusters” grandes que, por sua vez, formavam suspensões instáveis.

Figura 3.5 – Esquema de obtenção de M-CLEAs (a) e CLEAs (b). Na imagem as esferas amarelas representam as proteínas e as esferas vermelhas representam o amino-SPION.



A Tabela 3.1 mostra a atividade recuperada ($R\%$) e a atividade específica obtidas para M-CLEAs e CLEAs preparados sob as mesmas condições reacionais. A atividade foi medida empregando dois métodos distintos, hidrólise do substrato natural PG e hidrólise do substrato sintético NIPAB. Interessantemente, enquanto resultados similares foram obtidos para M-CLEAs e CLEAs empregando hidrólise de PG resultados inferiores foram observados para CLEAs quando a atividade foi medida por NIPAB. A medida de atividade empregando NIPAB foi realizada em uma cubeta com sistema de agitação e controle de temperatura, o

produto da reação, o NABA, foi medido em tempo real através do aumento da absorbância a 405 nm. A rápida e prontamente mensurável hidrólise do NIPAB combinada com um sistema de agitação ineficiente tornam as limitações de transferência de massa mais evidentes neste sistema, resultados similares foram obtidos para a hidrólise do substrato sintético p-nitrofenil propionato por CLEAs de lipase de *Candida antarctica* B (SHELDON *et al.*, 2005) que possuíam “clusters” grandes. Desta maneira é possível presumir que o aumento no tamanho de partículas causado pelo processo de filtração afeta consideravelmente o desempenho dos CLEAs na hidrólise de NIPAB.

Tabela 3.1 – Resultados de atividade recuperada ($R\%$) e atividade específica para M-CLEAs e CLEAs. Os resultados são apresentados para os dois métodos de medida de atividade empregados neste trabalho, NIPAB e PDAB (hidrólise de PG).

Amostras	$R_{NIPAB}(\%)$	$R_{PDAB}(\%)$	U/g _{NIPAB}	IU/g _{PDAB}
CLEA-DME*	9.0 (+/- 1.0)	32.9 (+/- 4.1)	561 (+/- 73)	8468 (+/- 504)
M-CLEA-DME*	35.2 (+/- 2.8)	34.5 (+/- 1.6)	1382 (+/- 82)	3153 (+/- 258)
CLEA-TBA*	8.0 (+/- 2.4)	41.7 (+/- 2.7)	410 (+/- 72)	8253 (+/- 164)
M-CLEA-TBA*	43.5 (+/- 4.6)	47.9 (+/- 3.1)	1441 (+/- 161)	3910 (+/- 259)
CLEA-PEG*	7.1 (+/- 3.3)	45.8 (+/- 5.0)	696 (+/- 154)	6651 (+/- 777)
M-CLEA-PEG*	42.4 (+/- 2.0)	49.1 (+/- 3.2)	1488 (+/- 107)	4782 (+/- 287)
M-CLEA-TBA-G75	38.3 (+/- 0.3)	38.5 (+/- 0.9)	1444 (+/- 47)	3776 (+/- 52)
M-CLEA-TBA-G150	31.4 (+/- 0.9)	34.0 (+/- 0.7)	1268 (+/- 80)	3728 (+/- 109)

*Amostras entrecruzadas empregando concentração de glutaraldeído de 25 mM.

Para verificar esta suposição realizamos um experimento simples onde os CLEAs eram macerados a 2 °C por duas horas em um moinho de bolas, a atividade enzimática na suspensão foi medida empregando NIPAB antes e depois do processo. Após o procedimento foi observado aumento na atividade enzimática de 3.4 vezes para o derivado CLEA-DME, 1.8 vezes para o derivado CLEA-TBA e 3.0 vezes para o derivado CLEA-PEG, estes resultados confirmam a presença de limitações de transferência de massa severas causadas pelo aumento no tamanho da partícula após o processo de filtração. É extensivamente descrito na literatura

que a diminuição no tamanho de partícula de suportes porosos minimiza efeitos de difusão (GIORDANO, GIORDANO e COONEY, 2000), por outro lado suportes com tamanho de partícula muito pequenos são difíceis de recuperar por métodos clássicos.

Com o objetivo de fazer uma melhor avaliação dos efeitos de transferência de massa observados, as atividades iniciais dos derivados M-CLEA-PEG e CLEA-PEG (antes e depois da quebra dos “clusters” por maceração) e da enzima livre foram avaliadas a 6 e 25 °C pelo método de NIPAB. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3.2. A atividade da enzima livre a 25 °C foi 2.15 vezes maior que a 6 °C, enquanto a atividade do derivado M-CLEA-PEG foi 1.91 vezes maior. A atividade dos “clusters” de CLEA-PEG foi somente 1.12 vezes maior, após o processo de maceração o derivado CLEA-PEG apresentou atividade 1.77 vezes maior a 25 °C que a 6 °C. A relação entre a atividade enzimática a 25 e 6 °C obtida para o derivado M-CLEA-PEG (1.91) foi próxima a observada para a enzima livre (2.15), indicando menores efeitos de limitação de transferência de massa. CLEA-PEG, por sua vez, apresentou uma relação muito mais baixa (1.12), isto indica que severas limitações de transferência de massa estão presentes. A maceração do derivado CLEA-PEG, por outro lado, permitiu a redução nas limitações de transferência de massa do material (GIORDANO, GIORDANO e COONEY, 2000). Por meio destes resultados fica evidenciada a importância de um método rápido, fácil, eficiente e pouco evasivo para a recuperação de CLEAs com o objetivo de evitar a formação de “clusters” grandes que afetem o desempenho do derivado, a co-agregação de enzimas e amino-SPION parece ser uma boa alternativa para realizar esta tarefa.

Empregando o método de hidrólise de PG a atividade recuperada para M-CLEAs e CLEAs foi praticamente a mesma, os melhores resultados foram obtidos para o derivado M-CLEA-PEG (49.1%) e para o M-CLEA-TBA (47.9%), os piores resultados neste parâmetro foram observados para o derivado CLEA-DME (32.9%). Resultados similares de atividade recuperada foram obtidos por Cao *et al.* (2001) para CLEAs de PGA empregando TBA e PEG como precipitantes, por Shah *et al.* (2006) empregando DME e TBA e por Mateo *et al.* (2004) empregando DME. Na obtenção de M-CLEAs 50% da massa de proteínas foi substituída por amino-SPION, isso causou uma diluição da atividade específica na ordem de aproximadamente 50% para todos os M-CLEAs. Embora a atividade específica de M-CLEAs tenha diminuído em relação aos CLEAs, a atividade de M-CLEAs ainda permanece na mesma ordem de magnitude (Tabela 2.1). Valores similares de atividade recuperada e atividade específica (tendo em conta a diminuição na quantidade de enzima oferecida na imobilização) observadas para M-CLEAs e CLEAs sugere que não houve alteração significativa na

atividade hidrolítica de M-CLEAs em relação aos CLEAs preparados nas mesmas condições reacionais.

Suspensões estáveis de M-CLEAs e CLEAs foram preparadas para experimentos de avaliação da estabilidade térmica e estabilidade em metanol 50% (v/v). “Clusters” de CLEAs formados durante o processo de obtenção do derivado foram cuidadosamente macerados por 2 horas a 2 °C antes do início dos experimentos com o objetivo de diminuir efeitos de limitação de transferência de massa no derivado que poderiam mascarar os resultados. A Figura 3.6 mostra os resultados de estabilidade térmica para os derivados obtidos. M-CLEAs e CLEAs preparados empregando o mesmo precipitante apresentaram comportamentos similares nos experimentos de estabilidade térmica (55 °C e pH 7.0). M-CLEAs e CLEAs obtidos empregando DME e PEG apresentaram desempenho inferior ao observado para a enzima livre no início do experimento, porém todos os demais derivados apresentam um desempenho superior. Os melhores resultados foram observados para os agregados preparados empregando TBA como precipitante. M-CLEA-TBA e CLEA-TBA apresentaram incrementos em sua meia vida de 180% quando comparados com a enzima livre (Tabela 3.3).

Tabela 3.2 – Efeito da temperatura nas atividades (velocidades iniciais) da enzima livre, M-CLEA-PEG e CLEA-PEG.

	Atividade a 6 °C (U/mL*)	Atividade a 25 °C (U/mL*)	AET**
Enzima livre	0.331 (+/- 0.022)	0.712 (+/- 0.001)	2.15
M-CLEA-PEG	0.289 (+/- 0.007)	0.553 (+/- 0.016)	1.91
CLEA-PEG	0.197 (+/-0.006)	0.242 (+/- 0.015)	1.12
CLEA-PEG (macerado)	0.342 (+/- 0.019)	0.630 (+/- 0.001)	1.77

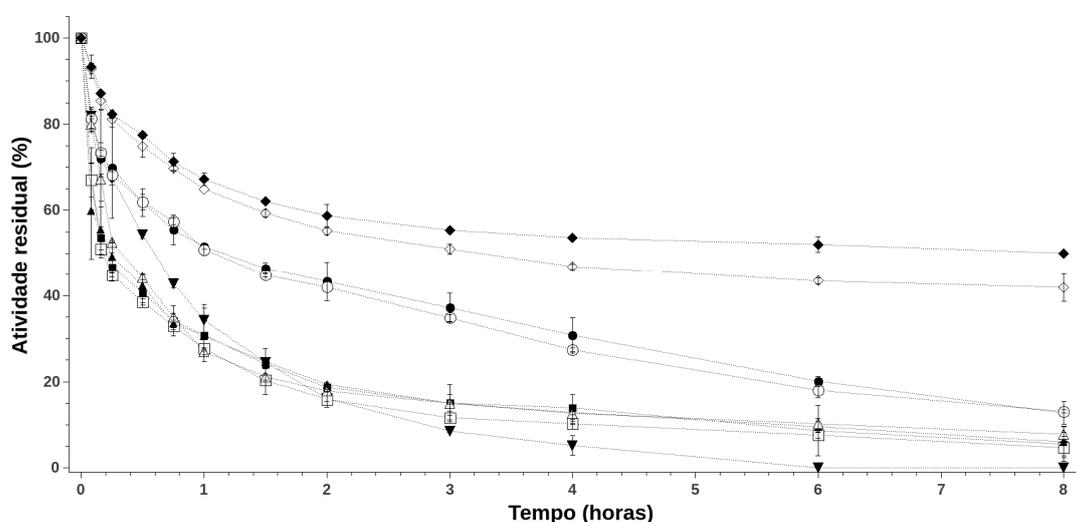
*As atividades foram medidas em triplicata empregando o método NIPAB padrão a 6 e 25 °C.

** AET – Efeito do aumento de temperatura na atividade enzimática: relação entre as atividades a 25 °C e 6 °C.

A produção de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos pode ser executada enzimaticamente empregando PGA para catalisar a união entre o anel β -lactâmico e um doador acil. Contudo hidrólises termodinamicamente favorecidas do antibiótico formado na reação e do doador acil necessitam ser minimizadas. A adição de co-solventes ao meio reacional como etileno glicol e metanol podem minimizar a hidrólise do produto e do doador

acil aumentando a seletividade da reação (FERNANDEZ-LAFUENTE, ROSELL e GUIÓSÁN, 1995). Apesar disso a adição de solventes ao meio reacional pode ocasionar perda e/ou inibição da atividade enzimática. Desta forma estabilidade e atividade em solventes orgânicos são características importantes para a implementação do uso de enzimas em reações de síntese orgânica.

Figura 3.6 – Estabilidade térmica para M-CLEAs e CLEAs. a) enzima livre (▼); b) CLEA-DME (■); c) M-CLEA-DME (□); d) CLEA-TBA (●); e) M-CLEA-TBA (○); f) CLEA-PEG (▲); M-CLEA-PEG (△); h) M-CLEA-TBA-G75 (◇); M-CLEA-TBA-G150 (◆). Os experimentos foram realizados em duplicata.



A Figura 3.7 mostra os resultados de estabilidade em metanol 50% para M-CLEAs e CLEAs (pH 6.5 e 25 °C). Nestas condições a enzima livre foi rapidamente desnaturada, não sendo possível observar atividade na solução após 45 minutos. Todos os M-CLEAs e CLEAs apresentaram incremento em sua estabilidade em metanol 50% quando comparados com a enzima livre, novamente resultados similares foram observados para M-CLEAs e CLEAs obtidos empregando o mesmo precipitante. O tempo de meia vida destes catalisadores pode ser observado na Tabela 3.3. Novamente os melhores resultados foram obtidos empregando TBA como agente precipitante. CLEA-TBA e M-CLEA-TBA apresentaram, respectivamente, incrementos em sua meia vida de 1690% e 1580% quando comparados com a enzima livre. Embora a síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos catalisados enzimaticamente empregando metanol como co-solvente tenha sido reportada em estudos prévios (FERNANDEZ-LAFUENTE, ROSELL e GUIÓSÁN, 1995; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1996; FERNANDEZ-LAFUENTE, ROSELL e GUIÓSÁN, 1998; CHOW *et al.*, 2007) a estabilidade da PGA neste solvente não foi sistematicamente estudada.

O aumento na estabilidade de M-CLEAs e CLEAs em metanol 50% pode ter sido ocasionado por dois fatores distintos, aumento na rigidez estrutural da PGA causado pelo entrecruzamento com glutaraldeído ou ainda pode ter ocorrido devido a efeitos de microambiente gerados no interior dos agregados. Enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água unida a sua estrutura para preservar sua atividade catalítica, contudo esta quantidade não tem relação direta com a quantidade de água presente no meio, mas sim com o número de moléculas de água unidas a estrutura da enzima (FARAZY *et al.*, 2009). Proteínas com superfícies hidrofílicas presentes como contaminante na solução de agregação e amino-SPION (no caso dos M-CLEAs) unidos na estrutura dos agregados juntamente com a PGA podem ter contribuído para preservar a camada de hidratação da enzima reduzindo efeitos negativos causados pela presença de metanol. Provavelmente o aumento na estabilidade dos agregados observada no experimento de estabilidade frente a metanol seja devido à ação conjunta destes dois fatores.

Figura 3.7 – Estabilidade em metanol 50% (v/v) para M-CLEAs e CLEAs. a) enzima livre (▼); b) CLEA-DME (■); c) M-CLEA-DME (□); d) M-CLEA-TBA (●); e) M-CLEA-TBA (○); f) CLEA-PEG (▲); M-CLEA-PEG (△); h) M-CLEA-TBA-G75 (◇); M-CLEA-TBA-G150 (◆). Os experimentos foram realizados em duplicata.

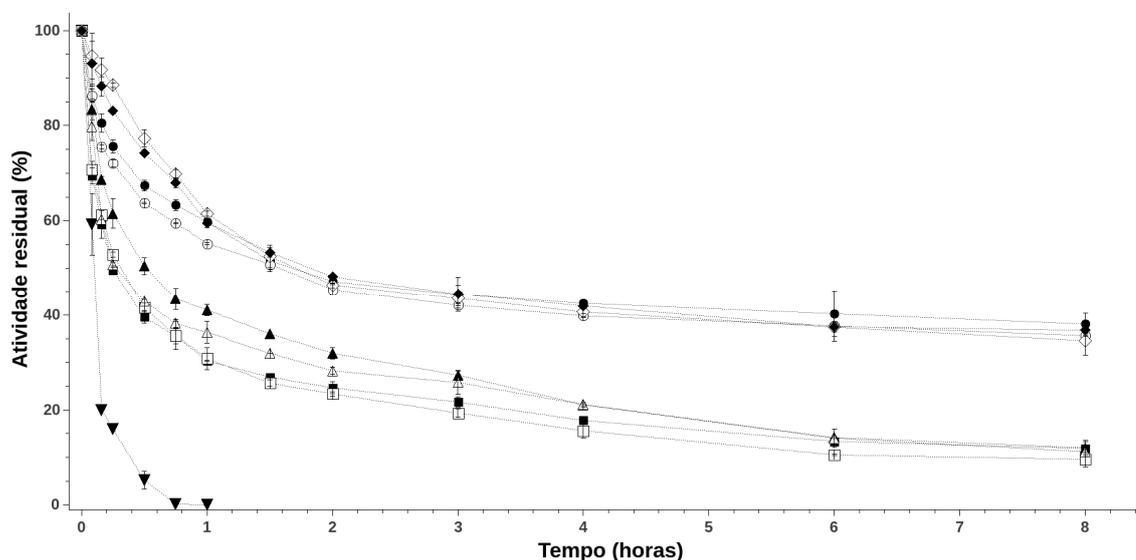


Tabela 3.3 – Resultados relativos de estabilidade térmica e em metanol 50% para M-CLEAs e CLEAs. A estabilidade relativa foi calculada através da comparação direta entre o tempo de meia vida da enzima livre, de M-CLEAs e CLEAs. Os experimentos foram realizados em duplicata.

	Estabilidade	Estabilidade em
Amostra	Térmica (%)	Metanol 50% (v/v)
CLEA-DME*	33%	280%
M-CLEA-DME*	33%	310%
CLEA-TBA*	183%	1690%
M-CLEA-TBA*	180%	1580%
CLEA-PEG*	40%	940%
M-CLEA-PEG*	55%	250%
M-CLEA-TBA-G75	533%	1710%
M-CLEA-TBA-G150	1333%	1830%

*Amostras entrecruzadas empregando concentração de glutaraldeído de 25 mM

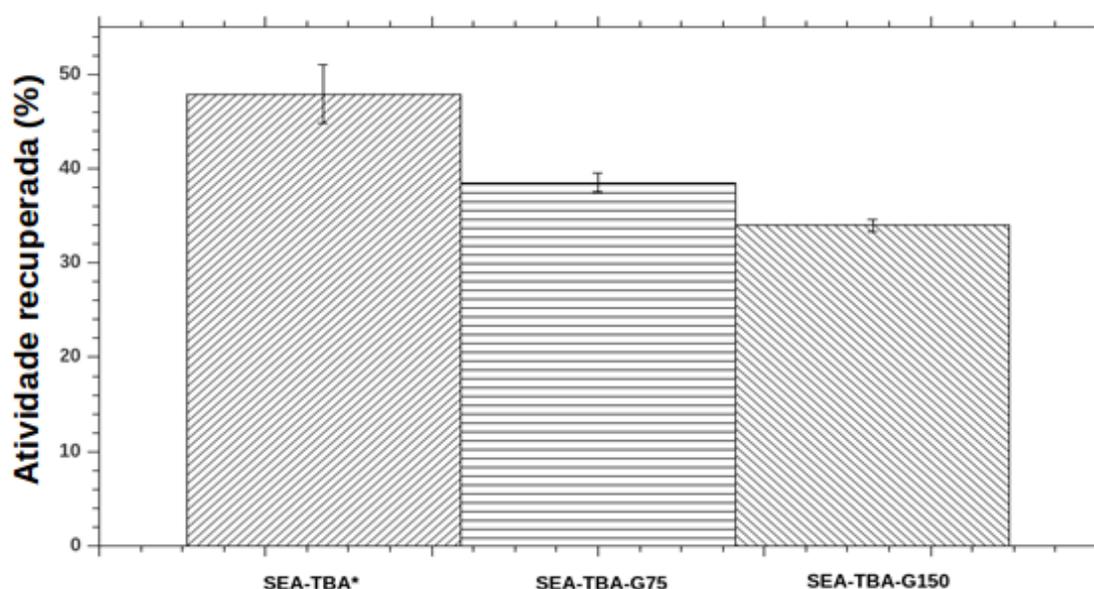
3.3.3 Efeito da Concentração de Glutaraldeído na Preparação de M-CLEAs

Glutaraldeído é geralmente o agente de entrecruzamento eleito para a preparação de CLEAs. A reação de entrecruzamento ocorre entre o grupo amino dos resíduos de lisina localizados na superfície da proteína ou o grupo N-terminal da molécula protéica e os grupos aldeído do glutaraldeído. Em CLEAs esta reação pode ocorrer entre lisinas de diferentes moléculas ou entre lisinas da mesma molécula. No caso de M-CLEAs podem ocorrer uniões proteína-proteína, amino-SPION-proteína ou amino-SPION-amino-SPION; uniões covalentes também podem ser formadas entre grupos lisina da mesma molécula de proteína ou grupos amino da mesma molécula de amino-SPION. Desta maneira o número de ligações cruzadas é uma variável chave que determina as características hidrolíticas e sintéticas dos agregados, além da sua estabilidade em diferentes condições.

Tendo em conta o desempenho superior apresentado pelo derivado M-CLEA-TBA, este foi eleito para verificação do efeito do aumento na concentração de glutaraldeído durante

a etapa de entrecruzamento nas propriedades finais dos derivados. A atividade recuperada alcançada para M-CLEAs-TBA preparados empregando concentração de glutaraldeído de 75 mM (M-CLEA-TBA-G75) e 150 mM (M-CLEA-TBA-G150) pode ser observada na Tabela 3.1 e na Figura 3.8. A atividade recuperada diminuiu quando a concentração de glutaraldeído aumentou, de 47.9% para 38.5% e 34% quando glutaraldeído 25 mM, 75 mM e 150 mM, respectivamente foram empregados na síntese dos derivados. Uma tendência similar foi observada para CLEAs de PGA empregando TBA como precipitante (WILSON *et al.*, 2009) e CLEAs da lipase de *Pseudomonas cepacia* preparados empregando acetona como precipitante (SHAH *et al.*, 2006).

Figura 3.8 – Histograma da atividade recuperada para M-CLEAs obtidos empregando TBA como agente precipitante e entrecruzados empregando glutaraldeído 25 mM (M-CLEA-TBA*), 75 mM (M-CLEA-TBA-G75) e 150 Mm (M-CLEA-TBA-G150). Os experimentos foram executados em duplicata.



A estabilidade térmica dos derivados M-CLEAs-TBA foi melhorada com o aumento da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de agregação, como pode ser observado na Figura 3.3 e na Tabela 3.3. Este resultado era esperado uma vez que o entrecruzamento com glutaraldeído pode aumentar a rigidez estrutural dos agregados, tornando-os menos susceptíveis a alterações conformacionais. Majumde *et al.* (2008) também observaram aumento significativo na estabilidade térmica de CLEAs de lipase com o aumento da

concentração de glutaraldeído empregada na etapa de entrecruzamento. Em contraste, para a estabilidade térmica não foi observado aumento significativo na estabilidade dos derivados M-CLEA-TBA-G75 e M-CLEA-TBA-G150 em metanol 50% em relação ao derivado entrecruzado com glutaraldeído 25 mM. Isto sugere que o principal fator na determinação da estabilidade de M-CLEAs em metanol é o efeito de microambiente gerado no processo de agregação.

3.3.4 Estrutura de M-CLEAs e CLEAs

O fato de agregados como M-CLEAs e CLEAs apresentarem, a princípio, estrutura aparentemente desorganizada não quer dizer que não possuam certo nível de organização. Na realidade é esperado que agregados de enzimas apresentem um nível considerável de organização estrutural, uma vez que são formados por proteínas com estrutura tridimensional constante e bem definida. Desta forma agregados de proteínas podem ser considerados superestruturas formadas através de interações supramoleculares que tem sua estrutura “congelada” por ação de um agente bifuncional ou polifuncional. A estrutura final dos agregados e suas propriedades catalíticas são dependentes de vários fatores como, por exemplo, concentração de proteínas; concentração de enzimas; características físicas químicas e morfológicas das proteínas presentes na solução de agregação e de suas concentrações relativas; precipitante empregado na etapa de agregação; pH do meio reacional; força iônica do meio reacional; presença e quantidade de aditivos (como o amino-SPION, por exemplo); natureza do agente entrecruzante e sua quantidade além de muitos outros fatores. Tendo em conta que a estrutura tridimensional das enzimas no agregado é “congelada” sob influencia de muitas variáveis, características únicas podem ser alcançadas através do controle das condições de agregação. Partindo do preceito que até mesmo proteínas contaminantes presentes na solução de imobilização são um fator determinante para as propriedades finais do agregado uma comparação direta de propriedades estruturais e catalíticas resulta em uma tarefa difícil.

A Figura 3.9 mostra as imagens de MEV obtidas para todas as amostras preparadas neste trabalho, é possível verificar grande diferença estrutural entre as amostras. O derivado CLEA-PEG apresenta partículas grandes que cobrem praticamente toda superfície do porta-amostra (Figura 3.9-c). Os agregados obtidos empregando TBA como agente precipitante apresentaram estrutura mais regular quando comparados com os agregados obtidos empregando outros agentes precipitantes. Na Figura 3.10 é possível verificar as diferenças

entre M-CLEAs e CLEAs preparados empregando TBA como precipitante. É evidente que o derivado CLEA-TBA possui estrutura mais definida quando comparado com M-CLEAs precipitados com TBA, no entanto é possível identificar determinados padrões estruturais em comum entre as amostras, esses padrões foram assinalados com quadrados brancos na Figura 3.10. É possível que a organização estrutural nos agregados obtidos empregando TBA tenha influencia na performance superior observada para os derivados obtidos empregando este precipitante, no entanto relacionar diretamente a estrutura com a performance de agregados é uma tarefa difícil. Estudos recentes conduzidos por Pchelintsev *et al.* (2009) demonstraram a existência de uma correlação entre morfologia e propriedades catalíticas de CLEAs de PGA e o tempo decorrido entre a etapa de precipitação e a etapa de entrecruzamento.

Figura 3.9 – Imagens de MEV para M-CLEAs e CLEAs. a) CLEA-DME; b) CLEA-TBA; c) CLEA-PEG; d) M-CLEA-DME; e) M-CLEA-TBA; f) M-CLEA-PEG, g) M-CLEA-TBA-G75, h) M-CLEA-TBA-G150. Figuras obtidas com um aumento de 2000x.

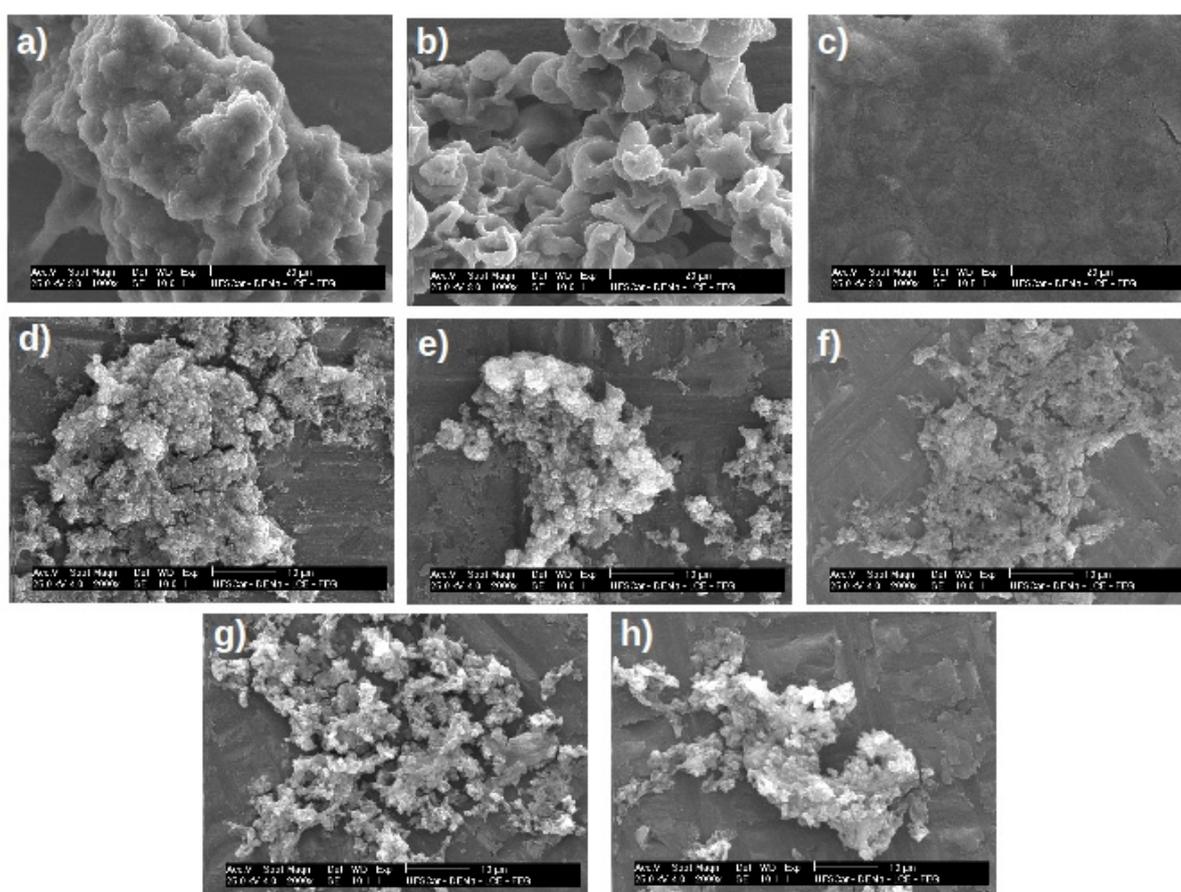
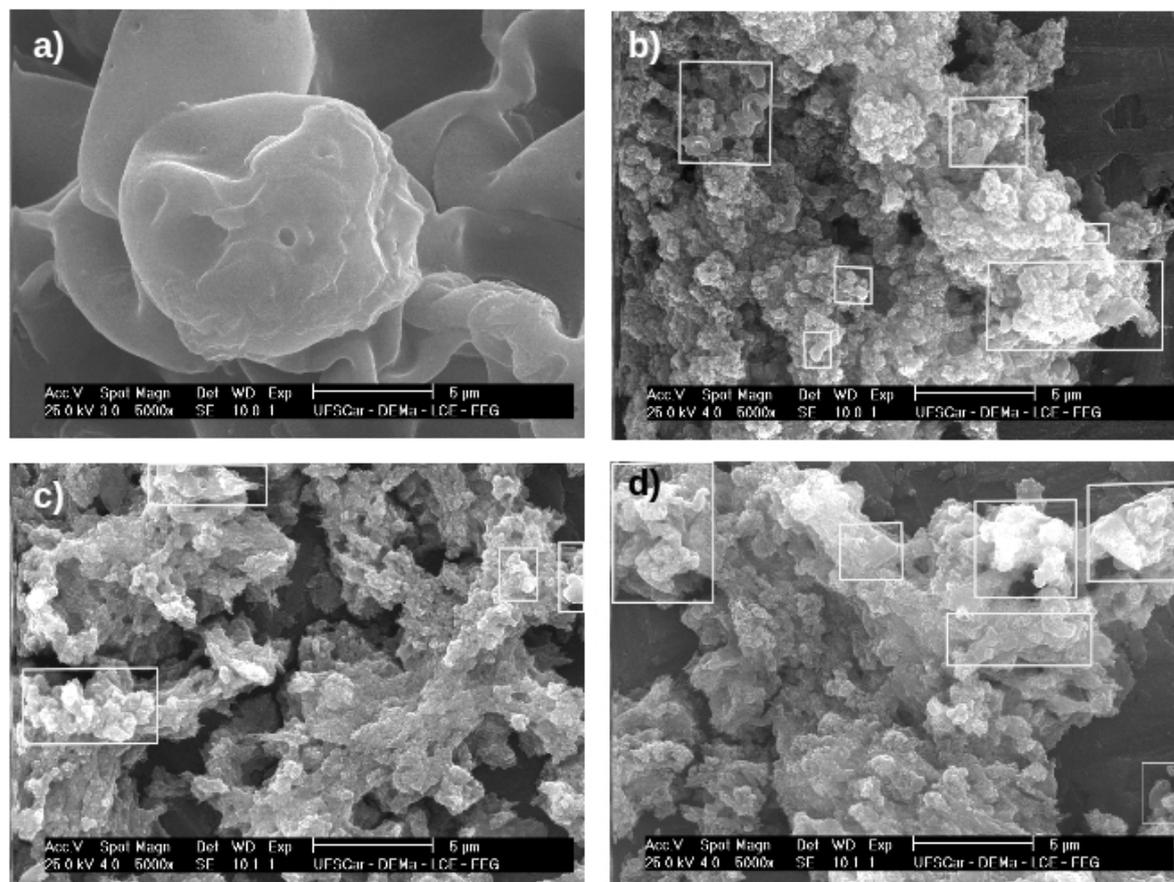


Figura 3.10 – Imagens de MEV de agregados obtidos empregando TBA como agente precipitante. a) CLEA-TBA; b) M-CLEA-TBA; c) M-CLEA-TBA-G75; d) M-CLEA-TBA-G150. Os quadrados brancos nas figuras mostram os padrões estruturais em comum entre M-CLEAs e CLEA-TBA. Figuras obtidas com aumento de 5000x.



3.3.5 Distribuição de Tamanho de Partícula

Os resultados inferiores obtidos para atividade específica e atividade recuperada para CLEAs, medidos empregando o método de hidrólise de NIPAB, em comparação com M-CLEAs obtidos empregando as mesmas condições reacionais sugerem significativo aumento nas limitações de transferência de massa para estes derivados. Subsequentemente demonstramos que o rompimento das partículas de CLEAs aumenta a atividade hidrolítica do derivado (hidrólise de NIPAB), indicando que CLEAs possuem tamanho de partícula superior ao observado para M-CLEAs. Para elucidar esta questão calculamos o diâmetro de partícula para todos os derivados sintetizados a partir de suas imagens obtidas por MEV. O diâmetro geométrico estatístico de Feret (MERKUS, 2009) foi calculado através da análise das imagens obtidas por MEV empregando o software ImageJ. O resultado da contagem de frequência

para o tamanho das partículas (agrupados em grupos com intervalos de 20 μm) pode ser observado na Figura 3.11. O diâmetro de partícula medido foi muito similar para M-CLEAs, independentemente do precipitante empregado, a maioria das partículas possuía menos de 20 μm . Não foram observadas partículas com mais de 90 μm para o derivado M-CLEA-DME e para o derivado M-CLEA-PEG, da mesma forma não foram observadas partículas com mais de 70 μm para o derivado M-CLEA-TBA.

Em contraste com M-CLEAs, CLEAs apresentam uma larga distribuição de tamanho de partículas, embora a maioria das partículas possua diâmetro inferior a 20 μm , assim como observado para M-CLEAs, foi possível encontrar partículas maiores que 600 μm para o derivado CLEA-DME, 650 μm para o derivado CLEA-TBA e 1800 μm para o derivado CLEA-PEG. A Figura 3.11-d mostra a distribuição de diâmetro de partículas para os derivados M-CLEA-TBA obtidos utilizando diferentes concentrações de glutaraldeído na etapa de entrecruzamento. Não foi observada alteração significativa no tamanho de partícula das amostras com o aumento da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de entrecruzamento, em contraste com os resultados observados para CLEAs de lipase de *Candida rugosa* (YU *et al.*, 2006) que apresentaram considerável aumento no tamanho de partículas dos agregados com o aumento da concentração de glutaraldeído empregada.

Quando se avalia o tamanho de partícula de agregados é importante considerar que o número de enzimas no agregado varia de acordo com o volume de partícula e não com o diâmetro. Desta forma embora a maioria das partículas de CLEAs apresente tamanho inferior a 20 μm , as partículas grandes observadas nas imagens de MEV contém uma quantidade significativa de enzimas. O gráfico de log do diâmetro de partículas ($\log(Pd_{\mu\text{m}})$) versus o volume relativo de partículas mostrado na Figura 3.12 exemplifica mais claramente este fato. Neste gráfico é possível observar que as partículas maiores concentram parte significativa das enzimas para todos os derivados, porém isto é mais significativo para CLEAs, estes concentram uma grande quantidade de enzimas em um pequeno número de partículas. O derivado CLEA-PEG foi o que apresentou partículas com maior volume, as curvas obtidas para os derivados CLEA-DME e CLEA-TBA apresentaram perfil similar. É possível observar alterações no perfil das curvas quando M-CLEAs e CLEAs obtidos empregando o mesmo precipitante são comparados. A 70 μm , o que corresponde a $\log(Pd_{\mu\text{m}}) = 1.85$, o volume cumulativo das partículas do derivado M-CLEA-TBA alcançava 100%, enquanto para os outros M-CLEAs este volume era alcançado a 90 μm de diâmetro, correspondendo a $\log(Pd_{\mu\text{m}}) = 1.95$. A partir destas observações, é possível concluir que uma fração significativa de PGA está localizada no interior de partículas grandes para os derivados CLEAs e,

consequentemente, limitações difusionais mais severas são esperadas para estes derivados em comparação com M-CLEAs (GIORDANO, GIORDANO e COONEY, 2000). Esta conclusão é corroborada pelos resultados obtidos para a medida de atividade empregando NIPAB.

Figura 3.11 – Distribuição de freqüência de tamanho de partícula. a) CLEA-DME (cinza) e M-CLEA-DME (linhas diagonais); b) CLEA-TBA (preto) e M-CLEA-TBA (linhas diagonais); c) CLEA-PEG (cinza) e M-CLEA-PEG (linhas diagonais); d) M-CLEA-TBA (preto), M-CLEA-TBA-G75 (linhas diagonais) e M-CLEA-TBA-G150 (cinza). O diâmetro de partícula foi obtido a partir da análise das imagens de MEV empregando o software ImageJ, a contagem de freqüência foi realizada empregando um intervalo de 20 μm .

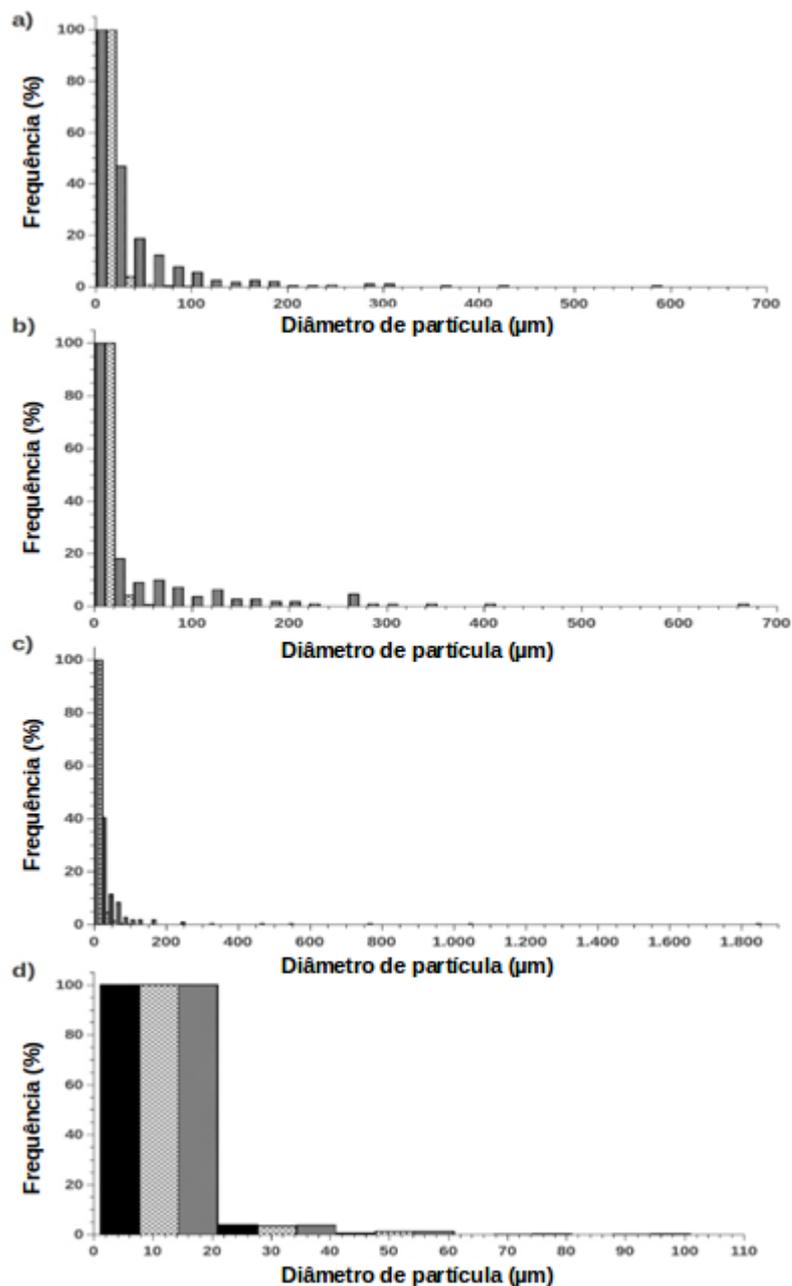
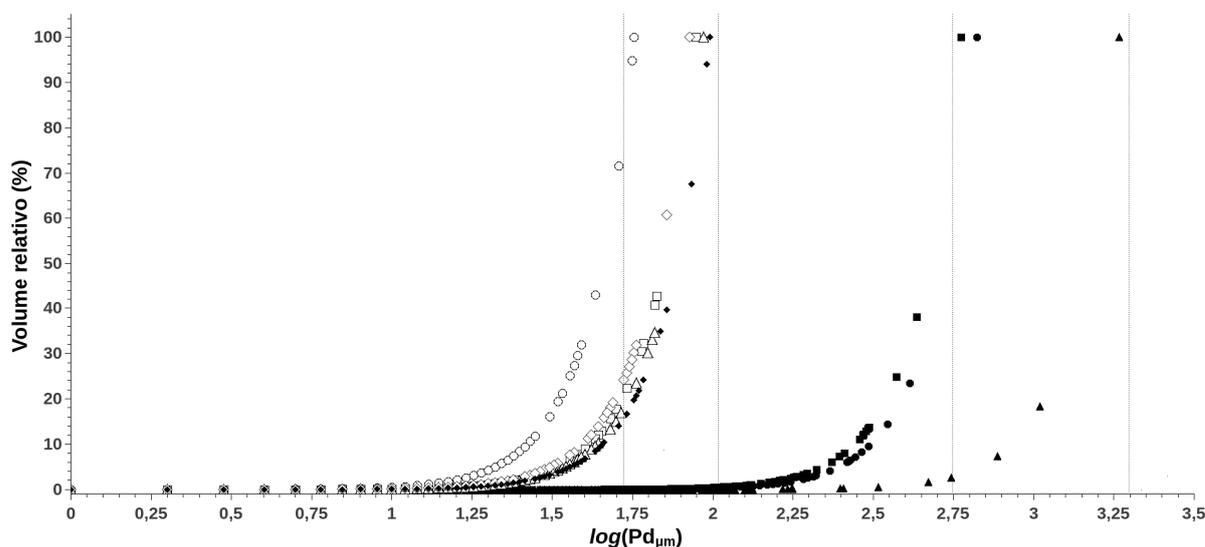


Figura 3.12 – Log de diâmetro de partículas ($\log Pd_{\mu m}$) versus volume relativo de partícula. a) CLEA-DME (■); b) M-CLEA-DME (□); c) CLEA-TBA (●); d) M-CLEA-TBA (○); e) CLEA-PEG (▲); f) M-CLEA-PEG (△); g) M-CLEA-TBA-G75 (◇); h) M-CLEA-TBA-G150 (◆). As linhas pontilhadas verticais delimitam as regiões do gráfico onde M-CLEAs e CLEAs alcançam 100% de seu volume relativo.



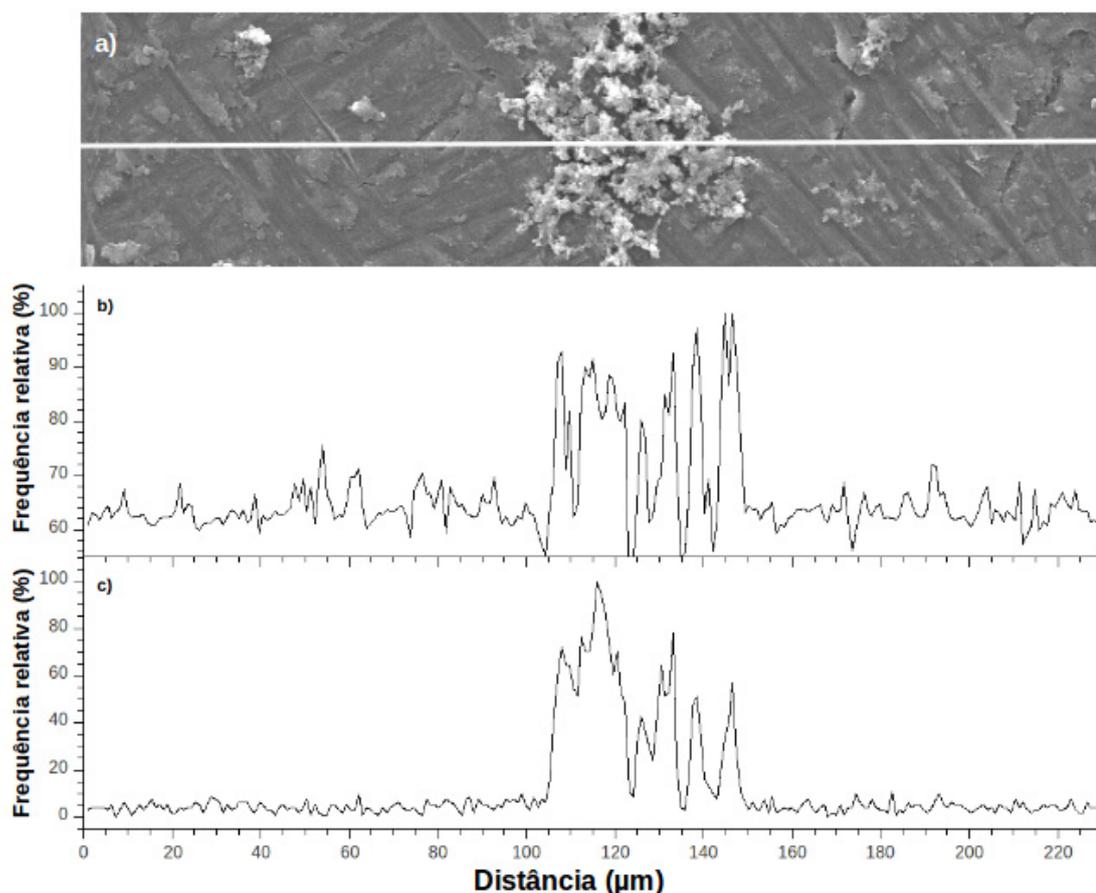
3.3.6 EDS Line-Scan

Uma importante questão levantada durante este trabalho foi como amino-SPION e proteínas estão organizados na superestrutura dos agregados. Para ter uma idéia inicial de como isso ocorre realizamos análises dos derivados M-CLEAs empregando EDS no modo “line-scan”. Nesta técnica a amostra é escaneada empregando feixes de elétrons (os mesmo empregados na geração da imagem de MEV) ao longo de uma linha pré-definida que cruza a amostra. Radiações no comprimento de onda dos raios X gerados pela interação dos elétrons disparados com a amostra fornecem informações relativas a composição elementar versus a posição ao longo da linha (com uma resolução aproximada de 100 nm).

A Figura 3.13 mostra o resultado da análise de EDS “line-scan” para a amostra M-CLEA-TBA-G75, a linha branca na Figura 13-a é a região da amostra onde o “line-scan” foi executado. A Figura 13-b mostra os dados topográficos da amostra (modo de elétrons secundários – SE) e a Figura 13-c mostra os dados de distribuição elementar para o ferro ao longo da linha. Comparando o gráfico de SE com o gráfico de distribuição de ferro é possível identificar claramente as regiões da amostra onde há presença ferro. O padrão similar observado para estes gráficos indica que o elemento ferro, e consequentemente amino-

SPION, encontra-se homogeneamente disperso na estrutura do derivado M-CLEA-TBA-G150. Resultados similares foram observados para os derivados M-CLEA-DME (Figura 3.14), M-CLEA-TBA (Figura 3.15), M-CLEA-PEG (Figura 3.16) e M-CLEA-TBA-G150 (Figura 3.17). Baseado nestes dados acreditamos que a alta densidade de grupos amino presentes na superfície de amino-SPION, seu tamanho diminuto (~ 11 nm, a mesma ordem de tamanho observada para a maioria das proteínas) e sua forma globular fazem com que este material se comporte como uma proteína durante o processo de agregação, interagindo com as proteínas presentes na solução a nível molecular e de forma organizada. Neste contexto parece ser possível preparar M-CLEAs empregando amino-SPION para virtualmente qualquer enzima.

Figura 3.13 – Derivado M-CLEA-TBA-G75 EDS “line-scan”. a) Imagem de MEV; b) Gráfico SE (informações topográficas); c) Presença de ferro (dados elementares). A linha branca na imagem (a) indica a região da amostra onde a análise de EDS “line-scan” foi executada.



3.3.7 Experimentos de Recuperação Magnética

A associação entre materiais magnéticos e biomoléculas visa prover estas biomoléculas com propriedades magnéticas. Em bioprocessos a principal motivação para prover uma biomolécula com propriedades magnéticas é facilitar sua separação a partir do meio reacional. O princípio básico e a principal vantagem por trás da separação magnética é sua seletividade, por exemplo, partículas com propriedades magnéticas podem ser separadas seletivamente até mesmo de meios reacionais extremamente complexos contendo outros sólidos em suspensão através da aplicação de um campo magnético externo. Em contraste com técnicas de separação tradicionais como centrifugação e filtração que são particularmente difíceis de serem aplicadas quando partículas sub-micrométricas (como é o caso da maioria das biomoléculas) precisam ser separadas, sobretudo e meios complexos (YAVUZ *et al.*, 2009). Neste caso, partículas magnéticas podem ser aplicadas para purificar e/ou recuperar biomoléculas de uma maneira eficiente e pouco agressiva.

Figura 3.14 – Derivado M-CLEA-DME EDS “line-scan”. a) Imagem de MEV; b) Gráfico SE (informações topográficas); c) Presença de ferro (dados elementais). A linha branca na imagem (a) indica a região da amostra onde a análise de EDS “line-scan” foi executada.

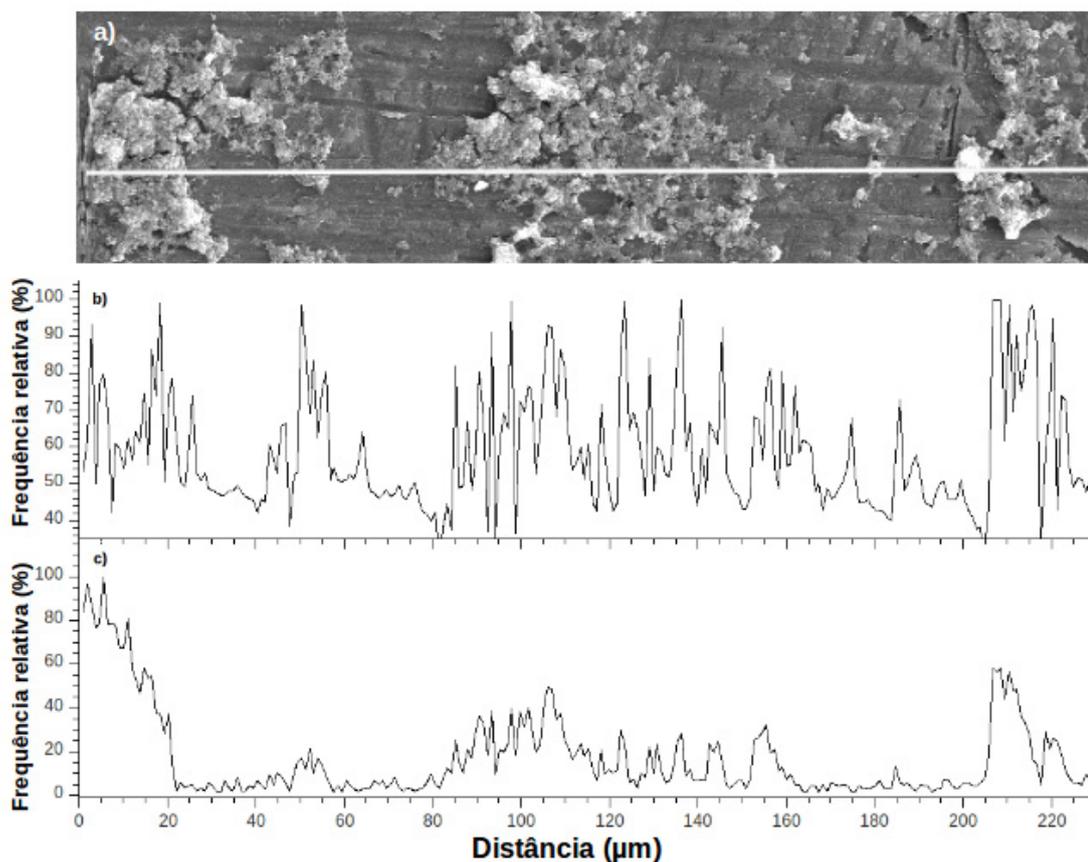


Figura 3.15 - Derivado M-CLEA-TBA EDS “line-scan”. a) Imagem de MEV; b) Gráfico SE (informações topográficas); c) Presença de ferro (dados elementares). A linha branca na imagem (a) indica a região da amostra onde a análise de EDS “line-scan” foi executada.

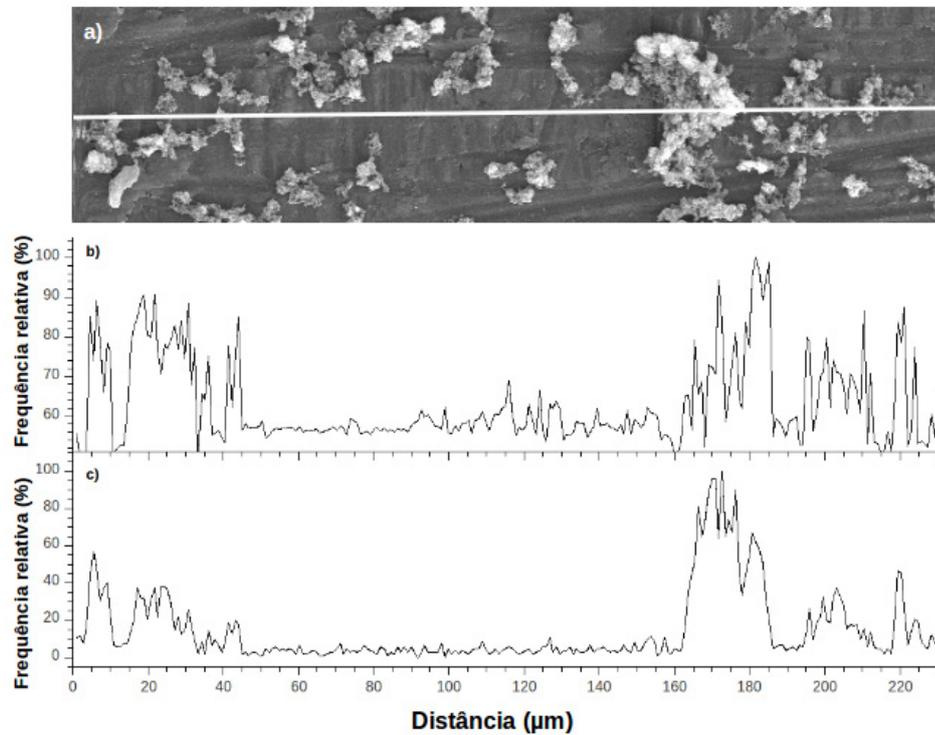


Figura 3.16 – Derivado M-CLEA-PEG EDS “line-scan”. a) Imagem de MEV; b) Gráfico SE (informações topográficas); c) Presença de ferro (dados elementares). A linha branca na imagem (a) indica a região da amostra onde a análise de EDS “line-scan” foi executada.

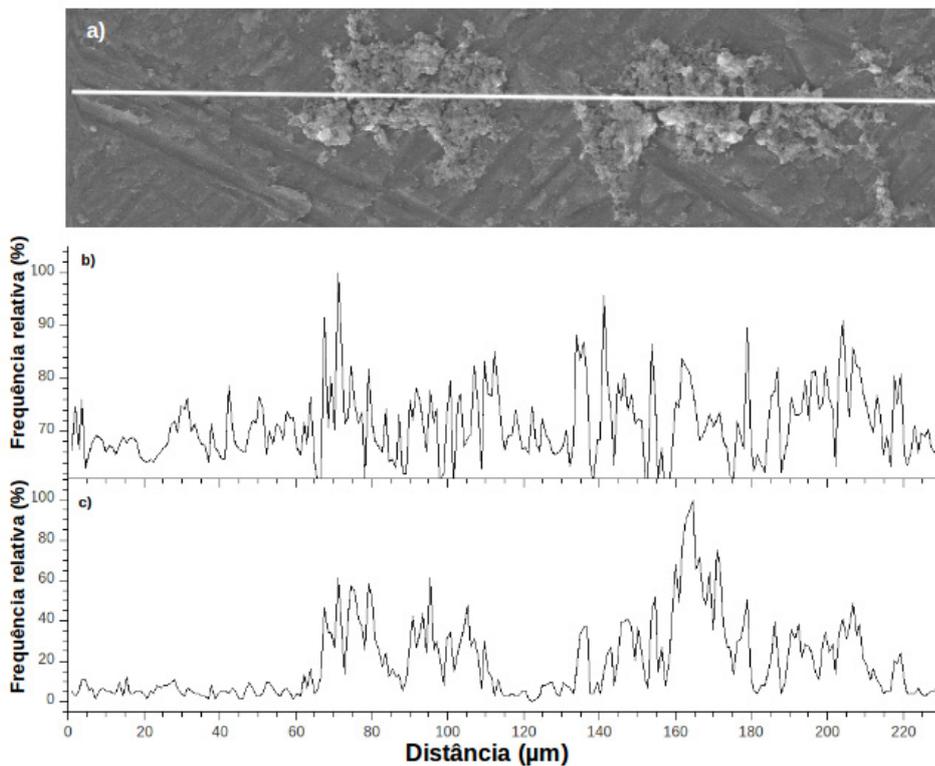
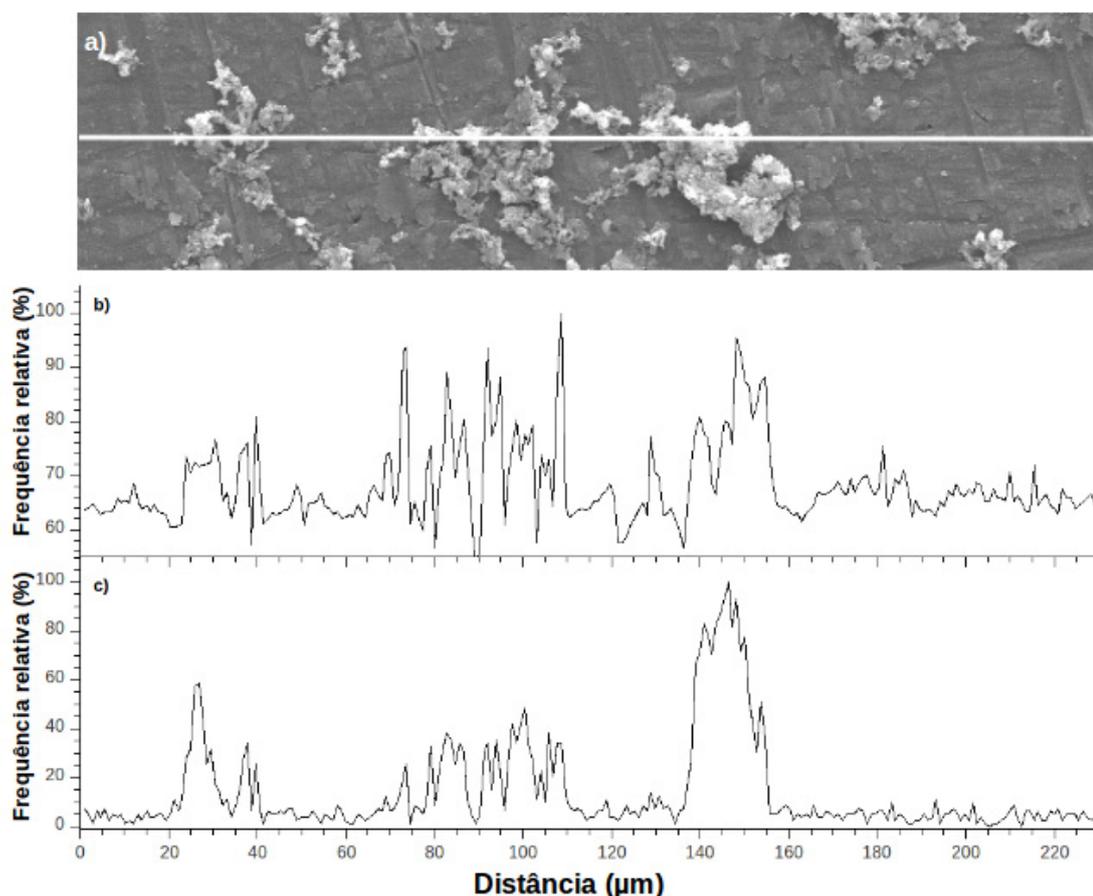


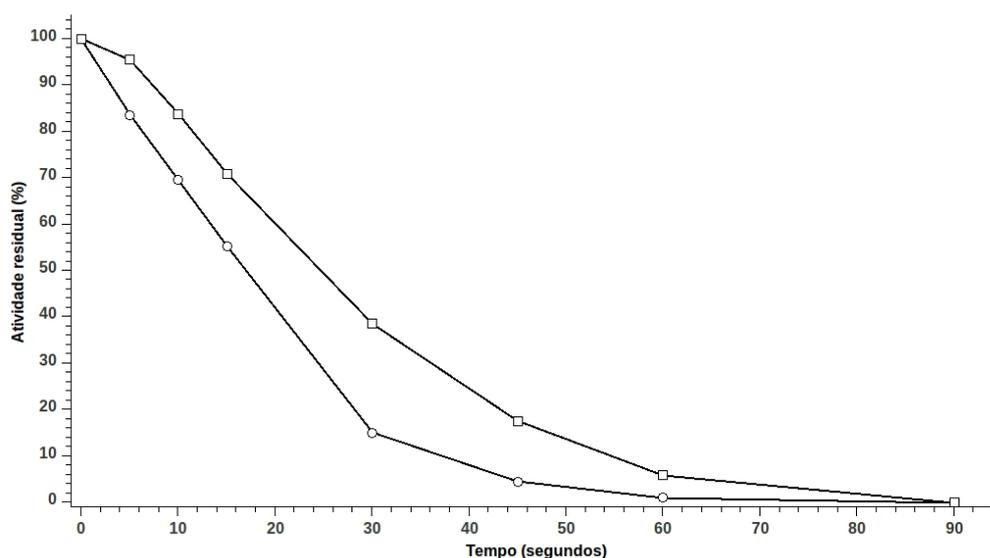
Figura 3.17 - Derivado M-CLEA-TBA-G150 EDS “line-scan”. a) Imagem de MEV; b) Gráfico SE (informações topográficas); c) Presença de ferro (dados elementares). A linha branca na imagem (a) indica a região da amostra onde a análise de EDS “line-scan” foi executada.



Atualmente muitos estudos vêm empregando materiais magnéticos para imobilizar enzimas, porém somente alguns deles executam experimentos de recuperação magnética para comprovar que de fato a recuperação magnética é eficiente. Para ilustrar a eficiência de recuperação magnética de M-CLEAs realizamos um experimento simples onde um frasco de vidro contendo 10 mL de uma suspensão de M-CLEA-TBA-G150 (100 mg/mL) foi colocado sobre um magneto N35 NdFeB (22 mm de diâmetro x 20 de espessura) e a velocidade de recuperação do derivado foi monitorada através da medida de atividade (NIPAB) no sobrenadante em dois pontos distintos a 2.0 cm e a 1.0 cm da superfície do magneto. Na Figura 3.18 é possível observar que a recuperação do derivado M-CLEA-TBA-G150 nestas condições foi rápida e eficiente. A 2 cm da superfície do magneto 50% das partículas foram recuperadas após 17 segundos e a 1.0 cm da superfície do magneto somente 25 segundos foram necessários para recuperar 50% das partículas do derivado. Um frasco contendo 10 mL

da solução de M-CLEA-TBA-G150 (100 mg/mL) foi preparado como referência com o objetivo de avaliar o efeito da gravidade sobre a suspensão. A solução contendo o derivado M-CLEA-TBA-G150 formava uma suspensão extremamente estável na ausência de um campo magnético externo, após dois minutos A_r era 98% a 2.0 cm e 100% a 1.0 cm da base do frasco. Este experimento demonstra que a co-agregação entre enzimas e etiquetas magnéticas é uma estratégia válida para prover propriedades magnéticas para agregados de enzimas os quais podem ser empregados para superar os problemas de recuperação anteriormente observados para CLEAs (PCHELINTSEV *et al.*, 2009; SHELDON, SCHOEVAART e VAN LANGEN, 2005).

Figura 3.18 – Velocidade de recuperação magnética do derivado CLEA-TBA-G75. Atividade NIPAB medida a 2.0 cm da superfície do magneto (○) e a 1.0 cm da superfície do magneto (□).

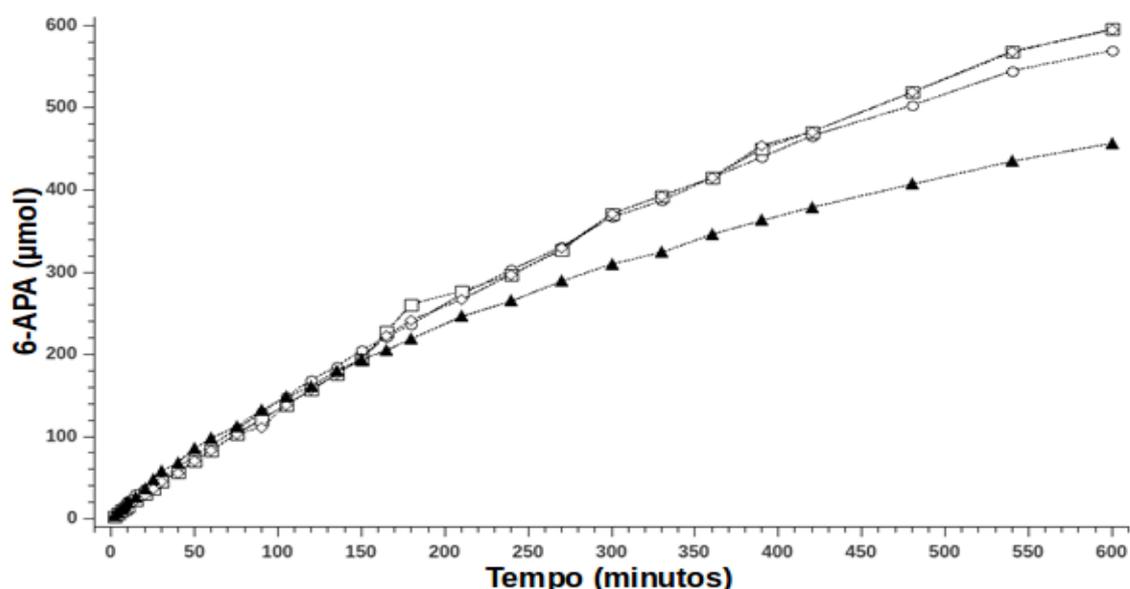


3.3.8 Hidrólise de Penicilina G

Para testar M-CLEAs sob condições de processo, bateladas de hidrólise de PG foram realizadas em reator encamisado com agitação mecânica empregando o derivado M-CLEA-TBA-G150 como catalisador. A reação foi conduzida a 37 °C e o pH do meio reacional foi constantemente ajustado para 8.0 através da adição de NaOH. Três bateladas consecutivas foram realizadas usando o mesmo derivado, com o objetivo de testar a estabilidade operacional do biocatalisador e a eficiência na recuperação magnética. Os resultados foram

comparados com um experimento realizado nas mesmas condições empregando a mesma carga enzimática de enzima livre ($0.23 \text{ IU/mL}_{\text{reator}}$). A Figura 3.19 mostra os resultados deste experimento. No primeiro ciclo reacional, após 600 minutos 570 μmol de PG foram hidrolisados correspondendo a aproximadamente 61% de conversão. Neste momento a reação foi paralisada e o derivado magneticamente recuperado, apenas 1.5 minuto foi necessário para recuperar magneticamente 100% do derivado em um reator de 50 mL. O derivado foi lavado uma vez com água e uma vez com uma solução de PG 5%, para a remoção dos produtos formados durante a reação (ácido fenilacético - AFA e 6-APA). A lavagem com um pequeno volume de solução aquosa de PG 5% foi mais eficiente que lavagem com tampão para remoção do AFA, um inibidor da atividade de PGA. O derivado recuperado magneticamente foi então empregado em dois outros ciclos alcançando 63% de conversão, em ambos os ciclos. A conversão similar obtidas nos três ciclos reacionais indica que todas as partículas do derivado foram recuperadas magneticamente após a reação/processo de lavagem e não houve perda significativa de atividade enzimática durante o processo. Uma vez mais, é evidente que a recuperação magnética de M-CLEAs é um método rápido, pouco agressivo e eficiente. A hidrólise da PG empregando a enzima livre teve desempenho inferior atingindo apenas 48% (457 μmol) de conversão após 600 minutos. Este fato provavelmente ocorreu devido a perda de atividade da enzima livre causada pelas condições empregadas no processo (temperatura, pH e adição de NaOH). Desta forma este experimento evidencia a estabilidade operacional superior do derivado M-CLEA-TBA-G150 quando comparado à enzima livre.

Figura 3.19 – Hidrólise de PG potássica 5% (37°C , pH 8.0) empregando (\blacktriangle) Enzima livre; e M-CLEA-TBA-G150: (\circ) ciclo1; (\square) ciclo 2; (\diamond) ciclo 3.



3.4 Conclusão do Capítulo

A co-agregação entre amino-SPION e a enzima modelo PGA para a obtenção de M-CLEAs foi investigada. M-CLEAs apresentaram atividades recuperadas ($R\%$) e estabilidades similares a CLEAs obtidos empregando as mesmas condições reacionais, indicando que não ocorreram modificações estruturais significativas em M-CLEAs devido à co-agregação com amino-SPION. Os derivados M-CLEAs foram recuperados a partir do meio reacional através da aplicação de um campo magnético externo de forma rápida e eficiente. O melhor resultado em termos de atividade recuperada foi obtido empregando PEG 600 e TBA como precipitantes. Os melhores resultados para estabilidade térmica e estabilidade em metanol 50% foram obtidos usando TBA como precipitante. A amostra M-CLEA-TBA foi empregada para averiguar o efeito do aumento na concentração molar de glutaraldeído durante a etapa de entrecruzamento. A atividade recuperada diminuiu com o aumento da concentração de glutaraldeído, porém a estabilidade térmica foi significativamente melhorada. Não foi possível observar incrementos na estabilidade em metanol 50% dos derivados M-CLEA-TBA com o aumento da concentração de glutaraldeído. A aplicação de um campo magnético externo permitiu a recuperação de 100% das partículas de M-CLEA-TBA-G150 após 90 segundos nas condições do experimento. Após a remoção do campo magnético as partículas de M-CLEAs foram prontamente re-dispersas em solução formando suspensões estáveis. CLEAs, por sua vez, foram difíceis de separar a partir do meio reacional. Após o processo de filtração CLEAs formaram “clusters” grandes e difíceis de serem re-suspendidos. Os “clusters” de CLEAs apresentaram desempenho inferior quando foram empregados na hidrólise de NIPAB, em comparação com M-CLEAs, devido a limitações de transferência de massa. Os severos efeitos difusivos verificados para CLEAs foram confirmados através da maceração dos agregados e análise de atividade a 6 e 25 °C. Tamanhos de partículas de M-CLEAs e CLEAs foram determinados através de análises de imagem de MEV, estes resultados demonstraram que CLEAs, de fato possuem partículas grandes, em alguns casos maiores que 1800 μm . M-CLEAs, por sua vez, não apresentaram partículas maiores que 90 μm . A fração significativa de enzimas retida em partículas grandes de CLEAs pode explicar as limitações de transferência de massa observadas durante a hidrólise de NIPAB. Análises de EDS “line-scan” indicam que amino-SPION se encontra homogeneamente disperso na estrutura de M-CLEAs. A hidrólise de PG empregando enzima livre apresentou desempenho inferior em comparação com o derivado M-CLEA-TBA-G150, desta forma demonstrando que o protocolo apresentado aqui provê significante aumento na estabilidade do

biocatalisador, a recuperação magnética neste experimento foi completa. A co-agregação entre amino-SPION e enzimas apresentada nesta etapa do trabalho representa uma nova metodologia para a imobilização de enzimas que pode virtualmente ser aplicada para qualquer enzima. M-CLEAs podem apresentar alta atividade volumétrica, que em conjunto com a capacidade de serem atraídos por um campo magnético externo torna factível sua utilização em processos industriais onde a recuperação do biocatalisador é difícil ou impraticável por métodos clássicos.

3.5 Referências

BINI, R. A.; MARQUES, R. F. C.; SANTOS, F. J.; CHAKER, J. A. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v 324, p. 534-539, 2012.

BOLLER, T.; MEIER C.; MENZKER S. Eupergit oxirane acrylic beads: How to make the enzyme for biocatalysts. **Org. Process Res. Develop.** n. 6, p. 509-519, 2002.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248–254, 1976.

CAO L.; VAN LANGEN, L. M.; L.; SHELDON, R. A. Immobilized enzymes: Carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology.** v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003.

CAO, L.; VAN LANGEN, L. M.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of beta-lactam antibiotics. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic.** v. 11, p. 665-670, 2001.

CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase. **Organic Lett.** v. 2, n. 10, p. 1361-1364, 2000.

CHASTELLAIN, A.; PETRI, A.; HOFMANN, H. Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 278, p. 353-360, 2004.

CHIANG, C. L.; SUNG, C. S. Purification of transfection-grade plasmid DNA from bacterial cells with superparamagnetic nanoparticles. **Journal Of Magnetism And Magnetic Materials.** Elsevier Science Bv. v. 302, p. 7-13, 2006.

CHOW, Y; LI, R.; WU, J.; PUAH, S. M.; NEW, S. W.; CHIA, Q.; LIE, F; RAHMAN, T. M. M.; CHOI W. J. Modeling and optimization of methanol as a cosolvent in amoxicillin synthesis and its advantage over ethylene glycol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering.** v. 12, p. 390-398, 2007.

DALAL, S.; KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Preparation and characterization of combi-CLEAs catalyzing multiple non-cascade reactions. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 44, p. 128-132, 2007.

FARAZY, A. E.; ISMADJI, S.; JU, Y. H. Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 44, p. 240-248, 2009.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.; GUISÁN, J. M. The presence of methanol exerts a strong and complex modulation of the synthesis of different antibiotics by immobilized penicillin G acylase. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 1998, v. 23, p. 305-310, 1998.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.; GUISÁN, J. M. The use of stabilised penicillin acylase derivatives improves the design of kinetically controlled synthesis. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v. 101, p. 91-97, 1995.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.; PIATKOWSKA, B. GUISÁN, J. M. Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: Evaluation and optimization of different synthetic approaches. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, 9-14, 1996.

GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; COONEY, C. L. A study on intra-particle diffusion effects in enzymatic reactions: glucose-fructose isomerization. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 159-166, 2000.

GOVARDHAN, C. P. Cross-linking of enzymes for improved stability and performance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 331-335, 1999.

LALONDE, J. J.; GOVARDHAN, C.; KHALAF, N.; MARTINEZ, A. G.; VISURI, K.; MARGOLIN, A. L. Cross-linked crystals of *Candida rugosa* lipase - highly efficient catalysts for the resolution of chiral esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 6845-6852, 1995.

LANGFORD, J. I.; WILSON, A. J. C. Scherrer after 60 years – survey and some new results in determination of crystallite size. **Journal of Applied Crystallography**. v. 11, p. 102-113, 1978.

LÓPEZ-SERRANO, P.; CAO, L.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases. **Biotechnology Letters**. v. 24, n. 16, p. 1379-1383, 2002.

MARQUES, R. F. C.; COSTA, T. P.; VARANDA, L. C.; SILVA, N. J. J.; SANTOS, F. J.; MILAN A.; JAFELIECI Jr, M. in: Proceedings of the Sixth Encontro SBPMat, Natal-Brazil, 2008; Abstracts, SBPMat: São Paulo, 2007, p. D579.

MATTEO, C.; PALOMO, J. M.; VAN LANGEN, L. M.; VAN RANTWIJK, F. SHELDON, R. A. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 86, p. 273-276, 2004.

MERKUS, H. **Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality**. New York: Springer, 536p., 2009.

PCHELINTSEV, N. A.; YOUSHKO, M. I.; SVEDAS, V. K. A new method for spectrophotometric assay of activity of cross-linked penicillin acylase aggregates. **Biochemistry-Moscow**. v. 71, p. 315-319, 2006

PCHELINTSEV, N. A.; YOUSHKO, M. I.; SVEDAS, V. K. Quantitative characteristic of the catalytic properties and microstructure of cross-linked enzyme aggregates of penicillin acylase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 56, p. 202-207, 2009.

QUIOCHO, F. A.; RICHARDS, F. M. Intermolecular Cross Linking of Protein in Crystalline State - Carboxypeptidase-A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**. v. 52, p. 833, 1964.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Application of cross-linked enzyme aggregates of *Bacillus badius* penicillin G acylase for the production of 6-aminopenicillanic acid. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 43-49, 2007

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Recente biotechnological interventions for developing improved penicillin G acilase. **J. Biosc. Bioeng**. v. 27, n. 1, p. 1-13, 2004.

ROY, J. J.; ABRAHAM, T. E. Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 38, p. 31-36, 2006.

SHAH, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Preparation of cross-linked enzyme aggregates by

using bovine serum albumin as a proteic feeder. **Analytical Biochemistry**. v. 351, p. 207-213, 2006.

SHELDON, R. A.; RANTWIJK, F. V. Biocatalysis for sustainable organic synthesis. **Aust. J. Chem.** n. 57, p. 281-289, 2004.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; VAN LANGEN, L. M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**. v. 23, p. 141-147, 2005

SHELDON, R. B. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. **Organic Process Research and Development**, v. 15, p. 213-223, 2011.

SMITH, A. L. Infrared group frequencies for structure determination in organosilicon compounds. In **Chemical, Biochemical, and Industrial Applications of Infrared Spectroscopy**; During, J. R., Ed.; Wiley: Chichester, 1985.

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? **Trends Biotechnol.** v. 17, p. 326-335, 1999.

WHITE, L. D.; TRIPP, C. P. Reaction of (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces. **J. Colloid Interface Sci.** v. 232, p. 400-407, 2000.

WILSON, L.; BETANCOR, L.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; GUISÁN, J. M.; PESSELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Cross-linked aggregates of multimeric enzymes: A simple and efficient methodology to stabilize their quaternary structure. **Biomacromolecules**. v. 5, n. 3, p. 814-817, 2004b.

WILSON, L.; ILLANES, A.; ABIÁN, O.; PESSELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: An easy methodology to prepare enzymes biocatalysts stable in organic media. **Biomacromolecules**. v. 5, n. 3, p. 852-857, 2004a.

WILSON, L.; ILLANES, A.; PESSELA, B. C. C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Encapsulation of crosslinked penicillin G acylase aggregates in lentikats: Evaluation of a novel biocatalyst in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 86, n. 5, p. 558-562, 2004c.

WILSON, L.; ILLANES, A.; SOLER, L.; HENRÍQUEZ, M. J. Effect of the degree of cross-linking on the properties of different CLEAs of penicillin acylase. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 322-326, 2009.

YAMAURA, M.; CAMILO, R. L.; SAMPAIO, L. C.; MACEDO, M. A.; NAKAMURA, M.; TOMA, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 279, p. 210-217, 2004.

YAVUZ, C. T.; PRAKASH, A.; MAYO, J. T.; COLVIN, V. L. Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. **Chemical Engineering Science**. v. 64, p. 2510-2521, 2009

YU, H. W.; CHEN, H.; WANG, X.; YANG, Y. Y. CHING, C. B. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**. v. 43, p. 124-127, 2006

CAPÍTULO 4:

SELEÇÃO DE MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *Trichoderma reesei* EMPREGANDO AGAROSE E SEPABEADS-EPÓXIDO COMO SUPORTES MODELO



4.1 Conhecimento Base

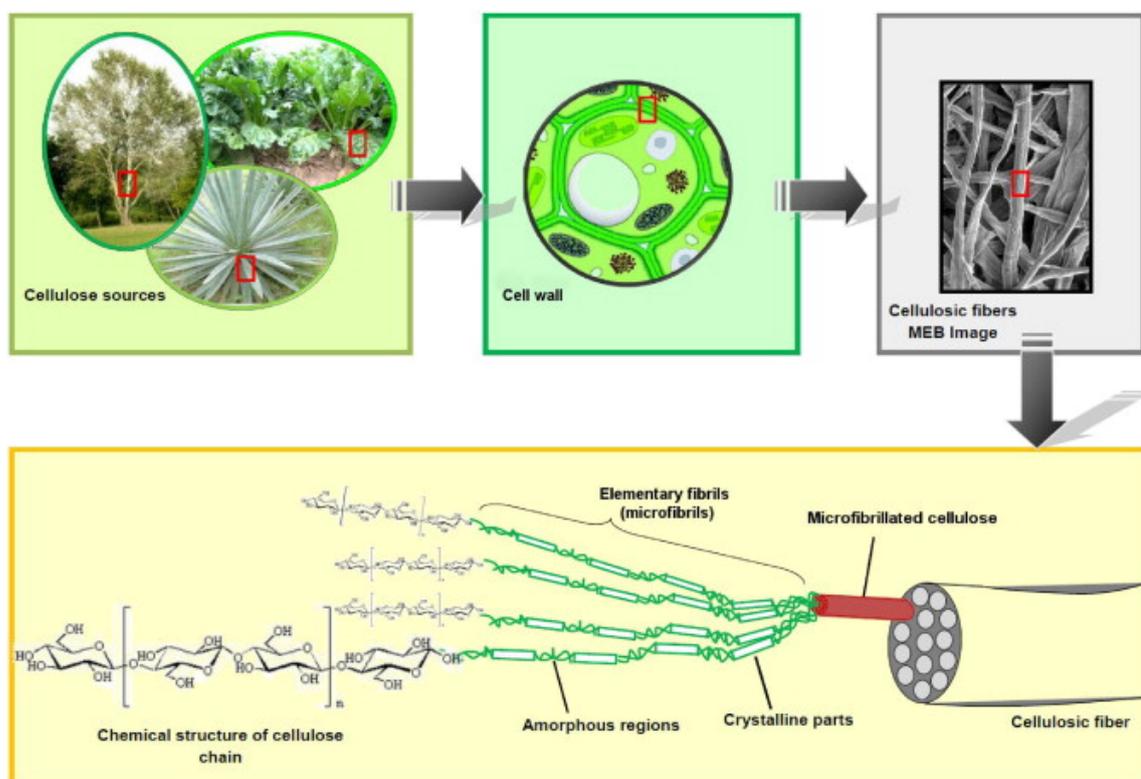
Atualmente, devido aos graves problemas ambientais causados pela queima de combustíveis fósseis, tem crescido o interesse em fontes alternativas de energia. O esgotamento de reservas de petróleo em muitos países, incentivos governamentais em forma de subsídios (sobretudo no Brasil) e crescentes preocupações com o meio ambiente têm posicionado o etanol como forte alternativa aos derivados de petróleo como fonte de energia e de compostos químicos para a indústria. Hoje a adição de etanol à gasolina é empregada em diversos países além do Brasil, pioneiro nessa área. Os maiores produtores mundiais são Brasil e Estados Unidos da América. No Brasil, o etanol vem sendo obtido por fermentação direta da sacarose da cana de açúcar, enquanto que nos EUA é obtido a partir do amido (principalmente milho) após hidrólise enzimática deste a glicose. Beterraba, sorgo e mandioca, são outras possíveis fontes de glicose para a produção de etanol. Contudo, o aumento da demanda no consumo de etanol faz necessário o aumento na produção deste composto químico, requerendo uso de mais biomassa como matéria prima. Isso tem gerado a preocupação de que culturas que tradicionalmente são usadas como alimento sejam desviadas para a produção de etanol, gerando falta de alimento no mundo.

A principal alternativa para o aumento na produção de etanol sem causar risco para a produção de alimentos seria a utilização de materiais lignocelulósicos residuais como matéria prima (LIU *et al.*, 2001). Celulose e hemicelulose, carboidratos que junto com lignina são os principais componentes dos lignocelulósicos, são os mais abundantes compostos orgânicos presentes na biosfera e representam juntos mais da metade de todo o carbono orgânico do planeta (KLEYWEGT *et al.*, 1997; SANDGREN *et al.*, 2001). A celulose é, ainda, o principal polissacarídeo encontrado em plantas constituindo predominantemente a parede celular de plantas terrestres aquáticas conferindo-lhes forma e rigidez (SANDGREN *et al.*, 2001). Em plantas vasculares a celulose corresponde a 40-60% de toda a massa seca da parede celular vegetal. (LIU *et al.*, 2011)

A celulose é um material composto de polímeros de unidades de β -D-glucopiranosídeo (glicose) unidos por ligações glicosídicas beta-1,4 (KLEYWEGT *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2001). Esses polímeros de glicose se associam por meio de interações de hidrogênio formando nano-fibrilas que por sua vez se organizam em micro-fibrilas altamente ordenadas, que juntamente com outros polissacarídeos e lignina formam as fibras da parede celular das plantas (LIU *et al.*, 2001; SANDGREN *et al.*, 2001). A estrutura de organização sistemática da celulose pode ser visualizada na Figura 4.1. O diâmetro das nano-fibrilas de celulose é de

cerca de 5 nm, enquanto as micro-fibrilas apresentam tamanho entre 20 e 50 nm. As fibras de celulose, por sua vez, apresentam tamanho de vários micrometros (LAVOINE *et al.*, 2012). Em alguns casos descritos na literatura as nano-fibrilas são chamadas de micro-fibrilas e não há distinção entre micro-fibrilas e fibrilas. Cada micro-fibrila é constituída por regiões contendo celulose cristalina e regiões contendo domínios de celulose amorfa.

Figura 4.1 – Organização sistemática da celulose, desde a fonte até a molécula de celulose propriamente dita (LAVOINE *et al.*, 2012).



Para a produção de etanol a partir de celulose, antes a celulose tem que ser transformada em glicose, por hidrólise química, catalisada com ácidos ou bases fortes, ou hidrólise enzimática (GOKHALE e LEE, 2012). Para facilitar essa hidrólise, usualmente, remove-se a hemicelulose e a lignina através de um pré-tratamento, que visa também desestruturar a altamente ordenada parede celular vegetal (LIU *et al.*, 2011). Infelizmente materiais lignocelulósicos, e até mesmo celulose pura, são polímeros extremamente estáveis e

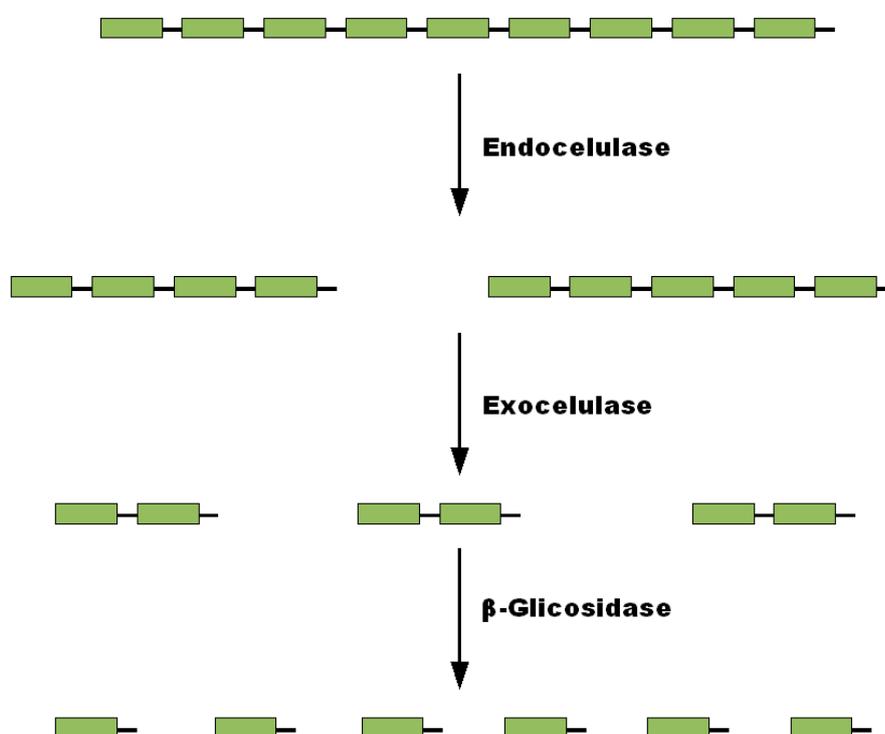
difíceis de hidrolisar a açúcares fermentescíveis (Liu *et al.*, 2001). Processos de hidrólise enzimática da celulose são menos agressivos em termos ambientais e, principalmente, permitem realizar a hidrólise e fermentação de forma simultânea. Além disso, a realização de hidrólise química da celulose gera como co-produtos algumas substâncias tóxicas que inibem o processo fermentativo.

Em um típico processo de hidrólise enzimática, a celulose é hidrolisada, gerando glicose, por um complexo de enzimas altamente especializadas secretadas por microorganismos celulolíticos, conhecido como complexo celulolítico (HIRSH *et al.*, 2010). Este é formado por inúmeras enzimas de três classes diferentes: 1) celobiohidrolases (CBH), antigamente chamadas de exo-celulases; 2) endoglucanases (EG), antigamente chamadas de endo-celulases; 3) β -glicosidases (BG). Para a hidrólise completa da celulose é necessária a ação sinérgica dessas três classes de enzimas. De forma geral, EGs atacam as ligações beta-1,4 internas da fibra de celulose quebrando o polímero, CBHs atacam as extremidades da cadeia de celulose liberando celobiose, que por sua vez é convertida a glicose por ação das BGs (Figura 4.2). As CBHs podem ser encontradas em duas classes distintas, CBHI que hidrolisa o polímero de celulose a partir de suas extremidades redutoras e CBHII que hidrolisa o polímero de celulose a partir de suas extremidades não redutoras. Ambas CBHs hidrolisam o polímero de celulose de modo contínuo, ou seja, assim que um polímero se une ao sítio ativo da enzima, várias hidrólises sequenciais ocorrem antes que o substrato seja liberado (GOKHALE e LEE; 2012; LIU *et al.*, 2001). As enzimas do complexo agem de forma sinérgica e simultânea hidrolisando completamente a celulose a glicose (KLEYWEGT *et al.*, 1997). A teoria mais aceita para o modo de ação dos complexos celulolíticos é de que EGs clivam as ligações glicosídicas localizadas nas regiões amorfas, e mais desordenadas, da fibra de celulose diminuindo rapidamente o grau de polimerização da fibra. A ação das EGs libera extremidades redutoras e não redutoras possibilitando a ação das CBHs que agem nessas extremidades liberando celobiose que, por fim, é convertida a glicose pela ação das β -glicosidases (KLEYWEGT *et al.*, 1997; MATTINEN *et al.*; 1997).

O modo de ação do complexo celulolítico depende da natureza do substrato. Quando carboximetilcelulose (CMC) é usada como substrato, não é observado sinergismo entre EGs e CBHs, porém quando o substrato é a celulose cristalina conhecida como avicel ocorre forte sinergismo entre EGs e CBHs (GOKHALE e LEE, 2012). Para avicel, a ação de CBHs é mais pronunciada, por outro lado, no caso de substratos amorfos, principalmente CMC, a ação de EGs é mais pronunciada. O grau de sinergia é um parâmetro importante que determina a eficiência na hidrólise de um determinado material ligno-celulósico. Estudos têm

demonstrado que quando EGs e CBHs são empregadas de forma simultânea o efeito combinado da ação destas duas enzimas é muito maior do que o efeito da soma de suas ações individuais, principalmente em estágios iniciais de reação (GOKHALE e LEE, 2012). Com o passar do tempo o efeito sinérgico diminui. A velocidade global de reação é determinada, na maioria dos casos, pela ação de CBHs, porém CBHs são inibidas pelo produto da reação, celobiose. Nesse contexto, a presença de BG no meio reacional é essencial para evitar o acúmulo de celobiose e, conseqüentemente, a inibição de CBHs (GOKHALE e LEE, 2012).

Figura 4.2 – Mecanismo sinérgico de hidrólise enzimática de celulose.



O fungo filamentosso *Trichoderma reesei* (também conhecido como *Hypocrea jecorina*) é um fungo tropical encontrado em resíduos lignocelulósicos e no solo (SANDGREN *et al.*, 2001). Esse fungo é o organismo produtor de celulases mais amplamente estudado, sendo o complexo celulolítico produzido pelo *Trichoderma reesei* também o mais empregado industrialmente (LIU *et al.*, 2001; MATTINEN *et al.*, 1997). Celulases de *T. reesei*

tem sido ao longo de muitos anos empregadas nas indústrias de alimentos, bebidas, têxtil e de papel e celulose (LEE *et al.*, 2011; HIRSH *et al.*, 2010). Pelo menos, sete celulasas diferentes são produzidas por *T. reesei*: duas celobiohidrolases (Cel7A e Cel6A) que representam, respectivamente, ~50 e 20% do total de enzimas do complexo; cinco endoglucanases (Cel7B, Cel5A, Cel12A, Cel61A e Cel45A) que representam, respectivamente, ~15, 10, 1, <1 e <1% do total de celulasas do complexo (KLEYWEGT *et al.*, 1997; SANDGREN *et al.*, 2001). As principais enzimas celulolíticas do complexo produzido pelo *T. reesei* são proteínas altamente glicosiladas e com PI ácido, além disso, apresentam organização bi-modular, com exceção da Cel12A, possuindo um módulo catalítico (CD) unido a um módulo de ligação ao substrato (CBD) através de um “linker” extremamente glicosilado (DIVNE *et al.*, 1998; KLEYWEGT *et al.*, 1997; MATTINEN *et al.*, 1997; SANDGREN *et al.*, 2001; STAHLBERG *et al.*, 1996). Acredita-se que os dois domínios presentes nas estruturas das celulasas funcionem simultaneamente se adsorvendo à superfície das fibras das celulasas com distintas especificidades (DIVNE *et al.*, 1998; KRAULIS *et al.*; 1989). Os CBDs permitem, ainda, que as celulasas se movam na superfície das fibras de celulose por difusão lateral (STAHLBERG *et al.*, 1996). O “linker”, por sua vez, permite a movimentação de ambos os domínios garantindo o grau de liberdade das celulasas (HIRSH *et al.*, 2010).

As duas principais celobiohidrolases produzidas pelo *T. reesei* (Cel7A e Cel6A) possuem sítios ativos localizados no interior de túneis completos formado por longos “loops” na superfície dos domínios catalíticos (KOIVULA *et al.*; 2001). Já as duas principais endoglucanases produzidas pelo fungo (Cel7A e Cel5A), por sua vez, apresentam sítios ativos abertos (ANKUSH *et al.*, 2012). Os CBDs da Cel6A e Cel5A estão localizados na extremidade N-terminal do CD, enquanto os sítios ativos da Cel7A e Cel7B estão localizados na extremidade C-terminal (KLEYWEGT *et al.*, 1997). Os CBDs de todas as celulasas conhecidas secretadas pelo *T. reesei* apresentam grande homologia em sua sequência de aminoácidos, embora apenas a estrutura tridimensional do CBD de Cel7A tenha sua conformação tridimensional conhecida com exatidão (KRAULIS *et al.*, 1989). Ainda não foi possível determinar estrutura tridimensional de celulasas contendo o CD unido ao CBD (KLEYWEGT *et al.*, 1997).

De acordo com alguns estudos, gastos com celulasas correspondem aproximadamente a 50% do custo total do processo de hidrólise enzimática de celulose (ANKUSH *et al.*, 2012). Para diminuir o impacto do custo de celulasas no processo seria necessário recuperá-las para permitir sua reutilização (LU, WEERASIRI, e LEE, 2013). Contudo recuperar enzimas solúveis é complexo e, principalmente, inviável economicamente. Nesse contexto, uma

alternativa promissora para a recuperação do complexo celulolítico seria a sua imobilização em um suporte insolúvel. Além disso, o processo de imobilização do complexo celulolítico poderia aumentar a estabilidade operacional das enzimas que o compõe frente à temperatura, pH e presença de etanol (ANDRIANI *et al.*, 2012). Desta forma, a imobilização do complexo celulolítico poderia permitir uma diminuição considerável no custo do processo de produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos. Outra vantagem da imobilização de celulases seria tornar factível o uso de altas concentrações de enzima no processo, diminuindo o tempo de hidrólise requerido (LIAO *et al.*, 2010). O custo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos diminuiu drasticamente nos últimos anos graças a esforços em engenharia genética e “downstream” para produção de complexos celulolíticos mais eficientes e baratos, porém parece que os desenvolvimentos nessa área estão diminuindo (GOKHALE e LEE, 2012). Nesse contexto, a imobilização de celulases é uma grande aposta para diminuir ainda mais o custo de hidrólise de materiais lignocelulósicos tornando o processo viável.

Complexos celulolíticos têm sido imobilizados em membranas (CHENG *et al.*, 2010; HUNG *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 1999), nano-partículas magnéticas de óxido de ferro (JORDAN, KUMAR e THEEGALA, 2011; KHOSHNEVISAN *et al.*, 2011), alginato de cálcio (ANDRIANI *et al.*, 2012), carbono ativado (DAOUD, KADDOUR e SADOON, 2010), nanotubos de carbono (LU, WEERASIRI e LEE, 2013), quitosana (E-GHAFFAR e HASHEM, 2010), álcool polivinílico (DINCER e TELEFONCU, 2007; LIAO *et al.*, 2010), quitosana modificada com álcool polivinílico (DINCER e TELEFONCU, 2007), micro-partículas de poliestireno (INCE *et al.*, 2012), sílica mesoporosa (TAKIMOTO *et al.*, 2008), além de inúmeros polímeros solúveis-insolúveis (LIANG e CAO, 2012; MISHRA, DESHPANDE e RAO, 1983; ZHANG *et al.*, 2010; ZHOU, 2010). Apesar da existência de um número considerável de trabalhos tratando da imobilização de complexos celulolíticos, a maior parte destes apresenta problemas de conceito e execução que tornam os resultados apresentados questionáveis. A imobilização de celulases em suportes insolúveis porosos pode permitir a recuperação eficiente do derivado, porém a performance do derivado, em princípio, não deve ser muito boa devido a problemas de limitação de transferência de massa. Outra alternativa investigada em alguns trabalhos é a imobilização de celulases em polímeros solúveis-insolúveis. Este tipo de suporte pode ser alterado do estado solúvel para o insolúvel através de alterações no meio reacional, como mudança de pH ou aumento de temperatura, assim uma vez tornado insolúveis esses suportes podem ser recuperados através de filtração ou centrifugação (LIANG e CAO, 2012; ZHOU, 2010). Apesar de interessante inicialmente, a recuperação de complexos celulolíticos imobilizados nesse tipo de material pode ser difícil

em meios de hidrólise de lignocelulósicos, que contém grande quantidade de sólidos em suspensão ao final do processo.

A imobilização de enzimas em suportes pode ser feita por diferentes mecanismos, cada qual com vantagens e desvantagens: encapsulação, adsorção, ligação covalente, etc. A encapsulação requer formação de rede polimérica do suporte muito estreita para impedir escape da proteína a ser imobilizada, o que geralmente implicará fortes restrições difusionais ao substrato. Adsorção tem protocolo simples, mas a união é feita por ligações fracas, com forte risco de dessorção da enzima. Ligação covalente, geralmente, requer ativação do suporte para gerar grupos reativos que irão se unir à enzima através dos grupos laterais dos resíduos de aminoácidos e/ou com grupos N-terminal ou C-terminal da estrutura enzimática, muitas vezes causando perda de atividade. Isso implica em maior custo e tempo para execução do protocolo, mas a ligação será, a princípio, mais estável. Além disso, a ligação covalente permite a realização de imobilização multipontual entre uma mesma molécula de enzima e o suporte, o que na grande maioria dos casos conduz a incrementos na estabilidade do derivado.

Na técnica ligação unipontual entre a enzima e o suporte, que ocorre, por exemplo, entre grupos aldeído no suporte e grupos N-terminal da enzima, não é esperado alteração significativa na estrutura tridimensional da proteína e, portanto, no desempenho catalítico da enzima. Já na imobilização multipontual, vários grupos reativos do suporte reagem com diferentes grupos da mesma molécula da enzima, grupos aldeído no suporte com grupos N-terminal e grupos amino de resíduos de lisina da enzima, por exemplo. Estas uniões multipontuais podem alterar significativamente as propriedades catalíticas de uma determinada enzima, incrementando suas propriedades ou ocasionando perda de atividade.

Agarose é um suporte baseado em ágar amplamente difundido e utilizado, pois possui inúmeras propriedades interessantes para imobilização de enzimas. Géis de agarose apresentam estabilidade mecânica; alta área de superfície; boa resistência à degradação microbiana; transparência ótica na região do ultravioleta e do visível o que facilita a quantificação de atividade enzimática de enzimas imobilizadas em agarose por métodos espectrofotométricos (GUISAN *et al.*, 1988; MATEO *et al.*, 2005). A química de superfície de géis de agarose é totalmente conhecida e explorada, além disso, existem vários métodos de modificação da superfície de agarose com diferentes grupos funcionais (GUISAN *et al.*, 1988; MATEO *et al.*, 2005).

Outro suporte amplamente utilizado em procedimentos de imobilização de enzimas é a resina sepabeads. Este tipo de material apresenta alta área de superfície, estrutura mesoporosa, alta resistência mecânica e resistência a ataques microbianos (MATEO *et al.*, 2003).

Sepabeads contendo inúmeros grupos funcionais em sua superfície são disponíveis comercialmente, no entanto o mais utilizado em procedimentos de imobilização de enzimas é o sepabeads-epóxido. O suporte sepabeads-epóxido, como o próprio nome sugere, possui alta densidade de grupos epóxido em sua superfície, estes grupos são capazes de reagir com inúmeros nucleófilos presentes na superfície de proteínas formando uniões covalentes (MATEO *et al.*, 2003). Em adição, sepabeads-epóxido, devido a sua alta reatividade, pode ser modificado com outros grupos funcionais gerando suportes com grupos mistos (PESSELA *et al.*, 2003).

Nesta etapa deste trabalho foram realizados inúmeros experimentos visando a imobilização de um complexo celulolítico comercial de *T. reesei* e determinação das propriedades dos derivados obtidos. Devido a grandes dificuldades encontradas em imobilizar o complexo diretamente em materiais magnéticos, optamos por testar inicialmente, a imobilização em suportes já amplamente estudados, com propriedades químicas, físicas e de superfície totalmente conhecidas. Os suportes escolhidos como modelo para seleção de métodos de imobilização do complexo celulolítico foram agarose e sepabeads-epóxido. Esses dois suportes permitem a ativação de sua superfície com inúmeros grupos funcionais, graus de ativação distintos e até mesmo grupos funcionais mistos, de modo controlado.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (Cdi), etilenodiamina (EDA), sulfato de dextrana, 2,3-Epoxy-1-propanol (glicidol), 1-cloro-2,3-epoxipropano (epicloridrina), Iminodiacetato de sódio (IDA), sulfato de dextrana (DS), polietilenoimina (PEI), membranas de diálise, carboximetilcelulose (CMC) e avicel foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Papel filtro Whatman nº 5 foi adquirido da GE Healthcare (Little Chalfont, UK) Ácido 3-dinitrosalicílico (DNS), metaperiodato de sódio, boroidreto de sódio e sulfato de cobre foram adquiridos da empresa Vetec (Brasil). Agarose 6Bcl (6%) foi adquirida da GE Healthcare e sepabeads-epóxido da Mitsubishi Chemical Corporation (Japão). O complexo celulolítico comercial de *Trichoderma reesei* (NS50013) foi doado pela empresa Novozymes (Dinamarca). Vários outros reagentes de grau analítico foram empregados neste trabalho.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Atividade Hidrolítica do Complexo Celulolítico

A atividade do complexo celulolítico, livre ou imobilizado, foi determinada empregando a velocidade inicial da reação de hidrólise de um determinado substrato (sob condições padrão de concentração, pH/tampão, e temperatura, para cada substrato) catalisada por uma concentração variável e conhecida desse complexo. Para isso, em intervalos pré-determinados, 100 µL de meio reacional foram retirados e a quantidade de produto (açúcares redutores, ou extremidades redutoras), liberadas em cada tempo, foi quantificada, empregando o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1956). Três métodos distintos foram empregados na medida de atividade do complexo celulolítico:

- 1) *Atividade hidrolítica frente a carboximetilcelulose (CMC)* - A atividade empregando CMC 1% (m/v) como substrato padrão foi medida em duas diferentes condições: a) Tampão fosfato pH 7.0 (100 ou 5 mM) a 25 °C (atividade $U_{CMC-7.0}$); b) Tampão citrato 50 mM pH 4.8 a 50 °C (atividade $U_{CMC-4.8}$). As reações foram conduzidas em reator encamisado com controle de temperatura, diferentes volumes de meio reacional e diferentes quantidades de enzima livre ou imobilizada foram empregados. Uma unidade de atividade CMC é definida como a quantidade de enzima que gera 1.0 µmol

de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio ($U_{CMC-7.0}$ ou $U_{CMC-4.8}$).

- 2) *Atividade hidrolítica frente a papel filtro Whatman (U_{PF})* - Uma determinada quantidade de enzima livre ou imobilizada foi adicionada a uma solução contendo 35 mg/mL de papel filtro Whatman (cortado em esferas com 2.5 mm de raio) em tampão citrato 50 mM pH 4.8, 50 °C, diferentes volumes de meio reacional foram empregados. A reação foi conduzida em reator encamisado com agitação mecânica. Uma unidade de atividade PF é definida como a quantidade de enzima que gera 1.0 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio (U_{PF}).
- 3) *Atividade hidrolítica frente a avicel (U_{AVICEL})* - O substrato foi preparado através da suspensão de partículas de avicel na concentração de 1% (m/v) em tampão citrato 50 mM pH 4.8. Um determinado volume de substrato foi adicionado a um reator encamisado agitado mecanicamente e em seguida uma determinada quantidade de enzima livre ou imobilizada foi, também, adicionada ao reator. As reações foram conduzidas a 50 °C. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que gera 1.0 μ mol de açúcar redutor por minuto nas condições do ensaio (U_{AVICEL}).

4.2.2.2 Análise de Proteínas Totais

A análise de proteínas totais foi realizada empregando o método de Bradford (BRADFORD; 1976).

4.2.2.3 Diálise do Complexo Celulolítico

O complexo comercial NS50013 foi diluído 10x em água MiliQ para um volume final de 20 mL. A solução diluída foi então dialisada contra 5 litros de água miliQ empregando membrana de acetato de celulose. A diálise foi realizada sob agitação magnética a 4 °C, com três trocas de água a cada 30 minutos. Ao final azida de sódio foi adicionada a solução dialisada para uma concentração final de 0.005% (m/v), esta solução foi armazenada a 4 °C até o uso.

4.2.2.4 Modificação Química na Estrutura das Enzimas do Complexo Celulolítico

Aminação de Resíduos de Ácidos Carboxílicos

A solução de NS50013 dialisada foi diluída em água MiliQ para uma concentração final de 5 mg de proteína por mL de solução, então 5 mL dessa solução foram adicionados a 45 mL de uma solução de etilenodiamina 1 M pH 4.75. Em seguida Cdii foi adicionado para uma concentração final de 1, 10 ou 100 mM e a solução resultante foi encubada a 25 °C por 2 horas. Ao final do processo a solução foi dialisada conforme descrito anteriormente, porém com 5 trocas de água. Após a diálise o complexo NS50013 aminado foi armazenado a 4 °C até o uso.

Oxidação e Redução de Carboidratos da Camada de Hidratação do Complexo Celulolítico

A solução de NS50013 dialisada foi diluída em água MiliQ para uma concentração final de 5 mg de proteína por mL de solução, 10 ou 100 µmol de metaperiodato de sódio foram então adicionados para cada mL de solução. A reação foi conduzida a 4 °C por 2 horas, ao final a solução foi dialisada contra água MiliQ, conforme descrito anteriormente. Opcionalmente após a diálise os grupos aldeídos gerados na estrutura dos carboidratos das glicosilações presentes nas proteínas foram reduzidos a grupos hidroxila empregando boroidreto de sódio na concentração de 1 mg/mL de solução. A reação foi conduzida sob agitação branda a 4 °C por 1 hora. Ao final do processo a solução resultante foi dialisada contra água MiliQ. Após a diálise o complexo NS50013 contendo açúcares modificados foi armazenado a 4 °C até o uso.

Aminação dos Açúcares da Camada de Hidratação do Complexo Celulolítico

5 mL da solução de NS50013, contendo a camada de glicosilação oxidada, como descrito no item anterior, foram adicionados a 5 mL de uma solução de etilenodiamina 0.4 M pH 7.1. A solução foi deixada para reagir por 16 horas a 4 °C sendo então reduzida com boroidreto de sódio 1 mg/mL por 1 hora, por fim a solução foi dialisada contra água MiliQ como descrito anteriormente.

4.2.2.5 Preparação de Aldeído-Dextrana

1.5 g de sulfato de dextrana, de diferentes massas molares, foram adicionados a 50 mL de uma solução de metaperiodato de sódio 0.35 M. A mistura foi incubada sob agitação a 25 °C por duas horas, ao final a solução foi dialisada contra água MiliQ e armazenada até o uso.

4.2.2.6 Preparação de Suportes

Glioxil-agarose

10.5g (massa úmida) de agarose 4% foram adicionadas a 3 mL de água destilada em banho de gelo e sob agitação mecânica suave. Em seguida 5 mL de uma solução de NaOH 1.7 M foram adicionados a mistura juntamente com 0.15g de boroidreto de sódio, então 3 mL do reagente glicidol foram adicionados e a mistura foi deixada para reagir por 12 horas a temperatura ambiente, ao final o gel gliceril-agarose obtido no processo foi filtrado e lavado. Em uma etapa posterior o gel gliceril-agarose foi re-suspendido em 135 mL de água destilada, 0.3 g de metaperiodato de sódio foram então adicionados a suspensão, a reação foi conduzida a temperatura ambiente por 2 horas. Após a etapa de oxidação o gel glioxil-agarose foi obtido. O gel foi então filtrado, lavado com água destilada e armazenado até o uso. A concentração de grupos aldeído gerados na superfície do gel glioxil-agarose foi determinada de forma indireta através de medida do metaperiodato de sódio não consumido na reação. A quantificação de metaperiodato de sódio foi realizada por iodometria (PEREIRA, 1996). 1.5 mL de uma solução 1:1 de iodeto de potássio e bicarbonato de sódio (saturadas) foram preparadas, a esta solução 25 µL do sobrenadante da solução de ativação foi adicionado ao início e ao final da reação. A absorvância da solução resultante foi medida a 520 nm, sabendo a absorvância relacionada a concentração, em µmoles, de metaperiodato de sódio ao início da reação foi possível calcular a concentração de metaperiodato de sódio ao final da reação através da absorvância obtida.

Agarose-epóxido

10.5 g (massa úmida) de agarose 4% foram adicionados a uma mistura contendo 44 mL de água destilada, 16 mL de acetona, 3.5 g de NaOH e 0.2 g de boroidreto de sódio em banho de gelo. Em seguida 11 mL do reagente epicloridrina foram lentamente adicionados a

solução, a reação foi conduzida por 12 horas a temperatura ambiente. Ao final da reação o gel agarose-epóxido foi filtrado, lavado com água destilada em abundância e armazenado até o uso.

MANAE-Agarose

Uma solução de etilenodiamina 2 M foi preparada, o pH da solução foi ajustado para 10 empregando HCl 31%. Para cada 100 mL da solução de etilenodiamina 2 M foram adicionados 10.5 g de gel glioxil-agarose. A mistura foi agitada mecanicamente por 2 horas a temperatura ambiente, em seguida foi adicionado 1.0 g de boroidreto de sódio, a solução foi então mantida sob agitação por mais duas horas. Ao final da reação o gel MANAE-agarose foi lavado abundantemente com água destilada, filtrado e armazenado até o uso.

Agarose-IDA

100 mL de uma solução de iminodiacetato de sódio (IDA) 0.5 M foram preparados e o pH da solução ajustado para 11.0, em seguida 10.5 g do gel glioxil-agarose foram adicionados a solução. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 12 horas, após este período 1.0 g de boroidreto de sódio foi adicionado a solução e a reação foi mantida por mais 1 hora. Após a etapa de redução com boroidreto de sódio o gel agarose-IDA foi filtrado, lavado com água destilada e armazenado até o uso.

Agarose-IDA-Cu⁺

100 mL de uma solução de sulfato de cobre 10 mg/mL foi preparada, a esta solução foram adicionados 10.5 gramas do suporte agarose-IDA. A reação foi conduzida por 1 hora, ao final da reação o suporte foi filtrado e lavado com água destilada e armazenado até o uso.

Agarose-PEI

Uma solução de polietilenoimina (PEI) 10% (m/v) foi preparada em água destilada, o pH da solução foi então ajustado para 11.0. A 100 mL desta solução foram adicionados 10.5 g de glioxil-agarose, a suspensão resultante foi encubada por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período 1 g de boroidreto de sódio foi adicionado, a mistura resultante foi então

mantida sob agitação por mais 1 hora. Ao final da reação o suporte foi filtrado, lavado com água destilada e armazenado até o uso.

Agarose-DS

Foram preparados 25 mL de uma solução de sulfato de dextrana (DS) na concentração de 40 mg/mL em tampão fosfato 25 mM, pH 7.0, a esta solução foram adicionados 10.5 g de gel MANAE-agarose. A suspensão foi deixada para reagir por 12 horas a temperatura ambiente, ao final da reação o gel agarose-DS foi filtrado, lavado com água destilada e armazenado até o uso.

Glioxil-agarose-IDA-Cu⁺

100 mL de uma solução de iminodiacetato de sódio 0.5 M foram preparados e o pH da solução ajustado para 11.0, em seguida 10.5 g do gel agarose-epóxido foram adicionados a solução. A suspensão resultante foi encubada a temperatura ambiente por 12 horas, após este período 1g de boroidreto de sódio foi adicionado a solução e a reação mantida por mais 1 hora. Após a etapa de redução com boroidreto de sódio o gel agarose-IDA foi filtrado e lavado com água destilada. Em seguida os grupos gliceril presentes no suporte, remanescentes da ativação com epícloridrina foram oxidados empregado metaperiodato de sódio (mesma condição usada para oxidação de gliceril-agarose) gerando o gel glioxil-agarose-IDA. Finalmente, foram preparados 100 mL de uma solução de sulfato de cobre 10 mg/mL, a esta solução foram adicionados 10.5 gramas do suporte glioxil-agarose-IDA. A reação foi conduzida por 1 hora, ao final da reação o suporte glioxil-agarose-IDA-Cu⁺ foi filtrado, lavado com água destilada e armazenado até o uso.

Agarose-IDA-epóxido

Uma solução de imodiacetato de sódio 100 mM pH 10.0 foi preparada, a 100 mL desta solução foram adicionados 10.5 g do gel agarose-epóxido. A reação foi conduzida sob agitação mecânica a temperatura ambiente por 1, 2 ou 5 horas com o objetivo de controlar o grau de modificação da superfície do material. Após a reação o gel agarose-IDA-epóxido foi filtrado, lavado com água destilada e armazenado até o uso.

MANAE-epóxido

10.5 g do gel MANAE-agarose foram adicionados a 80 mL de tampão bicarbonato 100 mM pH 9.0. Em seguida foram adicionados a mistura, sob agitação, 12 mL de acetona e 20 mL de epícloridrina. A mistura foi mantida sob agitação mecânica a 25 °C por 12 horas. Ao final da reação o gel MANAE-epóxido foi filtrado, lavado com água destilada em abundância e armazenado até o uso.

MANAE-Glutaraldeído

10.5 g de MANAE-agarose foram adicionados a 12 mL de tampão fosfato 200 mM pH 7.0, em seguida 17 mL de uma solução de glutaraldeído 25% foi adicionada a mistura. A reação foi conduzida sob agitação mecânica a temperatura ambiente por 12 horas. Após a ativação do gel MANAE-agarose com glutaraldeído o gel foi filtrado e lavado de forma abundante com água destilada. Este suporte não pode ser armazenado por muito tempo, portanto foi empregado logo após sua preparação.

Sepabeads-Epóxido-Amino

10 g de suporte sepabeads-epóxido (massa seca) foram adicionados a 100 mL de uma solução de etilenodiamina 0.1 M pH 10.0. A suspensão foi encubada em temperatura ambiente e sob agitação mecânica por 1, 2, ou 5 horas. Ao final da reação o suporte sepabeads-epóxido parcialmente modificado com grupos amino foi filtrado, lavado e armazenado até o uso.

4.2.2.7 Procedimentos de Imobilização

Todos os procedimentos de imobilização foram realizados empregando o mesmo protocolo geral, independentemente do suporte ou da condição da enzima. Para cada 1.0 g de suporte (qualquer um dos suportes empregados) foram adicionados 9 mL de solução de enzima comercial (NS50013) diluída 100 vezes em tampão. Para enzimas que tiveram sua estrutura química modificada (aminação de aminoácidos, oxidação e/ou redução de açúcares, aaminação de açúcares) a diluição final da solução de imobilização foi ajustada para ser igual a 100 vezes.

A imobilização em glioxil-agarose foi efetuada empregando tampão bicarbonato 100

mM pH 10.0 para enzimas não modificadas e pH 9.0 ou 8.5 para enzimas aminadas (aminoácidos ou açúcares), o tempo de incubação foi variável e a temperatura de incubação empregada foi de 25 ou 4 °C. Ao final da reação os derivados obtidos foram reduzidos com boroidreto de sódio 0.1 mg/mL a 4 °C, filtrados, lavados e re-suspendidos em tampão fosfato 100 mM pH 7.0.

A imobilização em sephabeads-epóxido foi efetuada empregando tampão fosfato 100 mM ou 1.0 M, pH 7.0 ou 8.0, o tempo de incubação foi variável e a temperatura de incubação foi de 25 ou 4 °C, em alguns experimentos NaCl foi adicionado para uma concentração final de 1 M. Ao final da reação o derivado foi filtrado, lavado e re-suspendido em tampão fosfato 100 mM pH 7.0.

Para a imobilização em agarose-bromocianógeno o suporte foi previamente ativado com HCl 0.1 M por 30 minutos. A imobilização foi efetuada em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 a 4 °C por 0.5 ou 1.5 horas, ao final da reação o derivado foi filtrado, lavado e re-suspendido em tampão fosfato 100 mM pH 7.0.

A adsorção em suporte agarose-IDA-Cu⁺ foi realizada em tampão fosfato pH 7.0 com força iônica de 100 ou 5 mM. A incubação da enzima na presença do suporte foi realizada por 16 horas a 25 °C. Ao final da reação o derivado foi filtrado, e re-suspendido em tampão fosfato 100 mM ou 5 mM pH 7.0.

A adsorção em suportes trocadores catiônicos (DEAE-sepharose, Q-sepharose, MANAE, agarose-PEI) e aniônicos (agarose-DS) foi realizada em tampão fosfato 5 mM pH 7.0. O processo foi conduzido a 25 °C e o tempo de incubação foi de 3 horas. Ao final da reação os derivados foram filtrados e re-suspendidos em tampão fosfato 5 mM pH 7.0. Derivados adsorvidos em suporte MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino eventualmente foram entrecruzados empregando glutaraldeído em diferentes concentrações ou dextrana-aldeído de diferentes massas moleculares e em diferentes concentrações. As reações de entrecruzamento foram realizadas através da adição de soluções concentradas de glutaraldeído ou dextrana-aldeído ao meio de incubação logo após a adsorção. A mistura resultante foi incubada por 1 hora a 25 °C, após este período os derivados foram filtrados, lavados e re-suspendidos em tampão fosfato 100 mM pH 7.0.

O complexo celulolítico foi imobilizado em glioxil-agarose-IDA-Cu⁺ em duas etapas primeiro adsorção em tampão fosfato 100 mM pH 7.0, a adsorção foi realizada a 25 °C por diferentes períodos. Em seguida o derivado foi filtrado sem lavar e re-suspendido em tampão bicarbonato 100 mM pH 10.0 (enzimas não modificadas) ou 9.0 (ácidos carboxílicos aminados) e incubado por 1 hora a 25 °C. Após este período o derivado foi reduzido a 4 °C

empregando boroidreto de sódio (0.1 mg/mL), lavado e re-suspendido em tampão fosfato 100 mM pH 7.0.

A imobilização do complexo celulolítico no suporte agarose-IDA-epóxido foi realizada em duas etapas. A primeira etapa foi a adsorção em tampão fosfato 5 mM pH 7.0, esta etapa foi conduzida a 25 °C por 72 horas. Em seguida o derivado foi filtrado sem lavar e re-suspendido em tampão bicarbonato 100 mM pH 9.0 e incubado por 1 hora a 25 °C. Após este período o derivado foi filtrado, lavado e re-suspendido em tampão fosfato 100 mM pH 7.0.

A imobilização do complexo celulolítico em suportes mistos contendo grupos reativos capazes de formar uniões covalente e grupos amino (MANAE-epóxido, sepabeads-epóxido-amino e MANAE-glutaraldeído) foi realizada em tampão fosfato 5 mM pH 7.0 a 25 °C, vários períodos diferentes de incubação foram utilizados. Ao final da reação os derivados foram filtrados, lavados e re-suspendidos em tampão fosfato 100 mM pH 7.0.

4.2.2.8 Cálculo de Rendimento de Imobilização (R_I), Atividade Recuperada ($R\%$) e Atividade Efetivamente Imobilizada (A_E)

O rendimento de imobilização (R_I) foi calculado através da equação 4.1, onde At_f é a atividade enzimática total observada no sobrenadante da solução de imobilização ao final do processo e At_i é a atividade enzimática total observada no sobrenadante da solução de imobilização no início do processo.

$$R_I = \left(1 - \frac{At_f}{At_i}\right) \times 100 \text{ Eq. (4.1)}$$

A atividade teórica (AT), ou seja, a atividade que se espera observar no derivado após o procedimento de imobilização foi calculada de acordo com a equação 4.2:

$$AT = At_i - At_f \text{ Eq. (4.2)}$$

Onde At_i é a atividade medida no sobrenadante no início da reação e At_f é a atividade medida no sobrenadante ao final do procedimento de imobilização.

O cálculo de atividade recuperada ($R\%$) foi realizado conforme a equação 4.3:

$$R\% = \left(\frac{At_d}{AT}\right) \times 100 \text{ Eq. (4.3)}$$

Onde At_d é a atividade total observada no derivado ao final do processo de imobilização.

Para avaliar o processo de imobilização independentemente de R_I e AT o cálculo atividade efetivamente imobilizada (A_E) foi realizado de acordo com a equação 4.4:

$$A_E = \left(\frac{At_d}{At_i}\right) \times 100 \text{ Eq. (4.4)}$$

Durante o acompanhamento cinético de experimentos de imobilização e experimentos de estabilidade térmica a atividade observada no sobrenadante e na suspensão das soluções de imobilização foi expressa em termos de atividade residual (A_r) que era calculada de acordo com a equação 4.5:

$$A_r = \left(\frac{Af}{Ao}\right) \times 100 \text{ Eq. (4.5)}$$

Onde Ao é a atividade medida no sobrenadante/suspensão no início do processo de imobilização/experimento de estabilidade térmica e Af é a atividade medida no sobrenadante/suspensão no decorrer do processo de imobilização/experimento de estabilidade térmica.

De forma semelhante a concentração de proteínas no sobrenadante de processos de imobilização foi expressa em termos de proteínas residuais (P_r) que foi calculada conforme a equação 4.6:

$$P_r = \left(\frac{Pf}{Po}\right) \times 100 \text{ Eq. (4.6)}$$

Onde Po é a concentração de proteínas totais no início do processo de imobilização e Pf é a concentração de proteínas totais medidas no sobrenadante no decorrer do processo de imobilização.

4.2.2.9 Avaliação da Estabilidade Térmica

Os experimentos de estabilidade térmica foram realizados empregando complexo celulolítico livre ou imobilizado. Para a enzima livre 5 mL do complexo celulolítico NS50013 diluído 100 vezes em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 foi encubado a 45 °C, em intervalos de tempo pré-definidos alíquotas da solução foram retiradas e a atividade residual medida empregando CMC_{7,0} como substrato (tampão fosfato 100 mM pH 7.0 e 25 °C). Para a enzima imobilizada 0.5 g de derivado foram re-suspendidos em 5 mL de tampão fosfato pH 7.0 e incubados a 45 °C, alíquotas da suspensão foram retiradas e a atividade residual (A_r) foi medida empregando CMC_{7,0} como substrato e calculada conforme equação 4.5.

4.2.2.10 Experimentos de Hidrólise Longa de Papel

Experimentos de hidrólise de papel filtro Whatman n° 5 por longos períodos foram realizados em tampão citrato 50 mM, pH 4.8. Papel filtro cortado em esferas de 2.5 mm de raio foram suspensos em 15 mL de tampão rendendo concentrações de 50, 35 ou 4.7 mg/mL. Ao meio reacional foram adicionados 5.25 U_{PF} de NS50013 livre ou imobilizado em MANAE-40 entrecruzada com glutaraldeído 0.15%. A reação foi conduzida em reator encamisado agitado mecanicamente a 50 °C, o reator era tampado e possuía um sistema de condensação para evitar a evaporação do meio reacional. O tempo de reação empregado foi variável, em todos os casos a reação foi acompanhada através da retirada de alíquotas do meio reacional para quantificação de açúcares redutores totais por DNS.

4.2.2.11 Experimentos de Hidrólise de Papel Filtro e Reciclo de NS50013 Imobilizada

O reciclo de NS50013 imobilizada em MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.15% foi realizado adicionando 5.25 U_{PF} de derivado ao meio reacional composto de papel filtro Whatman n° 5 (esferas de 2.5 mm de raio) suspensos em 15 mL de tampão citrato 50 mM pH 4.8 (4.7 mg/mL de papel filtro). A reação foi realizada em reator encamisado com sistema de condensação e agitado mecanicamente a 50 °C por 24 horas. Ao final da reação a concentração de açúcares redutores totais formados durante o processo foi quantificada por DNS. O derivado foi então filtrado, lavado com água destilada e adicionado novamente ao reator contendo novo meio reacional preparado nas mesmas condições descritas anteriormente, um novo ciclo reacional era então iniciado.

4.3 Resultados e Discussão

O complexo NS50013 é formado por celobiohidrolases (antigamente chamadas de exo-celulases), endoglucanases (antigamente chamadas de endo-celulases) e beta-glicosidases provenientes do fungo *Trichoderma reesei*, que é a principal fonte de enzimas celulolíticas comercializadas industrialmente por diferentes empresas (LIU *et al.*, 2001; MATTINEN *et al.*, 1997). Através de estudos preliminares empregando carboximetilcelulose (CMC), avicel e celobiose em condições padrão foi determinado que o complexo NS50013 possui alta atividade celulolítica e baixa concentração de beta-glicosidase. A baixa concentração de beta-glicosidase no meio favorece a utilização de NS50013 como complexo celulolítico modelo uma vez que diminui o número de variáveis a serem investigadas.

A hidrólise total de celulose natural a glicose requer a ação sinérgica de celobiohidrolases (CBHs), endoglucanases (EGs) e beta-glicosidases (BGs). As EGs apresentam papel fundamental no início da reação, quando o meio reacional possui grandes quantidades de cadeias longas de celulose, porém a velocidade global da reação é determinada pela atividade de CBHs que hidrolisam cadeias de celulose a partir de suas extremidades reductoras e não reductoras liberando como produto principalmente celobiose (KLEYWEGT *et al.*, 1997; MATTINEN *et al.*, 1997). Uma vez que o acúmulo de celobiose no meio causa inibição da atividade de CBHs e EGs (em alguns casos), a atividade de BGs apresenta papel muito importante em estágios mais avançados da reação por evitar acúmulo de celobiose no meio e conseqüentemente inibição das enzimas celulolíticas (ANKUSH *et al.*, 2012). No complexo celulolítico excretado pelo fungo *T. reesei* geralmente CBHs representam aproximadamente 70% do total de enzimas presentes no complexo (KLEYWEGT *et al.*, 1997; SANDGREN *et al.*, 2001).

Em processos de imobilização de enzimas é necessário utilizar métodos de detecção de atividade rápidos, precisos e confiáveis. A melhor maneira de detectar a atividade de complexos celulolíticos é através da medida de açúcares redutores liberados no meio reacional utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1956). Nesse contexto, elegemos CMC como substrato padrão para acompanhamento do processo de imobilização de celulases uma vez que este substrato é solúvel, o que permite avaliar a imobilização de celulases mesmo em suportes porosos. O método padrão de hidrólise de CMC (pH 4.8 e 50 °C), por sua vez, teve que ser modificado para permitir o acompanhamento preciso do processo de imobilização. Em experimentos preliminares foi verificado que, mesmo em diluições extremamente altas da enzima, a atividade celulolítica foi prejudicada devido à

inibição causada pelo acúmulo de celobiose no meio reacional já nos minutos iniciais de reação. Para solucionar este problema de forma a permitir o trabalho com diferentes diluições do complexo enzimático e aumentar a confiabilidade do método as medidas de atividade não foram realizadas na condição padrão e sim em tampão fosfato pH 7.0 a 25 °C empregando CMC de baixa viscosidade na concentração de 1%. Nessa condição foi possível garantir a velocidade máxima de atividade para o complexo enzimático sem problemas de inibição para diferentes diluições e em diferentes tempos de reação.

Nos experimentos de imobilização do complexo celulolítico foram utilizados 17 suportes diferentes, dos quais 15 consistiam de agarose 4% ativada com diferentes grupos funcionais, conforme pode ser observado na Tabela 4.1, onde se apresentam todos os suportes empregados neste estudo. Também foram realizadas modificações químicas na estrutura da enzima com o objetivo de facilitar alguns procedimentos de imobilização. Ao todo foram empregadas 60 condições de imobilização diferentes variando o suporte, condição da enzima (nativa ou modificada quimicamente) e o protocolo de imobilização.

4.3.1 Modificação Química do Complexo Celulolítico

Para testar diferentes condições de imobilização, o complexo celulolítico NS50013 também foi modificado quimicamente através de aminação dos ácidos carboxílicos presentes na estrutura protéica, oxidação da camada de glicosilação que rodeia as proteínas do complexo, oxidação seguida de redução da camada de glicosilação, e oxidação e aminação da camada de glicosilação. Os resultados desses processos são apresentados na Tabela 4.2. Antes dos processos de modificação química ou aminação o complexo NS50013 foi dialisado em membrana de acetato de celulose, em procedimento realizado a 4 °C por 1 hora com trocas de água a cada 20 minutos para acelerar o processo. Nessas condições, aproximadamente 5% da atividade foi perdida no processo por passagem de enzimas através da membrana ou adsorção na membrana de diálise.

Durante o processo de aminação química dos resíduos de ácido aspártico e glutâmico foram empregadas 3 concentrações molares diferentes do ativador Cdii. A concentração desse reagente Cdii define o grau de modificação dos ácidos carboxílicos das proteínas (JORDAN, KUMAR e THEEGALA, 2011), desta forma é esperado um aumento na atividade relativa perdida durante o processo com o aumento da concentração de Cdii empregada. Quando Cdii 100 mM foi empregado, 100% da atividade enzimática foi perdida durante o processo, já quando Cdii 10 mM foi empregado 83% da atividade foi perdida. Esses resultados indicam

baixa tolerância do complexo celulolítico, até mesmo a concentrações moderadas de Cdi. Isso pode ser explicado pela presença de ácidos carboxílicos no sítio ativo das celulasas que são essenciais ao processo de catálise (JORDAN, KUMAR e THEEGALA, 2011; KLEYWEGT *et al.*, 1997). A aminação empregando Cdi 10 mM foi repetida na presença de celobiose 2%, que é um inibidor competitivo de CBHs e EGs, visando proteger o sítio ativo das enzimas. Isso permitiu reduzir a atividade perdida no processo para 60%. Zhou *et al.* (2010) avaliaram a imobilização de celulasas de *Trichoderma viride* em polímeros solúveis-insolúveis de quitosana modificada quimicamente e também observaram perda de atividade com o aumento na concentração de Cdi empregada no processo.

Tabela 4.1- Lista de suportes empregados na imobilização do complexo celulolítico NS50013.

Lista de suportes

Glioxil-agarose
Agarose-epóxido
Agarose-bromocianógeno
Agarose-IDA
Agarose-IDA-Cu ⁺
MANAE-agarose
Agarose-PEI
Agarose-DS
Glioxil-agarose-IDA-Cu ⁺
Agarose-IDA-epóxido
MANAE-epóxido
MANAE-glutaraldeído
MANAE + glutaraldeído
DEAE-sepharose
Sepharose-Q
Sepabeads-epóxido
Sepabeads-amino-epóxido

Tabela 4.2 – Influência da modificação química na estrutura das proteínas presentes no complexo NS50013 na atividade celulolítica.

	Perda de Atividade Na etapa	Perda total de Atividade
Diálise	5%	5%
Aminação com Cdi 1 mM	32%	32%
Aminação com Cdi 10 mM	83%	83%
Aminação com Cdi 100 mM	100%	100%
Aminação com Cdi 10 mM + celobiose 2%	60%	60%
Oxidação de açúcares - Metaperiodato de sódio 10 µmol/mL	0%	0%
Oxidação de açúcares - metaperiodato de sódio 100 µmol/mL	8%	8%
Redução dos açúcares aminados	10%	18%*
Aminação dos Açúcares	11%	19%*

*A perda de atividade nas etapas anteriores foi somada à perda de atividade na etapa para indicar a perda total de atividade no processo de modificação química.

Assim como a maioria das enzimas secretadas por fungos, as celulasas secretadas por *T. reesei* são altamente glicosiladas (KLEYWEGT *et al.*, 1997; ROUVINEN *et al.*, 1990; WOODWARD e ZACHRY, 1982). Uma alternativa interessante é utilizar essas glicosilações no processo de imobilização (WOODWARD e ZACHRY, 1982). Assim, as glicosilações das proteínas presentes no complexo passaram a ser modificadas quimicamente de inúmeras maneiras. Inicialmente, os açúcares das glicosilações foram oxidados empregando duas

concentrações diferentes de metaperiodato de sódio, praticamente sem perda na atividade catalítica (Tabela 4.2). A oxidação dos açúcares presentes na estrutura das enzimas, a grupos aldeído permite a posterior reação covalente com suportes ativados, por exemplo, com grupos amino. A camada de glicosilação oxidada com metaperiodato de sódio 10 mM também foi aminada em uma etapa posterior de reação, com o objetivo de facilitar a imobilização em suportes ativados com grupos aldeído ou epóxido, processo esse que causava perda total de 19% de atividade. Por vezes camadas de glicosilação em proteínas podem interferir no processo de imobilização impedindo o contato direto da superfície da proteína com a superfície do suporte. Com o objetivo de diminuir a camada de glicosilação que envolve as enzimas do complexo NS50013 após a oxidação com metaperiodato de sódio 100 mM, os grupos aldeído formados foram então reduzidos empregando boroidreto de sódio 1%. Esse procedimento causava perda de 18% da atividade enzimática. Woodward e Zachry (1981) avaliaram a aaminação da camada de glicosilação de celulases de *T. reesei* empregando um método muito similar ao utilizado neste trabalho, e reportaram perda total de 37% de atividade no processo (atividade frente a CMC).

4.3.2 Imobilização em Suportes Ativados com Grupos Glioxil e Epóxido

4.3.2.1 Grupos Glioxil

Na Tabela 4.3 estão relacionados os experimentos de imobilização do complexo NS50013 em glioxil-agarose 4%. A imobilização de enzimas em suportes glioxil-agarose através da cadeia lateral dos resíduos lisina necessita ser realizada a valores de pH superiores a 10.0 para se obter concentração adequada de grupos amino desprotonados para reagirem. Contudo, foi observado em experimentos preliminares que valores de pH elevados causam perda de atividade do complexo após longos períodos de incubação. Para contornar este problema alguns agentes estabilizantes foram testados (polietilenoglicol, manose e glicerol) em diferentes concentrações, obtendo-se o melhor resultado com glicerol 50% como aditivo, condição na qual não foi observada perda significativa de atividade. A Figura 4.3 mostra a cinética de imobilização do complexo celulolítico não modificado em glioxil-agarose a 4 e 25 °C (condição 1.1 e 1.2 na Tabela 4.3). Após 24 horas a 4 °C, 12% da proteína presente no sobrenadante foi imobilizada no suporte ($R_I = 12\%$). O mesmo procedimento foi realizado a 25 °C, condição na qual 31% da atividade desapareceu do sobrenadante. Em ambos os casos não foi observada perda de atividade no branco reacional, mas foi observada perda de

atividade na suspensão devido ao processo de imobilização. Esse resultado sugere que conforme a enzima se imobilizava no suporte perdia atividade. Para nenhuma das duas condições testadas foi verificada atividade enzimática no derivado obtido ao final do processo.

Devido à baixa quantidade de resíduos de lisina na superfície das enzimas do complexo celulolítico (DIVNE *et al.*, 1998; KLEYWEGT *et al.*, 1997; MATTINEN *et al.*, 1997; ROUVINEN *et al.*, 1990; SANDGREN *et al.*, 2001) a imobilização em suportes glioxil-agarose não foi satisfatória. Optou-se, por isso, em experimentos posteriores, pela utilização do complexo celulolítico contendo ácidos carboxílicos aminados. Em experimentos preliminares as enzimas aminadas empregando C_{dii} 1.0 mM apresentaram perfil de imobilização similar ao da enzima nativa indicando que a concentração de C_{dii} empregada não foi suficiente para efetuar o procedimento de aminação dos ácidos carboxílicos na estrutura das proteínas de forma satisfatória. O complexo aminado empregando C_{dii} 10 mM na presença de celobiose 2% foi empregado para os demais experimentos. A imobilização empregando proteínas contendo os ácidos carboxílicos aminados foi realizada a pH 9.0 e 8.5 uma vez que o pK_a do grupo amino introduzido na superfície da estrutura das proteínas é inferior ao das lisinas. Após 36 horas de imobilização a 4 °C (Tabela 4.3, condição 1.3) 100% das enzimas e das proteínas presentes no sobrenadante foram imobilizadas no suporte. Ao final do processo de imobilização a suspensão também perdia 100% da atividade. Na Figura 4.4, que mostra a cinética de imobilização do complexo celulolítico aminado a pH 9.0 e 25 °C (condição 1.4 na Tabela 4.3), é possível verificar que com 5 horas mais de 70% das celulasas e das proteínas presentes no sobrenadante foram imobilizadas no suporte, enquanto a suspensão conservava 75% da atividade inicial. Após 24 horas, no entanto, não foi observada atividade tanto no sobrenadante quanto na suspensão. Através da análise das curvas de imobilização na Figura 4.4, é possível verificar que a suspensão perdia atividade em função do tempo de incubação, como ocorria nos experimentos anteriores empregando a enzima não aminada. Um novo experimento de imobilização foi realizado a pH 8.5 e 25 °C (condição 1.5 na Tabela 4.3 e Figura 4.5). Nesse novo experimento, no momento em que a atividade no sobrenadante diminuiu para um valor próximo a 50%, o processo de imobilização foi paralisado e o suporte foi reduzido empregando boroidreto de sódio 0.1 mg/mL a 4 °C. Após a redução não foi observado atividade no derivado, e também não foi observado dessorção de enzimas e nem de proteínas após re-suspensão do derivado.

Tabela 4.3 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em glioxil-agarose.

GLIOXIL AGAROSE 4%											
Condição	Enzima	pH	Força Iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R_I	R_P	Atividade		
									Proteína	Perdida no Processo	$R\%$
1.1	Não modificada	10.0	25 mM	Glicerol 50% (m/m)	4°C	24	12%	19%	10%	0%	0%
1.2	Não modificada	10.0	25 mM	Glicerol 50% (m/m)	25°C	24	31%	37%	14%	0%	0%
1.3	Aminada	9.0	25 mM	não	4°C	36	100%	100%	100%	0%	0%
1.4	Aminada	9.0	25 mM	não	25°C	24	100%	100%	100%	0%	0%
1.5	Aminada	8.5	25 mM	não	25°C	3.5	48%	28%	26%	0%	0%
1.6	Açúcares Aminados	8.5	25 mM	não	25°C	144	77%	38%	34%	0%	0%

Figura 4.3 – Imobilização do complexo NS50013 em glioxil-agarose. Imobilização a 4°C - ● atividade enzimática no sobrenadante; ▼ atividade enzimática na suspensão; ▲ proteínas totais no sobrenadante; ■ branco reacional. Imobilização a 25 °C - ○ atividade enzimática no sobrenadante; ▽ atividade enzimática na suspensão; △ proteínas totais no sobrenadante; ▽ branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).

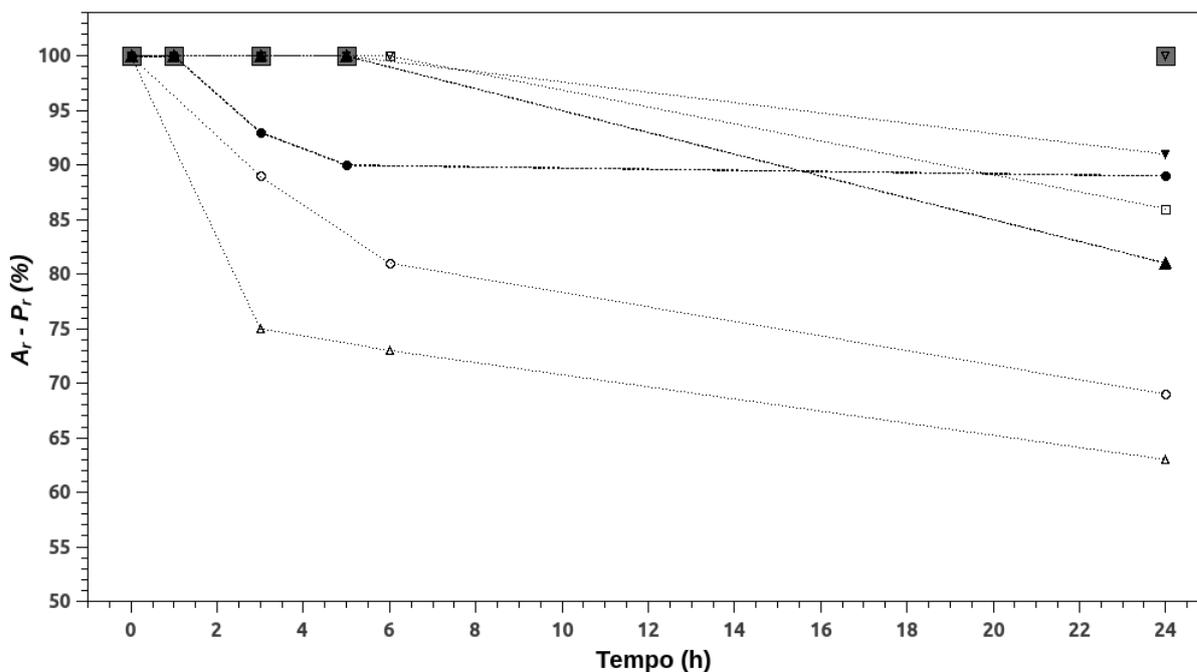
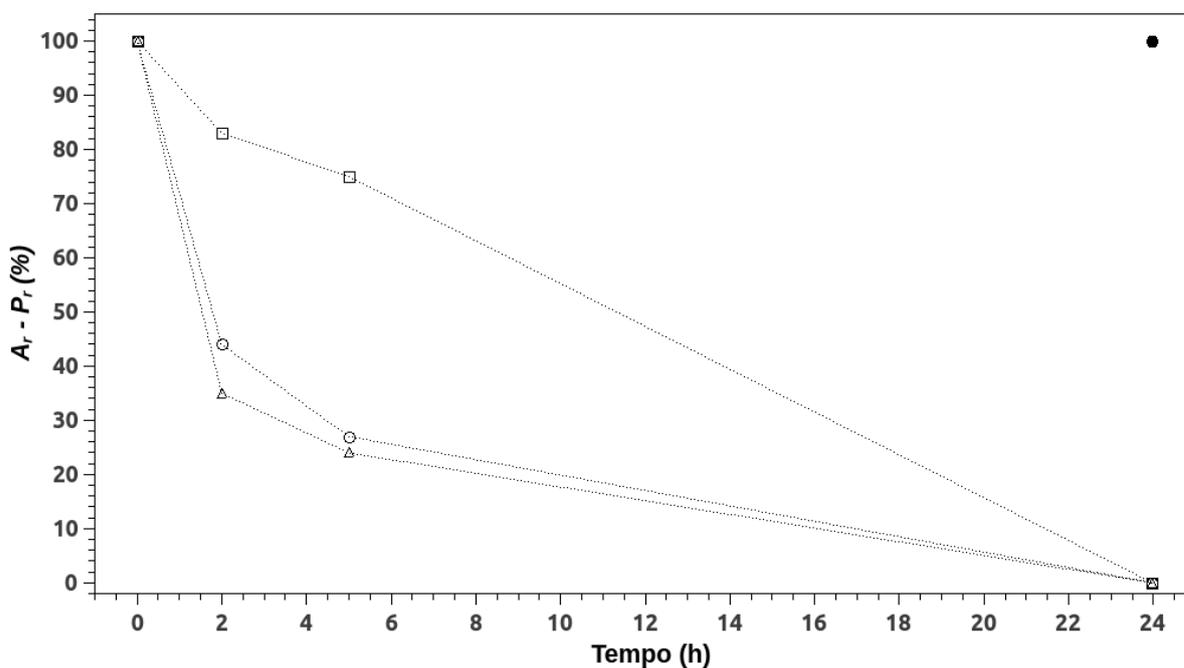


Figura 4.4 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo os ácidos carboxílicos aminados (Cdi 10 mM na presença de celobiose 2%) em glioxil-agarose a pH 9.0 e 25 °C. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; ▽ atividade na suspensão; ● branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).



Uma alternativa interessante para a imobilização de enzimas glicosiladas em suportes ativadas com grupos glioxil é a imobilização dessas enzimas através de sua camada de glicosilação previamente aminada (condição 1.6 na Tabela 4.3). A Figura 4.6 mostra a imobilização do complexo celulolítico contendo glicosilações aminadas a pH 8.5 e 25 °C. A imobilização foi lenta, mas permitiu a imobilização de 77% da atividade presente no sobrenadante após 144 horas, conservando 65% da atividade inicial observada na suspensão. Contudo, novamente, após o procedimento de redução com boroidreto de sódio 0.1 mg/mL, não foi observada atividade no derivado ao final do processo. O experimento de imobilização foi repetido, paralisando-se a reação e reduzindo-se o derivado, quando a atividade no sobrenadante era de aproximadamente 50% da atividade inicial. Da mesma forma que no experimento anterior, não foi observada atividade no derivado após redução. Estudos paralelos foram realizados para averiguar se o complexo perdia atividade por influencia do boroidreto de sódio. O complexo celulolítico, na mesma concentração empregada nos procedimentos de imobilização, foi incubado por 1 hora a 25 °C na presença de 1 mg/mL de boroidreto de sódio (uma concentração 10 vezes maior do que a empregada na redução dos suportes) e não foi observada perda significativa de atividade. Woodward e Zachry (1981) imobilizaram celulases de *T. reesei* contendo a camada de glicosilação aminada em agarose-bromocianógeno, um método que pode ser considerado pouco agressivo, e de forma similar observaram quase 100% de perda de atividade após o processo ($R\%$ foi de 9%).

4.3.2.2 Grupos Epóxido

Também foram testados suportes sepabeads-epóxido na imobilização do complexo celulolítico NS50013 (Tabela 4.4). A imobilização nesse suporte requer que a enzima seja inicialmente atraída ao suporte para viabilizar a interação entre grupos epóxido do suporte e grupos reativos na superfície das enzimas. Suportes sepabeads-epóxido são moderadamente hidrofóbicos e visando induzir a adsorção das proteínas em solução através de suas regiões hidrofóbicas, utilizamos alta força iônica do meio reacional. Desta forma, uma vez que a enzima encontra-se adsorvida ao suporte a reação entre os grupos reativos na superfície das proteínas e na superfície do suporte torna-se intramolecular, podendo ocorrer até mesmo em baixos valores de pH (MATEO *et al.*, 2003). Torna-se assim possível a imobilização multipontual da enzima em valores de pH inferiores a 10.0, conforme requerido para imobilização com grupos glioxil. Inicialmente, foi empregado NaCl na concentração de 1M em tampão fosfato pH 7.0 e 8.0 para induzir a adsorção hidrofóbica das enzimas ao suporte

(condições 1.7 e 1.8 na Tabela 4.4). Como pode ser observado nas Figuras 4.7 e 4.8, a adição de NaCl foi suficiente para a rápida adsorção de 25% e 42% da atividade inicial a pH 7.0 e 8.0, respectivamente. Apesar da rápida adsorção parcial das proteínas no meio a pH 7.0, não foi observada a formação de uniões covalentes entre a enzima e o suporte mesmo após longos períodos de incubação. Quando o derivado foi re-suspendido em tampão fosfato 100 mM toda a enzima adsorvida ao suporte foi dessorvida e não foi observado atividade no derivado final. A pH 8.0 a adsorção de enzimas foi mais intensa, e, nesta condição, foi observada perda de atividade na suspensão com o aumento no tempo de incubação indicando reação de celulases com o suporte. No entanto, ao final do processo toda a enzima ativa unida ao suporte, provavelmente apenas adsorvida, também foi dessorvida quando este foi incubado em tampão fosfato 100 mM. Assim, tal como nos experimentos anteriores de imobilização em glioxil-agarose, havia indicativos de que as celulases perdiam atividade ao se ligarem covalentemente ao suporte.

Figura 4.5 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo ácidos carboxílicos aminados (Cdi 10 mM na presença de celobiose 2%) em glioxil-agarose a pH 8.5 e 25 °C. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; ◻ atividade na suspensão; ● branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).

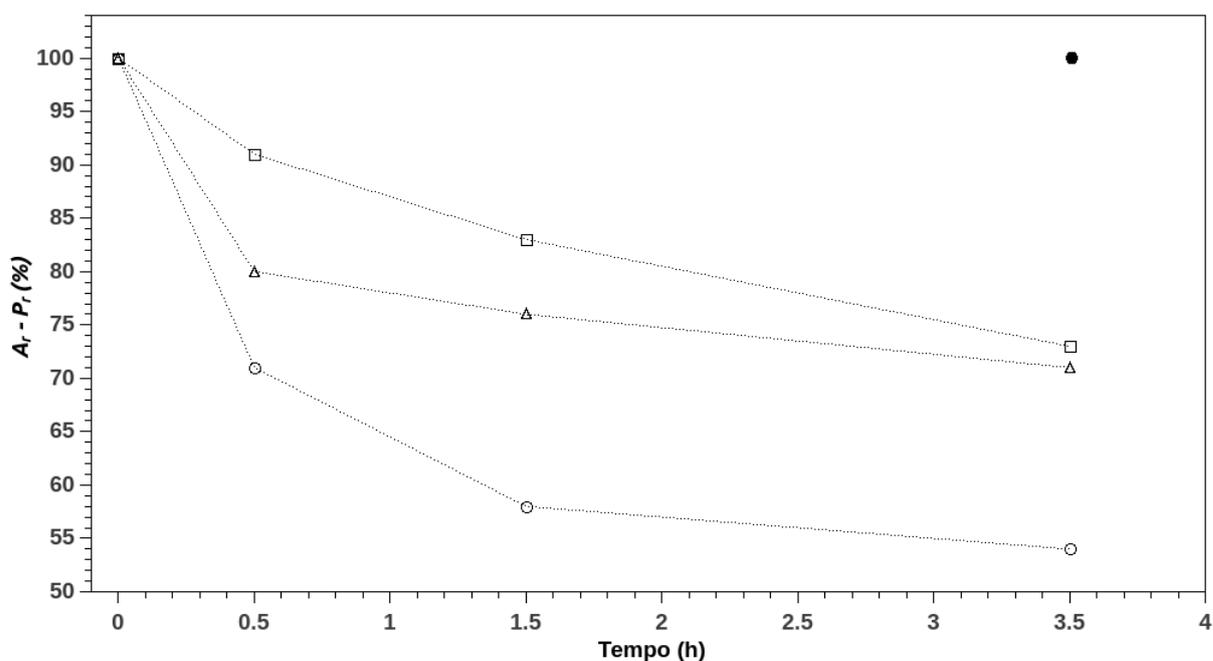


Figura 4.6 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo açúcares aminados em glioxil-agarose a pH 8.5 e 25 °C. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; □ atividade na suspensão; ● atividade no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).

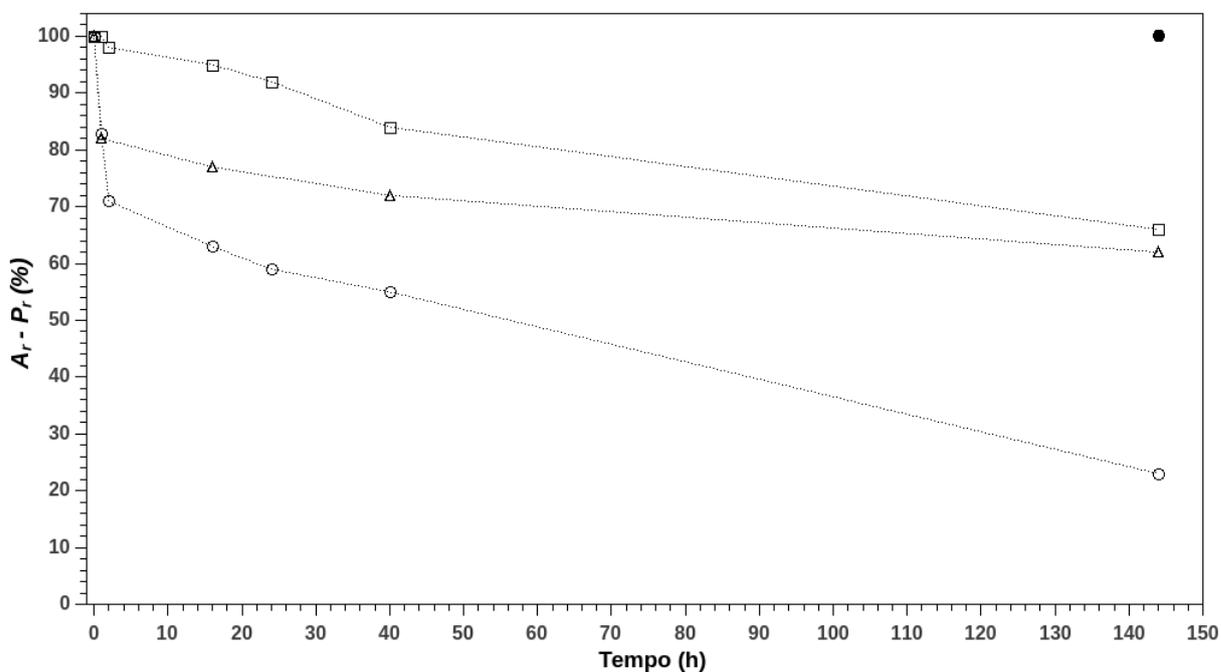
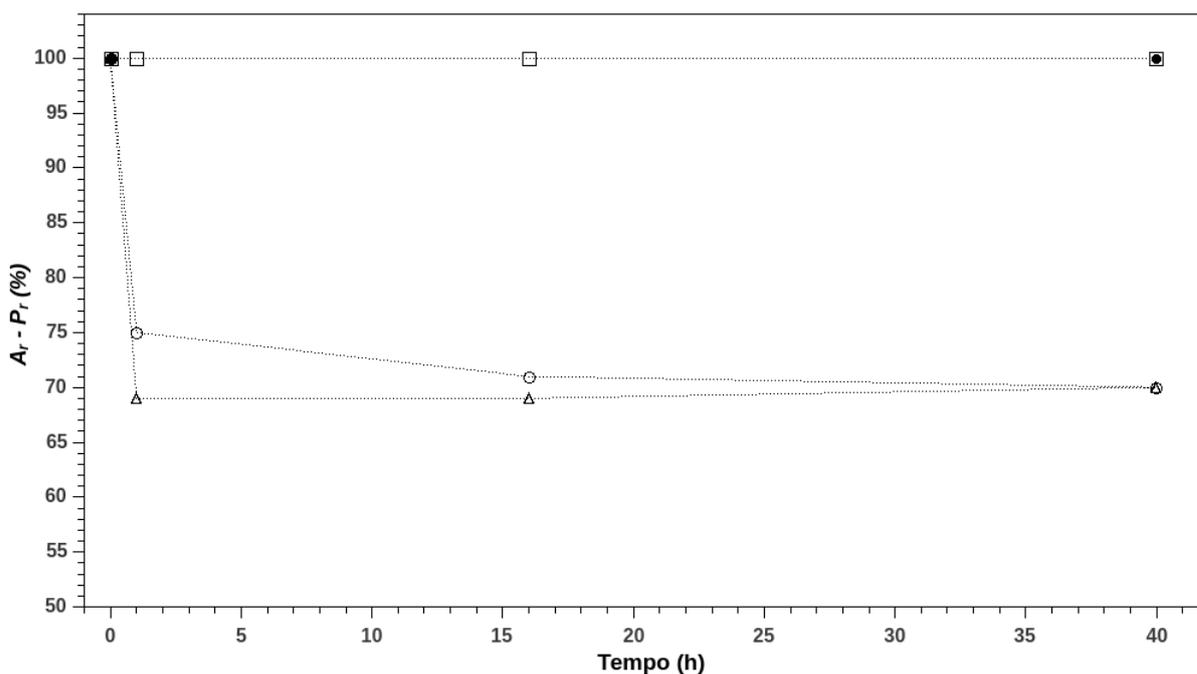


Figura 4.7- Cinética de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxido a pH 7.0 e 25 °C na presença de NaCl 1M. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; □ atividade na suspensão; ● atividade no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).



O procedimento de imobilização do complexo enzimático em sepabeads-epóxido foi repetido empregando tampão fosfato 1 M pH 7.0 sem adição de NaCl. Nessa condição 91% da atividade contida no sobrenadante foi rapidamente adsorvida ao suporte (condição 1.9 na Tabela 4.4 e Figura 4.9). A suspensão perdeu atividade durante o processo de incubação, enquanto o branco reacional conservou 100% de sua atividade inicial, após 64 horas de incubação a suspensão foi filtrada e re-suspensa em tampão fosfato 100 mM pH 7.0. Toda a atividade observada na suspensão foi desorvida do suporte de forma que não foi observado atividade no derivado ao final do processo. Assim como nos experimentos anteriores, as moléculas de enzima que se uniam covalentemente ao suporte perdiam sua atividade catalítica.

Em enzimas glicosiladas a camada de glicosilação pode interferir na imobilização por impedir o contato direto entre a superfície da enzima e o suporte. Assim, visando reduzir a camada de glicosilação para facilitar a imobilização em sepabeads-epóxido, o complexo NS50013 foi oxidado e, num segundo procedimento, reduzido. A Figura 4.10 mostra a cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo a camada de glicosilação oxidada e oxidada-reduzida em sephabeads-epóxido (tampão fosfato 1M pH 7.0). A diminuição da camada de glicosilação favorece a interação de todos os grupos presentes na superfície das proteínas com o suporte. Em consequência, a adsorção por interações hidrofóbicas no início do experimento foi maior do que a que deve ter ocorrido quando a camada de glicosilação estava intacta alcançando R_I e $R_{I-PROTEÍNA}$ de 100% para ambos os casos (oxidada e oxidada-reduzida). Foi observado, durante a incubação dos complexos celulolíticos oxidado e oxidado-reduzido, que ocorria perda de atividade na suspensão, perda essa superior à observada para a imobilização, nas mesmas condições, do complexo enzimático contendo as glicosilações intactas. A perda de atividade na suspensão foi mais acentuada para a amostra contendo glicosilações oxidadas-reduzidas. Apesar do alto rendimento de imobilização, assim como nos experimentos anteriores, também não foi observado atividade no derivado ao final do processo, toda a atividade presente no suporte foi desorvida uma vez que este foi re-suspensa em tampão fosfato 100 mM pH 7.0, em ambos os casos. Este experimento, assim como os anteriores, indica que as celulasas perdem atividade quando unidas covalentemente ao suporte. Os resultados obtidos sugerem que a camada de glicosilação presente nas celulasas do complexo NS50013 pode interferir no processo de imobilização dificultando o contato direto da superfície das enzimas com a superfície do suporte e até mesmo reduzindo o número de orientações possíveis durante o processo de imobilização.

Tabela 4.4 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxido.

SEPABEADS-EPÓXIDO											
Condição	Enzima	pH	Força iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R_I	R_I Proteína	Atividade		
									Perdida no Processo	$R\%$	A_E
1.7	Não modificada	7.0	100 mM	NaCl para 1M	25°C	40	29%	30%	5%	0%	0%
1.8	Não modificada	8.0	100 mM	NaCl para 1M	25°C	40	60%	29%	30%	0%	0%
1.9	Não modificada	7.0	1 M (fosfato)	não	25°C	64	91%	65%	38%	0%	0%
1.10	Oxidada	7.0	1 M (fosfato)	não	25°C	64	100%	100%	74%	0%	0%
1.11	Oxidada e reduzida	7.0	1 M (fosfato)	não	25°C	64	100%	100%	89%	0%	0%
1.12	Açúcares aminados	7.0	1 M (fosfato)	não	25°C	122	100%	100%	74%	0%	0%

Figura 4.8- Cinética de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxico a pH 8.0 e 25 °C na presença de NaCl 1M. \circ atividade enzimática no sobrenadante; \triangle proteínas totais no sobrenadante; \square atividade na suspensão; \bullet atividade no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).

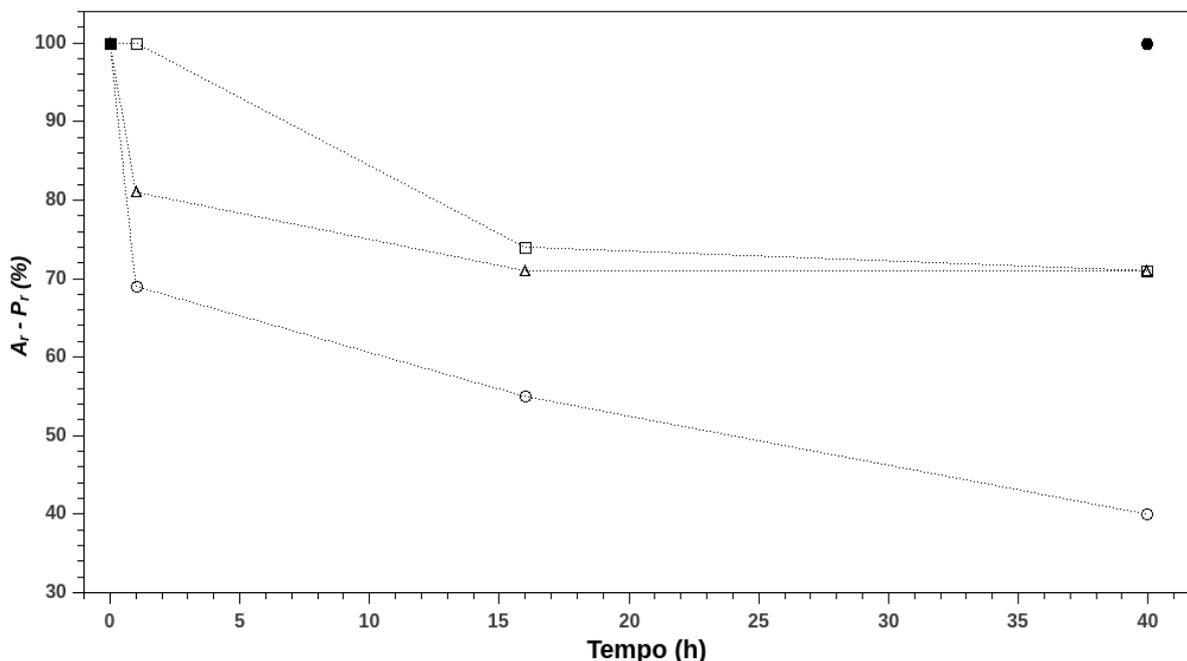


Figura 4.9- Cinética de imobilização do complexo NS50013 em sepabeads-epóxico a pH 7.0 e 25 °C empregando tampão fosfato 1.0 M. \circ atividade enzimática no sobrenadante; \triangle proteínas totais no sobrenadante; \square atividade na suspensão; \bullet atividade no branco reacional; \blacktriangle atividade dessorvida do suporte após re-suspensão. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).

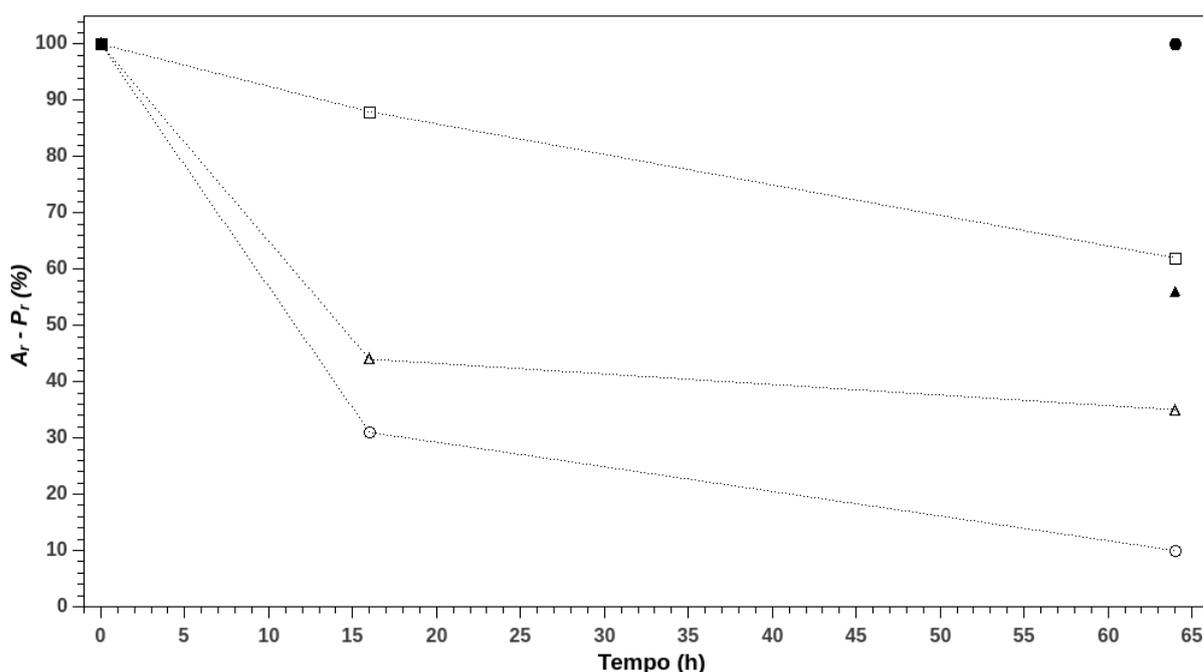
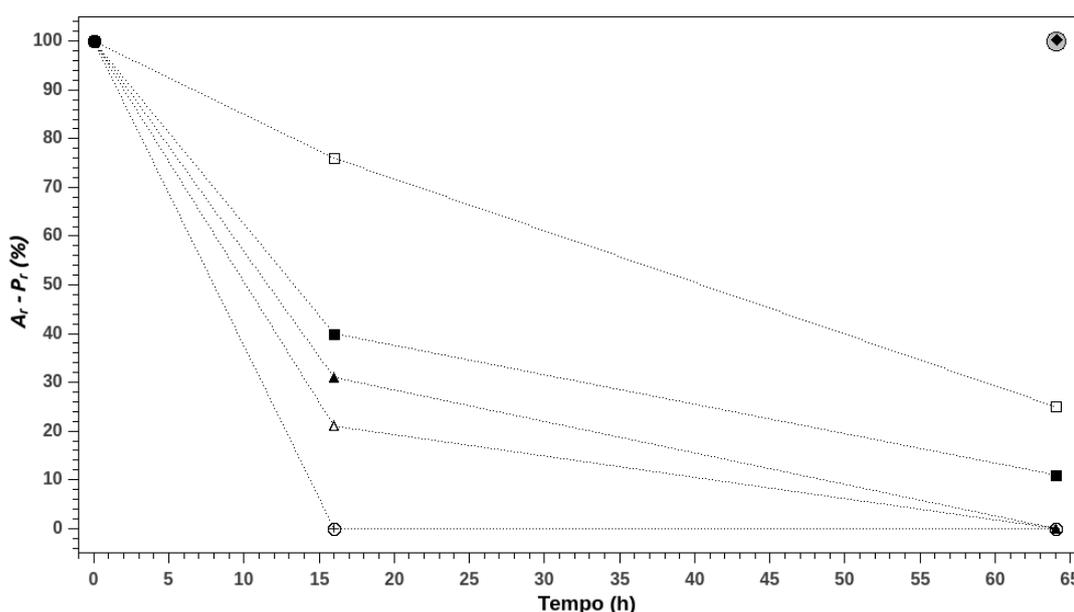


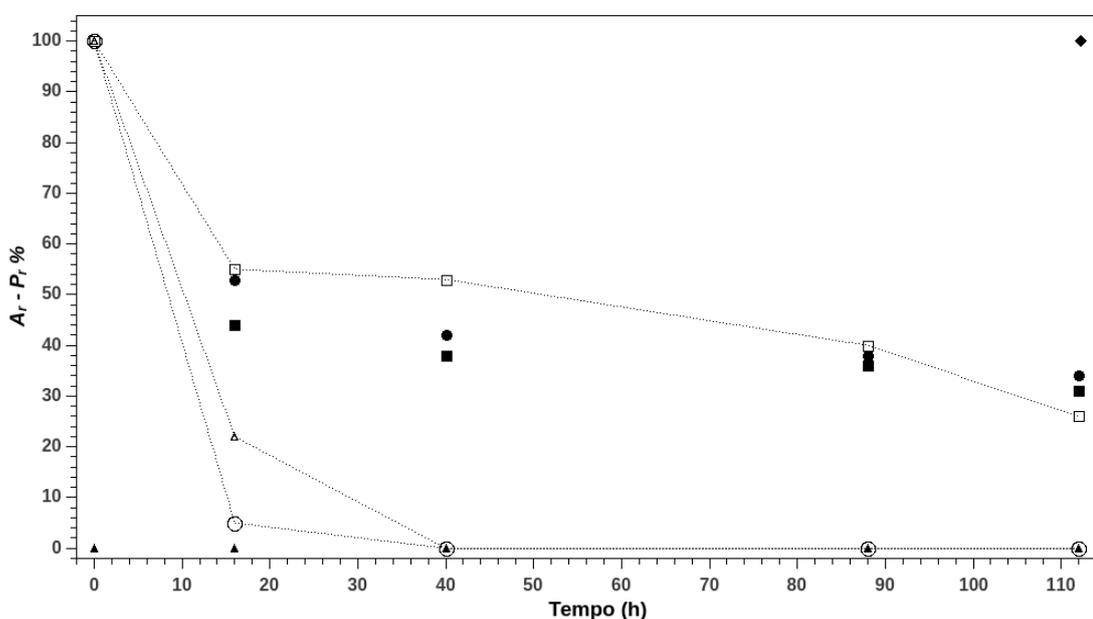
Figura 4.10- Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo a camada de glicosilação oxidada e oxidada e reduzida em sepabeads-epóxido a pH 7.0 e 25 °C empregando tampão fosfato 1M. a) Complexo NS50013 oxidado empregando metaperiodato de sódio 100 mM – ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; □ atividade na suspensão; ● atividade no branco reacional. b) Complexo NS50013 oxidado empregando metaperiodato de sódio 100 mM e reduzido empregando boroidreto de sódio 1 mg/mL – † atividade enzimática no sobrenadante; ▲ proteínas totais no sobrenadante; ■ atividade na suspensão; ◆ atividade no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).



Com o intuito de imobilizar as enzimas do complexo de forma pouco agressiva, diminuindo a perda de atividade em sepabeads-epóxido, foi testada a imobilização do complexo contendo a camada de glicosilação aminada em tampão fosfato 1 M pH 7.0 (Tabela 4.4, condição 1.12). A adsorção a alta força iônica foi rápida, de forma análoga aos experimentos anteriores a suspensão perdeu atividade durante a incubação. Neste experimento uma pequena quantidade de suporte foi filtrado e re-suspendido em tampão fosfato 100 mM em diferentes estágios do processo de incubação. A atividade enzimática e proteínas totais foram medidas no sobrenadante após re-suspensão. O derivado foi então novamente filtrado e re-suspendido em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 e a atividade enzimática nele contida foi medida. Através deste experimento (Figura 4.11) é possível verificar que a medida que as enzimas uniam-se covalentemente ao suporte perdiam atividade, de forma que uma vez que o suporte foi re-suspendido a única atividade que podia ser observada era a atividade das enzimas que estavam apenas adsorvidas na superfície do suporte e não unidas covalentemente. De forma análoga a atividade, uma vez que o suporte foi re-suspendido em

tampão fosfato uma quantidade significativa de proteínas (medidas por Bradford) foram liberadas no sobrenadante.

Figura 4.11- Cinética de imobilização do complexo NS50013 contendo a camada de glicosilação aminada em sepabeads-epóxido a pH 7.0 e 25 °C empregando tampão fosfato 1 M. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; □ atividade na suspensão; ● atividade desorvida do suporte após re-suspensão em tampão fosfato 100 mM; ■ proteínas totais desorvidas do suporte após re-suspensão em tampão fosfato 100 mM; ▲ atividade observada no derivado após re-suspensão em tampão fosfato 100 mM; ◆ atividade enzimática no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).



4.3.3 Imobilização em Suporte Agarose-Bromocianógeno

A imobilização do complexo NS50013 foi realizada empregando agarose-bromocianógeno como suporte. Este suporte é extremamente reativo, ligando-se rapidamente e de forma covalente com nucleófilos presentes na superfície de proteínas, principalmente resíduos de lisina e grupos N-terminais. O experimento foi realizado a pH 7.0 e 4 °C, o complexo enzimático foi incubado por 0.5 ou 1.5 hora (Tabela 4.5, condições 1.13 e 1.14). A incubação por 1.5 hora foi suficiente para imobilizar covalentemente 92% da atividade e 73% da proteína. Pela primeira vez foi observada atividade no derivado após o processo de imobilização, $R\%$ foi de 20 e 13% enquanto A_E foi de 11 e 12% para o processo de imobilização com incubação por 0.5 e 1.5 hora, respectivamente. Diferentemente dos métodos de união covalente testados anteriormente, que favoreciam a união multipontual da enzima

com a superfície do suporte, a imobilização empregando agarose ativada com bromocianógeno a pH 7.0 e baixas temperaturas favorece a união unipontual das proteínas através de seu grupo N-terminal. Métodos de união unipontual causam pouca ou nenhuma alteração conformacional na estrutura das proteínas. Nesse contexto, a imobilização em agarose-bromocianógeno pode ser considerada um método de imobilização pouco agressivo e que, geralmente, produz derivados com alta atividade recuperada. Apesar disso, os valores de $R\%$ obtidos em experimentos de imobilização de NS50013 em agarose-bromocianógeno foram extremamente baixos. Woodward e Zachry (1981) testaram a imobilização de celulasas de *T. reesei* (não modificada e contendo a camada de glicosilação aminada) em agarose-bromocianógeno obtendo valores de $R\%$ entre 9-43% dependendo da condição empregada e do substrato usado para medida de atividade (avicel e CMC). Esses autores observaram que mesmo as celulasas estando imobilizadas em um suporte poroso elas ainda conservavam atividade frente a substratos insolúveis como avicel, sendo a perda de atividade atribuída a limitações de transferência de massa e a impedimentos estéricos causados pelo bloqueio do sítio ativo das celulasas durante o processo de imobilização.

4.3.4 Imobilização por Adsorção

Os resultados de imobilização do complexo celulolítico através de uniões covalentes indicam que métodos de imobilização por adsorção, menos agressivos, podem ser mais indicados para imobilizar as enzimas do complexo NS50013. Vários suportes foram testados na imobilização do complexo fazendo uso de inúmeras interações não covalentes. A Tabela 4.6 mostra os resultados da adsorção do complexo NS50013 em agarose-IDA-Cu⁺ a 25 °C e pH 7.0 com força iônica de 100 e 5 mM (condição 2.1 e 2.2). Suportes agarose-IDA-Cu⁺ possuem a capacidade de adsorver proteínas através das cadeias laterais do aminoácido histidina de forma suave, sem causar grandes alterações conformacionais (MATEO *et al.*, 2000; PESSELA *et al.*, 2003). A imobilização nesse suporte apresentou bons resultados. Após 16 horas de incubação, $R\%$ foi de 63 e 27% e A_E foi de 45 e 14% para o processo conduzido a 100 e 5 mM, respectivamente. Apesar dos bons resultados em termos de $R\%$ e A_E , a interação entre a enzima e o suporte mostrou-se débil de forma que a enzima desprendia-se gradualmente do suporte quando o derivado era filtrado e re-suspendido em uma nova solução de tampão, impossibilitando sua aplicação em condições reais de processo.

Tabela 4.5 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em agarose-bromocianógeno.

AGAROSE-BROMOCIANÓGENO											
Condição	Enzima	pH	Força iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de	R_I	R_I	Proteína	Atividade	A_E
						Incubação (h)				Perdida no	
									Processo	R%	
1.13	Não modificada	7.0	100 mM	não	4°C	0.5	56%	47%	45%	20%	11%
1.14	Não modificada	7.0	100 mM	não	4°C	1.5	92%	73%	87%	13%	12%

Tabela 4.6 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em agarose-IDA-Cu⁺.

AGAROSE-IDA-CU ⁺											
Condição	Enzima	pH	Força iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de	R_I	R_I	Proteína	Atividade	A_E
						Incubação (h)				Perdida no	
									Processo	R%	
2.1	Não modificada	7.0	100 mM	não	25°C	16	71%	49%	27%	63%	45%
2.2	Não modificada	7.0	5 mM	não	25°C	16	51%	37%	18%	27%	14%

Tabela 4.7 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em trocadores catiônicos.

TROCADORES CATIÔNICOS												
Condição	Suporte	Enzima	pH	Força iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R_I	R_I Proteína	Atividade		
										Perdida no Processo	$R\%$	A_E
2.3	DEAE Sepharose	Não modificada	7.0	5 mM	não	25°C	3	28%	77%	13%	53%	15%
2.4	Q Sepharose	Não modificada	7.0	5 mM	não	25°C	3	23%	75%	5%	78%	18%
2.5	MANAE 80	Não modificada	7.0	5 mM	não	25°C	3	100%	97%	50%	51%	51%
2.6	Agarose-PEI 1500	Não modificada	7.0	5 mM	não	25°C	3	100%	90%	100%	0%	0%
2.7	Agarose-PEI 25000	Não modificada	7.0	5 mM	não	25°C	3	100%	92%	100%	0%	0%

Tabela 4.8 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em trocadores aniônicos.

TROCADORES ANIÔNICOS												
Condição	Suporte	Enzima	pH	Força iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R_I	R_I Proteína	Atividade		
										Perdida no Processo	$R\%$	A_E
2.80	Agarose-DS	Não modificada	7.0	5 mM	não	25°C	3	100%	93%	100%	0%	0%

Todas as enzimas presentes no complexo celulolítico possuem muitos resíduos de ácidos aspárticos e glutâmicos em sua superfície (LIU *et al.*, 2001; SANDGREN *et al.*, 2001), o que confere carga negativa a determinadas regiões das proteínas. Desta forma, a utilização de trocadores catiônicos para adsorver de forma reversível as celulasas do complexo foi avaliada (Tabela 4.7). Inicialmente, foram testados trocadores catiônicos comerciais, DEAE-Sepharose e Sepharose-Q (Tabela 4.7, condições 2.3 e 2.4). Apesar da alta atividade recuperada obtida para esses dois suportes, 53 e 78% respectivamente, o baixo rendimento de imobilização fez com que A_E seja de 15% para DEAE-Sepharose e 18% para Sepharose-Q. Apesar do fato de que todas as enzimas do complexo apresentam atividade sobre CMC, a atividade frente a esse substrato é diferente para cada uma dessas enzimas. Sendo assim quando empregamos CMC_{7.0} como método padrão para acompanhamento do processo de imobilização somente rendimentos de imobilização próximos a 100% são confiáveis para avaliação da atividade recuperada, uma vez que o processo de imobilização pode gerar partição das enzimas presentes no complexo que por sua vez vão hidrolisar este substrato de forma mais ou menos eficiente mascarando a real eficiência do procedimento de imobilização. Neste contexto o A_E é mais confiável para avaliar o desempenho real do processo de imobilização.

A condição 2.5 na Tabela 4.7 apresenta os resultados para imobilização do complexo em suporte MANAE-agarose ativado com 80 μ moles de grupos amino por mL de gel (MANAE-80). Empregando MANAE-80 100% da atividade observada no sobrenadante foi imobilizada no suporte obtendo $R\%$ e A_E de 51%. Apesar dos bons resultados obtidos para a adsorção do complexo NS50013 em MANAE-80 e os resultados satisfatórios observados para adsorção em DEA-sepharose e sepharose-Q, a interação fraca formada entre as enzimas e estes suportes fez com que 100% da atividade e da proteína fossem desorvidas, dos três suportes, quando os derivados foram incubados em tampão fosfato 100 mM pH 7.0. A completa desorção das enzimas adsorvidas em valores de força iônica moderada impossibilita a utilização desses derivados em condições reais de processo. Não foram encontrados na literatura trabalhos que tratam da imobilização direta de celulasas em suportes carregados positivamente de forma funcional sem a formação de uniões covalentes entre a enzima e o suporte. São descritos, porém, trabalhos sobre a adsorção em suportes positivos seguido de entrecruzamento com glutaraldeído (INCE *et al.*, 2012), uniões covalentes entre a enzima e o suporte empregando Cdi (KHOSHNEVISAN *et al.*, 2011) e suportes mistos contendo grupos de carga positiva e grupos funcionais capazes de realizar uniões covalentes (HUNG *et al.*, 2011).

A adsorção do complexo NS50013 também foi testada em agarose ativada com polietilenoimina (PEI) com peso molecular de 15000 e 25000 kDa (Tabela 4.7, condições 2.6 e 2.7). Suportes ativados com PEI possuem altas densidades de cargas positivas imobilizando fortemente proteínas por suas regiões de carga negativa, além disso, a flexibilidade do polímero PEI faz com que as proteínas sejam unidas ao suporte em três dimensões (PESSELA *et al.*, 2003; PESSELA *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2006). Desta forma, proteínas imobilizadas nesses suportes dificilmente desprendem-se deles até mesmo quando em altos valores de força iônica. A adsorção foi eficiente alcançando 100% de R_I em termos de atividade em ambos os suportes. Apesar eficiência na adsorção ocorreu 100% de perda de atividade durante o processo, para os dois suportes. Quando os derivados foram re-suspendidos a moderada ou alta força iônica não foi observada dessorção dos suportes, tanto em termos de atividade quanto de proteínas, indicando forte interação entre as enzimas do complexo NS50013 e os suportes, Torres *et al.*, (2006) observaram comportamento similar para proteínas adsorvidas em suporte agarose-PEI.

Também foi testada a imobilização do complexo celulolítico em agarose ativada com o polímero dextrana sulfato (agarose-DS), suporte esse que possui alta densidade de cargas negativas em sua superfície (FUENTES *et al.*, 2004; FUENTES *et al.*, 2006). Nesse tipo de suporte, até mesmo proteínas com baixas densidades de cargas positivas, como é o caso das celulases (LIU *et al.*, 2001; SANDGREN *et al.*, 2001), podem ser imobilizadas. A Tabela 4.8 mostra os resultados para imobilização do complexo em agarose-DS. Assim como ocorrido nos experimentos com agarose-PEI, 100% da atividade foi imobilizada no suporte, porém com 100% de perda de atividade, também não sendo observada dessorção de enzimas ou mesmo proteínas quando o derivado foi incubado a altos ou moderados valores de força iônica. O processo de imobilização do complexo enzimático por adsorção em suportes contendo polímeros com altas densidades de cargas negativas ou positivas em sua superfície teve, pois, comportamento similar ao observado em processos de imobilização covalente. Uma possível causa é que as fortes interações entre as enzimas e os suportes podem causar distorções estruturais e principalmente diminuição do grau de liberdade das enzimas imobilizadas. Assim, uso de suportes com altas cargas evita dessorção, mas também inativa a enzima, o que impede sua utilização.

4.3.5 Imobilização por Adsorção Seguida de União Covalente

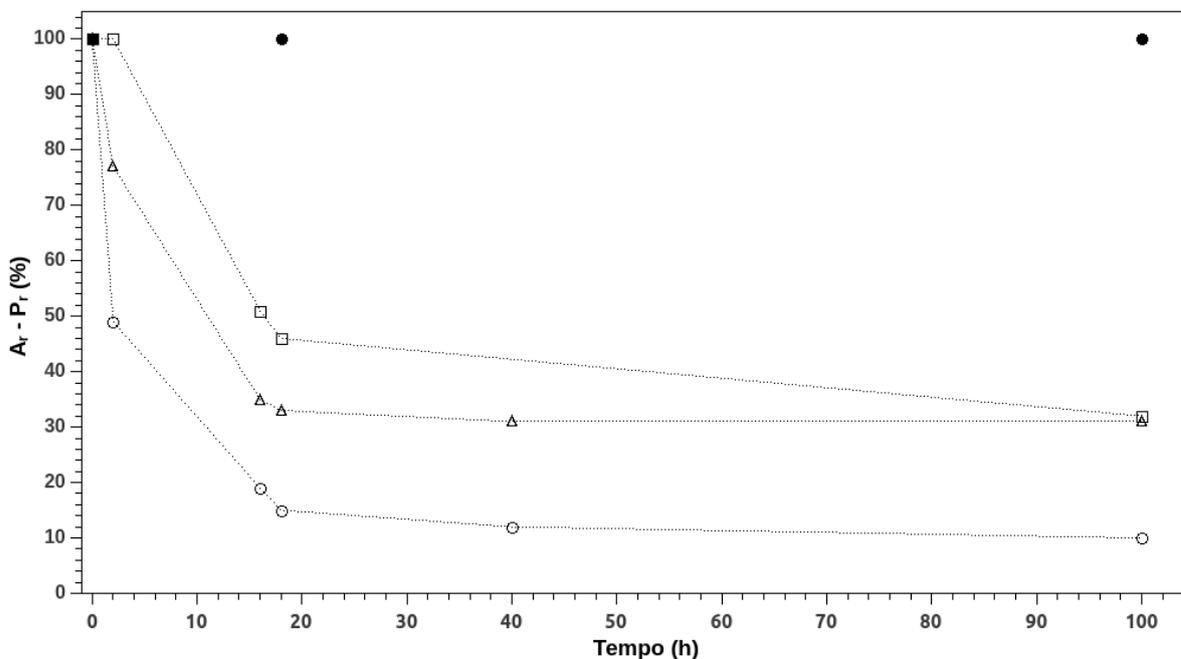
Apesar dos bons resultados obtidos para a imobilização do complexo NS50013 em suportes agarose-IDA-Cu⁺ e suportes ativados com cargas positivas, a dessorção de enzimas do suporte quando os derivados foram incubados em condições diferentes das empregadas durante o processo de imobilização impede a aplicação desses derivados em condições reais de processo. Desta forma, buscou-se outra estratégia de imobilização das enzimas do complexo que combinasse interações reversíveis com uniões covalentes entre as enzimas e o suporte.

Neste contexto, a imobilização do complexo NS50013 foi testada em diversos suportes contendo grupos IDA-Cu⁺ ou grupos positivamente carregados juntamente com grupos funcionais capazes de promover a união covalente entre as enzimas e o suporte. A Tabela 4.9 mostra os resultados para a imobilização do complexo em suportes mistos agarose-glioxil-IDA-Cu⁺. O processo de imobilização foi realizado em duas etapas, primeiro a adsorção das enzimas a pH 7.0 por 2, 18 ou 100 horas (condições 3.1, 3.2 e 3.3) seguido de aumento do pH da solução para 10.0 por uma hora com o objetivo de facilitar a união covalente entre as enzimas e o suporte. A Figura 4.12 mostra a cinética de imobilização das enzimas em agarose-glioxil-IDA-Cu⁺, nos tempos de 2, 18 e 100 horas. Uma parte do suporte foi filtrada e re-suspendida em tampão bicarbonato 100 mM pH 10.0 por 1 hora. Através da cinética de imobilização do complexo em agarose-glioxil-IDA-Cu⁺ é possível verificar que com 15 horas aproximadamente 80% da atividade observada no sobrenadante (R_f) e 65% das proteínas ($R_{L-PROTEÍNA}$) foram imobilizados no suporte conservando 54% de atividade na suspensão, o branco reacional indica que não havia perda de atividade devido às condições do processo. Após 100 horas de incubação, R_f foi de 90% e $R_{L-PROTEÍNA}$ 70%, mas a atividade na suspensão diminuiu com o aumento do tempo de incubação, chegando a apenas 70% em relação a atividade inicial ao final do processo. Após incubação a pH 10.0 por uma hora não foi observada atividade no derivado nas três condições testadas (incubados a pH 7.0 por 2, 18 e 100 horas), sendo que a enzima livre (branco reacional) não perdeu atividade de forma significativa após incubação a pH 10.0 por 1 hora.

Tabela 4.9 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes mistos contendo grupos reativos e grupos IDA-Cu⁺.

SUPORTES IDA-Cu ⁺ CONTENDO GRUPOS FUNCIONAIS PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE													
Condição	Suporte	Enzima	pH	Força iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R _I	R _I Proteína	Atividade perdida no processo			
										Etapa 1	Etapa 2	R%	A _E
3.1	Glioxil Agarose IDA Cu ⁺	Não modificada	7 e 10	100 mM	não	25°C	2	51%	23%	0%	100%	0%	0%
3.2	Glioxil Agarose IDA Cu ⁺	Não modificada	7 e 10	100 mM	não	25°C	18	81%	64%	43%	100%	0%	0%
3.3	Glioxil Agarose IDA Cu ⁺	Não modificada	7 e 10	100 mM	não	25°C	100	90%	69%	68%	100%	0%	0%
ETAPA ÚNICA													
3.4	Gioxil Agarose- IDA-Cu ⁺	Aminada Cdi 10 mM	9	100 mM	não	4°C	18	100%	-	100%		0%	0%

Figura 4.12 - Cinética de imobilização do complexo NS50013 em agarose-glioxil-IDA-Cu⁺ a pH 7.0 e 25 °C. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; □ atividade na suspensão; ● atividade no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).



Foi testada a imobilização do complexo celulolítico contendo ácidos carboxílicos aminados no suporte agarose-glioxil-IDA-Cu⁺ (condição 3.4 na Tabela 4.9). A imobilização foi realizada a pH 9.0 em tampão fosfato 100 mM, condição que permite a interação específica entre grupos histidina e grupos IDA-Cu⁺ do suporte e a união covalente entre grupos amino na estrutura das proteínas e grupos glioxil no suporte, respectivamente. A ligação covalente entre grupos aldeído glioxil e grupos amino requer a formação simultânea de duas ligações, devido à menor reatividade dos grupos aldeído glioxil em relação aos aldeído glutaraldeído, por exemplo. Isso irá requerer, então, dois grupos aminos desprotonados próximos na superfície da enzima, para formação da ligação entre enzima e suporte. A pH 9.0, a concentração de grupos amino desprotonados de resíduos lisina que poderiam reagir com grupos glioxil do suporte é baixa, mas o pKa dos grupos aminos dos ácidos carboxílicos aminados presentes na superfície da enzima é mais baixo e estes reagem rapidamente com os grupos glioxil do suporte uma vez a adsorção ocorra. Após 18 horas, R_f foi de 100%, porém, novamente, a ligação covalente, claro, impedia dessorção, mas resultava em 100% de perda de atividade. Todos os resultados obtidos até aqui indicam que a imobilização covalente das enzimas presentes no complexo NS50013 acarreta perda de

atividade.

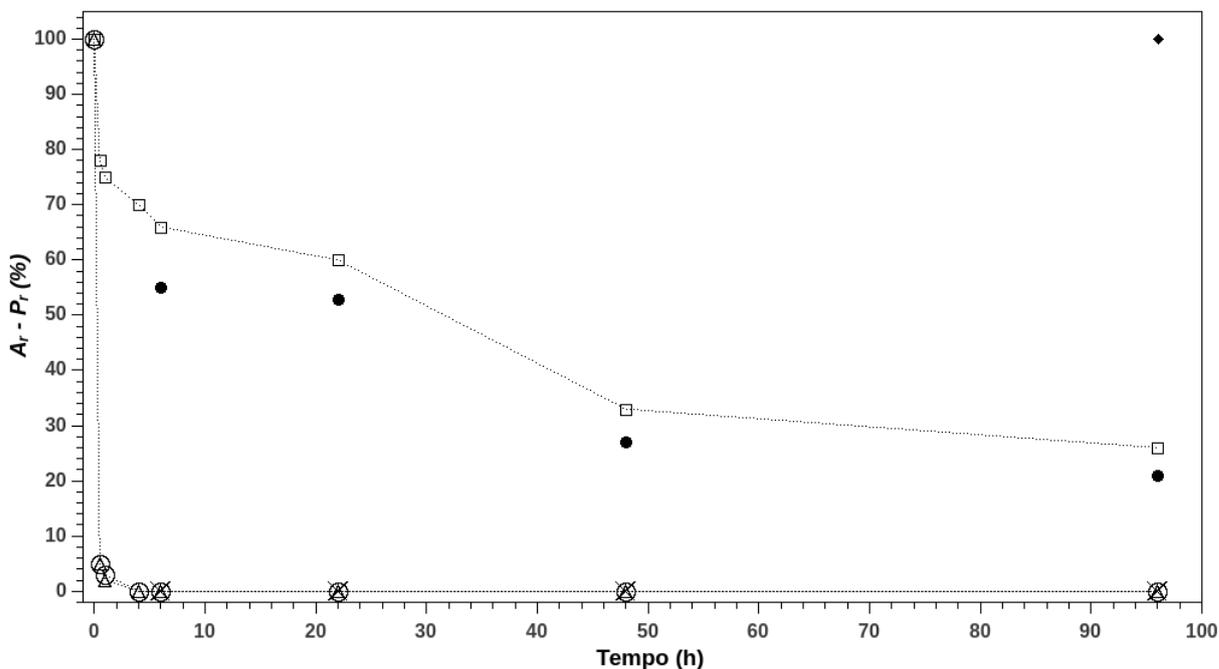
Os melhores resultados alcançados durante experimentos de adsorção do complexo NS50013 foram empregando MANAE-80 como suporte. No intuito de otimizar esse procedimento de imobilização, suportes ativados com grupos amino foram extensivamente estudados. A Tabela 4.10 mostra os resultados para a imobilização das enzimas em suportes contendo grupos amino através de diferentes estratégias. Inicialmente o suporte MANAE-epóxido, contendo 80 μmol de grupos amino por mL de gel, foi empregado na imobilização do complexo, com a reação sendo conduzida em tampão fosfato 5 mM a pH 7.0 (condição 3.5 na Tabela 4.10). A Figura 4.13 mostra a cinética de imobilização do complexo nesse suporte. A adsorção das enzimas ao suporte ocorreu por interações iônicas e, portanto, foi extremamente rápida. As enzimas não perderam atividade nas condições do processo (branco reacional), no entanto com o aumento do tempo de incubação foi observado diminuição na atividade da suspensão. Em diferentes tempos, uma determinada massa de derivado foi filtrada e re-suspensa em tampão fosfato 100 mM pH 7.0, medindo-se a atividade no sobrenadante e na suspensão. Após re-suspensão o derivado final foi novamente filtrado e novamente re-suspensa em tampão, para nova avaliação da atividade presente na suspensão. Os resultados obtidos mostraram que somente havia atividade presente no sobrenadante, pois os valores medidos foram idênticos aos obtidos para a suspensão, para todas as medidas efetuadas. Esses resultados mostram que realmente ocorria perda de atividade enzimática na medida em que a enzima se ligava covalentemente ao suporte.

Suportes sephabeads-epóxido foram parcialmente modificados através da reação com etilenodiamina 300 mM a pH 10.0 por 1, 2 ou 5 horas. Esses suportes contendo baixas e crescentes densidades de grupos amino e altas densidades de grupos epóxido foram empregados na imobilização do complexo celulolítico em tampão fosfato 5 mM pH 7.0. (Tabela 4.10, condições 3.6, 3.7 e 3.8). Devido à baixa densidade de grupos amino, a adsorção a baixa força iônica foi ineficiente para os três suportes testados e não foi observada evolução no processo de imobilização após 40 horas de incubação. Ao final da incubação, o suporte foi filtrado e re-suspensa, não se observando atividade em nenhum dos derivados ao final do processo. Também não foi observada dessorção de enzimas ou proteínas no sobrenadante indicando que todas as proteínas adsorvidas estavam unidas covalentemente ao suporte e inativas.

Tabela 4.10 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes mistos baseados em grupos amino.

SUPORTES MISTOS CONTENDO GRUPOS AMINO												
Condição	Suporte	Enzima	pH	Força iônica	Aditivos	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R_I	R_I Proteína	Atividade		
										R_I	Perdida no Processo	$R\%$
3.5	MANAE-Epóxido	modificada	7.0	5 mM	não	25°C	96	100%	100%	74%	0%	0%
3.6	Sepabeads-Epóxido-amino (1h)	modificada	7.0	5 mM	não	25°C	40	22%	18%	12%	0%	0%
3.7	Sepabeads-Epóxido-amino (2h)	modificada	7.0	5 mM	não	25°C	40	21%	19%	25%	0%	0%
3.8	Sepabeads-Epóxido-amino (5h)	modificada	7.0	5 mM	não	25°C	40	32%	26%	27%	0%	0%
3.9	MANAE 80-Glutaraldeído	modificada	7.0	5 mM	não	25°C	2	100%	100%	100%	0%	0%
3.10	MANAE 10-Glutaraldeído	modificada	7.0	100 mM	não	25°C	164	29%	39%	13%	0%	0%
3.11	MANAE 20-Glutaraldeído	modificada	7.0	100 mM	não	25°C	164	63%	46%	48%	-	-

Figura 4.13- Cinética de imobilização do complexo NS50013 em MANAE-epóxido a pH 7.0 e 25 °C. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; × atividade na suspensão; ● atividade desorvida do suporte após re-suspensão em tampão fosfato 100 mM; ✕ atividade observada no derivado após re-suspensão em tampão fosfato 100 mM; ◆ atividade enzimática no branco reacional.



Suportes MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino foram ativados previamente com glutaraldeído e empregados na imobilização do complexo NS50013 (condições 3.9, 3.10 e 3.11 na Tabela 4.10). A imobilização do complexo celulolítico em suporte MANAE-agarose ativado com 80 μ moles de grupos amino por mL de gel (MANAE-80) e com glutaraldeído foi realizada empregando tampão fosfato 5 mM. Nessa condição, a enzima se adsorvia ao suporte rapidamente, e também perdia rapidamente 100% de sua atividade. Ao filtrar e re-suspender o suporte em tampão fosfato 100 mM pH 7.0, não foi observada atividade na suspensão e nem no sobrenadante, indicando que todas as enzimas estavam covalentemente unidas ao suporte e inativas.

Inicialmente, proteínas imobilizadas em suportes ativados com glutaraldeído se unem ao suporte covalentemente através de seus grupos N-terminal (LOPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). A condição de baixa força iônica empregada no experimento favorece a adsorção das enzimas ao suporte de forma rápida e eficiente. Uma vez adsorvidas ao suporte, a reação torna-se intramolecular podendo, portanto, ocorrer a formação de ligações covalentes não somente com o grupo N-terminal das enzimas mas também com grupos amino da cadeia lateral dos resíduos de lisina, mesmo essa reação sendo desfavorável a pH 7.0 (LOPEZ-

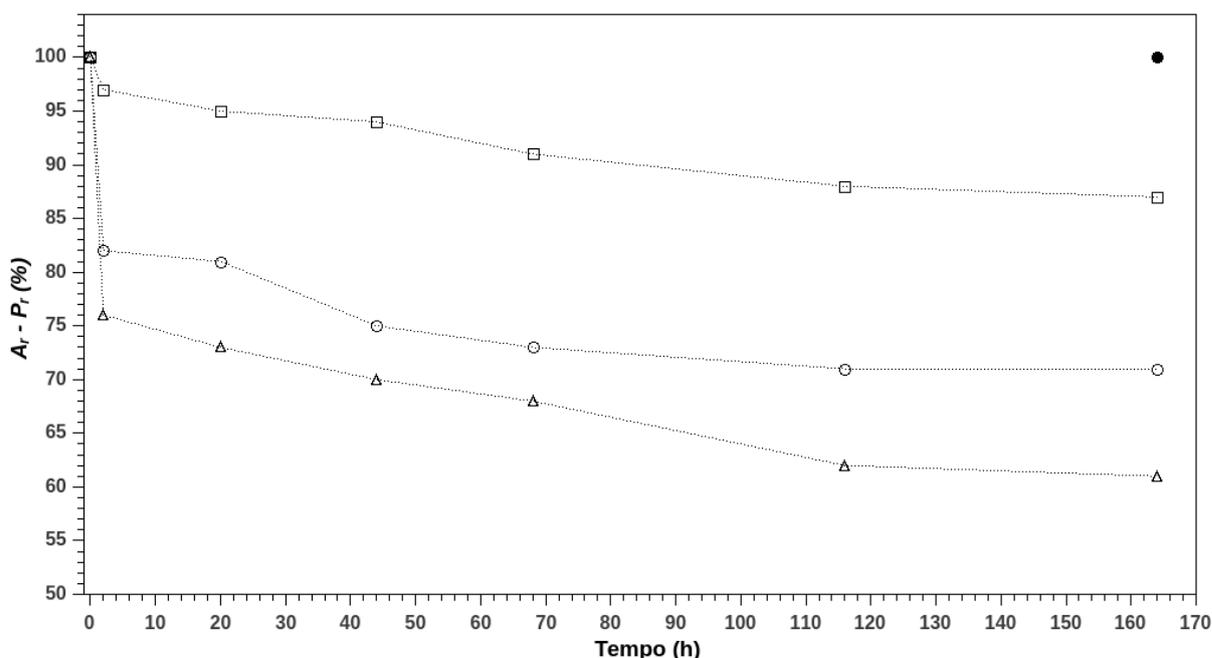
GALLEGO *et al.*, 2005).

Na tentativa de diminuir a perda de atividade enzimática observada no experimento anterior, a imobilização do complexo NS50013 foi então realizada em suportes MANAE-agarose contendo 20 e 10 μ moles de grupos amino por mL de gel (MANAE-20 e MANAE-10), ativação bem menor que a anterior (80 μ moles de grupos amino por mL de gel). Os suportes foram ativados com glutaraldeído e a imobilização foi realizada a pH 7.0, força iônica de 100 mM. Nessa condição, o processo de imobilização é mais lento e favorece a imobilização das enzimas unicamente através de seus grupos N-terminal. As Figuras 4.14 e 4.15 mostram a cinética de imobilização em MANAE-10-Glutaraldeído e MANAE-20-Glutaraldeído, respectivamente. A velocidade de imobilização em MANAE-20-Glutaraldeído foi superior à observada para MANAE-10-glutaraldeído, obtendo-se após 164 horas R_I de 29% para o MANAE-10-Glutaraldeído e 63% para MANAE-20-Glutaraldeído.

Apesar das enzimas não perderem atividade devido às condições de imobilização (branco reacional Figuras 4.14 e 4.15), a suspensão perdeu atividade gradativamente com o aumento do tempo de incubação, de forma análoga aos experimentos realizados com MANAE-80-Glutaraldeído. Após filtração e re-suspensão do derivado em tampão não foi observado atividade tanto no sobrenadante como na suspensão. Esses resultados indicam que a união covalente da enzima ao suporte causa perda de atividade até mesmo quando a união ocorre pela região N-terminal, comportamento já indicado pelos experimentos de imobilização em agarose-bromocianógeno realizados anteriormente.

Uma vez que a imobilização direta do complexo NS50013 em suportes contendo grupos amino na superfície, além de grupos reativos capazes de formar ligações covalentes, ocasionava perda de atividade tentamos adotar a estratégia de adsorver as enzimas em suportes MANAE-80 e entrecruzar a enzima empregando diferentes concentrações de glutaraldeído. O entrecruzamento com glutaraldeído pode evitar o desprendimento da enzima do suporte com o aumento da força iônica do meio, possibilitando a aplicação do derivado em condições de processo. As enzimas foram normalmente adsorvidas no suporte MANAE-80 a pH 7.0 e força iônica de 5 mM alcançando rendimentos de imobilização de 100% em todos os casos e conservando aproximadamente 50% da atividade oferecida para imobilização ($R\%$ e $A_E = \sim 50\%$).

Figura 4.14- Cinética de imobilização do complexo NS50013 em MANAE-10-glutaraldeído a pH 7.0 e 25 °C. ○ atividade enzimática no sobrenadante; △ proteínas totais no sobrenadante; ◻ atividade na suspensão; ● atividade no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).



Após a etapa de adsorção, os derivados foram entrecruzados com diferentes concentrações de glutaraldeído a pH 7.0 por 1 hora. Ao final do processo, os derivados foram filtrados e re-suspensos em tampão fosfato 100 mM pH 7.0, sendo medidas as atividades no sobrenadante e na suspensão. Os resultados desses experimentos, apresentados na Tabela 4.11, indicam que o entrecruzamento do derivado com glutaraldeído 1.5, 0.5 e 0.3% (m/v) ocasionou perda total de atividade (Tabela 4.11, condições 3.12, 3.13 e 3.14). O entrecruzamento com glutaraldeído 0.15% foi suficiente para entrecruzar 100% da atividade adsorvida no suporte e evitar assim a dessorção das enzimas já que ao se re-suspender o derivado em tampão fosfato 100 mM não foi observado desprendimento de enzimas do suporte. O processo de entrecruzamento ocasionava 53% de perda de atividade e rendia um A_E de 22%. O entrecruzamento empregando glutaraldeído 0.08 e 0.05% não foi suficiente para entrecruzar 100% da atividade adsorvida ao suporte, observando-se liberação de enzimas no sobrenadante após a re-suspensão do derivado em tampão fosfato 100 mM pH 7.0. Em ambos os casos (0.08 e 0.05%), a concentração relativa de enzimas entrecruzadas no processo foi de ~50%, com A_E similar para três casos avaliados. Nessa etapa do trabalho, a atividade

efetiva (A_E) torna-se uma variável muito interessante para comparação entre os resultados, permitindo avaliação do processo de forma global. O procedimento de adsorção em MANAE-agarose seguido de entrecruzamento com glutaraldeído apresentou os melhores resultados até o momento.

Figura 4.15- Cinética de imobilização do complexo NS50013 em MANAE-20-glutaraldeído a pH 7.0 e 25 °C. \circ atividade enzimática no sobrenadante; \triangle proteínas totais no sobrenadante; \square atividade na suspensão; \bullet atividade no branco reacional. Os dados são apresentados em termos de atividade residual - A_r (Sobrenadante e suspensão) e proteínas residuais - P_r (sobrenadante).

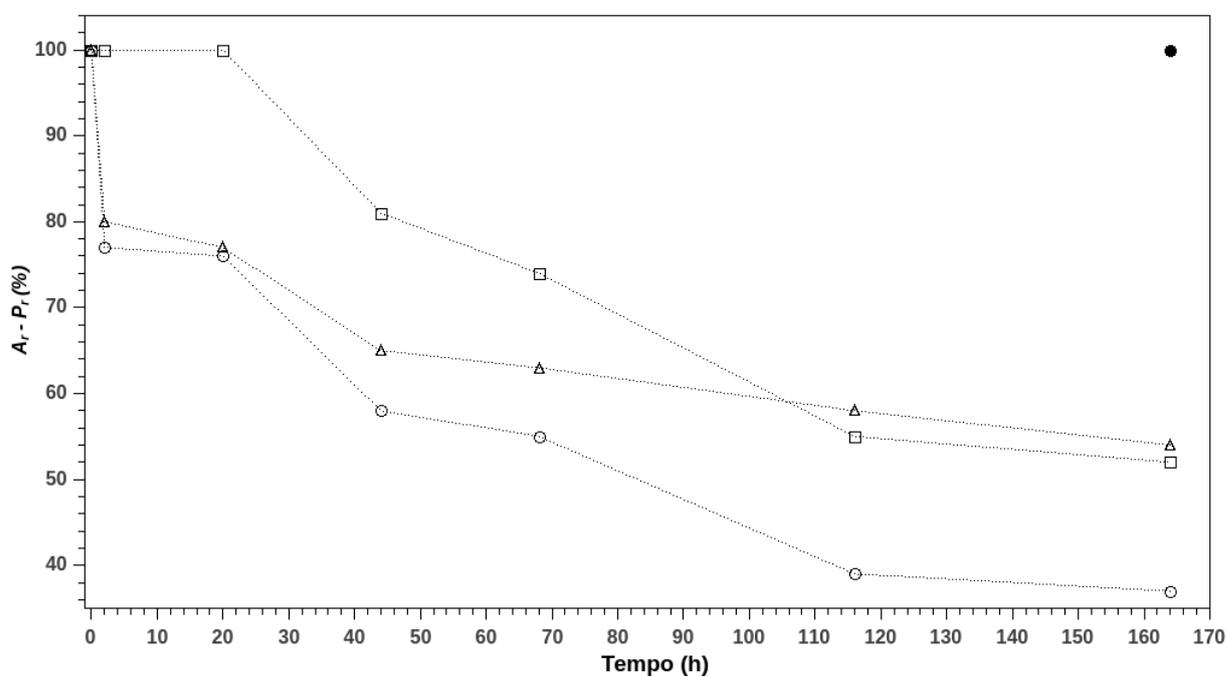


Tabela 4.11 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes MANAE-80 seguido de entrecruzamento com glutaraldeído.

ADSORÇÃO EM MANAE-AGAROSE SEGUIDO DE ENTRECruzAMENTO COM GLUTARALDEÍDO									
Condição	Suporte	Enzima	pH	Força iônica	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	Perda de Atividade na Etapa (%)*	Atividade Entrecruzada (%)**	A_E
3.12	MANAE-80 + glutaraldeído 1.5%	Não modificada	7.0	5 mM	25°C	3 e 2	100%	100%	0%
3.13	MANAE-80 + glutaraldeído 0.5%	Não modificada	7.0	5 mM	25°C	3 e 2	100%	100%	0%
3.14	MANAE-80 + glutaraldeído 0.3%	Não modificada	7.0	5 mM	25°C	3 e 2	100%	100%	0%
3.20	MANAE-80+ glutaraldeído 0.15%	Não modificada	7.0	5 mM	25°C	3 e 2	53%	100%	22%
3.21	MANAE-80 + glutaraldeído 0.08%	Não modificada	7.0	5 mM	25°C	3 e 2	48%	53%	25%
3.22	MANAE-80 + glutaraldeído 0.05%	Não modificada	7.0	5 mM	25°C	3 e 2	32%	47%	17%

*Este resultado se refere a perda de atividade somente na etapa de entrecruzamento, não tendo relação direta com a perda de atividade na etapa de adsorção (~50%).

**Variável calculada com base na atividade relativa entre a atividade observada no sobrenadante e na suspensão após o procedimento de entrecruzamento

4.3.6 Otimização da Imobilização em Suportes MANAE-Agarose

Uma vez que os resultados obtidos para a imobilização do complexo celulolítico em MANAE-80 seguido de entrecruzamento com glutaraldeído se mostraram promissores, o procedimento foi otimizado. Inicialmente, foi avaliada a adsorção do complexo celulolítico em suportes MANAE-agarose ativados com diferentes densidades de grupos amino. Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 4.12. Como esperado, a diminuição na densidade de grupos amino na superfície do suporte diminuiu sua capacidade de adsorção. O suporte MANAE-10 apresentou R_I de apenas 43%, já os suportes MANAE-30 e MANAE-40 apresentaram bom desempenho na adsorção das enzimas do complexo NS50013. Os melhores resultados foram alcançados empregando MANAE-30 e MANAE-40. E, esses dois últimos suportes foram eficientes na adsorção das enzimas do complexo, com perda mínima de atividade alcançando bons resultados em termos de $R\%$ e principalmente em termos de A_E . Foram, pois, selecionados os suportes MANAE-30 E MANAE-40 para os experimentos posteriores (Tabela 4.13) de entrecruzamento com distintas concentrações de glutaraldeído ou aldeído-dextrana (6, 15-25, 70 ou 413 kDa). De forma similar Hung *et al.* (2011) observaram que a capacidade de adsorção de celulasas em membranas ativadas com grupos de carga positiva diminuía com a diminuição da densidade de grupos positivos na superfície do material. O uso de glutaraldeído na concentração 0.08% foi suficiente para entrecruzar apenas 24% da enzima adsorvida no suporte MANAE-30, enquanto que glutaraldeído 0.15% foi o suficiente para entrecruzar 100% das enzimas (não foi observado dessorção de enzimas do suporte). Contudo, esse entrecruzamento mais intenso implicou também em perda de atividade de 62% no processo, observando-se para esse derivado o mesmo valor de A_E obtido para o derivado MANAE-80 entrecruzado com glutaraldeído 0.15% (Tabela 4.11).

O entrecruzamento do derivado MANAE-30 com aldeído-dextrana 15-25 kDa foi realizado empregando as concentrações de 5 e 10 mg de polímero (base seca) por grama de gel. A concentração de 5 mg/g de gel foi suficiente para entrecruzar apenas 53% da atividade adsorvida no suporte. Aumento da concentração para 10 mg permitiu entrecruzamento de 100% da atividade. Apesar da diferença observada para o entrecruzamento, os resultados em termos de A_E foram similares para ambos os casos. Uso de dextrana-aldeído 6 kDa, 10 mg/g gel, permitiu entrecruzar 100% da atividade, obtendo-se A_E de 20%, enquanto para 5 mg/grama de gel, apenas 27% da atividade foi entrecruzada. Quando dextrana-aldeído (10 mg/g de gel) 70 e 413 kDa foi empregada, para suporte MANAE-30, praticamente toda a atividade foi perdida durante o processo, indicando excesso de entrecruzamento.

Tabela 4.12 – Resultados de experimentos de adsorção do complexo NS50013 em suportes MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino.

ADSORÇÃO EM SUPORTES MANAE-AGAROSE ATIVADOS COM DIFERENTES DENSIDADES DE GRUPOS AMINO											
Condição	Suporte	Enzima	pH	Força iônica	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R_I	R_I	Proteína	Atividade	
										Perdida no	Processo
4.1	MANAE-10	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3	43%	38%	12%	38%	25%
4.2	MANAE-20	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3	72%	58%	10%	65%	54%
4.3	MANAE-30	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3	88%	94%	28%	63%	66%
4.4	MANAE-40	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3	96%	99%	39%	58%	61%
2.5*	MANAE-80	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3	100%	97%	49%	51%	51%

*Condição adicionada para comparação.

Tabela 4.13 – Resultados de experimentos de imobilização do complexo NS50013 em suportes MANAE contendo diferentes densidades de grupos amino seguido de diferentes estratégias de entrecruzamento.

MANAE-AGAROSE CONTENDO DIFERENTES DENSIDADES DE GRUPOS AMINO ENTRECruzADO COM GLUTARALDEÍDO OU ALDEÍDO DEXTRANA									
Condição	Suporte	Enzima	pH	Força iônica	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	Perda de	Atividade	A_E
							Atividade na etapa (%)	Entrecruzada (%)	
5.1	MANAE 30 + Glutaraldeído 0.08%	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	13%	24%	10%
5.2	MANAE 30 + Glutaraldeído 0.15%	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	62%	100%	22%
5.3	MANAE 30 + 5mg Dextrana-aldeído 15-25 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	45%	53%	16%
5.4	MANAE 30 + 10mg Dextrana-aldeído 15-25 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	74%	100%	18%
5.5	MANAE 30 + 5mg Dextrana-aldeído 6 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	55%	27%	8%
5.6	MANAE 30 + 10mg Dextrana-aldeído 6 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	69%	100%	20%
5.7	MANAE 30 + 10mg Dextrana-aldeído 70 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	92%	100%	7%
5.8	MANAE 30 + 10mg Dextrana-aldeído 413 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	100%	100%	0%
5.9	MANAE 40 + Glutaraldeído 0.08%	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	15%	53%	31%
5.10	MANAE 40 + Glutaraldeído 0.15%	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	40%	100%	28%
5.11	MANAE 40 + Glutaraldeído 0.3%	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	100%	100%	0%
5.12	MANAE 40 + Glutaraldeído 1.5.%	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	100%	100%	0%
5.13	MANAE 40 + 5mg Dextrana-aldeído 15-25 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	70%	53%	16%
5.14	MANAE 40 + 10mg Dextrana-aldeído 15-25 kDa	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	65%	100%	21%
5.15	MANAE 40 + CDII 5 mM	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	17%	32%	20%
5.16	MANAE 40 + CDII 10 mM	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	16%	30%	15%
5.17	MANAE 40 + CDII 20 mM	Não modificada	7.0	5 Mm	25°C	3 e 1	20%	32%	6%

O entrecruzamento do derivado MANAE-40 com glutaraldeído 0.08% apresentou desempenho na etapa de entrecruzamento similar ao observado para derivado MANAE-80, o procedimento foi suficiente para entrecruzar 53% da atividade rendendo A_E de 31%. Já o entrecruzamento do derivado com glutaraldeído 0.15% foi suficiente para entrecruzar 100% da atividade adsorvida no suporte. Apesar de não ter entrecruzado 100% da proteína, a atividade efetivamente imobilizada no derivado MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.08% apresentou A_E de 31%, já o entrecruzamento com glutaraldeído 0.15% rendeu A_E de 28%. Assim como observado para o MANAE-80, o entrecruzamento com concentrações relativamente elevadas de glutaraldeído conduziu a perda de 100% da atividade durante o processo.

Uma vez que o entrecruzamento com dextrana-aldeído de altos pesos moleculares (70 e 413 kDa) ocasionou perda significativa de atividade durante o entrecruzamento do derivado MANAE-30, o entrecruzamento de MANAE-40 foi realizado empregando apenas dextrana-aldeído de 15-25 kDa. Como observado para o derivado MANAE-30, a concentração de 5 mg/g de gel não foi suficiente para entrecruzar 100% da atividade imobilizada no suporte, o melhor resultado em termos de A_E (21%) foi obtido empregando o polímero na concentração de 10 mg/g de gel (Tabela 4.13, condições 5.14 e 5.13). Os resultados de entrecruzamento com altas concentrações de glutaraldeído ou aldeído-dextrana dão indícios de que ligações covalentes excessivas entre as enzimas do complexo NS50013 e o suporte causam perda de atividade enzimática. Ince *et al.* (2012) avaliaram a adsorção de celulasas de *Trichoderma viride* em micro-esferas de poliestireno seguido de entrecruzamento com glutaraldeído, alcançando $R\%$ de 63% (CMC), embora o método de medida pontual de atividade com 35 minutos de reação empregado no trabalho possa ter conduzido a resultados equivocados.

A estratégia de adsorção iônica utilizou os resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico presentes na superfície das enzimas do complexo. O bom desempenho na etapa de adsorção do complexo celulolítico em suportes MANAE-agarose, juntamente com a grande densidade de ácidos aspárticos e glutâmicos na superfície das enzimas sugeriu a possibilidade de união covalente direta dos grupos amino do suporte com os ácidos carboxílicos das proteínas empregando Cdii como agente ativador. Nessa nova estratégia, assim que as enzimas foram adsorvidas em MANAE-40, Cdii foi adicionado ao meio reacional nas concentrações de 5, 10 e 20 mM, incubando-se por 1 hora (Tabela 4.13, condições 5.15, 5.16 e 5.17). Independentemente da concentração de Cdii empregada, aproximadamente 30% da atividade adsorvida ao suporte foi covalentemente unida. Apesar de a concentração de Cdii não ter sido suficiente para unir 100% da enzima ao suporte, foram observados resultados

satisfatórios em termos de A_E principalmente para os derivados entrecruzados com Cdii 5 e 10 mM.

O aumento na concentração de Cdii não foi efetivo para aumentar o número de moléculas de enzimas covalentemente unidas ao suporte, porém ocasionou maior perda de atividade. A imobilização empregando Cdii é dependente da orientação dos grupos ácidos carboxílicos na superfície das proteínas em relação aos grupos amino presentes no suporte, pois eles necessitam estar orientados e espacialmente próximos para que a reação ocorra. Os resultados obtidos para o entrecruzamento empregando diferentes concentrações de Cdii sugerem que apenas uma parcela das enzimas adsorvidas ao suporte continha ácidos carboxílicos próximos o suficiente da superfície do suporte para que a reação pudesse ocorrer. Vale ressaltar o fato de que os complexos celulolíticos são formados por diferentes enzimas contendo padrões de química de superfície diferentes. A camada de glicosilação também pode atrapalhar a reação direta dos grupos amino na superfície do suporte com as enzimas do complexo celulolítico. Zhou (2010) imobilizou celulase de *Trichoderma viride* em quitosana solúvel modificada, sendo que primeiramente as celulasas foram adsorvidas ao suporte por interação iônica, seguindo-se união covalente entre a enzima e o polímero empregando Cdii como agente ativador. O melhor resultado em termos de $R\%$ obtido nesse trabalho foi de 48%, um bom resultado possivelmente explicado pelo fato do suporte ser um polímero solúvel e maleável, o que faz a reação ser menos dependente da orientação entre a enzima e o suporte além do fato de que em suportes insolúveis limitação difusionais são quase desprezíveis.

4.3.7 Estabilidade Térmica

Com base nos resultados de imobilização do complexo NS50013 alguns derivados foram selecionados para realização de experimentos de estabilidade térmica. A Figura 4.16 mostra os resultados de estabilidade térmica para os derivados adsorvidos em MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino em sua superfície. Os derivados foram incubados a pH 7.0 (tampão fosfato 5 mM) e 45 °C, amostras foram retiradas e a atividade residual na suspensão (A_r) foi medida em função do tempo de incubação.

A estabilidade dos derivados imobilizados em MANAE-agarose ativados com 80, 40, 30 e 20 μmol de grupos amino foi inferior à observada para a enzima solúvel. Como observado através dos inúmeros experimentos de imobilização realizados, celulasas são muito sensíveis perdendo atividade facilmente ao interagir com superfícies de suportes, seja de forma covalente ou iônica (ex. Imobilização em agarose-PEI e agarose-DS). Uma vez

adsorvida aos suportes MANAE-agarose a baixa força iônica do meio faz com que as enzimas interajam fortemente com o suporte. Aos poucos, as proteínas vão se acomodando sobre a superfície do material de forma a aumentar o número de interações iônicas. Esse aumento nas interações iônicas pode ocasionar alterações estruturais fazendo com que as enzimas adsorvidas percam atividade ou que as enzimas se posicionem em uma orientação que dificulte ou impeça a chegada do substrato até o sítio ativo e/ou a saída dele. O aumento da temperatura faz com que proteínas vibrem mais (NELSON e COX, 2004) acelerando o processo de acomodação na superfície de suportes iônicos, o que no caso das celulasas deve ter conduzido a total perda da atividade catalítica. Quanto maior a densidade de grupos amino na superfície do suporte mais rapidamente o derivado perdeu atividade, pois os derivados MANAE-80 e MANAE-40 perderam 100% da atividade em menos de 30 minutos nas condições do experimento, enquanto MANAE-30 e MANAE-20 conservavam menos de 40% da atividade inicial. O derivado MANAE-10 apresentou comportamento totalmente distinto, sua atividade foi superior à observada para a enzima livre, esse resultado pode ser devido à partição das enzimas presentes no complexo NS50013 durante o processo de imobilização uma vez que R_I para esse derivado foi de apenas 43%.

Os derivados imobilizados em MANAE-40 por adsorção, seguido de entrecruzamento com glutaraldeído ou aldeído-dextrana foram selecionados para realização de experimentos de estabilidade térmica. Os derivados foram incubados a 45°C e pH 7.0 (tampão fosfato 100 mM) e os resultados da atividade A_t acompanhada em função do tempo de incubação podem ser vistos na Figura 4.17. Todos os derivados apresentaram resultados de estabilidade térmica moderadamente superiores ao observado para a enzima livre.

A Tabela 4.14 mostra os resultados para a meia vida dos derivados entrecruzados com dextrana-aldeído. Foi observado aumento de 1.8 e 2.0 vezes na meia vida dos derivados entrecruzados com concentrações de 5 e 10 mg/g de suporte, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos para os derivados entrecruzados com glutaraldeído 0.08 e 0.15% (aumento na meia vida de 2.8 e 4.4 vezes). Geralmente derivados entrecruzados com polímeros não apresentam grande aumento em sua estabilidade. Nesses métodos de imobilização o polímero, maleável, se adapta à estrutura da proteína durante o processo permitindo que a estrutura da enzima conserve certo grau de liberdade, porém não aumenta consideravelmente a rigidez estrutural das proteínas. Como já observado nos experimentos de entrecruzamento, o aumento na concentração de glutaraldeído ou aldeído-dextrana, além de permitir total entrecruzamento da proteína unida ao suporte também ocasionou maior perda de atividade. A utilização de concentrações maiores de agente entrecruzante promoveu a perda de

100% de atividade, este fato foi ainda mais evidente quando aldeído-dextrana de alto peso molecular foi empregado. Por outro lado, como observado nos experimentos de estabilidade, apesar de o aumento na concentração de agente entrecruzante empregada ocasionar maior perda de atividade no processo, ocasionou também aumento na estabilidade térmica do derivado compensando a perda de atividade na etapa de imobilização.

O derivado imobilizado em agarose-bromocianógeno (condição de imobilização 1.16) também foi avaliado quanto a sua estabilidade térmica (Figura 4.17 e Tabela 4.14). De forma interessante a estabilidade térmica deste derivado aumentou em relação a enzima solúvel. Suportes ativados com bromocianógeno possuem alta reatividade com inúmeros nucleófilos presentes na estrutura das proteínas, em pH 7.0 e baixas temperaturas eles reagem rapidamente e de forma prioritária com o grupo N-terminal das proteínas. Porém, em períodos de incubação mais longos, como foi o caso, eles podem reagir com outros nucleófilos na estrutura protéica. Uma vez que o suporte reage com a estrutura da enzima em mais de um ponto a ligação torna-se multipontual podendo conferir certo aumento na estabilidade térmica das enzimas do complexo.

Figura 4.16 - Estabilidade térmica dos derivados preparados por adsorção do complexo NS50013 em MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino. O experimento foi realizado a pH 7.0 (tampão fosfato 5 mM) e 45 °C. ● Derivado MANAE-80; ☐ Derivado MANAE-40; △ Derivado MANAE-30; * Derivado MANAE-20; ✕ Derivado MANAE-10; ◆ Enzima livre.

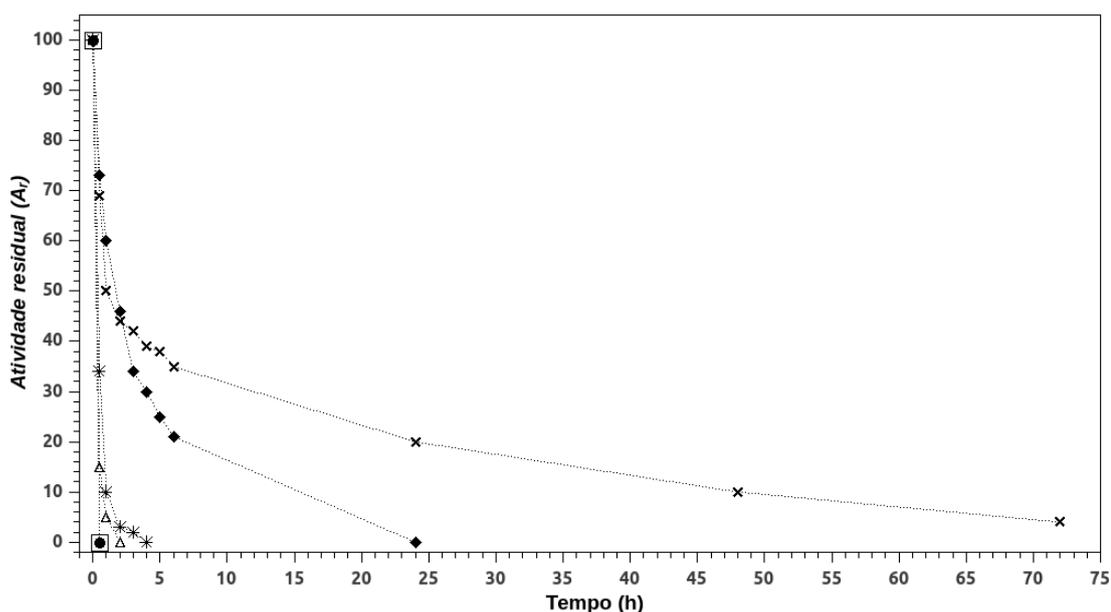
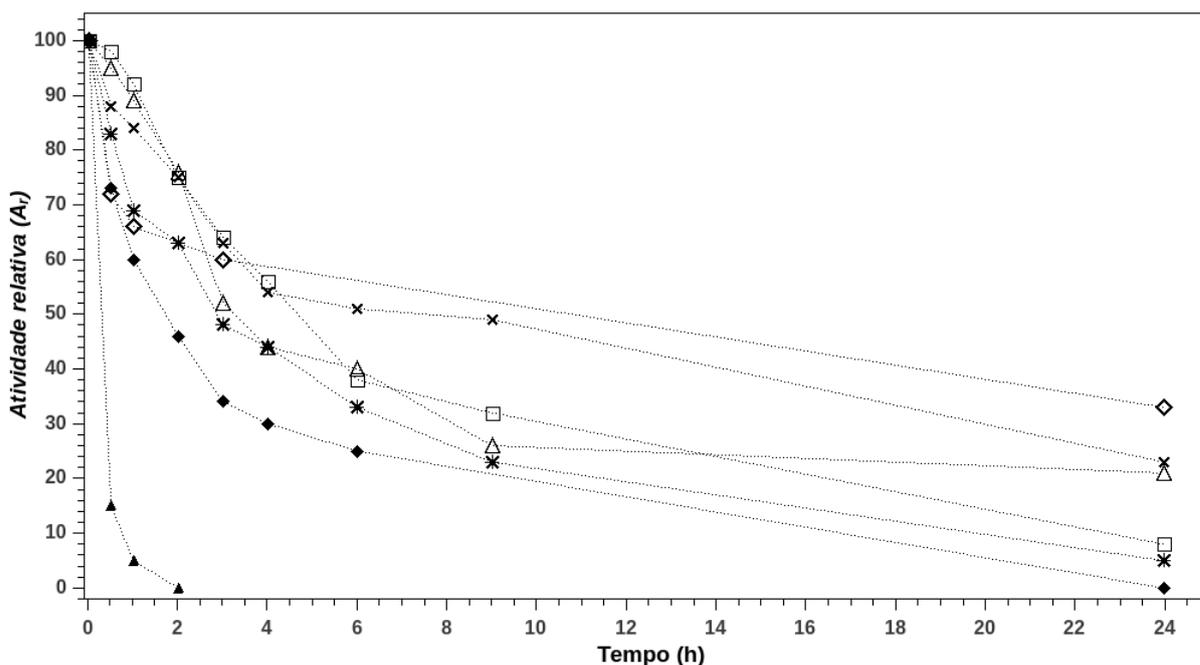


Figura 4.17 - Estabilidade térmica dos derivados preparados por adsorção do complexo NS50013 em MANAE-40 seguido de entrecruzamento com glutaraldeído ou aldeído dextrana em diferentes concentrações: ▲ Somente adsorvido em MANAE-40; ◻ Entrecruzado com glutaraldeído 0.08%; ✕ Entrecruzado com glutaraldeído 0.15%; * Entrecruzado com aldeído-dextrana (15-25 kDa) na concentração de 5 mg/g de gel; △ Entrecruzado com aldeído-dextrana (15-25 kDa) na concentração de 10 mg/g de gel; ◆ enzima livre. ◇ Estabilidade térmica do complexo NS50013 imobilizado em agarose-bromocianógeno (1.5 horas de encubação). O experimento foi realizado a pH 7.0 (tampão fosfato 5 mM) e 45 °C.



4.3.8 Derivado MANAE-40 Entrecruzado com Glutaraldeído 0.15% (v/v): Hidrólise de CMC, Papel Filtro Whatman e Avicel

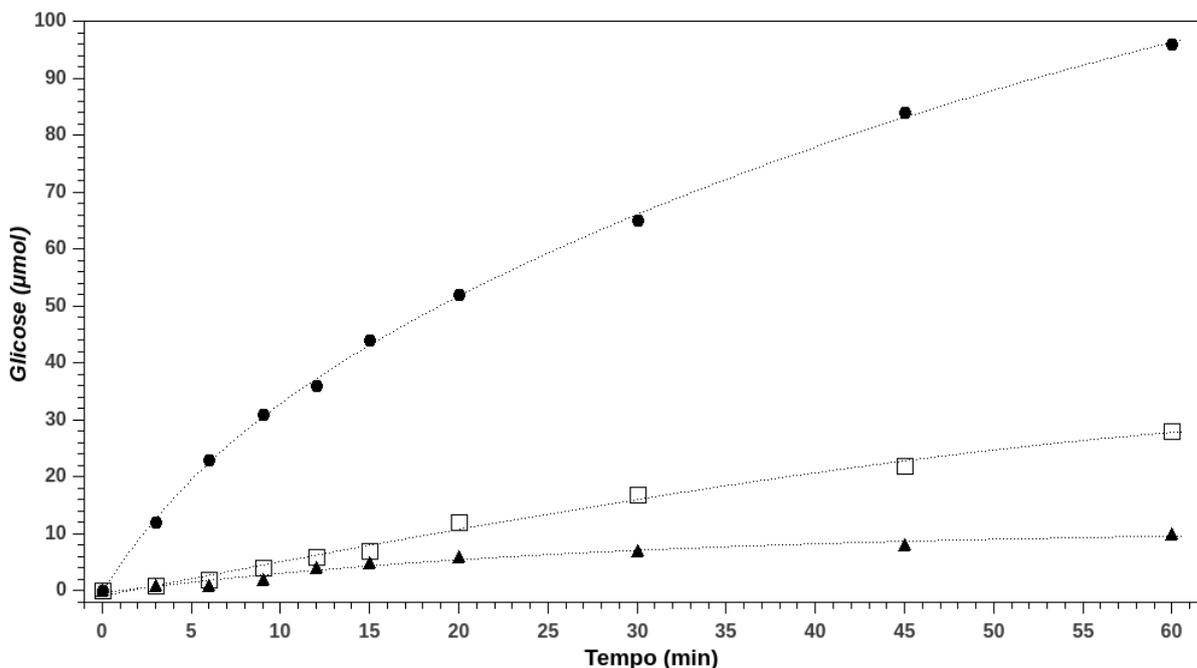
Inicialmente o estudo de imobilização do complexo celulolítico NS50013 em agarose foi realizado com o intuito de selecionar métodos de imobilização para celulasas. Em termos gerais, levando em conta A_E e o aumento da estabilidade térmica do derivado, o melhor protocolo desenvolvido foi adsorção em MANAE-40 seguido de entrecruzamento com glutaraldeído 0.15% (v/v). Todo o estudo de imobilização do complexo foi realizado empregando o substrato solúvel CMC em uma condição de atividade não ótima (pH 7.0 e 25 °C). Em princípio era esperado que o derivado não apresentasse atividade frente a substratos de celulasas insolúveis como o papel filtro Whatman n° 5 e avicel, para testar esta hipótese a atividade do derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% foi avaliada frente a esses substratos.

Tabela 4.14 – Tempo de meia vida e incremento no tempo meia vida do complexo celulolítico NS50013 imobilizado.

	Tempo de Meia Vida (h)	Aumento no Tempo de Meia Vida
Enzima livre	1.7	-
MANAE-40 + glutaraldeído 0.08% (v/v)	4.7	2.8x
MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% (v/v)	7.3	4.4x
MANAE-40 + dextrana-aldeído 5 mg/g de gel	2.9	1.8x
MANAE-40 + dextrana-aldeído 10 mg/g de gel	3.3	2.0x
Agarose- bromocianógeno	10.6	6.4x

A Figura 4.18 mostra os resultados para hidrólise de CMC (1%, m/v), papel filtro Whatman nº 5 (35 mg/mL) e avicel (1%, m/v) em tampão citrato 50 mM pH 4.8 e 50 °C. Estas são condições padrão para avaliação de atividade celulolítica, embora pequenas variações sejam comumente descritas na literatura. Antes do início dos experimentos, o derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% foi reduzido como boroidreto de sódio 0.1 mg/mL em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 a 4 °C. Esse procedimento foi realizado com o intuito de evitar o desprendimento de enzima do suporte durante o processo de hidrólise, o que poderia conduzir a resultados errôneos, não foi observado perda significativa de atividade enzimática durante este procedimento. Os experimentos de hidrólise foram realizados em reator encamisado, tampado, com controle de temperatura, controle de velocidade de agitação (500 RPM) e equipado com condensador. O volume do meio reacional empregado foi de 10 mL, em todos os experimentos foram empregados 50 mg de derivado. A reação foi conduzida por 60 minutos e a concentração de açúcares redutores liberados durante a hidrólise foi acompanhada por DNS.

Figura 4.18 – Hidrólise enzimática de derivado MANAE-40 frente a diferentes substratos. ● Hidrólise empregando CMC 1% (m/v) como substrato; □ Hidrólise empregando papel filtro Whatman n° 5 como substrato; ▲ Hidrólise empregando avicel 1% (m/v) como substrato. As reações foram realizadas a 50 °C empregando 50 mg de derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15% (v/v) em 10 mL de tampão citrato 50 mM pH 4.8.



Como pode ser observado na Figura 4.18 a atividade frente a CMC foi extremamente alta, produzindo 96 μ moles de açúcares redutores em 60 minutos. Contrariando o esperado, foi observado atividade do derivado frente aos substratos insolúveis papel filtro e avicel. A atividade frente a avicel foi baixa, alcançando apenas 10 μ moles de açúcares redutores em 60 minutos, 10 vezes menos que o observado para a hidrólise de CMC. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que avicel é um substrato macromolecular ($\sim 50 \mu$ m de diâmetro, segundo o fabricante) e portanto não pode penetrar nos poros do derivado. A hidrólise frente a papel filtro Whatman apresentou resultados animadores, uma vez que apesar de não ter sido extremamente alta apresentou resultados significativos (28 μ moles de açúcares redutores em 60 minutos). Papel filtro, assim como avicel, não pode penetrar nos poros do material, ao menos em estágios iniciais de reação.

Em um experimento realizado de forma paralela, 500 mg de derivado, 10 vezes mais que o empregado nos experimentos de hidrólise, foi incubado em 10 mL de tampão citrato 50 mM por 1 hora nas mesmas condições do processo de hidrólise. Neste experimento, a atividade no sobrenadante em função do tempo de incubação foi acompanhada por DNS, não tendo sido observada dessorção de celulasas a partir do suporte. Esse experimento simples mostrou que a

atividade observada frente aos substratos insolúveis foi efeito exclusivamente das enzimas imobilizadas no suporte MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.15% e não de enzima solúveis que se desprenderam do suporte.

Métodos de imobilização por adsorção, como o empregado na primeira etapa de obtenção do derivado, produzem derivados com distribuição pouco uniforme de proteínas na estrutura do material. Nesse método de imobilização, as camadas mais externas da superfície do suporte apresentam concentração de proteínas muito mais elevada que as camadas internas. O fato do derivado empregado possuir alta densidade de celulases nas camadas mais externas da partícula de agarose pode ter favorecido a reação frente a substratos insolúveis no estágio inicial de reação. Assim que iniciada a quebra do polímero de celulose, cadeias menores, solúveis, são liberadas no meio reacional. Essas cadeias de celulose são capazes de penetrar nos poros da agarose, de forma análoga ao observado para CMC, sendo então hidrolisadas totalmente a glicose.

A análise cuidadosa das curvas de hidrólise de celulose frente a papel filtro e avicel apresentou indicativos de que a atividade enzimática aumenta após os minutos iniciais de reação, suportando a hipótese de que a hidrólise de substratos insolúveis empregando celulases imobilizadas em MANAE-agarose entrecruzada com glutaraldeído ocorre em duas etapas. A atividade enzimática apresentada pelo derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% em termos de unidades de atividade (U) por grama de derivado é apresentada na Tabela 4.15. Com o intuito de realizar cálculos mais precisos e confiáveis, a atividade frente a substratos insolúveis (papel filtro e avicel) foi realizada empregando a região linear da curva de atividade após 10 minutos de reação. Os resultados observados na Tabela 4.15 foram utilizados como base para cálculos e experimentos posteriores.

4.3.9 Derivado MANAE-40 Entrecruzado com Glutaraldeído 0.15% (v/v): Experimentos de Hidrólise Longa e Reciclo empregando Papel Filtro Whatman como Substrato

Com o intuito de avaliar o desempenho do derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% (v/v) em reações de hidrólise em condições mais reais de processo empregamos papel filtro Whatman n° 5 como substrato. O papel filtro foi escolhido para realização de experimentos de hidrólise longa e reciclo porque dos três substratos padrão é o que mais se assemelha à celulose vegetal pré-tratada.

Os experimentos de hidrólise foram realizados em reator encamisado tampado com controle de temperatura e condensador. O meio reacional foi composto de 15 mL de tampão

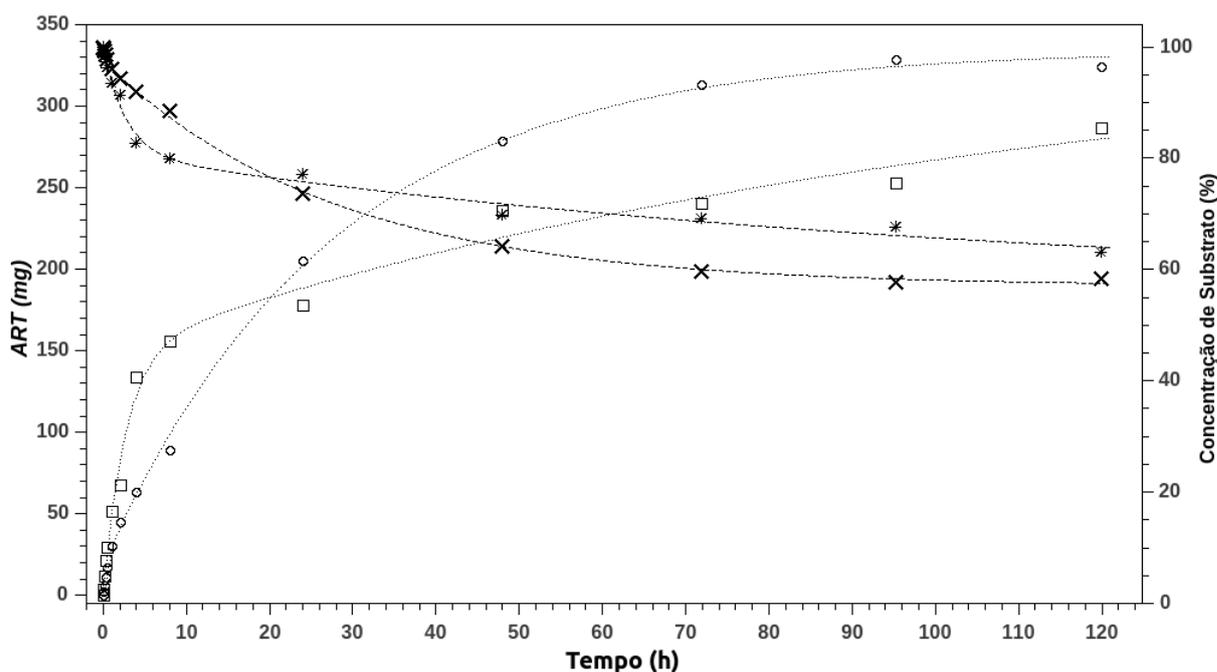
citrato 50 mM pH 4.8 contendo 5.2 U_{PF} do derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15%. A reação foi conduzida a 50 °C, alíquotas do meio reacional foram retiradas em intervalos periódicos para avaliação da quantidade de açúcares redutores produzidos na reação.

Tabela 4.15 – Atividade enzimática para o derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% (v/v) empregando diferentes substratos na condição padrão (tampão citrato 50 mM pH 4.8 e 50 °C).

Atividade Celulolítica		
CMC 1%	Papel Filtro Whatman	Avicel 1%
(m/v)	(35/mg/mL)	(m/v)
57.7 U _{CMC} .mg ⁻¹	12.6 U _{PF} .mg ⁻¹	3.2 U _{AVICEL} .mg ⁻¹

Inicialmente foi avaliada a hidrólise longa do derivado em um meio com altíssima concentração de substrato, 700 mg de substrato (46.6 mg/mL), com os resultados mostrados na Figura 4.19. Um experimento empregando enzima livre como catalisador (5.2 U_{PF}) foi realizado nas mesmas condições reacionais para comparação. Surpreendentemente, apesar de apresentar desempenho inferior à enzima livre no início da reação, o derivado MANAE-40 + glutaraldeído 0.15% alcançou rendimento superior ao final do processo. A enzima livre apresentou queda drástica em sua atividade hidrolítica após aproximadamente 10 horas de reação, já a atividade do derivado se mostrou constante até aproximadamente 48 horas. Esse resultado pode ser explicado pelo aumento na estabilidade térmica verificado para o derivado após o procedimento de imobilização. Após 48 horas de reação não foi observado incremento significativo na concentração de açúcares redutores obtidos para enzima livre e imobilizada. A hidrólise empregando MANAE-40 + glutaraldeído rendeu 324 mg de açúcares redutores, o que representa ~ 42% de conversão de substrato a produto, já a enzima livre gerou 286 mg de açúcares redutores (~ 37% de conversão). Apesar dos bons resultados não foi possível reciclar o derivado, pois a alta concentração de substrato empregada gerou uma solução de alta viscosidade que não pôde ser filtrada de forma eficiente. Além disso, foi impossível ao final do processo separar o derivado do substrato não hidrolisado. Esse substrato residual poderia interferir em futuros experimentos de hidrólise se o derivado fosse reaproveitado.

Figura 4.19 – Hidrólise enzimática longa empregando 46.66 mg/mL de papel filtro Whatman n° 5 como substrato. ○ Derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15% (v/v); □ Enzima livre; ✕ Consumo de substrato pelo derivado MANAE-80 glutaraldeído 0.15% (v/v) (%); * Consumo de substrato pela enzima livre (%). A reação foi conduzida em meio reacional composto de 15 mL de tampão citrato 50 mM pH 4.8 contendo 700 mg de substrato e 5.2 U_{PF} de enzima livre ou derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15%, a reação foi realizada em reator encamisado equipado com condensador a 50 °C e agitado mecanicamente (500 RPM). Os resultados são expressos em termos de miligramas de açúcares redutores totais (ART) presentes no meio reacional.



Para permitir a correta filtração do derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15%, possibilitando assim a realização de experimentos de reciclo do derivado, diminuimos a concentração de substrato empregada. Um novo experimento foi realizado nas mesmas condições do anterior, porém empregando concentração de 4.66 mg/mL de papel filtro Whatman n° 5 (Figura 4.20). Nessas condições, após 69 horas de reação ~ 47 mg de açúcares redutores foram liberados no meio reacional, o que representou aproximadamente 61% de conversão de substrato em produto. Após a reação, o derivado pôde ser facilmente filtrado e recuperado sem apresentar perda de massa no processo ou presença de excesso de substrato. Como pode ser visto na Figura 4.20, após aproximadamente 24 horas de reação não houve aumento significativo na concentração de ART no meio reacional. Sendo assim o tempo de 24 horas foi fixado como tempo padrão para realização dos experimentos de hidrólise e reciclo. Papel filtro Whatman n° 5 (4.66 mg/mL) foi hidrolisado por 24 horas empregando MANAE-80 + glutaraldeído 0.15%, nas mesmas condições das reações anteriores, atingindo conversão

de substrato em produto de 53% no primeiro ciclo. Após o termino da reação o derivado foi filtrado e lavado com água destilada para retirada de produtos e substrato residual, sendo em seguida empregado em um novo ciclo de reação exatamente nas mesmas condições do anterior. A reação foi repetida por 10 vezes e os resultados podem ser verificados na Figura 4.21. O derivado apresentou alta estabilidade operacional conservando mais de 90% de sua atividade ao final de 10 ciclos. Através deste experimento ficou claro, também, que nas condições empregadas é possível recuperar o derivado de forma eficiente através de processo de filtração. Este resultado demonstra que o derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15% (v/v) pode ser utilizado em reações de hidrólise de celulose insolúvel de forma eficiente permitindo recuperação e reciclo.

Figura 4.20 – Hidrólise enzimática longa empregando 4.66 mg/mL de papel filtro Whatman n° 5 como substrato. ○ Derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15% (v/v); ✕ Consumo de substrato pelo derivado MANAE-80 glutaraldeído 0.15% (v/v) (%). A reação foi conduzida em meio reacional composto de 15 mL de tampão citrato 50 mM pH 4.8 contendo 70 mg de substrato e 5.2 U_{PF} de derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15%, a reação foi realizada em reator encamisado equipado com condensador a 50 °C e agitado mecanicamente (500 RPM). Os resultados são expressos em termos de miligramas de açúcares redutores totais (ART) presentes no meio reacional.

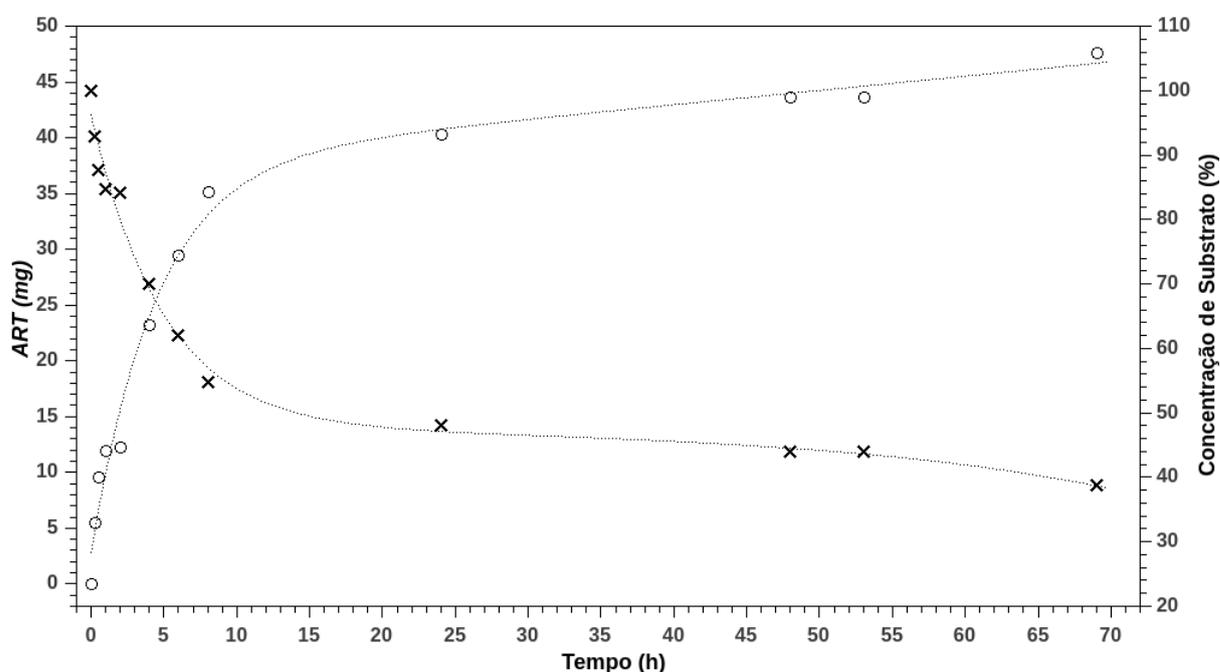
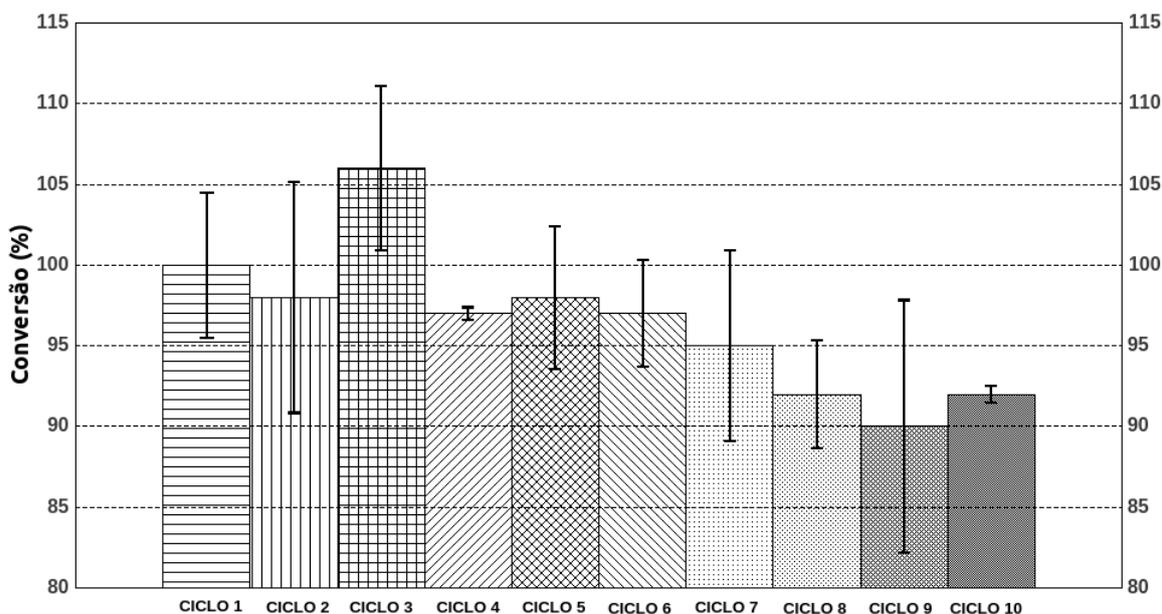


Figura 4.21 – Reciclo de derivado MANAE-80 + glutaraldeído 0.15%. Os resultados são expressos em termos de eficiência relativa na conversão de substrato em produto. As reações foram conduzidas empregando 4.66 mg/mL de papel filtro Whatman n° 5 como substrato em 15 mL de tampão citrato 50 mM pH 4.8, 5.2 U_{PF} de derivado foi usado como catalisador e a reação foi realizada a 50 °C por 24 horas em reator encamisado agitado mecanicamente (500 RPM) equipado com condensador. A eficiência na conversão de substrato em produto durante o primeiro ciclo de reação foi de 53%. Os experimentos foram realizados em triplicata



4.3.10 Discussão

Apesar de ser um assunto em evidência atualmente, a cinética de hidrólise de celulose a glicose não é bem conhecida, trata-se de um sistema multi-enzimático sinérgico que envolve no mínimo três enzimas diferentes. O sistema enzimático do fungo *Trichoderma reesei* é o mais empregado industrialmente para a hidrólise de celulose, secretando ao menos sete celulasas diferentes (LIU *et al.*, 2011). São duas celobiohidrolases, Cel7A e Cel6A (antigamente chamadas de CBHI e CBHII) que representam aproximadamente 50 e 20%, respectivamente, do conteúdo total de celulasas do complexo. O fungo produz também, geralmente, cinco endoglucanases, nomeadas Cel7B, Cel5A, Cel12A, Cel61A e Cel45A (EG1, EG2, EG3, EG4, e EG5 na nomenclatura antiga) que representam, respectivamente, ~15 %, 10 %, 1 %, <1 % e <1 % do total de celulasas do complexo (SANDGREN *et al.*, 2001). As celulasas produzidas por *T. Reesei*, assim como a maioria dos outros sistemas celulolíticos produzidos por fungos, são externamente glicosiladas e possuem organização bi-modular possuindo um domínio catalítico (CD) e um domínio de ligação ao substrato (CBD)

unidos através de um polipeptídeo extremamente glicosilado (linker) (KLEYWEGT *et al.*, 1997).

A Figura 4.22 mostra a estrutura da Cel7A contendo uma cadeia de celulose contínua, modelada com base em dados experimentais, unida ao sítio catalítico da enzima (DIVNE *et al.*, 1998). Através da análise de sua estrutura tridimensional é possível observar a principal característica desta enzima, um túnel completo de 50 Å de comprimento onde ocorre a quebra da molécula de glicose a celobiose a partir da extremidade redutora da cadeia de celulose (LIU *et al.*, 2011; STAHLBERG *et al.*, 1996). Acredita-se que a cadeia de celulose entre no túnel, ligando-se ao sítio ativo e avance liberando inúmeras unidades de celobiose antes de se desligar do sítio ativo (DIVNE *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2011). A Cel7A possui um ponto de glicosilação (N-acetilglucosamina) no resíduo Asn270 (DIVNE *et al.*, 1998). Além do CD a Cel7A possui um pequeno CBD unido ao CD através de sua extremidade N-terminal por um polipeptídeo glicosilado (MATTINEN *et al.*, 1997). O CBD tem forte afinidade por celulose unindo-se a ela e facilitando a catálise, principalmente frente a regiões cristalinas de celulose (MATTINEN *et al.*, 1997).

Uma das principais enzimas do complexo secretado pelo *T. Reesei* é a celobiohidrolase Cel6A, cuja estrutura tridimensional é mostrada na Figura 4.23 (KOIVULA *et al.*, 2001; ROUVINEN *et al.*, 1990). Assim como a Cel7A, a Cel6A possui em túnel completo de 20 Å de comprimento, onde entra a cadeia de celulose e se posiciona no sítio ativo através de sua extremidade não redutora, de onde são liberadas sucessivamente unidades de celobiose (KLEYWEGT *et al.*, 1997; KOIVULA *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2011; ROUVINEN *et al.*, 1990). A Cel6A possui glicosilações nos aminoácidos Asn289 e Asn310 (N-acetilglucosamina). Assim como a Cel7A, a Cel6A é composta por dois domínios distintos, um CD e um CBD, separados por um linker altamente glicosado rico em serinas e treoninas. O linker une o CD e o CBD através de suas extremidades N-terminal e C-terminal, respectivamente (ROUVINEN *et al.*, 1990).

Outra enzima extremamente importante para o complexo celulolítico secretado por *T. reesei* é a endoglucanase Cel7B, a qual apresenta elevada atividade frente a celulose solúvel, além de hidrolisar xilana e beta-glucana (KLEYWEGT *et al.*, 1997). A Cel7B apresenta um alto grau de homologia com a Cel7A (KLEYWEGT *et al.*, 1997), porém seu sítio ativo possui conformação aberta (Figura 4.24), em contraste com o túnel observado na estrutura da CBH Cel7A, o que permite sua atividade endo-glicolítica (KLEYWEGT *et al.*, 1997). Apesar de não possuir o túnel, a cavidade que contém o sítio catalítico da enzima ocupa uma face inteira da molécula protéica. Essa enzima possui glicosilações nos aminoácidos Asn56 e Asn182 (N-

acetilglucosamina).

A Cel5A também é uma endoglucanase de grande importância dentro do complexo celulolítico secretado pelo *T. reesei* e assim como a Cel7B possui sítio catalítico com conformação aberta que ocupa praticamente toda uma face de sua estrutura (Figura 4.25). A estrutura da proteína possui uma única glicosilação no aminoácido Asn33 (LEE *et al.*, 2011). Tanto a Cel7B quanto a Cel5A possuem um CBD unido ao domínio catalítico através da extremidade C-terminal e N-terminal, respectivamente. Os CBDs destas enzimas possuem alta homologia em sua sequência de aminoácidos com o CBD da Cel7A e se encontram unidos ao CD através de um linker glicosilado.

Tendo em conta a complexa estrutura apresentada pelas quatro principais enzimas que compõem o complexo NS50013 é possível inferir hipóteses acerca da dificuldade encontrada em imobilizá-las, mesmo empregando inúmeros suportes e protocolos de imobilização distintos. Experimentos de imobilização através de ligações covalentes entre a enzima e o suporte causaram, em sua maioria, 100% de perda na atividade catalítica quando as enzimas do complexo se uniam covalentemente ao suporte. Enzimas adsorvidas ionicamente aos suportes (MANAE, DEAE-sepharose e Sepharose-Q) foram capazes de conservar parcialmente sua atividade catalítica, porém quando foram adsorvidas em trocadores iônicos contendo altas densidades de cargas negativas ou positivas (sepharose-PEI e sepharose-DS) perdiam imediatamente 100% de sua atividade catalítica. Até mesmo suportes e condições reacionais que favorecem métodos de imobilização covalentes extremamente suaves, a imobilização em agarose-bromocianógeno, por exemplo, causaram grande perda de atividade durante o processo.

Inicialmente, poderia se esperar que essa perda de atividade durante o processo pudesse ser causada por alterações conformacionais na estrutura tridimensional das enzimas. Contudo, até mesmo métodos pouco agressivos de imobilização covalente, empregando açúcares provenientes das glicosilações das enzimas, ocasionaram 100% de perda de atividade (açúcares aminados em glioxil agarose e sepabeads-epóxido). Métodos de imobilização empregando ligações covalentes entre os açúcares provenientes de glicosilações e a superfície de suporte deveriam, em princípio, ser extremamente suaves uma vez que a flexibilidade das glicosilações permitem manter a flexibilidade na estrutura protéica evitando alterações severas em sua conformação tridimensional. Por outro lado métodos de imobilização por adsorção iônica permitiam a manutenção de atividade.

Figura 4.22- Estrutura tridimensional do domínio catalítico (CD) da celbiohidrolase Cel7A contendo uma cadeia de celulose contínua unida ao seu sítio ativo. Resíduos de ácido aspártico - azul forte; Resíduos de ácido glutâmico – azul fraco; Resíduos de lisina – vermelho; Cadeia de celulose e N-acetilglicosamina (glicosilação Asn270) – verde; Pontos de glicosilação – laranja. (DIVNE et al.; 1998).

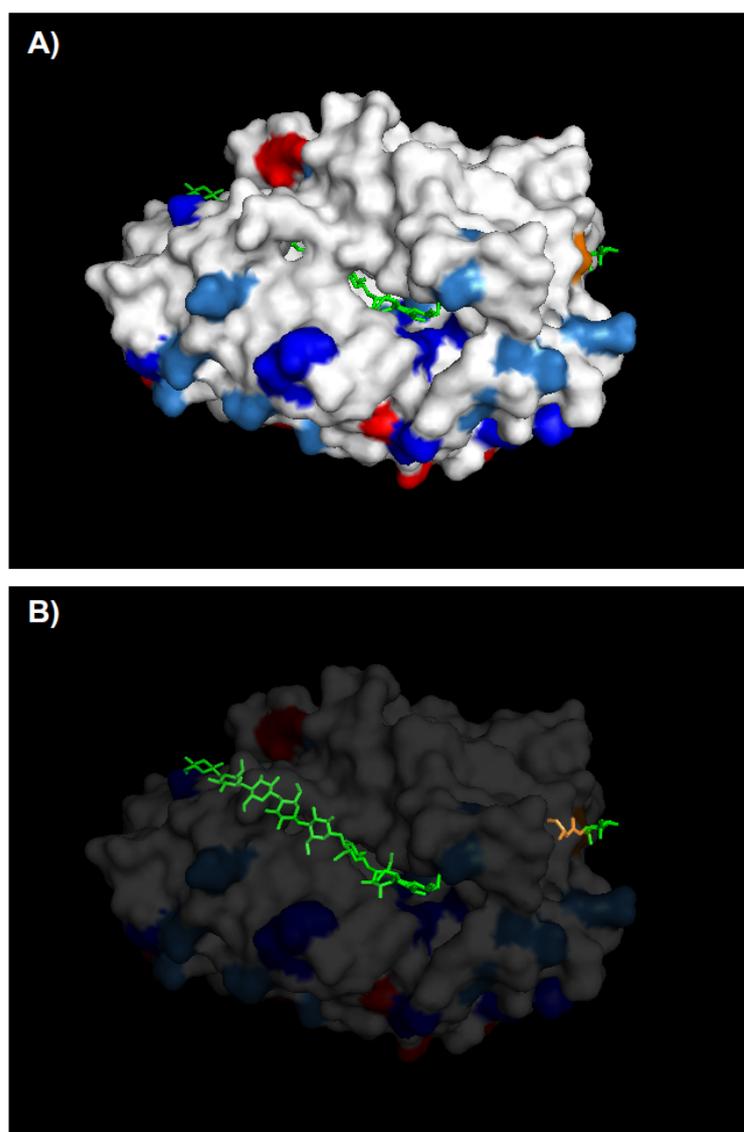
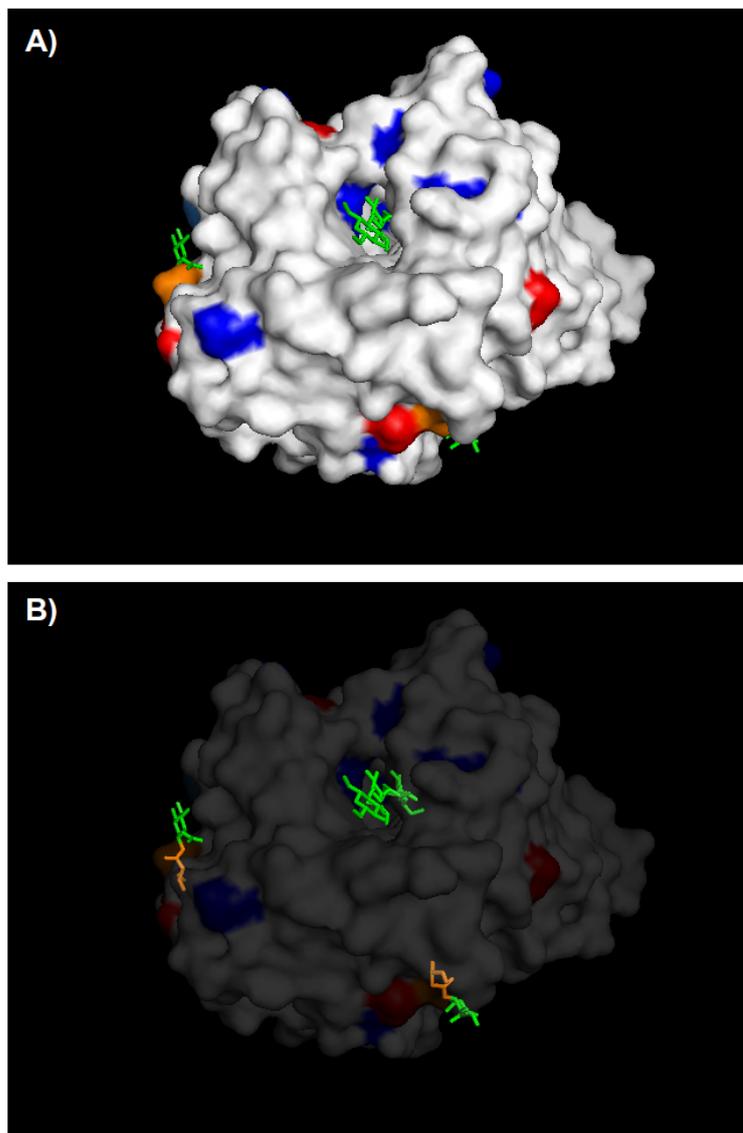


Figura 4.23- Estrutura tridimensional do domínio catalítico (CD) da celbiohidrolase Cel6A contendo O1-Metil-Glicose, 4-Deoxy-4-Tio-Beta-D-Glucopiranoose e alfa-D-Glucose unidos ao seu sítio ativo. Resíduos de ácido aspártico - azul forte; Resíduos de ácido glutâmico – azul fraco; Resíduos de lisina – vermelho; substratos sintéticos e N-acetilglicosamina (glicosilação Asn289 e Asn310) – verde; Pontos de glicosilação – laranja. (KOIVULA et al.; 2001).



Analisando a estrutura da Cel7A (Figura 4.22) e Cel6A (Figura 4.23) e a maneira como a macromolécula de celulose se liga a elas é possível inferir que a obstrução de qualquer uma das extremidades do túnel onde se localizam os sítios catalíticos destas enzimas impossibilitaria a catálise. A imobilização das enzimas com a face que contém o sítio catalítico em contato direto com a superfície do suporte também poderia obstruir parcialmente o túnel diminuindo em muito a velocidade da reação ou até mesmo impossibilitando a reação. Da mesma forma, as enzimas Cel7B e Cel5A, apesar de não possuírem um túnel completo,

apresentam uma cavidade catalítica muito grande que também ocupa toda uma face da estrutura destas enzimas. Estudos indicam (GOKHALE e Lee, 2012; LIU *et al.*, 2001) que para a hidrólise ocorrer uma porção significativa do polímero de celulose tem que estar aderida ao sítio ativo dessas enzimas. Desta maneira Cel7A e Cel5A também podem apresentar sérios prejuízos em sua atividade catalítica dependendo da orientação com que se unem a superfície do suporte.

Figura 4.24- Estrutura do domínio catalítico (CD) da endolucanase Cel7B. Resíduos de ácido aspártico - azul forte; Resíduos de ácido glutâmico – azul fraco; Resíduos de lisina – vermelho; N-acetilglicosamina (glicosilação Asn56 e Asn182) – verde; Pontos de glicosilação – laranja. (KLEYWEGT *et al.*; 1997).

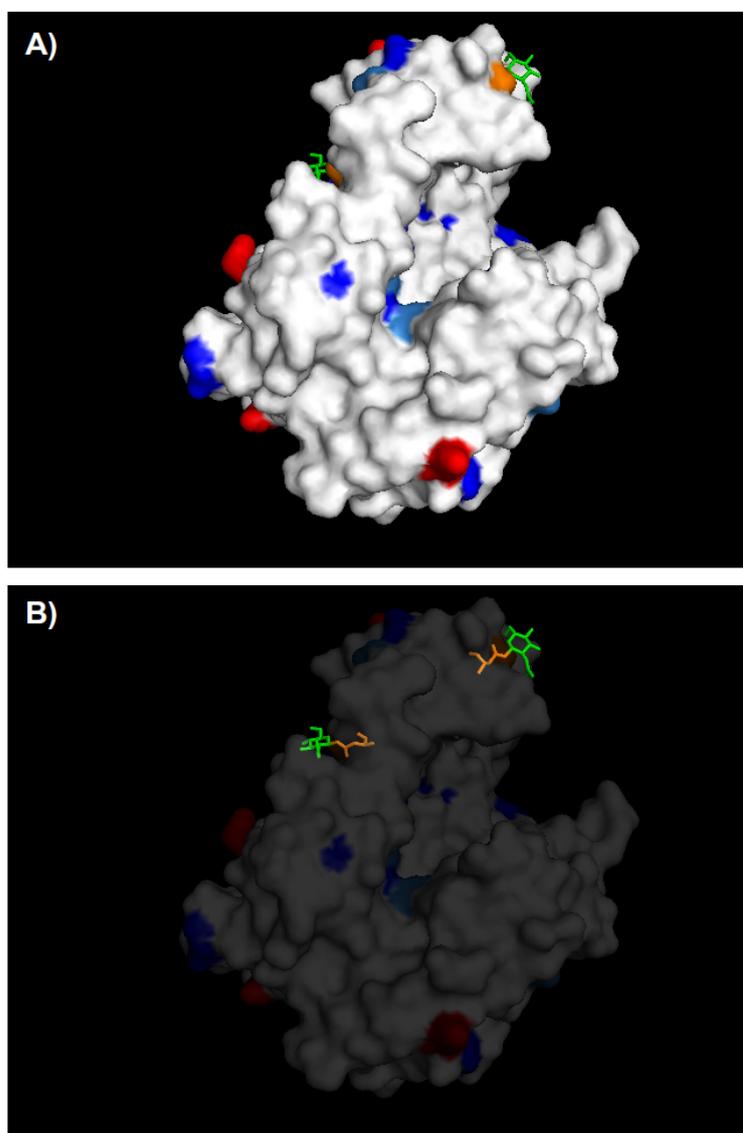
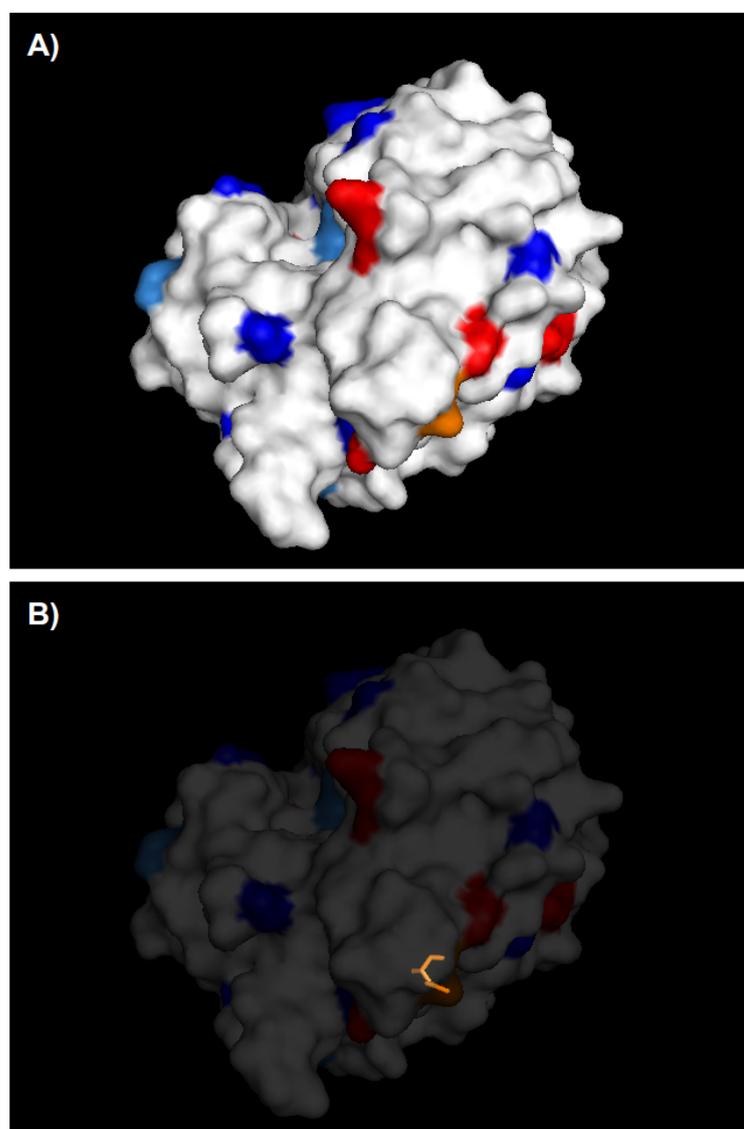


Figura 4.25- Estrutura do domínio catalítico (CD) da endolucanase Cel5A. Resíduos de ácido aspártico - azul forte; Resíduos de ácido glutâmico – azul fraco; Resíduos de lisina – vermelho; Pontos de glicosilação – laranja (LEE *et al.*, 2011).

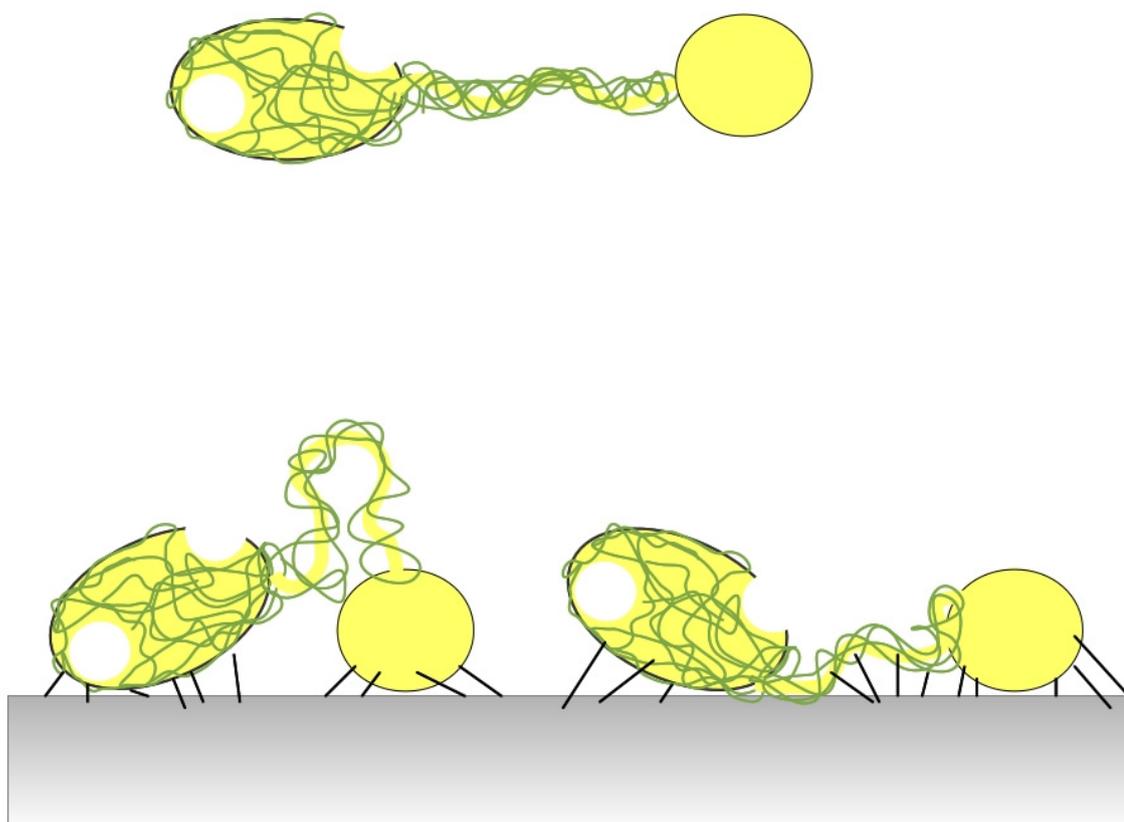


Além disso, a imobilização do CBD de celulasas ao suporte, que ocasionaria diminuição do seu grau de liberdade, também pode ocasionar sérios prejuízos à atividade celulolítica. Métodos de união covalente multipontual, fazem com que a enzima fique próxima à superfície do suporte, o que pode restringir o grau de liberdade da enzima e causar impedimentos estéricos de acesso do substrato ao sítio ativo, como pode ser observado na Figura 4.26.

A adsorção em suportes MANAE-agarose, que apresentou os melhores resultados em termos de $R\%$ e A_E , é uma ligação reversível. Em consequência, apesar de interagir com o

suporte, as enzimas do complexo conservam certo grau de liberdade. Quando a densidade de cargas positivas na superfície do suporte foi maior, a interação entre as enzimas e o suporte tornou-se mais intensa e conseqüentemente o grau de liberdade e a atividade catalítica diminuíram, conforme exemplificado no esquema mostrado na Figura 4.27.

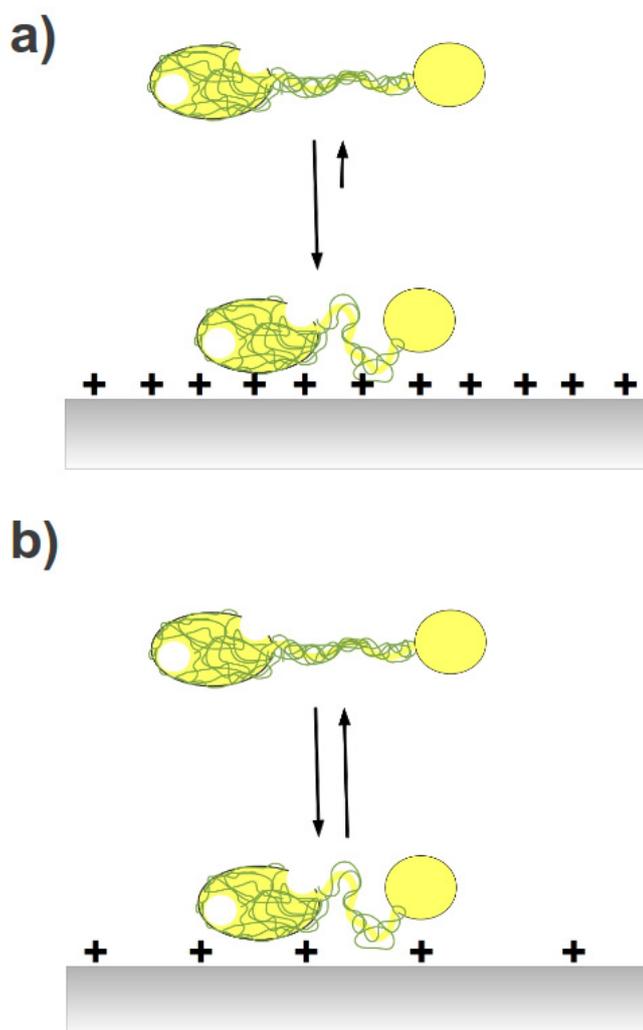
Figura 4.26- Representação esquemática da imobilização de celulases por união covalente multipontual. Amarelo – Celulases compostas de um domínio catalítico (CD) e um domínio de união ao substrato (CBD); Verde – Glicosilações; Cinza – superfície do suporte.



A adsorção iônica é um fenômeno dependente de um equilíbrio químico. Adsorção iônica eficiente implica que o equilíbrio químico está deslocado para a condição de enzima unida ao suporte. Quanto maior a densidade de cargas na superfície do material, mais esse equilíbrio é deslocado para a condição de enzima unida ao suporte, para uma dada condição reacional. Essa condição de equilíbrio químico permite que as enzimas adsorvidas ao suporte conservem certo grau de liberdade uma vez que elas não permanecem estáticas na superfície do suporte, se desorvendo e rapidamente voltando a se adsorver em outro ponto da superfície. Esse fenômeno garante o grau de liberdade de celulases adsorvidas em suportes

iônicos (sobretudo MANAE-agarose) e conseqüentemente a manutenção de parte da atividade catalítica. Esta hipótese é suportada pelo fato de que uma vez que as enzimas imobilizadas em MANAE-agarose foram desorvidas do suporte 100% da atividade catalítica foi recuperada.

Figura 4.27- Representação esquemática da imobilização de celulasas por adsorção iônica em suportes carregados positivamente. a) Adsorção iônica forte (suporte com alta densidade de cargas positivas); b) Adsorção iônica fraca (suporte com baixa densidade de cargas positivas). Amarelo – Celulasas compostas de um domínio catalítico (CD) e um domínio de união ao substrato (CBD); Verde – Glicosilações; Cinza – superfície do suporte.



No caso dos suportes agarose-PEI e agarose-DS a interação iônica além de mais intensa ocorria em três dimensões ocasionando total perda de atividade e impedindo a desorção da enzima do suporte mesmo em altos valores de força iônica. A Figura 4.28 exemplifica a adsorção das enzimas do complexo em Agarose-PEI. Neste caso, a interação iônica é muito forte e ocorre de forma simultânea entre grupos negativos na estrutura

enzimática e grupos positivos do polímero PEI, altamente flexível e que se ajusta a estrutura das proteínas. Nessa condição, o equilíbrio químico é praticamente inexistente de forma que as celulasas ficam restritas a pontos específicos na superfície do suporte, com diminuição no grau de liberdade, o que, juntamente com a obstrução do sítio ativo das enzimas, deve ter causado a perda de atividade de atividade observada.

O entrecruzamento de enzimas imobilizadas em MANAE-agarose empregando glutaraldeído ou aldeído-dextrana em baixas concentrações, por sua vez, favorece a manutenção do grau de liberdade das enzimas. Uma vez entrecruzado o derivado MANAE-agarose, é re-suspendido em tampão fosfato 100 mM (valores moderados de força iônica) a interação entre a enzima e o suporte diminui por anulação das cargas do suporte com os íons do tampão, favorecendo a dessorção da enzima. Esta, porém, permanece unida covalentemente ao suporte através de alguns pontos (Figura 4.29). Nessa condição, as celulasas ainda são capazes de conservar certo grau de liberdade, estando unidas covalentemente ao suporte, porém não estando adsorvidas à superfície do suporte.

Figura 4.28- Representação esquemática da imobilização de celulasas por adsorção iônica em suportes Agarose-PEI. Amarelo – Celulasas compostas de um domínio catalítico (CD) e um domínio de união ao substrato (CBD); Verde – Glicosilações; Cinza – superfície do suporte.

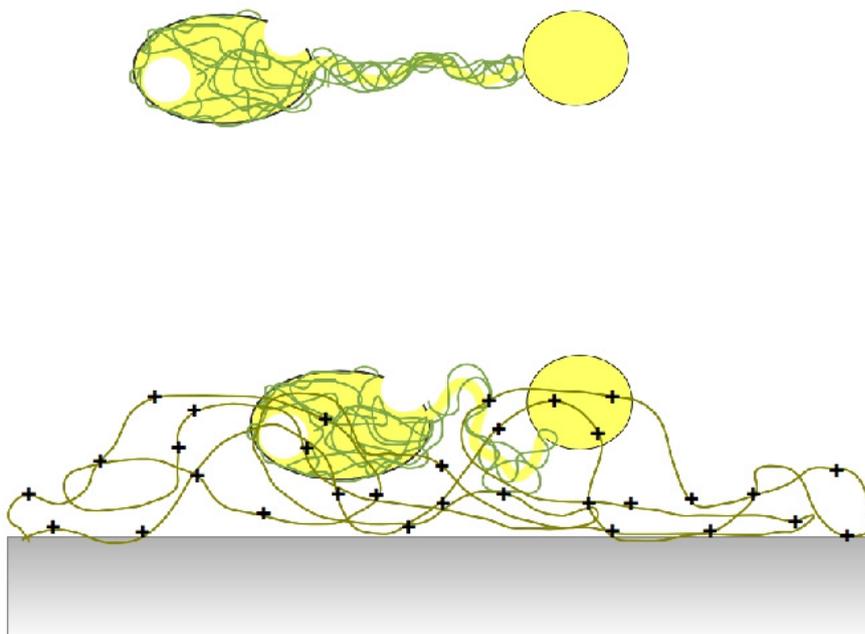
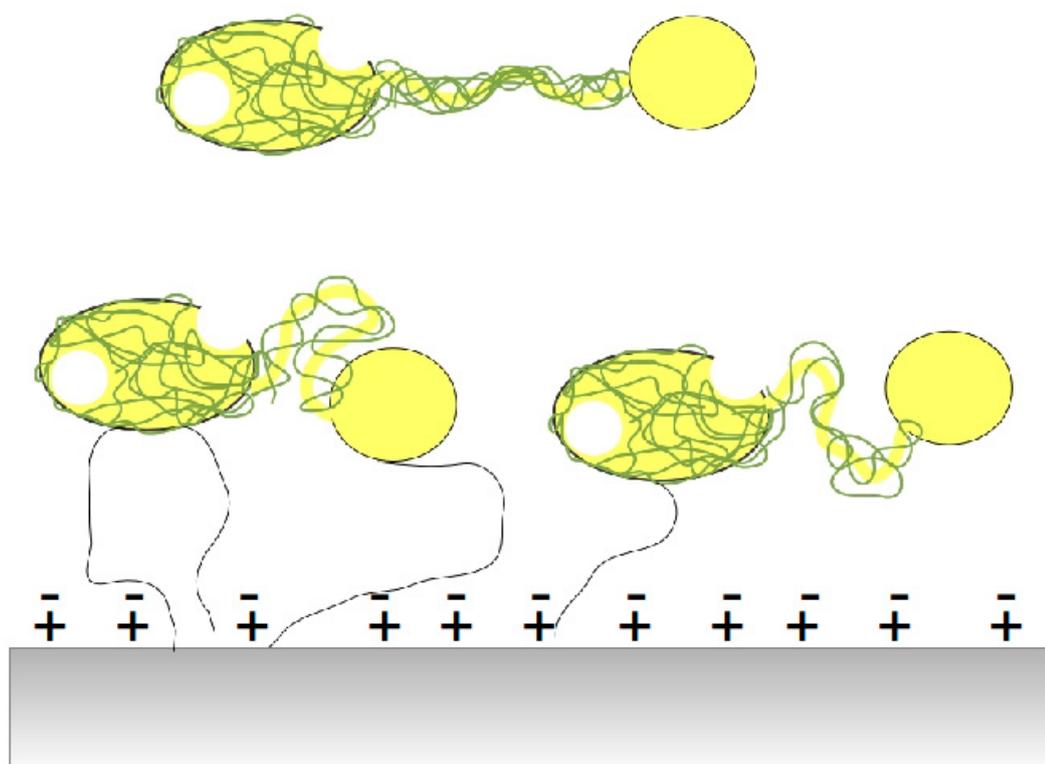


Figura 4.29- Representação esquemática da imobilização de celulases por adsorção iônica em suportes MANAE-agarose seguido de entrecruzamento com glutaraldeído em baixas concentrações. Amarelo – Celulases compostas de um domínio catalítico (CD) e um domínio de união ao substrato (CBD); Verde – Glicosilações; Cinza – superfície do suporte.



4.4 Conclusão do Capítulo

Como demonstrado através dos inúmeros experimentos de imobilização realizados, a imobilização do complexo celulolítico de *T. reesei* não é algo trivial. Métodos de imobilização covalentes multipontuais causam perda de atividade total das enzimas do complexo e métodos empregando adsorção através de interações químicas fracas não podem ser aplicadas em condições reais de processo uma vez que ocorre dessorção das enzimas para o meio reacional. Neste contexto, selecionou-se como mais adequado protocolo para imobilização do complexo em suportes porosos a adsorção inicial das enzimas em suportes carregados positivamente, seguido de entrecruzamento com agentes bi ou poli-funcionais. Esse protocolo foi então otimizado para adsorção em MANAE-agarose contendo diferentes densidades de grupos amino, seguida de entrecruzamento com glutaraldeído ou aldeído-dextrana. Foi verificado que a densidade de grupos amino na superfície do suporte tem papel importante no processo de imobilização. Os melhores resultados no processo de imobilização ($R\%$ e A_E) foram alcançados empregando MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.08% e 0.15%. A imobilização conferiu aumento na estabilidade térmica do complexo celulolítico de 4.4x para MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.15% e 6.4x para o derivado imobilizado em agarose bromocianógeno. Experimentos de hidrólise de substratos insolúveis (papel filtro Whatman e avicel) empregando o derivado MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.15% (v/v) mostraram que é possível a hidrólise de materiais lignocelulósicos empregando celulasas imobilizadas. Em experimentos de hidrólise longa de papel filtro foi verificado que o complexo NS50013 imobilizado apresenta desempenho superior em comparação com a enzima livre, sendo posteriormente reciclado por dez ciclos reacionais conservando mais de 90% de sua atividade catalítica. Com base nos inúmeros experimentos realizados foi apresentada uma hipótese para explicar a dificuldade em imobilizar celulasas, hipótese esta baseada em análise das estruturas tridimensionais das principais enzimas do complexo. Acredita-se que a perda de atividade foi causada pela diminuição no grau de liberdade das enzimas e por obstrução de seu sítio ativo uma vez que ao ser impedida a entrada e/ou saída do substrato do sítio ativo é impossível efetuar a catálise.

4.5 Referências

ANDRIANI, D.; SUNWOO, C.; RYU, H.-W.; PRASETYA, B.; PARK, D.-H. Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, p. 29-33, 2012.

BAUER, L. A.; BIRENBAUM, N. S.; Meyer, G. J. Biological applications of high aspect ratio nanoparticles. **Journal Of Materials Chemistry**, v. 14, p. 517-526, 2004.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHENG, Z.; WU, C.; YANG, W.; XU, T. Preparation of bromomethylated poly(2,6-dimethyl-1,4-phenylene oxide) hollow fiber cation-exchange membranes and immobilization of cellulase thereon. **Journal of Membrane Science**, v. 358, p. 93-100, 2010.

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, n. 1, p. 33-42, 2001.

DAOUD, F. B.-O.; KADDOUR, S.; SADOON, T. Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 75, p. 93-99, 2010.

DINCER, A.; TELEFONCU, A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, 45, 10-14, 2007.

DIVNE, C.; STAHLBERG, J.; TEERI, T.; JONES, T. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 angstrom long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Journal of Molecular Biology**, v.275, p. 309-325, 1998.

E-GHAFFAR, M. A. A.; HASHEM, M. S. Chitosan and its amino acids condensation adducts as reactive natural polymer supports for cellulase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 507-516, 2010.

FABER, K. Biotransformations in **Organic Chemistry: A Textbook**. 3rd ed., Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, 1997.

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.

GOKHALE, A.; LEE, I. Cellulase immobilized nanostructured supports for efficient saccharification of cellulosic substrates. **Topics in Catalysis**, v. 55, p. 1231-1246, 2012

GUISAN, J. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

HIRSH, S. L.; BILEK, M. M. M.; NOSWORTHY, N. J.; KONDYURIN, A.; DOS REMEDIOS, C. G.; MCKENZIE, D. R. A Comparison of Covalent Immobilization and Physical Adsorption of a Cellulase Enzyme Mixture. **Langmuir**, v. 26, p. 14380-14388, 2010.

HONG, J.; GONG, P. J.; YU, J. H.; XU, D. M.; SUN, H. W.; YAO, S. Conjugation of α -chymotrypsin on a polymeric hydrophilic nanolayer covering magnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 99-105, 2006.

HUNG, T.-C.; FU, C.-C.; SU, C.-H.; CHEN, J.-Y.; WU, W.-T.; LIN, Y.-S. Immobilization of cellulase onto electrospun polyacrylonitrile (PAN) nanofibrous membranes and its application to the reducing sugar production from microalgae. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 30-37, 2011.

INCE, A.; BAYRAMOGLU, G.; KARAGOZ, B.; ALTINTAS, B.; BICAK, N.; ARICA, M. Y. A method for fabrication of polyaniline coated polymer microspheres and its application for cellulase immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 189, p. 404-412, 2012.

JORDAN, J.; KUMAR, C. S. S. R.; THEEGALA, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 68, p. 139-146, 2011.

KHOSHNEVISAN, K.; BORDBAR, A.-K.; ZARE, D.; DAVOODI, D.; NORUZI, M.; BARKHI, M.; TABATABAEI, M. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 669-673, 2011.

KLEYWEGT, G.; ZOU, J.; DIVNE, C.; DAVIES, G.; SINNING, I.; STAHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; SRISODSUK, M.; TEERI, T.; JONES, T. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 angstrom resolution, and a comparison with related enzymes. **Journal of Molecular Biology**, v. 272, p. 383-397, 1997.

KOIVULA, A.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; VALKEAJARVI, A.; CLAEYSSSENS, M.; TELEMAN, O.; KLEYWEGT, G.; SZARDENINGS, M.; ROUVINEN, J.; JONES, T.; TEERI, T. The active site of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II: The role of tyrosine 169. **Protein Engineering**, v 9, p. 691-699, 1996.

KRAULIS, P.; CLORE, G.; NILGES, M.; JONES, T.; PETTERSSON, G.; KNOWLES, J.; GRONENBORN, A. Determination of the 3-dimensional solution structure of the c-terminal domain of cellobiohydrolase-i from *trichoderma-reesei* - a study using nuclear magnetic-resonance and hybrid distance geometry dynamical simulated annealing biochemistry. **American Chemical Society**, v. 28; p. 7241-7257; 1989.

LAVOINE, N.; DESLOGES, I.; DUFRESNE, A.; BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 735- 764, 2012.

LEE, T. M.; FARROW, M. F.; ARNOLD, F. H.; MAYO, S. L. A structural study of *Hypocrea jecorina* Cel5A. **Protein Science**, v. 20, p. 1935-1940, 2011.

LIANG, W.; CAO, X. Preparation of a pH-sensitive polyacrylate amphiphilic copolymer and its application in cellulase immobilization. **Bioresource Technology**, 2012, v. 116, p. 140-146, 2012.

LIAO, H.; CHEN, D.; YUAN, L.; ZHENG, M.; ZHU, Y.; LIU, X. Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe₂O₃ magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 600-604, 2010.

LIU, Y. S.; BAKER, J. O.; ZENG, Y.; HIMMEL, M. E.; HAAS, T.; DING, S.Y. Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 11195-11201, 2011.

LOPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 70-75, 2005.

LU, J.; WEERASIRI, R. R.; LEE, I. Carbon nanotubes tuned foam structures as novel nanostructured biocarriers for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 35, p. 181-188, 2013.

MARTINS, R. E. **Estudo da imobilização de celulase em géis de quitosana**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2007.

MARTINS, R. E., ADRIANO, W. S., GIORDANO, R. L. C. Obtenção de derivados imobilizados de celulases em géis de quitosana. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Santos, 2006.

MATEO, C.; ABIAN, O.; ERNEDO, M. B.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B. C. C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456-462, 2005.

MATEO, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M. Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 739-745, 2000.

MATTINEN, M.; KONTTELI, M.; KEROVUO, J.; LINDER, M.; ANNILA, A.; LINDEBERG, G.; REINIKAINEN, T.; DRAKENBERG, T. Three-dimensional structures of three engineered cellulose-binding domains of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Protein Science**, .5, p. 294-303, 1997.

MILLER, G. L. Use of de dinitrosalicylic acid reagent of determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31(3), p. 426-428, 1959.

MISHRA, C.; DESHPANDE, V.; RAO, M. Immobilization of penicillium-funiculosum cellulase on a soluble polymer. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, p. 342-344; 1983.

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

OGIER, J. C. Ethanol production from lignocellulosic biomass. **Oil Gás Sci Technol**, v. 54, p. 67-94, 1999.

PEREIRA Jr N. Biotecnologia de lignocelulósicos para a produção de etanol e o contexto de biorrefinaria. Conferência Plenária, **I Simpósio de biotecnologia da UFSCar**, São Carlos, 2007.

PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; VIAN, A.; GARCIA, J. L.; RIVAS, G.; ALFONSO, C.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged beta-galactosidase from *Thermus* sp strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy sepabeads. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 107-113, 2003.

PHILIPPIDIS, G. P.; HATZIS, C.; Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 33, p. 222-231, 1997.

ROUVINEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, J.; JONES, T. 3-Dimensional structure of cellobiohydrolase-II from *Trichoderma-reesei*. **Science**, v. 249, p. 380-386, 1990.

SANDGREN, M.; SHAW, A.; ROPP, T.; BOTT, S.; CAMERON, A.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C.; JONES, T. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 angstrom resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, p. 295-310; 2001.

SHEEHA, J.; HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549- 556, 2001.

SHEN X. L.; XIA L. M. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger*

ZU-07. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1363-1367, 2004.

STAHLBERG, J.; DIVNE, C.; KOIVULA, A.; PIENS, K.; CLAEYSSSENS, M.; TEERI, T.; JONES, T. Activity studies and crystal structures of catalytically deficient mutants of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. **Journal of Molecular Biology**, v 264, p. 337-349, 1996.

TAKIMOTO, A.; SHIOMI, T.; INO, K.; TSUNODA, T.; KAWAI, A.; MIZUKAMI, F.; SAKAGUCHI, K. Encapsulation of cellulase with mesoporous silica (SBA-15). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 116, p. 601-606, 2008.

TYAGI R.; GUPTA M. Immobilization of aspergillus-niger xylanase on magnetic latex beads. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 21, p. 217-222, 1995.

WOOD, T. M. Mechanism of cellulose degradation by enzymes from aerobic and anaerobic fungi. In: Coughlan, M. P. (Ed). **Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation**. Elsevier, London. p. 17 – 35. 1989.

WOODWARD, J.; ZACHRY, G. Immobilization of cellulase through its carbohydrate side-chains - a rationale for its recovery and reuse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 245-248, 1982.

YU, Z.; ZHANG, H. X. Ethanol Fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 199-204, 2004.

YUAN, X.; SHEN, N.; SHENG, J.; WEI, X. Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 155, p. 101-106, 1999.

ZHANG, Y.; XU, J.; YUAN, Z.; XU, H.; YU, Q. Artificial neural network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer Eudragit L-100. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3153-3158, 2010.

ZHOU, J. Immobilization of Cellulase on a Reversibly Soluble-Insoluble Support: Properties and Application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6741-6746, 2010.

CAPÍTULO 5:

IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *Trichoderma reesei* EM SMMPs ATIVADAS COM GRUPOS AMINO



5.1 Conhecimento Base

Na seção anterior deste trabalho (Capítulo 4) a imobilização do complexo celulolítico do fungo *Trichoderma reesei* foi avaliada empregando 17 suportes em 60 condições de imobilização diferentes. Praticamente todos os métodos de imobilização covalente causaram 100% de perda de atividade, enquanto métodos de imobilização por adsorção conservaram boa atividade. Os melhores resultados foram alcançados empregando adsorção em suporte MANAE-agarose seguido de entrecruzamento com glutaraldeído 0.15% (v/v), neste caso a atividade efetiva (A_E) foi de 25% com incremento de 7x na estabilidade térmica do derivado. Em estudos posteriores empregando o melhor derivado obtido foi avaliada a hidrólise de substratos insolúveis (papel filtro Whatman n°5 e avicel) que indicam que a enzima imobilizada possui desempenho similar, e em alguns casos superior, ao observado para a enzima livre. Foi verificado também que o derivado pode ser utilizado por vários ciclos de reação sem perda significativa de atividade. Apesar dos bons resultados obtidos a recuperação do catalisador por filtração se mostrou difícil, principalmente quando altas concentrações de substrato foram empregadas. A imobilização do complexo celulolítico em SMMps (Capítulo 2) ativadas com grupos amino empregando os protocolos utilizados para a imobilização em MANAE-agarose poderia facilitar a recuperação seletiva do derivado através da aplicação de um campo magnético externo.

A ativação de superfícies de suportes com grupos funcionais é necessária para permitir a interação destes materiais com biomoléculas em processos como a imobilização de enzimas. A modificação da superfície de suportes geralmente é realizada com grupos capazes de formar interações iônicas (ex. negativos ou positivos), grupos capazes de formar uniões covalentes (ex. aldeído ou epóxido) e grupos capazes de formar interações mais específicas (ex. quelatos e grupos hidrofóbicos). O sucesso de um processo de imobilização de enzimas depende não somente das características do grupo reativo presente na superfície do suporte, mas também de como este grupo está distribuído na superfície do material. Neste contexto a química de superfície evoluiu como uma poderosa ferramenta para modificação de superfícies de materiais de forma altamente seletiva e controlada (BRUCE e SEM, 2005). A modificação sob medida da superfície de um determinado material pode ajudar a fazer a interação com uma determinada biomolécula mais específica, evitar perda de atividade por alteração conformacional de proteínas

e permitir a imobilização de proteínas por diferentes orientações com relação a estrutura do suporte.

A utilização de um dado material em bioprocessos requer métodos de ativação de superfície extremamente genéricos e flexíveis que permitam a imobilização de uma dada biomolécula empregando uma metodologia de ativação padrão. A superfície de SMMps, apesar de apresentar núcleos magnéticos de óxido de ferro, é formada por sílica. Sendo assim, métodos de ativação de sílica porosa, altamente estudados e difundidos, podem ser aplicados na ativação da superfície de SMMps. O método de ativação superficial de partículas porosas de sílica mais versátil é a ativação empregando organosilanos (BRUCE e SEM, 2005; YOKOI *et al.*, 2004). Organosilanos são moléculas bifuncionais com fórmula geral $X-(CH_2)_n-SiR_n(OR')_{3-n}$, onde X representa um dado grupo funcional, $(CH_2)_n$ um braço espaçador flexível e $Si(OR)_n$ grupos reativos (após hidrólise do grupo alcóxido) capazes de formar uniões covalentes com os grupos Si-OH (grupos silanol) na superfície de sílicas porosas (BRUCE e SEM, 2005). Organosilanos contendo inúmeros grupos funcionais são disponíveis comercialmente, permitindo a ativação de sílicas porosas para aplicação na maioria dos procedimentos de imobilização de enzimas existentes.

Durante reações de ativação superficial de sílicas porosas com organosilanos duas reações acontecem de forma simultânea: a hidrólise dos grupos alcóxido da molécula de organosilano (n) gerando grupos silanol altamente reativos e a condensação dos grupos silanol do alcóxido de silício com os grupos silanol presentes na superfície do material (BERGNA, 1994; BRINKER e SCHERER, 1990; ILER, 1979). Dependendo das condições reacionais empregadas, a condensação de organosilanos presentes em solução pode ocorrer formando oligômeros, este fenômeno pode dificultar o controle da densidade de grupos funcionais inseridos na superfície do material. Desta forma, variáveis como tipo de solvente empregado, temperatura da reação, tempo de reação, natureza do organosilano, concentração do organosilano, concentração do material, etc., podem interferir significativamente no resultado final (BRINKER e SCHERER, 1990).

A ativação de sílica porosa utilizando organosilanos em meio orgânico é uma alternativa interessante para controlar de forma precisa a densidade de grupos funcionais inseridos na superfície do material. Neste método, comumente chamado de “grafting”, reações de condensação organosilano-organosilano são desfavorecidas permitindo maior controle da ativação do material (YOKOI *et al.*, 2004). Para o recobrimento de sílica, e até mesmo de nano-

partículas magnéticas com grupos amino o organosilano mais empregado é o aminopropiltriétoxissilano (APTES) (BRUCE e SEM, 2005). O recobrimento de sílica porosa MCM-41 foi realizado empregando APTES em tolueno sob condições de refluxo, este método permitiu o controle da densidade de grupos amino inseridos na superfície do material através do uso de diferentes concentrações de APTES (YOKOI *et al.*, 2004). Neste contexto, com o objetivo de imobilizar o complexo celulolítico de *T. reesei* empregando metodologia similar à desenvolvida para o suporte MANAE-agarose ativamos SMMps com grupos amino. Para tanto utilizamos o processo de “grafting” em tolueno empregando pequenas quantidades de APTES.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Materiais

Para ativação de SMMps com grupos amino foram empregados aminopropiltrietoxissilano (Sigma-Aldrich) e tolueno (Synth). Materiais empregados na síntese de SMMps e na imobilização do complexo celulolítico de *T. reesei* encontram-se descritos na seção “Materiais e Métodos” do Capítulo 2 e Capítulo 4, respectivamente.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Ativação de SMMp com Grupos Amino

Para esta etapa do trabalho foi selecionado o suporte SMMp-2 (variação de preparação 2 no Capítulo 2). Este suporte possui diâmetro médio de partícula de 12.5 μm , área de superfície de 89 $\text{m}^2.\text{g}^{-1}$ e tamanho médio de poros de 14.9 nm. A preparação do suporte é descrita em detalhes na seção “materiais e métodos” do Capítulo 2. A ativação do material foi realizada em tolueno empregando APTES. 1 grama de SMMp-2 foi adicionado a 25 mL de tolueno contendo 5.0 ou 1.0 mMol de APTES. A solução resultante foi aquecida a 110 °C em refluxo por 5 horas. Ao final da reação as SMMps recobertas com grupos amino (SMMp-amino) foram recuperadas magneticamente e lavadas com acetona (2x) e água destilada (2x). As SMMps-amino foram secas a 60 °C por 16 horas e armazenadas até o uso.

5.2.2.2 Imobilização do Complexo Celulolítico de *Trichoderma reesei*

A imobilização do complexo celulolítico foi realizada empregando o mesmo método utilizado para imobilização em suportes MANAE-agarose seguido de entrecruzamento com glutaraldeído, com pequenas modificações. De uma maneira geral 0.5 gramas de SMMp-amino foram suspensas em 10 mL de solução de ácido clorídrico 0.1 M e agitadas suavemente por 1 hora, em seguida foram recuperadas magneticamente e lavadas com tampão fosfato 5 mM pH

7.0. Após esse procedimento o suporte foi adicionado a 9 mL de uma solução do complexo celulolítico NS50013 diluído 100 vezes em tampão fosfato 5 mM pH 7.0. A mistura resultante foi incubada por 3 horas a 25 °C. Após o processo de adsorção os derivados foram entrecruzados com glutaraldeído 0.15% (v/v) por 1 hora a 25 °C, lavados e re-suspensos em tampão fosfato 100 mM pH 7.0. A atividade enzimática foi medida empregando CMC 1% em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 conforme descrito na seção “Materiais e Métodos” no Capítulo 4. O rendimento de imobilização (R_I), atividade recuperada ($R\%$) e atividade efetiva (A_E) foram calculados de acordo com as equações 4.1, 4.3 e 4.4, respectivamente, disponíveis no Capítulo 4 desta tese.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Ativação de SMMp com Grupos Amino

Este método de ativação já havia sido testado em nosso grupo para a ativação de SMMps com grupos octil, mostrando-se altamente eficiente. Foram empregados neste experimento duas concentrações distintas do agente ativador, APTES. Espera-se que nas condições empregadas praticamente 100% do APTES utilizado no procedimento de ativação tenha reagido com a superfície do material, permitindo, desta forma, o controle da densidade de grupos amino na superfície do material (YOKOI *et al.*, 2004).

5.3.2 Imobilização do Complexo Celulolítico de *Trichoderma reesei*

Antes do início da reação os suportes SMMp-amino foram hidratados em solução de ácido clorídrico 0.1 M por 1 hora, este procedimento visa a remoção de SPION não funcionalizado que por ventura estivessem no interior dos poros do material e protonar os grupos amino inseridos na superfície do material. Após este procedimento o suporte foi lavado inúmeras vezes com tampão fosfato 100 mM pH 7.0. Após o procedimento de hidratação e lavagem a massa do suporte dobrava, sendo assim a massa úmida usada no processo de imobilização foi de ~1.0 g. A Tabela 5.1 mostra os resultados para a etapa de adsorção do complexo NS50013 em SMMp-amino ativado com APTES na concentração de 5.0 e 1.0 mM por grama de material. A adsorção em termos de atividade foi eficiente para ambos os casos, porém a adsorção em SMMp-amino ativado com 5.0 mM de APTES/g de material causou perda total de atividade enzimática. Quando este suporte foi re-suspendido em tampão fosfato 100 mM pH 7.0 não foi observado dessorção de atividade, uma pequena parcela de proteínas (aproximadamente 20% do total adsorvido) dessorvia do suporte. A adsorção em SMMp-amino ativado com 1.0 mM de APTES por grama de material, por sua vez permitiu a adsorção eficiente das enzimas do complexo celulolítico conservando boa parcela de atividade catalítica frente a CMC_{7.0}.

A perda de atividade ocorrida no processo de adsorção do derivado em SMMp-amino ativado com APTES 5.0 mM foi similar a observada para a adsorção em agarose-PEI (Capítulo 4) indicando interação excessiva entre o suporte e as enzimas do complexo. No caso do suporte

agarose-PEI a perda de atividade observada foi atribuída à interação em três dimensões formada entre as enzimas e o suporte (PESSELA *et al.*, 2003; PESSELA *et al.*, 2005; TORRES *et al.*, 2006) que pode ter restringido o grau de liberdade das celulasas ou causado impedimentos estéricos que impedem a entrada e/ou saída do substrato macromolecular do sítio ativo das enzimas. Suportes onde a interação é bidimensional como MANAE-agarose e DEA-sepharose renderam derivados que conservaram boa atividade catalítica. Neste contexto é importante destacar que a estrutura de poros de SMMps avaliada através de adsorção-desorção de N₂ (Capítulo 2) é muito distinta da estrutura de poros apresentada pela agarose. A agarose possui estrutura de poros fibrilar formada pela união de fibras de ágar entrecruzadas, esta estrutura favorece a interação bidimensional com proteínas (GUISAN, 1988; MATEO *et al.*, 2005; MATEO *et al.*, 2006). Já a estrutura de poros de SMMps é formada pelo espaço entre partículas fundamentais em conjunto com o efeito de “templating” do surfactante e SPION empregados durante o processo de síntese, o que rende poros extremamente irregulares. Em adição, o número teórico de grupos amino que podem ser inseridos na superfície de silicatos porosos é maior do que o número que pode ser alcançado para a agarose (BRINKER e SCHERER, 1990; ILLER, 1979). Desta forma o uso de SMMp-amino altamente ativado (5 mM) pode favorecer forte interação entre as enzimas do suporte e o complexo deslocando o equilíbrio da reação totalmente para a condição de enzima unida ao suporte diminuindo o grau de liberdade e favorecendo a perda de atividade catalítica. A estrutura irregular dos poros de SMMps também pode ter favorecido a interação em três dimensões entre a enzima e a superfície do suporte o que pode ter contribuído para a perda de atividade observada.

Tabela 5.1 – Resultados para a imobilização do complexo celulolítico de *T. reesei* em suportes SMMp-amino.

ADSORÇÃO EM SMMp-2 ATIVADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE APTES									
Suporte	pH	Força iônica	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	R_I	R_I	Atividade		
							Proteína	Perdida no Processo	$R\%$
5.0 mM de APTES/g de material	7	5 mM	25 °C	3	100%	71%	100%	0%	0%
1.0 mM de APTES/g de material	7	5 mM	25 °C	3	100%	40%	48%	52%	52%

A ativação de SMMp com APTES 1.0 mM rende menor densidade de grupos reativos na superfície do material (YOKOI *et al.*, 2004), esta menor densidade de grupos permitiu que o derivado conservasse boa atividade após a etapa de adsorção com R_I de 100% em termos de atividade. Menor densidade de grupos na superfície do material diminui a interação entre a enzima e o suporte favorecendo a manutenção do grau de liberdade das celulases. Além disso, pode tornar menos favorável a interação das enzimas com o suporte em três dimensões, também favorecendo a manutenção no grau de liberdade das enzimas do complexo. O derivado adsorvido em SMMp-amino ativada com 1.0 mM de APTES foi entrecruzando com glutaraldeído 0.15 % (v/v) em procedimento idêntico ao empregado para MANAE-agarose (Tabela 5.2). O entrecruzamento com glutaraldeído nesta concentração foi suficiente para entrecruzar 100% das celulases imobilizadas no suporte de forma que ao final do processo não foi observada dessorção de proteínas no sobrenadante (medida de atividade e proteínas totais). O derivado conservou 100% de atividade durante a etapa de entrecruzamento rendendo A_E de 52%, maior até mesmo que o valor observado para o derivado MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.15% (28%). Este resultado superior em termos de A_E pode ser explicado pela diferença na estrutura de poros entre os dois suportes já discutida anteriormente.

Tabela 5.2 – Resultados para a etapa de entrecruzamento com glutaraldeído 0.15% (v/v) do complexo celulolítico de *T. reesei* adsorvido em suportes SMMp-amino ativados com APTES 1.0 mM/grama de material.

ENTRECRUZAMENTO DE CELULASES IMOBILIZADAS EM SMMp-amino COM GLUTARALDEÍDO 0.15% (v/v)							
Suporte	pH	Força iônica	Temperatura	Tempo de Incubação (h)	Perda de Atividade na Etapa (%)*	Atividade Entrecruzada (%)**	A_E
SMMp-2 ativado com APTES 1 mM/g	7	5 mM	25°C	3 e 2	0%	100%	52%

5.4 Conclusão

Nesta etapa do trabalho foi investigada a imobilização do complexo celulolítico de *T. reesei* em SMMp ativado com grupos amino empregando duas concentrações distintas de APTES, 5.0 e 1.0 mM por grama de material. O rendimento de imobilização em termos de atividade foi de 100% em ambos os casos, porém SMMps ativadas com APTES na concentração de 5.0 mM por grama de material ocasionaram 100% de perda na atividade após a etapa de adsorção. A perda de atividade na etapa de adsorção pode ser explicada pela alta densidade de grupos amino inseridos na superfície de SMMps ativadas com APTES na concentração de 5 mM/g de material e pela estrutura irregular de poros do material, que pode favorecer a interação das celulasas com a superfície do material em três dimensões. Derivados obtidos pela adsorção em SMMps ativadas com APTES 1.0 mM e entrecruzados com glutaraldeído 0.15% (v/v) apresentaram bons resultados em termos de A_E , melhores até mesmo que os obtidos anteriormente para derivados imobilizados em MANAE-agarose. O complexo celulolítico de *T. reesei* foi imobilizado com sucesso em SMMp-amino, a imobilização de celulasas neste material pode permitir a recuperação eficiente e reuso do biocatalisador em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos.

5.5 Referências

BERGNA, H. **The Colloid Chemistry of Silica**. Washington, DC: National Meeting of the American Chemical Society, 718p., 1994.

BRINKER, C.; SCHERER, G. **Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing**. Waltham, MA: Academic Press, 912p., 1990.

BRUCE, I. J.; SEN, T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy silanes and their application in magnetic bioseparations. **Langmuir**, v. 21, p. 7029-7035, 2005.

FRANZREB, M.; SIEMANN-HERZBERG, M.; HOBLEY, T. J., THOMAS, O. R. T. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 505-516, 2006.

ILER, R. **The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica**. Hoboken: Wiley-Interscience, 866p., 1979.

MATEO, C.; ABIAN, O.; ERNEDO, M. B.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B. C. C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456-462, 2005.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LOPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUIBAN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274-280, 2006.

PESSELA, B. C. C.; BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; TORRES, R.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; ALONSO-MORALES, N.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; Mateo, C. Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 295-299, 2005.

PESSELA, B. C. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; VIAN, A.; GARCIA, J. L.; RIVAS, G.; ALFONSO, C.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of a thermophilic poly-His-tagged beta-galactosidase from *Thermus* sp strain T2 by using novel heterofunctional chelate-epoxy sepabeads. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 107-113, 2003.

TORRES, R.; PESSELA, B. C. C.; FUENTES, M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Supports coated with PEI as a new tool in chromatography. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 711-716, 2006.

WOO, K.; HONG, J., AHN, J. P. Synthesis and surface modification of hydrophobic magnetite to processible magnetite@silica-propylamine. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 177-181, 2005.

YAVUZ, C. T.; MAYO, J. T.; YU, W. W.; PRAKASH, A.; FALKNER, J. C.; YEAN, S.; CONG, L. L.; SHIPLEY, H. J.; KAN, A.; TOMPSON, M.; NATELSON, D.; CONVIN, V. L. Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. **Science**, v. 314, p. 964-967, 2006.

YOKOI, T.; YOSHITAKE, H. TATSUMI, T. Synthesis of amino-functionalized MCM-41 via direct co-condensation and post-synthesis grafting methods using mono-, di- and tri-amino-organoalkoxysilanes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, p. 951-957, 2004.

CONCLUSÃO GERAL

A imobilização de enzimas em materiais magnéticos tem alcançado grande importância no atual cenário da engenharia de biocatalisadores, no entanto aplicações industriais destes derivados não são conhecidas. Isso se deve em grande parte a inexistência de suportes magnéticos que atendam as necessidades reais de um bioprocessos, e de métodos para imobilização de enzimas nestes suportes. A presente tese buscou desenvolver novos suportes magnéticos para aplicações em bioprocessos, estes suportes foram testados na imobilização das enzimas modelo PGA e celulasas. Para atingir os objetivos propostos micropartículas magnéticas de sílica (SMMps) foram preparadas em micro-emulsão *w/o* empregando silicato de sódio como fonte de sílica e nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) como núcleo magnético (Capítulo 2). SPIONs preparados por co-precipitação homogênea apresentaram alta magnetização de saturação. Já a síntese de SMMps rendeu materiais com alta magnetização de saturação, alta área de superfície, estrutura mesoporosa e forte resposta a campos magnéticos externos. Suportes magnéticos com grande potencial para aplicação em bioprocessos foram obtidos e caracterizados e a estrutura final do material pôde ser controlada de acordo com as condições de síntese empregadas. Foi testado um novo conceito em imobilização de enzimas em materiais magnéticos que consiste na co-agregação entre amino-SPION e PGA gerando os chamados M-CLEAs (Capítulo 3). M-CLEAs apresentaram atividades recuperadas (*R%*) e estabilidades similares a CLEAs obtidos empregando as mesmas condições reacionais. Derivados M-CLEAs foram recuperados a partir do meio reacional através da aplicação de um campo magnético externo de forma rápida e eficiente. Foram realizadas análises de EDS “line-scan” que indicam que amino-SPION se encontra homogeneamente disperso na estrutura de M-CLEAs. O derivado M-CLEA-TBA-G150 foi testado na hidrólise longa de PG e apresentou desempenho superior ao observado para a enzima livre, sendo recuperado magneticamente de forma eficiente e re-utilizado por três ciclos de reação, indicando que o procedimento de imobilização confere aumento na estabilidade operacional do biocatalisador. A co-agregação entre amino-SPION e enzimas apresentada nesta etapa do trabalho representa uma nova metodologia para a imobilização de enzimas. A imobilização do complexo celulolítico de *T. reesei* foi testada em 17 suportes empregando 60 diferentes condições de reação com o objetivo de desenvolver

protocolos de imobilização para posterior aplicação na imobilização de celulasas em suportes magnéticos (Capítulo 4). Métodos de imobilização covalentes multipontuais causaram perda de atividade total das enzimas do complexo. O melhor protocolo obtido consiste na adsorção inicial das enzimas em suportes carregados positivamente, seguido de entrecruzamento com agentes bi ou poli-funcionais. Esse protocolo foi otimizado para adsorção em MANAE-agarose seguido de entrecruzamento com glutaraldeído ou aldeído-dextrana. Alguns procedimentos de imobilização testados conferiram aumento na estabilidade térmica do complexo celulolítico. Experimentos de hidrólise de substratos insolúveis (papel filtro Whatman e avicel) empregando o derivado MANAE-40 entrecruzado com glutaraldeído 0.15% (v/v) mostraram que é possível a hidrólise de materiais lignocelulósicos empregando celulasas imobilizadas. Em experimentos de hidrólise longa de papel filtro foi verificado que o complexo NS50013 imobilizado apresenta desempenho superior em comparação com a enzima livre, sendo posteriormente reciclado por dez ciclos reacionais conservando mais de 90% de sua atividade catalítica. Com base nos inúmeros experimentos realizados foi apresentada uma hipótese para explicar a dificuldade em imobilizar celulasas. Acredita-se que a perda de atividade foi causada pela diminuição no grau de liberdade das enzimas e por obstrução de seu sítio ativo. Na última do trabalho foi investigada a imobilização do complexo celulolítico de *T. reesei* em SMMp ativado com grupos amino empregando duas concentrações distintas de APTES (Capítulo 5). O rendimento de imobilização em termos de atividade foi de 100% para SMMps ativadas com APTES na concentração de 5.0 mM por grama de material, porém 100% da atividade catalítica foi perdida. Derivados obtidos pela adsorção em SMMps ativadas com APTES 1.0 mM e entrecruzados com glutaraldeído 0.15% (v/v) apresentaram 100% de rendimento de imobilização e bons resultados em termos de atividade efetiva (A_E), melhores até mesmo que os obtidos anteriormente para derivados imobilizados em MANAE-agarose. O complexo celulolítico de *T. reesei* foi imobilizado com sucesso em SMMp-amino, a imobilização de celulasas neste material pode permitir a recuperação eficiente e reuso do biocatalisador em processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos.

SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE NOVOS SUPORTES MAGNÉTICOS PARA APLICAÇÕES EM BIOPROCESSOS

- Estudo da utilização de reagentes alternativos no processo de síntese de SMMps (surfactante e fase orgânica);
- Otimização do processo de produção de SMMps em escala piloto;
- Otimização do processo de remoção do surfactante por lavagem;
- Estudo de tratamento térmico para remoção do surfactante;
- Estudo da ativação da superfície de SMMps com inúmeros grupos funcionais empregando organosilanos;
- Desenvolvimento de protótipos de filtros magnéticos para a separação do material em escala industrial;
- Realização de testes conceituais de imobilização de enzimas em purificação de proteínas empregando SMMps.

CAPÍTULO 3: SÍNTESE DE AGREGADOS ENZIMÁTICOS ENTRECruzADOS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS (MAGNETIC CROSS-LINKED ENZYMES AGGREGATES – M-CLEAS): ESTUDOS EMPREGANDO PGA COMO ENZIMA MODELO

- Avaliação do desempenho de M-CLEAs de PGA obtidos empregando distintos agentes precipitantes em reações de síntese em meio orgânico e/ou líquidos iônicos;
- Avaliação do desempenho da tecnologia M-CLEA na imobilização de lipases para síntese orgânica;
- Preparação de M-CLEAs de mais de uma enzima para utilização em reações químicas sequenciais (reações em cascata);
- Desenvolvimento de nano-partículas magnéticas de óxido de ferro ativadas com grupos amino de baixo custo;

- Ativação de nano-partículas magnéticas de óxido de ferro com grupos mistos, de baixo custo, capazes de gerar M-CLEAs com propriedades distintas.

CAPÍTULO 4: SELEÇÃO DE MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *Trichoderma reesei* EMPREGANDO AGAROSE E SEPABEADS-EPÓXIDO COMO SUPORTES MODELO

- Avaliação do desempenho do complexo celulolítico NS50013 imobilizado em MANAE-40 seguido de entrecruzamento com glutaraldeído 0.15% (v/v) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

CAPÍTULO 5: IMOBILIZAÇÃO DO COMPLEXO CELULOLÍTICO DE *TRICHODERMA REESEI* EM SMMPS ATIVADAS COM GRUPOS AMINO.

- Otimização do processo de imobilização do complexo celulolítico em SMMp-amino ativado com diferentes concentrações de APTES;
- Imobilizar outros complexos celulolíticos, comerciais ou não, em SMMp-amino;
- Caracterizar estruturalmente SMMps ativadas com grupos amino;
- Quantificar a densidade de grupos amino na superfície de SMMps-amino por colorimetria e análise elementar;
- Relacionar de forma precisa o resultados em termos de A_E com a estrutura e a densidade de grupos funcionais na superfície de SMMps-amino;
- Estudo de hidrólise de papel filtro Whatman empregando celulasas imobilizadas em SMMp-amino seguido de recuperação magnética e reciclo;
- Estudo de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado empregando celulasas imobilizadas em SMMP-amino seguido de recuperação magnética e reciclo.