

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA

**PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE β -GLICOSIDASE POR IMOBILIZAÇÃO
EM SUPORTES SÓLIDOS DERIVATIZADOS**

Diogo Gontijo Borges

SÃO CARLOS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA

**PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DE β -GLICOSIDASE POR IMOBILIZAÇÃO
EM SUPORTES SÓLIDOS DERIVATIZADOS**

Diogo Gontijo Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como pré-requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química na área de *Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos*.

Professores Orientadores: Paulo Waldir Tardioli
Raquel de Lima Camargo Giordano

SÃO CARLOS

2011

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

B732pd

Borges, Diogo Gontijo.

Preparação de derivados de β -glicosidase por
imobilização em suportes sólidos derivatizados / Diogo
Gontijo Borges. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
98 f.

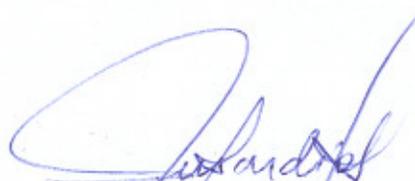
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Engenharia química. 2. Hidrólise. 3. Cana-de-açúcar.,
4. Celulase. 5. Glioxil – agarose. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
DIOGO GONTIJO BORGES APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO CARLOS, EM 25 DE FEVEREIRO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:



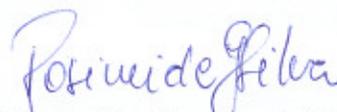
Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



Raquel de Lima Camargo Giordano
Co-orientador, UFSCar



Marcelo Fernández Vieira
UEM



Rosineide Gomes da Silva
UFSCar

Dedico esta Dissertação de Mestrado a minha Mãe Sônia, ao meu pai Luiz e ao meu irmão Rodrigo que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio e carinho. Vocês são a razão desta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as providências ao longo do caminho e pela intensidade da tua presença, sendo absoluto dos meus dias;

A minha mãe Sônia, que com a sua força e honestidade me incentivou a seguir em frente de cabeça erguida e sem esquecer os verdadeiros valores de um homem;

Ao meu pai Luiz, que com a sua humildade e paciência me ensinou a aceitar as críticas sem desanimar, não me deixando esquecer que serei sempre aprendiz;

Ao meu irmão Rodrigo, que sempre esteve ao meu lado para o que precisasse;

Aos meus avós, tios e primos pelo carinho e incentivo;

Ao Professor Paulo Waldir Tardioli que tanto contribuiu para o meu crescimento durante a orientação dessa dissertação e pela sua enorme paciência, confiança e credibilidade no meu trabalho;

A Professora Raquel de Lima Camargo Giordano que contribuiu para o meu crescimento humano e profissional;

A Dr^a Dasciana de Sousa Rodrigues por todo o ensinamento e por ter sido indispensável para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao aluno de iniciação científica Anderson Baraldo Júnior pela grande ajuda na etapa final deste trabalho, pela amizade e companheirismo;

Ao meu padrinho Tiliu, tia Sandra e tia Silvia, pelo carinho, conselhos e amizade;

Aos meus amigos irmãos “Os Bartira”: Tavim, Leozim, Batata, Carlão, Primo(*in memorian*), Gex, Pedrão, Kegin e Hulk por terem sido minha família são carlense durante esses dois anos;

Aos amigos de pós-graduação: Cacau, Mirella, Vivi, Lucia Maria, Lio, Hugão, Japa, Rê, Brunão, Priscilinha, Lili, Lu, Bebel, Tuti, Gislene, Thiago, Diana, Sandrinha, Chanel, Aru, KK, Carlos, Inti, Lê, Ediane, Cris, Carol, Traíra, Cintião, Anny, Ana Maria, Guri, Edson, Rafael pelos momentos de trocas de idéia, descontração e carinho;

Aos técnicos Thais, Amadeus, Thiago e Francisco por toda a ajuda;

As secretárias da pós-graduação e o pessoal dos serviços gerais por facilitarem nossa rotina de trabalho;

A Maira e toda sua família por terem estado presentes no difícil começo;

Aos amigos: Japa, Marcelão, Fer, Zaza, Pritty, Vê, Cris, Lia, Thales , Paulão por terem estado sempre ao meu lado;

A Genencor pela doação das enzimas Accellerase 1500 e Accellerase BG.

Ao CTC (Centro de Tecnologia Canavieira) pela doação do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Ao CNPq pelo apoio financeiro de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho;

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química pela dedicação, atenção e orientação das atividades do doutorado.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
NOMENCLATURA	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Biocombustível.....	4
2.2 Bagaço de Cana-de-Açúcar	6
2.3 Enzimas	8
2.3.1 - Enzimas como biocatalisadores e suas aplicações.....	9
2.4 Enzimas Celulolíticas	11
2.4.1 β -Glicosidases (EC 3.2.1.21)	15
2.5 Aplicações biotecnológicas de celulases	17
2.6 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos.....	19
2.7 Imobilização de Enzimas.....	22
2.7.1- Métodos de Imobilização de Enzimas.....	23
2.7.2- Suportes para imobilização	32
2.7.3 Parâmetros de imobilização.....	39
2.7.4 – Imobilização de β -glicosidase	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Materiais.....	43
3.1.1- Suportes	43
3.1.2- Enzima.....	43
3.1.3- Agentes ativantes	43
3.1.4- Substrato	44
3.1.5- Reagentes para análise de proteínas e teor de glicose.....	44
3.2 Métodos	44
3.2.1- Preparação de suportes para imobilização.....	44
3.2.2 - Aminoação química da BG comercial (Accellerase BG).....	48

3.2.3 – Determinação de proteínas.....	48
3.2.4 – Medida de atividade enzimática.....	48
3.2.5 – Imobilização de BG em suportes sólidos insolúveis	49
3.2.6 – Caracterização de BG solúvel e imobilizada.....	51
3.2.7. Cálculo dos Parâmetros de Imobilização	52
3.2.8 – Ensaio de hidrólise.....	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Caracterização de BG quanto a sua estabilidade ao pH.....	56
4.2 Caracterização de BG comercial quanto a sua pureza	58
4.3 Imobilização de BG comercial em diferentes suportes	59
4.3.1.- Imobilização de BG em quitosana ativada com glutaraldeído	59
4.3.2.- Imobilização de BG em suporte agarose.....	61
4.3.3- Imobilização de BG em Resina Poliacrílica funcionalizada com Grupos Carboxílicos (Immobeads IB-D152 da ChiralVision)	68
4.4 Estabilidade térmica.....	71
4.4.1.- Estabilidade térmica de BG imobilizada em glioxil-agarose	71
4.4.2.- Estabilidade térmica de BG imobilizada em resina carboxil-poliacrílica.....	74
4.5 Aplicações de BG livre e imobilizada em reações de hidrólise	75
4.5.1- Hidrólise de celobiose comercial	76
4.5.2- Hidrólise de Bagaço da Cana-de-açúcar	77
5 CONCLUSÕES.....	80
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Esquema geral de uma biorrefinaria utilizando diferentes tipos de biomassa (GIORDANO, 2004)	6
Figura 2.2 – Fluxograma representativo da utilização do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2ª geração (MARTINS; ADRIANO; GIORDANO,2005).....	8
Figura 2.3 - Célula vegetal, representando as microfibras de celulose e hemicelulose (MARTINS,2007).	11
Figura 2.4 - Cadeia linear polimérica da celulose, mostrando as ligações β -1,4 das unidades β -D-glicopiranosil (MARTINS, 2007).	12
Figura 2.5 - Estrutura de uma celulase de <i>Trichoderma reesei</i> (SANDRENA e MITCHINSON, 2005)	13
Figura 2.6 - Fibras cristalinas de celulose ilustrando a influência das pontes de hidrogênio (MARTINS, 2007).	13
Figura 2.7 - Mecanismo de degradação da celulose e o sinergismo do complexo enzimático (MARTINS, 2007).	15
Figura 2.8: Esquema representativo do sistema imobilização/estabilização proposto por Guisán em 1988. A ligação da enzima ao suporte dá-se entre grupos aminos da enzima e uma monocamada densa de grupos aldeídos alifáticos lineares moderadamente afastados da superfície do suporte (Adptação de Guisán <i>et al.</i> , 1992).....	26
Figura 2.9. Mecanismo de aminação dos grupos carboxílicos de uma enzima ativados com EDAC na presença de EDA (LOPEZ-GALLEGO <i>et al.</i> 2005). ...	30
Figura 2.10: Inibição competitiva: o substrato S , à esquerda, e o inibidor I , à direita, competem pela ligação ao sítio ativo da enzima E	31
Figura 2.11: Estrutura dos polímeros quitina, quitosana e celulose (BERGER <i>et al.</i> , 2004).	34
Figura 2.12 – Representação da agarobiose, as unidades básicas da agarose (KENNEDY; CABRAL, 1987).	38
Figura 2.13. (A) estrutura em dupla hélice das cadeias de agarobiose e (B) estrutura porosa da agarose gelificada (TARDIOLI, 2003).	39
Figura 3.1 – Reações envolvidas na obtenção do gel glioxil-agarose (Adptação de Guisán, 1988, p. 376).	46
Figura 3.2 – Reações envolvidas na ativação da agarose com grupos aminos - suporte MANAE-agarose (Adptação de Vieira, 2009, p.37).	47
Figura 4.1 Perfis de inativação a 25°C de BG comercial em diferentes valores de pH.....	57
Figura 4.2 Perfis de inativação a 25°C de BG quimicamente modificada (aminada) em diferentes valores de pH.	57
Figura 4.3.: Cromatograma da distribuição de massa molecular das diferentes proteínas presentes no extrato enzimático da Acellerase BG, obtido por SE-	

HPLC em coluna Superdex 200 (GE Healthcare) e tampão fosfato de sódio 20 mM-NaCl 0,25 M, pH 7,2 como fase móvel.....	59
Figura 4.4.: Perfil de imobilização de BG comercial em MANAE-agarose a 25° C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM).....	62
Figura 4.5: Perfil de imobilização de BG parcialmente purificada em MANAE-agarose a 25° C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM).....	62
Figura 4.6.: Perfil de imobilização de BG aminada em glioxil-agarose a 25°C, pH 9,0 (tampão bicarbonato de sódio 50mM).	65
Figura 4.7 Perfil de imobilização de BG aminada em glioxil-agarose a 25°C, pH 9,0, na presença de 10 mM de glicose (inibidor competitivo de BG).....	67
Figura 4.8.: Perfil de imobilização de BG comercial em resina carboxil-poliacrílica a 25°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).....	68
Figura 4.9 Distribuição de massa molecular de BG por cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SE-HPLC). Linha preta = solução enzimática inicial de BG; Linha vermelha = sobrenadante final da imobilização de BG em resina carboxil-poliacrílica.	69
Figura 4.10 Adsorção de BG em resina carboxil-poliacrílica a 25°C, pH 4,8, 24h de reação. As cargas protéicas foram de 3,5; 8,6; 20,6; 32,2 e 52,8 mg _{proteína} /g _{suporte}	71
Figura 4.12: Perfil de inativação térmica de BG imobilizada em glioxil-agarose (por 72h a pH 9,0) a 65° C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).	73
Figura 4.13: Perfil de inativação térmica a 65° C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM) de BG livre e imobilizada em matriz carboxil-poliacrílica (24h a pH 4,8).	74
Figura 4.14: Perfil de conversão de celobiose com o tempo a 50°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), razão enzima/substrato igual a 56,7 U/g _{celobiose}	76
ADRIANO,W.S.; BRASILEIRO, D.D.; GONÇALVES, L.R.B. Influência da Concentração de Glutaraldeído no Estudo da Imobilização de Penicilina G Acilase em Quitosana. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações . 2003.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).....	20
Tabela 2.2: Classificação dos suportes conforme a composição (MESSING, 1984)	32
Tabela 2.3: Imobilização de β -glicosidase, BG (dados compilados da literatura).	42
Tabela 4.1.: Rendimento de imobilização de BG aminada em termos de proteínas (PI), atividade recuperada (AR) e atividade de derivados BG-GA (BG aminada imobilizada em glioxil-agarose).	66
Tabela 4.2 – Adsorção de BG comercial em resina carboxil-poliacrílica a 25°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), 24h de reação.	70
Tabela 4.3 – Parâmetros de inativação térmica a 65°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).de BG livre e imobilizada em glioxil-agarose.	73
Tabela 4.4 – Parâmetros de inativação térmica a 65°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).de BG livre e imobilizada em resina carboxil-poliacrílica.	75

NOMENCLATURA

A: Atividade enzimática do estado final;

A₀: Atividade enzimática do estado inicial;

A_R = atividade relativa (A/A_0);

AR: Atividade recuperada, em %;

BG: β-glicosidase;

BG-GA = β-glicosidase imobilizada em glioxil-agarose;

BG-MP = β-glicosidase imobilizada em resina carboxil-poliacrílica;

EDA: Etilenodiamina;

EDAC: N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida;

F: Fração eluída por SE-HPLC;

FE: Fator de estabilidade;

GA: Glioxil-agarose;

GLI: Glicidol;

GLU: Glutaraldeído;

kd: Constante de inativação térmica de 1ª ordem;

MA: MANAE-agarose;

MANAE – mono-amino-N-aminoetil;

MP: resina poliacrílica catiônica (carboxil-poliacrílica);

M_S = massa (em g) de suporte usado na imobilizada;

P₀: concentração de proteína (em mg/mL) no sobredante inicial da imobilização;

P_f: concentração de proteína (em mg/mL) medida no sobrenadante ao final da imobilização;

PI: Porcentagem de proteína imobilizada;

RI: Rendimento de imobilização em termos de atividade;

SE-HPLC = cromatografia líquida por exclusão de tamanho;

t: Tempo de incubação

t_{1/2,EI} = meia-vida da BG imobilizada;

t_{1/2,ES} = meia-vida da BG solúvel;

t_{1/2}: Tempo de meia-vida;

U_{EI} = atividade aparente da enzima imobilizada (expressa em U/g_{suporte});

U_{ES} = atividade da enzima solúvel (U/mL);

U_f = atividade do sobrenadante final da imobilização (expressa em U/g_{suporte});

U_i = atividade real oferecida para imobilização (expressa em U/g_{suporte});

U_o: atividade da solução enzimática (branco de imobilização) medida no final da imobilização, expressa em U/g_{suporte};

V_{ES} = volume (mL) de enzima oferecida para imobilização;

α = razão entre a atividade enzimática final (A) e inicial (A₀).

RESUMO

β -Glicosidase (BG) é uma enzima de grande importância em inúmeras aplicações biotecnológicas. Essa enzima desempenha um papel muito importante na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica visando a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G). A hidrólise enzimática da celulose requer a ação sinérgica de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases. Endo e exoglicanases são fortemente inibidas por celobiose e seu acúmulo no meio reacional reduz a taxa de hidrólise. A suplementação do meio reacional com BG pode reduzir o efeito inibitório, levando a conversões maiores de celulose a glicose. Neste trabalho BG foi imobilizada em diferentes suportes sólidos visando a obtenção de um derivado ativo e estável para uso em reações de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. BG foi imobilizada em glioxil-agarose (GA) e resina poliacrílica catiônica (MP) a 25°C e pH 9,0 e 4,8, respectivamente. Para melhorar o rendimento de imobilização de BG em glioxil-agarose a pH 9,0 foi necessária uma aminação química da superfície da enzima. Entretanto, BG era inativada durante a imobilização, devido às condições alcalinas requeridas para imobilização de enzimas em glioxil-agarose. Contudo, a presença de um inibidor competitivo (glicose) durante a imobilização de BG preservou aproximadamente 70% da atividade inicial. Mesmo na presença de glicose, a etapa de redução com borohidreto de sódio (finalização da reação de imobilização) reduziu drasticamente a atividade da enzima imobilizada. A imobilização de BG na presença de inibidor competitivo permitiu a preparação de um derivado cerca de 4 vezes mais ativo que aquele preparado na ausência do inibidor. Por outro lado, o melhor derivado foi preparado adsorvendo BG em resina poliacrílica funcionalizada com grupos carboxílicos. Após quatro horas de reação, o rendimento de imobilização e a recuperação de atividade foram aproximadamente 71% e 97%, respectivamente. Bagaço de cana pré-tratado (10% m/v, base seca) foi hidrolisado a 50°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), por 24h, utilizando celulase solúvel (Acellerase 1500) na relação enzima/substrato de 20 FPU/g_{celulose}. Hidrólises nas mesmas condições foram realizadas

suplementando o meio reacional com BG imobilizada em glioxil-agarose (BG-GA) ou BG imobilizada em matriz poliacrílica (BG-MP) na rela o enzima/substrato de 120 U/g_{celulose}. Cinco bateladas foram realizadas nas condi es descritas acima, reutilizando a BG imobilizada e a celulose não convertida, após lavagem abundante com água destilada. A suplementa o do meio reacional com BG imobilizada contribuiu para a obten o de maiores conversões de celulose em todas as bateladas, devido ao fato da BG remover celobiose do meio reacional, evitando seu acúmulo, o qual poderia inibir a a o das endoglucanases e exoglucanases. Entretanto, observou-se uma redu o da conversão de celulose após a segunda batelada (de 50% para 15-25%). De qualquer forma, esse trabalho mostra que a suplementa o dos complexos enzimáticos comerciais com BG imobilizada   vantajosa, entretanto, a estabilidade da BG imobilizada ainda precisa ser melhorada.

Palavras-chave: β -glicosidase, bagaço de cana-de-a o car, glioxil-agarose, matriz poliacrílica, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

β -glucosidase (BG) is an important enzyme for several biotechnological applications. This enzyme plays an important role in hydrolyses of lignocellulosic biomass in order to produce second generation ethanol (2G ethanol). The enzymatic hydrolysis of cellulose requires the synergistic action of endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. Endo e exoglucanases are strongly inhibited by cellobiose and its accumulation into reaction medium decreases the hydrolysis rate. The supplementation of the reaction medium with BG can reduce the inhibition effect, leading to higher conversions of cellulose to glucose. In this work, BG was immobilized on different solid supports in order to obtain an active and stable derivative to be used in hydrolyses of sugarcane bagasse. BG was immobilized on glyoxyl-agarose (GA) and polyacrylic matrix (MP) at 25°C and pH 9.0 and 4.8, respectively. To improve the immobilization yield on glyoxyl-agarose at pH 9.0, a chemical amination of the enzyme surface was required. However, BG was inactivated during the immobilization reaction due to alkaline conditions that are required to immobilize enzymes on glyoxyl-agarose support. Nevertheless, the presence of a competitive inhibitor (glucose) during immobilization of BG preserved about 70% of the initial activity. However, the reduction step with sodium borohydride (end point of the reaction) drastically reduced the derivative activity even in the presence of glucose. The BG immobilization in presence of competitive inhibitor allowed the preparation of a derivative approximately 4 times more active than one prepared in inhibitor absence. On the other hand, the best derivative was prepared adsorbing the enzyme on polyacrylic resin covered with carboxylic groups. After four hours of reaction, the immobilization yield and the recovered activity were ca. 71% and 97%, respectively. Pretreated sugarcane bagasse (10% w/v, dry basis) was hydrolyzed at 50°C, pH 4.8 (50 mM sodium citrate buffer), for 24 h, using soluble cellulase (Acellerase 1500) in the enzyme/substrate ratio of 20 FPU/g_{cellulose}. Hydrolyses under same conditions were performed by supplementing the reaction medium with BG immobilized on glyoxyl-agarose (BG-GA) or BG immobilized on polyacrylic resin (GA-MP) in the enzyme/substrate ratio of 120 U/g_{cellulose}. Five batches were performed under

conditions described above by reusing the immobilized BG and non-converted cellulose after thoroughly washing with distilled water. The supplementation of the reaction medium with immobilized BG enhanced the cellulose conversions in all batches. This behavior is due to the fact that BG removes cellobiose from the reaction medium, avoiding its accumulation, which could inhibit the endoglucanases and exoglucanases. However, a decrease of the cellulose conversion after the second batch was observed (cellulose conversion decreased from ca. 50% to 15-25%). Anyway, this work shows that supplementation of the commercial enzymatic complexes with immobilized BG is advantageous. However, the stabilization of the immobilized BG is still required.

Keywords: β -glucosidase, bagasse-sugarcane, glyoxyl-agarose, polyacrylic matrix, enzymatic hydrolysis.

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda mundial pelo petróleo (em torno de 88 milhões de barris/dia em 2010, segundo dados da International Energy Agency), aliada à necessidade de redução das emissões de gases poluentes oriundos da queima de combustíveis fósseis, intensificou mundialmente a busca por fontes alternativas de energia. Dentre elas, destaca-se a produção de biocombustíveis líquidos (particularmente etanol e biodiesel) a partir de biomassa renovável.

Materiais lignocelulósicos são substratos economicamente atraentes para a produção de etanol (COELHO *et al.*, 2001; RAMOS, 2003). No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar, subproduto da indústria sucroalcooleira, destaca-se pela sua abundância - em torno de 160 milhões de toneladas somente na safra de 2008/2009 (CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA), das quais cerca de 8% não tem destino apropriado.

O bagaço de cana é constituído basicamente de três polímeros: *celulose* (polímero de glicose), *hemicelulose* (cadeias ramificadas de açúcares, maioria aldopentoses, principalmente xilose) e *lignina* (material estrutural da planta, responsável por rigidez, impermeabilidade e resistência) na proporção aproximada de 50:30:20. Uma tonelada de bagaço de cana gera em torno de 192 kg de lignina, 500 kg de celulose e 250 kg de hemicelulose. (COELHO *et al.* 2001).

A produção de etanol celulósico, também chamado de etanol de segunda geração, em escala comercial tem mobilizado um grande número de pesquisadores. Isso porque, diferente da produção do etanol a partir da sacarose da cana-de-açúcar, o etanol celulósico requer etapas adicionais no processo de produção a fim de converter os compostos poliméricos presentes na biomassa celulósica em açúcares fermentáveis (FARINAS, 2009).

A produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana requer basicamente as seguintes etapas: tratamento do bagaço para remoção de hemicelulose e lignina, hidrólise enzimática ou química da celulose e fermentação das hexoses por *Saccharomyces cerevisiae*.

A hidrólise enzimática da celulose requer a ação sinérgica de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. A hidrólise ácida gera produtos inibidores da fermentação, e por isso, a hidrólise enzimática tem sido apontada como a rota mais promissora e de grande interesse industrial para o aumento da produtividade do etanol de forma sustentável (FARINAS, 2009).

Apesar das excelentes perspectivas que apresentam as enzimas como catalisadores, devido a sua especificidade e alto poder catalítico, sua aplicação industrial não é tão atrativa. Esses biocatalizadores geralmente são caros, e como são solúveis, e estão presentes em baixa concentração no meio reacional, sua recuperação após o uso dificilmente será economicamente viável. Outra característica indesejada das enzimas é sua baixa estabilidade, mantendo-se ativas apenas em uma faixa limitada de temperatura e pH (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma técnica importantíssima para viabilizar a utilização industrial de enzimas, pois permite reduzir significativamente a inativação por influência da temperatura e solventes orgânicos, possibilitando, portanto, uso prolongado e repetido da enzima imobilizada, fácil recuperação a partir do meio reacional, implementação de processos contínuos de produção, aumento da produtividade, devido ao uso de alta carga enzimática por volume de reator, etc.

Baseado na demanda tecnológica de produção de etanol de segunda geração, o Departamento de Engenharia Química da UFSCar e o Centro de Pesquisa da EMBRAPA Instrumentação Agropecuária, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), programa BIOEN, somaram esforços para o desenvolvimento de um processo de produção de bioetanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

Este trabalho insere-se nesta linha de pesquisa, cujo objetivo principal é a imobilização/estabilização de uma das enzimas do complexo celulolítico, a β -glicosidase, visando sua aplicação em reações de hidrólise de celobiose gerada pela ação das endoglucanases e exoglucanases sobre a celulose do bagaço de cana-de-açúcar. Como celobiose é solúvel no meio reacional, a

suplementação dos complexos celulolíticos comerciais com β -glicosidase imobilizada poderia aumentar a conversão de celulose em glicose por reduzir o efeito inibitório de celobiose sobre as endoglucanases e exoglucanases, devido à remoção contínua de celobiose do meio reacional. Neste contexto, a produção de etanol de segunda geração poderia tornar-se mais atrativa do ponto de vista industrial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocombustível

A utilização de combustíveis renováveis tem despertado interesse cada vez maior em todo o mundo. Os impactos positivos do uso dos combustíveis renováveis, em substituição aos fósseis, não se restringem apenas ao campo econômico, mas também a questões estratégicas e ambientais. Além de reduzir a dependência externa de petróleo e os gastos com energia, o uso de tais combustíveis resulta em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera. Esse último aspecto constitui um apelo cada vez maior para a substituição dos derivados de petróleo pelos assim chamados “biocombustíveis”.

A procura por substitutos para o petróleo e matéria-prima para a indústria química é tema de projetos em muitos centros de pesquisa. Segundo previsões, o consumo de petróleo irá aumentar significativamente até por volta do ano 2014, quando o preço do barril deverá subir tanto que forçará a diminuição do consumo (EVANS¹, citado por MARTINS, 2007). Nesse contexto, novas tecnologias estão sendo propostas para a substituição do petróleo como fonte de insumos e energia.

Em princípio, os combustíveis fósseis, como o gás natural e o carvão mineral, podem ser utilizados e substituir o petróleo (CAMPBELL; LAHERRÉRE, 1998). Porém, eles são de difícil transformação em matéria-prima para a indústria química e não iriam resolver o outro grande problema relacionado com o petróleo: o impacto ambiental devido à formação de CO₂ e gases sulfurados na sua queima ou transformação. Para um País tropical com o Brasil, o substituto natural para o petróleo é a biomassa (SCHUCHART; RIBEIRO, 2000).

¹ EVANS, J. Chemistry in Britain, August, 1999, 38.

As principais fontes de biomassa provêm dos resíduos agrícolas (por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar e palha de cereais) e florestais. Portanto, materiais lignocelulósicos se tornam interessantes para produção de energias renováveis por reduzir a poluição ambiental, pois como são formados a partir de CO₂, H₂O e energia solar, num processo conhecido como fotossíntese, no balanço global contribuem para reduzir a emissão de gases poluentes (CORTEZ; LORA², citados por MARTINS 2007).

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

² CORTEZ, L. B. A.; LORA, E. S. Tecnologia de Conversão de Biomassa, Universidade do Amazonas, EFEI, Manaus, 1997.

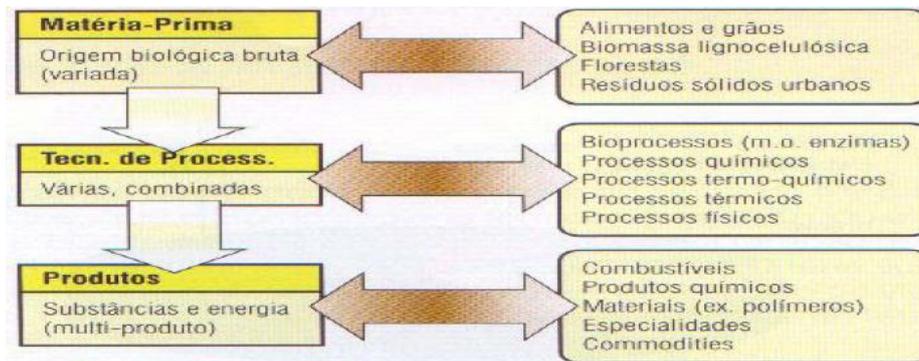


Figura 2.1 - Esquema geral de uma biorrefinaria utilizando diferentes tipos de biomassa (GIORDANO, 2004)

2.2 Bagaço de Cana-de-Açúcar

Os resíduos lignocelulósicos são os materiais orgânicos mais abundantes da biosfera, representando aproximadamente 50% da biomassa vegetal e podem ser usados como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos e bens de consumo diversos (CUNHA *et al.*, 2005; LATIF; RAJOCA, 2001). O Brasil, com sua grande extensão territorial, apresenta alto potencial de exploração de recursos renováveis para a geração de diversos insumos.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com produção estimada em 625 milhões de toneladas para a safra de 2010/2011 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, JAN/2011). O processamento da cana, para a produção de açúcar (sacarose) e álcool gera um resíduo lignocelulósico em abundância, o bagaço de cana-de-açúcar.

A indústria sucroalcooleira produz em média 250 kg de bagaço por tonelada de cana moída (SANTANA; SOUZA, 1984), o que corresponde a uma produção aproximada de 156 milhões de toneladas de bagaço em 2010/2011 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, JAN/2011). Grande parte deste resíduo é utilizada pela própria usina para geração de energia, mas, ainda há um grande excedente que pode ser

empregado para a produção de diversos bens para a sociedade (CUNHA *et al.*, 2005).

Algumas alternativas para utilização do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima são a produção de etanol, hidroximetilfurfural, papel e celulose, revestimentos acústicos, madeira prensada, enzimas e xilitol (CUNHA *et al.*, 2005). Outra possível aplicação é a sua utilização como matriz sólida para imobilização de enzimas. Diversos resíduos lignocelulósicos têm sido relatados na literatura como suportes para imobilização de lipases (enzimas que catalisam reações de hidrólise de óleos e gorduras e reações de esterificação e transesterificação), dentre eles, fibra de coco verde (BRÍGIDA *et al.*, 2007), palha de arroz (FREITAS *et al.*, 2003) e celulignina (PÉREZ *et al.*, 2007). Entretanto, bagaço de cana-de-açúcar ainda é pouco explorado.

A composição química do bagaço de cana *in-natura* é de 46,0% de celulose, 25,2% de hemicelulose e 20,7 % de lignina (BOFO *et al.*, 2005).

A hidrólise dos polissacarídeos presentes nos resíduos lignocelulósicos pode ser feita por diferentes tecnologias, empregadas individualmente ou combinadas, a saber: cozimento com vapor a alta pressão, seguido ou não de descompressão rápida; hidrólise ácida; hidrólise alcalina; uso de peróxido de hidrogênio; dissolução de lignina a quente com solvente orgânico ou álcali, dentre outros (ver Fig. 2.2).

Dependendo da severidade do processo utilizado no tratamento do resíduo, pode haver geração de grande quantidade de subprodutos tóxicos aos microrganismos que irão fermentar as hexoses e/ou pentoses. Entretanto, a utilização de um complexo enzimático (celulases e xilanases) pode catalisar a hidrólise dos polissacarídeos em condições suaves de reação, sem geração de subprodutos indesejáveis (MARTINS; ADRIANO; GIORDANO, 2005). Evidentemente, será necessário um pré-tratamento suave do material para facilitar a ação das enzimas. Ramos (2003) discute os diferentes tratamentos que podem ser utilizados, suas vantagens e desvantagens. Concentração do ácido ou base, temperatura e tempo de pré-tratamento são variáveis decisivas na composição do hidrolisado resultante. Cozimento rápido sob pressão,

utilizando ácido diluído, seguido de descompressão rápida, pode ser um bom caminho para se preparar um substrato adequado para o ataque enzimático.

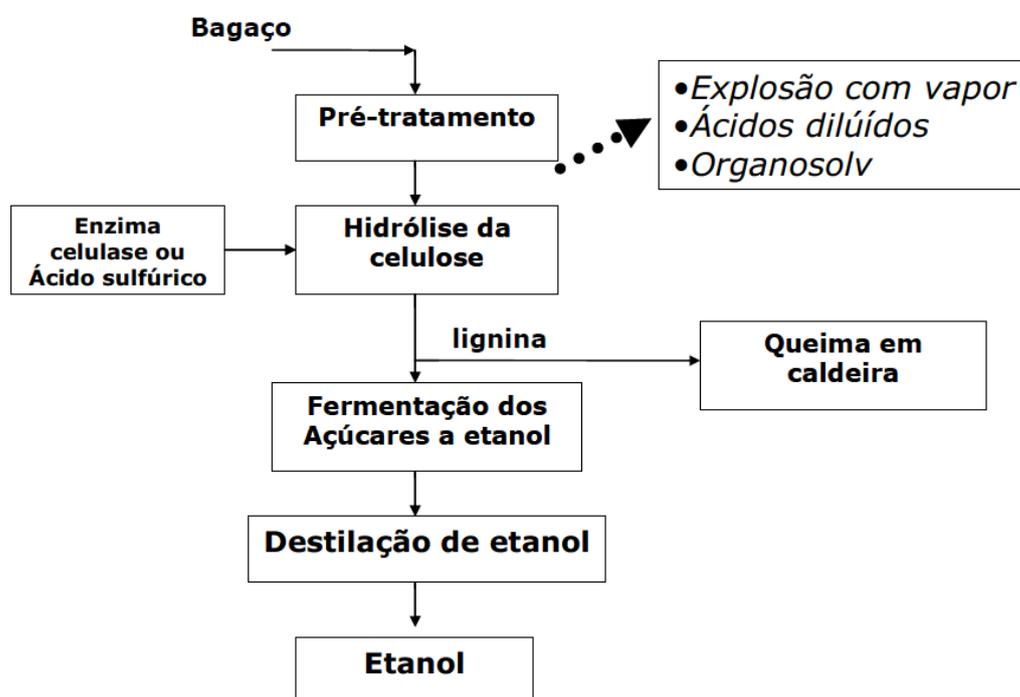


Figura 2.2 – Fluxograma representativo da utilização do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2ª geração (MARTINS; ADRIANO; GIORDANO,2005)

2.3 Enzimas

Enzimas são, exceto um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas, proteínas (polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas) produzidas dentro das células dos organismos vivos que apresentam atividade catalítica. Elas são os agentes principais nas transformações celulares, já que funcionam como catalisadores, facilitando reações bioquímicas através da redução da energia de ativação sem serem consumidas ou alterarem a constante de equilíbrio ou energia livre da reação (LEHNINGER, 1998).

As enzimas têm alta especificidade pelo substrato, pois a molécula é disposta tridimensionalmente de tal forma que apenas determinados substratos

consigam atingir seu sítio ativo, encontrando-se nessa região com grupos específicos da proteína num posicionamento adequado à reação. Entretanto, são, geralmente, muito sensíveis ao calor, ao pH e à presença de certos compostos que podem desnaturar a proteína, ou seja, alterar reversível ou irreversivelmente a estrutura tridimensional essencial para a atividade catalítica (KENNEDY; CABRAL, 1987). Assim, as enzimas são geralmente comercializadas na presença de aditivos que protegem a proteína da inativação durante a estocagem (ZANIN; MORAES, 2004).

As enzimas podem estar associadas com lipídios ou carboidratos e podem conter componentes não protéicos cataliticamente ativos, chamados coenzimas ou cofatores. Muitas enzimas, para serem cataliticamente ativas, necessitam de íons metálicos, atuando como ativadores e estando diretamente envolvidos na catálise (KENNEDY; CABRAL, 1987).

De acordo com a reação catalisada, as enzimas são divididas em seis classes: 1-*oxidoreductases* (reação de oxido-redução), 2-*transferases* (reações de transferência de grupos entre moléculas, que não sejam catalisadas pelas oxiredutases ou pelas hidrolases), 3- *hidrolases* (reações de hidrólise, onde a água é o receptor dos grupos transferidos), 4- *liases* (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou desfazendo ligações duplas), 5- *isomerases* (reações de isomerização) e 6-*ligases* (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP) (LARTIGUE, 1975; KENNEDY; CABRAL, 1987; WHITAKER, 1994; HARTMEIER, 1988).

2.3.1 - Enzimas como biocatalisadores e suas aplicações

As limitações existentes na obtenção de produtos e intermediários de interesse comercial podem ser associadas aos tipos de catalisadores químicos empregados, que são pouco versáteis e exigem altas temperaturas para atingir razoável velocidade de reação. Além disso, possuindo baixa especificidade, geralmente fornecem produtos de composição química mista, ou produtos contaminados, que requerem uma etapa posterior de purificação (MARCHETTI

et al., 2007; RANGANATHAN *et al.*, 2008; ANTCZAK *et al.*, 2009). As enzimas atuam em condições suaves de temperatura, pH e pressão, atingindo velocidade de reação bastante superior aos catalisadores químicos convencionais, que normalmente são utilizados em condições extremas de reações (KRAJEWSKA, 2004; HASAN *et al.*, 2006). Este comportamento das enzimas permite redução do custo final do processo, devido à redução do consumo de energia e subprodutos indesejáveis (de CASTRO *et al.*, 2004).

Nesse contexto, o enfoque biotecnológico vem se apresentando como uma opção interessante para a exploração em diversos tipos de reações (CASTRO *et al.*, 2004; HASAN *et al.*, 2006; MARCHETTI *et al.*, 2007; RANGANATHAN *et al.*, 2008; ANTCZAK *et al.*; 2009).

A tecnologia enzimática apareceu como área de investigação na década de 1960, com a imobilização de enzimas para a utilização em processos químicos (KRAJEWSKA, 2004). Desde então, os processos enzimáticos tem sido aplicados em diversos setores, incluindo construção de biossensores, síntese enzimática de compostos bioativos, obtenção de novos biopolímeros, processos em indústrias tradicionais como cortumes, papel e celulose, têxtil, cosméticos, dentre outras (HASAN *et al.*, 2006).

De acordo com reportagem da *Business Communications Company Inc.* (BCC), o mercado mundial de enzimas de interesse industrial foi estimado em U\$ 3,3 bilhões de dólares em 2010. Este mercado deve chegar a 4,4 bilhões de dólares em 2015, uma taxa de crescimento anual de 6% prevista para o período de 5 anos. Enzimas utilizadas na formulação de detergentes, produção de papel e celulose, manufatura de couros e produção de fármacos foram avaliadas em mais de U\$ 1 bilhão em 2010. Segundo a BCC, este setor vai ter um crescimento anual de 6,6% atingindo U\$ 1,5 bilhão em 2015. As maiores vendas de enzimas técnicas foram no mercado de couro, seguidas pelas vendas no mercado de bioetanol. No seguimento de alimentos e bebidas, o mercado de enzimas deverá atingir cerca de U\$ 1,3 bilhão em 2015, a partir do valor de U\$ 975 milhões em 2010, tendo um crescimento anual de 5,1%.

A crescente competitividade da tecnologia enzimática tem impulsionado a seleção de novas enzimas e a produção de enzimas recombinantes por

tecnologia de DNA recombinante e de engenharia de proteínas. Essas técnicas permitem a modificação de propriedades cinéticas e de estabilidade, o desenvolvimento de novas soluções ao nível da tecnologia de reatores enzimáticos e das técnicas de imobilização (GUISÁN, 2006).

2.4 Enzimas Celulolíticas

Celulases referem-se a uma classe de enzimas produzidas essencialmente por fungos e bactérias e que são capazes de hidrolisar a celulose, que é a matéria-prima mais abundante do planeta e a principal fonte de carbono (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Encontrada nas paredes celulares de vegetais, a celulose apresenta-se na forma amorfa e cristalina (RAMOS, 2003). A Figura 2.3 ilustra uma célula vegetal evidenciando a forma estrutural da celulose, polímero em maior quantidade na composição de uma célula vegetal.

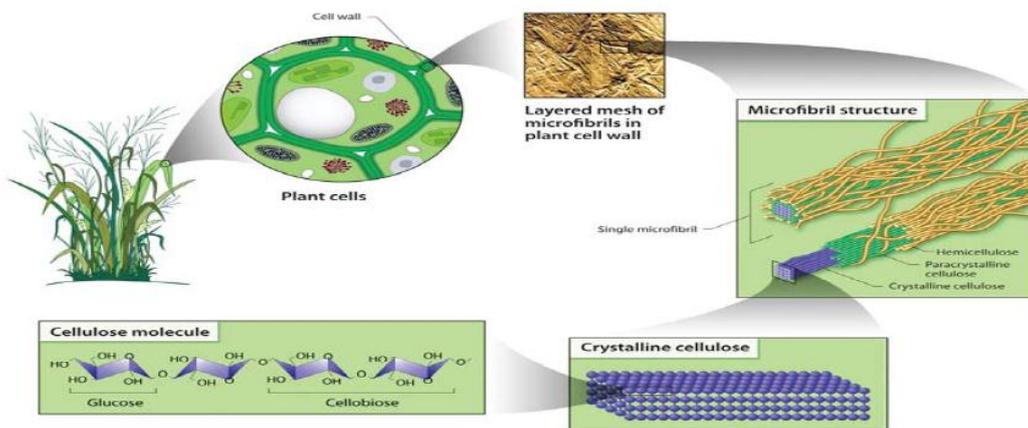


Figura 2.3 - Célula vegetal, representando as microfibras de celulose e hemicelulose (MARTINS,2007).

Do ponto de vista químico, a celulose é um polissacarídeo composto de unidades β -D-glicopiranosil, unidas por ligações β -(1,4), formando um polímero linear (RAMOS, 2003; LYND; ZHANG, 2004). A Figura 2.4 apresenta a estrutura linear da celulose.

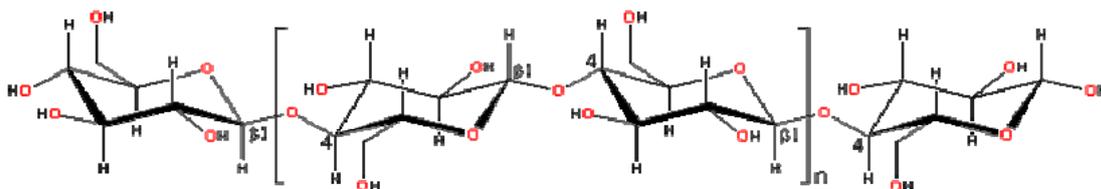


Figura 2.4 - Cadeia linear polimérica da celulose, mostrando as ligações β -1,4 das unidades β -D-glicopiranosil (MARTINS, 2007).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações β -glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC) com a codificação EC 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a celulase avaliada. A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglicanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglicanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidase (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose (de CASTRO; PEREIRA Jr., 2010). Atualmente as glicosidases são agrupadas em 87 famílias (WULFF, 2002). A Figura 2.5 apresenta a estrutura de uma celulase de *Trichoderma reesei*.

A conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa árdua, devido à natureza física do substrato. Na sua forma nativa, a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, chamadas de microfibrilas, nas quais as ligações de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. Essas fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz a acessibilidade das enzimas celulolíticas (BÉGUIN, 1990). A Figura 2.6 ilustra as ligações de hidrogênio formando redes/fibras cristalinas insolúveis.

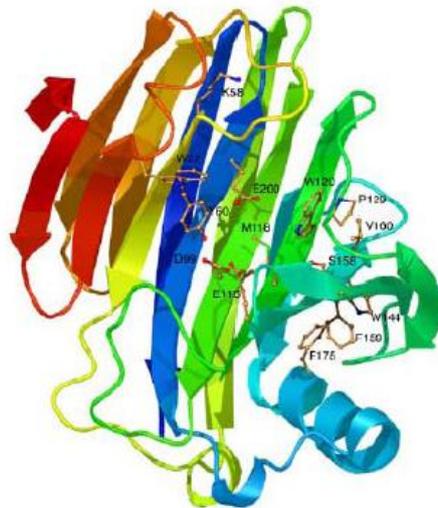


Figura 2.5 - Estrutura de uma celulase de *Trichoderma reesei* (SANDRENA e MITCHINSON, 2005)

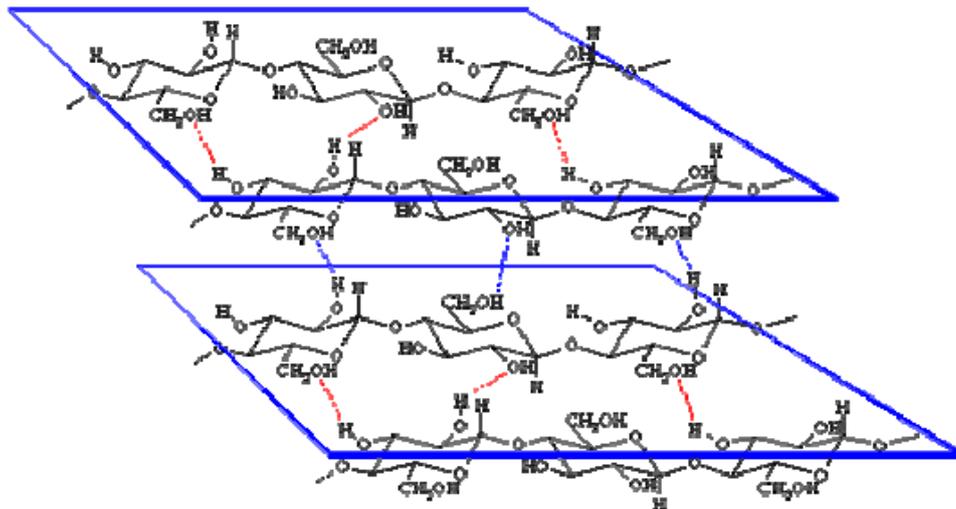


Figura 2.6 - Fibras cristalinas de celulose ilustrando a influência das pontes de hidrogênio (MARTINS, 2007).

Na hidrólise da celulose é necessário um consórcio de enzimas atuando sinergicamente (MONTI, 1989; NIDTZKY *et al.*, 1994; TANNER *et al.*, 2002; WULFF, 2002). Esse consórcio de enzimas reúne:

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

Exoglicanases ou Celobiohidrolases (CBH I e II; EC 3.2.1.91), conhecidas como avicelases ou exocelulases. Catalisam a hidrólise de ligação β -(1-4)-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, liberando celobiose das extremidades não redutoras da cadeia.

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

As endoglicanases e as celobiohidrolases degradam celodextrinas solúveis e celulose amorfa, enquanto somente as celobiohidrolases, com notáveis exceções, degradam a celulose cristalina eficientemente (SCHÜLEIN³ *apud* WULFF, 2002).

Na Figura 2.7 é representado o mecanismo de degradação da celulose e pode-se verificar o sinergismo das enzimas. A endocelulase quebra aleatoriamente a cadeia polimérica, posteriormente a exocelulase quebra o final dessa cadeia em um dímero de glicose (celobiose). Por último, a β -glicosidase converte a celobiose em glicose (SADDLER⁴ *apud* MARTINS, 2007).

³ SCHÜLEIN, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2000.

⁴ SADDLER, J. N. Factors limiting the efficiency of cellulase enzymes. **Microbiological Science**, Oxford. 1986.

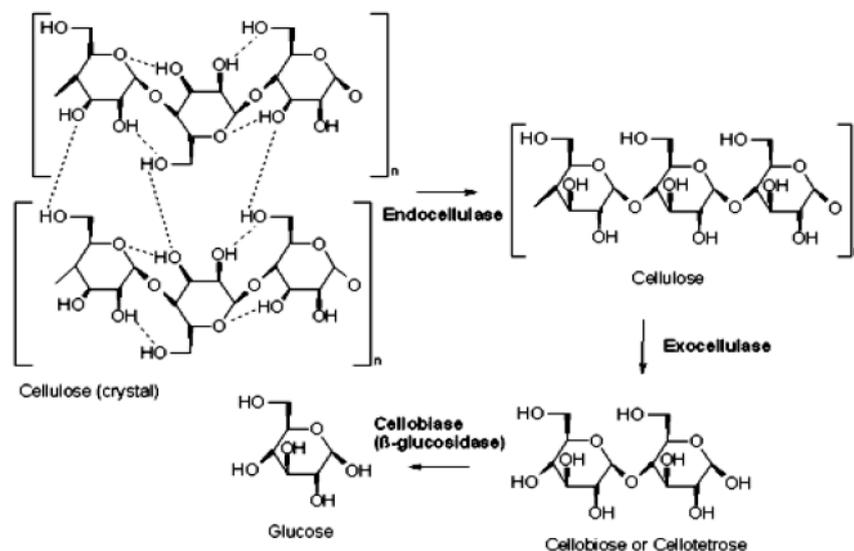


Figura 2.7 - Mecanismo de degradação da celulose e o sinergismo do complexo enzimático (MARTINS, 2007).

As hidrólises enzimáticas das ligações glicosídicas ocorrem através de catálise ácida geral, onde são necessários dois aminoácidos críticos, um doador de prótons (ácido) e um nucleófilo. A catálise ácida é usualmente promovida pelos resíduos aspartato e glutamato, ou por ambos resíduos (GILKES et al.⁵ *apud* MARTINS, 2007). Nesta catálise, ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando em inversão ou retenção da configuração anomérica do átomo de carbono do glicosídeo hidrolisado (DAVIES et al.⁶ *apud* MARTINS, 2007).

2.4.1 β -Glicosidases (EC 3.2.1.21)

Devido à ampla variedade de ligações glicosídicas que ocorrem naturalmente, existe uma vasta diversidade de enzimas, denominadas

⁵ GILKES, N. R. et al. Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiological Reviews**. 1991.

⁶ DAVIES, G.J. et al. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**. 1997.

glicosidases, cuja função é a clivagem destas ligações. Esta diversidade é, presumivelmente, consequência da natureza diversa de seus substratos, e também das diferentes soluções evolucionárias para o problema da construção de sítios ativos capazes de hidrolisar ligações glicosídicas (WITHERS, 2001).

Especificamente, as BGs formam um grupo altamente heterogêneo em enzimas hidrolíticas (BHATIA *et al.*, 2002). Tais enzimas são encontradas em diversos organismos, como bactérias, fungos, plantas e animais, incluindo o homem (GRACE *et al.*, 1994; DAY *et al.*, 1998; NEMETH *et al.*, 2003).

A principal reação catalisada por estas enzimas é a hidrólise de ligações β -glicosídicas em glicosídeos de baixa massa molecular. Desta forma, o nome β -glicosidase é dado a diferentes tipos de enzima capazes de hidrolisar ligações β -glicosídicas em dissacarídeos, oligossacarídeos e glicosídeos conjugados (COULON *et al.*, 1998; SANZ-APARICIO *et al.*, 1998; BHATIA *et al.*, 2002), sendo que a afinidade pelo substrato específico depende da origem, e também da função fisiológica e da localização da enzima (WOODWARD; WISEMAN, 1982). Entretanto, sob certas condições, como baixa atividade de água, alta concentração de substrato, ou a presença de nucleófilos diferentes de água, as β -glicosidases podem catalisar a síntese de ligações β -glicosídicas entre diferentes moléculas (BHATIA *et al.*, 2002).

As funções desempenhadas *in vivo* pelas β -glicosidases são diversas, podendo ser destacadas a hidrólise de oligossacarídeos de cadeia curta e celobiose em bactérias e fungos (BHATIA *et al.*, 2002; FAURE, 2002; ARO; PAKULA; PENTTILA, 2005). Em plantas, β -glicosidases podem atuar na hidrólise de precursores de hormônios (BRZOBOHATY *et al.*, 1993; COENEN; LOMAX, 1997; LEXA *et al.*, 2003; SARRY; GUNATA, 2004), na degradação de componentes da parede celular em processo de amadurecimento de frutos (GERARDI *et al.*, 2001; FAURE, 2002), germinação de sementes e desenvolvimento de embriões (LEAH *et al.*, 1995; AKIYAMA; KAKU; SHIBUAT, 1998; OPASSIRI *et al.*, 2003), na emissão de aromas (fragrância) em flores (REUVENI *et al.*, 1999; HAYASHI *et al.*, 2004), e participar no controle de movimentos foliares (UEDA *et al.*, 1999; KATO; KUMAGAI; UEDA, 2005). β -glicosidases estão envolvidas também em interações patógeno-planta (DORI;

SOLEL; BARASH, 1995; STAPLES; MAYER, 1995; ASHBY, 2000; HAERTER; VOEGELE, 2004) e herbívoro-planta, além de exercerem outras funções (WOODWARD; WISEMAN, 1982, BHATIA *et al.*, 2002). Em humanos, β -glicosidases realizam a hidrólise de glicosilceramidas (glicocerebrosídeos) e de outros glicosídeos conjugados (GRABOWSKI *et al.*, 1996; DAY *et al.*, 1998; ZHAO; GRABOWSKI, 2002; NEMETH *et al.*, 2003; GERMAIN, 2004).

As BGs são geralmente classificadas por métodos baseadas na especificidade em relação ao substrato, ou na similaridade entre suas sequências de aminoácidos e conformação. O último método é o mais aceito atualmente, uma vez que pode refletir características estruturais, relações evolucionárias e o mecanismo catalítico destas enzimas (BHATIA *et al.*, 2002).

Em alguns microorganismos, diferentes BGs são codificadas por genes distintos. Entretanto, formas múltiplas de uma enzima podem também originar-se através de degradação proteolítica de uma enzima única, ou através de diferentes graus de modificações pós-traducionais, como glicosilação (MCHALE; COUGHLAN, 1981; LO; BARBIER; WILLICK, 1990; LI; CALZA, 1991; CHEN; HAYN; ESTERBAUER, 1992; GUEGUEN *et al.*, 1995; IWASHITA *et al.*, 1998,1999; DE-PAULA; RAMOS; AZEVEDO, 1999; WALLECHA; MISHRA, 2003; YAZDI *et al.*, 2003). Fungos, por exemplo, são conhecidos por secretar diversas formas de uma mesma enzima, dependendo da linhagem e de condições ambientais (RIOU *et al.*, 1998). Neste aspecto, a diversidade das BGs pode ser utilizada como uma ferramenta para traçar um determinado evento evolucionário, ou para prognosticar a possível localização dos sítios ativos (LI; LEE, 1999). Por outro lado, a proteólise pode dificultar a identificação dos verdadeiros componentes de um sistema enzimático produzido, por exemplo, para degradação de determinados polissacarídeos (WARREN, 1996).

2.5 Aplicações biotecnológicas de celulases

Há varias aplicações de celulases em processos biotecnológicos, nos quais em sua grande maioria são utilizados fungos filamentosos do gênero

Trichoderma para degradação de materiais lignocelulósicos e enzimas livres comercialmente disponíveis (WEN *et al.*, 2004, KANG *et al.*, 2004).

A produção de etanol utilizando biomassa lignocelulósica atrai as atenções de pesquisadores em busca de energia alternativa (SHENG *et al.*, 1998; AGBLEVOR; JOST WEBER, 2004). Kang *et al.*, (2004), propuseram a fermentação em meio sólido da palha de arroz e farelo de trigo por *Aspergillus niger* para produção de etanol. Tal processo consiste em hidrolisar os materiais lignocelulósicos reduzindo-os principalmente em glicose e xilose e transformá-los posteriormente em caldo de açúcares para bioconversão em etanol (KANG *et al.*⁷, *apud* MARTINS, 2007).

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

Na indústria têxtil as celulases são capazes de tornar os tecidos mais lisos e macios, degradando as fibras da superfície (DIENES, 2004).

Nas indústrias alimentícias, as celulases são usadas em vários processos, principalmente na extração de componentes do chá verde, proteína de soja, óleos essenciais, aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam ainda dos processos de produção de vinagre de laranja e do ágar e na extração e clarificação de sucos de frutas cítricas (ORBEG⁸, *apud* RUEGGER, 2004).

Estudos voltados à ação e produção de celulases também são verificados na literatura. Xia e Shen (2003) estudaram o pré-tratamento de

⁷ KANG, S.W. *et al.* Production of cellulase and hemicellulase by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 2004.

⁸ ORBERG, P.K. **Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei***. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon. 1981.

resíduos de derivados de milho como fonte de substrato; Kansoh *et al.* (1998) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar na preparação de novos derivados celulolíticos; resíduos fibrosos de soja são aproveitados como substratos para produção de enzimas celulolíticas e produtos de valor agregado por *Lactobacillus subtilis* isolados da água e do solo da região amazônica (AYUAB *et al.*, 2002).

2.6 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos

Existem basicamente três técnicas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácidos diluídos e hidrólise enzimática.

Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais com ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas (<100°C). A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes a corrosão, aumentando assim o custo do produto. Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva a degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (SZENGYEL, 2000).

No processo com ácido diluído, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. A hemicelulose hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise. Dessa forma, as condições de hidrólise tanto para a hemicelulose quanto para a celulose podem ser otimizadas. Porém, devido às altas temperaturas aplicadas no segundo passo (aproximadamente 200°C), uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel é degradada, levando a uma inibição durante o processo de fermentação (CLARK; MACKEL, 1984, WYMAN; 1994; LARSSON *et al.*, 1998).

No processo enzimático, a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade das enzimas do complexo celulolítico. Durante o pré-tratamento, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído. No segundo passo, a celulose é quebrada por ação das enzimas celulasas. Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, a quantidade de subprodutos liberados é menor, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Porém, para atingir alta conversão da celulose são necessárias altas concentrações da enzima, o que aumenta o custo da produção (EKLUND; GALBE; ZACCHI, 1990).

As condições de cada processo e os seus desempenhos aproximados são mostrados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Processo	Insumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de glicose
Ácido diluído	H ₂ SO ₄ (<1%)	215	3 min	50-70%
Ácido concentrado	H ₂ SO ₄ (30- 70%)	40	2-6 h	90%
Enzimática	Celulase	70	1,5 dias	75-95%

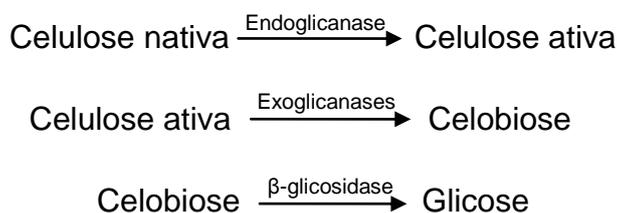
O interesse inicial no estudo das BGs surgiu na década de 1950, devido ao seu envolvimento na conversão biológica da celulose (ZANOELO *et al.*, 2004). Estima-se que aproximadamente 4×10^9 toneladas de celulose sejam formadas anualmente (ARO *et al.*, 2005). A celulose, principal componente de paredes celulares vegetais, é a biomassa mais abundante no planeta, representando uma valiosa fonte renovável de carbono que pode ser utilizada na produção de combustíveis, alimentos, dentre outros produtos. Neste sentido, materiais lignocelulósicos naturais têm sido considerados promissores

devido à sua abundância, baixo custo e enorme disponibilidade potencial (RYU; MANDELS, 1980; SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; BHAT; BHAT, 1997; LYND *et al.*, 2002; ARO *et al.*, 2005).

A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulases, as quais são altamente específicas (BÉGUIN; AUBERT, 1994). O produto da hidrólise são usualmente açúcares redutores, incluindo a glicose. O custo da hidrólise enzimática é muitas vezes baixo se comparado com a hidrólise ácida, porque a hidrólise é usualmente conduzida em condições suaves (pH 4,8 e temperatura entre 45 e 50°C), além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos (DUFF; MURRAY, 1996).

Ao contrário dos catalisadores comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo assim os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluente (SEGEL, 1975). No caso da hidrólise enzimática da celulose, a especificidade da enzima evita ainda que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (CONTIERO, 1992).

Ao longo dos anos, vários mecanismos diferentes foram propostos para a conversão de celulose a glicose. Petterson *et al.* (1978) descreveram um esquema hipotético para a degradação da celulose em 3 etapas:



O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, tais como, tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do

meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação. Conseqüentemente, é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (VALLANDER; ERIKSSON, 1985).

A hidrólise enzimática conduz a rendimentos mais elevados de monossacarídeos do que a hidrólise ácida, porque as enzimas celulasas catalisam somente as reações de hidrólise e não as reações da degradação do açúcar (PARISI, 1989).

Alguns autores vêm mostrando a eficiência da hidrólise enzimática em relação à hidrólise ácida. Segundo Krishna *et al.* (1997), aproximadamente 75% e 65% da sacarificação foram conseguidas com 7,5% (m/m) de H₂SO₄ e HCl, respectivamente, a 15 psi em 45 minutos. No caso da hidrólise enzimática, o pré-tratamento do bagaço foi essencial, mas altas pressões não foram requeridas. O hidrolisado enzimático apresentou uma conversão de 92% do substrato quando utilizado bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino a 2,5% (m/v). A formação dos açúcares foi conseguida a 50°C e pH 4,5, usando celulase de *T. reesei* com 40 FPU/g substrato em 48 h. A fermentação do hidrolisado enzimático conduziu à uma produção de etanol mais elevada em comparação com a fermentação do hidrolisado ácido.

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente e tenham maiores chances de se tornarem economicamente viáveis em um futuro próximo, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro.

2.7 Imobilização de Enzimas

Nos últimos anos, a utilização de enzimas na indústria cresceu sensivelmente devido às vantagens frente aos catalisadores químicos, tais como elevada atividade catalítica, especificidade por determinado substrato e elevada atividade em condições brandas de temperatura e pressão (SHARMA;

CHISTI; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). A grande desvantagem da utilização de enzimas na forma solúvel é a sua difícil recuperação a partir meio reacional para posterior aplicação, assim como a contaminação do produto desejado (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; GUISÁN, 2006). A fim de se contornar esses problemas, a imobilização de enzimas em suportes sólidos insolúveis com retenção de sua atividade catalítica é uma estratégia muito pesquisada a fim de tornar essas biomoléculas atrativas do ponto de vista industrial.

As principais vantagens obtidas pelo processo de imobilização são: aumento da estabilidade térmica do biocatalisador, aplicação em reatores bateladas e contínuos com maior controle do processo, diminuição do volume reacional, devido ao uso de elevadas concentrações de enzima e, reutilização da enzima sem perda significativa da sua atividade catalítica (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005; GUISÁN, 2006).

As principais desvantagens do processo de imobilização são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização (ARROYO, 1998).

2.7.1- Métodos de Imobilização de Enzimas

O desenvolvimento de novos métodos de imobilização tem sido importante para proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação de produtos e aumentar a estabilidade de enzimas na presença de solventes orgânicos. Na literatura, muitos métodos são descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (VILLENEUVE *et al.*, 2000; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004). Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Enzimas podem ser imobilizadas de muitas maneiras, isto é, podem ser confinadas em gel ou microcápsulas; podem ser adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; podem ser copolimerizadas com algum

monômero; e ainda podem se ligar covalentemente a uma matriz polimérica insolúvel (VILLENEUVE *et al.*, 2001; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

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

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser separados em duas grandes classes: métodos químicos e métodos físicos.

Nos métodos químicos de imobilização estão envolvidas ligações covalentes e estas podem ocorrer de diferentes maneiras, a saber:

Ligação covalente a suportes sólidos: envolve grupos funcionais da enzima (resíduos de aminoácidos não pertencentes ao sítio ativo da enzima) e grupos reativos do suporte (normalmente introduzidos quimicamente). Os grupos funcionais da enzima normalmente envolvidos na ligação ao suporte são: grupos α -NH₂ terminais e/ou ε -NH₂ de lisinas; grupos carboxílicos de resíduos de ácidos aspárticos e glutâmicos; grupo fenólico de tirosinas; grupo sulfidrílico de cisteínas; grupos hidroxílicos de serinas, treoninas e tirosinas; grupo imidazol de histidinas; e grupo indol de triptofano (KENNEDY; WHITE, 1985).

Ligação cruzada intermolecular: ligação entre moléculas de enzima para formação de uma estrutura tridimensional complexa. Usa-se para este fim reagentes bifuncionais ou multifuncionais, tais como, glutaraldeído e polialdeído dextrana. O complexo enzimático formado normalmente apresenta baixa estabilidade.

No método de ligação covalente de enzimas em suportes sólidos, a ligação formada é muito forte, dessa forma não há desprendimento de moléculas de enzima do biocatalisador na presença de substratos ou de soluções de alta concentração iônica. Entretanto, neste tipo de imobilização a regeneração do suporte só é possível se esse for inorgânico.

No método físico, a imobilização não depende de formação de ligação covalente e sim de forças físicas, tais como, van der Waals, eletrostáticas, interações hidrofóbicas ou forças de dispersão (ou forças de London) (KENNEDY; WHITE, 1985).

Dentre os métodos físicos, destacam-se a adsorção (física ou iônica) em superfícies sólidas e o confinamento de moléculas livres de enzima em matrizes poliméricas ou microcápsulas.

Na adsorção física, normalmente as forças de ligações enzima-suporte são fracas, podendo facilmente ocorrer dessorção devido a mudanças no meio reacional (variações de pH, agitação, etc.), contaminando assim o produto final. Na adsorção iônica a enzima se liga a suportes contendo resíduos trocadores de íons. As forças de ligação (interações iônicas) são mais fortes do que aquelas presentes na adsorção física, assim, enzima não se desprende facilmente do suporte (KENNEDY; CABRAL, 1987).

No confinamento em matrizes poliméricas ou microcápsulas, as moléculas de enzima não estão ligadas ao polímero; elas têm simplesmente seu movimento restringido. Neste tipo de imobilização há sérias limitações difusionais, sendo adequado somente para sistemas reacionais com substratos de baixa massa molecular. (HARTMEIER, 1988; KENNEDY; CABRAL, 1987; LARTIGUE, 1975).

Imobilização Covalente Multipontual: O método de ligação covalente multipontual consiste na formação de ligações covalentes entre grupos aldeídos alifáticos lineares (glioxil) do suporte e grupos aminos da enzima (ϵ -NH₂ de lisinas e NH₂-terminal). As várias razões para se escolher grupos aminos de enzimas são: muitas proteínas possuem resíduos de lisinas que não estão envolvidos no sítio catalítico; grupos aminos são polares e usualmente estão localizados na superfície da proteína (expostos ao meio reacional); grupos aminos, quando desprotonados são muito reativos, sem prévia ativação, agindo como agentes nucleofílicos contra átomos com carga $+\delta$ localizados na superfície do suporte (GUISÁN, 1988). A Figura 2.8 mostra os grupos reativos envolvidos num acoplamento enzima-glioxil-suporte.

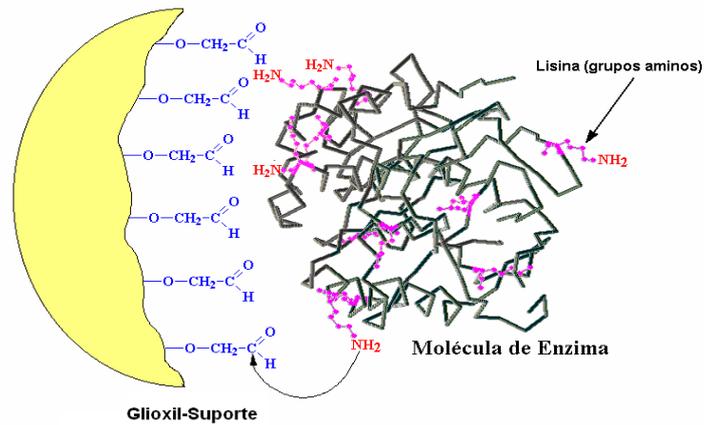


Figura 2.8: Esquema representativo do sistema imobilização/estabilização proposto por Guisán em 1988. A ligação da enzima ao suporte dá-se entre grupos aminos da enzima e uma monocamada densa de grupos aldeídos alifáticos lineares moderadamente afastados da superfície do suporte (Adptação de Guisán *et al.*, 1992)

A distribuição de grupos glioxil no suporte, na forma de monocamadas moderadamente afastadas da superfície permite a formação de ligações multipontuais - bases de *Schiff* - entre enzima e suporte, ligações estas instáveis, porém que aumentam consideravelmente a estabilidade do derivado obtido em relação à enzima livre. A possibilidade de que ligações adicionais sejam efetivas aumenta consideravelmente com o aumento da densidade superficial de grupos aldeídos ativados no suporte.

Normalmente, a primeira ligação que ocorre entre a enzima e o suporte é rápida e reversível, pois existe um equilíbrio entre as formas ligada e não ligada da enzima ao suporte. A estabilidade do derivado aumenta significativamente com a efetivação da segunda ligação entre enzima e suporte, pois havendo duas ligações semelhantes, embora reversíveis, essas funcionam na prática como uma única ligação irreversível no derivado. Além disso, os grupos aminos remanescentes na enzima alinham-se mais facilmente aos grupos aldeídos da superfície do suporte, facilitando, dessa forma, o processo de formação de outras ligações.

As principais características deste importante sistema de imobilização e estabilização de enzimas são: ausência de impedimento estérico para a reação

química do grupo amino da enzima com o grupo aldeído do suporte; alta estabilidade dos grupos aldeídos em pH alcalino; e reversibilidade de cada reação individual amino-aldeído. Essas características favorecem a formação de múltiplas ligações covalentes enzima-suporte sem mudanças conformacionais drásticas na estrutura da enzima (GUISÁN, 1988).

Ao contrário da primeira ligação formada (base de Schiff), as demais ligações demandam tempo para se efetivarem. É importante, portanto, que a estabilidade do grupo reativo do suporte seja alta (BLANCO; GUISÁN, 1989b).

A finalização do processo de multiinteração enzima-suporte se dá por meio da redução das bases de Schiff formadas na reação amino-aldeído por borohidreto de sódio (NaBH_4), que atua sobre as bases de Schiff rapidamente reduzindo-as a estáveis aminas secundárias, o que pode controlar a intensidade das interações enzimas-suporte que, quando muito forte, podem causar distorções da enzima (BLANCO; GUISÁN, 1988b). A redução com borohidreto de sódio também converte os grupos aldeídos remanescentes a grupos hidroxil inertes.

A imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual tem sido citada por diversos autores como uma maneira de aumentar a estabilidade das moléculas imobilizadas em relação à enzima livre (OTERO *et al.*, 1995; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995; MATEO *et al.*, 2000; TARDIOLI *et al.*, 2003a,b; TARDIOLI *et al.*, 2011), sendo também capaz de alterar a especificidade e seletividade de algumas enzimas. A enzima imobilizada torna-se uma estrutura mais rígida e, portanto, mais resistente a mudanças conformacionais induzidas por calor, solventes orgânicos e outras espécies de desnaturação, como por exemplo, quebra de ligação peptídica e oxidação de grupos funcionais (GUISÁN, 1988; MOZAHEV *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2001).

A escolha de um sistema de imobilização e estabilização de enzimas deve considerar, inicialmente, a morfologia da estrutura porosa do suporte, o grupo funcional da enzima e o método de ativação a ser usado, sendo fundamental que se evite o envolvimento dos aminoácidos do sítio ativo catalítico da enzima no processo de insolubilização da enzima (BLANCO, GUISÁN, 1988b; ZABORSKY, 1977)

Os principais fatores que influenciam na imobilização multipontual de enzimas são:

(i) Grau de Ativação do Suporte

Um parâmetro bastante relevante à possibilidade de interação multipontual enzima-suporte é o grau de ativação do suporte, ou seja, a densidade de grupos reativos (aldeídos) na superfície do suporte. No caso específico da agarose, o número de grupos aldeídos por unidade de massa ou volume de suporte, depende da porcentagem de agarose usada na preparação das partículas (MATEO *et al.*, 2006). Elevada porcentagem de agarose presente nas partículas é responsável pela formação de suporte com elevada porosidade porque o número de ligações cruzadas entre as fibras é maior, sendo mais favorável para uma efetiva imobilização de enzimas pela técnica multipontual. Para cada mililitro de gel de agarose CL 10% podem ser imobilizados aproximadamente 100-120 mg de uma enzima de baixa a média massa molecular, como penicilina G acilase, e o suporte pode ser ativado com uma concentração de $220 \mu\text{mol}_{\text{grupos glioxil}}/\text{mL}_{\text{suporte}}$. Empregando gel de agarose CL 4%, o carregamento máximo de proteína é de 20-30 mg/mL e a ativação máxima é de $40 \mu\text{mol}_{\text{grupos glioxil}}/\text{mL}_{\text{suporte}}$ (GUISÁN, 1988).

Além disso, a estabilidade da enzima imobilizada aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de agarose. Para agarose 10%, o fator de estabilidade é 10 vezes superior ao da agarose 4%, dependendo do tamanho da enzima imobilizada. A razão é a geometria da enzima, pois quanto maior é o tamanho da enzima, maior será o contato com os grupos reativos do suporte e, assim, a multiinteração do sistema enzima-suporte é mais efetiva, conferindo maior número de ligações e menor mobilidade da enzima, reduzindo a inativação (MATEO *et al.*, 2006).

O controle da ativação do suporte permite controlar a intensidade das reações enzima-suporte. Elevada ativação pode acarretar distorção da enzima durante a imobilização. O controle é muito simples, porque a oxidação dos grupos gliceril do suporte com periodato de sódio é uma reação estequiométrica. O decréscimo da concentração de grupos aldeídos no suporte promove uma redução da estabilidade do derivado e da velocidade de imobilização (BLANCO E GUISÁN, 1988b). Se a concentração de grupos glioxil

é baixa, o rendimento de imobilização também será baixo e, portanto, o período de contato da enzima com o suporte deve ser prolongado para a obtenção de derivados mais estáveis. Para períodos curtos de imobilização, a estabilidade da enzima imobilizada terá um comportamento similar à da enzima solúvel.

(ii) Condições de Imobilização

O processo de imobilização multipontual requer temperatura ambiente (20-25°C) e elevado valor de pH, cerca de pH 10,0, para possibilitar o desprotonamento dos grupos aminos dos resíduos de lisinas da enzima e, assim, apresentarem reatividade adequada para se ligarem efetivamente com os grupos aldeídos do suporte (BLANCO E GUISÁN, 1988b). Outro fator importante no processo de imobilização multipontual é o tempo de contato da enzima com o suporte. Imobilização em pH alcalino e com suporte altamente ativado pode ser extremamente rápida, podendo ser realizada em curtos períodos de tempo, na ordem de minutos. Neste curto período de contato da enzima com o suporte, pelo menos duas ligações podem ser efetuadas, mas a estabilização das ligações entre enzima e o suporte leva um tempo maior.

O tampão a ser empregado também é outro fator muito importante no processo de imobilização. É necessária a utilização de uma solução tampão capaz de facilitar a interação dos grupos lisinas da enzima com os grupos glioxil do suporte. O tampão mais utilizado neste processo é o tampão bicarbonato (GUISÁN, 1988). Estudos relatados na literatura mostram que a imobilização de enzimas na presença de tampão borato atingiu níveis poucos satisfatórios de fixação da enzima penicilina G acilase de *E. coli* em glioxil-agarose devido à formação de complexos com os grupos aldeído (ÁLVARO *et al.*, 1990). A utilização de tampão de compostos aminados, como as soluções de tampão tris-HCl, etilenodiamina e etanolamina também reduziram a eficiência de imobilização devido à competição entre os grupos aminos da enzima e do tampão, obtendo-se derivados imobilizados com baixa estabilidade térmica (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995).

(iv) Uso de inibidores durante a imobilização

O longo tempo de reação de imobilização, necessário para que se estabeleçam ligações multipontuais entre enzima e suporte, pode provocar distorções na estrutura tridimensional da enzima e causar mudanças conformacionais no sítio ativo que prejudicam sua atividade. Esse efeito pode ser evitado ou reduzido com o uso de inibidores competitivos (substâncias semelhantes ao substrato, Figura 2.10, e que se ligam reversivelmente ao sítio ativo), adicionados ao meio reativo durante o processo de imobilização (BLANCO; GUIÁN, 1988a).

O inibidor competitivo ligado ao sítio ativo previne sua distorção, que pode ocorrer durante a tentativa de um grupo amino da enzima se ligar a um grupo aldeído relativamente distante na superfície do suporte. O inibidor pode, portanto, reduzir as possibilidades de formação de um maior número de ligações covalentes enzima-suporte que seriam feitas com pequenas mudanças na estrutura da enzima, caso o inibidor não estivesse presente e, como consequência, o derivado produzido com o uso de inibidor é mais ativo, porém menos estável do que aquele produzido sem inibidor (BLANCO; GUIÁN, 1988a)

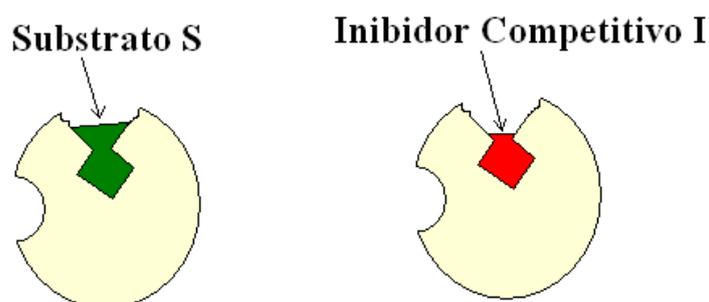


Figura 2.10: Inibição competitiva: o substrato **S**, à esquerda, e o inibidor **I**, à direita, competem pela ligação ao sítio ativo da enzima **E**.

2.7.2- Suportes para imobilização

As principais características a serem observadas na seleção de um suporte para uma determinada aplicação são: área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica, custo e outras.

Os suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos (ver Tabela 2.2) e, com base em sua morfologia, porosos, não porosos ou de estrutura de gel (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Os materiais porosos têm grande área superficial interna disponível para a imobilização de enzimas, onde a enzima fica protegida dos efeitos de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Tabela 2.2: Classificação dos suportes conforme a composição (MESSING, 1984)

Orgânicos		Inorgânicos		
Naturais	Sintéticos	Minerais	Fabricados	
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro de porosidade controlada
Celulose	Colágeno	Poliacrilato	Bentonita	Cerâmica de porosidade controlada
Agar	Albumina	Polivinil	Homoblenda	Sílica de porosidade controlada
Amido	Seda	Nylon	Pedra-Pome	Óxido de ferro

Os materiais não-porosos eliminam a resistência de massa interna, mas apresentam baixa área superficial disponível à ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores contínuos (PEREIRA, 1996).

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

Os polímeros naturais e sintéticos são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores (MATEO *et al.*, 2000; 2002; 2006; 2007a). Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis, não causando danos ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

Suportes inorgânicos são mais adequados para o uso industrial devido as suas propriedades físicas, além disso, apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como: elevada força mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de microrganismos e fácil regeneração por processo de pirólise. Além disso, materiais inorgânicos não apresentam modificação em sua estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. Contudo, a maioria das enzimas imobilizadas comerciais são preparadas em matrizes orgânicas, provavelmente, devido a grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos (KENNEDY; WHITE, 1987).

Dentre os diferentes suportes empregados na imobilização de enzimas podem ser destacados os suportes orgânicos naturais agarose e hidrogéis de quitosana ou polieletrólitos de quitosana com biopolímeros naturais e as resinas acrílicas comerciais (polímeros sintéticos) Toyopearl e Sepabeads (MATEO *et al.*, 2000, 2002, 2007a,b; PALOMO *et al.*, 2002; LÓPEZ-GALLEGO

et al., 2005; TARDIOLI *et al.*, 2003a,b; TORRES *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2006, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2008; ADRIANO *et al.*, 2008).

2.7.2.1 Quitosana

A quitosana é a forma desacetilada da quitina, o segundo polímero mais abundante na natureza, depois da celulose (GEORGE; ABRAHAM, 2006). É um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. Carapaças de crustáceos são resíduos abundantes da indústria pesqueira, muitas vezes consideradas poluentes. Sua utilização reduz o impacto ambiental causado pelo acúmulo nos locais onde é gerado ou estocado. Este biopolímero possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (KRAJEWSKA, 2004) - hidroxilas estão dispostas na estrutura de ambos os biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos aminos na estrutura da quitosana. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação dos grupos aminos, que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (BERGER *et al.*, 2004). A Figura 2.11 mostra a estrutura química dos biopolímeros quitina, quitosana e celulose.

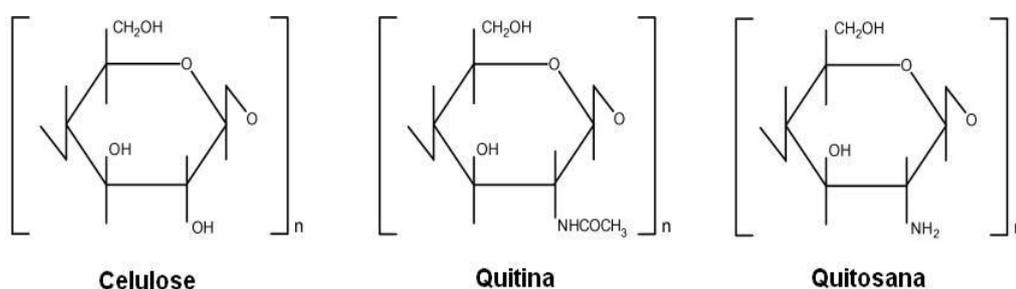


Figura 2.11: Estrutura dos polímeros quitina, quitosana e celulose (BERGER *et al.*, 2004).

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

Na etapa de desacetilação alcalina, parte das ligações N-acetil da quitina são rompidas com formação de unidade de D-glucosamina que contem um grupo amino livre. Entretanto, a quitosana não é uma macromolécula quimicamente uniforme, porque apresenta diferente grau de desacetilação e acima de 30% já podem ser considerados como quitosana, sendo que as aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e tamanho da cadeia polimérica (BERGER *et al.*, 2004). Este biopolímero tem três tipos de grupos reativos funcionais, um grupo amino na posição C-2 e duas hidroxilas, uma primária e outra secundária, nas posições C-3 e C-6, respectivamente (LI; BAI, 2005). É solúvel em diversos ácidos orgânicos e inorgânicos diluídos (KUMAR, 2000).

Devido a propriedades como hidrofiliçidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana, a quitosana apresenta inúmeras possibilidades de aplicação industrial, como na clarificação de sucos, agente emulsificante, agente floculante na purificação de água, formação de filmes biodegradáveis, além de ser usada como fibra dietética em alimentos devido a seu efeito hipocolesterolêmico (ARRUDA, 1999). Além disso, esse polímero reaproveitado do processamento da indústria pesqueira tem sido amplamente investigado como suporte para imobilização de enzimas (BRAUN *et al.*, 1989), mostrando ser a melhor opção dentre muitos suportes testados para imobilização com fim industrial da enzima β -Galactosidase (MARTINO *et al.*, 1996b).

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

A presença de grupos aminos livres na quitosana proporciona maior solubilidade e reatividade que a quitina e a celulose (MONTEIRO; AIROLDI, 1999). É atraente economicamente por ser o segundo polímero natural mais abundante (WU *et al.*, 2001).

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

Martino *et al.* (1996b), após explorarem diferentes suportes, otimizaram a quitosana para imobilizar β -galactosidase e utiliza-lá para o melhoramento de vinhos. O método de imobilização foi adsorção, seguindo de entrecruzamento com glutaraldeído. Obtiveram rendimentos de imobilização entre 55 e 85% e aumento de estabilidade térmica de 5 vezes em relação à enzima livre.

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

Cetinus e Oztop (2000) imobilizaram a enzima catalase em filme de quitosana ativado com glutaraldeído e obtiveram a 5°C um aumento de estabilidade térmica de apenas 1,4 vezes em relação a enzima em sua forma solúvel.

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

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

Os exemplos citados sugerem que, apesar da quitosana ser muito explorada como suportes para imobilizar enzimas, ainda não foram alcançados altos rendimentos de imobilização e altos valores de estabilização térmica. Apesar disso, é fundamental que se continue com a exploração deste material e o aperfeiçoamento dos métodos de imobilização de enzimas em quitosana, visto que é um material de baixo custo.

2.7.2.2 - Agarose

Agarose é um polímero de galactose, cujas unidades básicas são cadeias de agarobiose (Figura 2.12), onde se alternam estruturas de β -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, unidas por ligações 1,3 e 1,4. As unidades básicas de agarobiose se repetem formando cadeias com aproximadamente 400 unidades de agarobiose (massa molecular em torno de 120.000 Da) (KENNEDY; CABRAL, 1987)

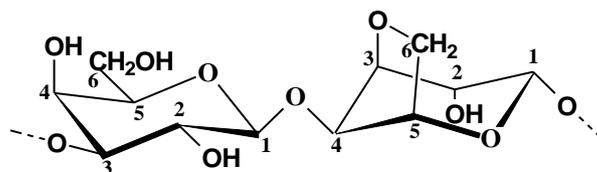


Figura 2.12 – Representação da agarobiose, as unidades básicas da agarose (KENNEDY; CABRAL, 1987).

Na gelificação, as cadeias de agarobiose, que em solução estão em forma de espiral desordenada, adquirem a forma de dupla hélice (Figura 2.13a), que por sua vez agregam-se para formarem uma estrutura tridimensional de tubos helicoidais capazes de reter líquidos. A capacidade de gelificação deve-se a formação de pontes de hidrogênio. A agarose quando gelificada forma géis com uma estrutura altamente porosa (Figura 2.13b) e com grande área superficial (por exemplo, a agarose 6% tem uma área superficial de $25 \text{ m}^2/\text{mL}_{\text{gel}}$ e a agarose 10% uma área de $66 \text{ m}^2/\text{mL}_{\text{gel}}$) (GUISÁN; BLANCO, 1987; PEDROCHE *et al.*, 2002).

A agarose é uma mistura de moléculas de ágar com um conteúdo menor de cargas e, portanto, com maior capacidade de gelificação e com as seguintes propriedades: (i) pouca quantidade de grupos eletronegativos (fundamentalmente sulfatos e ácido pirúvico) resultando num polissacarídeo bastante inerte e adequado para técnicas cromatográficas; (ii) fácil dissolução aquosa; (iii) excelente transparência óptica tanto nas regiões de espectro visível quanto na região do ultravioleta, que permite uma melhor quantificação por técnicas espectrofotométricas; (iv) estrutura macroporosa, na qual é possível variar o tamanho do poro; (v) fácil ativação e derivatização do suporte e (vi) ausência de toxicidade (MATEO *et al.*, 2006).

A baixa resistência da agarose a altas temperaturas pode ser superada pelo entrecruzamento entre as moléculas do polímero com epícloridrina. Altos graus de entrecruzamento implicam maior resistência mecânica e redução do tamanho dos poros. É um dos suportes mais utilizados na imobilização de enzimas. Diversas publicações relatadas na literatura mostram a aplicação

deste suporte para a imobilização multipontual de enzimas de diversas procedências (GUISÁN, 1988; BLANCO; GUISÁN, 1988; ALVARO *et al.*, 1990; FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1995; TARDIOLI *et al.*, 2003a,b; PALOMO *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2008).

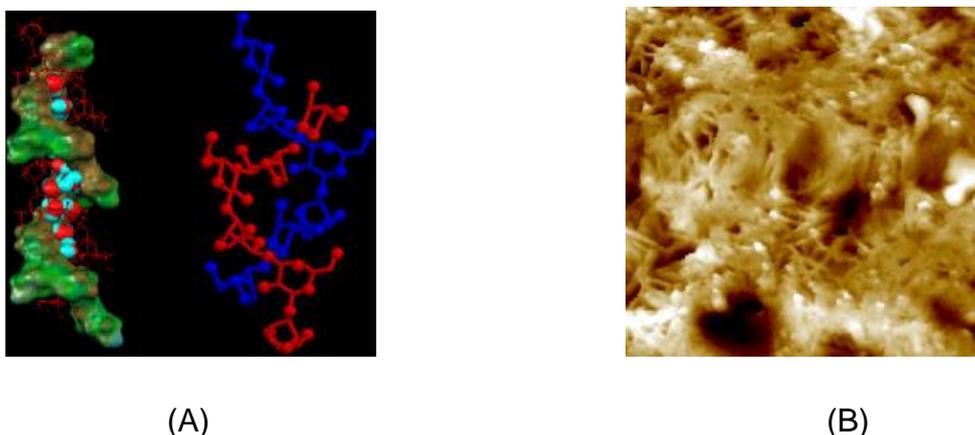


Figura 2.13. (A) estrutura em dupla hélice das cadeias de agarobiose e (B) estrutura porosa da agarose gelificada (TARDIOLI, 2003).

2.7.3 Parâmetros de imobilização

Quando se investiga uma nova metodologia para imobilização de enzimas, diversos parâmetros devem ser avaliados. Dentre eles merecem destaque, o rendimento de imobilização, definido como a razão entre a atividade oferecida ao suporte e a atividade desaparecida do sobrenadante; a atividade da enzima imobilizada (atividade do derivado); a atividade recuperada (razão entre a atividade medida no derivado e a atividade teoricamente imobilizada); e o fator de estabilidade (relação entre a meia-vida da enzima imobilizada e da enzima livre).

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

Efeitos conformacionais: a conformação tridimensional da molécula de enzima pode ser modificada durante o processo de imobilização, ocasionando

a alteração dos valores dos parâmetros cinéticos da enzima imobilizada. Este efeito nem sempre pode ser evitado, e, portanto, é característico de cada sistema enzima-suporte. Os parâmetros cinéticos da enzima imobilizada, na ausência de efeitos eletrostáticos e difusionais, são denominados parâmetros inerentes.

Efeitos eletrostáticos e de partição: a concentração de espécies químicas importantes (íons H⁺, moléculas de substrato, e moléculas de produto) no microambiente da enzima imobilizada pode ser diferente da concentração no “bulk” devido a propriedades físico-químicas do suporte.

Efeitos difusionais: a cinética observada da enzima imobilizada pode não estar sendo governada apenas por interações entre enzima e substrato, mas também pela taxa de difusão do substrato à superfície do suporte, e/ou pela taxa de difusão no interior dos poros do suporte. Nesse caso, a concentração real de substrato que está em equilíbrio com a enzima imobilizada (sistema heterogêneo) é menor que aquela que haveria caso substrato e catalisador fossem solúveis (sistema homogêneo). Em consequência, a velocidade de reação com enzima imobilizada (velocidade real, aparente ou observada) é menor que aquela que se obteria para a mesma concentração de reagente no “bulk” (BLANCH; CLARCK, 1997).

Os efeitos eletrostáticos e difusionais, apesar de influenciarem muito os parâmetros observados da enzima, podem ser calculados ao se aplicar princípios básicos de engenharia de reações químicas que, ao serem solucionados, permitirão a determinação dos parâmetros cinéticos inerentes da enzima imobilizada, que podem ou não serem iguais aos intrínsecos, dependendo da existência ou não de efeitos conformacionais e eletrostáticos.

2.7.4 – Imobilização de β -glicosidase

A enzima β -glicosidase tem recebido grande atenção devido à sua grande importância em processos biotecnológicos. Entre as possíveis aplicações de β -glicosidase, a principal delas pode ser a sua utilização em processos de hidrólise enzimática da celulose.

A biomassa lignocelulolítica, que inclui os resíduos agrícolas, resíduos de papel e aparas de madeira, tem baixo custo, é renovável, é o biopolímero mais abundante na Terra (VIEIRA *et al.*, 2011).

A hidrólise enzimática da celulose tem sido um tema de importante interesse científico desde 1950 (VIEIRA *et al.*, 2011). Encontram-se na literatura vários trabalhos com diferentes métodos de imobilização de β -glicosidase, como descritos a seguir.

Vieira *et al.* (2011), imobilizaram β -glicosidase de *Aspergillus niger* em agarose derivatizada com diferentes grupos reativos (polietilenoimina, glioxil e amino-epoxi), visando otimizar a estabilidade e atividade da enzima imobilizada. Para as imobilizações por adsorção foram obtidos derivados ativos e com estabilidade térmica 7 vezes maior que aquela da enzima solúvel. Já para as imobilizações por ligações covalentes em glioxil-agarose os derivados não apresentaram boa atividade, pois a superfície da enzima contém poucos resíduos de lisinas.

O melhor resultado obtido foi para a imobilização de β -glicosidase em amino-epoxi, obtendo um derivado com recuperação de 80% da atividade e 200 vezes mais estável que a enzima solúvel.

Synowiecki e Wolosowska (2006) imobilizaram β -glicosidase de *Sulfolobus shibatae* em sílica gel modificada ou não modificada com 3-aminopropil-trietoxisilano usando a enzima transglutaminase para catalisar a ligação covalente entre enzima e suporte. Obtiveram um derivado com atividade de 3.883 U/g. O maior rendimento de imobilização da enzima (em torno de 100% com 100 min) foi obtida em pH 5,0.

Calsavara *et al.* (2001), imobilizaram covalentemente β -glicosidase de *Aspergillus niger* em sílica-glutaraldeído obtendo 67% e 13,7% de rendimento de imobilização em termos de proteína e atividade, respectivamente. A enzima imobilizada era aproximadamente 17 vezes mais estável que a enzima solúvel (meias-vidas a 60°C de 14,1h e 245h para enzima solúvel e imobilizada, respectivamente).

A Tabela 2.3 lista outros estudos de imobilização de β -glicosidase encontrados na literatura.

Tabela 2.3: Imobilização de β -glicosidase, BG (dados compilados da literatura).

Enzima	Suporte	Método	Atividade Derivado	Rendimento de imobilização	$t_{1/2}$	Referência
BG de amêndoas (Sigma)	Laponite®, Kunipia®	Adsorção	4,08 U _{pNPG} /g 2,3 U _{pNPG} /g	91% 85%	n.d.	Serefoglou <i>et al.</i> , 2008
BG de amêndoas (Sigma)	Quitosana	Covalente	n.d.	n.d.	9,5min a 70°C	Chang <i>et al.</i> , 2008
BG de <i>Aspergillus niger</i>	Eupergit C	Covalente	3,5 U _{pNPG} /g	30%	10h a 65°C	Tu <i>et al.</i> , 2006
Cytolase PCL 5 (Genencor)	Quitosana	Covalente	854 U _{pNPG} /g	85,4%	>80 dias a pH 3,5 e 25°C	Martino <i>et al.</i> , 1996 b
Cytolase PCL 5 (Genencor)	Alumina Celulose Quitosana	Adsorção e Covalente	8 U _{pNPG} /g 53 U _{pNPG} /g 500 U _{pNPG} /g	15% 18% 80%	24h a 25°C, pH 3,5 80h a 25°C, pH 6,0	Martino <i>et al.</i> , 1996 a

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1- Suportes

Agarose 6B-CL foi adquirida comercialmente da GE Healthcare (Uppsala, Sweden); quitosana em pó com grau de desacetilação de 85,2% adquirida de Polymar Ind. Ltda (Fortaleza-CE, Brasil) e Immobeads IB-D152 (matriz poliacrílica funcionalizada com grupos carboxílicos – carboxil-poliacrílica) adquirida comercialmente de ChiralVision (Leiden, Holanda).

3.1.2- Enzima

As enzimas utilizadas neste trabalho foram Accellerase BG (celobiase de *Trichoderma reesei*) e Accellerase 1500 (celulase), gentilmente doadas pela Genencor (Rochester, EUA).

3.1.3- Agentes ativantes

Glutaraldeído 25% (v/v) comercializado pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil); glicidol (2,3-epoxi-1-propanol 96%) adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich, Inc. (EUA); etilenodiamina (EDA) comercializado pela Nuclear (São Paulo, Brasil); N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) adquirido comercialmente da Sigma Chem. Co. (St. Louis, EUA).

3.1.4- Substrato

Os substratos utilizados neste trabalho foram D-(+)-celbiose adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich (EUA) e bagaço de cana-de-açúcar doado pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Pirassicaba, SP, Brasil).

3.1.5- Reagentes para análise de proteínas e teor de glicose

Azul brilhante de Coomassie G 250 (Merck, Alemanha), ácido ortofosfórico 85% (Vetec, São Paulo, Brasil), reativo enzimático GOD-PAD para determinação de glicose (Wiener lab., Rosario, Argentina).

Os demais reagentes empregados foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1- Preparação de suportes para imobilização

3.2.1.1 – Preparação de gel glioxil-agarose

O suporte glioxil-agarose foi preparado por eterificação da agarose com glicidol e posterior oxidação com periodato de sódio, de acordo com a metodologia de Guisán (1988). A agarose comercial foi lavada abundantemente com água destilada e seca por sucção a vácuo para a remoção de etanol. Em seguida adicionou-se 6 ml de água destilada em 20 g de agarose e manteve-se a suspensão sob suave agitação mecânica em banho de gelo. Em seguida, 9,52 mL de uma solução a frio de NaOH 1,7 N contendo 0,2714 g de borohidreto de sódio, foi adicionada à suspensão de agarose sob agitação em banho de gelo. Gotejou-se lentamente 6,86 mL de glicidol e manteve-se a suspensão sob suave agitação em recipiente aberto por 12 a 15 h. O suporte eterificado (gliceril-agarose) foi lavado com água destilada

até pH neutro, seco por sucção a vácuo, e suspenso novamente em água destilada na razão $V_{\text{suporte}}/V_{\text{suspensão}}$ igual a 1/10. Para 20 g de suporte foram adicionados 0,7704 g de periodato de sódio. Após 2 h de suave agitação à temperatura ambiente, o suporte glioxil-agarose foi finalmente lavado com água destilada, seco por sucção a vácuo e estocado a 4°C.

A concentração de grupos aldeídos presentes na superfície do gel de agarose ativado foi determinada indiretamente pela medida de periodato de sódio não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril, segundo adaptação da metodologia de Pereira (1996), descrita a seguir.

O periodato (IO_4^-) não consumido na reação de oxidação dos grupos gliceril (álcoois) reage com o iodeto (I^-) em excesso, gerando iodo na forma do íon (I_3^-) de acordo com a reação $\text{IO}_4^- + 5\text{I}^- + 6\text{H}_3\text{O}^+ \leftrightarrow 3\text{I}_3^- + 12\text{H}_2\text{O}$. O íon tri-iodeto gerado é quantificado por colorimetria. É necessário iodeto em excesso para gerar o íon tri-iodeto, pois o iodo na forma I_2 é muito volátil.

Em solução ácida há perda de iodo por volatilização, devido à oxidação de iodeto por oxigênio atmosférico. Assim, a quantificação de periodato de sódio não consumido é realizada em meio contendo bicarbonato de sódio, pois a oxidação atmosférica de iodeto é desprezível em solução neutra (VOGEL, 1981).

Em uma cubeta de vidro contendo 3 mL de uma solução 1:1 (v/v) de iodeto de potássio saturado e bicarbonato de sódio saturado foram adicionados 100 μL de uma solução aquosa de periodato, preparada nas mesmas condições da suspensão do gel gliceril-agarose. Em um espectrofotômetro fez-se uma varredura de comprimentos de onda, escolhendo-se aquele que fornecesse uma absorvância mais ou menos entre 0,7 e 0,8. Uma amostra de 100 μL do sobrenadante final da oxidação foi posteriormente adicionada a 3 mL da solução 1:1 descrita acima, correspondendo o decréscimo na absorvância à porcentagem de grupos aldeídos formada.

A absorvância inicial da solução de periodato correspondia a 100% do periodato não consumido. Após 2 h de reação, a absorvância do sobrenadante final da oxidação, nas condições descritas acima, media entre 0,1 e 0,2 (em

média 75 % de periodato consumido). Portanto, como a reação de oxidação de grupos gliceril (álcoois) a aldeídos é equimolar, o total de periodato consumido é igual ao total de grupos aldeídos formado no suporte.

As reações envolvidas na ativação da agarose com grupos glioxil são esquematizadas na Figura 3.1.

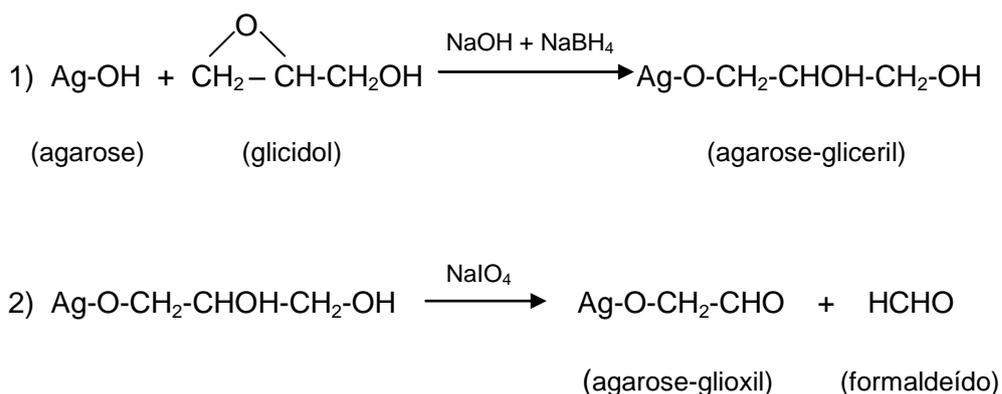


Figura 3.1 – Reações envolvidas na obtenção do gel glioxil-agarose (Adptação de Guisán, 1988, p. 376).

3.2.1.2 – Preparação do gel MANAE-Agarose

O suporte glioxil-agarose é aminado com etilenodiamina, de acordo com a metodologia de Fernández-Lafuente *et al.* (1993). Para cada grama de suporte adicionou-se 4 mL de uma solução de etilenodiamina 2 M, pH 10 (preparado previamente a frio) e após agitação suave por 2 h à temperatura ambiente adicionou-se 0,0571 g de borohidreto de sódio e agitou-se por mais 2 h. O suporte MANAE-agarose (mono-amino-N-aminoetil-agarose) foi lavado com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4, para a remoção do borohidreto residual, e tampão borato de sódio 100 mM, pH 9, para desprotonar os grupos aminos, e água destilada em abundância.

A Figura 3.2 mostra esquematicamente as reações envolvidas na preparação do gel MANAE-agarose.

tratamento com etanol, seguido de lavagem com água destilada em abundância.

3.2.2 - Aminoação química da BG comercial (Accellerase BG)

BG solúvel foi adicionada a uma solução de etilenodiamina (EDA) 1M, pH 4,75 na proporção (1:10), contendo 10 mM de EDAC (N-etil-N-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida). Essas condições permitem uma completa modificação dos grupos carboxílicos da superfície da proteína. Após o reajuste do pH para 4,75, a solução foi agitada por 2 horas e em seguida EDA e EDAC em excesso foram eliminados por ultrafiltração em membrana de celulose de 30 kDa (AMICON ULTRA 15 DA da Millipore) em uma centrífuga Eppendorf modelo 5810R operada a 10.000 rpm por 20 min a 4°C. Este procedimento era repetido três vezes completando-se o volume com água milli-Q.

3.2.3 – Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Albumina bovina cristalina (BSA) foi usada como padrão para construir a curva de calibração na faixa de 0 a 0,6 mg/mL.

3.2.4 – Medida de atividade enzimática

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados de acordo com a metodologia desenvolvida por Ghose, 1987. Brevemente, 1 mL de solução enzimática ou suspensão do derivado (enzima imobilizada suspensa em suspensão em 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8) era adicionado a 1 mL de solução de celobiose 15 mM, preparada em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. O meio reacional era mantido a 50°C por 15 minutos sob agitação. Uma alíquota de 50 µL da solução (ou sobrenadante, no caso da

enzima imobilizada) era adicionada a 1 mL do reagente GOD-POD e mantidos por 5 minutos a 37°C. Glicose era quantificada espectrofotometricamente a 505 nm utilizando espectrofotômetro Genesy 10uV Scanning (Thermo Scientific) e cubetas de vidro de 1 cm de caminho ótico.

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa o consumo de 1 μ mol de celobiose por minuto nas condições ensaiadas.

3.2.5 – Imobilização de BG em suportes sólidos insolúveis

3.2.5.1 - Imobilização de BG em glioxil-agarose

A imobilização da BG em glioxil-agarose foi realizada a 25°C, pH 9,0 e 10,0 (em tampão bicarbonato de sódio 100 mM); a concentração de proteína foi de 5 mg_{proteína}/g_{gel} a fim de se evitar efeitos difusionais intra-partícula. Uma alíquota de 1 mL do meio reacional contendo tampão de imobilização e enzima foi retirada para medida de atividade inicial (branco de imobilização). A suspensão de imobilização (suporte e solução enzimática na relação 1:10, m/v) foi mantida sob suave agitação durante 24, 48, 72 e 96 horas. A atividade e a concentração de proteína no sobrenadante foram monitoradas ao longo do tempo até atingir o equilíbrio de imobilização. O encerramento da reação deu-se com a redução do derivado com borohidreto de sódio (1 mg/mL_{suspensão}, 30 min, 25°C), filtração, lavagem com água destilada e secagem por sucção a vácuo.

3.2.5.2 - Imobilização de BG em MANAE-agarose

A imobilização de BG em MANAE-agarose foi realizada a 25°C e pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM); a carga protéica oferecida foi de 5 mg_{proteína}/g_{gel} a fim de evitar efeitos difusivos intra-partícula. Uma alíquota de 1 mL da solução enzimática foi retirada para medida de atividade inicial (branco

de imobilização). A suspensão enzimática (suporte e solução enzimática na relação 1:10, m/v) foi mantida sob suave agitação a 25°C. A atividade e a concentração de proteína no sobrenadante foram monitoradas ao longo do tempo até atingir o equilíbrio de imobilização. Filtrou-se a suspensão a vácuo e lavou-se abundantemente o derivado com água destilada.

3.2.5.3 - Imobilização em Matriz Poliacrílica

Após o tratamento da resina como descrito no item 3.2.1.4, pesou-se 1 g do suporte e adicionou-se 10 mL de solução enzimática preparada em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) a partir da enzima comercial (1156 U/mL e 35 mg_{proteína}/mL).

A suspensão de imobilização foi mantida sob suave agitação a 25°C até que o equilíbrio da adsorção foi atingido. Durante a imobilização, atividade enzimática e concentração de proteína foram monitoradas no sobrenadante da suspensão. Atingido o equilíbrio da adsorção, filtrou a suspensão a vácuo e lavou-se a enzima imobilizada com água destilada.

3.2.5.4 - Imobilização de BG em quitosana-glutaraldeído

A imobilização de BG em quitosana-glutaraldeído foi realizada a 25°C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM); a carga protéica oferecida foi de 5 mg_{proteína}/g_{suporte} a fim de se evitar efeitos difusivos intra-partícula. Mediu-se a atividade inicial da solução enzimática (branco de imobilização), suspendeu-se o suporte na solução enzimática na relação 1:10 (m/v) e manteve-se sob suave agitação. Atividade enzimática e concentração de proteína no sobrenadante foram monitoradas ao longo do tempo até atingir o equilíbrio de imobilização. Ao final, filtrou-se a suspensão a vácuo e lavou-se a enzima imobilizada abundantemente com água destilada.

3.2.6 – Caracterização de BG solúvel e imobilizada

3.2.6.1 - Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica de BG solúvel e imobilizada foi determinada a 65°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM). A atividade enzimática residual da solução enzimática (BG solúvel) e da suspensão da enzima imobilizada foi medida ao longo do tempo em intervalos regulares até inativação total da enzima, conforme protocolo descrito em 3.2.4. O modelo de inativação térmica de Sadana e Henley (1987), Equação (3.1), foi ajustado aos dados experimentais de atividade relativa em função do tempo a fim de se estimar a meia-vida do biocatalisador ($t_{1/2}$, tempo necessário para inativação de 50% da atividade inicial), Equação (3.2), e a constante de inativação térmica de 1ª ordem (k_d).

$$A_R = (1 - \alpha) \cdot e^{-k_d \cdot t} + \alpha \quad (3.1)$$

Em que: A_R é a atividade relativa (A/A_0); α é a razão entre a atividade enzimática final (A) e inicial (A_0); k_d é a constante de inativação térmica de 1ª ordem (h^{-1}) e t é o tempo de incubação da solução enzimática, em horas.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{k_d \cdot (1 - \alpha)} \quad (3.2)$$

Em que: $t_{1/2}$ é a meia-vida da enzima, em horas.

3.2.6.2 - Estabilidade de BG solúvel frente ao pH

Soluções de BG solúvel foram incubadas a 25°C em diferentes valores de pH (na faixa de 4,8 a 10). As atividades residuais foram medidas ao longo do tempo como descrito no item 3.2.4.

3.2.7. Cálculo dos Parâmetros de Imobilização

3.2.7.1. Rendimento de Imobilização em termos de Proteína

A porcentagem de proteína imobilizada (PI) foi calculada de acordo com a Equação (3.3):

$$PI (\%) = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100 \quad (3.3)$$

Em que: *PI* é a porcentagem de proteína imobilizada; P_0 é a concentração de proteína (em mg/mL) no sobredante inicial da imobilização, ou seja, concentração de proteína da solução enzimática inicial (branco de imobilização), corrigida pela diluição da solução devido à água presente no suporte; P_f é a concentração de proteína (em mg/mL) medida no sobrenadante ao final da imobilização.

3.2.7.2. Rendimento de Imobilização em termos de Atividade

O rendimento de imobilização (RI) em termos de atividade enzimática foi calculado pela Equação (3.4):

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

Em que: *RI* é o rendimento de imobilização; U_0 é a atividade da solução enzimática (branco de imobilização) medida no final da imobilização, expressa em U/g_{suporte} ; U_f é a atividade do sobrenadante final da imobilização (expressa em U/g_{suporte}), corrigida pela diluição do sobrenadante devido à umidade do suporte. U_0 é medida no final da imobilização, pois a enzima solúvel pode inativar-se nas condições de reação (pH, temperatura, força iônica do tampão, presença de inibidores, etc).

3.2.7.3. Atividade Recuperada

A atividade recuperada (AR) foi calculada pela Equação (3.5):

$$AR (\%) = \frac{U_{EI}}{U_I \times RI} \times 100 \quad (3.5)$$

Em que: *AR* é a atividade recuperada (em %); U_{EI} é a atividade aparente da enzima imobilizada (expressa em U/g_{suporte}); U_I é a atividade real oferecida para imobilização (expressa em U/g_{suporte}), calculada pela Equação (3.6):

$$U_I = \frac{U_{ES} \times V_{ES}}{M_S} \quad (3.6)$$

Em que: U_{ES} é a atividade da enzima solúvel (U/mL) medida nas condições descritas em 3.2.4; V_{ES} é o volume (mL) de enzima oferecida para imobilização; M_S é a massa (em g) de suporte usado na imobilizada.

3.2.7.4. Fator de Estabilidade

O fator de estabilidade (FE) foi calculado pela relação entre as meias-vidas da BG imobilizada e solúvel (Equação 3.7), estimadas a 65°C conforme descrito no item 3.2.6.1.

$$FE = \frac{t_{1/2,EI}}{t_{1/2,ES}} \quad (3.7)$$

Em que: *FE* é o fator de estabilidade; $t_{1/2,ES}$ é a meia-vida da BG solúvel e $t_{1/2,EI}$ é a meia-vida da BG imobilizada.

3.2.8 – Ensaio de hidrólise

3.2.8.1 Hidrólise de celobiose catalisada por BG solúvel e imobilizada

Hidrólises de celobiose 25 g/L foram realizadas a 50°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), mantendo-se agitação constante. Em todos os ensaios foram utilizadas cargas enzimáticas de 56,7 U/g_{celobiose}.

Ao longo do tempo foram retiradas alíquotas do meio reacional para dosagem de glicose por GOD-POD, como descrito no item 3.2.4.

3.2.8.2 - Hidrólise de bagaço de cana pré-tratado

Bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com solução de H₂SO₄ 1% (v/v) na razão sólido/líquido de 20:1. Após autoclavagem a 120°C por 30 min, o bagaço foi tratado com NaOH 4% (m/v) de acordo com Carvalho (2010), lavado com tampão citrato 50 mM, pH 4,8, para ajuste de pH, seco por sucção a vácuo. A umidade do bagaço pré-tratado foi determinada a priori das reações de hidrólises.

Bagaço de cana pré-tratado (10% m/v, base seca) foi hidrolisado a 50°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), utilizando celulase solúvel (Genencor Acellerase 1500) nas relações enzima/substrato de 20 e 40 FPU/g_{celulose}. Hidrólises nas mesmas condições foram realizadas suplementando o meio reacional com BG imobilizada (BG-GA e BG-MP) na relação enzima/substrato de 120 U/g_{celulose}. Ao longo da reação foram retiradas alíquotas do meio reacional para dosagem de glicose por GOD-POD, como descrito no item 3.2.4.

Cinco bateladas de hidrólises de bagaço de cana pré-tratado a 50°C, pH 4,8, foram realizadas com o reaproveitamento de BG imobilizada e bagaço não-convertido. O resíduo sólido (bagaço não convertido e BG imobilizada) do final de uma batelada, após lavagem com água destilada, era transferido para a batelada seguinte, contendo celulase solúvel e bagaço “fresco” em quantidade

adequada para um total de 10% m/v, base seca. Glicose formada após 24 horas de reação era quantificada pelo método de GOD-POD, como descrito em 3.2.4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes metodologias de imobilização de enzimas têm sido estudadas por diversos grupos de pesquisa em todo mundo, dentre eles o grupo de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar.

Neste trabalho foram investigadas diferentes estratégias para imobilização de β -glicosidase (BG) de *Trichoderma reesei* geneticamente modificado, gentilmente doada pela Genencor. De acordo com Barnett *et al.* (1991), esta enzima contém 745 resíduos de aminoácidos, dentre eles 42 resíduos de ácido aspártico, 17 resíduos de ácido glutâmico e 25 resíduos de lisina, os quais poderiam reagir com grupos reativos nos suportes selecionados nesta pesquisa.

As enzimas imobilizadas foram caracterizadas quanto a sua estabilidade térmica a 65°C e usadas em reações de hidrólise de celobiose a 50°C, pH 4,8. Hidrólises de bagaço de cana a 50°C, pH 4,8, catalisadas por celulase solúvel e BG imobilizadas foram realizadas a fim de se verificar a necessidade de suplementação dos preparados celulolíticos comerciais com BG.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nesta pesquisa.

4.1 Caracterização de BG quanto a sua estabilidade ao pH

Para se escolher um método de imobilização adequado é fundamental saber se a enzima sofre inativação nas condições do processo (temperatura, pH, etc.).

Segundo Barnett *et al.* (1991), BG de *Trichoderma reesei* é uma enzima termoestável, portanto, como as imobilizações foram realizadas a 25°C, foi investigada neste trabalho somente sua estabilidade frente ao pH de imobilização.

Neste trabalho houve a necessidade de modificar quimicamente (aminação) a superfície da BG a fim de permitir sua imobilização em glioxil-

agarose. Assim, houve a necessidade de se conhecer também a estabilidade da enzima aminada quanto ao pH.

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram os perfis de inativação de BG comercial e quimicamente modificada (aminada), respectivamente, a 25°C, na faixa de pH 4,8 a 10,0.

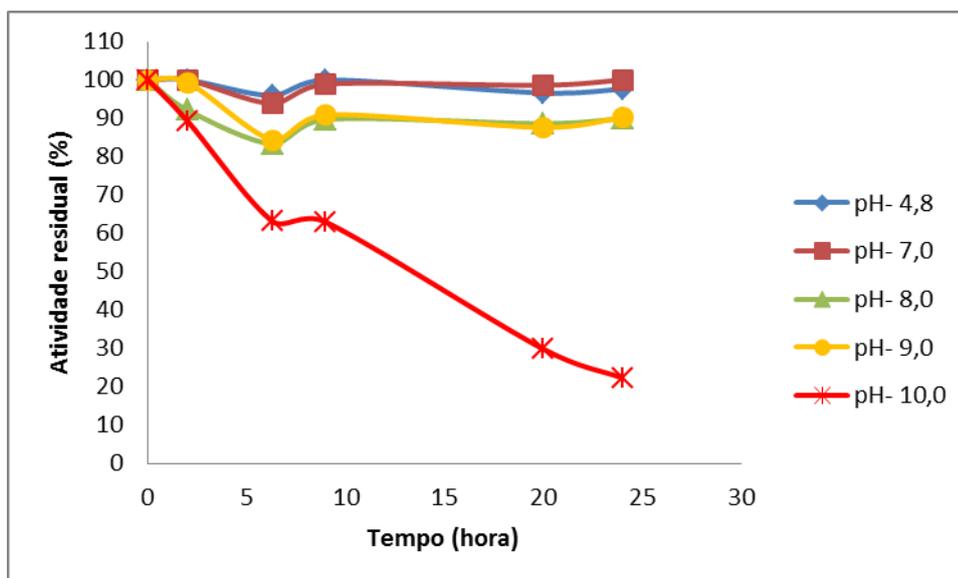


Figura 4.1 Perfis de inativação a 25°C de BG comercial em diferentes valores de pH.

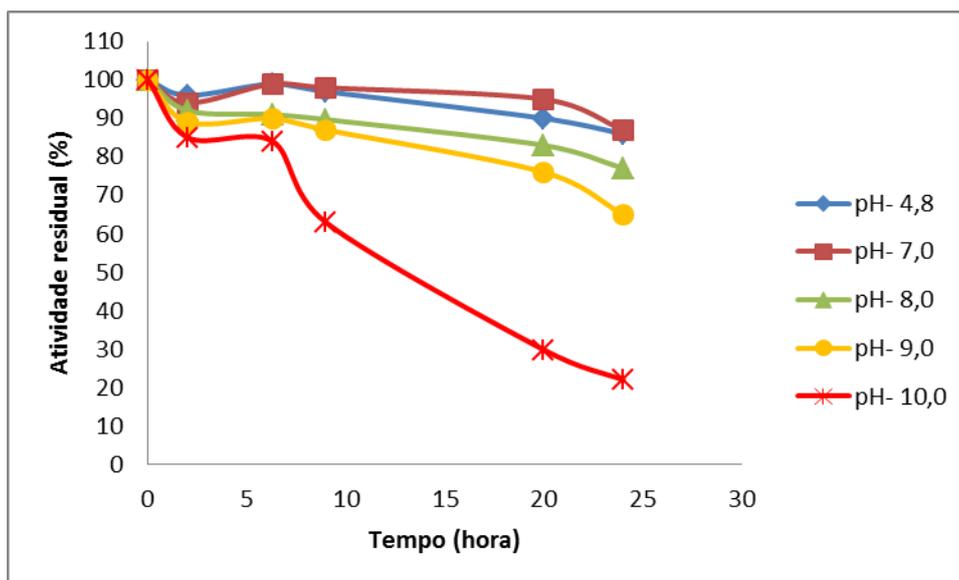


Figura 4.2 Perfis de inativação a 25°C de BG quimicamente modificada (aminada) em diferentes valores de pH.

Observou-se que a BG comercial e aminada apresentam perfis de inativação semelhantes, não sofrendo inativação significativa na faixa de pH entre 4,8 a 9,0, pelo menos no intervalo de tempo ensaiado. Entretanto, a pH 10, condição necessária para imobilização covalente multipontual em glioxil-agarose, há inativação quase total da enzima em 24 horas, tempo mínimo necessário para se obter derivados de BG mais estáveis que a enzima solúvel, pelo menos nas condições testados neste trabalho. Portanto, um método que exige pH 10,0 para uma eficiente imobilização de BG não é adequado visto que se observa grande perda de atividade nesta condição.

4.2 Caracterização de BG comercial quanto a sua pureza

As impurezas presentes na BG comercial (Acellerase BG da Genencor) utilizada neste trabalho foram identificadas por cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SE-HPLC) utilizando coluna Superdex 200 (GE Healthcare) e tampão fosfato de sódio 20 mM-NaCl 0,25 M, pH 7,2 como fase móvel. As frações eluídas em diferentes tempos foram investigadas quanto à atividade enzimática de acordo com metodologia descrita em 3.2.4. O cromatograma obtido para a BG comercial é mostrado na Figura 4.3.

Observou-se que somente as frações eluídas entre 40 e 65 minutos (F5, F6, F7, F8 e F9) apresentavam atividade enzimática.

A fim de verificar a purificação da enzima, as frações F5-F9 foram reunidas e medidas sua atividade enzimática e concentração de proteínas. O fator de purificação obtido com esta técnica foi de 3,4 (razão entre a atividade específica da enzima parcialmente purificada e comercial).

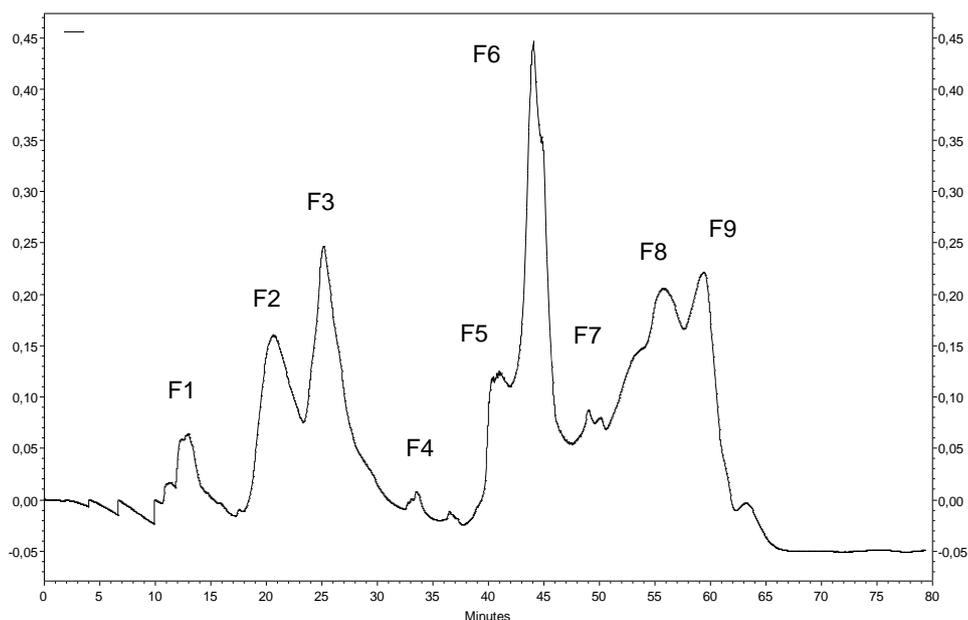


Figura 4.3.: Cromatograma da distribuição de massa molecular das diferentes proteínas presentes no extrato enzimático da Acellerase BG, obtido por SE-HPLC em coluna Superdex 200 (GE Healthcare) e tampão fosfato de sódio 20 mM-NaCl 0,25 M, pH 7,2 como fase móvel.

4.3 Imobilização de BG comercial em diferentes suportes

Neste trabalho foram investigadas diferentes técnicas de imobilização, entre elas imobilização por adsorção e imobilização covalente multipontual, usando diferentes suportes sólidos e diferentes condições reacionais.

4.3.1.- Imobilização de BG em quitosana ativada com glutaraldeído

BG não imobilizou em quitosana ativada com glutaraldeído. Durante um período de 3 horas a concentração de proteínas no sobrenadante da suspensão de imobilização permaneceu constante e igual à concentração inicial.

Dois efeitos em conjunto podem ter contribuído para a não insolubilização da enzima no suporte quitosana-glutaraldeído no curto intervalo de tempo ensaiado (3h de reação): a glicosilação da BG e o pH utilizado.

Glicosilação é a reação entre carboidratos e proteínas. A glicosilação pode ser de dois tipos: N-glicosilação, que é a reação entre oligossacarídeos e N do grupo amida de asparagina em sequências de tripeptídeos Asp-X-Ser/Thr, onde X é qualquer aminoácido; e a O-glicosilação, que é a reação entre oligossacarídeos e hidroxilas de serinas e treoninas (MURRAY *et al.*, 2003)

Por ser a BG uma proteína glicosilada (LYND *et al.*, 2002; EVANS, 1985), podendo atingir um nível de 90% da massa total da enzima, os grupos reativos no suporte, possíveis de reagirem com o glutaraldeído, poderiam estar bloqueados (por efeito estérico) pelas moléculas de oligossacarídeos, dificultando assim a aproximação do reagente entrecruzante.

Glutaraldeído possui uma química reacional muito complexa. Em solução aquosa pode apresentar-se pelo menos sob 13 formas diferentes (dímeros, dímeros cíclicos, trímeros, trímeros bicíclicos, etc.), dependendo do valor do pH. A pH próximo da neutralidade (pH 7,0) glutaraldeído reage rapidamente com proteínas, e essa alta reatividade é baseada na presença de diferentes grupos funcionais reativos nas moléculas de proteínas (em ordem decrescente de reatividade: ϵ -amino, α -amino, guanidínil, aminos secundários, hidroxilas e imidazol) (MIGNEAUTL *et al.*, 2004).

Jansen *et al.* (1971) mostrou que o pH ótimo para insolubilização de proteínas com glutaraldeído varia de proteína para proteína. Usando como modelo BSA (pI = 4,8), inibidor de tripsina de soja (pI = 4,8) , lisozima (pI = 10,5) e papaína (pI = 8,6), os autores encontraram que os valores de pH que dão rápida insolubilização com glutaraldeído situavam-se ao redor do ponto isoelétrico dessas proteínas. Entretanto, a insolubilização de quimotripsina foi mais rápida a pH 6,2 (pI de 8,6). A existência de um pH ótimo sugere o importante papel da carga da proteína no entrecruzamento intermolecular requerido para insolubilização.

BG de *T. reesei* tem ponto isoelétrico ao redor de 8,0 (CHAUVE *et al.*, 2010) e assim, o pH utilizado neste trabalho (pH 7,0) na imobilização da enzima em quitosana-glutaraldeído pode não ter sido adequado para se observar insolubilização em 3h de reação.

4.3.2.- Imobilização de BG em suporte agarose

O estudo da imobilização de BG em agarose foi realizado utilizando duas estratégias diferentes: adsorção em MANAE-agarose e ligação covalente multipontual em glioxil-agarose.

4.3.2.1- Imobilização de BG em suporte MANAE-agarose

O método de imobilização por adsorção em MANAE-agarose foi inicialmente selecionado para imobilização de BG em função da sequência de aminoácidos desta enzima, a qual foi determinada por Barnett *et al.*, 1991. Esta sequência mostra que, dependendo do pH, há um elevado número de cargas negativas na superfície dessa enzima, visto que em sua composição há 42 resíduos de ácido aspártico e 17 resíduos de ácido glutâmico. Portanto, era esperado que ocorresse uma elevada adsorção da BG em suporte positivamente carregado (MANAE-agarose).

As Figuras 4.4 e 4.5 mostram os perfis de imobilização de BG comercial e parcialmente purificada no suporte MANAE-agarose.

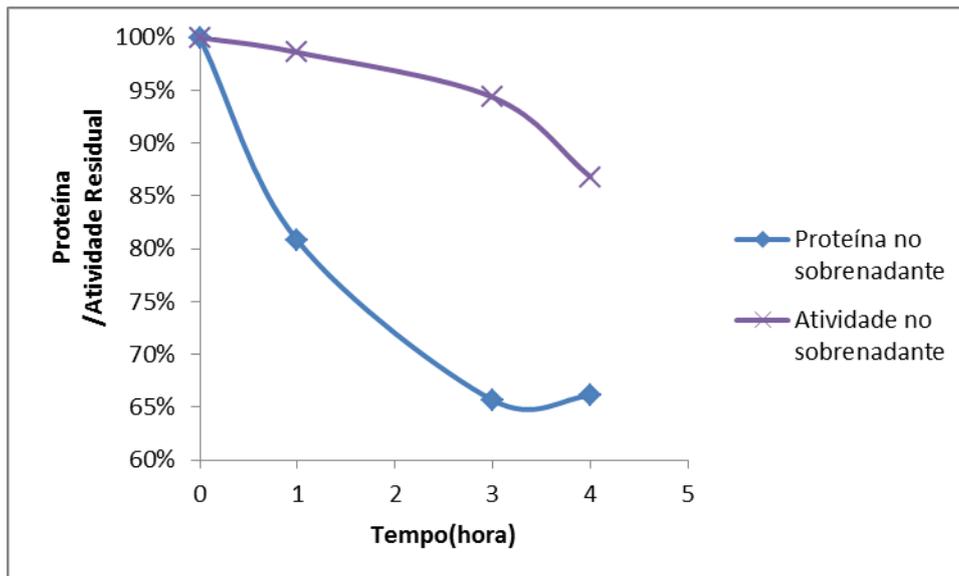


Figura 4.4.: Perfil de imobilização de BG comercial em MANAE-agarose a 25° C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM).

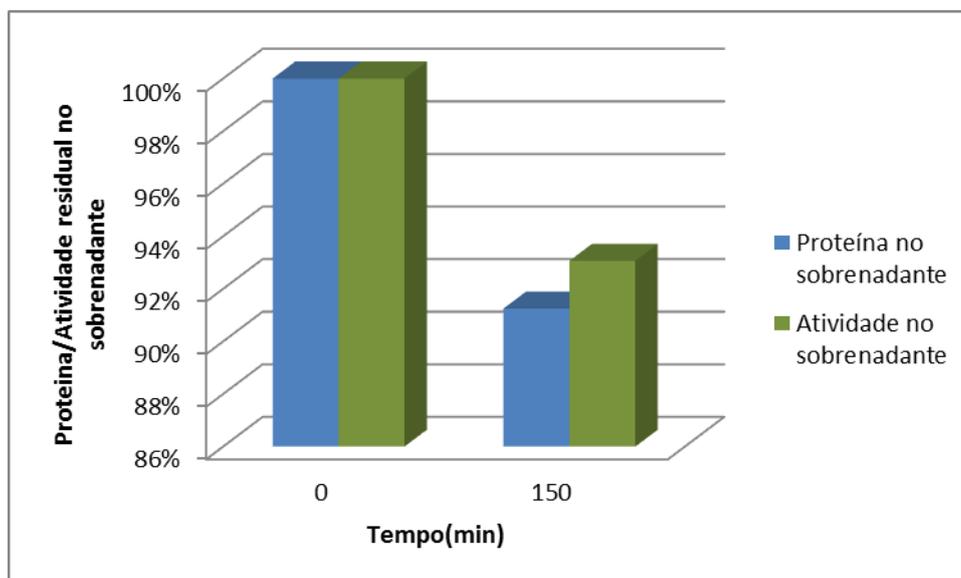


Figura 4.5: Perfil de imobilização de BG parcialmente purificada em MANAE-agarose a 25° C, pH 7,0 (tampão fosfato de sódio 50 mM).

Observa-se na Figura 4.4 que o rendimento de imobilização de BG comercial em MANAE-agarose em termos de proteínas (45%) foi bem maior

que o rendimento de imobilização em termos de atividade (aproximadamente 15%). Imobilização em suportes carregados positivamente requer alta concentração de grupos reativos da enzima carregados negativamente. Um saldo líquido de cargas negativas é esperado em pH acima de 8,0 (pI da BG). Entretanto, a estabilidade da enzima solúvel diminui significativamente em pH alcalino (ver pH 10,0 na Figura 4.1).

A Figura 4.5 mostra que BG parcialmente purificada apresentou também baixos rendimentos de imobilização após 3h min de incubação (9% em termos de proteína e 7% em termos atividade enzimática). O rendimento de imobilização enzimática é semelhante ao obtido com a enzima comercial em 3h de reação. Entretanto, o rendimento de imobilização protéico é significativamente menor. Esse resultado mostra que proteínas contaminantes são mais facilmente imobilizadas em MANAE-agarose do que BG. Assim, mesmo não sendo adequado para imobilização de BG, MANAE-agarose poderia ser utilizado como matriz para purificação da enzima.

Comportamento semelhante é relatado na literatura. Chauve *et al.* (2010) observaram que em pH 7,6 BG de *T. reesei* não imobilizava em matrizes trocadoras de íons. Usando essas matrizes, os autores purificaram a enzima em coluna com alto rendimento coletando a fração não retida na matriz. Leite (2007) testou a purificação de BG de *Aureobasidium pullulans* por cromatografia de troca iônica em diferentes valores de pH (4,0; 5,5 e 7,4). Nos pHs testados não obtiveram nenhuma resolução satisfatória.

Com base na discussão anterior, podemos concluir que a imobilização de BG por adsorção iônica em suportes MANAE-agarose não é eficiente em pHs abaixo do ponto isoelétrico (pH 8,0) pois prevalecerá um saldo líquido de cargas positivas na molécula de proteína. Mesmo BG de *T. reesei* tendo um número elevado de resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico (BARNETT *et al.*, 1991) estes podem estar impedidos estericamente pelas moléculas de oligossacarídeos e/ou estarem espaçadamente distribuídos na superfície da molécula, contribuindo assim para uma baixa velocidade de imobilização. Entretanto, esse suporte poderia ser utilizado para purificação da enzima,

adsorvendo as proteínas contaminantes na matriz e coletando-se a BG em solução.

4.3.2.2.- Imobilização de BG em suporte glioxil-agarose

Para este suporte, primeiramente foram realizados testes de imobilização da enzima comercial. Os resultados mostraram baixo rendimento de imobilização em termos de proteína e atividade.

Para que ocorram ligações covalentes entre enzima (grupos aminos de lisinas) e suporte (grupos aldeídos) é necessário que a molécula de enzima apresente uma região rica em resíduos de lisinas e que os grupos aminos da cadeia lateral desses resíduos de aminoácidos estejam desprotonados (GUISÁN, 1988). Os resíduos de lisinas na molécula de BG (25 resíduos, segundo Barnett *et. al.*, 1991) podem estar espaçadamente distribuídos pela superfície da enzima e, além disso, podem estar estericamente impedidos pelas moléculas de oligossacarídeos. Com essas hipóteses pode-se justificar a baixa velocidade de imobilização de BG em glioxil-agarose, já que a probabilidade de alinhamentos corretos entre grupos aminos desprotonados na molécula de enzima e grupos aldeídos no suporte, necessários para efetivarem uma ligação covalente, seria muito baixa.

A solução para este problema foi alterar quimicamente a superfície da molécula de enzima por aminação com etilenodiamina (EDA). Os grupos aminos inseridos na molécula enzimática apresentam valor de pK igual a 9,2 e, espera-se que haja uma alta concentração destes na molécula enzimática, visto que o EDA se liga aos grupos carboxílicos existentes (59 grupos carboxílicos por molécula enzimática). Além disso, como os grupos aminos inseridos quimicamente possuem pK menor comparado ao dos grupos aminos de lisinas (pK 10,5), a imobilização da BG aminada pode ser realizada em pH que não cause a inativação da enzima.

Os perfis de imobilização e os parâmetros de imobilização de BG aminada em glioxil-agarose são mostrados na Figura 4.6 e Tabela 4.1, respectivamente.

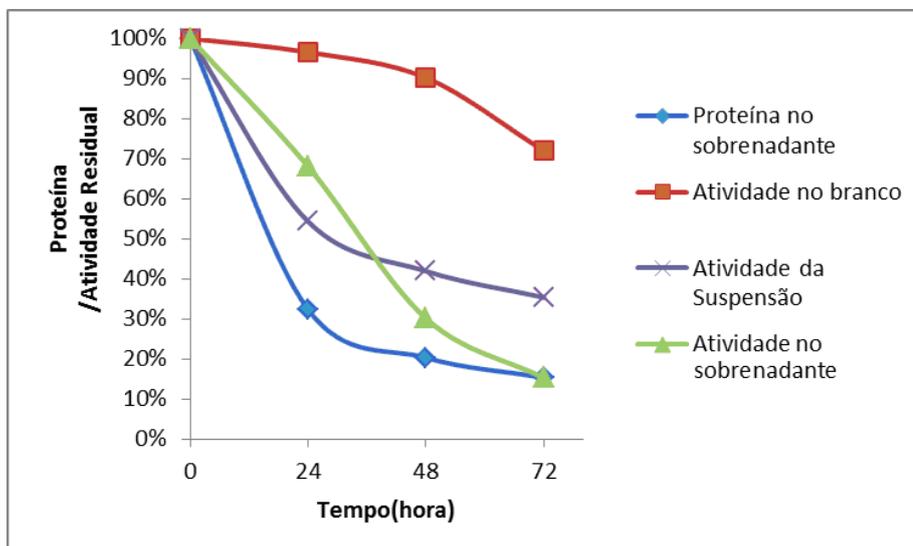


Figura 4.6.: Perfil de imobilização de BG aminada em glioxil-agarose a 25°C, pH 9,0 (tampão bicarbonato de sódio 50mM).

Os resultados apresentados na Figura 4.6 e Tabela 4.1 mostram que o tempo de imobilização é uma variável importante para o rendimento de imobilização. Entretanto, exerce influência negativa na atividade da enzima, pois há inativação pelo pH (enzima solúvel perdeu aproximadamente 30% de atividade em 72 h).

A baixa atividade recuperada dos derivados (5,1% a 11,6%) deve-se, além da inativação da enzima pelo pH, a prováveis efeitos deletérios do borohidreto de sódio na etapa de redução dos derivados. Além disso, a formação de múltiplas ligações covalentes enzima-suporte pode causar mudanças conformacionais na estrutura terciária da molécula da enzima, causando sua inativação. Entretanto, para se obter derivados com grande estabilidade a reação de imobilização deve ser conduzida por tempos prolongados.

Tabela 4.1.: Rendimento de imobilização de BG aminada em termos de proteínas (PI), atividade recuperada (AR) e atividade de derivados BG-GA (BG aminada imobilizada em glioxil-agarose).

	Condições de Imobilização	PI(%)	U_{EI} (U/g_{suporte})	AR(%)
1	pH 9,0; 25°C; 24h	67,7	3,8	11,6
2	pH 9,0; 25°C; 48h	80	3,4	5,6
3	pH 9,0; 25°C; 72h	85	2,6	5,1
4	pH 9,0; 25°C; 24h; Glicose 10mM	67,1	3,8	11,6
5	pH 9,0; 25°C; 48h; Glicose 10mM	83	6,4	14,2
6	pH 9,0; 25°C; 72h; Glicose 10mM	90	7,6	12,4
7	pH 9,0; 25°C; 72h; Glicose 10mM; redução com borohidreto de sódio na presença de glicose 50mM	90	9,0	18,2

PI = Rendimento de imobilização em termos de proteína; U_{EI} = atividade aparente da enzima imobilizada.

A presença de um inibidor competitivo durante o processo de insolubilização/imobilização pode preservar a atividade da enzima imobilizada, pois o mesmo impedirá a formação de ligações covalentes que levem à distorção do sítio ativo da enzima (BLANCO; GUIÁN, 1988; TARDIOLI *et al.*, 2003a) Entretanto, reduzindo-se o número de ligações covalentes poderá haver uma redução na estabilidade da enzima imobilizada.

A Figura 4.7 mostra o perfil de imobilização de BG aminada em suporte glioxil-agarose na presença de um inibidor competitivo (glicose).

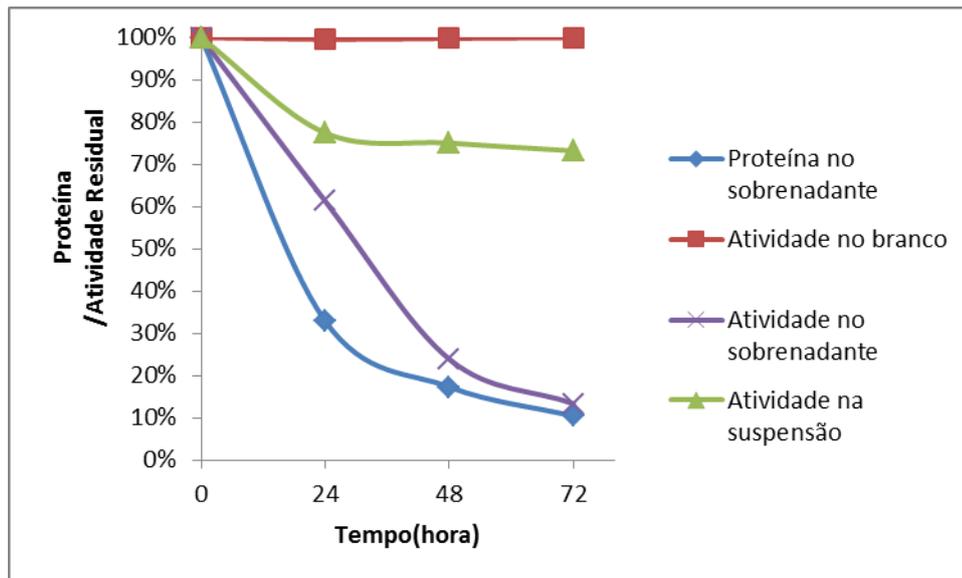


Figura 4.7 Perfil de imobilização de BG aminada em glioxil-agarose a 25°C, pH 9,0, na presença de 10 mM de glicose (inibidor competitivo de BG).

O efeito benéfico da presença de glicose durante o processo de insolubilização/imobilização de BG em glioxil-agarose pode ser facilmente observado comparando-se as Figuras 4.6 e 4.7. Pode-se observar que a velocidade de imobilização não foi afetada pela presença do inibidor (perfis de concentração de proteína no sobrenadante são iguais em ambas as imobilizações). Além disso, a presença de glicose durante a imobilização (10 mM) contribuiu significativamente para a preservação da atividade da BG; a enzima solúvel manteve-se totalmente ativa durante 72h em pH 9,0, e a recuperação da atividade total na suspensão (enzima no sobrenadante + enzima imobilizada) foi de 70% na presença de glicose, enquanto na sua ausência era somente em torno de 15%.

Embora a presença de glicose tenha sido muito eficaz na preservação da atividade durante o processo de imobilização, durante a etapa de redução com borohidreto de sódio, mesmo com uma concentração cinco vezes maior (50 mM), seu efeito foi praticamente desprezível (ver Tabela 4.1). Derivados com recuperação de atividade de 12 a 18% foram obtidos, o que corrobora com a hipótese de que o borohidreto de sódio exerce efeito deletério sobre a atividade da BG. Agentes redutores menos agressivos (por exemplo,

cianoborohidreto de sódio) poderiam permitir a preparação de derivados mais ativos.

4.3.3- Imobilização de BG em Resina Poliacrílica funcionalizada com Grupos Carboxílicos (Immobeads IB-D152 da ChiralVision)

O perfil de imobilização de BG comercial em resina poliacrílica ativada com grupos carboxílicos (resina carboxil-poliacrílica), que se dá por adsorção iônica entre os grupos negativos do suporte (grupos carboxílicos) e os grupos positivos da enzima (cadeias laterais de resíduos de aminoácidos carregadas positivamente), é apresentado na Figura 4.8.

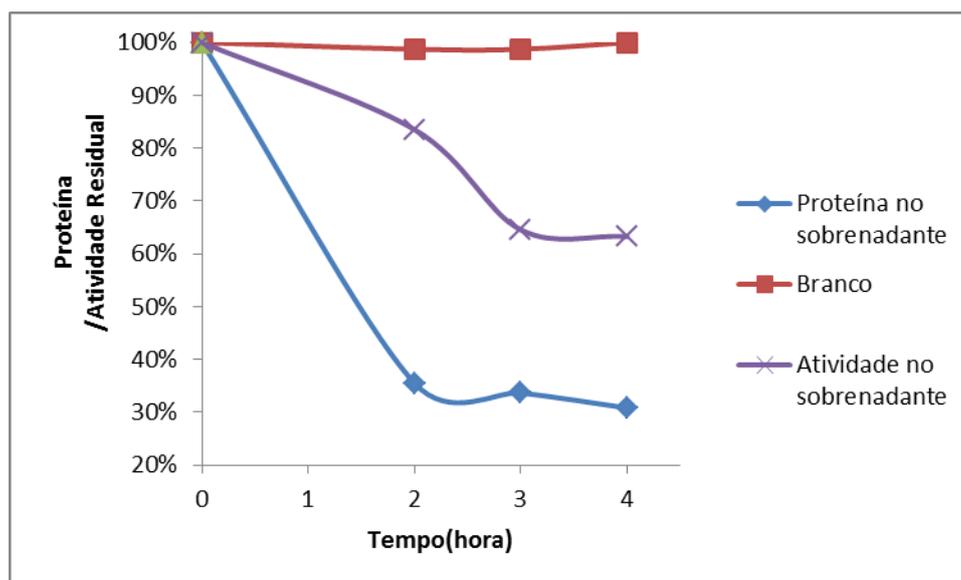


Figura 4.8.: Perfil de imobilização de BG comercial em resina carboxil-poliacrílica a 25°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).

Pode-se observar na Figura 4.8 que o equilíbrio de adsorção (em termos de proteína e atividade) foi atingido após 3 horas de imobilização. Ao final de 4h foram obtidos rendimentos de imobilização de 70% e 35%, respectivamente em termos de proteínas e atividade. O derivado preparado apresentou

atividade de 17,86 U/g_{suporte}, o que corresponde uma recuperação de atividade de 97%.

Como nas condições de imobilização (25°C, pH 4,8) não houve inativação da enzima solúvel, conclui-se que proteínas contaminantes são rapidamente imobilizadas em resina carboxil-poliacrílica, permanecendo a BG em solução BG numa forma mais pura.

A solução enzimática inicial e o sobrenadante final da imobilização de BG em resina carboxil-poliacrílica foram submetidos à cromatografia líquida de exclusão de tamanho (Figura 4.9), observando-se que as proteínas contaminantes na preparação enzimática comercial imobilizaram preferencialmente na resina (o 1º pico em ambos os cromatogramas referem-se às proteínas contaminantes, e o 2º pico refere-se à BG).

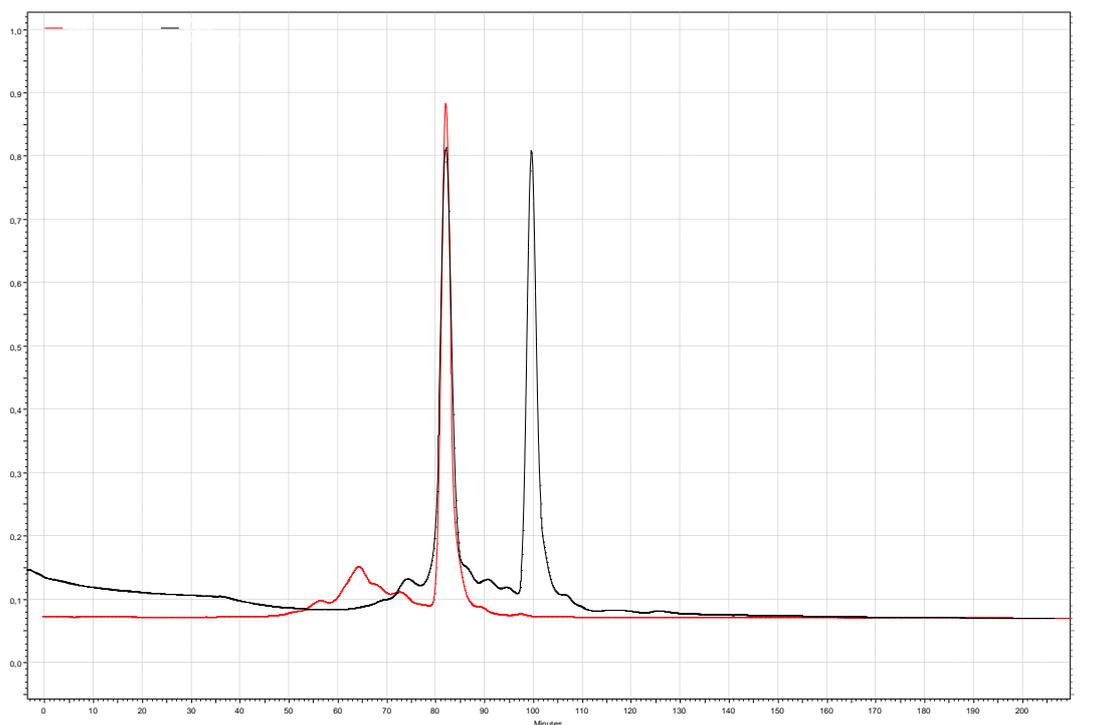


Figura 4.9 Distribuição de massa molecular de BG por cromatografia líquida de exclusão de tamanho (SE-HPLC). Linha preta = solução enzimática inicial de BG; Linha vermelha = sobrenadante final da imobilização de BG em resina carboxil-poliacrílica.

Fez-se um teste de carregamento para a resina carboxil-poliacrílica, sendo oferecidos 3,5; 8,6; 20,6; 32,2 e 52,8 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$. A Tabela 4.2 mostra os rendimentos de imobilização (em termos de proteínas) para as diferentes cargas oferecidas. Pode-se observar que para todas as cargas oferecidas os rendimentos de imobilização foram superiores a 70%.

Tabela 4.2 – Adsorção de BG comercial em resina carboxil-poliacrílica a 25°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), 24h de reação.

Carga oferecida ($\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$)	Carga imobilizada, q_e ($\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$)	Rendimento de imobilização (PI em %)
3,5	3,1	89
8,6	6,0	70
20,6	16,5	80
32,2	27,2	84
52,8	44,3	84

A Figura 4.10 mostra a quantidade de proteína adsorvida no equilíbrio (q_e , em $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$) em função da concentração de proteína em solução no equilíbrio (C_e , em mg/mL).

Analisando o comportamento da curva de adsorção (Figura 4.10) podemos classificá-la como isoterma do tipo S (Sigmoidal). A adsorção inicial é baixa e aumenta à medida que o número de moléculas adsorvidas aumenta. Isso indica que as interações adsorbato-adsorvente são mais fracas que as interações adsorbato-adsorbato e solvente (ou outras moléculas em solução)-adsorvente. Como a adsorção é cooperativa (associação entre moléculas adsorptivas) pode haver a formação de multicamadas no adsorvente (FALONE; VIEIRA, 2004; ALMEIDA, 2003; PORPINO, 2009).

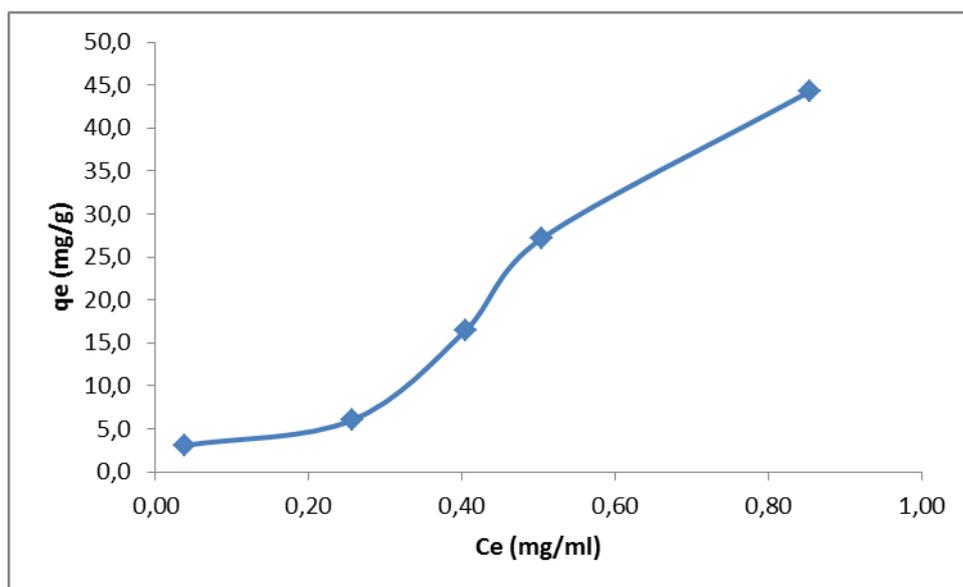


Figura 4.10 Adsorção de BG em resina carboxil-poliacrílica a 25°C, pH 4,8, 24h de reação. As cargas protéicas foram de 3,5; 8,6; 20,6; 32,2 e 52,8 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$.

4.4 Estabilidade térmica

Após serem feitas as imobilizações em suporte sólido por ligação covalente multipontual e por adsorção, foram feitos teste de estabilidade térmica dos derivados obtidos.

4.4.1.- Estabilidade térmica de BG imobilizada em glioxil-agarose

BG imobilizada em glioxil-agarose foi incubada a 65°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), por 4h. As atividades residuais em função do tempo são mostradas na Figura 4.11. Podemos observar que a BG imobilizada em glioxil-agarose em pH 10 por 1 h e em pH 9 por 24 horas, apresentam o mesmo perfil de inativação. Este resultado pode ser justificado pelo fato das

ligações covalentes serem formadas mais lentamente em um pH mais baixo. Já os derivados preparados com 48 e 72 horas em pH 9, são inativados mais lentamente devido, provavelmente, à formação de múltiplas ligações entre enzima e suporte, tornando o derivado mais estável frente a temperatura.

Para se estimar a meia-vida ($t_{1/2}$) da BG immobilizada em glioxil-agarose em pH 9 por 72 horas, prolongou-se o tempo de incubação do derivado a 65°C, pH 4,8. O perfil de inativação é mostrado na Figura 4.12.

A partir dos dados experimentais mostrados nas Figuras 4.11 e 4.12 foram determinados os parâmetros de inativação térmica. A constante de desativação térmica e o tempo de meia-vida foram calculados pelo método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987). Os parâmetros estimados pelo ajuste do modelo ao dados experimentais são apresentados na Tabela 4.3.

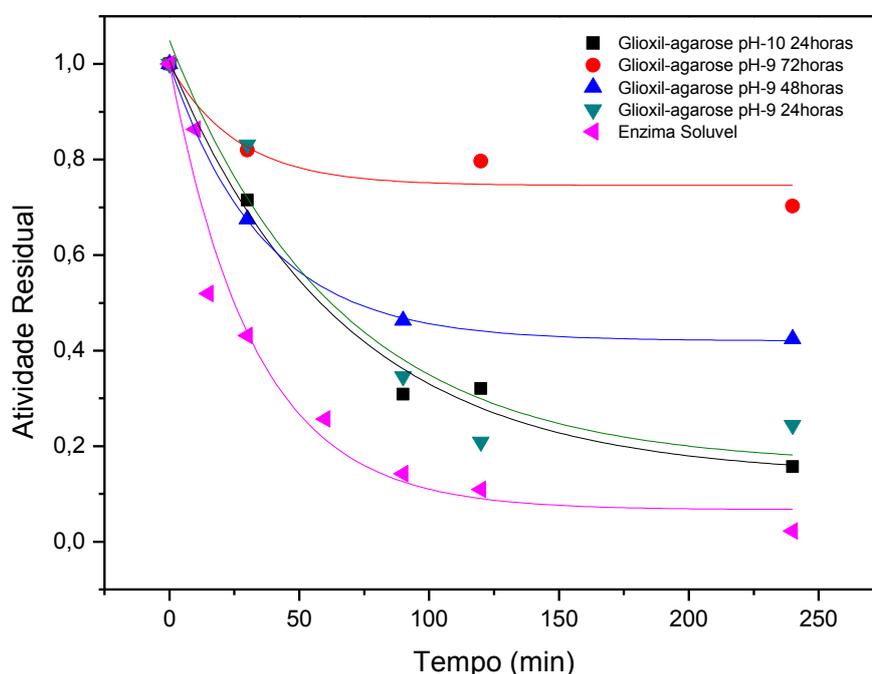


Figura 4.11: Perfil de inativação térmica de BG livre e immobilizada em glioxil-agarose, a 65° C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).

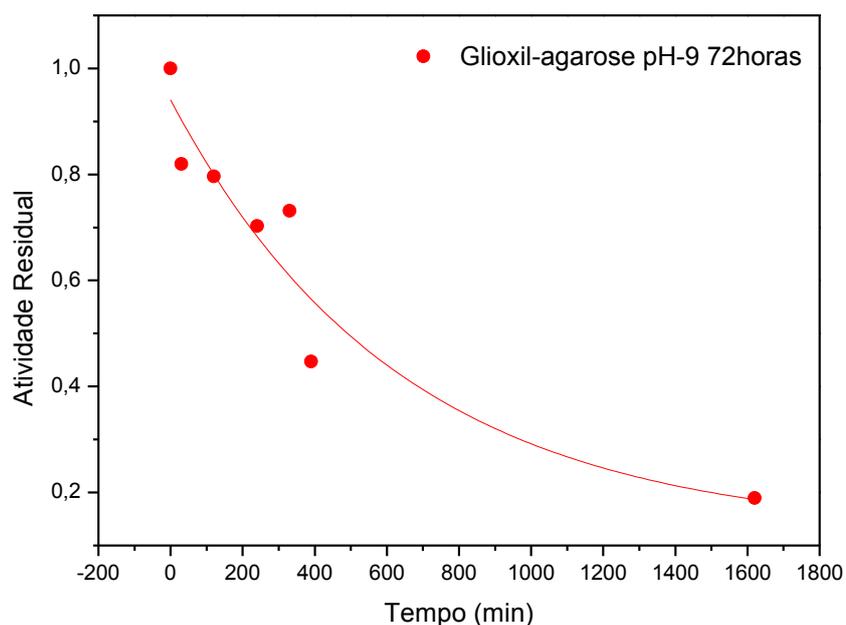


Figura 4.12: Perfil de inativação térmica de BG immobilizada em glicoxil-agarose (por 72h a pH 9,0) a 65° C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).

Tabela 4.3 – Parâmetros de inativação térmica a 65°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM).de BG livre e immobilizada em glicoxil-agarose.

Biocatalisador	k_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	FE
BG livre	0,031	24,9	1
BG-GA pH-10, 1h	0,015	56,7	2
BG-GA pH-9, 24h	0,015	53,4	2
BG-GA pH-9, 48h	0,028	71,1	3
BG-GA pH-9, 72h	0,0016	599,2	24

k_d = constante de inativação de 1ª ordem; $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida; FE = fator de estabilidade; BG-GA = β -glicosidase immobilizada em glicoxil-agarose.

De acordo com os parâmetros de inativação térmica mostrados na Tabela 4.3, podemos observar que as estabilidades térmicas da BG immobilizada em

glioxil-agarose pH 10 por 1 hora e em pH 9 por 24 horas são duas vezes superiores aquela da enzima livre. Já o derivado imobilizado a pH 9 por 48 horas é três vezes mais estável comparado com a enzima livre e o derivado imobilizado com 72 horas é vinte e quatro vezes mais estável que a enzima livre. Essa maior estabilidade deve-se, provavelmente, à formação de ligações covalentes multipontuais entre enzima e suporte, promovidas pelo maior tempo de contato enzima-suporte, tornando assim a estrutura da molécula imobilizada mais rígida e, portanto, mais estável.

4.4.2.- Estabilidade térmica de BG imobilizada em resina carboxil-poliacrílica

O derivado obtido da imobilização de BG em matriz carboxil-poliacrílica foi incubado em tampão citrato 50 mM, pH 4,8 a 65°C por 4 horas, nas mesmas condições da enzima livre. A Figura 4.13 mostra o perfil de inativação térmica da BG.

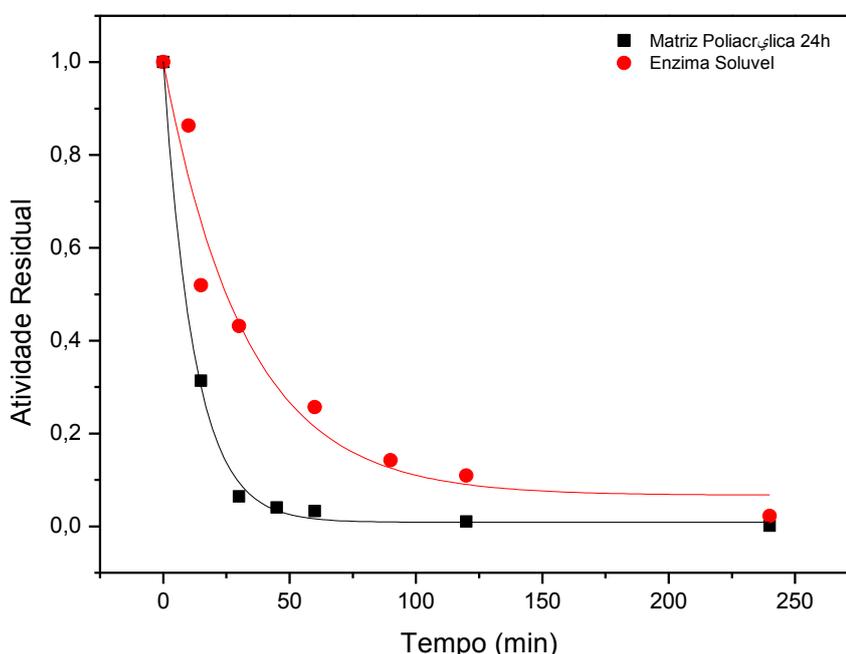


Figura 4.13: Perfil de inativação térmica a 65° C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM) de BG livre e imobilizada em matriz carboxil-poliacrílica (24h a pH 4,8).

Observa-se na Figura 4.13 que a enzima imobilizada inativou-se mais rápido que a enzima solúvel. Esta foi aproximadamente três vezes mais estável que a enzima imobilizada em resina carboxil-poliacrílica, como mostra a Tabela 4.4. A menor estabilidade da enzima imobilizada é justificável. A imobilização por adsorção normalmente não conduz a grandes estabilizações de enzimas, pois as forças de ligação entre suporte e enzimas são fracas (van der Waals, interações eletrostáticas, etc.). Além disso, a enzima solúvel comercial apresenta conservantes em sua formulação, adicionados para aumentar o tempo de vida de prateleira. Durante a imobilização da enzima, esses conservantes não são imobilizados, podendo assim diminuir a meia-vida da enzima imobilizada. Entretanto, a enzima imobilizada por adsorção tem as seguintes vantagens: fácil recuperação do meio reacional por filtração convencional, reutilização, possibilidade de operação contínua, regeneração do suporte, etc.

Tabela 4.4 – Parâmetros de inativação térmica a 65°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM) de BG livre e imobilizada em resina carboxil-poliacrílica.

Biocatalisador	k_d (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	FE
BG solúvel	0,031	24,9	1
BG-MP pH-4,8, 24h	0,082	8,6	0,34

k_d = constante de inativação de 1ª ordem; $t_{1/2}$ = tempo de meia-vida; FE = fator de estabilidade; BG-MP = β -glicosidase imobilizada em resina carboxil-poliacrílica.

4.5 Aplicações de BG livre e imobilizada em reações de hidrólise

Para testar a eficiência dos derivados de BG preparados em glioxil-agarose e resina carboxil-poliacrílica, comparada à eficiência da enzima

solúvel, foram feitos ensaios de hidrólise de celobiose comercial e de bagaço de cana-de-açúcar.

4.5.1- Hidrólise de celobiose comercial

Celobiose comercial (25 g/L) foi hidrolisada a 50°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM) com BG solúvel e imobilizada em glioxil-agarose e matriz carboxil-poliacrílica. Em todos os ensaios a relação enzima/substrato foi de 56,7 U/g_{celobiose}. Os perfis de conversão em função do tempo são mostrados na Figura 4.14

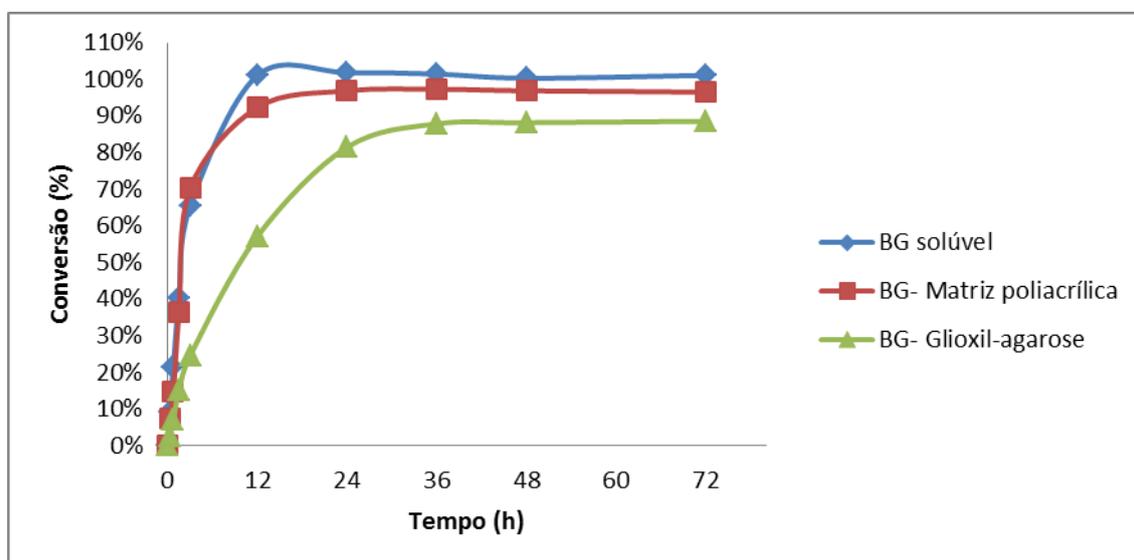


Figura 4.14: Perfil de conversão de celobiose com o tempo a 50°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), razão enzima/substrato igual a 56,7 U/g_{celobiose}.

Pode se observar na Figura 4.14 que celobiose foi totalmente convertida em glicose com 12 horas de reação quando BG solúvel foi utilizada. Utilizando-se o derivado preparado em matriz carboxil-poliacrílica, o perfil de hidrólise foi similar ao da enzima solúvel no início da reação, atingindo 90% de conversão após 12 horas. Conversão de 97% foi obtida com 24 horas de reação. O

derivado preparado em glioxil-agarose hidrolisou mais lentamente o substrato, sendo necessárias 36 horas para uma conversão de 89%.

4.5.2- Hidrólise de Bagaço da Cana-de-açúcar

Bagaço de cana pré-tratado (10% m/v, base seca) foi hidrolisado a 50°C, pH 4,8 (tampão citrato de sódio 50 mM), por 24h, utilizando celulase solúvel (Genencor Acellerase 1500) na relação enzima/substrato de 20 FPU/g_{celulose}. Hidrólises nas mesmas condições foram realizadas suplementando o meio reacional com BG imobilizada (BG-glioxil-agarose e BG-resina poliacrílica) na relação enzima/substrato 120 U/g_{celulose}.

A Figura 4.15 mostra que a suplementação do meio reacional com BG imobilizada contribuiu para a obtenção de maiores conversões de celulose em glicose. Essa maior conversão deve-se ao menor efeito inibitório de celobiose (consumida a uma maior velocidade) sobre as endoglicanases e exoglicanases.

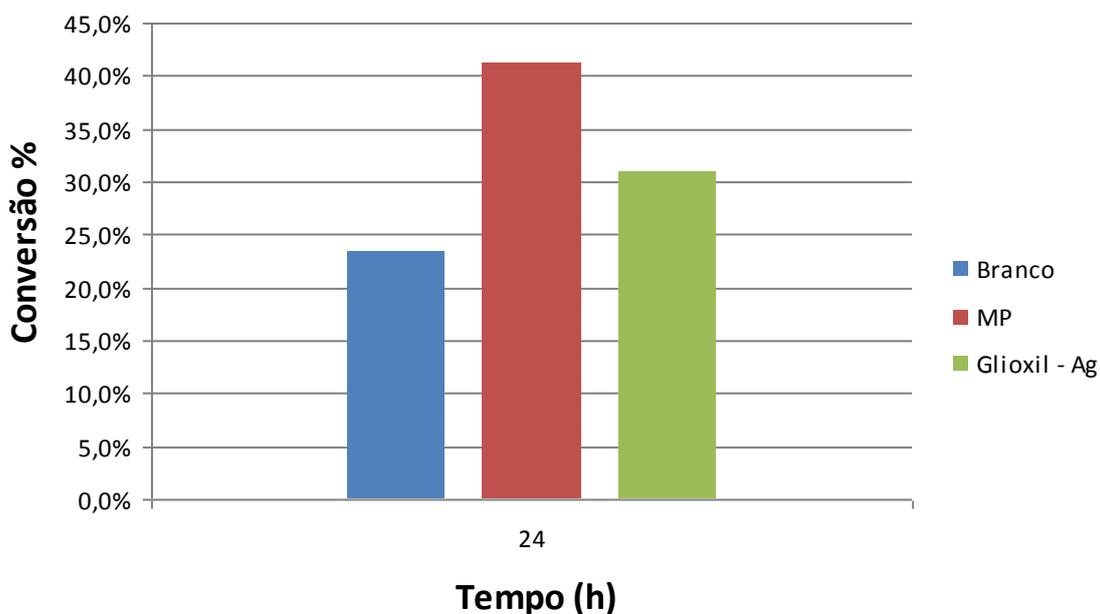


Figura 4.15: Hidrólises de bagaço de cana a 50°C, pH 4,8 com celulase solúvel (azul) 20 FPU/g_{celulose} e celulase solúvel suplementada com BG-glioxil-agarose (verde) e BG-resina poliacrílica (vermelho) 120 U/g_{celulose}.

Hidrólises de bagaço de cana pré-tratado foram realizadas com diferentes tempos de reação nas mesmas condições descritas acima, exceto que a razão celulase solúvel/substrato foi elevada para 40 FPU/g_{celulose}. A Figura 4.16 mostra que conversão próxima a 100% pôde ser obtida com 96h de reação quando o meio reacional foi suplementado com BG immobilizada em resina poliacrílica.

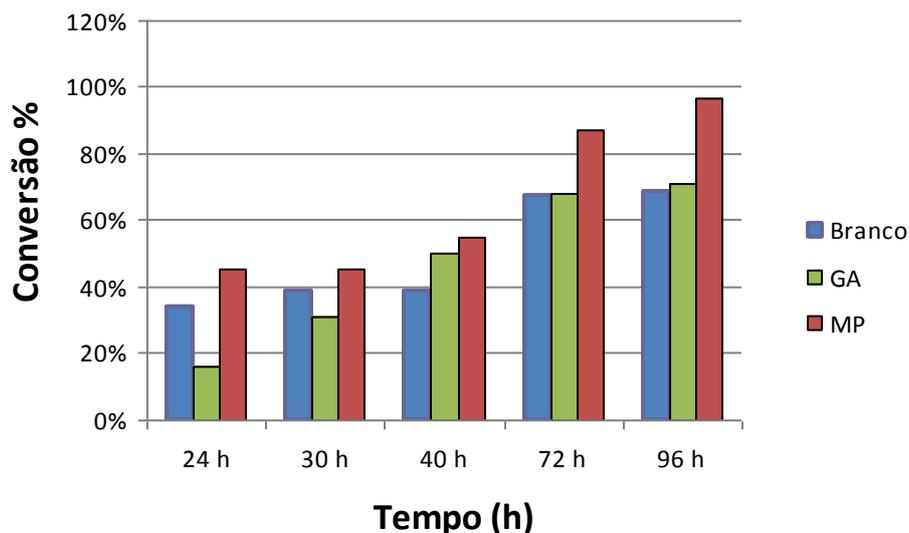


Figura 4.16: Hidrólises de bagaço de cana a 50°C, pH 4,8 com celulase solúvel (azul) 40 FPU/g_{celulose} e celulase solúvel suplementada com BG-glioxil-agarose (verde) e BG-resina poliacrílica (vermelho) 120 U/g_{celulose}.

Hidrólises de bagaço de cana a 50°C, pH 4,8, por 24h, também foram realizadas com o reaproveitamento de BG immobilizada e bagaço não-convertido. O resíduo sólido (bagaço não convertido e BG immobilizada) do final de uma batelada era transferido para a batelada seguinte, contendo celulase solúvel e bagaço “fresco” em quantidade adequada para um total de 10% m/v, base seca. A Figura 4.17 mostra que a conversão reduziu de aproximadamente 60% (1ª batelada) para 35% (5ª batelada).

Conclui-se neste trabalho que a suplementação do meio reacional com BG immobilizada é vantajosa, entretanto, a estabilização de BG immobilizada ainda é necessária.

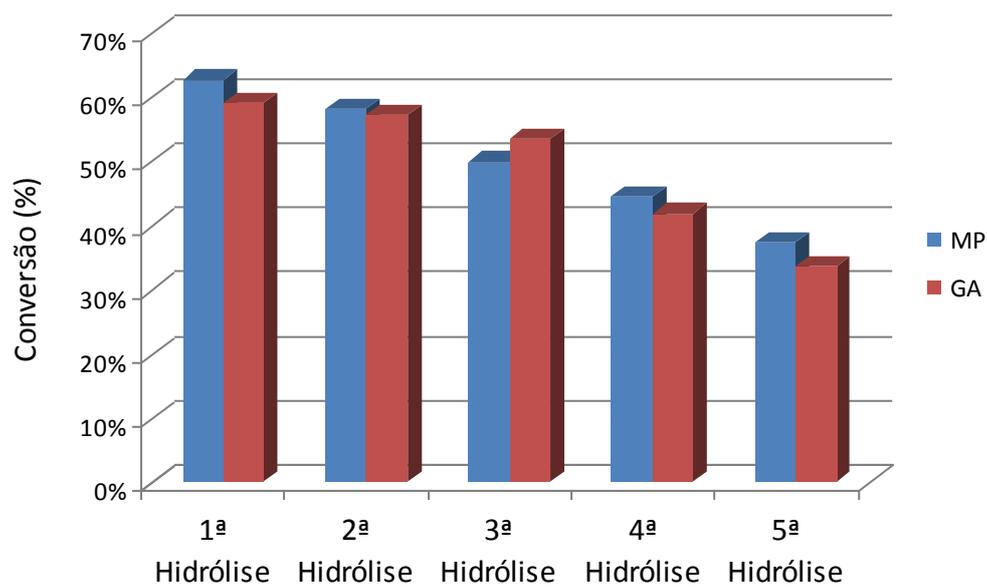


Figura 4.17: Hidrólises repetidas de bagaço de cana a 50°C, pH 4,8, 24h, com 60 FPU/g_{celulose} (celulase solúvel) e 120 U/g_{celulose} (BG imobilizada em glioxil-agarose – vermelho – e em resina poliacrílica – azul).

5 CONCLUSÕES

O objetivo principal do trabalho foi à preparação e seleção de derivados de β -glicosidase imobilizados com elevada atividade catalítica e boa estabilidade térmica, visando à hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ β -glicosidase apresenta boa estabilidade na faixa de pH entre 4,8 e 9,0, entretanto, a pH 10,0 (pH necessário para a formação de ligações covalentes multipontual em glioxil-agarose), esta enzima sofre rápida inativação;
- ✓ β -glicosidase não imobiliza em suporte quitosana-glutaraldeído, podendo ser justificada pelo fato dos grupos amino, necessários para a formação de ligação entre enzima e suporte, não estarem disponíveis para imobilização. Os grupos aminos podem estar esterificamente impedidos por carboidratos (BG de *T. reesei* é uma proteína glicosilada);
- ✓ β -glicosidase imobiliza lentamente em suporte MANAE-agarose e o baixo rendimento de imobilização deve-se provavelmente ao fato da imobilização ter sido realizada em pH abaixo do pI da enzima. E ainda, pelo fato dos resíduos aspartato e glutamato estarem bloqueados por carboidratos ligados à molécula de enzima;
- ✓ Para imobilização de β -glicosidase em suporte glioxil-agarose, é necessária a modificação química da enzima através de aminação;
- ✓ A formação de ligações covalentes multipontuais entre β -glicosidase e glioxil-agarose pode provocar distorções na estrutura tridimensional da enzima, causando mudanças conformacionais em seu centro ativo, levando assim à inativação da enzima. Observou-se que o uso de inibidor competitivo durante o processo de imobilização preserva cerca

de 70% da atividade do derivado. Entretanto, o inibidor (glicose) não se mostrou eficiente na etapa de redução com borohidreto de sódio;

- ✓ Imobilização de β -glicosidase em resina poliacrílica ativada com grupos carboxílicos por adsorção iônica rendeu derivados com alta atividade, entretanto, com estabilidade três vezes menor que a da enzima solúvel;
- ✓ Os ensaios de estabilidade térmica para os derivados de glioxil-agarose mostraram que quanto maior o tempo de imobilização, maior a estabilidade térmica da enzima imobilizada, devido provavelmente à formação de ligações covalentes múltiplas entre enzima e suporte;
- ✓ O ensaio de estabilidade térmica para o derivado preparado por adsorção de β -glicosidase em resina carboxil-poliacrílica mostrou que a presença de protetores na enzima comercial a torna mais estável, e quando imobilizada em matriz poliacrílica o derivado se torna menos estável por não estar mais na presença de protetores;
- ✓ Nos ensaios de hidrólise, o derivado preparado por adsorção de β -glicosidase em resina carboxil-poliacrílica converteu 96% de celobiose em 24 horas; entretanto, a hidrólise catalisada pelo derivado preparado por imobilização covalente de β -glicosidase em glioxil-agarose foi mais lenta, devido provavelmente a efeitos estéricos, conformacionais e/ou difusionais. A conversão em 36h de reação foi de 89%;
- ✓ Hidrólise de bagaço de cana com celulase comercial solúvel suplementada com β -glicosidase imobilizada em resina carboxil-poliacrílica rendeu 100% de conversão em aproximadamente 96 horas de reação;
- ✓ A suplementação do meio reacional de hidrólise de bagaço de cana com β -glicosidase imobilizada é vantajosa, pois o efeito inibitório da celobiose sobre as endoglucanases e exoglucanases é menor, conduzindo a maiores conversões de celulose em glicose. Entretanto, a estabilização de β -glicosidase imobilizada ainda é necessária.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para dar continuidade ao estudo realizado, recomendam-se as seguintes etapas:

- ✓ Purificação da BG comercial por cromatografia de troca iônica, exclusão de tamanho, bioafinidade, dentre outras;
- ✓ Estudar a etapa de redução dos derivados preparados em glioxil-agarose na presença de agentes redutores menos agressivos e/ou na presença de agentes protetores;
- ✓ Testar entrecruzamento enzima-suporte após adsorção de BG em resina poliacrílica funcionalizada com grupos carboxílicos, visando obter um derivado mais estável;
- ✓ Caracterização da BG purificada quando ao grau de glicosilação. Por exemplo, hidrólise ácida seguida de quantificação de açúcares;
- ✓ Testar a imobilização de BGs de outros microrganismos ou outras fontes comerciais;
- ✓ Testar diferentes configurações de reatores visando o uso repetido de BG imobilizada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W.S.; BRASILEIRO, D.D.; GONÇALVES, L.R.B. Influência da Concentração de Glutaraldeído no Estudo da Imobilização de Penicilina G Acilase em Quitosana. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. 2003.

ADRIANO, W.S. et al. Stabilization of penicillin g acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** v. 22, p. 529-538. 2008.

AGBLEVOR, F. A.; JOST WEBER. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulose production. **Process Biochemistry**, v. 40. P. 669-679. 2004

AKIYAMA, T.; KAKU, H.; SHIBUAT, N. A cell wall-bound beta-glucosidase from germinated rice: purification and properties. **Phytochemistry**, v.48, p.49-54. 1998.

ALMEIDA, M. R. M. G. **Estudo da purificação do ácido clavulânico utilizando processo contínuo de purificação**. 2003. 170 p. Tese (doutorado), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2003.

ALVARO, G.; BLANCO, R.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J.M. Immobilization–stabilization of penicillin G acylase from *E. coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 210–214. 1990.

ANTCZAK, M.S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185–1194. 2009.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plat cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719-739. 2005.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23-29. 1998.

ARRUDA, E.J. **Concentração e Purificação de b-amilase de Extrato de Soja por Adsorção em Gel de Afinidade Quitosana-fenilboronato**. 1999. Tese(Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos.

ASHBY, A. M. Biotrophy and the cytokinin conundrum. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57,p.147-158. 2000.

AYUAB A.Z. et. al. Cellulase an Xylanase production by isolated amazon Bacillus Straits using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33. p. 231-218. 2002.

BARNETT, C. C., BERKA,R.M. AND FOWLER,T. Cloning and amplification of the gene encoding na extracellular beta-glucosidase from Trichoderma reesei: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates; **Journal Biotechnology** (N.Y.), v.9, n. 6, p. 562-567 .1991.

BÉGUIN P. Molecular biology of cellulase degradation **Annual Rewien of Microbiology**, v. 44, p. 219-248. 1990.

BEGUIN, P., AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 25-58. 1994.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34. 2004.

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, p. 583-6920. 1997.

BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial b-glucosidases: cloning, properties and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v.22, p. 375-407. 2002.

BLANCH, H. W.; CLARCK, D. S. **Biochemical engineering**. New York: Marcel Dekker Inc. 1997.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Protecting effect of competitive inhibitors during very intense insolubilized enzyme-activated support multipoint attachments: trypsin (amine)-agarose (aldehyde) system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 227-232. 1988a.

BLANCO, R.M.; GUISAN, J.M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydre reduction of trypsin-agarose derivates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 360-366. 1988b.

BOFO, et. al: Comparação da eficiência da imobilização das leveduras Saccharomyces cerevisiae CB-IX(osmotolerante) e S. cerevisiae ATCC 9763 em bagaço de cana-de-açúcar. **Braz J. Food Technol.** 5° SIPAL, p. 121-124. 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, Issues 1-2, p. 248-254. 1976.

BRAUN, J.; CHANU, P.L. E GOFFIC, F.L. The immobilization of Penicillin G Acylase on Chitosan, **Biotechnology and Bioengineering** 33, p. 242-246. 1989.

BRÍGIDA, A.I.S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 67-80. 2007.

BRZOBOHATY, B. et al. Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. **Science**, v.262, p. 1051-1054. 1993.

BUDRIENE, S. et al. β -galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Central European Journal of Chemistry**, v.3, n.1, p.95-105. 2005.

CALSAVARA, L. P. V.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Comparison of Catalytic Properties of Free and Immobilized Cellobiase Novozym 188. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 615-626. 2001.

CAMPBELL, C.J.and LAHERRÉRE, J. H. The end of cheap oil. **Scientific American**, p. 60. 1998.

CETINUS, S. A. e OZTOP, H. N. Immobilization of Catalase on Chitosan Film. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p. 497-501. 2000.

CHANG, M- Y.; KAO, H-C; JUANG, R-S. Thermal inactivation and reactivity of b-glucosidase immobilized on chitosan-clay composite. **International Journal of Biological Macromolecule**, v. 43, p. 48-53. 2008.

CHAUVE, M. et al. Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. **Biotechnology for Biofuels**, 3, 3-8. 2010.

CHEN, H.; HAYN, M.; ESTERBAUER, H. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1121, p. 54-60. 1992.

CLARK, T. A., MACKEL, K. L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood **Pinus radiata**. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 34B:101-110. 1984.

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 **CEEP** v.19, n1, p.33-42. 2001.

COENEN, C.; LOMAX, T. L. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. **Trends in Plant Science**, v.2, p. 351-356. 1997.

CONTIERO, J. **Estudo da produção da enzima invertase extracelular por Kluyveromyces bulgaricus**. 1992.Tese(doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas.

COULON, S. et al. Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.74, p.105-114. 1998.

CUNHA, M.A.A. et al. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 61-70. 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630. 2004.

DAY, A. J. et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. **FEBS Letters. Amsterdam**, v.436, p. 71-75. 1998.

de CASTRO, A. M.; PEREIRA Jr., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 1, 181-188. 2010.

de CASTRO, H.F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156. 2004.

DE-PAULA, E. H.; RAMOS, L. P.; AZEVEDO, M. O. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**. Oxford, v. 68, p. 35-41. 1999.

DIENES, D. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and products an International Journal**. V.20 p. 11-21. 2004.

DORI, S.; SOLEL, Z; BARASH, I. Cell wall-degrading enzymes produced by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *in vitro* and *in vivo*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 46, p. 189-198. 1995.

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 33. 1996.

EKLUND, R., GALBE, M., ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 12, p. 225-228. 1990.

EVANS, C. S. Properties of the β -D-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus *Coriolus versicolor*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 128-131. 1985.

FALONE, S. Z.; VIEIRA, E. M. Adsorção/dessorção do explosivo tetril em turfa e em argissolo vermelho amarelo. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 849-854. 2004.

FARINAS, C. S. **Desafios para a produção do etanol celulósico**. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropaq/103612.htm> 13/12/2010>. Acesso em: novembro 2010.

FAURE, D. The Family-3 glycoside hydrolases: from housekeeping functions to host-microbe interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.1485-1490. 2002.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; COWAN, D. A.; WOOD, A. N. P. Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 366-372. 1995.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550. 1993.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2553-2561. 2008.

FREITAS, L.; MENDES, A.A.; DE CASTRO, H.F. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação com lipase imobilizada em resíduo agroindustrial. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 52, p. 88-92. 2003.

GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Autohydrolysis of corn cob: study of non-isothermal operation for xilooligosaccharide production **J. food Eng.**, n. 52, p. 211-218. 2002.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 1-14. 2006.

GERARDI, C. et al. Purification and characterization of a beta-glucosidase abundantly expressed in ripe sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit. **Plant Science**, v.160, p.795-805. 2001.

GERMAIN, D. P. Gaucher's disease a paradigm for interventional genetics. **Clinical Genetics**, v.65,p. 77-86. 2004.

GIORDANO, R.L.C. Perspectiva e desafios para a engenharia química no século XXI em busca do equilíbrio, ou uma política 3R para o planeta terra. **Revista Brasileira de Engenharia Química**; v. 21, n. 3, p.26-30. 2004.

GHOSE, T.K. Measurement of celulase activites. **Pure e Appl. Chem**, v.59, n.2, p. 257-268. 1987.

GRABOWSKI, G. A. et al. Gaucher disease: a prototype for molecular medicine. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 23, p. 25-55. 2002.

GRACE, M. E. et al. Analysis of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis and heterologous expression. **Journal of Biological Chemistry, Bethesda**, v. 269, p. 2283-2291. 1994.

GU, L. et al. A novel methodo to prepare chitosan poder and its aplication in celulase immobilization. **Journal Chem Technol Biotechnol**. 2005.

GUENGUEN, Y. et al. Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*. **Enzyme and Microbial Technology**. New York, v. 17, p. 900-906. 1995.

GUISÁN, J. M.; BLANCO, R. M. Stabilization of trypsin by multiple-point attachment to aldehyde-agarose gels. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 501, p. 67-72. 1987.

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

GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUEZ, V.; BASTIDA, A.;

BLANCO, R. M.; ALVARO, G. Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment to activated pre-existing supports. In van den TWEEL, W. J. J.; HARDER, A.; BUITELAAR, R. M. (Eds.), *Stability and Stabilization of Enzymes. Proceedings of an International Symposium, Maastricht, The Netherlands, 22-25 de Novembro, 1992*, Elsevier Science Publishers B. V. 1993.

GUISAN, J.M. Immobilization of enzymes for use in organic media. In: Guisan JM editor. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa. p. 1-13. 2006.

GUPTA, K.C.; JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrates Polymers**, v. 66, p. 43-54. 2006.

HAERTER, A. C.; VOEGELE, R.T. A novel beta-glucosidase in *Uromyces fabae*: feast or fight? **Current Genetics**, v.45, p. 96-103. 2004

HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, G. V., FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410. 2005.

HARTMEIER, W. **Immobilized biocatalysts**. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1988.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251. 2006.

HAYASHI, S. et al. Emission of 2-phenylethanol from its β -D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [$^2\text{H}_8$] L-phenylalanine in rose flowers. **Tetrahedron**, v. 60, p. 7005-7013. 2004.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Oil Market Report. Disponível em <http://omrpublic.iea.org/omrarchive/10feb11tab.pdf>. Acesso: fevereiro 2011.

ISLAM, M. ET. al. Energy and protein utilization by goats fed Italian ryegrass silagem treated with molasses, urea, cellulose or cellulose + lactic acid bacteria. **Small Ruminant Research**. V. 42. p. 49-60. 2001.

IWASHITA, K.; TODOROKI, K; KIMURA, H; SHIMOI, H; ITO, K. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound β -glucosidase from *Aspergillus Kawachii*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. Tokyo, v. 62, p. 1938-1946. 1998

IWASHITA, K.; NAGAHARA, T; KIMURA, H; TAKANO, M; SHIMOI, H; ITO, K. The Bgla gene of *Aspergillus Kawachii* encodes both extracellular and cell wall-bound β -glucosidase. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 68, p. 5546-5553. 1999.

JANSEN, E.F.; TOMIMATSU, Y. AND OLSON, A.C. Cross-linking of α -chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 144, 394-400. 1971.

KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.S.; HONG, S.I.; KIM, S.W. Production of celullase and hemicellulase by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 91. p. 153-1156. 2004.

KANSOH, A.L. et.al. Biodegradetion and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. **Polymer Degradetion and Stability**. V. 63. P. 373-278. 1998.

KATO, E; KUMAGAI, T; UEDA, M. Concise synthesis of glyconoamidines as affinity ligands for the purification of beta-glucosidase involved in controlo f some biological events icluding plant leaf movement. **Tetrahedron Letters**, v.46, p. 4865-4869. 2005.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Enzyme immobilization. In: Enzyme Technology. **Rehm. H.j. e reed g., editors**. v. 7A, p. 347-406 Weinheim: VCH. 1987.

KENNEDY, J. F.; WHITE, C. A. Principles of Immobilization of Enzymes. In Wiseman, A. (ed). **Handbook of Enzyme Biotechnology**, 2nd Ed., Chichester: John Wiley & Son. 1985.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139. 2004.

KRISHNA S. H.; PRABHAKAR, Y.; RAO, R. J. Saccharification studies of lignocellulosic biomass from *Antigonium leptopus* Linn. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59 , p. 39-42.1997.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27. 2000.

LARSSON, S. *et al.* The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb. Technol.**, 24:151-159. 1998.

LARTIGUE, D. J. **Immobilized enzymes for industrial reactors**. Basic enzymology. In: MESSING, R. A. New York: Academic Press Inc.. p. 11-38. 1975.

LASER M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL, M.J.; LYND R. L. A comparision of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Tech.** v. 81, n. 1, p 33-44. 2002.

LATIF, F.; RAJOCA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corncobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 57-63. 2001.

LEAH, R. et al. Biochemical and molecular characterization of barley seed beta-glucosidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p.15789-15797. 1995.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

LEITE, R. S. R. **Purificação, caracterização físico-química e termodinâmica de b-glicosidase produzidas pelos microrganismos Aureobasidium pullulans e Thermoascus aurantiacus**: Aplicação em isoflavonas e terpenos glicosilados. 2007. 83 p. Tese (doutorado),UNESP, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro,2007.

LEXA, M. et al. Dynamics of endogenous cytokinin pools in tobacco seedlings: a modeling approach. **Annals of Botany**, v. 91, p. 585-597. 2003.

LI, N.; BAI, R. A novel amine-shielded surface cross-linking of chitosan hydrogel beads for enhanced metal adsorption performance. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 6692-6700. 2005.

LI, X.; CALZA, R. E. Purification and characterization of na extracelular β -glucosidase from the rumem fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188. **Enzyme and Microbial Tecnology**, New York, v. 13, p. 622-628. 1991.

LI, Y. K.; LEE, J. A. Cloning and expression of beta-glucosidase from *Flavobacterium meningosepticum*: a new member of family B beta-glucosidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p.144-150. 1999.

LO, A. C.; BARBIER, J.R.; WILLICK, G. E. Kinetics and specificities of two closely related β -glucosidasas secreted by *Schizophyllum commune*. **Europen Journal of Biochemistry**. Oxford, v. 192, p. 175-181. 1990.

LOPES, J. et. al. Fitase e/ou celulase sobre a redução de nitrogênio de fósforo na excreta, em dieta de suínos contendo 50% de farelo de arroz integral. UFRGS. Porto Alegre. 2002.

LOPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1-10, 2005.

LYND R.L., ZHANG P.H.Y. Toward and aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems (Review). **Wiley Periodics**. 2004.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577. 2002

MALCATA, F.X.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL JR., C.G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A review. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910. 1990.

MANRICH, A. et al. Immobilization and Stabilization of Xylanase by Multipoint Covalent Attachment on Agarose and on Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 455-467. 2010.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 11, p. 1300-1311. 2007.

MARTINO, A. et al. Immobilization of β -glucosidase from comercial Preparation Part 1. A comparative Study of Natural Supports, **Process Biochemistry** 31, n°3, pp. 281-285. 1996a.

MARTINO, A.; PIFFERI, P. G.; SPAGNA, G. Immobilization of β -glucosidase from comercial Preparation Part 2. Optimization of the Immobilization Process on Chitosan, **Process Biochemistry** 31, n°3, pp. 287-293. 1996b.

MARTINS, E. M; ADRIANO, W.S.; GIORDANO, R.L.C. Obtenção de derivados imobilizados de celulasas em géis quitosana. XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2005. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Recife. 2005.

MARTINS, R. E. **Estudo de Imobilização de Celulasas em Géis de Quitosana. Dissertação.** 2007. Tese (Mestrado Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos. 2007.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 509-515. 2000.

MATEO, C. et al. Epoxy sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 629-634. 2002.

MATEO, C. et al. 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.

MATEO, C. et al. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1022-1033. 2007a.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463. 2007b.

MCHALE, A; COUGHLAN, M. P. The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*. Purification and characterization of the extracellular and intracellular β -glucosidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.662, p. 152-159. 1981.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases para a Síntese Enzimática de Biodiesel**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2009.

MENDES, A.A. et al. Covalent Attachment of *Aspergillus oryzae* Lipase on Chemically Bound Hybrid Matrices. **10th International Conference on Chitin and Chitosan**, Montpellier-FR, Livro de Abstracts, v. 1. p. 95-96. 2006.

MESSING, R. A. **Immobilized enzymes for industrial reactors**. London: Academic Press Inc., 1984.

MIGNEAULT, I. et al. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **Biotechniques**, 37, 790-802. 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Estatística de produção. Departamento de cana-de-açúcar e agroenergia. 2011.

MONTEIRO Jr., O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, p. 119-128. 1999.

MONTI, R. **Produção de celulase e xilase pelo fungo termófilo *Humicola grisea* variedade *thermoidea* RP-17**: fatores que afetam a produção e propriedades bioquímicas das enzimas. Pós- Graduação-FMRP-USP-Ribeirão Preto, 1989.

MOZAHEV, V. V. et al. Strategy for stabilizing enzymes- Part 1: Increasing Stability of Enzymes via their multipoint. **Biocatalysis Biotransformation**, v. 3, n. 3, p. 179-187. 1999.

MÜHLBACH, P. R. F. et. al. Silagem de alfafa colhida no início do florescimento e submetida ao emurchimento e à ação do aditivos biológicos. **Revista brasileira de zootecnia**, v. 29, p. 349-356. 2000.

MURRAY, R. K. et al. Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixty Edition, **Lange Medical Books/MacGraw-Hill**: New York, Cap. 47. 2003

NEMETH, K. et al. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. **European Journal of Nutrition**, v.42, p. 29-42. 2003.

NIDTZKY, B. et al. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interation. **Biochm. J.** 298. 705-710. 1994.

OPARISSI, R. et al. Characterization of a rice beta-glucosidase highly expressed in flower and germinating shoot. **Plant Science**, v. 165, p. 627-638. 2003.

OTERO, C.; ROBLEDO, L.; ALCANTARA, A.R. Study of the stabilization of pure lipases: comparison of two different lipase-microgel derivates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.1, p. 23-28. 1995.

PALOMO, J.M. et al. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophonic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open formo f lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzumatic**, v. 19-20, p.279-286. 2002.

Palomo, J. M; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Fernández-Lorente,G.; Guisán, J.M; Fernández-Lafuente,R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. **Jornal Cromatogr.A.**, 1038, p. 267-273. 2004.

PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. **Adv. Biochem. Eng.**, 38:53-87. 1989.

PEDROCHE, J. et al. Estabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 711-718. 2002.

PEREIRA, G. H. A. **Estudo da Imobilização Multipontual da Penicilina G Acilase em Sílica Ativada com Grupos Glioxil**. 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

PEREZ, V.H. et al. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 13-19. 2007.

PETTERSON, L. G. GHOSE, T. K., GHOSH, P. Bioconversion of Cellulosic Substance. **Journal of Applied Chemical Biotechnology**, v. 28, p. 309-320. 1978.

PORPINO, K. K. P. **Biossorção de ferro (II) por casca de caranguejo *Ucides cordatus***. 2009. 90 p. Dissertação (mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2009.

RAMOS L.P. The chemistry involved in the steam treatment lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, 863-871. 2003.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975 - 3981. 2008.

REUVENI, M. et al. β -glucosidase activity is involved in scent production in Narcissus flowers. **Plant Science**, v. 147, p. 19-24. 1999.

RIOU, C. et al. Purification, characterization, and substrate specific of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental microbiology**, v. 64, p. 3607-3614. 1998.

RODRIGUES, D.S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, p. 100-109. 2008.

RUEGGER J.S. et al. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia- Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. V.27 n.2 p.205-211. 2004.

RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial technology**, v. 2, p. 91-102. 1980.

SADANA, A; HENLEY, JP. Single-step unimolecular non-firstorder enzyme deactivation kinetics. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 30, p.717–723. 1987.

SANDRENA, M; J,S, MITCHINSON. Struture and biochemical studies of GH family 12 cellulases; improved thermal satability, and ligand complex. **Process in Biophysics and Molecular Biology**, v. 8, p. 9246-291. 2005.

SANTANA, J.; SOUZA, S. O. Subproduto da cana-de-açúcar. **Informe agropecuário**, 10:22-26. 1984.

SANZ-APARICIO, J. et al. Crystal struture of beta-glucosidase A from *Bacillus polymyxa*: Insights into the catalytic in Family 1 glycosyl hydrolases. **Journal of Molecular Biology**, v. 275, p. 491-502. 1998.

SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, p. 509-521. 2004.

SCHUCHARDT, U. ; RIBEIRO, M. L. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Quim. Nova**, Vol. 24, No. 2, 247-251. 2000.

SERFOGLOU, E.et al. Smectite clays as solid supports for immobilization of b-glucosidase: synthesis, characterization, and biochemical properties. **Chem. Mater**, v. 20, p. 4106–4115. 2008.

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. New York: John Wiley. **Cap I: Enzymes as biological catalysts**. Wiley, New York , 1975.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662. 2001.

SHENG JING et. al. Immobilization of cellulose using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. **Jornal of membrane science**. V. 155. p. 101-106. 1998.

SPAGNA, G.; ANDREANI, F.; SALATELLI, E. Immobilization of alpha-L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan, **Process Biochemistry**, v. 33, n.1, p. 57-62. 1998.

STAPLES, R. C.; MAYER, A. M. Putative virulence factors of botrytis cinerea acting as a wound pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 134, p.1-7. 1995.

SYNOWIECKI, J.; WOLOSOWSKA, S. Immobilization of thermostable β -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1417-1422. 2006.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass e Bioenergy**, v.10, p. 367-375. 1996.

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood cellulose enzyme production**. 2000. Ph.D. Thesis. Sweden: Dept. of Chemical Engineering 1, Lund University, 2000.

TANNER, D.R. et al. The effect of pH on the foam fraction of β -glucosidase and cellulose. **Bioresource Technology**. V.87. p. 247-253. 2002.

TARDIOLI, P.W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro do queijo usando carboxipeptidase A e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose**. Tese (Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos. 2003.

TARDIOLI, P.W. et al. 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. et al. Hydrolysis of proteins by immobilized–stabilized alcalase-glyoxyl agarose. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 352–360. 2003b.

TARDIOLI, P. W. et al. Immobilization-stabilization of glucoamylase: chemical modification of the enzyme surface followed by covalent attachment on highly activated glyoxyl-agarose supports. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 409-412. 2011.

TORRES, R. et al. **A novel heterofunctional epoxy-amino sepabeads for a new enzyme immobilization protocol: Immobilization-stabilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae***. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1056-1060. 2003.

TU, M. et al. Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 151-156. 2006.

UEDA, M. et al. Leaf-movement factors of nyctinastic plant, *Phyllanthus urinaria* L.; the universal mechanism for the regulation of nyctinastic leaf-movement. **Tetrahedron**, v. 55, p. 5781-5792. 1999.

VALLANDER, L. ERIKSSON, K. E. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 27, p. 650-659. 1985.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos. 2009.

VIEIRA, M. P. et al. β -glucosidase immobilized and stabilized on agarose matrix functionalized with distinct reactive groups. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 47-53. 2011.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148. 2000.

VOGEL. A.I. **Análise inorgânica quantitativa.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Dois S. A. 1981.

WALLECHA, A.; MISHRA, S. Purification and characterization of two β -glucosidase from a thermo-tolerant yeast *Pichia etchellsii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1649, p. 74-84. 2003.

WARREN, R.A.J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. **Annual review of Microbiology**, v 50, p. 183-212. 1996

WEN, Z. et. al. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 491-499. 2004.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences.** 2 ed. New York: marcel Dekker Inc. 1994 .

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 44, p. 325-337. 2001

WOODWARD, J.; WISEMAN, A. Fungal and other β -D-glucosidases- their properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 73-79. 1982.

WU, F.C., TSENG, R.L; JUANG, R. S.; Enhanced abilities of highly swollen chitosan beads for colour removal and tyrosinase immobilization, **Jornal of Hazardous Materials** 81, p. 167-177. 2001.

WULFF, N., A. **Caracterização enzimáticas das celulases XF-810, XF-818 e XF- 2708 de Xylella fastidiosa e purificação da proteína XF-818, expressas em Escherischia Coli.** 2002. Tese (Doutorado em biologia agrícola). USP- Piracicaba, 2002.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. **Bioresour. Technol.**, 50:3-16. 1994.

XIA, L, SHEN. X. Production and immobilization of cellobiase from *Aspergillus niger* ZU-07. **Process Biochemistry**. V.39. p.1363-1367. 2003.

YAZDI, M. T. et al. Purification and characterization of two intracellular β -glucosidases from the *Neurospora crassa* mutant cell-1. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, New York, v. 19, p. 79-84. 2003.

ZABORSKY, O. R.; **Immobilized Enzymes.** National Science Foudation CRC Press inc. 2 ed. 1977.

ZANIN, G. M.; MORAES, F.F. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** Legis Summa: Ribeirão Preto, cap.4, p.35-85. 2004.

ZANOELO, F. F. et al. B-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS microbiology Letters**, v. 240, p. 137-143. 2004.

ZHANG P.H.Y., HIMMEL, M.E.; MIELENZ J.R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v.24, p.452- 481. 2006.

ZHAO, H.; GRABOWSKI, G. A. Gaucher disease: perspectives on a prototype lysosomal disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 694-707, 2002.